

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-535266

(P2017-535266A)

(43) 公表日 平成29年11月30日 (2017. 11. 30)

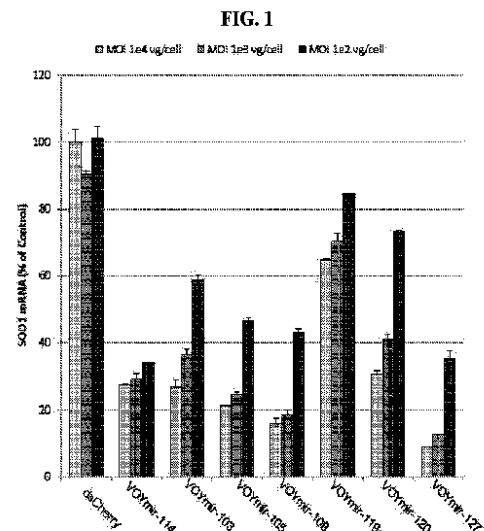
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 C 0 8 4
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5 4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-525847 (P2017-525847)	(71) 出願人	517157204
(86) (22) 出願日	平成27年11月13日 (2015. 11. 13)		ボイジャー セラピューティクス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月23日 (2017. 6. 23)		VOYAGER THERAPEUTICS, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/060562		アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ シドニー ストリート 75
(87) 国際公開番号	W02016/077687	(74) 代理人	100105957
(87) 国際公開日	平成28年5月19日 (2016. 5. 19)		弁理士 恩田 誠
(31) 優先権主張番号	62/079, 588	(74) 代理人	100068755
(32) 優先日	平成26年11月14日 (2014. 11. 14)		弁理士 恩田 博宣
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100142907
(31) 優先権主張番号	62/211, 992		弁理士 本田 淳
(32) 優先日	平成27年8月31日 (2015. 8. 31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/234, 466		
(32) 優先日	平成27年9月29日 (2015. 9. 29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を治療する組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、SOD1遺伝子に対する低分子干渉RNA (siRNA) 分子、siRNA分子をコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、およびsiRNA分子およびAAVベクターを用いた筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含む、細胞中の S O D 1 の発現を阻害または抑制するための 2 つの逆方向末端反復 (I T R) の間に位置する核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであって、前記センス鎖配列は、表 3、表 1 1 または表 1 4 に列挙された配列のヌクレオチド配列と 3 ヌクレオチド以下で異なる少なくとも 1 5 個の連続したヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖配列は、表 3、表 1 1 または表 1 4 に列挙された配列のヌクレオチド配列と 3 ヌクレオチド以下で異なる少なくとも 1 5 個の連続したヌクレオチドを含み、前記センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列は少なくとも 4 ヌクレオチド長の相補性領域を共有する、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター。

10

【請求項 2】

前記核酸配列が、 s i R N A 二本鎖のセンス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含む、請求項 1 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3】

前記 s i R N A 二本鎖が、 s i R N A 二本鎖 I D 番号 D - 2 7 4 1 ~ I D 番号 D - 2 9 8 5 からなる群から選択される、請求項 2 に記載の A A V ベクター。

【請求項 4】

前記 s i R N A 二本鎖が、 s i R N A I D : D - 2 7 5 7、D - 2 8 0 6、D - 2 8 6 0、D - 2 8 6 1、D - 2 8 7 5、D - 2 8 7 1、D - 2 7 5 8、D - 2 7 5 9、D - 2 8 6 6、D - 2 8 7 0、D - 2 8 2 3、および D - 2 8 5 8 の核酸配列からなる群から選択される、請求項 2 に記載の A A V ベクター。

20

【請求項 5】

前記相補性領域が少なくとも 1 7 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 に記載の A A V ベクター。

【請求項 6】

前記相補性領域が 1 9 から 2 1 ヌクレオチドの長さである、請求項 5 に記載の A A V ベクター。

【請求項 7】

前記相補性領域が 1 9 ヌクレオチドの長さである、請求項 6 に記載の A A V ベクター。

【請求項 8】

前記センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列が、独立して、3 0 ヌクレオチド以下である、請求項 1 に記載の A A V ベクター。

30

【請求項 9】

前記センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列の少なくとも 1 つが、少なくとも 1 ヌクレオチドの 3 ' オーバーハングを含む、請求項 1 に記載の A A V ベクター。

【請求項 1 0】

前記センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列の少なくとも 1 つが、少なくとも 2 ヌクレオチドの 3 ' オーバーハングを含む、請求項 9 に記載の A A V ベクター。

【請求項 1 1】

前記 A A V ベクターが、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 9 . 4 7、A A V 9 (h u 1 4)、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V r h 8、A A V r h 1 0、A A V - D J 8 および A A V - D J およびそれらの変異体からなる群から選択されるキャプシド血清型を含む、請求項 1 に記載の A A V ベクター。

40

【請求項 1 2】

細胞中の S O D 1 遺伝子の発現を阻害する方法であって、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の A A V ベクターを含む組成物を前記細胞に投与することを含む方法。

【請求項 1 3】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

50

前記哺乳類細胞が運動ニューロンである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記哺乳類細胞が星状細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

治療を必要とする対象における筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療および改善の少なくとも一方を行う方法であって、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の AAV ベクターを含む組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 17】

前記 SOD1 の発現が阻害または抑制される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 SOD1 が野生型 SOD1、少なくとも 1 つの突然変異を有する突然変異 SOD1、または野生型 SOD1 および少なくとも 1 つの突然変異を有する突然変異 SOD1 である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 SOD1 の発現が、約 20% ~ 約 100% 阻害または抑制される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 ALS が、同定された SOD1 遺伝子突然変異を有する家族性 ALS である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 ALS が散発性 ALS である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

SOD1 遺伝子が細胞内で機能効果をもたらす変異を含む細胞における SOD1 遺伝子の発現を抑制する方法であって、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の AAV ベクターを含む組成物を前記細胞に投与することを含む方法。

【請求項 23】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記哺乳動物細胞が運動ニューロンである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記哺乳類細胞が星状細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2014 年 11 月 14 日に提出された SOD-1 を標的とする siRNA を用いた筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療と題された米国仮特許出願第 62/079,588 号、2015 年 8 月 31 日に提出された筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を治療する組成物および方法と題された米国仮特許出願第 62/211,992 号、2015 年 9 月 29 日に提出された筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を治療する組成物および方法と題された米国仮特許出願第 62/234,466 号の権利を主張しており、その各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

本出願は、電子フォーマットの配列表と共に提出されている。配列表は、2015 年 1 月 12 日に作成された 126,873 バイトのサイズである 1011PCTSL.txt という名前のファイルとして提供されている。配列表の電子フォーマットでの情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

発明の分野

10

20

30

40

50

本発明は、調節性ポリヌクレオチド、例えばスーパーオキシドジスムターゼ1 (SOD1) 遺伝子を標的とする低分子干渉RNA (siRNA) 分子の設計、調製、製造、使用および/または製剤のための組成物、方法およびプロセスに関する。本明細書中で使用される「調節ポリヌクレオチド」は、標的遺伝子、例えばmRNAのレベルまたは量、またはタンパク質レベルを調節(上昇または低下のいずれか)するように機能する任意の核酸配列である。SOD1遺伝子の標的化は、SOD1遺伝子発現およびSOD1酵素産生を妨害し得る。いくつかの実施形態において、siRNA分子をコードする核酸配列は、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに挿入される。神経変性疾患(例えば、筋萎縮性側索硬化症(ALS))を有する対象におけるSOD1遺伝子発現を阻害するためのsiRNA分子の使用方法も開示される。

10

【背景技術】

【0004】

ルーゲーリック病としても知られる筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、最も致命的な進行性の神経変性疾患であり、一次運動野、脳幹、および脊髄における運動ニューロン(MN)の支配的な喪失を特徴とする。運動ニューロンの喪失は、呼吸などの基本的な基礎運動を崩壊させ、典型的には診断後2~5年以内に患者に死に至らせる。患者の運動機能の進行性悪化は、呼吸能力をひどく低下させるため、患者の生存のために何らかの形の呼吸補助が必要となる。他の症状には、手、腕、脚または嚥下筋肉の筋力低下も含まれる。一部の患者(例えば、FTD-ALS)はまた、前頭側頭型認知症を発症し得る。

20

【0005】

ALS協会によると、米国では毎年約5,600人がALSと診断されている。ALSの発生率は10万人あたり2人であり、常に3万人というアメリカ人がこの疾患に罹患していると推定されている。

【0006】

ALSには2つの形態が示されている: 1つは散発性ALS(sALS)で米国で最も一般的なALS型であり、診断されるすべての症例の90~95%を占める。もう1つは家族性ALS(fALS)であり、これは主に家族間遺伝で、米国内の全症例の約5~10%にすぎない。またsALSとfALSは臨床的に区別できない。

【0007】

病理学的研究では、疾患の発症後にいくつかの細胞プロセスに障害が起きることが見出されており、たとえば、特に運動ニューロン(MN)における、ERストレスの増加、フリーラジカル(すなわち、活性酸素種(ROS))の生成、ミトコンドリア機能障害、タンパク質凝集、アポトーシス、炎症およびグルタミン酸興奮毒性を含む。

30

【0008】

ALSの原因は複雑で異質である。一般に、ALSは、環境曝露と相まって複数の遺伝子が組み合わさり、その人に疾患が起こりやすくなる、複雑な遺伝的疾患であると考えられている。ALSに関連するものとして、SOD-1($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ スーパーオキシドジスムターゼ)、TDP-43(TARDBP、TAR DNA結合タンパク質-43)、FUS(肉腫において融合・転座する)、ANG(アンジオゲニン)、ATXN2(アタキシン-2)、パロシン含有タンパク質(VCP)、OPTN(オブチニューリン)、染色体9における非コード化GGGGCCヘキサヌクレオチド反復の拡大、オープンリーディングフレーム72(C9ORF72)を含む、十数種以上の遺伝子が発見されている。しかし、運動ニューロン変性の正確なメカニズムはまだ分かっていない。

40

【0009】

現在、ALSの治癒的治療法はない。唯一のFDA承認薬はリルゾールであり、これはALSの疾患進行を抑えるためにグルタミン酸応答に拮抗するものである。しかし、早期段階にあるALS患者においての約3ヶ月の寿命延長のみが報告されており、後期段階のALS患者の治療上の利点は認められず、患者の治療選択肢の欠如を示している(非特許文献1)。したがって、疾患の進行を効果的に予防することができる新しい治療戦略が依然として求められている。

50

【0010】

散発性および家族性ALSの両方の潜在的治療法については多くの異なる戦略が研究されている。1つの戦略は、インスリン様成長因子I (IGF-I)、グリア細胞系由来神経栄養因子(GDNF)、血管内皮成長因子(VEGF)、コリベリンおよび活性依存性神経栄養因子(ADNF)由来ペプチドなどの、ニューロン生存を促進することができる神経栄養因子の神経保護および/または再生効果に基づくものである。いくつかの研究は、神経栄養因子が運動ニューロン機能を保存し、それによってSOD1トランスジェニックマウスにおいて運動能力が改善し得ることを示した。しかしながら、そのような治療は、しばしばSOD1マウスの生存を延長させることができず、神経栄養因子がニューロンの生存を延長するのに十分ではないことを示唆している(非特許文献2による評価を参照)。

10

【0011】

ALS治療のもう一つの戦略は、幹細胞に基づく療法に焦点を当てている。幹細胞は運動ニューロンを生成する可能性があり、それによって、ALSにおける退行運動ニューロン、すなわち一次運動皮質、脳幹および脊髄などの罹患したCNSを置換する。人工多能性幹細胞(iPSC)、間葉系間質細胞(MSC)(例えば、骨髄間葉間質細胞(BMSC)と脂肪細胞幹細胞(ASC))及び神経組織起源の神経幹細胞(例えば、胎児脊髄神経幹細胞(NSC)、多分化能神経前駆細胞(NPC))など複数の源から由来する幹細胞が調査されている(例えば、Kim Cらによって評価された非特許文献3)。

20

【0012】

スーパーオキシドジスムターゼI型遺伝子の突然変異(SOD1; Cu^{2+}/Zn^{2+} スーパーオキシドジスムターゼI型)は、fALSの最も一般的な原因で、すべてのfALS症例の約20~30%を占めている。最近の報告では、SOD1突然変異はまた、すべてのsALS症例の約4%に関連している可能性が示されている(非特許文献4)。SOD1関連fALSは、通常SOD1活性の喪失によって引き起こされるのではなく、むしろ毒性機能の増加によって引き起こされる可能性が最も高い。突然変異型SOD1関連fALS毒性の仮説の1つは、異常型SOD1酵素が、ペルオキシ亜硝酸または過酸化水素などの小分子に有害なフリーラジカルを生成させる原因となっていると述べている。突然変異SOD1神経毒性の他の仮説には、プロテアソーム活性の阻害、ミトコンドリア損傷、RNAプロセシングの破壊および細胞内凝集物の形成が含まれる。ALSにおける突然変異型SOD1変異体および/または野生型SOD1の異常な蓄積は、病理学的封入体として同定される不溶性原線維凝集体を形成する。凝集したSOD1タンパク質は、細胞、特に運動ニューロンに対し、ミトコンドリアストレス(非特許文献5)及び他の毒性を誘発し得る。

30

【0013】

これらの知見は、SOD1が家族性および散発性の両方のALSの潜在的な治療標的であることを示している。ALS患者の中枢神経系において産生されるSOD1タンパク質を減少させることができる療法は、運動ニューロン変性、筋肉衰弱および萎縮といったALS患者の症状を改善し得る。野生型および/または変異型SOD1タンパク質凝集の形成を防止することを目的とする薬剤および方法は、疾患の進行を予防し、ALS症状の改善を可能にし得る。RNA干渉(RNAi)媒介遺伝子サイレンシングは、近年研究者の関心を呼んでいる。SOD1遺伝子を標的とする小さな二本鎖RNA(低分子干渉RNA)分子は、ALSの治療におけるそれらの可能性について当該分野で教示されている(例えば、特許文献1および特許文献2を参照。その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】米国特許第7,632,938号明細書

【特許文献2】米国特許公開第20060229268号

50

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Bensimon Gら, J Neurol)。2002, 249, 609-615

【非特許文献2】YacilaおよびSari, Curr Med Chem., 2014, 21(31), 3583-3593

【非特許文献3】Kim Cら, Exp. Neurobiol., 2014, 23(3), 207-214

【非特許文献4】RobberechtおよびPhilip, Nat. Rev. Neurosci., 2013, 14, 248-264

【非特許文献5】Vehvilainen Pら, Front Cell Neurosci., 2014, 8, 126

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、疾患の治療のためのALS患者におけるSOD1の発現を阻害または防止するための、RNA干渉に基づくアプローチを開発する。

