

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-512061
(P2025-512061A)

(43)公表日 令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 6
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全69頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-560444(P2024-560444)		(71)出願人	522343120	
(86)(22)出願日	令和5年4月11日(2023.4.11)			ユニキュアー バイオファーマ ビー. ブイ.	
(85)翻訳文提出日	令和6年11月28日(2024.11.28)			UNIQUE BIOPHARMA B . V .	
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/059361			オランダ王国, 1 1 0 5 ビーピー アムステルダム, パースフーフエルヴェーク 2 5	
(87)国際公開番号	WO2023/198663		(74)代理人	100107456	
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)			弁理士 池田 成人	
(31)優先権主張番号	22168001.0		(74)代理人	100162352	
(32)優先日	令和4年4月12日(2022.4.12)			弁理士 酒巻 順一郎	
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		(74)代理人	100123995	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			弁理士 野田 雅一	
		最終頁に続く	(72)発明者	バレス サンチュス, アストリッド	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 S N C A の核酸調節

(57)【要約】

本発明は、2つ以上のRNAコード配列を含む核酸に関し、ここで、配列の少なくとも1つは、SNC A遺伝子の一部に実質的に相補的なガイド配列を含む。本発明はまた、関連するAAV、組成物、医薬組成物及びその治療における使用に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 の RNA をコードする配列及び第 2 の RNA をコードする配列を含む核酸であって、

i . 前記第 1 及び第 2 の RNA は、それぞれヘアピンを含み、

i i . 前記第 1 の RNA は、アルファシヌクレイン (S N C A) 遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも 19ヌクレオチドの第 1 のガイド配列を含み、

i i i . 前記第 2 の RNA は、 S N C A 遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも 19ヌクレオチドの第 2 のガイド配列を含む、

第 1 の RNA をコードする配列及び第 2 の RNA をコードする配列を含む核酸。

10

【請求項 2】

5' から 3' 方向において、前記第 1 の RNA をコードする前記配列の後に少なくとも 15ヌクレオチドを含む第 1 のスペーサが続く、前記第 1 のスペーサの後に前記第 2 の RNA をコードする前記配列が続く、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

前記第 1 の RNA が、配列番号 11、配列番号 101、及びそのバリエーションから選択される配列を含み、前記第 2 の RNA が、配列番号 11 又はそのバリエーションを含む、請求項 1 又は請求項 2 に記載の核酸。

【請求項 4】

前記第 1 の RNA 及び前記第 2 の RNA が、それぞれ配列番号 11 又はそのバリエーションを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の核酸。

20

【請求項 5】

第 3 の RNA をコードする配列を更に含み、前記第 3 の RNA が配列番号 34 又はそのバリエーションを含む、請求項 4 に記載の核酸。

【請求項 6】

5' から 3' 方向において、前記第 3 の RNA をコードする前記配列の後に少なくとも 15ヌクレオチドを含む第 2 のスペーサが続く、前記第 2 のスペーサの後に前記第 1 の RNA をコードする前記配列が続く、前記第 1 のスペーサ及び前記第 2 の RNA をコードする前記配列が続く、請求項 5 に記載の核酸。

【請求項 7】

前記第 3 の RNA が、前記第 3 の RNA の m i R 144 プロセッシング及び／又は発現を低減又は排除するように変異している、請求項 5 又は請求項 6 に記載の核酸。

30

【請求項 8】

前記ガイド配列のそれぞれが、配列番号 4 ～ 配列番号 10 からなる群から選択される配列と実質的に相補的である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の核酸を含む発現カセットであって、DNA 分子である、発現カセット。

【請求項 10】

前記核酸が、プロモータ及び場合によりポリ A シグナルに作動可能に連結されている、請求項 9 に記載の発現カセット。

40

【請求項 11】

前記発現カセットが、少なくとも 1 つの AAV 逆位末端配列 (I T R) に隣接している、請求項 9 又は請求項 10 に記載の発現カセット。

【請求項 12】

請求項 9 ～ 11 のいずれか一項に記載の発現カセットを含む、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター。

【請求項 13】

AAV5 カプシドタンパク質又は AAV9 カプシドタンパク質を含む、請求項 12 に記載の AAV ベクター。

50

【請求項 1 4】

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の発現カセット、又は請求項 1 2 若しくは請求項 1 3 に記載の A A V ベクターと、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 1 5】

医薬品として使用するための、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の発現カセット、又は請求項 1 2 若しくは 1 3 に記載の A A V ベクター、又は請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記 S N C A 遺伝子によってコードされる R N A の発現を低下させる治療に使用するための、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の発現カセット、又は請求項 1 2 若しくは請求項 1 3 に記載の A A V ベクター、又は請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

前記治療が、 α -シヌクレイン凝集体の量並びに／又はレビー及び／若しくは P a p p - L a n t o s 体の量を減少又はノックダウンする、請求項 1 6 に記載の使用のための、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の発現カセット、又は請求項 1 2 若しくは請求項 1 3 に記載の A A V ベクター、又は請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

前記医薬品が、パーキンソン病（P D）、レビー小体型認知症（D L B）、多系統萎縮症、神経精神症状、パーキンソン病（P D）の運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害、及び／又は嗅覚障害を治療及び／又は予防するために使用される、請求項 1 6 又は請求項 1 7 に記載の使用のための、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の発現カセット、又は請求項 1 2 若しくは請求項 1 3 に記載の A A V ベクター、又は請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の発現カセット、請求項 1 2 若しくは請求項 1 3 に記載の A A V ベクター、又は請求項 1 4 に記載の医薬組成物を含むキットであって、免疫抑制化合物を更に含む、キット。

【請求項 2 0】

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の発現カセット、又は請求項 1 2 若しくは請求項 1 3 に記載の A A V ベクターでトランスフェクトされた細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、バイオテクノロジー、医学及び遺伝子治療の分野に関する。具体的には、本発明は、2 つ以上の R N A コード配列を含む核酸に関し、ここで、その配列は、 α -シヌクレイン（S N C A）遺伝子の一部に実質的に相補的なガイド配列を含む。本発明はまた、関連する A A V、組成物、医薬組成物及びその治療における使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

線維性 α -シヌクレイン封入体は、2 つの主要な神経変性疾患クラス：パーキンソン病（P D）及びレビー小体型認知症（D L B）を含むレビー小体型疾患、並びに多系統萎縮症（M S A）を含む、P a p p - L a n t o s 体を特徴とするものを定義する。これらはまとめてシヌクレイン病と呼ばれる。

【0 0 0 3】

P D は、振戦、硬直、運動緩慢及び／又は姿勢不安定性等のいくつかの運動症状を含む複雑な進行性神経変性障害である。非運動症状もまた、臨床診断の前及び／又は後に P D

10

20

30

40

50

患者において観察される。非運動症状には、疾患の初期段階におけるうつ病、睡眠障害、疼痛及び／又は疲労、疾患の後期段階における不安、認知症及び／又は認知機能障害が含まれる。運動症状及び非運動症状の両方は、患者及びその介護者にとって非常に消耗性である。

【0004】

現在の治療法は、運動症状に焦点を合わせた短期緩和に焦点を合わせている。しかしながら、あらゆる運動症状の徴候を示す前に、PD患者は、診断前に非運動症状に罹患する可能性があり、それによって、上記のように、生活の質が著しく低下する。したがって、対症療法は、PDを治療及び／又は予防するための予防的アプローチではない。

【0005】

PDは複雑な障害であり、その原因は不明のままである。それにもかかわらず、多数の遺伝子がPDの原因及び／又は進行に関与することが見出されている。これらの遺伝子の1つは、 α -シヌクレインタンパク質をコードするSNCA遺伝子である。

【0006】

PD病理学の主な特徴は、運動関連機能の中心である線条体及び皮質への関連するドーパミン作動性投射を有する中脳の脳領域である黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの神経変性である。黒質線条体ドーパミン作動性神経支配の喪失及び他の脳領域における変性に加えて、PDは、SNCA遺伝子によってコードされる不溶性タンパク質を含有する細胞質タンパク質凝集体（レビー小体）の存在を特徴とする。

【0007】

PDが進行するにつれて、レビー小体は、脳幹の嗅球及び運動核を含む最初の領域から、後の段階で青斑及び黒質の場所に広がり、最後に皮質領域に広がる。異なるPD段階における症状は、レビー小体が拡散及び／又は蓄積する特定の脳領域に関連することが見出された。これはまた、 α -シヌクレインタンパク質凝集体がPDと関連し、ニューロンにおける正常な機能及び／又は毒性作用の喪失をもたらす得、その結果、異なる脳領域において神経変性及び／又は神経炎症を引き起こすことを意味する。

【0008】

脳内の天然の α -シヌクレインタンパク質は、定義された三次構造なしでほとんど折り畳まれていない。細胞膜を構成するリン脂質等の負に荷電した脂質と相互作用すると、 α -シヌクレインはそのN末端を介して α らせん構造に折り畳まれる。しかしながら、PDでは、 α -シヌクレインタンパク質は、凝集しやすい β シートに富むアミロイド様構造をとる。凝集体は、レビー小体の大部分を構成する。

【0009】

MSAは、好銀性グリア細胞質封入体（GCI）及び選択的神経変性を伴う特徴的なオリゴデンドログリオパチーを特徴とする未確定の病因の進行性成人発症神経変性障害である。GCI又はPappalantos封入体／体は、現在、MSAの確定的な神経病理学的診断の特徴として受け入れられており、この障害の病理発生において中心的な役割を果たすことが示唆されている。GCIは、高リン酸化 α -syn、ユビキチン、LRRK2（ロイシンリッチリピートセリン／トレオニンタンパク質）及び他のタンパク質から構成される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

現在、疾患を治療及び／又は予防するための遺伝子療法は、遺伝子及び／又は遺伝子の転写物を完全にノックダウンすることに基づいている。SNCAによってコードされる α -シヌクレインタンパク質は、シナプス輸血に関与するドーパミン放出及び輸送の調節に関与すると考えられている。したがって、 α -シヌクレインタンパク質の重要な生理学的役割のために、SNCA転写物の枯渇は、患者の健康に大きな影響を及ぼし得る。したがって、リスクを最小限に抑える及び／又は予防しながら、臨床診断の前及び／又は後にPD及び他の α -シヌクレイン病の異なる段階を治療及び／又は予防することができる最適化

10

20

30

40

50

された非常に強力な治療を有する必要性が依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、少なくとも2つのRNAコード配列を含む核酸を使用することによって問題を解決し、両方の配列は、SNCA遺伝子の一部に実質的に相補的なガイド配列を含む。

【0012】

本発明は、いくつかのガイド配列の同時使用を可能にする非常に汎用性の高いシステムを提供する。同じベクターからの異なる治療用miRNAの発現は、増大した治療有効性をもたらし、mRNA発現の最適化された非常に強力な阻害をもたらす。したがって、遺伝子治療において本発明の核酸又はAAVを使用する場合、単回用量の治療が期待される。これにより、本発明の前記核酸の使用に関連する毒性及び免疫原性のリスクが低下する。更に、ガイド配列は、それらの凝集特性が定性的及び定量的に異なる、異なるSNCAアイソフォーム中の配列を標的とすることができ、それによって前記異なるアイソフォームによってコードされるRNAの発現を実質的に同時に減少させることを可能にする。更に、本発明の核酸又はAAVに基づく治療のコストは、他の遺伝子治療製品よりも低いと予想され、実質的な経済的利点を提示する。

10

【0013】

したがって、本発明の第1の態様は、第1のRNAをコードする配列及び第2のRNAをコードする配列を含む核酸に関し、第1のRNA及び第2のRNAのそれぞれは、ヘアピンを含み、第1のRNAは、アルファシヌクレイン(SNCA)遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも19ヌクレオチドの第1のガイド配列を含み、第2のRNAは、SNCA遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも19ヌクレオチドの第2のガイド配列を含む。

20

【0014】

本発明の第2の態様は、本発明の核酸を含む発現カセットに関し、発現カセットはDNA分子である。

【0015】

本発明の第3の態様は、本発明の核酸又は発現カセットを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(「本発明のAAVベクター」)に関する。

【0016】

本発明の第4の態様は、本発明の核酸、発現カセット、又はAAVベクターを含む医薬組成物に関する。

30

【0017】

本発明の第5の態様は、本発明の核酸、発現カセット、AAVベクター又は医薬組成物の医薬品としての使用に関する。

【0018】

本発明の第6の態様は、本発明の核酸、発現カセット、AAVベクター、又は医薬組成物を含むキットに関する。

【0019】

本発明の第7の態様は、本発明の核酸、発現カセット又はAAVベクターを含む細胞に関する。

40

【0020】

発明の説明

定義

別段定義されない限り、本明細書で使用される技術的用語及び科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味と同様の意味を有する。当業者は、本発明の実施に使用することができる、本明細書に記載されたものと類似又は同等の多くの方法及び材料を認識するであろう。

【0021】

本明細書及びその特許請求の範囲において、「含む」という動詞及びその活用形は、そ

50

の語に続く項目が含まれるが、具体的に言及されていない項目は除外されないことを意味するためにその非限定的な意味で使用される。更に、不定冠詞「a」又は「an」による要素への言及は、文脈が要素の1つ及び1つのみが存在することを明確に要求しない限り、要素の複数が存在する可能性を排除しない。したがって、不定冠詞「a」又は「an」は、通常、「少なくとも1つ」を意味する。

【0022】

本発明の目的のために、「得られた」という用語は、「得られる」という用語の好ましい実施形態であると考えられる。以下、例えば抗体が特定の供給源から得ることができると定義される場合、これはまた、この供給源から得られる抗体を開示すると理解されるべきである。

【0023】

本明細書で使用される場合、「及び／又は」という用語は、記載された事例の1つ以上が、単独で、又は記載された事例の少なくとも1つ、記載された事例の最大全てと組み合わせ発生し得ることを示す。

【0024】

本明細書で使用される場合、「少なくとも」特定の値は、その特定の値以上を意味する。例えば、「少なくとも2つ」は、「2以上」、すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15...等と同じであると理解される。

【0025】

「約」又は「およそ」という用語は、数値（例えば約10）に関連して使用される場合、好ましくは、その値がその値（10）の多かれ少なかれ0.1%の所与の値であり得ることを意味する。

【0026】

本明細書で使用される場合、「有効量」は、未処置患者と比較して疾患の症状を改善するのに必要な薬剤の量を意味する。例えば癌の治療的処置のために本発明を実施するために使用される活性薬剤の有効量は、投与様式、対象の年齢、体重及び全般的な健康状態に応じて変化する。最終的には、主治医又は獣医が適切な量及び投与レジメンを決定する。そのような量は「有効」量と呼ばれ、（ウイルス送達ベクターの場合）キログラム当たりのゲノムコピー数（GC/kg）として決定される。したがって、本開示の文脈において「～に対して有効である」薬物、物質又は医薬品の投与に関連して、疾患又は状態は、臨床的に適切な方法での投与が、症状の改善、治療、少なくとも1つの疾患徴候又は症状の減少、寿命の延長、生活の質の改善、又は特定の種類の疾患又は状態の治療に精通した医師によって肯定的であると一般に認識される他の効果等、少なくとも統計的に有意な割合の患者に有益な効果をもたらすことを示す。

【0027】

本明細書に記載の医薬品としての物質の使用は、医薬品の製造における前記物質の使用として解釈することもできる。同様に、物質が治療のために又は医薬品として使用されるときはいつでも、治療のための医薬品の製造のために使用することもできる。本明細書に記載の医薬品として使用するための製品は、治療方法において使用することができ、そのような治療方法は、使用のための製品の投与を含む。

【0028】

「相同性」、「配列同一性」等の用語は、本明細書では互換的に使用される。配列同一性は、本明細書では、配列を比較することによって決定される、2つ以上のアミノ酸（ポリペプチド又はタンパク質）配列又は2つ以上の核酸（ポリヌクレオチド）配列の間の関係として定義される。当技術分野では、「同一性」はまた、そのような配列のストリング間の一致によって決定される場合があるように、アミノ酸又は核酸配列間の配列関連性の程度を意味する。2つのアミノ酸配列間の「類似度」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列及びその保存されたアミノ酸置換を第2のポリペプチドの配列と比較することによって決定される。「同一性」及び「類似性」は、公知の方法により容易に算出することができる。

10

20

30

40

50

【0029】

「配列同一性」及び「配列類似性」は、2つの配列の長さに応じて、グローバル又はローカルアラインメントアルゴリズムを使用して、2つのペプチド又は2つのヌクレオチド配列のアラインメントによって決定することができる。類似の長さの配列は、好ましくは、配列を全長にわたって最適にアラインメントするグローバルアラインメントアルゴリズム（例えば、Needleman Wunsch）を使用してアラインメントされ、一方、実質的に異なる長さの配列は、好ましくは、ローカルアラインメントアルゴリズム（例えば、Smith Waterman）を使用してアラインメントされる。配列は、それらが（例えば、デフォルトパラメータを使用してプログラムGAP又はBESTFITによって最適にアラインメントされた場合）少なくとも特定の最小パーセンテージの配列同一性（以下に定義される）を共有するとき、「実質的に同一」又は「本質的に類似」と称され得る。GAPは、Needleman及びWunschのグローバルアラインメントアルゴリズムを使用して、2つの配列をそれらの完全長（全長）にわたって整列させ、マッチの数を最大化し、ギャップの数を最小化する。2つの配列が同様の長さを有する場合、配列同一性を決定するために、グローバルアラインメントが適切に使用される。一般に、ギャップ生成ペナルティ＝50（ヌクレオチド）／8（タンパク質）及びギャップ伸長ペナルティ＝3（ヌクレオチド）／2（タンパク質）で、GAPデフォルトパラメータが使用される。ヌクレオチドの場合、使用されるデフォルトのスコアリング行列はnws gap dnaであり、タンパク質の場合、デフォルトのスコアリング行列はBlossum62である（Henikoff&Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919）。配列同一性パーセントについての配列アラインメント及びスコアは、Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USAから入手可能なGCG Wisconsin Package, Version 10.3等のコンピュータプログラムを使用して、又はEmbossWINバージョン2.10.0の（大域的Needleman Wunschアルゴリズムを使用する）プログラム「needle」若しくは（局所的なSmith Watermanアルゴリズムを使用する）「water」等のオープンソースソフトウェアを使用して、上記のGAPと同じパラメータを使用して、又はデフォルト設定（「needle」及び「water」の両方、並びにタンパク質及びDNAアラインメントの両方について、デフォルトのギャップオープニングペナルティは10.0であり、デフォルトのギャップ伸長ペナルティは0.5であり、デフォルトのスコアリング行列は、タンパク質についてはBlossum62であり、DNAについてはDNABFullである）を使用して決定することができる。配列が実質的に異なる全長を有する場合、Smith Watermanアルゴリズムを使用するもの等の局所アラインメントが好ましい。

【0030】

或いは、類似性又は同一性の割合は、FASTA、BLAST等のアルゴリズムを使用して、公開データベースに対して検索することによって決定され得る。したがって、本発明の核酸及びタンパク質配列は、例えば、他のファミリーメンバー又は関連配列を識別するために、公開データベースに対して検索を実行するための「クエリ配列」として更地使用することができる。そのような検索は、Altschul, et al. 1990 J. Mol. Biol. 215:403-10のBLASTn及びBLASTxプログラム（バージョン2.0）を使用して行うことができる。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の酸化還元酵素核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア＝100、ワード長＝12で行うことができる。BLASTタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTxプログラム、スコア＝50、ワード長＝3で行うことができる。比較目的のためにギャップのあるアラインメントを得るために、Altschul et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載されているように、ギャップのあるBLASTを利用することができる。BLAST及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ（例

例えば、BLASTX及びBLASTn)を使用することができる。アメリカ国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)のホームページ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を参照のこと。

【0031】

本発明の文脈内で、所与の配列(配列番号)に言及する場合、「そのバリエーション」という用語は、対応する天然の核酸の特性の少なくとも一部、例えばRNA発現の低下を保持する任意の核酸を含む。「バリエーション」という用語は、天然の核酸と少なくとも50;55;60;65;70;75;80;90;又は95%の配列同一性を有する任意の核酸を含み得る。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸の配列はコドン最適化されている。コドン最適化とは、アミノ酸配列を変化させることなく様々な基準に基づいて組換え遺伝子のコドン組成を改善するように設計された実験的アプローチを指す。これは、ほとんどのアミノ酸が2つ以上のコドンによってコードされているために可能である。ほとんどのコドン最適化アプローチは、稀少コドンの使用を回避する。しかしながら、異なるアプローチは、発現を阻害することができるmRNA要素、開始コドンのヌクレオチドの状況、mRNA二次構造、配列リピート、ヌクレオチド組成、内部リボソーム進入部位、プロモータ配列、並びに推定スプライスドナー及びアクセプター部位を含む、考慮される他の特徴の程度が異なる。更に、いくつかのプログラムは、タンパク質構造情報、遺伝子内ポリ(A)部位、代替的なリーディングフレーム中の終止コドン、並びにRNase切断、変異、及びメチル化依存性遺伝子サイレンシングの標的であるジヌクレオチドを考慮している。当業者は、そのようなコドン最適化された核酸を設計するために必要な要件を理解している。

20

【0033】

本明細書で使用される場合、「選択的にハイブリダイズすること」、「選択的にハイブリダイズする」という用語及び類似の用語は、互いに少なくとも66%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、更により好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%又はより好ましくは少なくとも99%相同なヌクレオチド配列が典型的に互いにハイブリダイズしたままであるハイブリダイゼーション及び洗浄条件を記載することを意図している。すなわち、そのようなハイブリダイズ配列は、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、更により好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%又はより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を共有し得る。

30

【0034】

そのようなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例は、約45℃の6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でのハイブリダイゼーション、その後の1xSSC、0.1%SDS中、約50℃、好ましくは約55℃、好ましくは約60℃、更により好ましくは約65℃での1回又は複数回の洗浄である。

40

【0035】

高度にストリンジェントな条件としては、例えば、5xSSC/5xDenhardt溶液/1.0%SDS中約68℃でのハイブリダイゼーション及び室温での0.2xSSC/0.1%SDS中での洗浄が挙げられる。或いは、洗浄は、42℃で実施されてもよい。

【0036】

当業者は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件及び高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に適用すべき条件を知っているであろう。そのような条件に関する更なる指針は、例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold

50

Spring Harbor Press, N. Y. ; 及び Ausubel et al. (eds.), Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N. Y.) において当該技術分野で容易に入手可能である。

【0037】

当然のことながら、ポリA配列(mRNAの3'末端ポリ(A)域等)のみにハイブリダイズするポリヌクレオチド、又はT(又はU)の相補的ストレッチのみにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、本発明の核酸の一部に特異的にハイブリダイズするために使用される本発明のポリヌクレオチドには含まれないであろう。というのも、そのようなポリヌクレオチドは、ポリ(A)ストレッチ又はその相補体(例えば、実質的に任意の二本鎖cDNAクローン)を含有する任意の核酸分子にハイブリダイズするからである。

【0038】

「核酸構築物」又は「核酸ベクター」は、本明細書では、組換えDNA技術の使用から生じる人工核酸分子を意味すると理解される。したがって、「核酸構築物」という用語は、天然に存在する核酸分子を含まないが、核酸構築物は、天然に存在する核酸分子(の一部)を含み得る。「ベクター」は、外因性核酸配列(すなわちDNA又はRNA)を宿主細胞に移入するのに役立つ核酸構築物(典型的にはDNA又はRNA)である。ベクターは、好ましくは、自律複製及び宿主細胞のゲノムへの組込みの少なくとも1つによって宿主内で維持される。「発現ベクター」又は「発現構築物」という用語は、そのような配列に適合する宿主細胞又は宿主生物における遺伝子の発現に影響を及ぼすことができるヌクレオチド配列を指す。これらの発現ベクターは、典型的には、発現される産物をコードする配列の発現に影響を及ぼすことができる機能単位である少なくとも1つの「発現カセット」を含み、コード配列は、少なくとも、適切な転写制御配列及び場合により3'転写終結シグナルを含む適切な発現制御配列に作動可能に連結されている。発現に影響を及ぼすのに必要又は有用な更なる因子、例えば発現エンハンサー要素も存在し得る。発現ベクターは、適切な宿主細胞に導入され、宿主細胞のインビトロ細胞培養物中のコード配列の発現に影響を及ぼすことができる。好ましい発現ベクターは、ウイルスタンパク質及び／又は核酸、特に組換えAAVタンパク質及び／又は核酸の発現に適している。

【0039】

本明細書で使用される場合、「プロモータ」又は「転写制御配列」という用語は、1つ以上のコード配列の転写を制御するように機能し、コード配列の転写開始部位の転写の方向に対して上流に位置し、DNA依存性RNAポリメラーゼ、転写開始部位、及び転写因子結合部位、リプレッサー及びアクチベータタンパク質結合部位、並びにプロモータからの転写量を直接又は間接的に調節するように作用するための当業者に公知の任意の他のヌクレオチドの配列を含むがこれらに限定されない任意の他のDNA配列に対する結合部位の存在によって構造的に同定される核酸断片を指す。「構成要素」プロモータは、ほとんどの生理学的及び発達条件下でほとんどの組織において活性であるプロモータである。「誘導可能」プロモータは、例えば化学的誘導物質又は生物学的実体の適用によって生理学的又は発生的に調節されるプロモータである。

【0040】

「レポータ」という用語は、マーカーと互換的に使用され得るが、緑色蛍光タンパク質(GFP)又はルシフェラーゼ等の可視マーカーを指すために主に使用される。

【0041】

「タンパク質」又は「ポリペプチド」という用語は互換的に使用され、特定の作用様式、サイズ、三次元構造又は起源を参照せずに、アミノ酸の鎖からなる分子を指す。

【0042】

「遺伝子」という用語は、細胞内でRNA分子（例えばmRNA）に転写され、適切な制御領域（例えばプロモータ）に作動可能に連結された領域（転写領域）を含むDNA断片を意味する。遺伝子は、通常、いくつかの作動可能に連結された断片、例えば、プロモータ、5'リーダ配列、コード領域及びポリアデニル化部位を含む3'非翻訳配列（3'末端）を含むであろう。「遺伝子の発現」は、適切な制御領域、特にプロモータに作動可能に連結されたDNA領域が、生物学的に活性な、すなわち生物学的に活性なタンパク質又はペプチドに翻訳され得るRNAに転写されるプロセスを指す。

【0043】

「相同」という用語は、所与の（組換え）核酸又はポリペプチド分子と所与の宿主生物又は宿主細胞との関係を示すために使用される場合、天然では、核酸又はポリペプチド分子が同じ種、好ましくは同じ種類又は株の宿主細胞又は生物によって産生されることを意味すると理解される。宿主細胞に相同である場合、ポリペプチドをコードする核酸配列は、典型的には（必ずしもそうとは限らないが）、その天然環境におけるものとは別の（異種の）プロモータ配列、並びに適用可能であれば別の（異種の）分泌シグナル配列及び／又はターミネータ配列に作動可能に連結される。制御配列、シグナル配列、ターミネータ配列等も宿主細胞と相同であり得ることが理解される。これに関連して、「相同」配列要素のみの使用は、「自己クローン化」遺伝子組換え生物（GMO）の構築を可能にする（自己クローニングは、本明細書において欧州指令98／81／EC付属書IIのように定義される）。2つの核酸配列の関連性を示すために使用される場合、「相同」という用語は、1つの一本鎖核酸配列が相補的一本鎖核酸配列にハイブリダイズし得ることを意味する。ハイブリダイゼーションの程度は、後述するように、配列間の同一性の量並びに温度及び塩濃度等のハイブリダイゼーション条件を含む多くの因子に依存し得る。

【0044】

「異種」及び「外因性」という用語は、核酸（DNA又はRNA）又はタンパク質に関して使用される場合、それが存在する生物、細胞、ゲノム若しくはDNA若しくはRNA配列の一部として天然に存在しないか、又はそれが天然に見出されるものとは異なる細胞又はゲノム若しくはDNA若しくはRNA配列中の位置に見出される核酸又はタンパク質を指す。異種及び外因性の核酸又はタンパク質は、それらが導入される細胞に対して内因性ではないが、別の細胞から得られているか、又は合成的若しくは組換え的に産生される。一般に、必ずしもそうとは限らないが、そのような核酸は、DNAが転写又は発現される細胞によって通常産生されないタンパク質、すなわち外因性タンパク質をコードする。同様に、外因性RNAは、外因性RNAが存在する細胞において通常発現されないタンパク質をコードする。異種／外因性の核酸及びタンパク質は、外来の核酸又はタンパク質と呼ばれることもある。当業者がそれが発現される細胞にとって外来であると認識するであろう任意の核酸又はタンパク質は、本明細書では異種又は外因性の核酸又はタンパク質という用語に包含される。異種及び外因性という用語は、核酸又はアミノ酸配列の非天然の組合せ、すなわち組み合わせられた配列の少なくとも2つが互いに異種である組合せにも適用される。

【0045】

本明細書で使用される場合、生物に関して使用される場合の「天然に存在しない」という用語は、生物が、言及された種の野生型株を含む、言及された種の天然に存在する株では通常見られない少なくとも1つの遺伝的変化を有することを意味する。遺伝子変化には、例えば、タンパク質若しくは酵素をコードする発現可能な核酸を導入する修飾、他の核酸付加、核酸欠失、核酸置換、又は生物の遺伝物質の他の機能的破壊が含まれる。そのような修飾には、例えば、参照される種の異種又は相同ポリペプチドのコード領域及びその機能的断片が含まれる。更なる修飾には、例えば、修飾が遺伝子又はオペロンの発現を変化させる非コード制御領域が含まれる。酵素又はその機能的断片をコードする核酸分子に対する遺伝子修飾は、その天然に存在する状態から変化した非天然に存在する生物に生化学的反応能力又は代謝経路能力を付与することができる。

【0046】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、機能的関係にあるポリヌクレオチド（又はポリペプチド）要素の連結を指す。核酸は、別の核酸配列と機能的関係にある場合、「作動可能に連結されている」。例えば、転写制御配列は、コード配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結される。作動可能に連結されているとは、連結されているDNA配列が典型的には連続しており、2つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合、連続しており、読み枠内にあることを意味する。

【0047】

発現制御配列がヌクレオチド配列の転写及び／又は翻訳を制御及び調節する場合、発現制御配列はヌクレオチド配列に「作動可能に連結される」。したがって、発現制御配列は、プロモータ、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（IRES）、転写ターミネータ、タンパク質コード遺伝子の前の開始コドン、イントロンに対するスプライシングシグナル、及び終止コドンを含み得る。

【0048】

「発現制御配列」という用語は、少なくとも、その存在が発現に影響を及ぼすように設計されている配列を含むことを意図しており、追加の有利な成分も含むことができる。例えば、リーダー配列及び融合パートナー配列は、発現制御配列である。この用語はまた、フレーム内外の望ましくない潜在的な開始コドンが配列から除去されるような核酸配列の設計を含み得る。それはまた、望ましくない潜在的なスプライス部位が除去されるような核酸配列の設計を含み得る。これには、ポリAシグナル、すなわちmRNAの3'末端の一連のアデニン残基の付加を指示する配列又はポリアデニル化配列（pA）、ポリA配列と呼ばれる配列が含まれる。mRNA安定性を高めるように設計することもできる。転写及び翻訳の安定性に影響を及ぼす発現制御配列、例えばプロモータ、並びに翻訳に影響を及ぼす配列、例えばコザック配列は、昆虫細胞において公知である。発現制御配列は、より低い発現レベル又はより高い発現レベルが達成されるように、それが作動可能に連結されているヌクレオチド配列を調節するような性質のものであり得る。

【0049】

発明の詳細な説明

本発明の第1の態様は、第1のRNAをコードする配列及び第2のRNAをコードする配列を含む核酸に関し、第1のRNA及び第2のRNAのそれぞれは、ヘアピンを含み、第1のRNAは、アルファシヌクレイン（SNCA）遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも19ヌクレオチドの第1のガイド配列を含み、第2のRNAは、SNCA遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも19ヌクレオチドの第2のガイド配列を含む。

【0050】

核酸

本明細書で使用される「核酸」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味をとる。したがって、本明細書で使用される「RNA」又は「RNA分子」又は「リボ核酸分子」という用語は、リボヌクレオチドのポリマー（例えば、2、3、4、5、10、15、20、25、30個、又はそれを超えるリボヌクレオチド）を指し、本明細書で使用される「DNA」又は「DNA分子」又は「デオキシリボ核酸分子」という用語は、デオキシリボヌクレオチドのポリマーを指す。DNA及びRNAは、天然に合成することができる（例えば、それぞれDNA複製又はDNAの転写によって）。RNAは転写後修飾され得る。DNA及びRNAはまた、化学合成することができる。DNA及びRNAは、一本鎖（すなわち、それぞれssRNA及びssDNA）又は多鎖（例えば、二本鎖、すなわち、それぞれdsRNA及びdsDNA）であり得る。「mRNA」又は「メッセンジャーRNA」は、1つ以上のポリペプチド鎖のアミノ酸配列を指定する一本鎖RNAである。この情報は、リボソームがmRNAに結合するタンパク質合成中に翻訳される。

【0051】

本明細書で使用される場合、「低分子干渉RNA」（「siRNA」「短い分子干渉RNA」という用語は、RNA干渉を指示又は媒介することができる約10～50ヌクレオチド（又はヌクレオチド類似体）を含むRNA（又はRNA類似体）を指す。好ましくは

、s i R N Aは、約15～30ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体、より好ましくは約16～25ヌクレオチド（又はヌクレオチド類似体）、更により好ましくは約18～23ヌクレオチド（又はヌクレオチド類似体）、更により好ましくは約19～22ヌクレオチド（又はヌクレオチド類似体）を含む（例えば、19、20、21又は22ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体）。「短い」s i R N Aという用語は、約21ヌクレオチド（又はヌクレオチド類似体）、例えば19、20、21又は22ヌクレオチドを含むs i R N Aを指す。「長い」s i R N Aという用語は、約24～25ヌクレオチド、例えば23、24、25又は26ヌクレオチドを含むs i R N Aを指す。短いs i R N Aは、場合によっては、より短いs i R N AがR N A iを媒介する能力を保持する限り、19ヌクレオチド未満、例えば16、17又は18ヌクレオチドを含み得る。同様に、長いs i R N Aは、より長いs i R N Aが短いs i R N Aへの更なるプロセッシング、例えば酵素的プロセッシングを欠くR N A iを媒介する能力を保持する限り、場合によっては26を超えるヌクレオチドを含み得る。

10

【0052】

本明細書で使用される場合、「R N A干渉」（「R N A i」）という用語は、R N Aの選択的な細胞内分解を指す。R N A iは、外来R N A（例えば、ウイルスR N A）を除去するために細胞内で天然に生じる。天然R N A iは、分解機構を他の類似のR N A配列に導く遊離d s R N Aから切断された断片を介して進行する。或いは、R N A iは、例えば、標的遺伝子の発現をサイレンシングするように誘導することができる。R N A iを誘導するのに適した二本鎖R N A構造は、当技術分野で周知である。例えば、低分子干渉R N A（s i R N A）はR N A iを誘導することができる。s i R N Aは、2つの別個のR N A鎖を含み、一方の鎖は第1のR N A配列を含み、他方の鎖は第2のR N A配列を含み、したがって第1及び第2の鎖を含む。しばしば使用されるs i R N A設計は、3'オーバーハングを有する連続した塩基対を含む。第1及び／又は第2の鎖は、3'-オーバーハングを含み得る。3'-オーバーハングは、好ましくは、s i R N Aの両鎖上のジヌクレオチドオーバーハングである。そのような設計は、これらの特徴を有するs i R N Aをもたらすより大きな二本鎖R N Aの観察されたダイサープロセッシングに基づく。3'-オーバーハングは、第1の鎖に含まれてもよい。3'オーバーハングは、第1の鎖に加えてもよい。s i R N Aが構成される二本鎖の長さは、19、20、21、22、23、24、25、26又は27ヌクレオチド以上であり得る。

20

30

【0053】

s i R N Aは、ダイサー基質としても機能し得る。例えば、ダイサー基質は、27個の連続する塩基対を有するR N Aの二本鎖からなる27量体であり得る。第1の鎖は、27量体の二重鎖の3'末端に位置する。s i R N Aと同様に、3'末端において、鎖の各々又は1つは、2つのヌクレオチドオーバーハングを含み得る。3'-オーバーハングは、第1の鎖に含まれてもよい。3'オーバーハングは、第1の鎖に加えてもよい。第1の鎖から5'に、隣接するか又は隣接しない標的R N A配列に相補的である追加の配列が含まれ得る。s i R N Aダイサー基質の他端は平滑末端である。このダイサー基質設計は、19個の連続した塩基対及び2個のヌクレオチドオーバーハングを両方の3'末端に有する上記のs i R N A設計のようにs i R N Aを形成することができるように、ダイサーによるプロセッシングを優先させ得る。

40

【0054】

いずれの場合でも、s i R N A等は、2つの別個のR N A鎖（Fire et al. 1998, Nature 19; 391 (6669): 806-11）から構成され、各R N A鎖は、本発明による第1及び第2のR N A鎖又は第3及び第4のR N A鎖を含むか又はそれらからなる。したがって、本発明の核酸は、第1のR N Aである第1及び第2のR N A鎖、並びに第2のR N Aである第3及び第4のR N A鎖を誘導すると言われ得る。各第1、第2、第3及び第4のR N A鎖の代替命名規則は本発明の範囲内であり、互いに、相補的、実質的に相補的、又は固有であってもよく、又は本明細書で論じられるような任意の他の必要な配置であってもよい。

50

【0055】

ループ配列はステムループ配列であってもよく、これによりshRNAの二本鎖領域が伸長される。上記のsiRNAダイサー基質と同様に、shRNAを、例えばダイサーによってプロセッシングして、例えば19個の連続した塩基対及び2個のヌクレオチドオーバーハングを両方の3'末端に有する、上記のようなsiRNA設計を有するsiRNAを提供することができる。shRNAがダイサーによってプロセッシングされる場合、shRNAの末端に第1及び第2の鎖を有すること、すなわち、siRNAの推定鎖がステムループ配列：5'-第1の鎖-ステムループ配列-第2の鎖-任意選択の2ntオーバーハング配列-3'を介して連結されるようにすることが好ましい。又は逆に、5'-第2の鎖-ステムループ配列-第1の鎖-任意選択の2ntオーバーハング配列-3'である。別のshRNA設計は、ダイサープロセッシング（参照により本明細書に組み込まれる、Liu et al., 2013 Nucleic Acids Res. 41(6):3723-33）を必要としない活性化RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）、いわゆるAgoshRNA又はAgos2プロセッシングRNAを提供するためにRNAi機構によってプロセッシングされるshRNA構造であり得、これは、以下に記載されるmiR-451足場に非常に類似する構造に基づく。そのようなshRNA構造は、そのループ配列中に第1のRNA配列の一部を含む。そのようなshRNA構造はまた、第1の鎖と、それに続く第2の鎖とからなり得る。

10

【0056】

スペーサ

20

本発明の好ましい実施形態では、第1のRNAをコードする配列の後に、少なくとも15ヌクレオチドを含むスペーサ及び第2のRNAをコードする配列が続く。したがって、好ましくは、5'から3'方向において、第1のRNAをコードする配列の後に少なくとも15ヌクレオチドを含む第1のスペーサが続き、このスペーサの後に第2のRNAをコードする配列が続く。5'から3'方向は、二本鎖(ds)核酸の場合、コード鎖を指すと理解される。

【0057】

上記のように、核酸は、第1のRNAである第1及び第2のRNA鎖、並びに第2のRNAである第3及び第4のRNA鎖を誘導すると言われてもよく、第1及び第2のRNA鎖をコードする配列の後に少なくとも15ヌクレオチドのスペーサ、並びに第3及び第4のRNA鎖をコードする配列が続く。

30

【0058】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸は、第3のRNAをコードする第3の配列を含む。

【0059】

本発明の好ましい実施形態では、第3のRNAをコードする配列の後に、少なくとも15ヌクレオチドを含む第2のスペーサが続き、その後に第1のRNAをコードする配列が続く。したがって、好ましくは、5'から3'方向において、第3のRNAをコードする配列の後に少なくとも15ヌクレオチドを含む第2のスペーサが続き、第2のスペーサの後に第1のRNAをコードする配列が続き、第1のスペーサ及び第2のRNAをコードする配列が続く。

40

【0060】

したがって、核酸は、第1のRNAである第1及び第2のRNA鎖、第2のRNAである第3及び第4のRNA鎖、並びに第3のRNAである第5及び第6のRNA鎖を誘導すると言われてもよく、好ましくは、5'から3'方向において、第5及び第6のRNA鎖をコードする配列の後に少なくとも15ヌクレオチドのスペーサが続き、その後に第1及び第2のRNA鎖をコードする配列が続き、前記第1及び第2の鎖の後に少なくとも15ヌクレオチドのスペーサが続き、第3及び第4のRNA鎖をコードする配列が続く。

【0061】

本発明のいくつかの実施形態では、スペーサは、少なくとも25；少なくとも30；又

50

は少なくとも 35ヌクレオチドを含む。

【0062】

本発明のいくつかの実施形態では、スペーサは、少なくとも、15；20；25；30；35；40；45；50；55；60；65；70；75；80；85；90；95；100；105；110；115；120；125；130；135；140；145；150；155；160；165；170；175；180；185；190；195又は200ヌクレオチドを含む。

【0063】

いくつかの特定の実施形態では、本発明のスペーサは、15；16；17；18；19；20；21；22；23；24；25；26；27；28；29；30；31；32；33；34；35；36；37；38；又は40ヌクレオチドを含む。

【0064】

本発明のいくつかの特定の実施形態では、スペーサは、75；76；77；78；79；80；81；82；83；84；85；86；87；88；89；90；91；92；93；94；95；96；97；98；99；100；101；102；103；104；又は105ヌクレオチドを含む。

【0065】

本発明のいくつかの実施形態では、スペーサは、配列番号1；配列番号2；配列番号3；及びそのバリエーションからなる群から選択される配列を含むか、又はそれからなる。

【0066】

したがって、本発明のいくつかの特定の実施形態では、第1及び第2のRNA鎖をコードする配列の後に、少なくとも15ヌクレオチドのスペーサ並びに第3及び第4のRNA鎖をコードする配列が続く。

【0067】

本発明のいくつかの特定の実施形態では、第1及び第2のRNA鎖をコードする配列の後に、配列番号3並びに第3及び第4のRNA鎖をコードする配列を含む又はそれらからなるスペーサが続く。

【0068】

したがって、本発明のいくつかの特定の実施形態では、第1及び第2のRNA鎖をコードする配列の後に、少なくとも75ヌクレオチドのスペーサ並びに第3及び第4のRNA鎖をコードする配列が続く。

【0069】

本発明のいくつかの具体的な例では、第1及び第2のRNA鎖をコードする配列の後に、配列番号1並びに第3及び第4のRNA鎖をコードする配列を含む又はそれらからなるスペーサが続く。

【0070】

いくつかの特定の実施形態では、第5及び第6のRNA鎖をコードする配列の後に、少なくとも75ヌクレオチドのスペーサが続き、第1及び第2のRNA鎖をコードする配列の後に、少なくとも15ヌクレオチドのスペーサが続き、第3及び第4のRNA鎖をコードする配列が続く。本発明のいくつかの具体的な例では、第5及び第6のRNA鎖をコードする配列の後に、配列番号1を含むか又はそれらからなるスペーサが続き、第1及び第2のRNA鎖をコードする配列の後に、配列番号3並びに第3及び第4のRNA鎖をコードする配列を含むか又はそれらからなるスペーサが続く。

【0071】

いくつかの実施形態では、一方又は両方のRNAがダイサーによってプロセッシングされるshRNAである場合、上記の関連shRNA構造も適用可能である。いくつかの実施形態では、一方又は両方のRNAがAgoshRNA又はAgos2プロセッシングRNAである場合、上記の関連shRNA構造も適用可能である。したがって、一方又は両方のRNAは、同じ又は異なるRNAi機構によってプロセッシングされ得る。

【0072】

RNA足場

本発明による二本鎖RNAは、pre-miRNA又はpri-miRNA足場に組み込まれ得る。マイクロRNA、すなわちmiRNAは、例えば哺乳動物細胞において内因的に発現される二本鎖RNA分子に由来するガイド鎖である。miRNAは、RNAi機構によって、上記のshRNA又は伸長されたsiRNAのプロセッシングと同様に、pre-miRNA前駆体分子からプロセッシングされ、活性化されたRISCに組み込まれる (Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. Cell. 2004 Apr 2; 117 (1): 1-3)。pre-miRNAは、例えばイントロンに含まれるより大きなRNA分子 (pri-miRNA) の一部であり得るヘアピンRNA分子であり、これは最初にDroshaによってプロセッシングされてpre-miRNAヘアピン分子を形成する。pre-miRNA分子はshRNA様分子であり、その後、ダイサーによってプロセッシングされて、siRNA様二本鎖RNA二重鎖をもたらすことができる。二本鎖RNA二重鎖の一部であるmiRNA、すなわちガイド鎖は、その後、RISCに組み込まれる。

【0073】

本発明の第1及び第2のRNAは、SNCA遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも19ヌクレオチドの第1及び第2のガイド配列を含む。

【0074】

天然に存在するようなRNA分子、すなわち、pri-miRNA、pre-miRNA又はmiRNA二重鎖は、選択された遺伝子の特異的に標的とする人工miRNAを製作するための足場として使用される場合がある。天然に存在するRNA分子の予測されるRNA構造に基づいて、例えば、標準的な設定を使用したm倍ソフトウェアを使用して予測されるRNA分子の予測されるRNA構造に基づいて (Zuker. Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-3415, 2003)、RNA構造中に存在する天然のmiRNA配列 (すなわち、二重鎖、pre-miRNA又はpri-miRNA)、及びそれと実質的に相補的な構造中に存在する配列が除去され、本発明による第1の鎖及び第2の鎖、すなわち第1のRNAの第1の鎖及び第2の鎖、又は第3の鎖及び第4の鎖とも呼ばれ得る第2のRNAの第1の鎖及び第2の鎖で置き換えられる。したがって、第1及び第2の鎖を単に例示的な目的のために使用する場合、第1の鎖及び第2の鎖は、好ましくは、形成される予測される二次RNA構造、すなわち、pre-miRNA、pri-miRNA及び／又はmiRNA二重鎖が、天然のRNA配列の対応する予測される元の二次構造に類似するように選択される。pre-miRNA、pri-miRNA及びmiRNA二重鎖 (相補的な塩基対合を介してハイブリダイズする2つの別々のRNA鎖からなる) は、天然に見出されるように、完全に塩基対形成されていないことが多く、すなわち、上で定義されるような第1及び第2の鎖に対応する全てのヌクレオチドが塩基対形成されているわけではなく、第1及び第2の鎖は同じ長さではないことが多い。miRNA前駆体分子を任意の選択された標的RNA配列及び実質的に相補的な第1の鎖のための足場としてどのように使用するかは、例えば、Liu YP Nucleic Acids Res. 2008 36 (9): 2811-24に記載されている。

【0075】

pri-miRNAは、細胞のRNAi機構によってプロセッシングされ得る。pri-miRNAは、pre-miRNAヘアピン及び／又はshRNA様分子の5'末端及び3'末端にフランキング配列を含む。そのようなpri-miRNAヘアピンは、Droshaによってプロセッシングされて、pre-miRNAを産生することができる。フランキング配列の長さは様々であり得るが、約80ntの長さであり得る (Zeng and Cullen, J Biol Chem. 2005 280 (30): 27595-603; Cullen, Mol Cell. 2004 16 (6): 861-5)。一本鎖側面の最小長さは、短くなりすぎると、例えばDroshaプロセッシングが失敗して配列特異的阻害が減少するか又は存在しなくなるため、RNA分子がその機能を失う可能性

があるとして容易に決定することができる。一実施形態では、本発明による第1及び第2の鎖を担持する *pri-miRNA* 足場は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、又は少なくとも50ヌクレオチドの予測 *pre-miRNA* 構造に対して5'配列隣接及び3'配列隣接を有する。好ましくは、*miRNA* 足場に含まれる *pri-miRNA* 由来のランキング配列(5'及び3')は、同じ天然に存在する *pri-miRNA* 配列に由来する。好ましくは、*miRNA* 足場に含まれる *pre-miRNA* 及び／又は *pri-miRNA* 由来のランキング配列(5'及び3')及び／又はループ配列は、同じ天然に存在する *pri-miRNA* 配列に由来する。内因性 *miRNA* 配列に含まれる(推定上の)ガイド鎖RNAは、第1の鎖を含む(又は、第1の鎖からなる)配列によって置き換えられ得、パッセンジャー鎖配列は、第2の鎖を含む(又は、第2の鎖からなる)配列によって置き換えられ得るので、内因性配列の *pri-miRNA* 配列又は *pre-miRNA* 配列のランキング配列及び／又はループ配列は、足場 *miRNA* 配列の予測された構造(例えば、M倍予測構造)が内因性 *miRNA* 配列の予測された構造と同じであるような小さな配列修飾を含み得ることが理解される。

10

20

30

40

50

【0076】

第1及び第2の鎖並びに第3及び第4の鎖は、例えば2つの二本鎖RNA、すなわち本発明の第1及び第2のRNAを形成するために、発現カセットによってコードされる。特に明記しない限り、本発明の核酸に含まれる任意の追加のRNA、例えば以下に記載される本発明の第3のRNAも発現カセットによってコードされることが理解される。二本鎖RNAが、例えば、それぞれ2本の鎖からなる2つの *siRNA* である場合、2つ以上の発現カセットが必要とされることも理解される。各二本鎖RNAが、例えば *shRNA*、*pre-miRNA* 又は *pri-miRNA* をコードする単一のRNA分子に含まれる場合、RNA分子当たり1つの発現カセットで十分であり得る。*pol I* 発現カセットは、発現されるRNAをコードする配列とそれに続くポリアデニル化配列とを含むプロモータ配列を含み得る。発現される二本鎖RNAが *pri-miRNA* 足場を含む場合、コードされるRNA配列は、イントロン配列及びエクソン配列並びに3'-UTR及び5'-UTRをコードし得る。*pol I* 発現カセットは、一般に、プロモータ配列と、それに続くRNAをコードする配列(例えば *shRNA* 配列、*pre-miRNA*、又は例えば *siRNA* 若しくは5つの伸長された *siRNA* に含まれる二本鎖RNAの鎖)とを含む。*pol I* 発現カセットは、*pol I* プロモータ、続いてRNAコード配列及び3'-配列を含み得る。二本鎖RNAのための発現カセットは当技術分野で周知であり、任意のタイプの発現カセットで十分であり得、例えば、*pol I* プロモータ、*pol I* プロモータ又は *pol I* プロモータを使用し得る(i. a. ter Brake et al., 2008 Mol Ther. Mar; 16(3): 557-64, Maczuga et al., 2012 BMC Biotechnol. Jul 24; 12: 42)。いくつかの実施形態では、更に以下に記載されるように、発現カセットはDNA分子である。いくつかの特定の実施形態では、発現カセットは *pol I* プロモータを含む。

【0077】

上記から明らかなように、二本鎖RNAに含まれる第1及び第2の鎖は、追加のヌクレオチド及び／又はヌクレオチド配列を含むことができる。本発明の二本鎖RNAは、単一のRNA配列に含まれてもよく、又は2つの別個のRNA鎖に含まれてもよい。どのような設計が使用される場合であっても、RNA配列から、第1又は第2の鎖を含むアンチセンスRNA分子が、以下で更に説明されるように、その全体又はかなりの部分がRNAi機構によってプロセッシングされ得、それにより、その作用を有するために、すなわち、SNCA遺伝子によってコードされるRNAに含まれるRNA標的配列に対してRNAiを誘導するためにRISC複合体に組み込まれるように設計される。第1又は第2の鎖を含む又はそれからなる配列は、その全体又は実質的な部分において、ヒトSNCA遺伝子によってコードされるRNAを特異的に標的とする配列をとることができる。したがって、

二本鎖RNAがRNAiを誘導することができる限り、そのような二本鎖RNAが本発明において企図される。

【0078】

いくつかの実施形態では、本発明による二本鎖RNAは、pre-miRNA足場、pri-miRNA足場、shRNA、又はsiRNAに含まれる。好ましくは、発現されたカセットによってコードされる第1及び第2の鎖、又は第3及び第4の鎖、又は第5及び第6の鎖、又は全ての鎖は、単一の転写産物に含まれる。発現された転写物は、その後のプロセッシング、すなわち切断において、単一の転写物が複数の別個のRNA分子にプロセッシングされる結果となることが理解される。