本発明は、新規の二本鎖RNA(dsRNA)構築物およびsiRNA構築物ならびにそれらの設計方法を提供する。さらに、これらの新規のsiRNA構築物は、合成分子であってもよく、または細胞への投与のために発現ベクター(一方または両方の鎖)にコードされてもよい。そのようなベクターは、例えばAAV血清型のいずれかのベクターゲノムなどのアデノ関連ウイルスベクター、またはレンチウイルスなどの他のウイルス投与ビヒクルを含むが、これに限定されない。

20

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、遺伝子発現およびタンパク質産生を伴うRNA分子媒介遺伝子特異的干渉に関する。筋萎縮性側索硬化症などの運動ニューロン変性疾患を治療するための方法も、本発明に含まれる。本明細書で扱っている組成物に含まれるsiRNAは、SOD1遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部と実質的に相補的である、30ヌクレオチド以下、概して19-24ヌクレオチドの長さの領域を有するアンチセンス鎖(アンチセンス鎖)を有するdsRNAを包含する。

30

【0018】

本発明は、SOD1発現および/またはSOD1タンパク質産生を妨げるためにSOD1 mRNAを標的とする、低分子干渉RNA(siRNA)二本鎖のような短鎖二本鎖RNA分子を提供する。本発明のsiRNA二本鎖は、SOD1遺伝子のいずれかの特定の突然変異にかかわらずSOD1遺伝子の両方の対立遺伝子を阻害し得、特にALS疾患に見られるものと相互作用し得る。

【0019】

いくつかの実施形態では、そのようなsiRNA分子、またはsiRNA分子の一本鎖は、アデノ随伴ウイルスベクターに挿入され、細胞、特に運動ニューロンおよび/または中枢神経系の他の周囲細胞内に入れる。

40

【0020】

本発明のsiRNA二本鎖は、二本鎖構造を形成するようにハイブリダイズしたアンチセンス鎖およびセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は標的SOD1遺伝子の核酸配列に相補的であり、センス鎖は核酸に対して相同である標的SOD1遺伝子の配列である。いくつかの態様では、アンチセンス鎖の5'末端は5'ホスフェート基を有し、センス鎖の3'末端は3'ヒドロキシル基を含む。他の態様において、各鎖の3'末端には、ヌクレオチドオーバーハングは存在しないか、1つまたは2つ存在する。

【0021】

本発明によれば、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖の各鎖は、長さが約1

50

9 - 25ヌクレオチド、好ましくは約19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、または25ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、siRNAは非修飾RNA分子であってもよい。

【0022】

他の態様では、siRNAは、塩基、糖または主鎖修飾のような少なくとも1つの修飾されたヌクレオチドを含み得る。

一実施形態では、siRNAまたはdsRNAは、互いに相補的である少なくとも2つの配列を含む。dsRNAは、第1の配列を有するセンス鎖および第2の配列を有するアンチセンス鎖を含む。アンチセンス鎖は、SOD1をコードするmRNAの少なくとも一部に実質的に相補的なヌクレオチド配列を含み、その相補性領域は30ヌクレオチド以下、且つ少なくとも15ヌクレオチドの長さである。一般的に、dsRNAは19~24ヌクレオチド、例えば19~21ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、dsRNAは長さが約15~約25ヌクレオチドであり、他の実施形態ではdsRNAは長さが約25から30ヌクレオチドである。

【0023】

dsRNAは、SOD1を発現する細胞と接触するか、またはSOD1を発現する細胞内で転写すると、例えば本明細書に記載の方法によってアッセイした場合に、SOD1遺伝子の発現を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%または少なくとも40%またはそれ以上を阻害または抑制する。

【0024】

本発明によれば、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖、siRNA二本鎖の一本鎖、またはdsRNAをコードする核酸を含むAAVベクターが産生され、そのAAVベクター血清型はAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8および/またはAAV-DJ、およびそのバリエーションである。

【0025】

本発明によれば、ALSにおけるSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはdsRNAは、表3, 11または13に列挙されるsiRNA二本鎖から選択される。好ましくは、ALSにおけるSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはdsRNAは、以下のsiRNA二本鎖から成る群：D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823及びD-2858から選択される。

【0026】

本発明はまた、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二本鎖および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。いくつかの態様において、siRNA二本鎖をコードする核酸配列は、AAVベクターに挿入される。

【0027】

いくつかの実施形態において、本発明は、細胞におけるSOD1遺伝子発現を阻害/サイレンシングするための方法を提供する。したがって、siRNA二本鎖またはdsRNAを使用して、細胞、特に運動ニューロンにおけるSOD1遺伝子発現を実質的に阻害することができる。いくつかの態様では、SOD1遺伝子発現の阻害は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%の阻害である。したがって、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、および100%阻害され得る。SOD1遺伝子は、野生型遺伝子または少なくとも1つの変異を有する変異型SOD1遺伝子のいずれであっても良い。したがって、SOD1タンパク質は、野生型タンパク質または少なくとも1つの変異を有する突然変異ポリペプチドのいずれかである。

【0028】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療を必要とする対象に、異常SOD1遺伝子および/またはSOD1タンパク質に関連する筋萎縮性側索硬化症を治療または改善する方法を提供するものであり、当該方法は、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二本鎖の薬学的に有効な量を対象に投与すること、前記siRNA二本鎖を標的細胞に送達すること、SOD1遺伝子発現およびタンパク質産生を阻害すること、対象におけるALSの症状を改善することを含む。

【0029】

いくつかの実施形態において、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二本鎖をコードする核酸配列を含むAAVベクターは、ALSを治療および/または改善する必要がある対象に投与される。AAVベクターの血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10およびAAV-DJおよびその変異体からなる群から選択され得る。

10

【0030】

いくつかの態様において、ALSはSOD1突然変異に関連する家族性ALSである。他の態様において、ALSは、必ずしも遺伝的突然変異の結果としてではないが、SOD1タンパク質の異常な凝集またはSOD1タンパク質の機能または局在の破壊によって特徴付けられる散発性ALSである。本方法によって改善されるALSの症状には、運動ニューロンの変性、筋肉の衰弱、筋肉の硬直、痙攣発作および/または呼吸困難が含まれる。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはdsRNAまたはそのようなsiRNAコード分子を含むAAVベクターは、例えば頭蓋内注射によって、対象の中樞神経系に直接導入することができる。

【0032】

いくつかの実施形態において、本発明の医薬組成物は、単独療法として使用される。他の実施形態では、本発明の医薬組成物は併用療法に使用される。併用療法は、運動ニューロン変性に対する神経保護効果について試験された小分子化合物、成長因子およびホルモンなどの1つまたは複数の神経保護剤と組み合わせてもよい。

30

【0033】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載する、治療上有効な量のプラスミドまたはAAVベクターを、それを必要とする対象に投与することによって筋萎縮性側索硬化症を治療または改善する方法を提供する。ALSは、家族性ALSまたは散発性ALSであり得る。

【0034】

本発明の前述及び他の目的、特徴および利点は、添付の図面に示されるように、本発明の特定の実施形態の以下の説明から明らかにする。添付の図面では、記載されている類似の参照符号が、異なる視点を通して同じ部分を表している。図面は必ずしも縮尺通りではなく、本発明の様々な実施形態の原理を例示することに重点を置いている。

40

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】AAVベクターにコードされた構築物の活性を示すヒストグラムである。

【図2】HEK293T細胞におけるAAVベクターにコードされた調節ポリヌクレオチドのガイド鎖の活性を示すヒストグラムである。

【図3】HEK293T細胞におけるAAVベクターにコードされた調節ポリヌクレオチドのパッセンジャー鎖の活性を示すヒストグラムである。

【図4】HeLa細胞におけるAAVベクターにコードされた調節ポリヌクレオチドのガイド鎖の活性を示すヒストグラムである。

【図5】HeLa細胞におけるAAVベクターにコードされた調節ポリヌクレオチドのパ

50

ッセンジャー鎖の活性を示すヒストグラムである。

【図 6】細胞内 A A V D N A のヒストグラムである。

【図 7】ヒト運動ニューロンにおける A A V ベクターにコードされた構築物の活性を示すヒストグラムである。

【図 8】U 2 5 1 M G 細胞における S O D 1 の用量依存的サイレンシングを示すチャートである。

【図 9】ヒト星状細胞における S O D 1 の用量依存的サイレンシングを示すチャートである。

【図 1 0】U 2 5 1 M G 細胞における S O D 1 のサイレンシングの経時変化を示すチャートである。

【図 1 1 A】構築物の用量依存性効果を示すチャートであって、相対 S O D 1 発現を示す。

【図 1 1 B】構築物の用量依存性効果を示すチャートであって、ガイド鎖のパーセントを示す。

【図 1 1 C】構築物の用量依存性効果を示すチャートであって、パッセンジャー鎖のパーセントを示す。

【図 1 2】I T R、イントロン (I) 及びポリ A (P) に対する調節ポリヌクレオチド (M P) の位置を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 6】

本発明は、調節ポリヌクレオチド、例えば、治療剤としての R N A または D N A 分子に関する。R N A 干渉媒介遺伝子サイレンシングは、標的とする遺伝子の発現を特異的に阻害することができる。次いで、本発明は、S O D 1 遺伝子を標的とする小さな二本鎖 R N A (d s R N A) 分子 (低分子干渉 R N A、s i R N A)、そのような s i R N A を含む医薬組成物、およびそれらの設計方法を提供する。本発明はまた、神経変性疾患、特に筋萎縮性側索硬化症 (A L S) を治療するための S O D 1 遺伝子発現およびタンパク質産生を阻害するためのそれらの使用方法を提供する。

【 0 0 3 7】

本発明は、S O D 1 m R N A 発現および / または S O D 1 タンパク質産生を妨げるために、S O D 1 m R N A を標的とする低分子干渉 R N A (s i R N A) 二本鎖 (およびそれらをコードする調節ポリヌクレオチド) を提供する。本発明の s i R N A 二本鎖は、S O D 1 遺伝子のいずれかの特定の突然変異にかかわらず S O D 1 遺伝子の両方の対立遺伝子を阻害し得、特に A L S 疾患に見られるものと相互作用し得る。

【 0 0 3 8】

いくつかの実施形態では、そのような s i R N A 分子または s i R N A 分子の一本鎖をコードする核酸配列をアデノ随伴ウイルスベクターに挿入し、細胞、特に運動ニューロンおよび / または中枢神経系の他の周辺細胞に導入する。

【 0 0 3 9】

本発明の、コードされた s i R N A 二本鎖は、二本鎖構造を形成するように互いにハイブリダイズしたアンチセンス鎖およびセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が標的 S O D 1 遺伝子の核酸配列に相補的であり、またセンス鎖が標的 S O D 1 遺伝子の核酸配列と相同である。いくつかの態様では、アンチセンス鎖の 5 ' 末端は 5 ' ホスフェート基を有し、センス鎖の 3 ' 末端は 3 ' ヒドロキシル基を含む。他の態様において、各鎖の 3 ' 末端には、ヌクレオチドオーバーハングは存在しないか、1 つまたは 2 つ存在する。

【 0 0 4 0】

本発明によれば、S O D 1 遺伝子を標的とする s i R N A 二本鎖の各鎖は、長さが約 1 9 - 2 5、1 9 - 2 4 または 1 9 - 2 1 ヌクレオチド、好ましくは約 1 9 ヌクレオチド、2 0 ヌクレオチド、2 1 ヌクレオチド、2 2 ヌクレオチド、2 3 ヌクレオチド、2 4 ヌクレオチド、または 2 5 ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、s i R N A は非修飾 R N A 分子であってもよい。

10

20

30

40

50

【0041】

他の態様では、s i R N A は、塩基、糖または主鎖修飾のような少なくとも1つの修飾されたヌクレオチドを含み得る。

一実施形態では、s i R N A または d s R N A は、互いに相補的である少なくとも2つの配列を含む。d s R N A は、第1の配列を有するセンス鎖および第2の配列を有するアンチセンス鎖を含む。アンチセンス鎖は、S O D 1 をコードする m R N A の少なくとも一部に実質的に相補的なヌクレオチド配列を含み、その相補性領域は30ヌクレオチド以下、また少なくとも15ヌクレオチドの長さである。一般的に、d s R N A は、19~25、19~24または19~21ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、d s R N A は長さが約15~約25ヌクレオチドであり、他の実施形態では d s R N A は長さが約25から30ヌクレオチドである。

10

【0042】

本明細書に記載の方法でアッセイした場合に、d s R N A は、直接投与された場合であっても、発現ベクター内にコードされている場合であっても、S O D 1 を発現している細胞と接触すると、S O D 1 の発現の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、または40%以上を阻害する。

【0043】

本明細書で扱っている組成物に含まれる s i R N A 分子は、30ヌクレオチド以下、一般的には19-25、19-24または19-21ヌクレオチドの長さを有するアンチセンス鎖（当該アンチセンス鎖）を有する d s R N A を含み、これは、S O D 1 遺伝子の m R N A 転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である。

20

【0044】

本発明によれば、S O D 1 遺伝子を標的とする s i R N A 二本鎖の核酸、s i R N A 二本鎖の一本鎖または d s R N A を含む A A V ベクターが産生され、その A A V ベクター血清型は A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 9、A A V 9 (h u 1 4)、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V r h 8、A A V r h 1 0、A A V - D J 8 および A A V - D J、およびそれらの変異体であり得る。

【0045】

本発明によれば、A L S における S O D 1 遺伝子を標的とする s i R N A 二本鎖またはコードされた d s R N A は、表3に列挙される s i R N A 二本鎖から選択される。いくつかの実施形態では、A L S における S O D 1 遺伝子を標的とする s i R N A 二本鎖または d s R N A は、以下のような s i R N A 二本鎖から成る群：D - 2 7 5 7、D - 2 8 0 6、D - 2 8 6 0、D - 2 8 6 1、D - 2 8 7 5、D - 2 8 7 1、D - 2 7 5 8、D - 2 7 5 9、D - 2 8 6 6、D - 2 8 7 0、D - 2 8 2 3 及び D - 2 8 5 8 から選択される。

30

【0046】

本発明はまた、S O D 1 遺伝子を標的とする少なくとも1つの s i R N A 二本鎖および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。いくつかの態様においては、s i R N A 二本鎖は A A V ベクターによってコードされる。

【0047】

いくつかの実施形態において、本発明は、細胞における S O D 1 遺伝子発現を阻害 / サイレンシングするための方法を提供する。このようにして、s i R N A 二本鎖またはコードされた d s R N A を用いて、細胞、特に運動ニューロンにおける S O D 1 遺伝子発現を実質的に阻害することができる。いくつかの態様では、S O D 1 遺伝子発現の阻害とは、少なくとも約20%、例えば少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、

40

50

00%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100%または95～100%の阻害を意味する。したがって、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%、または少なくとも20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～100%、30～40%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100%または95～100%で阻害される。SOD1遺伝子は、野生型遺伝子または少なくとも1つの変異を有する変異型SOD1遺伝子のどちらかであってよい。したがって、SOD1タンパク質は、野生型タンパク質または少なくとも1つの変異を有する突然変異ポリペプチドのいずれかである。

10

【0048】

一実施形態では、siRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、SOD1タンパク質の発現を少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%、または少なくとも20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～100%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100%または95～100%減少させるために使用される。非限定的な例として、SOD1タンパク質発現の発現を50～90%低下させることができる。

20

30

【0049】

一実施形態では、siRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、SOD1 mRNAの発現を少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%、または少なくとも20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～100%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100%または95～100%減少させるために使用される。非限定的な例として、SOD1 mRNA発現の発現を、50～90%低下させることができる。

40

【0050】

一実施形態では、siRNA二本鎖またはコードされたdsRNAを使用して、CNSの少なくとも1つの領域、例えば、脊髄、前脳、中脳、または後脳のSOD1タンパク質および/またはmRNAの発現を低下させることができる。SOD1タンパク質および/またはmRNAの発現は、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%、20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～

50

100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100%または95~100%のCNS範囲で減少させることができる。非限定的な例として、脊髄におけるSOD1タンパク質およびmRNAの発現は、50~90%減少する。

【0051】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療を必要とする対象における異常SOD1遺伝子および/またはSOD1タンパク質に関連する筋萎縮性側索硬化症を治療または改善する方法を提供しており、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二本鎖またはsiRNA二本鎖をコードする核酸の薬学的有効量を対象に投与し、前記siRNA二本鎖（またはコードされた二本鎖）を標的細胞に送達し、SOD1遺伝子発現およびタンパク質産生を阻害し、対象におけるALSの症状を改善する。

【0052】

いくつかの実施形態において、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二本鎖の核酸配列を含むAAVベクターは、ALSを治療および/または改善する必要がある対象に投与される。AAVベクターの血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8(AAVDJ8)およびAAV-DJ(AAVDJ)、およびその変異体から成る群から選択される。一実施形態では、AAVベクター血清型はAAV2である。別の実施形態では、AAVベクターはAAVDJである。さらに別の実施形態では、AAVベクター血清型はAAVDJ8である。

【0053】

一実施形態において、本発明において有用であり得る血清型は、AAV-DJ8であり得る。AAV-DJ8のアミノ酸配列は、ヘパリン結合ドメイン(HBD)を除去するために、2つまたはそれ以上の突然変異を含んでよい。非限定的な例として、その全体が参照により本発明に組み込まれている内容である、米国特許第7,588,772号で配列番号1として記載されるAAV-DJには、以下の2つの突然変異が含まれる：(1)アミノ酸587のアルギニン(R; arg)がグルタミン(Q; Glu)に変化したR587Qと、(2)アミノ酸590のアルギニン(R; Arg)がスレオニン(T; Thr)に変化したR590T。別の非限定的な一例として、当該AAV-DJ配列は、以下に示す3つの突然変異を含んでよい：(1)アミノ酸406のリシン(K; Lys)がアルギニン(R; Arg)に変化したK406R、(2)アミノ酸587のアルギニン(R; Arg)がグルタミン(Q; Glu)に変化したR587Q、(3)アミノ酸590のアルギニン(R; Arg)がスレオニン(T; Thr)に変化したR590T。

【0054】

いくつかの態様において、ALSはSOD1突然変異に関連する家族性ALSである。他の態様において、ALSは、SOD1タンパク質の異常凝集またはSOD1タンパク質機能および局在における異常を特徴とする散発性ALSである。本方法によって改善されるALSの症状は、運動ニューロンの変性、筋力低下、筋肉の硬直、不明瞭な発語および/または呼吸困難を含み得るが、これらに限定されない。

【0055】

いくつかの実施形態では、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAまたはそのようなsiRNA分子を含むAAVベクターは、例えば頭蓋内注射によって、対象の中樞神経系に直接導入することができる。

【0056】

いくつかの実施形態において、本発明の医薬組成物は、単独療法として使用される。他の実施形態では、本発明の医薬組成物は併用療法に使用される。併用療法は、運動ニューロン変性に対する神経保護効果について試験された小分子化合物、成長因子およびホルモンなどの1つまたは複数の神経保護剤と組み合わせてもよい。

【0057】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載する、治療上有効な量のプラスミドまたはAAVベクターを、それを必要とする対象に投与することによって筋萎縮性側索硬化症を治療または改善する方法を提供する。ALSは、家族性ALSまたは散発性ALSであり得る。

【0058】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、以下の添付の説明に記載する。本明細書に記載しているものと類似または同等の任意の材料および方法を本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい材料および方法を以下に記載する。本発明の他の特徴、目的及び利点は、明細書から明らかになる。本明細書において、単数形はまた、文脈が明確に別途指示しない限り、複数形も含む。他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明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ものと同じ意味を有する。矛盾する場合には、本説明が制御する。

【0059】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)

成人発症の神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動皮質、脳幹および脊髄における運動ニューロンの選択的死によって特徴付けられる進行性および致命的な疾患である。ALSの発生率は、100,000人に約1.9人である。ALSと診断された患者は、痙性、反射亢進または反射減弱、線維束性収縮、筋萎縮および麻痺によって特徴付けられる進行性の筋肉表現型を発現する。これらの運動障害は、運動ニューロンの喪失による筋肉の衰弱によって引き起こされる。ALSの主要な病理学的特徴には、皮質脊髄路の変性および下位運動ニューロン (LMN) または前角細胞の広範な喪失 (Ghatkaj Neuropathol Exp Neurol 1986, 45, 385-395)、一次運動野におけるベッツ (Betz) 細胞および他の錐体細胞の変性および消失 (Udaka Acta Neuropathol 1986, 70, 289-295、Maekawa Brain 2004, 127, 1237-1251)、運動皮質および脊髄における反応性神経膠症 (Kawamata Am J Pathol 1992, 140, 691-707; および Schiffer J Neurol Sci. 1996, 139, 27-33) が含まれる。ALSは、呼吸障害および/または炎症のため、通常は診断後3~5年以内に致死性である (Rowland LP および Shneider NA, N Engl J Med., 2001, 344, 1688-1700)。

【0060】

ALSの細胞の特徴は、変性運動ニューロンおよび周囲の細胞 (例えば、星状細胞) 内のタンパク質性のユビキチン化された細胞質封入体の存在である。ユビキチン化封入体 (すなわち、レヴィー体様封入体またはスケイン (Skein) 様封入体) は、ALSにおける最も一般的かつ特定の種類の封入体であり、脊髄および脳幹のLMNおよび皮質脊髄の上位運動ニューロン (UMN) に見出される (Matsumoto, J Neurol Sci, 1993, 115, 208-213; および Sasaki および Maruyama, Acta Neuropathol, 1994, 87, 578-585)。いくつかのタンパク質は、ユビキチン、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ1 (SOD1)、ペリフェリンおよびドルフィンを含む、封入体の成分であることが確認されている。ニューロフィラメント封入体は、ALSの脊髄運動ニューロンにおける硝子体積塊 (HCI) および軸索の「スフェロイド」においてしばしば見出される。他の種類およびあまり特異的でない封入体には、皮質の上層におけるブニナ小体 (Bunina body) (シスタチンC含有封入体) および三日月形封入体 (SCI) が挙げられる。ALSに見られる他の神経病理学的特徴としては、ゴルジ装置の断片化、ミトコンドリア空胞化およびシ

10

20

30

40

50

ナブス末端の超微細構造異常が挙げられる (Fujita et al., Acta Neuropathol. 2002, 103, 243-247)。

【0061】

加えて、前頭側頭型認知症では、FTD-ALS患者において認知障害を引き起こす可能性のあるALS (FTD-ALS) 皮質萎縮 (前頭葉および側頭葉を含む) も観察される。

【0062】

ALSは複雑で多因子性の疾患であり、ALSの病因に関与すると仮定された複数のメカニズムには、タンパク質分解障害、グルタミン酸興奮毒性、ミトコンドリア機能障害、アポトーシス、酸化ストレス、炎症、タンパク質ミスフォールディングおよび凝集、異常なRNA代謝、および変化した遺伝子発現が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0063】

ALS症例の約10%~15%がこの疾患の家族歴を有しており、これらの患者は家族性ALS (fALS) または遺伝性の患者と呼ばれ、一般にメンデルの支配的な遺伝様式および高い浸透度を有する。報告されている家族歴に関連していない残りの患者 (約85%~95%) は散发性ALS (sALS) として分類されるが、その代わりに、環境因子、遺伝子多型、体細胞突然変異、およびおそらくは遺伝子-環境相互作用を含むがそれらに限定されない他の危険因子に起因すると考えられる。ほとんどの場合、家族性 (または遺伝性) ALSは常染色体優性疾患として遺伝するが、常染色体劣性およびX連鎖遺伝および不完全浸透性の家系が存在する。散发性および家族性の形態は臨床的に区別できず、共通の病因を示唆している。ALSにおける運動ニューロンの選択的死の正確な原因は依然として分かっていない。fALSにおける遺伝的要因の理解の進歩が、この疾患の両方の形態を明らかにする可能性がある。

20

【0064】

近年、ALSの遺伝的原因の爆発は、fALSを引き起こすことが知られている10以上の異なる遺伝子において突然変異を発見した。最も一般的なものは、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ1をコードする遺伝子 (SOD1; 約20%) (Rosen DR et al., Nature, 1993, 362, 59-62)、肉腫に融合/脂肪肉腫に転換される (FUS/TLS; 1-5%) とTDP-43 (TARDBP; 1-5%) である。近年、C9orf72遺伝子におけるヘキサヌクレオチド反復の拡大が (GGGGCC)_n、西洋人口におけるfALS (約40%) の最も頻繁な原因として特定された (Renton et al., Nat.によるレビュー、Neurosci., 2014, 17, 17-23)。LSで変異した他の遺伝子には、アルシン (ALS2)、セナタキシン (SETX)、小胞関連膜タンパク質 (VAPB) およびアンギオゲニン (ANG) が含まれる。fALS遺伝子は異なる細胞機構を制御し、ALSの病因が複雑であり、運動ニューロン変性に最終的には至るいくつかの異なるプロセスに関連している可能性があることを示唆している。

30

【0065】

SOD1は、哺乳動物において同定され特徴付けられた以下の3つのヒトスーパーオキシドジスムターゼの1つである: 銅-亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (Cu/Zn SODまたはSOD1)、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn SODまたはSOD2)、および細胞外スーパーオキシドジスムターゼ (EC SODまたはSOD3)。SOD1は、ヒト染色体21上のSOD1遺伝子によってコードされるサブユニット当たり1つの銅結合部位および1つの亜鉛結合部位を有する153残基ポリペプチドの32 kDaホモダイマーである (GeneBank アクセスNo.: NM_000454.4) (表2を参照)。SOD1は、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot -}$) と分子酸素 (O_2) と過酸化水素 (H_2O_2) の反応を触媒する。SOD1の細胞内濃度は高く (10~100 μM の範囲)、中枢神経系 (CNS) 中の全タンパク質含量の1%を占める。このタンパク質は、細胞質だけでなく、真核細胞の核、リソソーム、ペルオキシソームおよびミトコンドリアの膜間隙に局在する (Lindenau J et al., Glia, 2

40

50

000, 29, 25 - 34)。

【0066】

SOD1 遺伝子の突然変異は、fALS 患者の15～20%およびすべてのALS 症例の1～2%に保持される。現在、153アミノ酸SOD1ポリペプチド全体に分布する少なくとも170の異なる突然変異がALSを引き起こすことが判明しており、ALSオンライン遺伝データベースで更新リストがある(ALSOD) (Wroe Ret al., Amyotroph Lateral Scler., 2008, 9, 249 - 250)。表1は、ALSにおけるSOD1の変異のいくつかの例を列挙する。これらの突然変異は、欠失、挿入およびC末端切断も起こるが、主として単一のアミノ酸置換(すなわちミスセンス突然変異)である。異なるSOD1突然変異は、異なる地理的分布パターンを示す。例えば、SOD1遺伝子突然変異によって引き起こされるALSを有するすべてのアメリカ人の40～50%は、特定の突然変異Ala4Val(またはA4V)を有する。A4V突然変異は、典型的にはより重篤な徴候および症状と関連し、余命期間は通常2～3年である。I113T突然変異は、イギリスで最も一般的な突然変異である。ヨーロッパで最も一般的な突然変異はD90A置換であり、生存期間は通常10年以上である。

10

【0067】

【表1】

表1. ALSにおけるSOD1変異の例

20

位置	変異
エクソン1 (220bp)	Q22L; E21K,G; F20C;N19S; G16A,S; V14M,S; G12R; G10G,V,R; L8Q,V; V7E; C6G,F; V5L; A4T,V,S
エクソン2 (97bp)	T54R; E49K; H48R,Q; V47F,A; H46R; F45C; H43R; G41S,D; G37R; V29,insA
エクソン3 (70bp)	D76Y,V; G72S,C; L67R; P66A; N65S; S59I,S
エクソン4 (118bp)	D124G,V; V118L,InsAAAAC; L117V; T116T; R115G; G114A; I113T,F; I112M,T; G108V; L106V,F; S106L,delTCACTC; I104F; D101G,Y,H,N; E100G,K; I99V; V97L,M; D96N,V; A95T,V; G93S,V,A,C,R,D; D90V,A; A89T,V; T88delACTGCTGAC; V87A,M; N86I,S,D,K; G85R,S; L84V,F; H80R
エクソン5 (461bp)	I151T,S; I149T; V148I,G; G147D,R; C146R, 停止; A145T,G; L144F,S; G141E,停止; A140A,G; N139D,K,H,N; G138E; T137R; S134N; E133V,delGAA,insTT; E132insTT; G127R,InsTGGG; L126S,delITT,停止; D126,delTT

30

40

SOD1 遺伝子欠損に関連するニューロン死のメカニズムを調べるために、ミスセンス変異、小さな欠失または挿入を含む異なる変異を有するヒトSOD1遺伝子を発現するSOD1関連ALSのいくつかのげっ歯動物モデルが当該分野で開発された。ALSマウスモデルの非限定的な例には、SOD1^{G93A}、SOD1^{A4V}、SOD1^{G37R}、SOD1^{G85R}、SOD1^{D90A}、SOD1^{L84V}、SOD1^{I113T}、SOD1