【0079】

相補的という用語は、本明細書では、水素結合を介して別の核酸配列に結合することができる核酸配列のヌクレオチド、すなわち塩基対合が可能なヌクレオチドとして定義される。RNAの構築ブロックであるリボヌクレオチドは、糖、リン酸及びプリン（グアニン、アデニン）又はピリミジン（ウラシル、シトシン）のいずれかである塩基を含有するモノマー（ヌクレオチド）から構成される。相補的RNA鎖は二本鎖RNAを形成する。二本鎖RNAは、2つの別個の相補的RNA鎖から形成され得るか、又は2つの相補的RNA鎖が1つのRNA鎖に含まれ得る。相補的RNA鎖では、ヌクレオチドのシトシン及びグアニン（C及びG）は塩基対、グアニン及びウラシル（G及びU）を形成することができる、ウラシル及びアデニン（U及びA）も塩基対を形成することができる。実質的な相補性という用語は、第1及び第2のRNA配列が完全に相補的であること、又は第1のRNA配列及びヒトSNCA遺伝子によってコードされるRNAの1つ又は複数の標的RNA配列が完全に相補的であることを必要としないことを意味する。

【0080】

ガイド鎖

本発明に従って発現される第1及び第2のRNAは、その全体又は実質的な一部にガイド鎖を含む。

【0081】

本発明の特定の実施形態では、ガイド鎖は、センス転写物中の標的RNA配列に相補的（「抗」）であり、センス標的RNA配列は、SNCA遺伝子によってコードされるRNAに含まれるので、アンチセンス鎖とも呼ばれ得る。したがって、第1及び第2のRNAはまた、標的RNA配列と実質的な配列同一性を有するか又は同一であり得る「センス鎖」を含む。したがって、第1及び第2のRNAは、それ自体に実質的に相補的なヘアピン又は二本鎖RNAとして説明することができる。

【0082】

本発明による前記二本鎖RNAは、RNA干渉を誘導し、それによってSNCA由来転写物のノックダウンを含むSNCA転写物の発現を減少させることである。標的化され得る転写物には、スプライスバリエーションを含むスプライシングされた転写物及びスプライシングされていないRNA転写物が含まれ得る。したがって、ヒトSNCA遺伝子によってコードされるRNAは、5'非翻訳領域（UTR）、イントロン及びエクソン配列、それに続く3'UTR及びポリAシグナル、並びにそのスプライスバリエーションを含む非スプライシング型mRNAを含むと理解される。本発明による二本鎖RNAはまた、転写サイレンシングを誘導し得る。

【0083】

したがって、SNCA転写物の発現を低下させることは、本明細書では、好ましくは、 α -シヌクレインタンパク質への翻訳のために細胞において利用可能なmRNAが少なくなるように、標的細胞における機能的SNCA mRNAの定常状態レベルを低下させ、それによって標的細胞におけるタンパク質の定常状態レベルを低下させることとして理解される。したがって、SNCA転写物の発現を減少させることは、必ずしもSNCA遺伝子のデノボ転写を減少させることを伴わず、むしろSNCA mRNA及び／又はその前駆体、例えば非スプライシング型RNA転写物の分解を増加させることを伴う。

【0084】

いくつかの実施形態では、本発明による二本鎖RNAは、第1のRNA配列及び第2のRNA配列、すなわち第1及び第2又は第3及び第4のRNA鎖を含み、第1及び第2のRNA配列は実質的に相補的であり、第1のRNA配列は少なくとも19ヌクレオチドの配列長を有し、SNCA遺伝子によってコードされるRNAの標的RNA配列と実質的に相補的であり、第1のRNA配列は、RNA干渉を誘導して標的RNA配列を含むRNA転写物の発現を配列特異的に低下させることができる。いくつかの更なる実施形態では、標的RNA配列を含むRNA転写物の発現を減少させるためのRNA干渉の前記誘導は、SNCA遺伝子発現を減少させることを意味する。

【0085】

いくつかの実施形態では、本発明による二本鎖RNAは、第1のRNA配列及び第2のRNA配列、すなわち第1及び第2又は第3及び第4のRNA鎖を含み、第1及び第2のRNA配列は実質的に相補的であり、第2のRNA配列は少なくとも19ヌクレオチドの配列長を有し、SNCA遺伝子によってコードされるRNAの標的RNA配列と実質的に相補的であり、第2のRNA配列は、RNA干渉を誘導して標的RNA配列を含むRNA転写物の発現を配列特異的に低下させることができる。いくつかの更なる実施形態では、標的RNA配列を含むRNA転写物の発現を減少させるためのRNA干渉の前記誘導は、SNCA遺伝子発現を減少させることを意味する。

【0086】

当業者は、標準的なルシフェラーゼレポータアッセイ、並びに実施例に記載されているような、及び当技術分野で公知のような適切な対照を使用することによって、これが当てはまるかどうかを容易に決定することができる（Zhuang et al., 2006 Methods Mol Biol. 342:181-7）。例えば、標的RNA配列を含むルシフェラーゼレポータを使用して、本発明による二本鎖RNAが配列特異的ノックダウンが可能であることを示すことができる。更に、SNCA発現レベルは、内因性SNCA mRNA、 α -シヌクレインタンパク質（可溶性形態、凝集形態又はリン酸化形態）、及び／又は α -シヌクレインタンパク質アイソフォーム（SNCA140、SNCA126、SNCA112、SNCA98；それぞれ配列番号35、36、37及び38）を検出することによって決定することができる。SNCA mRNA又は α -シヌクレインタンパク質のレベルは、細胞溶解物、組織溶解物、血球並びに血清、血漿及び脳脊髄液等の生体流体等の異なる試料タイプで決定することができる。

【0087】

本明細書で使用される場合、「RNAサイレンシング」という用語は、対応するタンパク質コード遺伝子の発現の阻害又は「サイレンシング」をもたらすRNA分子によって媒介される配列特異的制御機構（例えば、RNA干渉（RNAi）、転写遺伝子サイレンシング（TGS）、転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）、クエリング、共抑制、及び翻訳抑制）の群を指す。RNAサイレンシングは、植物、動物、及び真菌を含む多くの種類の生物において観察されている。

【0088】

この文脈における「実質的に相補的」とは、ガイド配列及び標的配列の全てのヌクレオチドが塩基対を形成する、すなわち完全に相補的である、又はガイド配列及び標的配列の全てのヌクレオチドが塩基対を形成する必要がないことを意味すると理解される。本発明の第1、第2、及び適用可能な場合には第3のRNAがRNA干渉を誘導し、それによって標的RNA配列を含む配列を配列特異的に標的化することができる限り、そのような実質的な相補性が本発明に従って企図される。

【0089】

SNCA遺伝子の一部とも呼ばれる、標的RNA配列に相補的な鎖間の実質的な相補性は、好ましくは最大で2つのミスマッチのヌクレオチドからなり、より好ましくは1つのミスマッチのヌクレオチドを有し、最も好ましくはミスマッチを有さない。1つのミスマッチのヌクレオチドは、標的RNA配列と塩基対合したときに標的RNA配列に相補的な

10

20

30

40

50

鎖の全長にわたって、1つのヌクレオチドが標的RNA配列と塩基対合しないことを意味することが理解される。ミスマッチを有さないとは、標的RNA配列と相補的な鎖の全てのヌクレオチドが標的RNA配列と塩基対を形成することを意味し、2つのミスマッチを有するとは、標的RNAと相補的な鎖の2つのヌクレオチドが標的RNA配列と塩基対を形成しないことを意味する。標的RNAに相補的な鎖はまた、標的RNA配列に相補性を有さない追加のヌクレオチドを含んでもよく、例えば21ヌクレオチドより長くてもよい。そのようなシナリオでは、実質的な相補性は、標的RNA配列の全長にわたって決定される。これは、この実施形態における標的RNA配列が、標的RNAに相補的な鎖と塩基対合したときに、その全長にわたってミスマッチを有さないか、1つ又は2つ有することを意味する。

10

【0090】

標的RNAに相補的な鎖と標的RNA配列との間の実質的な相補性は、標的RNAに相補的な鎖又はヒトSNCAのRNAによってコードされる標的RNA配列のいずれかの最も短い方の全長にわたって、ミスマッチが全くない、1つ又は2つ存在することからなる。

【0091】

上記のように、本発明によるミスマッチは、第1の鎖（又は第2の鎖）及び第3の鎖（鎖）のヌクレオチドが、第1の遺伝子又は第2の遺伝子のRNAによってコードされる標的RNA配列と塩基対を形成しないことを意味する。塩基対を形成しないヌクレオチドは、A及びA、G及びG、C及びC、U及びU、A及びC、C及びU、又はA及びGである。ミスマッチはまた、ヌクレオチドの欠失又はヌクレオチドの挿入に起因し得る。ミスマッチが鎖配列の欠失である場合、これは、標的RNA配列のヌクレオチドが、鎖配列の全長と比較した場合に、その配列と塩基対を形成していないことを意味する。塩基対を形成し得るヌクレオチドは、A-U、G-C及びG-Uである。G-U塩基対は、G-Uゆらぎ又はゆらぎ塩基対とも呼ばれる。一実施形態では、鎖配列と標的RNA配列との間のG-U塩基対の数は、0、1又は2である。

20

【0092】

いくつかの実施形態では、鎖RNA配列と標的RNA配列との間にミスマッチはなく、G-U塩基対又はG-U対が許容される。好ましくは、鎖配列と標的RNA配列との間にG-U塩基対が存在しなくてもよく、又は鎖配列と標的RNA配列とがA-U若しくはG-Cである塩基対のみを有する。好ましくは、G-U塩基対が存在せず、鎖配列と標的RNA配列との間にミスマッチが存在しない。本発明による二本鎖RNAの鎖配列は、好ましくは標的RNA配列に完全に相補的であり、前記相補性はG-U、G-C及びA-U塩基対からなる。本発明による二本鎖RNAの鎖配列は、より好ましくは標的RNA配列に完全に相補的であり、前記相補性はG-C及びA-U塩基対からなる。

30

【0093】

したがって、いくつかの実施形態では、鎖配列及び標的RNA配列は、塩基対を形成する少なくとも15、16、17、18又は19個のヌクレオチドを有する。好ましくは、鎖及び標的RNA配列は実質的に相補的であり、前記相補性は少なくとも19塩基対を含む。他の実施形態では、鎖は、標的RNA配列の連続するヌクレオチドと塩基対合する少なくとも8、9、10、11、12、13又は14個の連続するヌクレオチドを有する。他の実施形態では、鎖は、標的RNA配列の連続するヌクレオチドと塩基対合する少なくとも19個の連続するヌクレオチドを有する。他の実施形態では、鎖は、標的RNA配列の19個の連続するヌクレオチドと塩基対を形成する少なくとも19個の連続するヌクレオチドを含む。他の実施形態では、鎖は、標的RNA配列と塩基対を形成する少なくとも17個のヌクレオチドを有し、標的RNA配列の連続するヌクレオチドと塩基対を形成する少なくとも15個の連続するヌクレオチドを有する。第1の鎖の配列長は、好ましくは最大で21、22、23、24、25、26又は27ヌクレオチドである。他の実施形態では、鎖は、20個の標的RNA配列の連続するヌクレオチドと塩基対合する少なくとも20個の連続するヌクレオチドを有する。他の実施形態では、鎖は、標的RNA配列の2

40

50

1 個の連続するヌクレオチドと塩基対を形成する少なくとも 2 1 個の連続するヌクレオチドを含む。

【0094】

上記のように、第 1 の RNA の第 1 又は第 2 の鎖と第 2 の RNA の第 1 の鎖との間に完全な相補性（すなわち、完全塩基対形成（ミスマッチなし）及び G-U 塩基対形成なし）を有する必要はない場合があり、そのような鎖としての標的 RNA 配列は、遺伝子発現の十分な抑制を依然として可能にすることができる。また、完全な相補性を有さないことは、例えば、標的 RNA 配列を含む転写物の配列特異的阻害を維持しながら、オフターゲット RNA 配列特異的遺伝子抑制を回避又は低減するために企図され得る。しかしながら、より強力な阻害をもたらし得るので、完全な相補性を有することが好ましい場合がある。理論に束縛されるものではないが、第 1 の RNA の第 1 又は第 2 の鎖と第 2 の RNA の第 1 の鎖との間に完全な相補性を有し、標的 RNA 配列は、第 1 の RNA の前記第 1 又は第 2 の鎖又は第 2 の RNA の第 1 の鎖（又はそのかなりの部分）を含む活性化された RISC 複合体がその標的 RNA 配列を切断することを可能にし得るが、ミスマッチを有することは切断を妨げ得、翻訳の阻害を主に可能にし得、その結果、後者はあまり強力でない阻害をもたらし得る。

10

【0095】

第 1 又は第 2 の RNA 上の第 2 の鎖に関して、第 2 の鎖は第 1 の鎖と実質的に相補的である。第 1 の鎖と組み合わせられた第 2 の鎖は、二本鎖 RNA を形成する。前述のように、これは、その標的、すなわちヒト SNCA 遺伝子によってコードされる RNA の発現を特異的に阻害するように配列決定するために、第 1 の鎖に由来するガイド配列が RISC 複合体に含まれるように、RNA 干渉機構に適した基質を形成することである。第 2 の鎖の配列は、標的 RNA 配列と配列類似性を有する。しかしながら、第 1 の鎖との第 2 の鎖の実質的な相補性は、第 1 の鎖と標的 RNA 配列との間の実質的な相補性と比較して、実質的な相補性が少なくなるように選択され得る。したがって、第 2 の鎖は、0、1、2、3、4 又はそれ以上のミスマッチ、0、1、2、3 又はそれ以上の GU ゆらぎ塩基対を含み得、0、1、2、3、4 ヌクレオチドの挿入及び／又は 0、1、2、3、4 ヌクレオチドの欠失を含み得る。ガイド配列が本発明の第 1 の RNA の第 2 の鎖又は第 2 の鎖内に含まれる場合、上記の説明は本発明の第 1 の鎖に適用されることが理解される。

20

【0096】

好ましくは、第 1 の鎖及び第 2 の鎖は実質的に相補的であり、前記相補性は 0、1、2 又は 3 の G-U 塩基対を含み、及び／又は前記相補性は少なくとも 17 塩基対を含む。これらのミスマッチ、G-U ゆらぎ塩基対、挿入及び欠失は、第 1 の鎖、すなわち第 1 の鎖と第 2 の鎖との間に形成される二本鎖領域に関するものである。第 1 及び第 2 の鎖が実質的に塩基対形成することができ、ヒト SNCA 遺伝子によってコードされる RNA の配列特異的阻害を誘導することができる限り、そのような実質的な相補性は本発明に従って許容される。第 1 の鎖と第 2 の鎖との間の実質的な相補性は、選択される二本鎖 RNA 設計に依存し得ることも理解される。それは、例えば、二本鎖 RNA が組み込まれるために選択される miRNA 足場に依存し得る。

30

【0097】

上記から明らかなように、第 1 及び第 2 の RNA の第 1 の鎖と第 2 の鎖との間の実質的な相補性は、完全に相補的である（すなわち、完全に塩基対である）第 1 及び第 2 の RNA 配列に対してミスマッチ、欠失及び／又は挿入を含み得る。いくつかの実施形態では、第 1 及び／又は第 2 の RNA の第 1 及び第 2 の鎖は、少なくとも 11 個の連続する塩基対を有する。したがって、第 1 の鎖の少なくとも 11 個の連続するヌクレオチド及び第 2 の鎖の少なくとも 11 個の連続するヌクレオチドは完全に相補的である。いくつかの実施形態では、第 1 及び／又は第 2 の RNA の第 1 及び第 2 の鎖は、塩基対を形成する少なくとも 15 個のヌクレオチドを有する。第 1 の鎖の少なくとも 15 ヌクレオチドと第 2 の鎖の少なくとも 15 ヌクレオチドとの間の前記塩基対形成は、G-U、G-C 及び A-U 塩基対からなり得るか、又は G-C 及び A-U 塩基対からなり得る。

40

50

【0098】

いくつかの実施形態では、第1及び第2のRNA配列は、塩基対を形成する少なくとも15個のヌクレオチドを有し、少なくとも11個の連続する塩基対を有する。別の実施形態では、第1のRNA配列及び第2のRNA配列は実質的に相補的であり、前記相補性は少なくとも17塩基対を含む。前記17塩基対は、好ましくは17個の連続する塩基対であり得、前記塩基対は、G-U、G-C及びA-U塩基対からなるか、又はG-C及びA-U塩基対からなる。

【0099】

したがって、本発明は、第1及び／又は第2のRNAの第1の鎖及び第2の鎖をコードする発現カセットを提供し、第1及び第2の鎖は実質的に相補的であり、第1の鎖は少なくとも19ヌクレオチドの配列長を有し、ヒトSNCA遺伝子によってコードされるRNAに含まれる標的RNA配列に実質的に相補的である。本発明による適切な標的RNA配列が提供される（例えば、表1を参照されたい）。適用可能な場合、発現カセットはまた、第3のRNAの第1の鎖及び第2の鎖をコードし得、第1の鎖及び第2の鎖は実質的に相補的である。

【0100】

本発明の特定の実施形態では、第1のRNAは、その第2の鎖に第1の標的配列に実質的に相補的なガイド配列を含む。この場合、上記の実施形態は、本発明の第1及び第3の鎖の代わりに、本発明の第2及び第3の鎖に適用される。

【0101】

【表1】

配列番号	miSNCA	標的配列 (5'-配列-3')	長さ (ヌクレオチド)
4	02	AAGGACTTTCAAAGGCCAAGGA	22
5	05	TGGCTGAGAAGACCAAAGAGCA	22
6	07	AGAGCAAGTGACAAATGTTGGA	22
7	12	TGGCTGCTGCTGAGAAAACCAA	22
8	13	AGGAAAGACAAAAGAGGGTGTT	22
9	15	TCAAAAAGGACCAGTTGGGCAA	22
10	16	AGACTACGAACCTGAAGCCTAA	22

表1.ヒトSNCA遺伝子によってコードされる転写物の適切な標的RNA配列。

【0102】

いくつかの実施形態では、第1の鎖及び第2の鎖をコードする発現カセットが提供され、第1及び／又は第2のRNAの第1及び第2の鎖は実質的に相補的であり、第1の鎖は少なくとも22ヌクレオチドの配列長を有し、ヒトSNCA遺伝子によってコードされるRNAに含まれる表1に列挙される群から選択される標的RNA配列に実質的に相補的である。

【0103】

同様に、いくつかの実施形態では、第1の鎖及び第2の鎖をコードする発現カセットが提供され、第1及び／又は第2のRNAの第1及び第2の鎖は実質的に相補的であり、第1のRNAの第2の鎖及び第2のRNAの第1の鎖は少なくとも22ヌクレオチドの配列長を有し、表1に列挙される群から選択される標的RNA配列に実質的に相補的である。適用可能な場合、発現カセットはまた、第3のRNAの第1の鎖及び第2の鎖をコードし得、第1の鎖及び第2の鎖は実質的に相補的である。

【0104】

本発明のいくつかの実施形態では、ガイド配列の各々は、配列番号 4 ～ 配列番号 10 からなる群から選択される配列と実質的に相補的である。

【0105】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明の第 1 及び第 2 のガイド配列は同じ配列である。他の実施形態では、本発明の第 1 及び第 2 のガイド配列は異なる配列である。

【0106】

上記のように、本発明の RNA は、miRNA 足場に組み込まれ得る。miRNA 足場配列は、細胞内に存在する RNAi 機構によってプロセッシングされる。本発明のいくつかの特定の実施形態では、miRNA 足場配列のプロセッシングは、第 1 の RNA の第 1 の鎖又はそのかなりの部分を 21 ～ 30 ヌクレオチドの範囲で含むガイド配列；及び第 2 の RNA の第 1 の鎖又はそのかなりの部分を 21 ～ 30 ヌクレオチドの範囲で含むガイド配列をもたらす。本発明のいくつかの他の特定の実施形態では、miRNA 足場配列のプロセッシングは、第 1 の RNA の第 2 の鎖又はそのかなりの部分を 21 ～ 30 ヌクレオチドの範囲で含むガイド配列；及び第 2 の RNA の第 1 の鎖又はそのかなりの部分を 21 ～ 30 ヌクレオチドの範囲で含むガイド配列をもたらす。

10

【0107】

そのようなガイド鎖は、選択された標的配列を標的とすることによって SNCA 遺伝子転写物発現を減少させることができる。

【0108】

実施例に示されるように、第 1 の RNA の第 1 の鎖及び第 2 の RNA の第 1 の鎖、或いは、代替的には、第 1 の RNA の第 2 の鎖及び第 2 の RNA の第 1 の鎖は、本発明の発現カセットによってコードされるように、細胞の RNAi 機構によってプロセッシングされた場合、ガイド鎖に部分的又は全体的に含まれる。したがって、第 1 の RNA の第 1 又は第 2 の鎖及び第 2 の RNA の第 1 の鎖を含む、発現カセットによってコードされる RNA から生成されるガイド鎖は、第 2 の RNA 配列の少なくとも 18 ヌクレオチドを含むことになる。

20

【0109】

好ましくは、そのようなガイド鎖は、少なくとも 19 ヌクレオチド、20 ヌクレオチド、21 ヌクレオチド又は 22 ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、全体としても、第 1 の RNA 配列の第 1 の鎖若しくは第 2 の鎖又は第 2 の RNA 配列の第 1 の鎖を含むことができる。miRNA 足場を選択する際、第 1 の RNA 配列の第 1 又は第 2 の鎖及び第 2 の RNA 配列中の第 1 の鎖は、元のガイド鎖を置換するように選択することができる。しかしながら、これは、そのような人工足場から生成されたガイド鎖が、第 1 の RNA の第 1 の鎖若しくは第 2 の鎖又は選択された第 2 の RNA の第 1 の鎖と長さが同一であること、又は第 1 の RNA の第 1 の鎖若しくは第 2 の鎖又は第 2 の RNA の第 1 の鎖が、その全体が、生成されるガイド鎖に見られることを必ずしも意味しない。

30

【0110】

miR-451

本発明のいくつかの実施形態では、第 1 の RNA 及び第 2 の RNA のそれぞれが、miR-451 に由来する pre-miRNA 又は pri-miRNA 足場に組み込まれる。本発明のいくつかの特定の実施形態では、第 1 の RNA 及び第 2 の RNA のそれぞれは、配列番号 11 又はそのバリエーションを含む。

40

【0111】

したがって、実施例に示されるように、本発明の核酸の第 1 の鎖、第 2 の鎖、第 3 の鎖及び第 4 の鎖は、miR-451 に由来する pre-miRNA 足場又は pri-miRNA 足場に組み込まれ得る。miR-451 足場は、主にガイド鎖誘導 RNA 干渉をもたらし得る RNA 干渉を誘導し得るので、本発明において特に有用であることが見出されている。pri-miR-451 足場は、プロセッシングがカノニカル miRNA プロセッシング経路とは異なるため、パッセンジャー鎖をもたらさない (Cheloufi et al. 2010 Nature 465 (7298) : 584-9 and Yang e

50

t a l . , 2010 Proc Natl Acad Sci USA 107 (34) : 15163-8)。足場は、完全ではないにしても、パッセンジャー鎖による望ましくない潜在的オフターゲットを大部分回避することができるので、遺伝子治療製品を開発するための優れた候補を表す。パッセンジャー鎖（第2の配列に対応する）は、SNC A RNA以外の転写物の標的化をもたらし得るので、そのような足場を使用することは、そのような望ましくない標的化を防止し得る。したがって、選択された足場は、パッセンジャー鎖の15%未満；10%未満；5%未満；4%未満；又は3%未満を産生することが好ましい。

【0112】

実施例に示されるように、miRNA 451足場は、好ましくは、5'から3'に、第1に、5'-CUUGGGA AUGGCA AGG-3'（配列番号12）と、それに続く、第1のRNA配列を含むか又はそれからなる22ヌクレオチドの配列と、それに続く、17ヌクレオチドの配列とを含み、それは第2のRNA配列とみなすことができ、それは全長にわたって22ヌクレオチドの前記配列のヌクレオチド2~18と相補的であり、続いて、配列5'-SWCUUGC UAUACCC AGA-3'（配列番号13）（Sは、A又はGであり、又はC及びWは、A又はUである）とを含む。好ましくは、後者の配列の最初の5'-G/C/Aヌクレオチドは、第1又は第2のRNAの第1の鎖の第1ヌクレオチドと塩基対を形成しない。

【0113】

そのような足場は、元のpri-miR-451足場に見られるような更なるフランキング配列を含み得る。或いは、ヘアピンステム配列、5'-CUUGGGA AUGGCA AGG-3'（配列番号12）及び5'-SWCUUGC UAUACCC AGA-3'（配列番号13）は、他のpri-mRNA構造のヘアピンステム配列によって置き換えられ得る。上記から明らかなように、足場の配列は、野生型足場に存在するように、（推定）ガイド鎖配列及びそれに相補的な配列に関して異なるだけでなく、5'、ループ及び3'配列に追加の変異も含み得、野生型足場の二次構造を模倣すると予測されるRNA構造を提供するために追加の変異が必要とされ得る。そのような足場は、より大きなRNA転写物、例えば5'UTR及び3'UTR並びにポリAを含むpol II発現転写物に含まれてもよい。フランキング構造も存在しなくてもよい。

【0114】

したがって、22ヌクレオチドの配列を有するshRNA様構造を発現する本発明による発現カセットは、第2のRNAの第1の鎖を含むか、又は第2のRNAの第1の鎖からなり、その後17ヌクレオチドの配列が続く、これは第2のRNAの第2の鎖であることとみなすことができ、その全長にわたって前記22ヌクレオチドの配列のヌクレオチド2~18と相補的である。後者のmiR-451足場に由来するshRNA様構造は、miR-451由来のpre-miRNA足場と称され得る。

【0115】

いくつかの実施形態では、第1及び第2のRNAの前記第1の鎖の各々が、ヒトSNC A遺伝子によってコードされるアンチセンスRNA転写物に含まれる標的RNA配列に実質的に相補的である、本発明による発現カセットが提供される。