50

H 3 6 R / H 4 8 Q、S O D 1 G 1 2 7 X、S O D 1 L 1 2 6 X および S O D 1 L 1 2 6 d e l T T が含まれる。2つの異なるヒト S O D 1 突然変異を有する、以下の2つのトランスジェニックラットモデルが存在する：S O D 1 H 4 6 R および S O D 1 G 9 3 R。これらのげっ歯動物 A L S モデルは、ヒト A L S 患者に類似した筋力低下と、ヒト疾患のいくつかの特徴、特に脊髄運動ニューロンの選択的死、運動ニューロンにおけるタンパク質封入体の凝集およびミクログリア活性化、を反映する他の病原性特徴とを発症し得る。トランスジェニックげっ歯動物は、ヒト S O D 1 関連 A L S 疾患の良いモデルであり、疾患病因の研究および疾患治療の開発のためのモデルを提供することが当技術分野でよく知られている。

【0068】

動物および細胞モデルにおける研究は、S O D 1 病原性変異体が機能獲得によって A L S を引き起こすことを示した。すなわち、スーパーオキシドジスムターゼ酵素は、S O D 1 突然変異によって改変された場合、新規であるが有害な特性を得る。例えば、A L S 中のいくつかの S O D 1 突然変異体は、酸化還元サイクルを破壊することによって、酸化ストレスを増加させる（例えば、毒性スーパーオキシドラジカルの蓄積の増加）。他の研究はまた、A L S におけるいくつかの S O D 1 突然変異体が、正常な生理機能とは無関係の毒性特性を得る可能性があることも示している（ミスフォールド S O D 1 変異体の異常凝集など）。異常なレドックス化学モデルでは、突然変異体 S O D 1 は不安定であり、異常な化学反応により、非活性基質と相互作用し、活性酸素種（R O S）の過剰産生を引き起こす。タンパク質毒性モデルでは、不安定でミスフォールドされた S O D 1 が細胞質封入体に凝集し、細胞プロセスにとって重要なタンパク質を封鎖する。これらの2つの仮説は互いに排他的ではない。活性部位の金属に結合する選択されたヒスチジン残基の酸化が S O D 1 凝集を媒介することが示されている。

【0069】

凝集した変異型 S O D 1 タンパク質はまた、ミトコンドリア機能不全（V e h v i l a i n e n P e t a l . , F r o n t C e l l N e u r o s c i . , 2 0 1 4 , 8 , 1 2 6）、軸索輸送の障害、異常な R N A 代謝、グリア細胞病理およびグルタミン酸興奮毒性を誘発し得る。いくつかの散发性 A L S 症例では、ミスフォールドされた野生型 S O D 1 タンパク質は、家族性 A L S 結合 S O D 1 変異体で見られるものと同様の「毒性コンフォメーション」を形成する病的運動ニューロンに見出されている（R o t u n n o M S a n d B o s c o D A , F r o n t C e l l N e u r o s c i . , 2 0 1 3 , 1 6 , 7 , 2 5 3）。このような証拠は、A L S が、アルツハイマー病およびパーキンソン病などの他の神経変性疾患に類似したタンパク質折りたたみ疾患であることを示唆している。

【0070】

現在、A L S に罹患している患者に治癒的治療法はない。グルタミン酸放出の阻害薬である F D A 認可リルゾール（R i l u z o l e）のみが A L S に対して中等度の効果を示しており、18ヶ月間の服用で2～3カ月のみ生存期間が延長される。残念なことに、リルゾールを服用している患者に、疾患の進行を遅らせるまたは筋肉機能が改善することはない。したがって、リルゾールは治癒的、または効果的な治療法ではない。研究者はより良い治療薬を探し続けている。

【0071】

S O D 1 凝集を予防または改善し得る治療アプローチは過去に試験されている。例えば、ヒドロキシルアミン誘導体であるアリモクロモールは、これらの凝集体に対する細胞の防御機構である熱ショックタンパク質を標的とする薬である。研究は、S O D 1 マウスモデルにおいて、アリモクロモールによる治療が筋肉機能を改善することを実証した。A L S にみられる1つまたは複数の細胞性障害を標的とする他の薬剤には、運動ニューロンに対するグルタミン酸誘発興奮毒性を低下させる可能性のある、タルバパネルなどの A M P A アнтаゴニスト、 β -ラクタム系抗生物質；酸化的に誘発される運動ニューロン死を阻害し得るプロモクリプチン（例えば、米国特許公開第 2 0 1 1 0 1 0 5 5 1 7 号；その内

10

20

30

40

50

容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)；SOD1遺伝子発現を低下させる1,3-ジフェニル尿素誘導体またはマルチキナーゼ阻害剤(例えば、米国特許公報第20130225642号；その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)；ミトコンドリアにおける酸化反応を改善することができるドーパミンアゴニストプラミベキソールおよびその鏡像異性体デクスプラミベキソール；シクロオキシゲナーゼ酵素を阻害するニメスリド(例えば、米国特許公開第20060041022号；その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)；フリーラジカルスカベンジャーとして作用する薬剤(例えば、米国特許第6,933,310号およびPCT特許公開番号：WO2006075434；これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)が含まれる。

10

【0072】

異常なSOD1タンパク質凝集を阻害するための別のアプローチは、ALSにおけるSOD1遺伝子発現をサイレンシング/阻害することである。突然変異した対立遺伝子の特定の遺伝子サイレンシングのための低分子干渉RNAは、fALSの治療に治療的に有益であることが報告されている(例えばRalph GS et al., Nat. Medicine, 2005, 11(4), 429-433；およびRaoul C et al., Nat. Medicine, 2005, 11(4), 423-428；およびMaxwell MM et al., PNAS, 2004, 101(9), 3178-3183；and Ding H et al., Chinese Medical J., 2011, 124(1), 106-110；およびScharz DS et al., Plos Genet., 2006, 2(9), e140；これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

20

【0073】

SOD1遺伝子を標的とし、ALSにおけるSOD1発現を調節する多くの他のRNA治療剤は、当技術分野で教示されている。このようなRNAに基づく薬剤には、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび二本鎖低分子干渉RNAが含まれる。例えば、Wang H et al., J Biol. Chem., 2008, 283(23), 15845-15852)；米国特許第7,498,316；第7,632,938；第7,678,895；第7,951,784；第7,977,314；第8,183,219；第8,309,533；及び第8,586,554号明細書；並びに米国特許公開第2006/0229268号および米国特許公開第2011/0263680号を参照；これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0074】

本発明は、調節性ポリヌクレオチド、例えばSOD1遺伝子を標的とするsiRNA分子、およびそれらの設計および製造方法を提供する。特に、本発明は、本発明のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターなどのウイルスベクターを使用する。本発明のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むAAVベクターは、運動ニューロンへの活性剤の投与を増加させることができる。SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードするdsRNAは、細胞内のSOD1遺伝子発現(例えば、mRNAレベル)を有意に阻害することができる；したがって、タンパク質の凝集および封入体の形成、フリーラジカルの増加、ミトコンドリアの機能不全およびRNA代謝のような細胞内のSOD1発現誘導性ストレスを改善する。

40

【0075】

このようなsiRNA媒介性SOD1発現阻害は、ALSの治療に使用することができる。本発明によれば、患者におけるALSを治療および/または改善する方法は、本発明のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むAAVベクターの有効量を細胞内に投与することを含む。このような核酸配列のAAVベクターの投与は、SOD1遺伝子発現の阻害/サイレンシングを引き起こすsiRNA分子をコードする。

【0076】

一実施形態では、調節ポリヌクレオチドをコードするベクター、例えばAAVは、対象

50

における変異体 S O D 1 の発現を低下させる。突然変異体 S O D 1 の減少は、酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全、軸索輸送の障害、異常な R N A 代謝、グリア細胞病理および/またはグルタミン酸興奮毒性などを含むがこれら限定されない毒性の機構を引き起こす可能性がある毒性凝集体の形成を減少させることもできる。

【 0 0 7 7 】

一実施形態では、ベクター、例えば A A V ベクターは、それを必要とする対象における S O D 1 の量を減少させ、したがって、本明細書に記載の治療上の利点を提供する。

本発明の組成物

s i R N A 分子

本発明は、神経変性疾患を治療するための遺伝子発現の R N A 干渉 (R N A i) 誘発阻害に関する。本明細書において、S O D 1 遺伝子を標的とする s i R N A 二本鎖またはコードされた d s R N A が提供される (本明細書では集合的に「s i R N A 分子」と呼ぶ) 。このような s i R N A 二本鎖またはコードされた d s R N A は、例えば運動ニューロンなどの細胞内の S O D 1 遺伝子発現を減少またはサイレンシングさせることができ、それによって運動ニューロン死および筋肉萎縮などの A L S の症状を改善する。

10

【 0 0 7 8 】

R N A i (転写後遺伝子サイレンシング (P T G S) 、クエリング、または共抑制としても知られている) は、R N A 分子が配列特異的様式で、典型的には特定の m R N A 分子の破壊を引き起こすことによって遺伝子発現を阻害する転写後遺伝子サイレンシングプロセスである。R N A i の活性成分は、典型的には 1 5 ~ 3 0 ヌクレオチドを含む低分子干渉 R N A (s i R N A) と呼ばれる短い / 小さい二本鎖 R N A (d s R N A) (例えば、1 9 から 2 5 、 1 9 から 2 4 または 1 9 - 2 1 ヌクレオチド) および 2 ヌクレオチド 3 ' オーバーハングであり、標的遺伝子の核酸配列と一致する。これらの短い R N A 種は、より大きな d s R N A のダイサー仲介切断によって i n v i v o で自然に産生され得、哺乳動物細胞において機能的である。

20

【 0 0 7 9 】

マイクロ R N A (m i R N A) と名付けられた自然に発現した小さな R N A 分子は、m R N A の発現を調節することによって遺伝子サイレンシングを誘発する。R N A 誘導サイレンシング複合体 (R I S C) を含む m i R N A は、シード領域と呼ばれる m i R N A の 5 ' 領域のヌクレオチド 2 - 7 および他の塩基対とその 3 ' 領域で完全な配列相補性を示す m R N A を標的とする。m i R N A が媒介する遺伝子発現のダウンレギュレーションは、標的 m R N A の切断、標的 m R N A の翻訳阻害、または m R N A 崩壊によって引き起こされ得る。m i R N A 標的配列は、通常、標的 m R N A の 3 ' - U T R に位置する。単一の m i R N A は、様々な遺伝子からの 1 0 0 を超える転写物を標的とすることができ、1 つの m R N A は、異なる m i R N A によって標的とされ得る。

30

【 0 0 8 0 】

特定の m R N A を標的とする s i R N A 二本鎖または d s R N A を i n v i t r o で設計および合成し、R N A i プロセスを活性化するために細胞に導入することができる。E l b a s h i r らは、2 1 ヌクレオチドの s i R N A 二本鎖 (低分子干渉 R N A と呼ばれる) が、哺乳動物細胞において免疫応答を誘導することなく、強力かつ特異的な遺伝子ノックダウンを行うことができることを実証した (E l b a s h i r S M e t a l . , N a t u r e , 2 0 0 1 , 4 1 1 , 4 9 4 - 4 9 8) 。この最初の報告以来、s i R N A による転写後遺伝子サイレンシングは、哺乳類細胞における遺伝子解析のための強力なツールとして急速に登場し、新規治療法を生み出す可能性を秘めている。

40

【 0 0 8 1 】

I n v i t r o 合成 s i R N A 分子は、R N A i を活性化するために細胞に導入することができる。内在性 d s R N A と同様に、外因性 s i R N A 二本鎖を細胞に導入すると、s i R N A 二本鎖の 2 つの鎖の 1 つ (すなわち、アンチセンス鎖) に相補的な R N A 配列のゲノムを介した検索を容易にする多ユニット複合体である R N A 誘導サイレンシング複合体 (R I S C) を形成することができる。このプロセス中、s i R N A のセンス鎖 (

50

またはパッセンジャー鎖)は複合体から失われ、*siRNA*のアンチセンス鎖(またはガイド鎖)はその相補的*RNA*と一致する。特に、*RISC*複合体を含む*siRNA*の標的は、完全な配列相補性を示す*mRNA*である。次に、*siRNA*媒介遺伝子サイレンシングが起こり、標的を切断し、放出し、分解する。

【0082】

標的*mRNA*に相同なセンス鎖および標的*mRNA*に相補的なアンチセンス鎖からなる*siRNA*二本鎖は、一本鎖(*ss*) - *siRNA*(例えば、アンチセンス鎖*RNA*またはアンチセンスオリゴヌクレオチド)の使用と比較して、標的*RNA*破壊の効率の面ではるかに有利である。多くの場合、対応する二本鎖の効果的な遺伝子サイレンシング効力を達成するためには、より高い濃度の*ss* - *siRNA*が要求される。

10

【0083】

前述の分子のいずれかは、*AAV*ベクターまたはベクターゲノムによってコードされ得る。

*SOD1*遺伝子を標的とする*siRNA*二本鎖の設計と配列

*siRNA*を設計するためのいくつかのガイドラインが当該分野で提案されている。これらのガイドラインは、一般に、サイレンシングされる遺伝子中の領域を標的とする19ヌクレオチド二本鎖領域、対称2-3ヌクレオチド3'オーバーハング、5-リン酸および3-ヒドロキシル基の生成を推奨している。*siRNA*配列選択を支配し得る他の規則には、以下に限定されないがこれらが含まれる。(i)アンチセンス鎖の5'末端のA/U、(ii)センス鎖の5'末端のG/C、(iii)アンチセンス鎖の3分の1における5'末端の少なくとも5個のA/U残基、および(iv)長さが9ヌクレオチドを超えるGCストレッチが存在しないこと。このような考察によれば、標的遺伝子の特定の配列と合わせて、哺乳類の標的遺伝子発現を抑制するために必須である、非常に有効な*siRNA*分子を容易に設計することができる。

20

【0084】

本発明によれば、ヒト*SOD1*遺伝子を標的とする*siRNA*分子(例えば、*siRNA*二本鎖またはコードされた*dsRNA*)が設計される。このような*siRNA*分子は、*SOD1*遺伝子発現およびタンパク質産生を特異的に抑制することができる。いくつかの態様において、*siRNA*分子は、細胞、すなわちALS疾患を有する患者において同定された突然変異*SOD1*転写物(例えば、表1の突然変異)における*SOD1*遺伝子変異体を選択的に「ノックアウトする」ために設計および使用される。いくつかの態様において、*siRNA*分子は、細胞中の*SOD1*遺伝子変異体を選択的に「ノックダウン」するように設計され、使用される。他の態様では、*siRNA*分子は、*SOD1*遺伝子の任意の特定の突然変異とは無関係に、*SOD1*遺伝子の野生型および突然変異対立遺伝子の両方を阻害または抑制することができる。

30

【0085】

一実施形態では、本発明の*siRNA*分子は、センス鎖および相補的なアンチセンス鎖を含み、ここで両方の鎖がハイブリダイズして二本鎖構造を形成する。アンチセンス鎖は、標的変異的*RNAi*を誘導するために*SOD1*の*mRNA*配列に対して十分な相補性を有する。すなわち、*siRNA*分子は、*RNAi*の機構またはプロセスによって標的*mRNA*の破壊を引き起こすのに十分な配列を有する。

40

【0086】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖および標的*mRNA*配列は100%相補的である。アンチセンス鎖は、標的*mRNA*配列の任意の部分に相補的であり得る。

他の実施形態では、アンチセンス鎖および標的*mRNA*配列は、少なくとも1つのミスマッチを含む。非限定的な例として、アンチセンス鎖および標的*mRNA*配列は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%

50

、20～95%、20～99%、30～40%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～99%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～99%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～99%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～99%、70～80%、70～90%、70～95%、70～99%、80～90%、80～95%、80～99%、90～95%、90～99%または95～99%相補的である。

【0087】

本発明によれば、siRNA分子は、約10～50またはそれ以上のヌクレオチド、すなわち各鎖が10～50ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を含む長さを有する。好ましくは、siRNA分子は、約15～30、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドの長さを有し、各鎖は、標的領域に対して十分に相補的である。一実施形態では、siRNA分子は、約19～25、19～24または19～21ヌクレオチドの長さを有する。

10

【0088】

いくつかの実施形態において、本発明のsiRNA分子は、約19ヌクレオチド～約25ヌクレオチドおよび3'末端に2つのオーバーハングヌクレオチドを含む合成RNA二本鎖であり得る。いくつかの態様では、siRNA分子は未修飾RNA分子であってよい。他の態様では、siRNA分子は、塩基修飾、糖修飾、または骨格修飾などの少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含むことができる。

20

【0089】

他の実施形態では、本発明のsiRNA分子は、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、AAVベクター）、ゲノムまたは細胞への投与のための他の核酸発現ベクターでコードされ得る。

【0090】

DNA発現プラスミドを使用して、本発明のsiRNA二本鎖またはdsRNAを細胞中で安定に発現させ、標的遺伝子の長期阻害を達成することができる。ひとつの態様では、siRNA二本鎖のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、典型的には短いスパー配列によって連結され、短いヘアピンRNA（shRNA）と呼ばれるステム-ループ構造の発現を導く。ヘアピンはダイサー（Dicer）によって認識、切断され、成熟siRNA分子を生成する。

30

【0091】

本発明によれば、SOD1 mRNAを標的とするsiRNA分子をコードする核酸を含むAAVベクターが産生され、そのAAVベクター血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9（hu14）、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8およびAAV-DJ、およびそれらの変異体であり得る。

【0092】

いくつかの実施形態では、本発明のsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、標的mRNA（すなわち、SOD1）を抑制する（または分解する）。したがって、siRNA二本鎖またはコードされたdsRNAを使用して、細胞、例えば運動ニューロンにおけるSOD1遺伝子発現を実質的に阻害することができる。いくつかの態様では、SOD1遺伝子発現の阻害は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%、または少なくとも20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～100%、30～40%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、50～60%、50～70%、50～80%、50～

40

50

90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100%または95～100%である。したがって、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%、または少なくとも20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～100%、30～40%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100%または95～100%で阻害される。SOD1遺伝子は、野生型遺伝子または少なくとも1つの変異を有する変異型SOD1遺伝子のどちらであってもよい。したがって、タンパク質は、野生型タンパク質または少なくとも1つの変異を有する変異ポリペプチドのいずれかである。

【0093】

本発明によれば、ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAを設計し、培養細胞におけるSOD1 mRNAレベルを低下させる能力について試験した。このようなsiRNA二本鎖には、表3に列挙されたものが含まれる。非限定的な例として、siRNA二本鎖は、siRNA二本鎖ID：D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823及びD-2858であってよい。

【0094】

一実施形態では、ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAの3'ステムアームは、ガイド鎖の3'末端の下流に11ヌクレオチドを有し、5'末端ステムのパスセンジャー鎖の5'末端の上流にある13ヌクレオチドのうちの11ヌクレオチドと相補性を有する。

【0095】

一実施形態では、ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、調節ポリヌクレオチドの3'末端アームの3'末端の6ヌクレオチド下流にあるシステインを有し得る。

【0096】

一実施形態では、ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、ガイド鎖のmiRNAシードマッチを含む。別の実施形態では、ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、パスセンジャー鎖のmiRNAシードマッチを含む。さらに別の実施形態において、ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、ガイドまたはパスセンジャー鎖のシードマッチを含まない。

【0097】

一実施形態では、ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、ガイド鎖について、有意な全長のオフターゲットをほとんど有さない。別の実施形態では、ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、パスセンジャー鎖について、有意な全長のオフターゲットをほとんど有さない。ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖またはコードされたdsRNAは、パスセンジャー鎖について、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%未満、1～5%、2～6%、3～7%、4～8%、5～9%、5～10%、6～10%の全長オフターゲットを有する。さらに別の実施形態では、ヒトSOD1遺伝

10

20

30

40

50

子を標的とする *siRNA* 二本鎖またはコードされた *dsRNA* は、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖について、有意な全長のオフターゲットをほとんど有さない。ヒト *SOD1* 遺伝子を標的とする *siRNA* 二本鎖またはコードされた *dsRNA* は、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖について、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%未満、1~5%、2~6%、3~7%、4~8%、5~9%、5~10%、6~10%の全長オフターゲットを有する。

【0098】

一実施形態では、ヒト *SOD1* 遺伝子を標的とする *siRNA* 二本鎖またはコードされた *dsRNA* は *in vitro* で高い活性を有する。別の実施形態では、ヒト *SOD1* 遺伝子を標的とする *siRNA* 二本鎖またはコードされた *dsRNA* は、*in vitro* で低活性を有し得る。さらに別の実施形態において、ヒト *SOD1* 遺伝子を標的とする *siRNA* 二本鎖または *dsRNA* は、*in vitro* で高いガイド鎖活性および低いパッセンジャー鎖活性を有し得る。

10

【0099】

一実施形態では、ヒト *SOD1* 遺伝子を標的とする *siRNA* 二本鎖またはコードされた *dsRNA* は、*in vitro* で高いガイド鎖活性および低いパッセンジャー鎖活性を有する。ガイド鎖による標的ノックダウン (KD) は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%または100%であり得る。ガイド鎖による標的ノックダウンは、60-65%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、60-99%、60-99.5%、60-100%、65-70%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、65-99%、65-99.5%、65-100%、70-75%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、70-99%、70-99.5%、70-100%、75-80%、75-85%、75-90%、75-95%、75-99%、75-99.5%、75-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-99.5%、80-100%、85-90%、85-95%、85-99%、85-99.5%、85-100%、90-95%、90-99%、90-99.5%、90-100%、95-99%、95-99.5%、95-100%、99-99.5%、99-100%、または99.5-100%であり得る。非限定的な例として、ガイド鎖による標的ノックダウン (KD) は70%より大きい。

20

30

【0100】

一実施形態では、最も近いオフターゲットについてのパッセンジャー鎖の IC_{50} は、ターゲットについてのガイド鎖の IC_{50} を100倍したものより大きい。非限定的な例として、最も近いオフターゲットについてのパッセンジャー鎖の IC_{50} が、ターゲットについてのガイド鎖の IC_{50} を100倍したものを超える場合、ヒト *SOD1* 遺伝子を標的とする *siRNA* 二本鎖またはコードされた *dsRNA* は、*in vitro* で高いガイド鎖活性および低いパッセンジャー鎖活性を有すると言われる。

【0101】

一実施形態では、ガイド鎖の5'プロセッシングは、*in vitro* または *in vivo* において、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%の割合で、5'末端での正確な開始 (n) を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の5'プロセッシングは正確であり、*in vitro* において、少なくとも99%の割合で5'末端での正確な開始 (n) を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の5'プロセッシングは正確であり、*in vivo* において、少なくとも99%の割合で、5'末端における正確な開始 (n) を有する。

40

【0102】

一実施形態において、*in vitro* または *in vivo* において、発現されるガイド鎖対パッセンジャー鎖 (G:P) 比は、1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50

50

: 50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5または99:1である。非限定的な例として、*in vitro*において、ガイド鎖とパッセンジャー鎖の比は、80:20である。非限定的な例として、*in vivo*において、ガイド鎖とパッセンジャー鎖の比は、80:20である。

【0103】

一実施形態では、dsRNAをコードするベクターゲノムの完全性は、構造体の完全長の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99%である。

【0104】

s iRNA修飾

いくつかの実施形態では、本発明のs iRNA分子は、前駆体またはDNAとして送達されない場合、*in vivo*におけるs iRNAの安定性の増加などを含むがこれに限定されないRNA分子のいくつかの特徴を調節するために、化学的に修飾することができる。化学的に修飾されたs iRNA分子は、ヒトへの治療用途に使用することができ、s iRNA分子のRNAi活性を損なうことなく改善される。非限定的な例として、s iRNA分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方の3'末端および5'末端の両方で修飾されている。

【0105】

いくつかの態様において、本発明のs iRNA二本鎖は、糖修飾ヌクレオチド、核酸塩基修飾および/または骨格修飾を含むがこれらに限定されない、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、s iRNA分子は、組み合わされた修飾、例えば、組み合わされた核酸塩基および骨格修飾を含み得る。

【0106】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、糖-修飾ヌクレオチドであり得る。糖修飾ヌクレオチドは、2'-フルオロ、2'-アミノおよび2'-チオ修飾リボヌクレオチド、例えば、2'-フルオロ修飾リボヌクレオチドを含むが、これらに限定されない。修飾されたヌクレオチドは、糖部分上で修飾されてよく、ならびにリボシルではない糖または類似体を有するヌクレオチドもまた修飾されてもよい。例えば、糖部分は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、および他の糖、複素環、または炭素環であってよく、またはそれらに基づくものであってもよい。

【0107】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは核酸塩基修飾ヌクレオチドであってよい。

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、骨格修飾ヌクレオチドであってよい。いくつかの実施形態では、本発明のs iRNA二本鎖は、主鎖上に他の修飾をさらに含み得る。本明細書で使用する通常の「骨格」は、DNA分子またはRNA分子中の交互に繰り返される糖-リン酸配列を指す。デオキシリボース/リボース糖は、「ホスホジエステル」結合/リンカー(PO結合)としても知られているエステル結合で、3'-ヒドロキシル基および5'-ヒドロキシル基の両方においてリン酸基に結合する。PO骨格は、「ホスホロチオエート骨格(PS結合)」として修飾することができる。いくつかの場合において、天然のホスホジエステル結合はアミド結合によって置換され得るが、2つの糖単位間の4つの原子は維持される。そのようなアミド修飾は、オリゴヌクレオチドの固相合成を促進し、s iRNA相補体で形成される二本鎖の熱力学的安定性を増加させることができる。例えば、Mesmaeker et al., Pure & Appl. Chem., 1997, 3, 437-440;を参照せよ。その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0108】

修飾塩基は、1つ以上の原子または基の置換または付加によって修飾された、例えばアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、キサンチン、イノシンおよびクエオシンなどのヌクレオチド塩基を指す。核酸塩基部分の修飾のいくつかの例には、アルキル化

10

20

30

40

50

、ハロゲン化、チオール化、アミノ化、アミド化またはアセチル化塩基が個々にまたは組み合わせて含まれるが、これらに限定されない。より具体的には、5 - プロピニルウリジン、5 - プロピニルシチジン、6 - メチルアデニン、6 - メチルグアニン、N、N' - ジメチルアデニン、2 - プロピルアデニン、2 - プロピルグアニン、2 - アミノアデニン、1 - メチルイノシン、3 - メチルウリジン、5 - メチルシチジン、5 - メチルウリジン、および5位に修飾を有する他のヌクレオチド、5 - (2 - アミノ)プロピルウリジン、5 - ハロシチジン、5 - ハロウリジン、4 - アセチルシチジン、1 - メチルアデノシン、2 - メチルアデノシン、3 - メチルシチジン、6 - メチルウリジン、2 - メチルグアノシン、7 - メチルグアノシン、2, 2 - ジメチルグアノシン、5 - メチルアミノエチルウリジン、5 - メチルオキシウリジン、例えば7 - デアザ - アデノシンのようなデアザヌクレオチド、6 - アゾウリジン、6 - アゾシチジン、6 - アゾチミジン、5 - メチル - 2 - チオウリジン、例えば2 - チオウリジンおよび4 - チオウリジンおよび2 - チオシチジンのような他のチオ塩基、ジヒドロウリジン、シュードウリジン、クオシン、アルゲオシン、ナフチルおよび置換ナフチル基、任意のO - およびN - アルキル化プリンおよびピリミジン、例えばN6 - メチルアデノシン、5 - メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン5 - オキシ酢酸、ピリジン - 4 - オン、ピリジン - 2 - オン、フェニルおよびアミノフェノールまたは2, 4, 6 - トリメトキシベンゼンなどの修飾フェニル基、G - クランブヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - 置換ウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、およびアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドが挙げられる。

【0109】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、センス鎖上にのみ存在し得る。

別の実施形態において、修飾ヌクレオチドは、アンチセンス鎖上にのみ存在し得る。

いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオチドは、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方に存在し得る。

【0110】

いくつかの実施形態では、化学的に修飾されたヌクレオチドは、SOD1 mRNA配列のような標的mRNA配列と対合するアンチセンス鎖の能力に影響を与えない。

ベクター

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるsiRNA分子は、プラスミドまたはウイルスベクターのようなベクターによってコードされ得る。一実施形態では、siRNA分子は、ウイルスベクターによってコードされる。ウイルスベクターは、ヘルペスウイルス(HSV)ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどであり得るが、これらに限定されない。いくつかの特定の実施形態では、ウイルスベクターはAAVベクターである。

【0111】

レトロウイルスベクター

いくつかの実施形態において、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖は、レトロウイルスベクターによってコードされ得る(例えば、米国特許第5,399,346号;第5,124,263号;第4,650,764号および第4,980,289号明細書を参照;これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0112】

アデノウイルスベクター

アデノウイルスは、in vivoで様々な細胞タイプに核酸を効率的に送達するように改変することができ、遺伝子を神経細胞に標的化することを含む遺伝子治療プロトコルに広く使用されている真核生物DNAウイルスである。種々の複製欠損アデノウイルスおよび最小アデノウイルスベクターが核酸治療について記載されている(例えば、PCT特許公開番号WO199426914号、WO199502697号、WO199428152号、WO199412649号、WO199502697号およびWO199622

10

20

30

40

50

378号参照；これらの各々の内容は、その全体が参照により組み込まれる）。そのようなアデノウイルスベクターはまた、本発明の siRNA 分子を細胞に送達するために使用され得る。