【0116】

いくつかの実施形態では、第1及び第2のRNAの第1の鎖の各々は、配列番号4~10からなる群から選択される標的配列に実質的に相補的である。いくつかの好ましい実施形態では、第1及び第2のRNAの第1の鎖の各々は、19、20、21又は22ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの特定の実施形態では、第1及び第2のRNAの各第1の鎖は、その全長にわたって標的配列と完全に相補的である。いくつかの好ましい実施形態では、第1及び第2のRNAの第1の鎖の各々は、19、20、21又は22ヌクレオチドの長さを有し、第1及び第2のRNAの前記第1の鎖は、その全長にわたって標的配列と完全に相補的である。第1及び第2のRNAの第1の鎖の各々は、配列番号14~配列番号20からなる群から選択することができる。

10

20

30

40

50

【0117】

上述のように、第1及び第2のRNAのそれぞれの第1の鎖は、第1及び第2のRNAの第2の鎖と組み合わせられる。本明細書に記載されるように、当業者は、細胞内で発現された場合にRNA干渉を誘導することができる第1及び第2のRNAのための第1及び第2の鎖を提供するために、第1及び第2のRNAの適切な第2の鎖を設計及び選択することが十分に可能である。第1及び第2のRNAの適切な第2の鎖は、配列番号21～配列番号27からなる群から選択することができる。

【0118】

第1及び第2のRNAの第1の鎖は、実施例に示されるようなmiR-451足場に含まれる。本発明による第1及び第2のRNAのための第1及び第2の鎖を含む適切な足場は、配列番号11等の配列であり得る。

【0119】

上記のような第1及び／又は第2のRNAの第1の鎖は、発現カセットに含まれ得る。第1及び／又は第2のRNAの第1の鎖はまた、発現カセットによってコードされるRNA構造に含まれ得る。

【0120】

上記のような第1及び第2のRNA配列の第1及び第2の鎖は、発現カセットに含まれ得る。第1及び第2のRNAの第1及び第2の鎖はまた、発現カセットによってコードされるRNA構造に含まれ得る。カセットは、存在する場合、上記のように、第3のRNAの第1及び第2の鎖を更に含み得ることが理解される。

【0121】

そのような第1及び第2のRNAを利用して上に開示されたRNA配列を標的化することは、ヒトSNCA遺伝子によってコードされるRNA転写物の発現を減少させるのに特に有用であることが分かった。このようにヒトSNCAを標的とすることにより、本発明者らは、ヒトSNCA遺伝子発現を非常に効率的に低下させ、したがってSNCA RNA及び α -シヌクレインタンパク質の発現を低下させ、最終的に α -シヌクレイン凝集体並びにレビー及び／又はPapp-Lantos体の形成を低下させることができた。最終的に、これは、SNCA遺伝子に関連する任意の病状を逆転させ、予防し、その進行を減速させ、又は完全に停止させることができる。

【0122】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸は、第3のRNAをコードする第3の配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、第3のRNAは、配列番号34又はそのバリエーションを含む。

【0123】

したがって、核酸は、第1のRNAである第1及び第2のRNA鎖、第2のRNAである第3及び第4のRNA鎖、並びに第3のRNAである第5及び第2のRNA鎖を誘導すると言われ得、第5及び第6のRNA鎖をコードする配列の後には、少なくとも15ヌクレオチドのスペーサ、並びに第1及び第2のRNA鎖をコードする配列の後には、少なくとも15ヌクレオチドのスペーサ、並びに第3及び第4のRNA鎖をコードする配列が続く。

【0124】

前記第3のRNAは、miR-144に由来するpre-miRNA又はpri-miRNA足場に組み込まれ得る。本発明のいくつかの特定の実施形態では、第3のRNAは、配列番号34又はそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、そのバリエーションは配列番号28である。換言すれば、上記のように、本発明の第3のRNAの第1及び第2の鎖は、miR-144に由来するpre-miRNA又はpri-miRNA足場に組み込まれる。したがって、第3のRNAは、それ自体に実質的に相補的なヘアピン又は二本鎖RNAとして説明することができる。いくつかの実施形態では、第2のRNA中のヘアピンは少なくとも70ヌクレオチドを含む。

【0125】

第3のRNAがmiR-144に由来するpre-miRNA又はpri-miRNA足場に組み込まれる前記実施形態では、第3のRNAはダイサーによってプロセシングされ、したがって、後続のsiRNAの推定鎖は、ステムループ配列：5'-第1の鎖-先端ループ配列-第2の鎖-任意の2ntオーバーハング配列-3'又は逆に、5'-第2の鎖-先端ループ配列-第1の鎖-任意の2ntオーバーハング配列-3'を介して連結される。

【0126】

第3のRNAがmiR-144に由来するpre-miRNA又はpri-miRNA足場に組み込まれる本発明のいくつかの実施形態では、第3のRNAは、第3のRNAのプロセシング及び／又は発現を低下させるように変異される。いくつかの特定の実施形態では、配列番号34又はそのバリエーションは、第3のRNAのプロセシング及び／又は発現を減少させるように変異されている。

10

【0127】

いくつかの実施形態では、変異は、単一点変異である。言い換えれば、第1のRNAは、第1のRNAのプロセシング及び／又は発現を減少させるための単一の点変異を含む。DROSHA切断部位の4～8位に導入された任意のミスマッチ、バルジ又はGUゆらぎは、DROSHAの酵素活性を損なう可能性がある。前記位置内の二重及び三重のミスマッチ、バルジ又はゆらぎは、DROSHAの活性を更に低下させる。したがって、miR-144の4～8ヌクレオチドストレッチ内の以下の一塩基多型(SNP)及びそれらの組合せのいずれかは、(プレ)-miR-144発現を変化させ得る。

20

【0128】

いくつかの実施形態では、第3のRNAは、位置4にU>G；位置5にA>U又はG；位置6にU>A；位置7にC>G又はU；位置8にA>U又はGからなる群から選択される少なくとも1つの変異を含む。

【0129】

好ましい実施形態では、第3のRNAは、位置5にA>Uの単一の点変異を含む。当業者は、これが該当するかどうかを、標準的なアッセイ及び実施例に記載されており、当技術分野で知られているような適切な対照を使用することによって容易に決定することができる。

【0130】

本発明の核酸内のmiR-144/miR-451足場の特定の組合せは、遺伝子治療及びRNAサイレンシングの文脈内で特に有用である。miR-144及びmiR-451は、トランスで制御されるクラスター化されたmiRNAの例であり、miR-144は、AgO2によるmiR-451のプロセシングを制御する。具体的には、miR-144は、ダイサーを抑制し、次に全体的なカノニカルなmiRNAプロセシングを抑制することによって、miR-451のトランスでの生合成を増強する(Kretov et al., 2020 Molecular Cell 78, 317-328)。したがって、足場のこの組合せが使用される場合、本発明の第3のRNAは、本発明の第1及び第2のRNAの生合成、したがって前記第1及び第2のRNAに含まれるガイド配列の送達を増強するのに重要な役割を果たす。

30

40

【0131】

本発明のいくつかの実施形態では、第1のRNAをmiR-144足場に組み込む。

【0132】

本発明のいくつかの特定の実施形態では、第1のRNAはmiR-144足場に組み込まれ、第2のRNAはmiR-451足場に組み込まれる。

【0133】

上記のように、第1のRNAは第1のガイド配列を含む。第1のRNAがmiR-144足場に組み込まれる本発明の実施形態では、第1のガイド配列は、第1のRNAの第1又は第2の鎖に組み込まれ得る。

【0134】

50

本発明の第1のRNAがmiR-144足場に組み込まれるそれらの実施形態では、本発明における使用のためのmiRNA-144足場は好ましくは、5'から3'に、まず、5'-UGGGGCCUGGCUM-3'（式中、MはA又はC又はG又はUである）（配列番号29）を含み、その後、第1のRNA配列を含むか又はそれからなる22ヌクレオチドの配列が続く、その後、頂端ループ5'-UUUGCGAUGAGAWMM-3'（式中、Wは、好ましくはC又はGであるが、A又はUであってもよく、第1のRNAの第1の鎖の最後のヌクレオチドと塩基対を形成するためのものである；式中、MはA又はCであり、第1のRNAの第1の鎖のヌクレオチド21と塩基対を形成しない）（配列番号30）とみなすことができる15ヌクレオチドの配列が続く、その後、第2のRNA配列とみなすことができ、第1の鎖のヌクレオチド2とミスマッチを形成するヌクレオチド18を除いて、22ヌクレオチドの前記配列のヌクレオチド1及び3～10及び12～20とその全長にわたって相補的である20ヌクレオチドの配列が続く、続いて配列5'-AGUCCGGGCACCCCC-3'（配列番号31）が続く。

10

20

30

40

50

【0135】

好ましくは、後者の配列の最初の5'-Uヌクレオチドは、第3のRNAの第1の鎖の第1ヌクレオチドと塩基対を形成しない。そのような足場は、元のpri-miR-144足場に見られるランキング配列を含み得る。或いは、ランキング配列5'-5'-ATCGGCGCTATGCTTCTCTGTGCCCCCAAG-3'（配列番号32）及び5'-AGCTCTTGGAAGCCTGACAAAGGAGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAAGCTCTCTGTCTCAGCCTGTCAACAACCTACTGACTGCCAGGGCA-3'（配列番号33）は、他のpri-mRNA構造のランキング配列によって置き換えられ得る。ランキング構造はまた、存在しなくてもよい。

【0136】

本発明の第1のRNAがmiR-144足場を含む実施形態では、ガイド配列は、足場の5pアーム又は3pアーム内に含まれ得る。miR-144のDROSHAプロセッシング、その後のダイサープロセッシングは、miRNA鎖選択のプロセスに最終的に入るmiRNA二重鎖を生成する。鎖選択はRISC内で行われ、どの鎖が活性鎖（ガイド鎖とも呼ばれる）になり、どの鎖が分解されるか（パッセンジャー鎖）を決定する（Noland and Doudna, 2013 RNA, 19:639-648）。ガイド鎖選択は、miRNA二重鎖の熱力学的特徴によって高度に決定され、したがって、ガイド鎖選択は、miRNAをコードするヌクレオチド配列を修飾することによって影響され得る。一般的に言えば、その5'末端でより低い熱力学的安定性を有する鎖がガイド鎖になる。ヒトmiRNAガイド鎖の別の重要な特徴は、A及びGヌクレオチドの濃縮に関連する5'末端Uバイアスであり、一方、パッセンジャー鎖は、5'末端Cバイアス及びC及びUヌクレオチドの濃縮を示す（Hai Yang Hu et al. 2009, BMC Genomics 2009, 10:413）。

【0137】

好都合には、ガイド鎖選択が配列依存的であるので、ガイド鎖を含む本発明のmiR-144構築物は、5p-又は3p-ガイド含有領域（配列番号101）として設計される場合がある。重要なことに、本発明の所望のガイド鎖がRISCにおいて選択される確率は、第1の鎖の第1のヌクレオチド（5p-設計）又は第2の鎖の第1のヌクレオチド（3p-設計）としてUを選択すること、及び第1の鎖のヌクレオチド20（5p-設計）又は第2の鎖のヌクレオチド19（3p-設計）としてC又はGを選択すること等の単一ヌクレオチド変異によって調節することができる。

【0138】

miR-451足場と同様に、miR-144足場の配列は、野生型足場に存在するように、（推定）ガイド鎖配列及びそれに相補的な配列に関して異なるだけでなく、5'、ループ及び3'配列に追加の変異も含み得、野生型足場の二次構造を模倣すると予測されるRNA構造を提供するために追加の変異が必要とされ得る。ここでも、そのような足場

は、より大きなRNA転写物、例えば5'UTR及び3'UTR並びにポリAを含むpol I I発現転写物に含まれてもよい。フランキング構造はまた、存在しなくてもよい。したがって、本発明による発現カセットは、第1のRNAの第1の鎖を含むか又はそれからなる22ヌクレオチドの配列と、その後続く17ヌクレオチドの配列とを有するshRNA様構造を発現し得、これは、第1の鎖のヌクレオチド2とミスマッチを形成するヌクレオチド18を除いて、22ヌクレオチドの前記配列のヌクレオチド1及び3～10及び11～19とその全長にわたって相補的である、第1のRNAの第2の鎖であるとみなすことができる。後者のmiR-144足場に由来するshRNA様構造は、miR-144由来のpre-miRNA足場と称され得る。

【0139】

10

いくつかの実施形態では、第1のRNAの前記第1又は第2の鎖が、SNCA遺伝子によってコードされるRNA転写物に含まれる標的RNA配列に実質的に相補的である、本発明による発現カセットが提供される。

【0140】

いくつかの好ましい実施形態では、第1のRNAの第1又は第2の鎖は、19、20、21又は22ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの特定の実施形態では、第1のRNAの第1又は第2の鎖は、その全長にわたって第1の標的配列と完全に相補的である。いくつかの好ましい実施形態では、第1のRNAの第1又は第2の鎖は、19、20、21又は22ヌクレオチドの長さを有し、第1のRNAの前記第1の鎖は、その全長にわたって標的配列と完全に相補的である。

20

【0141】

上で説明したように、第1のRNAの第1の鎖がガイド配列を含む場合、第1の鎖は第1のRNAの第2の鎖と組み合わせられるべきである。上記のように、当業者は、第1のRNAの適切な第2の鎖を設計及び選択することが十分に可能である。

【0142】

同様に、第1のRNAの第2の鎖がガイド配列を含む場合、第2の鎖は第1のRNAの第1の鎖と組み合わせられるべきである。上記のように、当業者は、第1のRNAの適切な第1の鎖を設計及び選択することが十分に可能である。

【0143】

したがって、本発明のいくつかの実施形態では、第1のRNAは配列番号101又はそのバリエーションを含む。本発明のいくつかのより特定の実施形態では、第1のRNAは、配列番号101又はそのバリエーションを含み、第2のRNAは配列番号11又はそのバリエーションを含む。

30

【0144】

第1のRNAが配列番号101を含む本発明のいくつかの実施形態では、第1のガイド配列は、第1のRNAの第1の鎖に組み込まれ、他の実施形態では、ガイド配列は、第1のRNAの第2の鎖に組み込まれる。

【0145】

本発明のいくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号14～配列番号20からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号14～20に対する相補鎖配列は、それぞれ配列番号21～配列番号27である。

40

【0146】

本発明のいくつかの実施形態では、第1のRNAは、配列番号71～配列番号77からなる群から選択される配列を含む。本発明のいくつかの実施形態では、第2のRNAは、配列番号71～配列番号77からなる群から選択される配列を含む。

【0147】

本発明のいくつかの実施形態では、核酸は、配列番号78～配列番号81及び配列番号95～配列番号98からなる群から選択される配列を含む。

【0148】

本発明のいくつかの実施形態では、第1及び第2のRNAは配列番号11を含み、第1

50

のRNAをコードする配列の後に、配列番号3を含むスペースが続く。

【0149】

本発明のいくつかの実施形態では、第1のRNAは配列番号101を含み、第2のRNAは配列番号11を含み、第1のRNAをコードする配列の後に、配列番号1を含むか又はそれからなるスペースが続く。

【0150】

本発明のいくつかの実施形態では、第3のRNAは配列番号34を含み、第2及び第3のRNAは配列番号11を含み、第3のRNAをコードする配列の後に、配列番号1を含むか、又は配列番号1からなるスペースが続き、第1のRNAをコードする配列の後に、配列番号3を含むか又はそれからなるスペースが続く。

10

【0151】

本発明の第2の態様では、本発明の核酸を含む発現カセットが提供され、発現カセットは、DNA分子である。いくつかの特定の実施形態では、カセット内に含まれる核酸は、プロモータ及び場合によりポリAシグナルに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、発現カセットは、5'から3'の順序で、以下の要素：少なくとも1つのプロモータ、少なくとも第1及び第2のRNA並びに少なくともポリAシグナルを含む。

【0152】

哺乳動物細胞における発現のための本明細書で上に定義される（1つ以上の）発現カセットを含むヌクレオチド配列は、目的の遺伝子産物をコードする配列に作動可能に連結された少なくとも1つの哺乳動物細胞適合性発現制御配列、例えばプロモータを含み、したがって目的の遺伝子産物を用いた遺伝子療法によって治療される哺乳動物標的細胞における目的の遺伝子産物の発現のための発現カセットを形成する。多くのこのようなプロモータは当技術分野で公知である（前出のSambrook and Russell, 2001を参照されたい）。CMVプロモータ等の多くの細胞型で広く発現される構成的プロモータを使用することができる。しかしながら、誘導性、組織特異的、細胞型特異的又は細胞周期特異的であるプロモータがより好ましいであろう。好ましくは、CAGプロモータ（i. a. Miyazaki et al. 1989 Gene 79 (2) : 269-77; Niwa, Gene. 108 (2) : 193-9）、PGKプロモータ、又はCMVプロモータ（例えば国際公開第2016102664号パンフレットの図2に示されている）等のpol IIプロモータが使用される。PD及び他の種類の神経変性脳疾患を模倣する任意の非定型提示は主に脳に影響を及ぼすので、ニューロン特異的プロモータを使用することが特に有用であり得る。

20

30

【0153】

したがって、本発明のいくつかの実施形態では、プロモータは、脳細胞における転写を駆動することができるプロモータである。適切なニューロン特異的プロモータの例は、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）、ヒトシナプシン1、CaMKIIキナーゼ、天然又は操作されたニフトリベーターアクチン（CAG）プロモータ、最小CMV配列を有するヒトシナプシンI（SynI-minCMV）、血小板由来成長因子-ベータ鎖（PDGF）、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）、フォークヘッドボックスA2（FOXA2）及びチューブリナルファ（Hioki et al. 2007 Gene Ther. 14 (11) : 872-82）である。企図され得る他の適切なプロモータは、誘導性プロモータ、すなわち宿主細胞が何らかの特定の刺激に曝露されたときにのみ転写を開始するプロモータである。

40

【0154】

本発明の核酸を含む発現カセットは、RNA分子の3'末端に作動可能に連結されたポリAシグナルをコードする。本発明のいくつかの実施形態では、ポリAシグナルは、サルウイルス40ポリアダデニル化（SV40ポリA）；又はウシ成長ホルモンポリアダデニル化（bGHポリA）；又はヒト成長ホルモンポリアダデニル化（hGHポリA）である。

【0155】

本発明による発現カセットは、例えばトランスフェクション法を用いて細胞に移入する

50

ことができる。本発明による発現カセットを移送するには、任意の適切な手段で十分であり得る。好ましくは、本発明による発現カセットは、ウイルスベクター、好ましくは遺伝子治療ベクターに含まれる。好ましくは、SNC Aの配列特異的阻害を誘導する二本鎖RNAの安定な発現が達成され得るように、発現カセットを細胞に安定に移入する遺伝子治療ベクターが使用される。適切なベクターは、レンチウイルスベクター、レトロトランスポゾンベースのベクター系、又はAAVベクターであり得る。例えば、レンチウイルスベクターがRNAゲノムを有する場合、RNAゲノムは、細胞の形質導入後に前記DNA配列及び前記発現カセットが形成されるように前記発現カセットをコードすることが理解される。好ましくは、遺伝子治療ベクターはウイルスベクターである。好ましくは、ウイルスベクターはAAVである。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される発現カセットは、逆位末端配列に隣接している。

10

【0156】

したがって、本発明の好ましい実施形態では、本発明の核酸を含む発現カセットは、少なくとも1つのAAV逆位末端配列(ITR)に隣接する。いくつかの特定の実施形態では、発現カセットは、1つの5' ITR及び1つの3' ITRに隣接している。言い換えれば、発現カセットは、カセットの5'末端のITR配列及びカセットの3'末端のITR配列に隣接している。

【0157】

AAV

本発明の第3の態様は、本発明の核酸又は発現カセットを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)に関する。

20

【0158】

組換えパルボウイルス、特に感染性ヒト又はサルアデノ随伴ウイルス(AAV)等のディペンドウイルス、及びその成分(例えば、パルボウイルスゲノム)は、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞における核酸の導入及び／又は発現のためのベクターとして使用され得る。「AAVベクター」は、インビボ、エクシビボ又はインビトロのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む組換え産生されたAAV又はAAV粒子として定義される。本明細書において、AAVベクター構築物は、ウイルスゲノム又はその一部、通常は少なくとも1つのITR、及び導入遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。本明細書において、導入遺伝子は、目的のヌクレオチド配列を指し、発現に必要なプロモータ及び／又は制御配列並びに目的の遺伝子をコードする配列を含み得る。

30

【0159】

本明細書における「組換えパルボウイルス又はAAVベクター」(又は「rAAVベクター」)又は「パルボウイルス又はAAVベクター」は、少なくとも1つのパルボウイルス又はAAV逆位末端配列(ITR)に隣接する1つ以上の目的のヌクレオチド配列、目的の遺伝子又は「導入遺伝子」を含む(又は「パッケージングする」)パルボウイルス又はAAVビリオン(すなわち、カプシド)を指す。好ましくは、導入遺伝子は、導入遺伝子の両側に1つずつ、ITRに隣接している。そのような(r)AAVベクターは、AAV rep及びcap遺伝子産物(すなわち、AAV Rep及びCapタンパク質)を発現している適切な宿主細胞に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒子にパッケージングされ得る。少なくとも1つのITRに隣接する目的の導入遺伝子がより大きな核酸構築物(例えば、染色体において、又はクローニング若しくはトランスフェクションに使用されるプラスミド若しくはバキュロウイルス等の別のベクターにおいて)に組み込まれる場合、これは典型的には「プロベクター」と呼ばれ、これはAAVパッケージング機能及び必要なヘルパー機能の存在下での複製及びカプシド形成によって「救済」され得る。

40

【0160】

好ましくは、使用されるAAVベクターは、血清型5又は9のAAVベクターである。血清型5又は9のAAV(AAV5及びAAV9とも呼ばれる)は、実施例に示すように、ヒトニューロン及びヒト星状膠細胞を形質導入するために特に有用であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される発現カセットを含むAAVが存在

50

する。したがって、AAV5及びAAV9は、FBN、ドーパミン作動性ニューロン、運動ニューロン及び星状膠細胞を含むCNSの種々のヒト細胞型を効率的に形質導入することができ、したがって、神経発生疾患を処置（例えば、本明細書中に記載されるようなSNCA遺伝子を標的化することによるPDの処置が含まれるが、これらに限定されない）するためにCNSに治療遺伝子を送達するための好適なベクター候補である。目的の任意の発現カセットを含むAAVベクターの産生は、国際公開第2007/046703号パンフレット、国際公開第2007/148971号パンフレット、国際公開第2009/014445号パンフレット、国際公開第2009/104964号パンフレット、国際公開第2011/122950号パンフレット、国際公開第2013/036118号パンフレットに十分に記載され、その全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0161】

例えば昆虫又は哺乳動物細胞株で産生されるAAVベクターの産生のために本発明で使用され得るAAV配列は、任意のAAV血清型のゲノムに由来し得る。一般に、AAV血清型は、アミノ酸レベル及び核酸レベルで有意な相同性のゲノム配列を有し、遺伝子機能の同一のセットを提供し、本質的に物理的及び機能的に等価なビリオンを産生し、実質的に同一の機構によって複製及び集合する。様々なAAV血清型のゲノム配列及びゲノム類似性の概要については、例えば、GenBank受託番号U89790；GenBank受託番号J01901；GenBank受託番号AF043303；GenBank受託番号AF085716；Chlorini et al. (1997, J. Vir. 71: 6823-33)；Srivastava et al. (1983, J. Vir. 45: 555-64)；Chlorini et al. (1999, J. Vir. 73: 1309-1319)；Rutledge et al. (1998, J. Vir. 72: 309-319)；及びWu et al. (2000, J. Vir. 74: 8635-47)を参照されたい。AAV血清型1、2、3、4及び5は、本発明の文脈で使用するためのAAVヌクレオチド配列の好ましい供給源である。好ましくは、本発明の文脈で使用するためのAAV ITR配列は、AAV1、AAV2、及び／又はAAV5に由来する。同様に、Rep52、Rep40、Rep78及び／又はRep68コード配列は、好ましくはAAV1、AAV2及びAAV5に由来する。しかしながら、本発明の文脈において使用するためのVP1、VP2及びVP3カプシドタンパク質をコードする配列は、公知の42の血清型のいずれかから、より好ましくはAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8若しくはAAV9から、又は例えばカプシドシャッフリング技術及びAAVカプシドライブラリによって得られる新たに開発されたAAV様粒子から取り出され得る。AAVカプシドは、VP1、VP2及びVP3からなり得るが、VP1及びVP3からもなり得る。

20

30

【0162】

いくつかの実施形態では、本発明によるAAVベクターは、AAV5又はAAV9カプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本発明によるAAVベクターはAAV5カプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本発明によるAAVベクターはAAV9カプシドタンパク質を含む。

【0163】

別の実施形態では、本発明による前記核酸又は前記発現カセットを含む宿主細胞が提供される。例えば、前記発現カセット又は核酸は、細菌に含まれるプラスミドに含まれ得る。前記発現カセット又は核酸はまた、例えばウイルスベクターを産生する産生細胞に含まれてもよい。前記発現カセットはまた、バキュロウイルスベクター中に提供され得る。

40

【0164】

宿主細胞における適切な発現のための、例えば野生型AAV配列を含む上で定義されたヌクレオチド配列の様々な修飾は、例えばSambrook and Russell (2001、上)に記載されているような周知の遺伝子工学技術の適用によって達成される。コード領域の様々な更なる修飾が当業者に知られており、コードタンパク質の収率を増加させることができる。これらの修飾は、本発明の範囲内である。

50

【0165】

一実施形態では、任意の哺乳動物細胞、例えば、限定されないが、筋肉細胞、肝臓細胞、神経細胞、グリア細胞及び上皮細胞に本発明のAAVベクターを感染させることができ、哺乳動物種は、限定されないが、マウス、イヌ、非ヒト霊長類及びヒトを含む任意の種であり得る。好ましい実施形態では、感染させる細胞はヒト細胞である。