【0113】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、依存性パルボウイルス (他のパルボウイルスのように) であり、約 5000 ヌクレオチドの長さのゲノムを有する一本鎖非エンベロープ DNA ウイルスであるとともに、複製を担うタンパク質 (Rep) とキャプシド (Cap) の構造タンパク質とをコードする 2 つのオープンリーディングフレームを含む。オープンリーディングフレームには、ウイルスゲノムの複製起点として機能する 2 つの逆方向末端反復 (ITR) 配列が隣接している。さらに、AAV ゲノムはパッケージング配列を含み、ウイルスゲノムの AAV キャプシドへのパッケージングを可能にする。AAV ベクターは、感染細胞において生産的感染を受けるために、コヘルパー (例えばアデノウイルス) を必要とする。そのようなヘルパー機能がない場合、AAV ビリオンは本質的に宿主細胞に入り、細胞のゲノムに組み込まれる。

10

【0114】

AAV ベクターはいくつかの独特な特徴のために、その siRNA 投与について研究されている。特徴の非限定的な例には、(i) 分裂細胞および非分裂細胞の両方に感染する能力；(ii) ヒト細胞を含む感染性の広範な宿主範囲；(iii) いずれの疾患とも関連しておらず、感染細胞において複製することが示されていない野生型 AAV；(iv) ベクターに対する細胞媒介免疫応答の欠如および (v) 長期発現の可能性を減少させる、宿主染色体における非組み込み性の性質が含まれる。さらに、AAV ベクターによる感染は、細胞遺伝子発現のパターンの変化に最小の影響しか及ぼさない (Stilwell および Samulski et al., Biotechniques, 2003, 34, 148)。

20

【0115】

典型的には、siRNA 送達のための AAV ベクターは、それらがウイルスゲノム内の機能的 Rep および Cap タンパク質をコードする配列を欠いているため、複製欠損である組換えウイルスベクターであり得る。場合によっては、欠損した AAV ベクターは、大部分または全てのコード配列を欠いている可能性があり、本質的に 1 つまたは 2 つの AAV ITR 配列およびパッケージング配列のみを含有する。

30

【0116】

AAV ベクターはまた、自己相補的 AAV ベクター (scAAV) からなっていてよい。scAAV ベクターは、双方の DNA 鎖を含み、それらが共にアニーリングし、二本鎖 DNA を形成する。第二鎖合成をスキップすることにより、scAAV は細胞内での迅速な発現を可能にする。

【0117】

一実施形態では、本発明で使用される AAV ベクターは scAAV である。

一実施形態では、本発明で使用される AAV ベクターは ssAAV である。

AAV ベクターを産生および / または改変する方法は、偽型 AAV ベクターのような当技術分野で開示されている (PCT 特許公開番号 WO 2000 28004 号；WO 2001 23001 号；WO 2004 112727 号；WO 2005 005610 号および WO 2005 072364 号、これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

40

【0118】

siRNA 分子の核酸配列を含む AAV ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8 および AAV-DJ を含むがこれらに限定されない AAV の様々な血清型から調製または誘導することができる。ある場合には、異なる血清型の AAV を一緒

50

にまたは他のタイプのウイルスと混合して、キメラ A A V ベクターを産生することができる。

【 0 1 1 9 】

一実施形態では、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む A A V ベクターを哺乳動物細胞に導入することができる。

A A V ベクターは、送達効率を高めるために修飾することができる。本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むそのような改変 A A V ベクターは、効率的にパッケージされ、標的細胞を高い頻度で最小限の毒性でうまく感染させるために使用することができる。

【 0 1 2 0 】

10

いくつかの実施形態では、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む A A V ベクターは、ヒト血清型 A A V ベクターであり得る。そのようなヒト A A V ベクターは、任意の既知の血清型、例えば血清型 A A V 1 - A A V 1 1 のいずれか 1 つに由来し得る。非限定的な例として、A A V ベクターは、A A V 1 由来のキャプシドに A A V 1 由来のゲノムを含むベクター、A A V 2 由来ゲノム中に A A V 2 由来ゲノムを含むベクター、A A V 4 由来のキャプシドに A A V 4 由来のゲノムを含むベクター、A A V 6 由来のキャプシドに A A V 6 由来のゲノムを含むベクター、または A A V 9 由来のキャプシドに A A V 9 由来のゲノムを含むベクターであってよい。

【 0 1 2 1 】

20

他の実施形態では、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む A A V ベクターは、少なくとも 2 つの異なる A A V 血清型に由来する配列および / または成分を含む偽型 (p s e u d o t y p e d) ハイブリッドまたはキメラ A A V ベクターであり得る。偽型 A A V ベクターは、1 つの A A V 血清型に由来する A A V ゲノムおよび異なる A A V 血清型に少なくとも部分的に由来するキャプシドタンパク質を含むベクターであり得る。非限定的な例として、このような偽型 A A V ベクターは、A A V 1 由来のキャプシドに A A V 2 由来のゲノムを含むベクター、または A A V 2 由来のゲノムを A A V 6 由来のキャプシドに含むベクター、または A A V 4 由来のキャプシドに A A V 2 由来のゲノムを含むベクター、または A A V 9 由来のキャプシドに A A V 2 由来のゲノムを含むベクターであってよい。同様の様式で、本発明は任意のハイブリッドまたはキメラ A A V ベクターを意図する。

30

【 0 1 2 2 】

他の実施形態では、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む A A V ベクターを使用して、s i R N A 分子を中枢神経系に送達することができる (例えば、米国特許第 6 , 1 8 0 , 6 1 3 号 ; その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【 0 1 2 3 】

いくつかの態様において、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む A A V ベクターは、非ウイルス由来のペプチドを含む修飾されたキャプシドをさらに含み得る。他の態様では、A A V ベクターは、コードされた s i R N A 二本鎖の脳および脊髄への送達を促進するための C N S 特異的キメラキャプシドを含み得る。例えば、C N S 指向性を示す A A V 変異体由来のキャップヌクレオチド配列の整列を、可変領域 (V R) 配列および構造を同定するために構築することができる。

40

【 0 1 2 4 】

一実施形態では、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む A A V ベクターは、ポリシストロン分子である s i R N A 分子をコードし得る。s i R N A 分子は、s i R N A 分子の領域間に 1 つ以上のリンカーをさらに含んでいてもよい。

【 0 1 2 5 】

一実施形態では、コードされた s i R N A 分子は、C M V、U 6、C B A または S V 4 0 イントロンを有する C B A プロモーターを含むがこれらに限定されない発現ベクター中のプロモーターの下流に位置し得る。さらに、コードされた s i R N A 分子は、発現ベクター中のポリアデニル化配列の上流に位置し得る。非限定的な例として、コードされた s

50

iRNA分子は、発現ベクターにおいて、プロモーターの下流および/またはポリアデニル化配列の上流の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、または30超のヌクレオチド内に位置し得る。別の非限定的な例として、コードされたsiRNA分子は、発現ベクターにおいて、プロモーターの下流および/またはポリアデニル化配列の上流の1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、10～15、10～20、10～25、10～30、15～20、15～25、15～30、20～25、20～30または25～30のヌクレオチド内に位置し得る。非限定的な例として、コードされたsiRNA分子は、発現ベクターにおいて、プロモーターの下流および/またはポリアデニル化配列の上流の最初の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、または25%超のヌクレオチド内に位置し得る。別の非限定的な例として、コードされたsiRNA分子は、発現ベクターにおいて、プロモーターの上流および/またはポリアデニル化配列の上流の最初の1～5%、1～10%、1～15%、1～20%、1～25%、5～10%、5～15%、5～20%、5～25%、10～15%、10～20%、10～25%、15～20%、15～25%、または20～25%内に位置し得る。

10

【0126】

一実施形態では、コードされたsiRNA分子は、発現ベクター中のポリアデニル化配列の上流に位置し得る。さらに、コードされたsiRNA分子は、発現ベクターにおいて、CMV、U6、CBAまたはSV40イントロンを有するCBAプロモーターを含むがこれに限定されないプロモーターの下流に位置し得る。非限定的な例として、コードされたsiRNA分子は、発現ベクターにおいて、プロモーターの下流および/またはポリアデニル化配列の上流の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、または30超のヌクレオチド内に位置し得る。別の非限定的な例として、コードされたsiRNA分子は、発現ベクターにおいて、プロモーターの下流および/またはポリアデニル化配列の上流の1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、10～15、10～20、10～25、10～30、15～20、15～25、15～30、20～25、20～30または25～30ヌクレオチド内に位置し得る。非限定的な例として、コードされたsiRNA分子は、発現ベクターにおいて、プロモーター下流および/又はポリアデニル化配列の上流の最初の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、または25%超のヌクレオチド内に位置し得る。別の非限定的な例として、コードされたsiRNA分子は、発現ベクターにおいて、プロモーターの下流および/またはポリアデニル化配列の上流の最初の1～5%、1～10%、1～15%、1～20%、1～25%、5～10%、5～15%、5～20%、5～25%、10～15%、10～20%、10～25%、15～20%、15～25%、または20～25%内に位置し得る。

20

30

【0127】

一実施形態では、コードされたsiRNA分子は、scAAVに位置し得る。
一実施形態では、コードされたsiRNA分子は、ssAAVに位置し得る。
一実施形態では、コードされたsiRNA分子は、発現ベクター中のフリップITRの5'末端近くに位置し得る。別の実施形態では、コードされたsiRNA分子は、発現ベクター中のフリップITRの3'末端近くに位置し得る。さらに別の実施形態では、コードされたsiRNA分子は、発現ベクター中のフロップITRの5'末端近くに位置し得る。さらに別の実施形態では、コードされたsiRNA分子は、発現ベクター中のフロップITRの3'末端近くに位置し得る。一実施形態では、コードされたsiRNA分子は、発現ベクター中のフリップITRの5'末端とフロップITRの3'末端との間に位置し得る。一実施形態では、コードされたsiRNA分子は、発現ベクター内の、フリップ

40

50

ITRの3'末端およびフリップITRの5'末端の間(例えば、フリップITRの5'末端とフロップITRの3'末端またはフロップITRの3'末端とフリップITRの5'末端の間の途中)に位置し得る。非限定的な例として、コードされた*siRNA*分子は、発現ベクター中のITRの5'または3'末端(例えば、フリップまたはフロップITR)から、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30内または30ヌクレオチドを超える下流に位置し得る。非限定的な例として、コードされた*siRNA*分子は、発現ベクター中のITRの5'または3'末端(例えば、フリップまたはフロップITR)から、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30内、または30ヌクレオチドを超える上流に位置し得る。別の非限定的な例として、コードされた*siRNA*分子は、発現ベクター中のITRの5'または3'末端(例えば、フリップまたはフロップITR)から1~5、1~10、1~15、1~20、1~25、1~30、5~10、5~15、5~20、5~25、5~25、5~25、5~30、10~15、10~20、10~25、10~30、15~20、15~25、15~30、20~25、20~30または25~30ヌクレオチド内の下流に位置し得る。別の非限定的な例として、コードされた*siRNA*分子は、発現ベクター中のITRの5'または3'末端(例えば、フリップまたはフロップITR)から1~5、1~10、1~15、1~20、1~25、1~30、5~10、5~15、5~20、5~25、5~25、5~25、5~30、10~15、10~20、10~25、10~30、15~20、15~25、15~30、20~25、20~30または25~30上流に位置し得る。非限定的な例として、コードされた*siRNA*分子は、発現ベクター中のITRの5'または3'末端(例えば、フリップまたはフロップITR)から最初の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%内または25%のヌクレオチドを超える上流に位置し得る。別の非限定的な例として、コードされた*siRNA*分子は、発現ベクター中のITRの5'または3'末端(例えば、フリップまたはフロップITR)から最初の1~5%、1~10%、1~15%、1~20%、1~25%、5~10%、5~15%、5%~20%、5%~25%、10%~15%、10%~20%、10%~25%、15%~20%、15~25%、または20~25%下流に位置し得る。

10

20

30

【0128】

発現ベクター

一実施形態では、発現ベクター(例えば、AAVベクター)は、本明細書に記載の発現ベクターの少なくとも1つを含む調節性ポリヌクレオチドの少なくとも1つを含み得る。

【0129】

一実施形態では、発現ベクターは、ITRからITRへ、列挙される5'から3'へ、ITR、プロモーター、イントロン、調節ポリヌクレオチド、ポリA配列およびITRを含み得る。

【0130】

ゲノムサイズ

一実施形態では、本明細書に記載の調節性ポリヌクレオチドをコードする核酸配列を含むベクターゲノムは、一本鎖または二本鎖ベクターゲノムであり得る。ベクターゲノムのサイズは、小、中、大または最大であり得る。さらに、ベクターゲノムは、プロモーターおよびポリAテールを含み得る。

40

【0131】

一実施形態では、本明細書に記載の調節性ポリヌクレオチドをコードする核酸配列を含むベクターゲノムは、小さな一本鎖ベクターゲノムであり得る。小さな一本鎖ベクターゲノムは、約2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4および3.5 kbのサイズなどの、2.7から3.5 kbのサイズであり得る。非限定的な例として、小さな一本鎖ベクターゲノムは、3.2 kbのサイズであり得る。さらに、ベクター

50

ゲノムは、プロモーターおよびポリ A テールを含み得る。

【0132】

一実施形態では、本明細書に記載の調節性ポリヌクレオチドをコードする核酸配列を含むベクターゲノムは、小さな二本鎖ベクターゲノムであり得る。小さな二本鎖ベクターゲノムは、約 1.3、1.4、1.5、1.6、1.7 kb のサイズなどの、1.3 から 1.7 kb のサイズであり得る。非限定的な例として、小さな二本鎖ベクターゲノムは、1.6 kb のサイズであり得る。さらに、ベクターゲノムは、プロモーターおよびポリ A テールを含み得る。

【0133】

一実施形態では、本明細書に記載の調節性ポリヌクレオチドをコードする核酸配列、例えば siRNA または dsRNA を含むベクターゲノムは、中程度の一本鎖ベクターゲノムであってもよい。中程度の一本鎖ベクターゲノムは、約 3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2 および 4.3 kb のサイズなどの、3.6 から 4.3 kb のサイズであり得る。非限定的な例として、中程度の一本鎖ベクターゲノムは、4.0 kb のサイズであり得る。さらに、ベクターゲノムは、プロモーターおよびポリ A テールを含み得る。

【0134】

一実施形態では、本明細書に記載の調節性ポリヌクレオチドをコードする核酸配列を含むベクターゲノムは、中程度の二本鎖ベクターゲノムであり得る。中程度の二本鎖ベクターゲノムは、約 1.8、1.9、2.0 および 2.1 kb のサイズなどの、1.8 から 2.1 kb のサイズであり得る。非限定的な例として、中程度の二本鎖ベクターゲノムは、2.0 kb のサイズであり得る。さらに、ベクターゲノムは、プロモーターおよびポリ A テールを含み得る。