【0166】

カプシドアミノ酸配列及びそれらをコードするヌクレオチド配列を操作することができ、例えば、配列はハイブリッド形態であってもよく、又は例えばAcmNPv又はスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) のコドン使用頻度等によってコドン最適化されていてもよいことを理解されたい。カプシドタンパク質は、例えば、DNAシャッフリング、エラープロードPCR、バイオインフォマティクスの合理的設計又は部位飽和変異誘発によって操作され得る。結果として生じるカプシドは、既存の血清型に基づくが、そのようなカプシドの特徴を改善する様々なアミノ酸又はヌクレオチドの変化を含む。得られるカプシドは、既存の血清型の様々な部分の組合せ、「シャッフルカプシド」であり得るか、又は完全に新規な変化、すなわち、1つ以上のアミノ酸又はヌクレオチドの付加、欠失又は置換を含み得るか、グループに編成されるか、又は遺伝子若しくはタンパク質の全長にわたって広がる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Schaffer and Maheshri; Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS San Francisco, CA, USA; September 1-5, 2004, pages 3520-3523; Asuri et al., 2012 Molecular Therapy 20(2):329-3389; Lisowski et al., 2014, Nature 506(7488):382-386を参照されたい。

【0167】

いくつかの実施形態では、本発明のAAVベクター中のITR及びカプシドタンパク質（又はその一部）は、異なるAAV血清型に由来し得る。限定ではなく例として、ITRはAAV2に由来し得るが、カプシドタンパク質は異なる血清型、例えばAAV5又はAAV9に由来し得る。

【0168】

第4の態様では、本発明は、本発明の核酸、発現カセット、又は本発明のAAVベクターと、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物（「本発明の医薬組成物」）に関する。

【0169】

適切な賦形剤には、緩衝剤及び安定剤、抗酸化剤等が含まれるが、これらに限定されない。例として、本発明の医薬組成物は、例えばPBS等の生理学的緩衝剤、及び例えばスクロース等の安定剤を含み得る。

【0170】

本発明の組成物は、その後の静脈内、線条体内、小脳内、髄腔内、実質内、硝子体内、網膜下投与での使用、又は門脈内若しくは冠動脈内送達若しくは単離肢灌流等の臓器標的血管送達での使用に適合し、適しており、使用が意図されている。

【0171】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、少なくとも1つの免疫抑制化合物も含み得る。前記化合物は、本発明の医薬組成物の投与によって誘導される免疫応答を低減及び／又は防止し得る。

【0172】

いくつかの実施形態では、これらの組成物は、インビトロ又はエクスピボで細胞に形質導入するために使用され、その場合、賦形剤は細胞培養物と適合性である必要がある。

【0173】

第5の態様では、本発明は、医薬品として使用するための本発明の核酸、本発明の発現

10

20

30

40

50

カセット、本発明の A A V ベクター、又は本発明の医薬組成物に関する。適切な定義は、本出願の他の箇所に提供されている。

【0174】

いくつかの実施形態では、前記医薬品は、本明細書で上に説明したように、ヒト S N C A 遺伝子によってコードされる R N A の発現を低下させる。

【0175】

いくつかの実施形態では、ガイド配列の少なくとも1つは、ヒト S N C A 遺伝子に含まれるエクソンの一部に実質的に相補的である。前記エクソンは、エクソン2；エクソン4；及びエクソン6からなる群から選択され得る。

【0176】

いくつかの特定の実施形態では、医薬品は、S N C A 遺伝子の少なくとも1つのスプライス部位バリエーションによってコードされる転写物の発現を低下させる。いくつかのより特定の実施形態では、少なくとも1つのスプライス部位バリエーションは、S N C A 1 4 0、S N C A 1 1 2、S N C A 1 2 6、及び S N C A 9 8 からなる群から選択される。

【0177】

ヒト S N C A 遺伝子は、代替的スプライシングによって異なるアイソフォームをコードする。S N C A アイソフォーム S N C A 1 4 0（配列番号35）、S N C A 1 2 6（配列番号36）、S N C A 1 1 2（配列番号37）、S N C A 9 8（配列番号38）は、エクソン2、4及び6等の共通のエクソンを含む S N C A 核酸によってコードされる。これら4つのアイソフォームは、その凝集特性が定性的及び定量的に異なる。カノニカルアイソフォーム S N C A 1 4 0 は、S N C A 1 2 6、S N C A 1 1 2 及び／又は S N C A 9 8 よりも凝集しやすい。更に、凝集体において、S N C A 1 4 0 は比較的直線状のフィブリルを形成し、S N C A 1 2 6 は平行なフィブリル束に配置されたより短いフィブリルを形成し、S N C A 9 8 は環状構造を形成する。S N C A タンパク質の病理学的凝集は、P D の病理発生における中心的な過程である。したがって、本発明の核酸を使用することにより、実質的に同時に異なるアイソフォームの発現を減少させることが可能になり、P D を治療及び／又は予防するための非常に強力な方法が提供される。

【0178】

本発明の文脈内で、「効力」は、定義された効果を生じるのに必要な濃度又は量に関して、医薬品又は治療物質の活性の発現として理解される。所与の医薬品の効力は、その医薬品の最大効果の50%をもたらすのに必要な薬物の濃度（E C 5 0）又は用量（E D 5 0）として表すことができる。特定の場合には、相対効力を使用することができ、特定のエンドポイントを達成するために必要な用量を記載するために単位を使用する代わりに、等価用量の比が使用される。例として、医薬品 A は医薬品 B よりも10倍強力である、すなわち、医薬品 A は、1 / 1 0 の用量で同じ効果を達成する。

【0179】

いくつかの特定の実施形態では、医薬品は、 α -s y n タンパク質凝集体の量並びに／又はレビー及び／若しくは P a p p - L a n t o s 体の量を減少又はノックダウンする。

【0180】

本発明のいくつかの実施形態では、医薬品は、P D、D L B、M S A、神経精神症状、P D の運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害及び／又は嗅覚障害を治療及び／又は予防するために使用される。

【0181】

本明細書で使用される場合、「治療する」という用語及びその変形のいずれかは、病気、傷害、精神的健康問題等の症状及び／又は原因を軽減又は排除することを意図した任意の種類のヘルスケアを指す。「予防する」という用語及びその変形のいずれかは、疾患又は状態になる可能性を減少させるために取られる任意のアクションを指す。

【0182】

P D、L B D、M S A、神経精神症状、P D の運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害、及び／又は嗅覚障害の治療は、前記疾患のいずれかに罹患しているヒト対象だけ

10

20

30

40

50

でなく、疾患の症状を示しても示さなくてもよい疾患を発症する遺伝的素因を有するヒト対象にも提供され得ることが理解される。これらの対象には、S N C A 遺伝子の既知の重複若しくは三重重複を有する対象、又は S N C A 遺伝子に疾患を引き起こす変異、すなわち、A 3 0 P、E 4 6 K、H 5 0 Q、G 5 1 D 及び A 5 3 T を有する対象が含まれるが、これらに限定されない。

【0183】

特定の実施形態では、本発明の核酸、本発明の A A V 又は本発明の医薬組成物は、医薬品として使用するために標的細胞に送達される必要がある。上記のように、P D、D L B、M S A、神経精神症状、P D の運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害、及び／又は嗅覚障害は、主に中枢神経系（C N S）に影響を及ぼす。したがって、本発明のいくつかの実施形態では、標的細胞は C N S 細胞である。本発明のいくつかの実施形態では、標的細胞はニューロンである。本発明のいくつかの特定の実施形態では、標的細胞は、脳幹ニューロン又は中脳ニューロン又は海馬ニューロン又は扁桃体ニューロン及び／又は大脳皮質ニューロンである。

10

【0184】

特定の実施形態では、本発明の核酸、本発明の A A V 又は本発明の医薬組成物は、脳脊髄液（C S F）に送達される。

【0185】

特定の実施形態では、本発明の核酸、本発明の A A V 又は本発明の医薬組成物は、黒質及び／又は線条体及び／又は視床に送達される。

20

【0186】

本発明の特定の実施形態では、本発明の A A V 又は本発明の医薬組成物は、注射によって C N S 標的細胞に送達される。特定の実施形態では、注射は実質内注射である。いくつかの実施形態では、注射は髄腔内注射である。いくつかの他の実施形態では、注射は大槽注射である。いくつかの他の実施形態では、注射は脳室内注射である。いくつかの他の実施形態では、注射は、軟膜注射である。本発明の特定の実施形態では、注射は M R I 誘導注射である。介入の特定の実施形態では、注入の後に集束超音波（f U S）が続く。

【0187】

特定の実施形態では、本発明の A A V 又は本発明の医薬組成物は、送達方法の組合せによって C N S 標的細胞に送達される。非限定的な例として、送達方法の組合せは、脳室内及び／又は胸骨内注射と組み合わせた髄腔内又は軟膜下注射又は実質内注射と組み合わせた髄腔内若しくは軟膜下注射を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、本発明の A A V 又は本発明の医薬組成物は、対流強化送達によって送達される。

30

【0188】

本発明の核酸を産生するための方法は、核酸を産生するための任意の方法を含み、それには、m i R N A 配列のデノボ合成、クローニング及びサブクローニング、設計された m i R N A 配列を含有するプラスミドの一部であるプロモータ及び複製要素を有するプラスミドの構築が含まれるが、これらに限定されず、これらは全て当業者に明らかであろう。

【0189】

本発明の A A V ベクターを産生する方法は、a) A A V ベクターが産生されるような条件下で、本明細書で上に定義される宿主細胞を培養する工程と、b) 場合により、A A V ベクターの回収、精製及び製剤化の1つ以上の工程と、を含み得る。

40

【0190】

宿主細胞は、A A V ベクターの産生に適した宿主細胞である。したがって、宿主細胞は、好ましくは大規模なインビトロ培養に適した宿主細胞である。A A V ベクターの産生に適した宿主細胞は当技術分野で周知であり、典型的には哺乳動物又は昆虫細胞株である。A A V ベクターを産生するための哺乳動物細胞株は、限定されないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ及びハムスターを含む哺乳動物に由来する、A 5 4 9、W E H I、3 T 3、1 0 T 1 / 2、B H K、M D C K、C O S 1、C O S 7、B S C 1、B S C 4 0、B M T 1 0、V E R O、W I 3 8、H e L a、H E K 2 9 3 細胞（機能性アデノ

50

ウイルスE1を発現する)、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2及び初代線維芽細胞、肝細胞及び筋芽細胞等の細胞を含む任意の哺乳動物種の中から選択される。細胞を提供する哺乳動物種の実施形態は、本発明の限定ではなく、哺乳動物細胞のタイプ、すなわち線維芽細胞、肝細胞、腫瘍細胞でもない。AAVベクターを産生するための哺乳動物細胞株は、特に広範囲のHEK293細胞株を含み、そのうちのHEK293T細胞株が好ましい。

【0191】

AAVベクターを産生するための昆虫細胞株は、異種タンパク質の産生に適した任意の細胞株であり得る。好ましくは、昆虫細胞は、バキュロウイルスベクターの複製を可能にし、培養中、より好ましくは懸濁培養中に維持することができる。好ましい実施形態では、昆虫細胞は、rAAVベクターを含む組換えパルボウイルスベクターの複製を可能にする。例えば、使用される細胞株は、スポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)、ショウジョウバエ、又は蚊、例えば、ヒトスジシマカ(Aedes albopictus)由来細胞株に由来し得る。好ましい昆虫細胞又は細胞株は、バキュロウイルス感染に感受性の昆虫種由来の細胞であり、例えば、S2(CRL-1963、ATCC)、Se301、SeIZD2109、SeUCR1、Sf9、Sf900+、Sf21、BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAm1、Ha2302、Hz2E5、High Five(Invitrogen, CA, USA)及びexpressSF+(登録商標)(米国特許第6,103,526号明細書; Protein Sciences Corp., CT, USA)を含む。

10

20

【0192】

したがって、いくつかの実施形態では、発現カセット又は構築物は、昆虫細胞適合性ベクター又は哺乳動物細胞適合性ベクターである。「哺乳動物細胞適合性ベクター」は、哺乳動物細胞又は細胞株の生産的形質転換又はトランスフェクションが可能な核酸分子であると理解される。哺乳動物細胞適合性ベクターは当技術分野で周知である。「昆虫細胞適合性ベクター」は、昆虫又は昆虫細胞の生産的形質転換又はトランスフェクションが可能な核酸分子であると理解される。例示的な昆虫細胞適合性ベクターには、プラスミド、線状核酸分子、及びバキュロウイルス等の組換えウイルスが含まれる。昆虫細胞に適合する限り、任意のベクターを使用することができる。哺乳動物又は昆虫細胞適合性ベクターは細胞のゲノムに組み込まれ得るが、細胞中のベクターの存在は永続的である必要はなく、一過性エピソードベクターも含まれる。ベクターは、公知の任意の手段、例えば細胞の化学的処理、エレクトロポレーション又は感染によって導入することができる。

30

【0193】

上清中のAAVは、当業者に公知の適切な技術を使用して回収及び／又は精製することができる。例えば、モノリスカラム(例えば、イオン交換、親和性又はIMACモード)、クロマトグラフィ(例えば、捕捉クロマトグラフィ、固定法クロマトグラフィ、及び膨張床クロマトグラフィ)、遠心分離、濾過及び沈殿を精製及び濃縮に使用することができる。これらの方法は、単独で用いてもよいし、組み合わせ用いてもよい。一実施形態では、カラムベース又は膜ベースのシステムを含む捕捉クロマトグラフィ法が、濾過及び沈殿と組み合わせ利用される。例えば、ポリエチレングリコール(PEG)8000及びNH₃SO₄を利用する適切な沈殿方法は、当業者によって容易に選択され得る。その後、沈殿物をベンゾナーゼで処理し、適切な技術を使用して精製することができる。更に、回収は、好ましくは、抗AAV抗体、好ましくは固定化抗体を使用する組換えパルボウイルス(rAAV)ベクター(を含むビリオン)の親和性精製の工程を含み得る。抗AAV抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。特に適切な抗体は、例えばラクダ又はラマから得ることができる一本鎖ラクダ抗体又はその断片である(例えば、Muyldermans, 2001, Biotechnol. 74:277-302を参照されたい)。rAAVの親和性精製のための抗体は、好ましくは、AAVカプシドタンパク質上のエピトープと特異的に結合する抗体であり、それによって、好ましくは、エピトープは、2つ以上のAAV血清型のカプシドタンパク質上に存在するエピトープである。例えば、抗

40

50

体は、AAV2カプシドへの特異的結合に基づいて産生又は選択され得るが、同時にAAV1、AAV3及びAAV5カプシドにも特異的に結合し得る。

【0194】

一般に、哺乳動物又は昆虫宿主細胞において本発明によるAAVベクターを産生するための適切な方法、及びそのための手段（例えば、AAV repタンパク質の発現のための発現構築物）は、哺乳動物細胞についてはClark et al. (1995, Hum. Gene Ther. 6, 1329-134), Gao et al. (1998, Hum. Gene Ther. 9, 2353-2362), Inoue and Russell (1998, J. Virol. 72, 7024-7031), Grimm et al. (1998, Hum. Gene Ther. 9, 2745-2760), Xiao et al. (1998, J. Virol. 72, 2224-2232) 及びJudd et al. (Mol Ther Nucleic Acids. 2012; 1:e54)、昆虫細胞については、Urabe et al. (2002, Hum. Gene Ther. 13:1935-1943)、国際公開第2007/046703号パンフレット、国際公開第2007/148971号パンフレット、国際公開第2009/014445号パンフレット、国際公開第2009/104964号パンフレット、国際公開第2011/122950号パンフレット、国際公開第2013/036118号パンフレット、国際公開第2015/137802号パンフレット、国際公開第2019/016349号パンフレット、及び同時係属出願欧州特許第21177449.2号明細書、PCT/EP2021/058794号及びPCT/EP2021/058798号明細書に記載されている。

10

20

【0195】

本発明の医薬組成物を製造するための方法は、医薬組成物を製造するための任意の方法を含み、その全てが当業者に明らかであろう。前記方法は、一般に、特定の条件下で本発明の核酸又はAAVと賦形剤との組合せを含む。

【0196】

本発明の別の態様は、本発明の核酸、発現カセット、本発明のAAVベクター、又は本発明の医薬組成物、及び免疫抑制化合物を含むキットに関する。

【0197】

本発明の特定の実施形態では、免疫抑制化合物は、本発明の核酸、AAVベクター、又は医薬組成物の投与によって誘導される免疫応答を低減及び／又は予防し得る。

30

【0198】

別の態様では、本発明は、本発明の核酸、本発明の発現カセット若しくはAAVを含む細胞、又は宿主細胞に関する。

【0199】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞は原核細胞である。いくつかの特定の実施形態では、本発明の細胞は細菌細胞である。いくつかの実施形態では、本発明の細胞は真核生物細胞である。いくつかの実施形態では、本発明の細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、本発明の細胞は昆虫細胞である。

40

【0200】

本発明の核酸又は本発明のAAVベクターは、トランスフェクション、形質転換、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、形質導入及びマイクロインジェクションを含むがこれらに限定されない任意の適切な方法によって本発明の細胞に送達され得る。例えば、本発明の発現カセット又は核酸は、細菌に含まれるプラスミドに含まれ得る。本発明の発現カセット又は核酸はまた、例えばウイルスベクターを産生する産生細胞に含まれてもよい。前記発現カセットはまた、バキュロウイルスベクター中に提供され得る。

【0201】

本発明によるAAVベクターを含む宿主細胞に関する更なる詳細は、本出願の他の箇所に提供されている。筋肉細胞、肝細胞、神経細胞、グリア細胞又は上皮細胞を含むがこれらに限定されない任意の哺乳動物細胞を本発明のAAVベクターに感染させることができ

50

る。本発明のいくつかの好ましい実施形態では、感染させる細胞はヒト細胞である。

【0202】

別の態様では、本発明は、障害を治療又は予防する方法に関し、方法は、本発明の核酸又は本発明のAAVを対象に投与し、それにより障害を治療又は予防することを含む。

【0203】

特定の実施形態では、障害は、SNCA遺伝子又は病理学的ヒトSNCA遺伝子（A30P、E46K、H50Q、G51D及びA53Tの重複、三重化又は変異）によって引き起こされる。

【0204】

特定の実施形態では、障害は、PD、DLB、MSA、神経精神症状、PDの運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害、及び／又は嗅覚障害、又は他の種類の神経変性脳疾患を模倣する任意の非定型提示である。

【0205】

別の態様では、本発明は、障害を治療するための医薬品の製造に使用するための本発明の核酸、発現カセット、又は本発明のAAVに関する。

【図面の簡単な説明】

【0206】

【図1】本発明のガイド配列及びmiRNAの設計戦略の図である。

【図2】アイソフォーム標的化ガイド配列の設計戦略の図である。

【図3】二重ルシフェラーゼSNCA miRNA候補選択： α -シヌクレインレポーター低下の図である。

【図4】A53T Kエラット（A．ウイルスDNA（vDNA）レベル；B．miSNCA発現レベル；C．線条体におけるSNCA mRNA低下）におけるインビボ研究の図である。

【図5】二重ルシフェラーゼ滴定実験： α -シヌクレインレポーターの低下の図である。

【図6】候補足場の設計の図である。

【図7】候補足場に対する二重ルシフェラーゼアッセイ結果の図である。

【図8】候補足場による内因性mRNA低下の結果の図である。

【図9】候補足場のmiRNAプロセシングの図である。

【図10】空ベクター（EV）、全長SNCA RNAi（SNCA）又は候補足場（miSNCA 5、13、15）で処理した線虫（C. elegans）PDモデルの運動行動改善の図である。

【図11】線虫（C. elegans）PDモデルにおける全長SNCA RNAi又は候補足場（miSNCA 5；miRNA 5とも呼ばれる）によるSNCA mRNA低下及び α -シヌクレインタンパク質低下の図である。

【図12】L1段階（全長SNCA RNAi、miSNCA 5及びmiSNCA 15）での線虫（C. elegans）の処理後の線虫（C. elegans）試料の低分子RNA配列決定結果（1日目及び4日目）の図である。

【図13】インビトロでの候補足場のmiRNAプロセシングの図である。

【図14-1】インビボでの候補足場1のmiRNAプロセシングの図である。

【図14-2】インビボでの候補足場1のmiRNAプロセシングの図である。

【図15】AAV-Synラットモデルのインビボ概念実証研究の線条体におけるvDNAレベル（研究2）の図である。

【図16-1】AAV-Synラットモデルのインビボ概念実証研究の線条体におけるmiSNCAレベル（研究2）；（A）miSNCA 2；（B）miSNCA 5；（B）miSNCA 15の図である。

【図16-2】AAV-Synラットモデルのインビボ概念実証研究の線条体におけるmiSNCAレベル（研究2）；（A）miSNCA 2；（B）miSNCA 5；（B）miSNCA 15の図である。

【図17】AAV-Synラットモデルのインビボ概念実証研究の線条体におけるヒトS

10

20

30

40

50

NCA mRNA レベル（研究 2）の図である。

【図 18】AAV-Syn ラットモデルのインビボ概念実証研究の線条体におけるヒト α -syn タンパク質レベル（研究 2）の図である。

【図 19】AAV-Syn ラットモデルのインビボ概念実証研究の線条体におけるドーパミントランスポートレベル（研究 2）（（[125I]-RTI-121 オートラジオグラフィによって評価）の図である。

【図 20】AAV-Syn ラットモデルのインビボ概念実証研究の線条体におけるドーパミン及びドーパミン代謝産物レベル（研究 2）（LC/MS によって評価）の図である。

【図 21】AAV-Syn ラットモデルのインビボ概念実証研究における運動行動試験（シリンダー試験、足の使用の非対称性の評価）（研究 2）の図である。（A）ベースライン時（注入前）；（B）処置後 56 日目。

【図 22】（A）総 TH；（B）総ヒト α -syn；及び（C）黒質中の α -syn 陽性 TH ニューロンの免疫組織化学によって評価した、AAV-Syn ラットモデル（試験 2）におけるインビボ概念実証試験の結果の図である。

【発明を実施するための形態】

【0207】

実施例

実験節内で、配列番号 95～98 及び配列番号 78～81 を含む核酸は、「足場 1」と命名され、少なくとも 3 つの RNA を含む本発明の核酸は、「足場 2」と呼ばれる。

【0208】

材料及び方法

SNCA mRNA ガイド鎖の設計。miSNCA（miRNA ガイド鎖）を、最も一般的な SNCA mRNA バリエーション；SNCA140、SNCA126、SNCA112 及び SNCA98 の一般的な RNA 配列を標的とするように設計した。これらのバリエーションの全てを標的とする miRNA を設計するために、SNCA の主要な mRNA バリエーションの全てと共通する領域の miRNA を設計した（図 1）。SNCA mRNA 配列の標的領域は、エクソン 2、エクソン 4 及びエクソン 6 の一部である。これらのエクソンの外側の最も一般的な SNP、すなわち A30P は、ガイド RNA に含まれることが回避された。保存された配列のそれぞれを使用して、22 nts を有する多数の異なるガイド鎖を作製した。SNCA を標的とする 17 個のガイドを設計し、miR451 足場：miSNCA2（配列番号 71）、miSNCA5（配列番号 72）、miSNCA7（配列番号 73）、miSNCA12（配列番号 74）、miSNCA13（配列番号 75）、miSNCA15（配列番号 76）、miSNCA16（配列番号 77）、miSNCA1（配列番号 82）、miSNCA3（配列番号 83）、miSNCA4（配列番号 84）、miSNCA6（配列番号 85）、miSNCA9（配列番号 86）、miSNCA10（配列番号 87）、miSNCA11（配列番号 88）、miSNCA14（配列番号 89）、miSNCA18（配列番号 90）、及び miSNCA19（配列番号 91）に組み込んだ。これらを、デュアルルシフェラーゼレポータプラスミドにおいて連結された SNCA レポータ遺伝子（配列番号 92）を全体的に低下させるそれらの有効性についてインビトロで試験し、二重ルシフェラーゼアッセイで試験した（図 3）。これらの 17 個の miRNA のうち、7 個が SNCA mRNA レベルを用量依存的様式で低下させる可能性を示した（配列番号 71～77）（図 5）。

【0209】

miSNCA ガイドを以下の基準に基づいて選択した：miRNA ガイド配列は、4 G 超、4 C 超、5 A 超及び 5 T nts 超のストレッチ、30%～70% の GC 含有量、siSPOTR 分析（<https://sispotr.icts.uiowa.edu/sispotr/tools/lookup/evaluate.html>）及び -44 kcal/モル～-55 kcal/モルの pre-miRNA 配列折り畳みエネルギーを使用することによる SNCA ターゲティングガイドについては 4000 未満の miRNA シード配列の予測オフターゲット遺伝子、及び SNCA ターゲティングガイドに

10

20

30

40

50

については5000未満のmiRNAシード配列の予測オフターゲット遺伝子を含むべきではない。陰性対照を作製するために、インビトロ試験(miR144__miSCR(ANG1))(配列番号93)及びmiR144__miSCR(ANG1)+miSCR(C90)(配列番号94)のために2つのスクランブルガイドを選択した。

【0210】

選択されたmiSNCAガイドは、以下の基準を満たす：サルSNCA遺伝子配列(アカゲザル、NCBI受託番号NC__041768.1)による保存、miRNAガイド配列は、 >4 G又は >4 C ntのストレッチ、20%~70%のGC含有量、40%~70%のGCシード含有量、 $-45 \sim -55$ kcal/molのpre-miRNA配列折り畳みエネルギーを含むべきではなく、内因性miRNAシードと一致しない。

10

【0211】

ガイド配列をヒトpri-miRNA miR-451足場配列に組み込み、mFoldプログラム(<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>)を標準的な設定で使用して、候補が二次構造に折り畳まれているかどうかを決定した。

【0212】

SNCA足場1)は、1つのmiR-451下流ヘアピン/足場と組み合わせられたmiR-144ヘアピン/足場からなる。SNCA足場2は、2つ以上のmiR-451下流足場と組み合わせられたmiR-144ヘアピンからなる。miR144ヘアピンの配置は、miR451ヘアピン配列と比較して常に最も5'側にある。4つのSNCA足場1(配列番号95~98)を生成してSNCA mRNAを標的化し、4つのSNCA足場2を生成してSNCA mRNAの異なる又は同じ領域を標的化した(配列番号78~81)。