【0135】

一実施形態では、本明細書に記載の調節性ポリヌクレオチドをコードする核酸配列を含むベクターゲノムは、大きな一本鎖ベクターゲノムであり得る。大きな一本鎖ベクターゲノムは、約 4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9 および 6.0 kb のサイズなどの、4.4 から 6.0 kb のサイズであり得る。非限定的な例として、大きな一本鎖ベクターゲノムは、4.7 kb のサイズであり得る。別の非限定的な例として、大きな一本鎖ベクターゲノムは、4.8 kb のサイズであり得る。さらに別の非限定的な例として、大きな一本鎖ベクターゲノムは、サイズが 6.0 kb であってもよい。さらに、ベクターゲノムは、プロモーターおよびポリ A テールを含み得る。

【0136】

一実施形態では、本明細書に記載の調節性ポリヌクレオチドをコードする核酸配列を含むベクターゲノムは、大きな二本鎖ベクターゲノムであり得る。大きな二本鎖ベクターゲノムは、約 2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 および 3.0 kb のサイズなどの、2.2 から 3.0 kb のサイズであり得る。非限定的な例として、大きな二本鎖ベクターゲノムは、2.4 kb のサイズであり得る。さらに、ベクターゲノムは、プロモーターおよびポリ A テールを含み得る。

【0137】

プロモーター

当業者は、標的細胞が、種特異的、誘導性、組織特異的または細胞周期特異的なプロモーターを含むがこれらに限定されるものではない特異的なプロモーターを必要とすることを認識するであろう (Parr et al., Nat Med. 3: 1145 - 9 (1997)); この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0138】

一実施形態では、プロモーターは、調節ポリヌクレオチドの発現を効率的に駆動すると考えられるプロモーターである。

一実施形態では、プロモーターは、標的とされる細胞の向性を有するプロモーターであ

10

20

30

40

50

る。

【 0 1 3 9 】

一実施形態では、プロモーターは、限定されるものではないが、神経系組織などの標的組織中の一定期間、ペイロード、例えば調節ポリヌクレオチド、例えば s i R N A または d s R N A の発現を提供する弱いプロモーターである。発現は、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、9 時間、1 0 時間、1 1 時間、1 2 時間、1 5 時間後、1 6 時間後、1 7 時間後、1 8 時間後、1 9 時間後、2 0 時間後、2 1 時間後、2 2 時間後、2 3 時間後、1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、5 日後、6 日後、1 0 日、1 1 日、1 2 日、1 3 日、2 週間、1 5 日、1 6 日、1 7 日、1 8 日、1 9 日、2 0 日、3 週間、2 2 日、2 3 日、2 4 日、2 7 日、2 8 日、2 9 日、3 0 日、3 1 日、1 ケ月、2 ケ月、3 ケ月、4 ケ月、5 ケ月、6 ケ月、7 ケ月、8 ケ月、9 ケ月、1 1 ケ月、1 年、1 3 ケ月、1 4 ケ月、1 5 ケ月、1 6 ケ月、1 7 ケ月、1 8 ケ月、1 9 ケ月、2 0 ケ月、2 1 ケ月、2 2 ケ月、2 3 ケ月、2 年、3 年、4 年、6 年、7 年、8 年、9 年、1 0 年、または 1 0 年以上の期間、持続する。発現は、1 ~ 5 時間、1 ~ 1 2 時間、1 ~ 2 日、1 ~ 5 日、1 ~ 2 週間、1 ~ 3 週間、1 ~ 4 週間、1 ~ 2 ケ月、1 ~ 4 ケ月、1 ~ 6 ケ月、3 ~ 6 ケ月、3 ~ 9 ケ月、4 ~ 8 ケ月、6 ~ 1 2 ケ月、1 ~ 2 年、1 ~ 5 年、2 ~ 5 年、3 ~ 6 年、3 ~ 8、4 ~ 8 年、または 5 ~ 1 0 年の期間、持続する。非限定的な一例として、プロモーターは、神経組織におけるペイロードの持続的発現のための弱いプロモーターである。

10

【 0 1 4 0 】

一実施形態では、プロモーターは、1 k b 未満のプロモーターであってよい。プロモーターは、2 0 0、2 1 0、2 2 0、2 3 0、2 4 0、2 5 0、2 6 0、2 7 0、2 8 0、2 9 0、3 0 0、3 1 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、3 7 0、3 8 0、3 9 0、4 0 0、4 1 0、4 2 0、4 3 0、4 4 0、4 5 0、4 6 0、4 7 0、4 8 0、4 9 0、5 0 0、5 1 0、5 2 0、5 3 0、5 4 0、5 5 0、5 6 0、5 7 0、5 8 0、5 9 0、6 0 0、6 1 0、6 2 0、6 3 0、6 4 0、6 5 0、6 6 0、6 7 0、6 8 0、6 9 0、7 0 0、7 1 0、7 2 0、7 3 0、7 4 0、7 5 0、7 6 0、7 7 0、7 8 0、7 9 0、8 0 0、あるいは 8 0 0 以上の長さであってよい。プロモーターは、2 0 0 ~ 3 0 0、2 0 0 ~ 4 0 0、2 0 0 ~ 5 0 0、2 0 0 ~ 6 0 0、2 0 0 ~ 7 0 0、2 0 0 ~ 8 0 0、3 0 0 ~ 4 0 0、3 0 0 ~ 5 0 0、3 0 0 ~ 6 0 0、3 0 0 ~ 7 0 0、3 0 0 ~ 8 0 0、4 0 0 ~ 5 0 0、4 0 0 ~ 6 0 0、4 0 0 ~ 7 0 0、4 0 0 ~ 8 0 0、5 0 0 ~ 6 0 0、5 0 0 ~ 7 0 0、6 0 0 ~ 8 0 0、6 0 0 ~ 7 0 0、6 0 0 ~ 8 0 0、7 0 0 ~ 8 0 0 の長さであってよい。

20

30

【 0 1 4 1 】

一実施形態では、プロモーターは、C M V および C B A を含むがこれらに限定されない 2 つあるいはそれ以上の構成要素の組み合わせであってよい。各構成要素は、2 0 0、2 1 0、2 2 0、2 3 0、2 4 0、2 5 0、2 6 0、2 7 0、2 8 0、2 9 0、3 0 0、3 1 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、3 7 0、3 8 0、3 8 1、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 6、3 8 7、3 8 8、3 8 9、3 9 0、4 0 0、4 1 0、4 2 0、4 3 0、4 4 0、4 5 0、4 6 0、4 7 0、4 8 0、4 9 0、5 0 0、5 1 0、5 2 0、5 3 0、5 4 0、5 5 0、5 6 0、5 7 0、5 8 0、5 9 0、6 0 0、6 1 0、6 2 0、6 3 0、6 4 0、6 5 0、6 6 0、6 7 0、6 8 0、6 9 0、7 0 0、7 1 0、7 2 0、7 3 0、7 4 0、7 5 0、7 6 0、7 7 0、7 8 0、7 9 0、8 0 0 または 8 0 0 以上の長さであってよい。各構成要素は、2 0 0 ~ 3 0 0、2 0 0 ~ 4 0 0、2 0 0 ~ 5 0 0、2 0 0 ~ 6 0 0、2 0 0 ~ 7 0 0、2 0 0 ~ 8 0 0、3 0 0 ~ 4 0 0、3 0 0 ~ 5 0 0、3 0 0 ~ 6 0 0、3 0 0 ~ 7 0 0、3 0 0 ~ 8 0 0、4 0 0 ~ 5 0 0、4 0 0 ~ 6 0 0、4 0 0 ~ 7 0 0、4 0 0 ~ 8 0 0、5 0 0 ~ 6 0 0、5 0 0 ~ 7 0 0、5 0 0 ~ 8 0 0、6 0 0 ~ 7 0 0、6 0 0 ~ 8 0 0、7 0 0 ~ 8 0 0 の長さを有することができる。非限定的な一例として、プロモーターは、3 8 2 ヌクレオチドの C M V エンハンサー配列と 2 6 0 ヌクレオチドの C B A プロモーター配列との組み合わせである。

40

50

【0142】

一実施形態において、ベクターゲノムは、標的特異性および発現を増強するための少なくとも1つのエレメントを含む。(例えば、Powell et al. *Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy*, 2015を参照せよ;この内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。)参照導入遺伝子標的特異性および発現を増強するエレメントの非限定的な例には、プロモーター、内在性miRNA、転写後調節エレメント(PRE)、ポリアデニル化(Poly A)シグナル配列および上流エンハンサー(USE)、CMVエンハンサーおよびイントロンがある。

10

【0143】

一実施形態において、ベクターゲノムは、プロモーターのような、標的特異性および発現を増強するための少なくとも1つのエレメントを含む。(例えば、Powell et al. *Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy*, 2015を参照せよ;この内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0144】

ほとんどの組織において発現を促進するプロモーターは、ヒト伸長因子1 - サブユニット(EF1)、前初期サイトメガロウイルス(CMV)、ニワトリ - アクチン(CBA)およびその誘導体CAG、グルクロニダーゼ(GUSB)、またはユビキチンC(UBC)を含むがこれに限定されない。組織特異的発現要素を使用して、発現をある細胞型に制限することができ、たとえば、ニューロン、星状細胞、または希突起膠細胞に制限するために使用することができる神経系プロモーターを含むがこれに限定されない。ニューロンに対する組織特異的発現エレメントの非限定的な例には、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、血小板由来成長因子(PDGF)、血小板由来成長因子B鎖(PDGF-β)、シナプシン(Syn)、メチル-CpG結合タンパク質2(MeCP2)、CaMKII、mGluR2、NFL、NFH、n2、PPE、EnkおよびEAAT2プロモーターが挙げられる。星状細胞に対する組織特異的発現エレメントの非限定的な例には、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)およびEAAT2プロモーターが挙げられる。希突起膠細胞に対する組織特異的発現エレメントの非限定的な例には、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)プロモーターが挙げられる。

20

30

【0145】

一実施形態では、ベクターゲノムはユビキタスプロモーターを含む。ユビキタスプロモーターの非限定的な例には、CMV、CBA(誘導体CAG、CBhなどを含む)、EF-1、PGK、UBC、GUSB(hGBp)、およびUCOE(HNRPA2B1-CBX3のプロモーター)が挙げられる。Yura(*Molecular Pain* 2011, 7:63;この内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)は、レンチウイルスベクターを用いて、ラットDRG細胞および一次DRG細胞におけるCAG、EFI、PGKおよびUBCプロモーター下でのeGFPの発現を評価し、UBCが他の3つのプロモーターよりも弱い発現しか示さず、すべてのプロモーターについて見られたグリア発現がわずかに10~12%であったことを見いだした。Soderblomら(*J. Neurosci* 2015;この内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)は、運動皮質に注入後のAAV8におけるCMVおよびUBCプロモーターによるeGFPの発現、およびCMVプロモーターによるAAV2におけるeGFPの発現を評価した。UBCまたはEFIプロモーターを含むプラスミドの鼻腔内投与は、CMVプロモーターによる発現よりも長く持続した気道発現を示した(例えば、Gill et al., *Gene Therapy* 2001, Vol. 8, 1539-1546を参照せよ;この内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)。Husainら(*Gene Therapy* 2009;この内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれ

40

50

る)は、hGUSBプロモーター、HSV-1LATプロモーター、およびNSEプロモーターを用いてH₂H構築物を評価し、H₂H構築物がマウスの脳におけるNSEよりも弱い発現を示したことを見いだした。PassiniおよびWolfe(J. Virol. 2001, 12382-12392;この内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)は、新生児マウスにおける脳室内注射後のH₂Hベクターの長期効果を評価し、持続的発現が少なくとも1年間あったことを見いだした。Xuら(Gene Therapy 2001, 8, 1323-1332;この内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)は、CMV-lacZ、CMV-luc、EF、GFAP、hENK、nAChR、PPE、PPE + wpre、NSE(0.3kb)、NSE(1.8kb)、およびNSE(1.8kb + wpre)に比較して、NF-LおよびNF-Hプロモーターを使用した場合に、すべての脳領域において発現が低いことを見いだした。Xuらは、プロモーター活性の降順が、NSE(1.8kb)、EF、NSE(0.3kb)、GFAP、CMV、hENK、PPE、NFLおよびNFHであることを見出した。NFLは650ヌクレオチドのプロモーターであり、NFHは920ヌクレオチドのプロモーターであり、いずれも肝臓には存在しないが、NFHは感覚固有受容体ニューロン、脳および脊髄に豊富であり、NFHは心臓に存在する。Scn8aは、DRG、脊髄および脳全体を通して、海馬ニューロンおよび小脳プルキンエ細胞、皮質、視床および視床下部に見られる特に高い発現を有する470ヌクレオチドのプロモーターである(例えば、Drews et al. 2007およびRaymond et al. 2004を参照せよ;この内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

10

20

【0146】

一実施形態では、ベクターゲノムはUBCプロモーターを含む。UBCプロモーターは、300~350ヌクレオチドのサイズを有し得る。非限定的な一例として、UBCプロモーターは332ヌクレオチドの長さである。

【0147】

一実施形態では、ベクターゲノムはGUSBプロモーターを含む。GUSBプロモーターは、350~400ヌクレオチドのサイズを有し得る。非限定的な例として、GUSBプロモーターは378ヌクレオチドの長さである。非限定的な一例として、構築物は、AAV-プロモーター-CMV/グロビンイントロンhFXN-RBGであってよく、この構築物では、AAVが自己相補的であってよく、AAVがDJ血清型であってよい。

30

【0148】

一実施形態では、ベクターゲノムはNFLプロモーターを含む。NFLプロモーターは、600~700ヌクレオチドのサイズを有し得る。非限定的な一例として、NFLプロモーターは650ヌクレオチドの長さである。非限定的な一例として、構築物は、AAV-プロモーター-CMV/グロビンイントロンhFXN-RBGであってよく、この構築物では、AAVが自己相補的であってよく、AAVがDJ血清型であってよい。

【0149】

一実施形態では、ベクターゲノムはNFHプロモーターを含む。前記NFHプロモーターは、900~950ヌクレオチドのサイズを有し得る。非限定的な一例として、NFHプロモーターは920ヌクレオチドの長さである。非限定的な一例として、構築物は、AAV-プロモーター-CMV/グロビンイントロンhFXN-RBGであってよく、この構築物では、AAVが自己相補的であってよく、AAVがDJ血清型であってよい。

40

【0150】

一実施形態では、ベクターゲノムはscn8aプロモーターを含む。scn8aプロモーターは、450~500ヌクレオチドのサイズを有し得る。非限定的な一例として、scn8aプロモーターは470ヌクレオチドの長さである。非限定的な一例として、構築物は、AAV-プロモーター-CMV/グロビンイントロンhFXN-RBGであってよく、この構築物では、AAVが自己相補的であってよく、AAVがDJ血清型であってよい。

【0151】

50

- －実施形態では、ベクターゲノムはF X Nプロモーターを含む。
- －実施形態では、ベクターゲノムはP G Kプロモーターを含む。
- －実施形態では、ベクターゲノムはC B Aプロモーターを含む。