20

【0213】

二重レポータルシフェラーゼアッセイ

二重ルシフェラーゼアッセイのために、HEK293T細胞(1×10^5 細胞/ウェル)を24ウェル組織培養処理プレートに三連で播種した。細胞を、リポフェクタミン3000(Thermo Fisher Scientific)を使用して、140アミノ酸長(全長;配列番号39)の α -シヌクレインタンパク質をコードする全長SNCA遺伝子を担持するレポータプラスミド(10 ng)及び様々な量(0.1~1~10~100 ng)のmiSNCA候補を担持するプラスミド(図1)でコトランスフェクトした。次いで、細胞をトランスフェクションの2日後に収集し、Promega製のDual Luciferaseアッセイキットを使用して、ウミシイタケルシフェラーゼ及びホタルルシフェラーゼ活性について細胞試料を分析した。アッセイは、GloMax Luminescenceリーダーで行った。 α -シヌクレイン低下をRL/FL活性比の低下として測定した。実験を少なくとも3回繰り返した。

30

【0214】

SNCAの異なるmRNAバリエーションを優先的に標的化するための二重ルシフェラーゼアッセイを同様の様式で行う。HEK293T細胞を、126、112又は98アミノ酸長の α -シヌクレインアイソフォームをコードするより短いmRNAバリエーションをコードする単一遺伝子を担持するレポータプラスミド(10 ng)及び様々な量(0.1~1~10~100 ng)のmiSNCA候補を担持するプラスミドでコトランスフェクトする(図2)。アッセイの残りは、前の段落に記載のように実施される。

40

【0215】

トランスフェクション及び内因性 α -シヌクレインの低下

miSNCA候補による内因性 α -シヌクレインの低下を評価するために、HEK293T細胞を使用した。これらのアッセイのために、HEK293T細胞(1又は 5×10^5 細胞/ウェル)をそれぞれ24又は6ウェル組織培養処理プレートにプレーティングした。細胞を、Lipofectamine 2000又はLipofectamine 3000(Thermo Fisher Scientific)を使用して、miSNCA

50

候補を有する様々な量（50～100～200～1000 ng）のプラスミドでトランスフェクトした。各トランスフェクションを三連で行った。次いで、トランスフェクションの2日後に細胞を回収した。細胞試料を、SNCAのmRNAレベル及び α -シヌクレインタンパク質レベルについて分析した。実験を少なくとも3回繰り返した。

【0216】

アイソフォームのトランスフェクション及び内因性 α -シヌクレイン低下

異なるアイソフォームを標的とするmiSNCA候補による内因性 α -シヌクレイン低下を評価するために、HEK293T細胞を使用する。これらのアッセイのために、HEK293T細胞（1又は5x105細胞／ウェル）をそれぞれ24又は6ウェル組織培養処理プレートにプレーティングする。細胞を、Lipofectamine2000又はLipofectamine3000（Thermo Fisher Scientific）を使用して、miSNCA候補を有する様々な量（50～100～200～1000 ng）のプラスミドでトランスフェクトする。各トランスフェクションを三連で行う。次いで、トランスフェクションの2日後に細胞を回収する。McLean et al., 2012 Mol. and Cell. Neuroscience, 49 (2) : 230-239に記載されているように、エクソンにまたがるプライマーセットを用いたRT-qPCRを使用して、SNCAのmRNAスプライシングバリエーションのmRNAレベルについて細胞試料を分析する。更に、それらの細胞試料から、 α -シヌクレインアイソフォームタンパク質レベルを、異なるアイソフォームを標的とする抗体又は全てのアイソフォームに存在するエピトープを認識する抗体を使用してウェスタンブロットによって分析する（各アイソフォームをその分子量によって区別することができる）。実験を少なくとも3回繰り返す。

【0217】

バキュロウイルスシード生成用DNA構築物

候補のmiSNCA構築物を担持する発現カセットを、AAV5及びAAV6パッケージングのためのITR領域を含むpVD1746（配列番号40）、pVD1747（配列番号41）、pVD1748（配列番号42）、pVD1749（配列番号43）、pVD1750（配列番号44）、pVD1751（配列番号45）、及びpVD1752（配列番号46）にサブクローニングした。

【0218】

足場1構築物を含むpVDプラスミドは、構成的プロモータP1（配列番号47）、続いて本発明のRNAをコードする配列及びhGHポリA配列（配列番号48）を有する。足場2構築物を含むpVDプラスミドは、短いCAGプロモータを有し、その後本発明のRNAをコードする配列及びhGHポリA配列が続く（配列番号48）。

【0219】

AAV5ベクター（HEK材料）

AAV5血清型についてのトランスファーベクター及びパッケージングプラスミドによるHEK 293T細胞の同時トランスフェクションによるAAV産生。AAVの精製は、アフィニティークロマトグラフィ及びイオジキサンール勾配超遠心分離によって行った。製剤化及び濃縮後、精製AAVの力価をQPCRを用いて決定した。

【0220】

AAV5ベクター（バキュロウイルス材料）

発現カセットを有する組換えAAV5は、SF+昆虫細胞（Protein Sciences Corporation, Meriden, Connecticut, USA）を、Rep、Cap及び導入遺伝子をコードする2つのバキュロウイルスに感染させることによって産生させた。AVBセファロス（GE Healthcare）を使用する高速タンパク質液体クロマトグラフィシステム（AKTA Explorer、GE 30 Healthcare）での標準タンパク質精製手順に従って、精製AAVの力価をQPCRを使用して決定した。

【0221】

10

20

30

40

50

AAV6ベクター（HEK材料）

発現カセットを有する組換えAAV6を、Rep、Cap及び導入遺伝子をコードするパッケージングプラスミドによるHEK293T細胞の同時トランスフェクションによって産生した。AVBセファロース（GE Healthcare）を使用する高速タンパク質液体クロマトグラフィシステム（AKTA Explorer、GE 30 Healthcare）での標準タンパク質精製手順に従って、精製AAVの力価をQPCRを使用して決定した。

【0222】

インビトロモデル及び形質導入アッセイ

ヒトα-シヌクレインmRNA及びタンパク質レベルに対するAAV5-miSNCA足場1／2の効果を測定するために、対照非患者由来iPSC由来前脳ニューロン、患者由来iPSC由来前脳ニューロン及びLundヒト中脳（LUHMES）由来DAニューロンを使用する。iPSC細胞株（表1）はNINDS RUCDRリポジトリから入手し、LUHMES細胞はATCCから入手する。

【0223】

【表2】

略称	対象 ID	細胞株 ID	影響を受ける遺伝子	遺伝子型
A53T	NDS00188	ND50050	SNCA	ALA53THR
アイソジェニック対照	NDS00188	ND50085	SNCA	アイソジェニック型（編集）
編集（ヘテロ接合）	NDS00188	ND50086	SNCA	ヘテロ接合（編集）
SNCA3X	NDS00201	ND50040	SNCA	SNCA 三重化
対照	NDS00159	ND41865	なし	非患者対照

表 2.iPSC 細胞株及び対照

【0224】

iPSC細胞の前脳ニューロンへの分化は、StemCell Technologiesの前脳ニューロン分化キットを使用して行われる。Harischandra et al., 2020 BBA Mol. Basis of Disease 1866:165533に記載のプロトコルを使用して、LUHMES細胞をDAニューロンに分化させた。

【0225】

上記のインビトロ細胞モデルを、HEK細胞又はバキュロウイルス産生AAV5-miSNCA足場1及びAAV5-miSNCA足場2（又はHEK293T細胞産生AAV6-miSNCA足場1／2）候補のいずれかをウイルスの様々な感染多重度（MOI）で使用して形質導入する。細胞を5 x 10⁵細胞／ウェルでPDLーラミニン又はPLOーラミニン被覆6ウェルプレートにプレーティングする。3～4日の継代後、細胞を10³、10⁴、10⁵及び10⁶／細胞のMOIで形質導入する。次いで、形質導入の7～15日後に細胞を回収する。細胞試料をRNA及びDNA単離に使用して、ベクターDNAレベル、miSNCA発現、SNCA mRNA及びα-synタンパク質発現を決定する。

【0226】

次世代シーケンシング（NGS）を使用したRNA単離及び低分子RNAシーケンシングa.m iSNCA足場1及び2の候補によってトランスフェクトされたHEK293T細胞から

DNAse処理工程を有するDirect-zol RNA Microprep K

its (ZymoResearch) を使用して10 ngのmiSNCA足場1又は2含有プラスミド (1×10^5 /細胞について10 ngプラスミドを有する) でトランスフェクトしたHEK293T細胞から全RNAを単離した。全RNAの品質をチェックし、Nanodropを用いて定量した。次いで、試料を低分子RNA配列決定のためにGenomeScan BV (Leiden, Netherlands) に送った。Illumina NovaSeq6000 PE150配列決定と組み合わせた最終ライブラリのBluePippinサイズ選択を含むNebNext低分子RNAライブラリ調製法を使用して、GenomeScanによって低分子RNA配列決定を行った。データを、CLC Genomics v20 Suit (Qiagen) を使用して分析した。トリミングされた低分子RNAリードを、マイクロRNAのヒトデータベース (miRbase v22) に対してマッピングし、合成 (プレ) miRNA配列を含むカスタムデータベースへのマッピング及びアノテーションと並行してアノテーションした。miSNCA及びmiR-144A>T (関連する場合にはガイド鎖及びパッセンジャー鎖) 配列の定量化を、カウント/配列の数対試料当たりの低分子RNAカウントの総数として表した。miSNCA候補のプロセッシングを、リードをmiRNAガイド配列にアラインメントすることによっても調べ、1つのisomiR配列に対するカウント数対試料当たりのisomiRカウントの総数として定量した。

10

【0227】

b. AAV-miSNCA足場1及び2の候補を形質導入した神経細胞モデルから

RNAを、Zymogen RNA単離キットを使用して、AAV5又はAAV6足場1又は2 (HEK細胞又はバキュロウイルスのいずれかが産生された) 形質導入細胞 (DAニューロン、前脳ニューロン及び/又はLUHME S由来DAニューロン) から単離する。Bioanalyzerを用いてRNAの品質を試験し、Nanodropを用いて定量する。次いで、試料は、次世代シーケンシング法を使用して、低分子RNAシーケンシングのためにGenomeScan BV (Leiden, Netherlands) に送られる。データを、CLC Genomics Suit (Qiagen) を使用して分析して、miSNCA候補の発現値に関する情報を抽出し、また、AAV5又はAAV6パッケージ化足場1及び2候補から発現されるmiSNCA候補のプロセッシングを評価する。

20

【0228】

低分子RNA配列決定 (NGS) データ解析

AAV5-足場1/足場2又はAAV6-足場1/足場2miSNCAで形質導入されたニューロンから得られたデータの分析を、CLC Genomics Workbench 21 suitを用いて行う。トリミングされた低分子RNA配列リードをカウントし、miRbaseデータベースを使用してアノテーションする。miSNCA分子は、pri-miRNA配列をこれらの低分子RNAライブラリに対してアラインメントすることによってアノテーションされる。miSNCA候補の発現値は、miSNCA候補カウントのカウント数対全アノテーション低分子RNAカウントとして表される。大部分が発現されるmiSNCA分子を、pre-miSNCAを低分子RNAライブラリにアラインメントする様々なサイズのmiSNCAの相対的なカウントを調べることで、及びそこから得られるRNAカウントを使用することによって分析する。

30

40

【0229】

RNA配列決定 (NGS) 及びオフターゲット分析

RNA配列決定は、形質導入前脳ニューロン又は分化LUHME S細胞から収集した試料に対して行う。

【0230】

a. データ処理及び品質管理

ペアエンドRNA-seqデータは、Illumina NovaSeq 6000を使用して全ての試料について生成される。全ての試料からのリードのヒトゲノムへのアラインメントは、STARアライナを使用して行われる。生の発現データは、ユークリッド

50

距離の和、HoeffdingのD統計量、平均ピアソン相関及びコルモゴロフスミルノフ検定統計量を含むいくつかの自動化された外れ値検定を使用して評価される。

【0231】

発現データを生成する。正規化を、トリム平均正規化を使用して行い、データを `voom` (`https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2014-15-2-r29`) で変換した。

【0232】

主成分分析 (PCA) 及び階層的クラスタリングを実行して、試料のクラスタリングを識別する。

【0233】

b. 差次的

全ての試料群間で有意に差次的に発現された遺伝子 (DEG) を決定するために、10の統計的コントラストが行われる。有意なDEGは、偽発見率 (FDR) 調整を使用して複数の試験のために補正された統計的閾値を使用して決定される。

【0234】

細胞及び動物組織からのベクターDNAの単離及び定量

DNA抽出は、AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) を使用し、製造業者の指示に従って実施した。ベクターゲノムコピーを、ベクターのポリA領域に対するプライマーを用いたTaqMan qPCRアッセイ (Thermo Fisher Scientific) を使用することによって定量した。定量 (GC/u g DNA) は、線状化pVDプラスミドを使用し、様々な量のこの線状化プラスミドで標準曲線を作成して行った。このようにして作成した標準曲線を用いて、AAV5-miS NCA 足場 1及びAAV5-miS NCA 足場 2を形質導入した細胞から単離したDNAからベクターDNAコピー数を算出した。

【0235】

トランスフェクトHEK細胞からのRNA及びタンパク質の単離並びにS NCA及び α -シヌクレインタンパク質レベルのmRNAの定量

RNA単離のために、Direct-zol (商標) RNA Miniprep (カタログ番号R2050) を使用した。急速凍結細胞ペレットにTRIzolを塗布して溶解させた。cDNA合成は、RT-qPCR用のMaxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

【0236】

タンパク質の単離には、PhosSTOPホスファターゼ阻害剤 (Roche) 及びEDTA不含プロテアーゼ阻害剤 (Roche) を含むRIPA緩衝剤 (Sigma) を使用した。タンパク質の抽出のために、緩衝剤を細胞ペレットに添加し、細胞を4°C、400rpmで30分間攪拌した。次いで、細胞抽出物を最高速度で遠心分離した。清澄化された上清を α -シヌクレイン及び総タンパク質測定、すなわちHTRF及びBCAアッセイに使用した。

【0237】

mS NCAレベルの検出のために、SYBR GreenベースのRT-qPCRアッセイを、S NCAに対して設計されたプライマーセットを使用して使用した (表3)。結果を、家庭内遺伝子の平均発現に対して正規化した未処理試料に対する処理試料の $\Delta\Delta$ サイクル閾値 ($\Delta\Delta C_t$) を使用して倍率変化として表示した (表3)。

【0238】

10

20

30

40

50

【表 3】

配列番号	プライマー	遺伝子の種類	フォワードプライマー	リバースプライマー
49 & 50	SNCA1	導入遺伝子	AAATGTTGGAGGAG CAGTGG (配列番号49)	TCCAGAATTCCTTCCTGT GG (配列番号50)
51 & 52	SNCA2	導入遺伝子	ATGTTGGAGGAGCA GTGGTG (配列番号51)	TGTCAGGATCCACAGGCA TA (配列番号52)
53 & 54	GFP	導入遺伝子	AGCAAAGACCCCAA C GAGAA (配列番号53)	GCGGCGGTCACGAACTC (配列番号54)
55 & 56	B2M	ハウス キーピング 遺伝子	GCCATCCACCGGAG AATG (配列番号55)	GGTGGAAGTGAACACGT AGCA (配列番号56)
57 & 58	GAPD H	ハウス キーピング 遺伝子	TGCCCCCATGTTTG TGATG (配列番号57)	GCTGACAATCTTGAGGGA GTTGT (配列番号58)
59 & 60	ACTB	ハウス キーピング 遺伝子	AGCGTGGCTACAGC TTCACC (配列番号59)	AAGTCTAGGGCAACATAG CACAGC (配列番号60)
61 & 62	HPRT	ハウス キーピング 遺伝子	GCGAAAGTGGA GCCAAGT (配列番号61)	GCCACATCAACAGGACTC TTGTA (配列番号62)

表3.HEK細胞のRT-qPCRのためのプライマー配列。

【0239】

α -シヌクレインタンパク質レベルの検出のために、全 α -syn HTRFキット (Cisbio) を使用した。次いで、HTRF測定値を、HTRFアッセイに加えた総タンパク質によって正規化した。総タンパク質測定を、ビシンコニン酸アッセイ (BCAタンパク質アッセイキット; Pierce (商標)) を使用して行った。HTRFの結果を、HTRF比/総タンパク質 μ gとして示した。

【0240】

動物組織からのmiSNCA候補、GFP mRNA及びSNCA mRNAのRNA単離及び定量

組織を、Tissue Lyserシステム (Qiagen) 及びAllPrep DNA/RNA Miniキット (Qiagen) を製造者の説明書に従って使用してホモジナイズした。DNA及びRNAの量及び完全性をNanodrop及びBioanalyzerによって決定した。

【0241】

miSNCA発現のために、以下のプロトコルを使用した: AllPrep DNA/RNA Microキット (Qiagen) を使用して全RNAを単離した。28 ntsのmiSNCA2、23 ntsのmiSNCA5及び22 ntsのmiSNCA15を検出

10

20

30

40

50

するために設計された Taqman ステムループ-miRNA アッセイ (ThermoFisher) を使用する RT-qPCR により、miRNA 発現のレベルを使用した。発現レベルを miRNA 分子 / ug 総 RNA として表した。

【0242】

mRNA 発現のために、以下のプロトコルを使用した: AllPrep DNA/RNA Microキット (Qiagen) を使用して総 RNA を単離した。RT-qPCR のための Taqman アッセイを使用して、SNCA 及び GFP mRNA 発現を測定した。ハウスキーピング遺伝子として使用された遺伝子は、ACTB、B2M、GAPDH、HPRT である。表 4 に示すプライマー配列。

【0243】

【表 4】

配列番号	遺伝子	遺伝子の種類	プライマー配列
49	SNCA1	導入遺伝子	5'-AAATGTTGGAGGAGCAGTGG-3'
50	SNCA1	導入遺伝子	3'-TCCAGAATTCCTTCCTGTGG-5'
51	SNCA2	導入遺伝子	5'-ATGTTGGAGGAGCAGTGGTG-3'
52	SNCA2	導入遺伝子	3'-TGTCAGGATCCACAGGCATA-5'
配列番号	遺伝子	遺伝子の種類	プローブ配列
63	SNCA1	導入遺伝子	5'-AGCAGGGAGCATTGCAGCAGC-3'
64	SNCA2	導入遺伝子	5'-CAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAA-3'

表4 動物組織からのRT-qPCRのためのプライマー及びプローブ配列。

【0244】

動物組織からの LC-MS/MS

線条体組織試料をドライアイス上で Vanderbilt Neurochemistry Core Facility (Nashville, TN, USA) に送り、カテコールアミンレベルを決定し、データを分析のために盲検化して返した。

【0245】

組織抽出。脳切片を、組織ディスマンプレートを使用して、10-2 M 酢酸ナトリウム、10-4 M の EDTA 及び 7.5 % メタノール (pH 3.8) を含有する 100~750 µl の 0.1 M の TCA 中でホモジナイズした。タンパク質濃度の測定のために 10 µl のホモジネートを除去した。次いで、試料を微量遠心機で 10,000 g にて 4℃ で 20 分間回転させた。生体アミン分析のために上清を新しい微量遠心管に移した。

【0246】

生体アミン分析。ドーパミン、HVA、及び DOPAC レベルは、塩化ベンゾイル (BZC) で分析物を誘導体化した後、高感度で特異的な液体クロマトグラフィ/質量分析 (LC-MS/MS) 方法によって決定した。5 µl の上清を、アセトニトリル中 500 mM の NaCO3 (水溶液) 及び 2 % BZC のそれぞれ 10 µl で処理した。4 分後、200 pg の各 13C6-誘導体化ドーパミン-d4、HVA 及び DOPAC を含有する 10 µl の内部標準溶液 (3 % 硫酸を含有する 20 % アセトニトリル中) を添加することによ

って反応を停止した。液体クロマトグラフィは、Waters Acquity UPLCを使用して2.0 x 50 mm、1.7 μ m粒子Acquity BEH C18カラム (Waters Corporation, Milford, MA, USA)で行った。移動相Aは0.15%ギ酸水溶液であり、移動相Bはアセトニトリルであった。試料を、SCIEX 6500+QTrap質量分析計 (AB Sciex, Framingham, MA, USA)に送達する前に、600 μ l/分の流速で11分間かけて98~5%の移動相Aの勾配によって分離した。以下のMRMトランジションを定量的目的のためにモニターした：466から105、BZC-ドーパミン；488から111、13C6-BZC-ドーパミン-d4；304から150、BZC-HVA；310から111、13C6-BZC-HVA；394から105、BZC-DOPAC；406から111、13C6-BZC-DOPAC。自動化されたピーク積分を、SCIEX Multiquantソフトウェアバージョン3.0.2を使用して行った。適切な統合を確実にするために、全てのピークを目視検査した。ピーク面積比 (Panalyte/PI.S.) 対内部標準の濃度に基づいて構築された検量線を使用して、線形回帰によって試料中のドーパミン、HVA、及びDOPACのレベルを計算した。レベルを組織抽出物中のタンパク質濃度に対して正規化した。

10

【0247】

タンパク質アッセイ。組織ホモジネート中のタンパク質濃度を、提供されたキットの説明書に記載されているPierce (商標) BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)を使用して決定した。POLARstar Omegaプレートリーダー (BMG LABTECH, Offenbourg, Germany)を使用して吸光度を測定した。

20

【0248】

導入遺伝子由来ヒト α -synのELISA

全ての動物の新鮮凍結切片からの解剖線条体組織を、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤 (Roche: 11836153001)を含有する溶解緩衝剤中でホモジナイズした。試料を4℃で30分間攪拌した後、遠心分離 (4℃で135000 rpmで10分間)して上清を生成した。0.001 mg/mlの濃度で1:500希釈を使用して、上清の一部を使用して総タンパク質レベルを決定した (BCAアッセイ、Pierce、Rockford, IL)。上清の別の部分を、製造者の説明書 (BioLegend: 844101)に従ってELISA手順に供した。aSynの量に対する発光カウントを定量するCLARIOstarシステムを使用して試料を分析した。 α -Synのレベルをpg/mg総タンパク質 (Pierce (商標) BCA Protein Assay Kit、Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)として表した。

30

【0249】

ドーパミントランスポーター (DAT) 結合

線条体DATのレベルを、20 μ mの新鮮凍結組織から調製したクライオスタット切断切片における[125I]-RTI-121結合オートラジオグラフィによって評価した。簡潔には、解凍したスライドを、50 mMのTris、120 mMのNaCl及び5 mMのKClを含有する結合緩衝剤 (2 x 15分、室温)に入れた。次いで、切片を、50 pM [125I]-RTI-121 (Perkin-Elmer、比活性2200 Ci/ μ mol)を含有する同じ緩衝剤中に25℃で120分間入れて、総結合を決定した。非特異的結合は、100 μ MのGBR12909 (Tocris Bioscience)の存在下で観察されるものと定義した。次いで、全てのスライドを氷冷結合緩衝剤で洗浄し (4 x 15分)、氷冷蒸留水ですすぎ、風乾した。次いで、[125I]マイクロスケール標準 (Amersham)と共に、スライドをオートラジオグラフィフィルム (Kodak)に貼り付け、室温で約7日間放置した後、現像した。次いで、MCIDソフトウェア (Image Research Inc., Ontario, Canada)を使用してオートラジオグラムを分析した。各動物由来の3つの線条体のデンストメトリー分

40

50

析を行い、c.p.m.対光学密度の基準曲線を β 放出[14C]マイクロスケール標準から計算し、これを使用してシグナルの強度を nCi/g として定量した。バックグラウンド強度を各読み取り値から差し引いた。次いで、データを平均 $\pm$ s.e.m.各処置群のシグナル強度として表した。非特異的結合を同じ方法で計算し、合計から差し引いて特異的結合を得た。非特異的結合は、典型的には、総結合の1%未満を占めることが見出された。

【0250】

免疫蛍光及び立体構造

免疫蛍光：凍結スライド式ミクロトーム (Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, ON) で、脳を冠状面で $40\mu\text{m}$ の厚さで凍結切片化し、6系列の切片を凍結保護剤 (30%グリセロール、30%エトキシエタノール、40%PBS) 中に保存した。単一の一連の中脳切片を使用して、二重標識免疫蛍光法を実施して、ヘマグルチニン (HA) タグ付きヒト α Syn及びチロシンヒドロキシラーゼ (TH) を明らかにした。簡潔には、遊離浮遊切片において、TH (ヒツジ抗TH、1:1000、Pel Freez、P60101; 二次抗体、Alexa fluorロバ抗ヒツジ、Fisher Scientific、A21099、1:500) 及びHA (ウサギ抗HA、1:1000; Abcam、AB9110; AlexaFluorロバ抗ウサギ、1:500、Fisher Scientific、A21206、1:500) のレベル及び分布を二重標識免疫蛍光によって評価した。

【0251】

立体学：黒質緻密部 (SNc) 内のヒト α -syn共局在化あり及びなしのTH+veニューロン数の推定を、立体学的原理に従ってStereoInvestigatorソフトウェア (MBF Bioscience, Williston, VT) を使用して行った。前方SNから後方SNまでそれぞれ $240\mu\text{m}$ で分離された7つ又は8つの切片を、各症例を数えるために使用した。組織切片の可視化のためにモノクロデジタルカメラに連結されたZeiss顕微鏡 (AxioImager M2 with Apotome, Carl Zeiss, Canada) を使用して立体解析を行った。ヒト α -syn封入体を含む及び含まないTH+veニューロンの総数を、光学分画法を使用してコード化スライドから推定した。分析された各組織切片について、切片厚を経験的に評価し、各切片の上部及び底部に約 $2\mu\text{m}$ 厚のガードゾーンを使用した。SNcを低倍率 (5倍) 下で輪郭を描き、TH+veニューロンを40倍の倍率下でカウントした。StereoInvestigatorソフトウェア (MicroBrightfield, VT, USA) を使用して、立体パラメータを経験的に決定した (すなわち、グリッドサイズ、カウントフレームサイズ、及びディスセクタ高さ)。許容誤差係数 (CE) は、Gundersen CE ($m=1$) として知られるWest及び同僚の手順に従って計算した。0.10未満のGundersen値が認められた。

【0252】

計数立体学の結果は、神経保護を評価するためにSNc内のTH+veニューロンの絶対数をもたらした。ヒト α -シヌクレインに対する反応性を含む残りのTH+veニューロンの数もまた、TH+veニューロンを発現するヒト α -synの数の指標を提供するために産生された。次いで、TH+ve/シヌクレイン+ve: TH+ve/シヌクレイン-veの比を計算した。

【0253】

研究設計インビボ研究

試験1. α -シヌクレインKIラットでの作用機序試験

本研究では、2つのAAV-miSNCA候補の作用機序をヒト α -シヌクレインKIラットで評価した。1群当たり $N=3$ 匹の動物 (合計 $N=9$, Envigo, USA) を含む合計3つの処置群を使用した。1日目に、全ての動物に、線条体へのAAV5の $3 \times 3 \mu\text{l}$ 片側注射を行った。反対側は対照として機能し、AAV5注射と同じ方法で製剤緩衝剤を注射した。群を表5に示す。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 4 】

【 表 5 】

群	同側 (AAV5)	対側 (緩衝剤)	ラット系統	終末処置- 脳試料	N
1	AAV5-miSCR	製剤緩衝剤	Rat-KI	D43	3
2	AAV5-miSNCA5	製剤緩衝剤	Rat-KI	D43	3
3	AAV5-miSNCA15	製剤緩衝剤	Rat-KI	D43	3
4	AAV5-miSNCA5+15	製剤緩衝剤	Rat-KI	D43	3

10

表 5.インビボ試験 1 の群.AAV5 力価=2.5x10¹¹gc/脳、線条体内 3 部位;Rat-KI=Envigo
ヒトα-シヌクレインノックインラット。

【 0 2 5 5 】

線条体定位注射座標は部位 1 : + 1 . 3 mm A P、- / + 2 . 8 M L、- 4 . 5 D V ;
部位 2 : + 0 . 2 mm A P、- / + 3 . 0 M L、- 5 . 0 D V ; 部位 3 : 部位 2 : - 0 .
6 mm A P、- / + 4 . 0 M L、- 5 . 5 D V (歯棒が - 3 . 3 に設定されている)であ
った。ウイルスベクターを 0 . 5 u l / 分の速度で投与し、各注射後に 5 分間の待機時間
を許容した。

20

【 0 2 5 6 】

4 3 日目に、全てのラットにイソフルランの過剰投与を行い、氷冷 0 . 9 % 生理食塩水
で経心的に灌流した。その後、脳を可能な限り迅速に除去し、左右の半球を分割した。各
群の全ての動物において、以下の領域：前頭前皮質、線条体、海馬、視床下部、視床、後
皮質、小脳、腹側中脳及び脳幹を、左半球と右半球とに分けて新たに解剖し、ドライアイ
ス上で凍結し、分子分析のために - 8 0 ° C で保存した。

30

【 0 2 5 7 】

試験 2 . A A V - α - シヌクレインラットモデルにおける概念実証試験

この研究は、S N C A m R N A を標的化する 2 つの m i R N A (α - シヌクレインを
コードする) が、パーキンソン病の A A V 1 / 2 - h A 5 3 T - a S y n ラットモデルに
おいてドーパミン作動性機能を保護する能力を評価するために設計される。1 日目 (D 1
) に、A A V 1 / 2 ヒト A 5 3 T α - シヌクレイン (A A V 1 / 2 - h A 5 3 T - α - S
y n) を、4 つの他の A A V 5 ベクターのうちの 1 つと組み合わせて、定位的手法に従っ
て右黒質に片側投与する。手術前 (ベースライン、D - 3) 並びに D 1 4、D 2 1、D 4
2 及び D 5 6 (A A V 投与の 2、3、6 及び 8 週間後) に前肢の非対称性を評価するため
に、シリンダー試験で行動評価を行う。群を表 6 に示す。

40

【 0 2 5 8 】

50

【表 6】

群	ウイルスベクター-1	ウイルスベクター-2	N
	SN 内、2ul 体積		
1	D1:AAV1/2-EV	D14:AAV5 非関連 miR	12
2	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14:AAV5 非関連 miR (足場 1 について)	12
3	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14:AAV5 非関連 miR (足場 2 について)	12
4	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14:AAV5-miSNCA2	12
5	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14:AAV5-miSNCA5	12
6	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14:AAV5-miSNCA15	12
7	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14:AAV5-miSNCA5+15 低用量	12
8	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14:AAV5-miSNCA5+15 中用量	12
9	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14:AAV5-miSNCA5+15 高用量	12

表 6.インビボ試験 2 の群,AAV1/2-hA53T-aSyn=AAV1/2 ヒト A53T α -シヌクレイン、
3x;AAV1/2-EV=空の α -Syn ベクター;D15、ウイルスベクター-2;第 1-6 群及び第 9 群、
3x10¹³gc/ml;第 7 群、6x10¹²gc/ml;第 8 群、1.2x10¹²gc/ml;SN=黒質;D=日。全ての群は、D1
及び D14 への AAV の連続注入である。

【0259】

D57 に、動物を死後評価のために 殺した。血液、試料を収集し、必要に応じて処理し、保存した。

【0260】

試験の主要評価項目には、前肢の非対称性の評価（シリンダー試験による）；線条体ドーパミン及び代謝産物レベルの定量（LC-MS/MS による）；ドーパミントランスポータの定量（オートラジオグラフィによる）；線条体導入遺伝子由来 α Syn レベルの定量（ELISA による）が含まれた。

【0261】

任意選択のエンドポイントには、ヒト α Syn との共発現を伴う又は伴わない（二重標識免疫蛍光による）黒質におけるチロシンヒドロキシラーゼ陽性（TH+ve）細胞の定量化が含まれた。

【0262】

殺及び試料採取を以下のように行った：動物をイソフルランで深く麻酔し、次いで、0.2%ヘパリンを含有する氷冷 0.9%生理食塩水を用いた経心臓灌流による放血によって 殺した。脳を腹側上方で氷冷ステンレス鋼ラット脳マトリックスに入れ、最初に視床下部のレベルで冠状面で切断した。線条体全体を含む脳の吻側部分を -42℃に冷却したイソペンタン中で直ちに凍結し、後に DAT オートラジオグラフィのために切片化し、LC-MS/MS によるドーパミン及びドーパミンの代謝産物（HVA 及び DOPAC）のレベル並びに ELISA によるヒト α Syn のレベルの定量のために解剖した。組織を -80℃のロックフリーザーに保存した。分子アッセイのために、追加の関心領域（追加の線条体解離を含む）を表 11 に従って収集した。

【0263】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 9. 目的の脳領域並びに対応するアッセイ及び試料の取り扱い。

目的の領域	アッセイ	使用した緩衝剤	フォーマット
線条体	オートラジオグラフィ	なし、凍結切片化	オンスライド
線条体	LCMS	以下の LCMS 方法を参照されたい	上清
線条体	ELISA	RIPA、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤	アッセイ間で一定分量を共有する
線条体	TR-FRET	RIPA、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤	
線条体	Q-PCR (DNA) RT-QPCR (miRNA, RNA)	なし、凍結切片化及び切開	インチューブ

10

【0264】

中脳を含む脳の尾部の残りの部分を、固定のために 4 % パラホルムアルデヒド (PFA) に 48 時間浸漬し、引き続いて段階的スクロース溶液 (15 ~ 30 % スクロース) 中で凍結保護した。この様式で調製された組織を、チロシンヒドロキシラーゼの免疫組織化学及び偏りのない立体構造学を介した SNc におけるドーパミンニューロン数の定量化のために使用した。

20

【0265】

試験 3. 線虫 (*C. elegans*) PD モデルにおける運動表現型の表現型救済

この研究では、線虫 (*C. elegans*) PD モデル (OW40; van Ham et al 2008 PLoS Genet 4 (3): e1000027) における変化した運動行動の表現型救済に対する miSNCA 候補の発現の効果を研究した。このモデルでは、 α -シヌクレインは線虫 (*C. elegans*) の体壁筋において過剰発現される。この α -シヌクレイン過剰発現は、対照蠕虫と比較した場合、蠕虫の動きの減速を引き起こす。本発明者らは、全長 SNCA 遺伝子又は本発明者らの miSNCA 構築物を使用して、RNAi によって SNCA mRNA レベルを低下させ、それによって α -シヌクレインタンパク質レベルを低下させる効果を研究した。これらの構築物の 1 つを含む二本鎖 RNA を、摂食によって生物に導入した。線虫 (*C. elegans*) OW40 蠕虫には、ネガティブ対照としての空の T444T プラスミド又は全長 SNCA 遺伝子又は本発明者らの miSNCA 候補の 1 つ (miSNCA5、miSNCA13 又は miSNCA15) のいずれかを、その寿命の異なる段階; 幼虫段階 1 (L1)、幼虫段階 4 (L4) 及びそれらの成体期の 1 日目で過剰発現させた大腸菌が与えられた。25 °C 及び 15 °C で処理実験を繰り返した。それらの成体期の 1 日目、4 日目及び 8 日目における処置の後、それらの動き ($\mu\text{m}/\text{s}$ としての速度) を測定するためのハイスループットトラッキングセットアップを使用して虫をビデオ追跡した (Perniet al 2018 Journal of Neuroscience Methods, 306: 57-67)。

30

40

【0266】

更なる読み取りは、ウェスタンブロット分析を使用した SNCA mRNA 及び α -シヌクレインタンパク質レベルの RT-qPCR であった。SNCA mRNA の RT-qPCR に使用したプライマーを表 7 に示す。

【0267】

50

【表 8】

配列番号	遺伝子	遺伝子の種類	プライマー
65	SNCA1	導入遺伝子	5'-GACTTTCAAAGGCCAAGGAG-3'
66	SNCA1	導入遺伝子	3'-GGAGCCTACATAGAGAACAC-5'
67	SNCA2	導入遺伝子	5'-ATTGCAGCAGCCACTGGCTTTG-3'
68	SNCA2	導入遺伝子	5'- GGCTTCAGGTTCGTAGTCTTG-3'
69	PMP3	ハウスキーピング遺伝子	5'-CACTCATCTCTATGACGACGTTTC-3'
70	PMP3	ハウスキーピング遺伝子	3'- CACCGTCGAGAAGCTGTAGA-5'

10

表7.線虫 (*C.elegans*) 試料におけるSNCA mRNA決定のためのqPCRプライマー

【0268】

20

α-シヌクレインタンパク質レベルの検出のために、ウェスタンブロット分析を使用した。この目的のために、タンパク質を、RIPA緩衝剤及びTissue lyser (Qiagen)を使用して抽出した。異なる処理条件からの同様のタンパク質量をSDS PAGEにロードし、α-シヌクレインレベルを検出するために抗ヒトα-シヌクレイン抗体(表8)を使用してウェスタンブロットを行った。正常化のために、チューブリンを使用し、抗チューブリン抗体を使用してチューブリンを検出した(表8)。

【0269】

【表 9】

抗体名	カタログ番号	タンパク質の種類
α-シヌクレイン	18-0215 (Invitrogen)	標的タンパク質
チューブリン	T6074 (sigma)	正規化のためのハウスキーピングタンパク質

30

表 8.線虫 (*C.elegans*) 試料のウェスタンブロット分析に使用される抗体

【0270】

40

試験 4 . PFFラットモデルでの試験

この研究では、線条体へのα-Synによって予め形成されたフィブリル(PFF)の投与後のトランスジェニックマウス(線83、又は線20若しくは線61)におけるα-Synクレイン(α-Syn)病理の広がり进行评估する。α-Syn病理の広がりを減少させることにおけるAAV5-足場1又はAAV5-足場2の效果进行评估する。

【0271】

動物は、対照AAV(非標的化miRNA)又は異なる用量のAAV5-miSNCAと組み合わせて、α-Syn-PFF(マウス又はヒトベース)又は対照としてのそれぞれのモノマーの定位的注射を受ける。

【0272】

AAVを含む又は含まないα-Synの投与後の異なる時点で、動物を、氷冷0.9%

50

生理食塩水、引き続いて4% PFAによる経心腔内灌流によって殺した。次いで、脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒド中で（一晚）後固定し、スクロース溶液中で凍結保護する。次いで、前脳及び中脳を組織学的処置のために凍結摺動ミクロトームで切断する。前脳（前頭前帯状皮質、島皮質、線条体）及び中脳（黒質；SN）における病理学的な α -Syn拡散の程度についてのpSer129 α -Syn発現の定性的評価を免疫組織化学によって評価する。

【0273】

試験5．パーキンソン病のげっ歯類モデルにおける用量反応試験

この研究では、以前の実験で決定された最も強力なAAV5-miSNCA候補のいくつかの用量を、関連するげっ歯類（ラット又はマウス）パーキンソン病モデル（トランスジェニック系統）で試験する。分子的、組織学的及び運動の読み出しを使用して、AAV5-miSNCAと表現型救済との間の用量応答関係を決定する。

10

【0274】

結果

インビトロ実験

実施例1．人工miSNCA構築物のインビトロでのサイレンシング効力

インビトロでのmiSNCA構築物のmiSNCAノックダウン効力を評価するために、HEK293T細胞を、SNCA遺伝子をコードするウミシイタケルシフェラーゼレポータにより同時トランスフェクションした。ホタルルシフェラーゼ（FL）遺伝子を同じレポータベクターから発現させ、トランスフェクション効率を補正するための内部対照として用いた。最初のスクリーニングでは、HEK細胞を、1ng~10ng~50ng又は250ngの各miSNCA構築物及びSNCA遺伝子を担持するDual Lucレポータにより同時トランスフェクトした。SNCA遺伝子を標的とするように設計された17のmiSNCA構築物（配列番号71~77及び配列番号82~91）から、miSNCA2（配列番号71）、miSNCA5（配列番号72）、miSNCA7（配列番号73）、miSNCA12（配列番号74）、miSNCA13（配列番号75）、miSNCA15（配列番号76）及びmiSNCA16（配列番号77）が、RL/FL比における最も強力な用量依存的減少を誘導した（図3）。効力を更に決定するために、上記の構築物を滴定実験に更に使用した。構築物を異なる濃度；10ngのSNCALシフェラーゼレポータプラスミドで0.1、1、10又は100ngでHEK293T細胞に同時トランスフェクトした。これらの結果によれば、100ngのmiSNCAプラスミドでのトランスフェクションは、滴定実験において使用された全てのmiSNCA候補物について少なくとも50%の減少を示した（図5）。異なるモデルにおける更なる試験のために、miSNCA5、miSNCA13及びmiSNCA15が、mSNCAレベルを低下させることにおけるそれらの比較的大きい効力のために選択された。

20

30

【0275】

実施例2．足場1及び足場2構築物によるトランスフェクト細胞における内因性SNCA発現の低下

細胞におけるSNCA mRNA発現のノックダウンを試験するために、miSNCA5、miSNCA15及びmiSNCA2足場1（配列番号96、98、95）及び足場2構築物（miSNCA2+5、miSNCA5+15、miSNCA5+5、miSNCA5+15+2；それぞれ配列番号78~配列番号81）並びに足場1及び2（配列番号93、94及び99）についての対照miRNA（単一miRNA（CTR1）、二重スクランブルmiRNA（CTR1+CTR2）又は三重スクランブルmiRNA（CTR1+CTR2+CTR3））を選択した（図7A及び図7B）。HEK293T細胞における内因性SNCA遺伝子発現のノックダウンを、トランスフェクト細胞に対するRT-QPCRによって確認した。50ngのmiRNAプラスミドのトランスフェクションは、試験した全てのmiSNCA足場2候補による60~40%のSNCA mRNA発現の減少をもたらした（図8）。タンパク質発現の同様の減少が予想される。

40

【0276】

50

実施例 3．細胞におけるトランスフェクション時の mi SNCA 構築物のプロセッシング (NGS データ)

mi RNA のプロセッシングを、足場 1 及び足場 2 の足場における mi SNCA 5、mi SNCA 15 及び mi SNCA 2 構築物の pre-mi RNA 配列に対するリードのアラインメントによって調べた。結果によれば、全ての mi SNCA は、足場 1 足場又は足場 2 足場の両方において同じ方法で処理された。mi SNCA 5 について最も豊富な形態の長さは 25 nts であり、続いて 24 nts であり (図 9 A)、mi SNCA 15 については 24 nts であり、続いて 25 nts であり (図 9 B)、mi SNCA 2 については 28 nts であった (図 9 C)。

【0277】

10

実施例 4．ヒト細胞における AAV-mi SNCA 形質導入及び用量依存的 SNCA mRNA 低下

AAV 5 又は AAV 6 - 足場 1 又は足場 2 がパッケージングされた発現カセットを形質導入及び送達する能力を調べるために、DA ニューロン又は前脳ニューロン及び／又は LHMES 由来 DA ニューロンを様々な感染多重度 (MOI) ; 10^4 、 10^5 、 10^6 及び 10^7 で形質導入する。ベクター DNA レベルを測定し、これらの細胞における用量依存的な vDNA レベルの上昇が予想される。RNA を形質導入された細胞から単離し、SNCA の mRNA レベルを RT-qPCR アッセイを用いて測定し、これらの形質導入された細胞における SNCA レベルの用量依存的な mRNA 減少が予想される。

【0278】

20

実施例 5．インビトロ及びインビボ研究における AAV 5-mi SNCA 及び AAV 6-mi SNCA 形質導入：mi SNCA プロセッシングの評価

足場 1 及び足場 2 における mi SNCA 2、mi SNCA 5 及び mi SNCA 15 の mi RNA プロセッシングを評価するために、AAV 5-mi SNCA 2、AAV 5-mi SNCA 5、AAV 5-mi SNCA 15、AAV 5-mi SNCA 5+15 を使用して、MOI 5 でヒト誘導多能性幹細胞 (iPSC) 由来前脳ニューロンを形質導入した。これらの試料から全 RNA を単離し、低分子 RNA 配列決定を行った。mi RNA のプロセッシングを、足場 1 及び足場 2 の足場における mi SNCA 2、mi SNCA 5 及び mi SNCA 15 構築物の pre-mi RNA 配列に対するリードのアラインメントによって調べた。結果によれば、全ての mi SNCA は、足場 1 足場又は足場 2 足場の両方において同じ方法で処理された (図 13)。mi SNCA 2 について最も豊富な形態の長さは 27 nts であり、続いて 25~26 nts であり、mi SNCA 5 については 24 nts であり、続いて 25~24 nts であり、mi SNCA 15 については 23 nts であり、続いて 22~24 nts であった (図 13)。

【0279】

30

実施例 6．インビボ試料からの AAV 5-mi SNCA 処理

足場 1 から発現される mi RNA の mi RNA プロセッシング及びアイソフォームを調べるために、インビボ研究 2 からの線条体組織試料から単離された RNA を、低分子 RNA 配列決定 (Genome Scan による次世代シーケンシング) によって分析した。インビボ試料での足場 1 における mi SNCA 2、mi SNCA 5 及び mi SNCA 15 のプロセッシングは、これらの mi RNA のインビトロプロセッシングと類似していた (図 13 対図 14)。最も豊富に存在するアイソフォームの長さは、mi SNCA 2 については 25 及び 28 nts、続いて 27 及び 29 nts であり (図 14 A)、mi SNCA 5 については 24 nts、続いて 23、25 及び 22 nts であり (図 14 B)、mi SNCA 15 については 22 nts、続いて 23、21 及び 24 nts であった (図 14 C)。

【0280】

40

インビボ試験

実施例 7．AAV 5-mi SNCA 候補は、 α -syn KI ラットにおけるヒト SNCA mRNA 発現を低下させた (試験 1)

ヒト SNCA mRNA 発現を低下させる設計候補のうちの 2 つ (mi SNCA 5 及び

50

miSNCA15)の能力を評価するために、AAV5-miSCR(miSCR非標的化スクランブル対照(配列番号100)、AAV5-miSNCA5又はAAV5-miSNCA15を成体 α -syn KIラットの左線条体に注射した。miSNCA13は、SNCA KIラットモデルのヒト化部分の外側の領域を標的としており、wtラットSNCA遺伝子に対して3つのミスマッチを有するので、インビボ研究から除外した。追加の対照として、製剤緩衝剤を右線条体に注射した。使用した単回用量では、AAV5注射した脳半球でvDNAが検出されたが、対照半球では、vDNAレベルは定量下限(LLoQ)未満であった(図4A)。形質導入は、ベクター特異的様式でmiSNCA候補5及び15の発現をもたらした(図4B):miSNCA5は、AAV5-miSNCA5注入半球においてのみ検出され、miSNCA15は、AAV5-miSNCA15注入半球においてのみ検出された。使用した単回用量では、AAV5-miSNCA5は、対照線条体と比較して、2つの異なるRT-QPCR SNCAアッセイ(プライマーセットSNCA1及びプライマーセットSNCA2)によって評価したように、注射した線条体におけるSNCA mRNA発現を減少させるのに有効であった(図4C)。この研究は、パーキンソン病の治療のためのAAV5-miSNCA候補がヒトSNCA mRNAの発現を減少させ、最終的に α -シヌクレインの関連する毒性を減少させることができることを示す。更に、miSNCA5とmiSNCA15との組合せは、SNCAのmRNAレベルを低下させることにおいてより効果的である。

10

【0281】

実施例8.AAV-Synラットモデルにおける概念実証研究(研究2)

20

AAV-Synラットモデルにおいて、異なるAAV5-miSNCA足場1及びAAV5-miSNCA足場2候補を試験した。AAV5-miSNCAベクターは、運動表現型、分子及び神経化学的变化において、AAV-Synラットモデルにおける疾患表現型を回復させた。

【0282】

SNCAレベルを低下させる概念のインビボ証明、及び運動表現型改善との関係を決定するために、ラットPDモデルを使用した(AAV1/2-hA53T-aSyn;ヒトA53T a-synのウイルス誘導性過剰発現)。右黒質(SN)に疾患誘導性AAV1/2-hSNCAベクターを片側注射し、続いて異なる治療用ベクター(AAV5-miSNCA)を投与し、それぞれの対照miCTR1又はmiCTR1+CTR2空ベクター(EV__CTR)を疾患モデルの対照として使用した。使用した単回用量では、全ての注射群において、AAV5注射した脳半球の線条体においてvDNAが検出された。低中用量及び高用量の最後の3つのAAV5-miSNCA足場2群では、用量依存的なvDNAレベルが検出されたが(図15)、対照半球(左線条体)では、vDNAレベルは定量下限(LLoQ)未満であった(図示せず)。形質導入は、ベクター特異的様式でmiSNCA2、miSNCA5又はmiSNCA15の特異的発現をもたらした(図16A、B、及びC):miSNCA2は、AAV5-miSNCA2注入群においてのみ検出され、miSNCA5は、AAV5-miSNCA5及びmiSNCA5+15注入群においてのみ検出され、miSNCA15は、AAV5-miSNCA15及びmiSNCA5+15注入群においてのみ検出され、陰性対照群からの他の試料では検出されなかった。A53T-aSyn動物では、Taqman RT-qPCRアッセイ(SNCA2プライマーとプローブの組合せ)によって評価したところ、AAV5-miSNCA候補の全てが、注射された半球の線条体におけるSNCA mRNA発現を減少させるのに有効であり、AAV5-miSNCA足場1候補を、無関係のmiRNA(薄灰色の実線のバー;miCTR1)を注射した対照線条体と比較し、AAV5-miSNCA足場2候補を、無関係のmiRNA(薄い灰色の格子縞の棒;miCTR1+CTR2)を注射した対照線条体と比較した(図17)。miSNCA発現はまた、ELISAによって測定される場合、対照と比較して、全てのAAV5-miSNCA処置群における低下した α -synタンパク質レベルによって反映されるタンパク質レベルでの低下をもたらした(図18)。[125I]-RTI-121オートラジオグラフィによって測定されたドー

30

40

50

パミントランスポータ欠損は、PD患者で観察された欠損と同様に、対照（非標的化）*miRNA*（無関係な*miR*、第2群及び第3群（表6の*miCTR1*及び*miCTR1+CTR2*）を注射した*A53T-aSyn*動物で明らかであり、*miSNCA15*及び*miSNCA5+15*（低用量及び高用量）処置群で補正された（表6の群6、7及び9）（図19）。このモデルにおける代謝産物の変化に関連して、*miSNCA*候補による*A53T-aSyn*誘導性線条体ドーパミン欠損の補正が5～9群で観察された。図20は、試験群におけるドーパミンレベルを示す。

【0283】

左足使用の非対称性パーセントによって測定される運動行動障害は、ベースラインレベルと比較して、56日目に*miSNCA2*、*miSNCA5*、*miSNCA15*又は*miSNCA5+15*（中用量）（群4、5、6及び8）処置を受けた群において有意に救済された（図21A及び図21B）。

【0284】

分子的、生化学的及び運動行動の結果は、組織学的観察によって裏付けられた。黒質におけるドーパミン作動性（TH陽性）及び α -*syn*陽性ニューロンの免疫染色及び定量化は、*AAV5-miSNCA5*及び*AAV5-miSNCA15*候補の両方がドーパミン作動性（TH）ニューロン細胞喪失を救済し（図22A）、ヒト α -*syn*陽性細胞数を減少させた（図22B）ことを示した。これは、*a-syn*を発現した陽性ドーパミン作動性（TH）細胞の割合の減少によって反映された（図22C）。

【0285】

全体として、*AAV5-miSNCA*は、*AAV-Syn*ラットモデルにおける疾患表現型をレスキューし、運動表現型を改善し、分子的及び神経化学的变化をレスキューした。

【0286】

実施例9．線虫PDモデルにおける運動表現型の表現型救済（試験3）

異なるプラスミド発現大腸菌（*E. coli*）によって給餌された線虫（*C. elegans*）（体壁筋肉にヒトSNCA遺伝子を発現し、運動性の低下を引き起こす）間の運動速度を比較するために、条件ごとに100匹の線虫をビデオ追跡した。結果によれば、全長SNCA RNAi発現又は*miSNCA*発現大腸菌（*E. coli*）によって給餌された虫は、空のプラスミドで形質転換された大腸菌（*E. coli*）によって給餌された虫と比較して、運動速度の改善を示した。完全長SNCA又は*miSNCA*で処置した虫は、その動きを追跡した全ての日において、未処置の疾患モデル蠕虫と比較して速度が増加した。これらの結果は、SNCA遺伝子の発現を減少させ、それによって α -シヌクレインレベルを低下させることが、この線虫（*C. elegans*）PDモデルにおける運動表現型を改善していることを示す。

【0287】

*miSNCA*候補を使用することによるRNAiは、線虫（*C. elegans*）の発達の異なる段階；幼虫段階1（L1）、幼虫段階4（L4）及び成体段階1日目（Day1）で処置した場合に有効であることが示されている。線虫（*C. elegans*）の運動行動は、L1、L4及びDay1段階の処置で救済された（図10A～C）。SNCA mRNAレベル（図11A～C）及び α -シヌクレインタンパク質レベル（図11D～F）もまた、これらの条件で低下することが示された。

【0288】

全長SNCA及び*miSNCA*によるRNAiは、線虫（*C. elegans*）PDモデルの筋細胞においてSNCA過剰発現によって引き起こされる運動表現型挙動をレスキューした。SNCA全長RNAiは常に、SNCA mRNA及び α -シヌクレインタンパク質の低下のはるかに効果的な低下を示す。これは、SNCA全長RNAiによって説明することができ、SNCAのmRNA発現を低下させるのに全体的にはるかに効果的な種々の小さなRNA片をもたらす。更に、これは、全長SNCA RNAiによって導入された*miRNA*の投与量の増加に起因し得る。低分子RNA配列決定の結果は、多くの

10

20

30

40

50

異なるSNCA断片（断片サイズの大部分は20～25bpsの範囲）を示すことによってこれを実証した。断片のいくつかは、この研究の範囲内で設計されたmiSNCAと重複する配列を有し（図12）、効力を増大させるために異なるmiRNAを組み合わせる有益な効果を裏付ける。

【0289】

実施例10．PFFラットモデルにおける概念実証研究（研究4）

異なるAAV-miSNCA候補をPFFラットモデルにおいて試験する。ラット脳における α -synPFFの病理学的広がり減少が予想される。

【0290】

実施例11．パーキンソン病のげっ歯類モデルにおける用量反応試験（試験5）

最も強力なAAV5-miSNCA足場1及び足場2候補のいくつかの用量を、関連するげっ歯類（ラット又はマウス）パーキンソン病モデル（トランスジェニック系統）で試験する。AAV5-miSNCA足場1及び足場2は、分子的、組織学的及び運動読み出しの表現型を救済すると予想される。

【図面】

【図1】

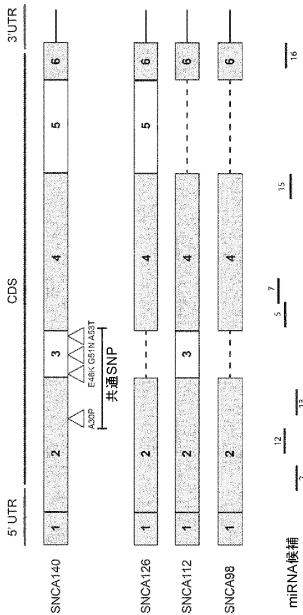


図1

【図2】

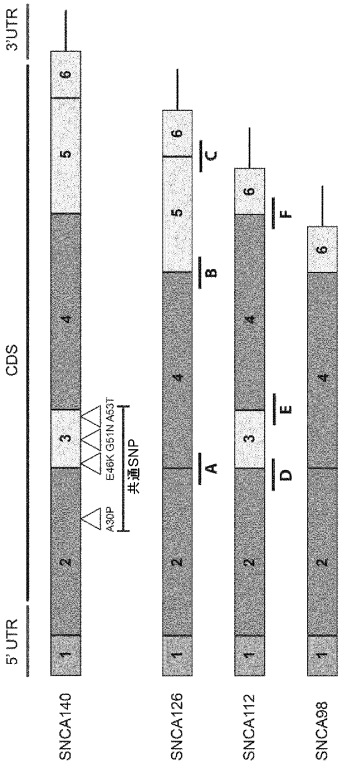


図2

miSNCA候補をまたぐエクソンA-SNCA126及びSNCA98を標的とする、B&C-SNCA140及びSNCA126を標的とする、D&E-SNCA140及びSNCA112を標的とする、F-SNCA112及びSNCA98を標的とする

10

20

30

40

50

【図 3】

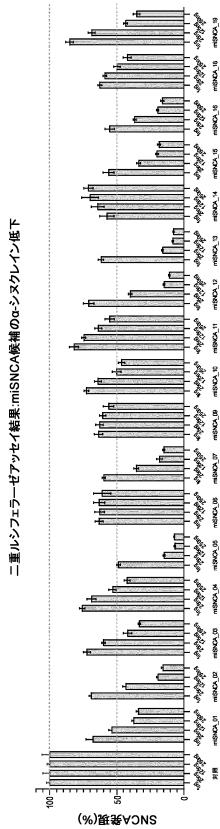


図3

【図 4】

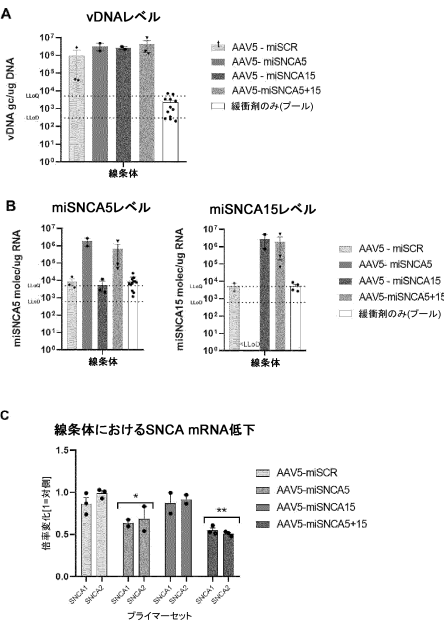


図4

【図 5】

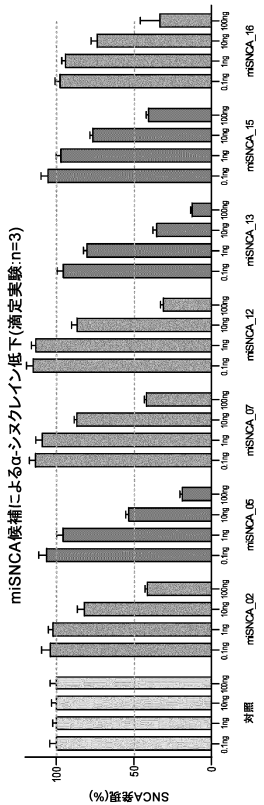


図5

【図 6】

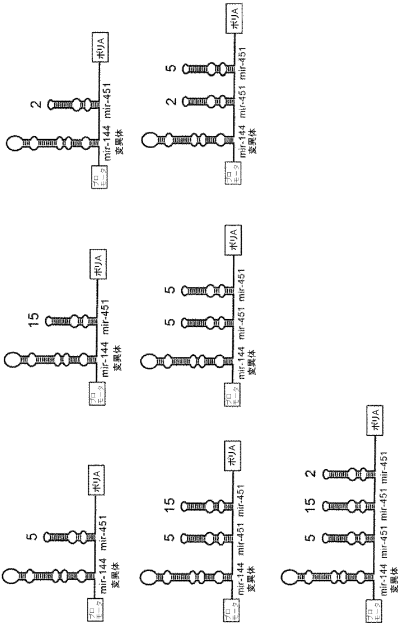


図6

10

20

30

40

50

【図 1 4 - 2】

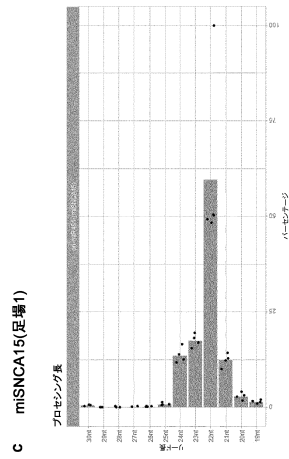


図14

【図 1 5】

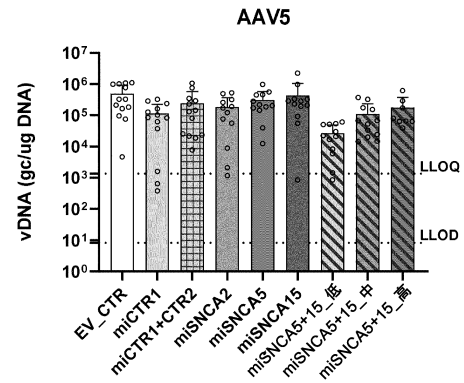


図15

【図 1 6 - 1】

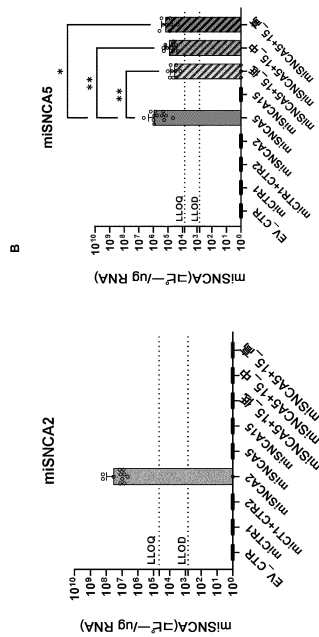


図16

【図 1 6 - 2】

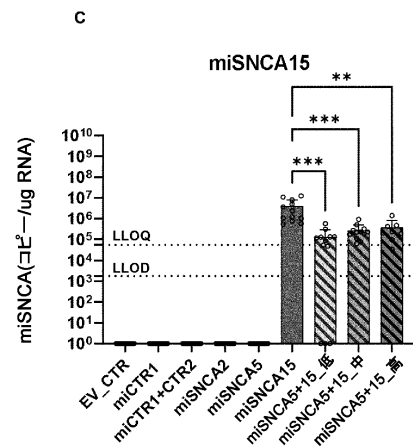


図16

10

20

30

40

50

【 図 1 7 】

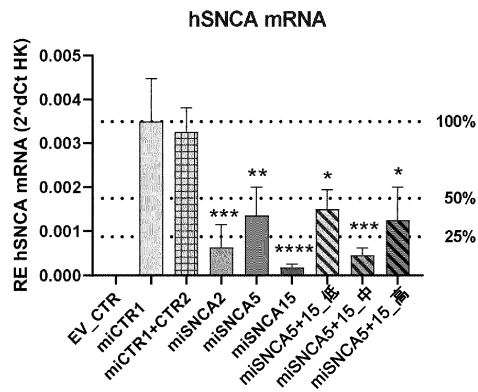


図17

【 図 1 8 】

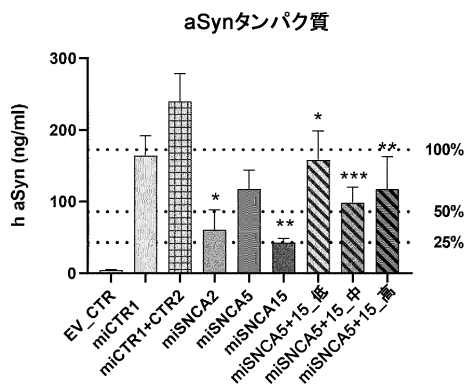


図18

【 図 1 9 】

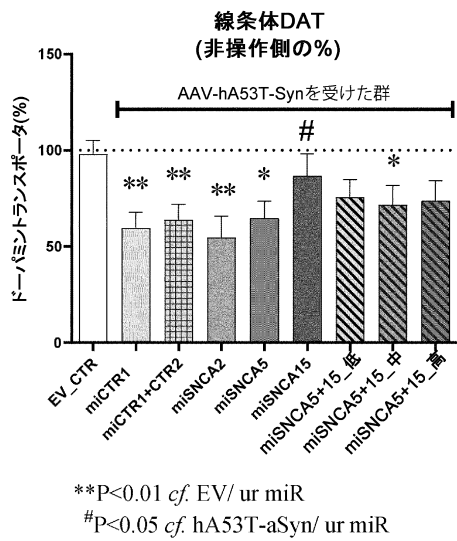


図19

【 図 2 0 】

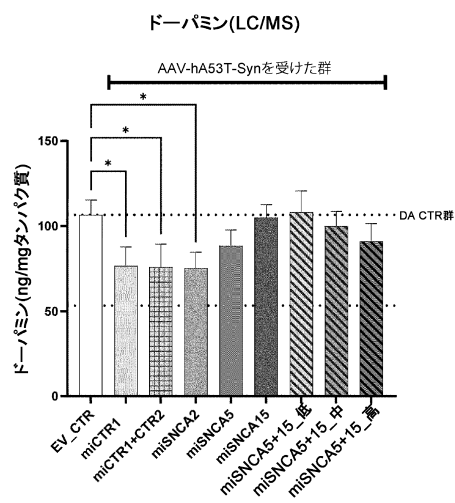


図20

10

20

30

40

50

【図 2 1】

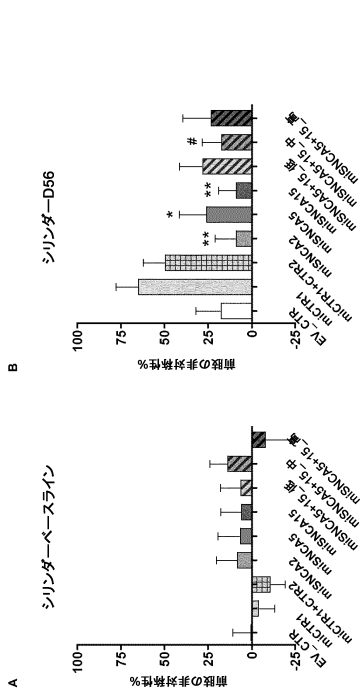


図21

【図 2 2】

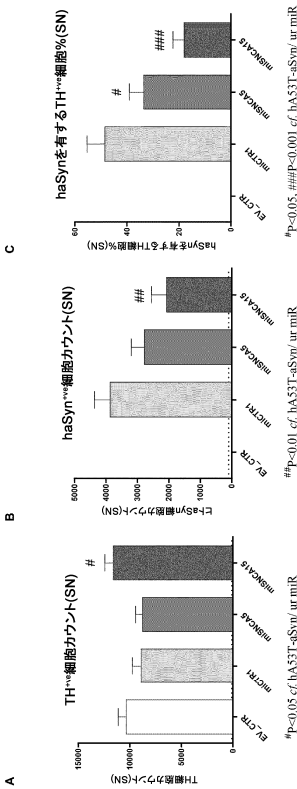


図22

【配列表】

2025512061000001.xml

【手続補正書】

【提出日】令和7年1月10日(2025.1.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1のRNAをコードする配列及び第2のRNAをコードする配列を含む核酸であって 10
、

i. 前記第1及び第2のRNAは、それぞれヘアピンを含み、

i i. 前記第1のRNAは、アルファシヌクレイン(SNCA)遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも19ヌクレオチドの第1のガイド配列を含み、

i i i. 前記第2のRNAは、SNCA遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも19ヌクレオチドの第2のガイド配列を含む、

第1のRNAをコードする配列及び第2のRNAをコードする配列を含む核酸。

【請求項2】

5'から3'方向において、前記第1のRNAをコードする前記配列の後に少なくとも15ヌクレオチドを含む第1のスペーサが続き、前記第1のスペーサの後に前記第2のRNAをコードする前記配列が続く、請求項1に記載の核酸。 20

【請求項3】

前記第1のRNAが、配列番号11、配列番号101、及びそのバリエーションから選択される配列を含み、前記第2のRNAが、配列番号11又はそのバリエーションを含む、請求項1又は請求項2に記載の核酸。

【請求項4】

前記第1のRNA及び前記第2のRNAが、それぞれ配列番号11又はそのバリエーションを含む、請求項1に記載の核酸。

【請求項5】

第3のRNAをコードする配列を更に含み、前記第3のRNAが配列番号34又はそのバリエーションを含む、請求項2に記載の核酸。 30

【請求項6】

5'から3'方向において、前記第3のRNAをコードする前記配列の後に少なくとも15ヌクレオチドを含む第2のスペーサが続き、前記第2のスペーサの後に前記第1のRNAをコードする前記配列が続く、前記第1のスペーサ及び前記第2のRNAをコードする前記配列が続く、請求項5に記載の核酸。

【請求項7】

前記第3のRNAが、前記第3のRNAのmiR144プロセッシング及び／又は発現を低減又は排除するように変異している、請求項5に記載の核酸。

【請求項8】

前記ガイド配列のそれぞれが、配列番号4～配列番号10からなる群から選択される配列と実質的に相補的である、請求項1に記載の核酸。 40

【請求項9】

請求項1に記載の核酸を含む発現カセットであって、DNA分子である、発現カセット。

【請求項10】

前記核酸が、プロモータ及び場合によりポリAシグナルに作動可能に連結されている、請求項9に記載の発現カセット。

【請求項11】

前記発現カセットが、少なくとも1つのAAV逆位末端配列(ITR)に隣接している 50

、請求項 9 に記載の発現カセット。

【請求項 12】

請求項 9 に記載の発現カセットを含む、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター。

【請求項 13】

AAV5 カプシドタンパク質又は AAV9 カプシドタンパク質を含む、請求項 12 に記載の AAV ベクター。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の核酸と、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 15】

医薬品として使用するための、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記 SNCA 遺伝子によってコードされる RNA の発現を低下させる治療に使用するための、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記治療が、 α -シヌクレイン凝集体の量並びに／又はレビー及び／若しくは Pappalantos 体の量を減少又はノックダウンする、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

パーキンソン病（PD）、レビー小体型認知症（DLB）、多系統萎縮症、神経精神症状、パーキンソン病（PD）の運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害、及び／又は嗅覚障害を治療及び／又は予防するために使用される、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 1 に記載の核酸を含むキットであって、免疫抑制化合物を更に含む、キット。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の核酸でトランスフェクトされた細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0290

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0290】

実施例 11. パーキンソン病のげっ歯類モデルにおける用量反応試験（試験 5）

最も強力な AAV5-miSNCA 足場 1 及び足場 2 候補のいくつかの用量を、関連するげっ歯類（ラット又はマウス）パーキンソン病モデル（トランスジェニック系統）で試験する。AAV5-miSNCA 足場 1 及び足場 2 は、分子的、組織学的及び運動読み出しの表現型を救済すると予想される。

さらなる実施形態は以下のとおりである。

【実施形態 1】

第 1 の RNA をコードする配列及び第 2 の RNA をコードする配列を含む核酸であって、

i. 前記第 1 及び第 2 の RNA は、それぞれヘアピンを含み、

ii. 前記第 1 の RNA は、アルファシヌクレイン（SNCA）遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも 19 ヌクレオチドの第 1 のガイド配列を含み、

iii. 前記第 2 の RNA は、SNCA 遺伝子の一部に実質的に相補的な少なくとも 19 ヌクレオチドの第 2 のガイド配列を含む、

第 1 の RNA をコードする配列及び第 2 の RNA をコードする配列を含む核酸。

【実施形態 2】

5' から 3' 方向において、前記第 1 の RNA をコードする前記配列の後に少なくとも 15 ヌクレオチドを含む第 1 のスペーサが続き、前記第 1 のスペーサの後に前記第 2 の RNA をコードする前記配列が続く、実施形態 1 に記載の核酸。

10

20

30

40

50

〔実施形態 3〕

前記第 1 の RNA が、配列番号 1 1、配列番号 1 0 1、及びそのバリエーションから選択される配列を含み、前記第 2 の RNA が、配列番号 1 1 又はそのバリエーションを含む、実施形態 1 又は実施形態 2 に記載の核酸。

〔実施形態 4〕

前記第 1 の RNA 及び前記第 2 の RNA が、それぞれ配列番号 1 1 又はそのバリエーションを含む、実施形態 1 ～ 3 のいずれか 1 つに記載の核酸。

〔実施形態 5〕

第 3 の RNA をコードする配列を更に含み、前記第 3 の RNA が配列番号 3 4 又はそのバリエーションを含む、実施形態 4 に記載の核酸。

〔実施形態 6〕

5' から 3' 方向において、前記第 3 の RNA をコードする前記配列の後に少なくとも 1 5 ヌクレオチドを含む第 2 のスペーサが続く、前記第 2 のスペーサの後に前記第 1 の RNA をコードする前記配列が続く、前記第 1 のスペーサ及び前記第 2 の RNA をコードする前記配列が続く、実施形態 5 に記載の核酸。

〔実施形態 7〕

前記第 3 の RNA が、前記第 3 の RNA の miR 1 4 4 プロセッシング及び／又は発現を低減又は排除するように変異している、実施形態 5 又は実施形態 6 に記載の核酸。

〔実施形態 8〕

前記ガイド配列のそれぞれが、配列番号 4 ～配列番号 1 0 からなる群から選択される配列と実質的に相補的である、実施形態 1 ～ 7 のいずれか 1 つに記載の核酸。

〔実施形態 9〕

実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の核酸を含む発現カセットであって、DNA 分子である、発現カセット。

〔実施形態 1 0〕

前記核酸が、プロモータ及び場合によりポリ A シグナルに作動可能に連結されている、実施形態 9 に記載の発現カセット。

〔実施形態 1 1〕

前記発現カセットが、少なくとも 1 つの AAV 逆位末端配列 (ITR) に隣接している、実施形態 9 又は実施形態 1 0 に記載の発現カセット。

〔実施形態 1 2〕

実施形態 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の発現カセットを含む、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター。

〔実施形態 1 3〕

AAV 5 カプシドタンパク質又は AAV 9 カプシドタンパク質を含む、実施形態 1 2 に記載の AAV ベクター。

〔実施形態 1 4〕

実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の核酸、実施形態 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の発現カセット、又は実施形態 1 2 若しくは実施形態 1 3 に記載の AAV ベクターと、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

〔実施形態 1 5〕

医薬品として使用するための、実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の核酸、実施形態 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の発現カセット、又は実施形態 1 2 若しくは 1 3 に記載の AAV ベクター、又は実施形態 1 4 に記載の医薬組成物。

〔実施形態 1 6〕

前記 SNCA 遺伝子によってコードされる RNA の発現を低下させる治療に使用するための、実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の核酸、実施形態 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の発現カセット、又は実施形態 1 2 若しくは実施形態 1 3 に記載の AAV ベクター、又は実施形態 1 4 に記載の医薬組成物。

〔実施形態 1 7〕

10

20

30

40

50

前記治療が、 α -シヌクレイン凝集体の量並びに／又はレビー及び／若しくは P a p p - L a n t o s 体の量を減少又はノックダウンする、実施形態 1 6 に記載の使用のための、実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の核酸、実施形態 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の発現カセット、又は実施形態 1 2 若しくは実施形態 1 3 に記載の A A V ベクター、又は実施形態 1 4 に記載の医薬組成物。

〔実施形態 1 8〕

前記医薬品が、パーキンソン病（P D）、レビー小体型認知症（D L B）、多系統萎縮症、神経精神症状、パーキンソン病（P D）の運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害、及び／又は嗅覚障害を治療及び／又は予防するために使用される、実施形態 1 6 又は実施形態 1 7 に記載の使用のための、実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の核酸、実施形態 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の発現カセット、又は実施形態 1 2 若しくは実施形態 1 3 に記載の A A V ベクター、又は実施形態 1 4 に記載の医薬組成物。

10

〔実施形態 1 9〕

実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の核酸、実施形態 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の発現カセット、実施形態 1 2 若しくは実施形態 1 3 に記載の A A V ベクター、又は実施形態 1 4 に記載の医薬組成物を含むキットであって、免疫抑制化合物を更に含む、キット

。

〔実施形態 2 0〕

実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の核酸、実施形態 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の発現カセット、又は実施形態 1 2 若しくは実施形態 1 3 に記載の A A V ベクターでトランスフェクトされた細胞。

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2023/059361
Box No. I	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: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 A61K31/7088 A61P25/28 C07K14/47 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 A61K A61P C40B C07K		
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 2012/027558 A2 (UNIV COLUMBIA [US]; ABELIOVICH ASA [US] ET AL.) 1 March 2012 (2012-03-01)	1, 9, 12, 14-20
Y	paragraphs [00158], [00167], [00172]; examples 2-16; table 1; sequences 5, 32,	2-4, 10, 11, 13
A	39, 47, 55, 63, 71, 1, 28, 35, 43, 51, 59, 67 -----	5-8
Y	WO 2020/053258 A1 (UNIQUE IP BV [NL]) 19 March 2020 (2020-03-19)	2-4, 10, 11, 13
A	pages 35, 36; figures 4a, 5a; tables 14, 16; sequence 151 -----	5-8
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 7 July 2023		Date of mailing of the international search report 17/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Harvey, Maia

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						International application No	
Information on patent family members						PCT/EP2023/059361	
Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date	
WO 2012027558	A2	01-03-2012	US	2014051748	A1	20-02-2014	
			WO	2012027558	A2	01-03-2012	

WO 2020053258	A1	19-03-2020	CA	3112007	A1	19-03-2020	
			EP	3850098	A1	21-07-2021	
			US	2021330813	A1	28-10-2021	
			WO	2020053258	A1	19-03-2020	

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)

C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/20 (2006.01)	A 6 1 P	25/20	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	11/02 (2006.01)	A 6 1 P	11/02	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW ,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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,ZW

オランダ王国, 1 1 0 5 ビーピー アムステルダム, パースフーフエルヴェーク 2 5, ケア
オブ ユニキュアー バイオフィーマ ビー. ブイ.

(72)発明者

アッカー ブロックマンズ, セイダ

オランダ王国, 1 1 0 5 ビーピー アムステルダム, パースフーフエルヴェーク 2 5, ケア
オブ ユニキュアー バイオフィーマ ビー. ブイ.

(72)発明者

ボッカイ, イレーナ

オランダ王国, 1 1 0 5 ビーピー アムステルダム, パースフーフエルヴェーク 2 5, ケア
オブ ユニキュアー バイオフィーマ ビー. ブイ.

(72)発明者

エバース, メルビン モーリス

オランダ王国, 1 1 0 5 ビーピー アムステルダム, パースフーフエルヴェーク 2 5, ケア
オブ ユニキュアー バイオフィーマ ビー. ブイ.

(72)発明者

ワーテル, モルガン, サラ

オランダ王国, 1 1 0 5 ビーピー アムステルダム, パースフーフエルヴェーク 2 5, ケア
オブ ユニキュアー バイオフィーマ ビー. ブイ.

(72)発明者

キーパー, セバスチャン ニクラス

オランダ王国, 1 1 0 5 ビーピー アムステルダム, パースフーフエルヴェーク 2 5, ケア
オブ ユニキュアー バイオフィーマ ビー. ブイ.

F ターム (参考)

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA44

4C084 AA13 NA13 ZA01 ZA05 ZA15 ZA34 ZC41

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA13 ZA01 ZA05 ZA15 ZA34
ZC41