【0152】

- －実施形態では、ベクターゲノムはC M Vプロモーターを含む。

－実施形態では、ベクターゲノムは、肝臓または骨格筋プロモーターを含む。肝臓プロモーターの非限定的な例には、h A A TおよびT B Gが挙げられる。骨格筋プロモーターの非限定的な例には、D e s m i n、M C KおよびC 5 - 1 2が挙げられる。

【0153】

－実施形態では、A A Vベクターは、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび/または5' U T Rイントロンを含む。エンハンサーはC M Vエンハンサーであってよいが、これに限定されず；プロモーターはC M V、C B A、U B C、G U S B、N S E、サナプシン、M e C P 2、およびG F A Pプロモーターであってよいが、これに限定されず；また5' U T R / イントロンは、S V 4 0およびC B A - M V Mであってよいが、これらに限定されない。非限定的な例として、組み合わせて使用されるエンハンサー、プロモーターおよび/またはイントロンには以下が挙げられる：(1) C M Vエンハンサー、C M Vプロモーター、S V 4 0 5' U T Rイントロン；(2) C M Vエンハンサー、C B Aプロモーター、S V 4 0 5' U T Rイントロン；(3) C M Vエンハンサー、C B Aプロモーター、C B A - M V M 5' U T Rイントロン；(4) U B Cプロモーター；(5) G U S Bプロモーター；(6) N S Eプロモーター；(7) シノプシンプロモーター；(8) M e C P 2プロモーターおよび(9) G F A Pプロモーター。

【0154】

- －実施形態では、A A Vベクターは、操作されたプロモーターを有する。

イントロン

－実施形態では、ベクターゲノムは、イントロンなどの、導入遺伝子標的特異性および発現を増強するための少なくとも1つのエレメントを含む(例えば、P o w e l l e t a l . V i r a l E x p r e s s i o n C a s s e t t e E l e m e n t s t o E n h a n c e T r a n s g e n e T a r g e t S p e c i f i c i t y a n d E x p r e s s i o n i n G e n e T h e r a p y , 2 0 1 5を参照せよ；この内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。イントロンの非限定的な例には、M V M (6 7 ~ 9 7 b p s)、F . I X短縮イントロン1 (3 0 0 b p s)、グロビンS D / 免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプター (2 5 0 b p s)、アデノウイルススプライスドナー / 免疫グロブリンスプライスアクセプター (5 0 0 b p s)、S V 4 0晚期スプライスドナー / スプライスアクセプター (1 9 S / 1 6 S) (1 8 0 b p s)、およびハイブリッドアデノウイルススプライスドナー / I g Gスプライスアクセプター (2 3 0 b p s) が挙げられる。

【0155】

－実施形態では、イントロンは100 ~ 500ヌクレオチドの長さを有し得る。イントロンは、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490または500の長さを有し得る。プロモーターは、80 - 100、80 - 120、80 - 140、80 - 160、80 - 180、80 - 200、80 - 250、80 - 300、80 - 350、80 - 400、80 - 450、80 - 500、200 - 300、200 - 400、200 - 500、300 - 400、300 - 500または400 - 500の長さを有し得る。

【0156】

- －実施形態では、A A Vベクターゲノムは、C M VまたはU 6などのプロモーターを含

み得るが、これに限定されない。非限定的な例として、本発明の *siRNA* 分子の核酸配列を含む *AAV* のプロモーターは、*CMV* プロモーターである。別の非限定的な例として、本発明の *siRNA* 分子の核酸配列を含む *AAV* のプロモーターは、*U6* プロモーターである。

【0157】

一実施形態では、*AAV* ベクターは *CMV* および *U6* プロモーターを含み得る。

一実施形態では、*AAV* ベクターは *CBA* プロモーターを含み得る。

細胞への導入 - 合成 *dsRNA*

siRNA 分子（例えば、*siRNA* 二本鎖および *dsRNA*）の化学的および生物学的安定性を確実にするために、*siRNA* 分子を標的細胞の内部に送達することが重要である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物起源の細胞、ヒト起源の細胞、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、神経幹細胞、および神経前駆細胞を含み得るが、これらに限定されない。

10

【0158】

siRNA を含む核酸は、正常な生理学的条件下で糖-リン酸骨格上に正味の負電荷を有する。細胞に入るためには、*siRNA* 分子は細胞膜の脂質二重層と接触しなければならないが、そのヘッドグループもまた負に帯電している。

【0159】

siRNA 二本鎖は、*siRNA* の細胞取り込みを促進するためにパッケージ粒子のように細胞膜を横切ることができる担体と複合化することができる。パッケージ粒子は、リボソーム、ナノ粒子、カチオン性脂質、ポリエチレンジイミン誘導体、デンドリマー、カーボンナノチューブ、およびカーボンナノ粒子とデンドリマーとの組み合わせを含み得るが、これらに限定されない。脂質は、カチオン性脂質および/または中性脂質であり得る。*siRNA* 分子とカチオン性キャリアとの間に確立された親油性複合体に加えて、*siRNA* 分子は、コレステロールなどの疎水性部分にコンジュゲートすることができる（例えば、米国特許公開第20110110937号；その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。この送達方法は、*siRNA* 分子の *in vitro* 細胞取り込みおよび *in vivo* 薬理学的特性を改善する可能性を秘めている。本発明の *siRNA* 分子は、*MPG*、トランスポーターまたはペネトラチンのような特定のカチオン性細胞浸透性ペプチド（*CPP*）と共有結合または非共有結合されていてもよい（例えば、米国特許公開第20110086425号；その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

20

30

【0160】

細胞への導入 - *AAV* ベクター

本発明の *siRNA* 分子（例えば、*siRNA* 二本鎖）は、ウイルスベクター（例えば、*AAV* ベクター）などを含むがこれに限定されない様々なアプローチのいずれかを用いて細胞に導入することができる。これらのウイルスベクターは、容易にトランスフェクションすることができない細胞への *siRNA* 分子の進入を容易にするように操作され最適化される。また、いくつかの合成ウイルスベクターは、*shRNA* を細胞ゲノムに組み込み、安定した *siRNA* 発現および標的遺伝子の長期ノックダウンをもたらす能力を有する。このようにして、ウイルスベクターは特異的投与のための媒体として設計され、そのようなウイルスベクターは野生型ウイルスに見られる有害な複製および/または組み込みの特徴を欠いている。

40

【0161】

いくつかの実施形態では、本発明の *siRNA* 分子は、親油性担体と、本発明の *siRNA* 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば *AVV* ベクターとを含む組成物に細胞を接触させることによって、細胞に導入される。他の実施形態では、*siRNA* 分子は、細胞内で転写されると *siRNA* 分子を産生することができる核酸配列を含むベクター、例えば *AAV* ベクターで細胞をトランスフェクトするかまたは感染させることによって細胞に導入される。いくつかの実施形態では、*siRNA* 分子は、細胞内で転写される

50

と s i R N A 分子を産生することができる核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターを細胞に注入することによって細胞に導入される。

【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態では、トランスフェクションの前に、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターを細胞にトランスフェクトすることができる。

【 0 1 6 3 】

他の実施形態では、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターは、エレクトロポレーションによって細胞に送達され得る（例えば、米国特許公開第 2 0 0 5 0 0 1 4 2 6 4 号；その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【 0 1 6 4 】

本明細書に記載の s i R N A 分子の核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターを導入するための他の方法は、米国特許公開第 2 0 1 2 0 2 6 4 8 0 7 号に記載されているような光化学的インターナリゼーションを含むことができる；その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 1 6 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、本明細書に記載の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む少なくとも 1 つのベクター、例えば A A V ベクターを含むことができる。一実施形態では、s i R N A 分子は、1 つの標的部位で S O D 1 遺伝子を標的とすることができる。別の実施形態では、製剤は、複数のベクター、例えば A A V ベクターを含み、各ベクターは異なる標的部位で S O D 1 遺伝子を標的とする s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む。S O D 1 は、2、3、4、5 または 5 以上の部位で標的とされ得る。

【 0 1 6 6 】

一実施形態では、以下に限定されるものではないが、ヒト、イヌ、マウス、ラットまたはサルなどの任意の関連種に由来するベクター、例えば A A V ベクターを細胞に導入することができる。

【 0 1 6 7 】

一実施形態において、ベクター、例えば A A V ベクターは、治療される疾患に関連する細胞に導入され得る。非限定的な例として、その疾患は A L S であり、標的細胞は運動ニューロンおよび星状細胞である。

【 0 1 6 8 】

一実施形態では、ベクター、例えば A A V ベクターは、標的配列の高レベルの内因性発現を有する細胞に導入することができる。

別の実施形態では、ベクター、例えば A A V ベクターは、標的配列の低レベルの内因性発現を有する細胞に導入することができる。

【 0 1 6 9 】

一実施形態では、その細胞は、A A V 形質導入の高い効率を有するものであってよい。

医薬組成物および製剤

医薬組成物（s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクター）に加えて、本明細書はヒトへの投与に適した医薬組成物を提供しており、そのような組成物が一般に他の動物、例えばヒト以外の動物、例えば非ヒト哺乳動物、への投与に適していることは、当業者には理解されよう。医薬組成物を種々の動物への投与に適したものにするために、ヒトへの投与に適した医薬組成物の改変はよく理解されており、通常の熟練した獣医学の薬理学者は、もし実験を行なうとすれば、単に通常の実験でこのような改変を設計および／または実施することができる。当該医薬組成物の投与が企図される対象には、ヒトおよび／または他の霊長類；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウスおよび／またはラットのような商業的に関連する哺乳動物を含む哺乳類；および／または家禽、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、および／またはシチメンチョウのような商業的

10

20

30

40

50

に関連する鳥類を含むが、それらに限定されない。

【0170】

いくつかの実施形態では、組成物は、ヒト、ヒトの患者、または対象に投与される。本開示の目的のために、語句「活性成分」は、一般に、合成 s i R N A 二本鎖、s i R N A 二本鎖をコードするベクター（例えば A A V ベクター）、または、本明細書に記載のベクターによって送達される s i R N A 分子のいずれかを指す。

【0171】

本明細書に記載された医薬組成物の製剤は、薬理学の分野において既知または今後開発される任意の方法によって調製することができる。一般に、そのような調製方法は、活性成分を賦形剤および／または1つまたはそれ以上の他の補助成分と会合させる工程を包含し、必要であればおよび／または望ましい場合には、産物を所望の単回投与単位または複数回投与単位に、分割し、成形し、および／または包装する工程をも包含する。

【0172】

本発明による医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤および／または任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、サイズおよび／または状態に依存して変化し、さらに、組成物が投与されるルートに依存して変化する。

【0173】

本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターは、以下を行うために、1種以上の賦形剤を用いて製剤化することができる：(1)安定性を高める；(2)細胞トランスフェクションまたは形質導入を増加させる；(3)持続放出または遅延放出を可能にする；または(4)生体内分布を変える（例えば、ウイルスベクターを特定の組織または脳および運動ニューロンなどの細胞型に標的化する）。

【0174】

本発明の製剤には、限定することなく、生理食塩水、リポイド、リボソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス、コア-シェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、ウイルスベクターでトランスフェクションした細胞（例えば、対象への移植のための細胞）、ナノ粒子模倣物、およびそれらの組み合わせを含めてよい。さらに、本発明のウイルスベクターは、自己組織化核酸ナノ粒子を用いて製剤化してよい。

【0175】

本明細書に記載された医薬組成物の製剤は、薬理学の分野において既知または今後開発される任意の方法によって調製することができる。一般に、そのような調製方法は、有効成分を賦形剤および／または1つまたはそれ以上の他の補助成分と会合させる工程を含む。

【0176】

本開示による医薬組成物は、バルクで、単一の単位用量として、および／または複数の単一単位用量として調製、包装および／または販売されてよい。本明細書では、「単位用量」という語は、所定量の活性成分からなる医薬組成物の個別の量を指す。活性成分の量は、一般的に、対象に投与されるであろう活性成分の用量および／またはこのような用量の特定のニーズを満たす一部分（例えば、そのような用量の半分または三分の一）に等しい。

【0177】

本開示による医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤および／または任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、サイズおよび／または状態に依存して変化し、さらに組成物が投与されるルートに依存して変化する。例えば、組成物は、0.1%~99%(w/w)の有効成分からなっていてよい。一例として、組成物は、0.1%~100%(例えば、0.5~50%、1~30%、5~80%、少なくとも80%(w/w))の活性成分からなっていてよい。

【0178】

いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100

10

20

30

40

50

% 純粋であってよい。いくつかの実施形態において、賦形剤は、ヒトおよび獣医学のための使用が承認されている。いくつかの実施形態において、賦形剤は、米国食品医薬品局によって承認されている。いくつかの実施形態において、賦形剤は、医薬グレードのものである。いくつかの実施形態において、賦形剤は、米国薬局方 (USP)、欧州薬局方 (EP)、英国薬局方および / または国際薬局方の基準を満たす。

【0179】

本明細書では、賦形剤は、所望の特定の剤形に適したものである限り、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散または懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、防腐剤などを含むが、これらに限定されない。医薬組成物を調製するための様々な賦形剤および組成物を調製するための技術は、当該分野で公知である (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006 を参照せよ; その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。任意の従来の賦形剤媒体が、任意の望ましくない生物学的効果を生じさせることによって、あるいは医薬組成物の他の成分 (群) と有害に相互作用することによって、ある物質またはその誘導体と不適合でない限りにおいては、従来の賦形剤媒体の使用は、本開示の範囲内で考えられてよい。

10

【0180】

希釈剤の例には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム乳糖、ショ糖、セルロース、微晶質セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、コーンスターチ、粉末糖等、および / またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0181】

いくつかの実施形態において、製剤は、少なくとも 1 つの不活性成分を含み得る。本明細書中では、「不活性成分」という語は、製剤に含まれる 1 つ以上の不活性薬剤を指す。いくつかの実施形態では、本発明の製剤において使用され得る不活性成分の全てまたは一部は、米国食品医薬品局 (FDA) によって承認されているか、あるいは承認されていない。

30

【0182】

本発明の siRNA 分子の核酸配列を含むベクターの製剤は、カチオンまたはアニオンを含むことができる。一実施形態では、製剤は、限定されないが、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{+} およびそれらの組み合わせなどの金属カチオンを含む。

【0183】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容される塩」は、親化合物が既存の酸または塩基部分をその塩形態に変換することによって修飾される開示化合物の誘導体を指す (例えば、遊離塩基を適切な有機酸と反応させる)。薬学的に許容される塩の例としては、アミンのような塩基性残基の無機または有機酸塩; カルボン酸などの酸性残基のアルカリまたは有機塩; 等が含まれるが、これらに限定されるものではない。代表的な酸付加塩の例としては、酢酸塩、酢酸、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク

40

50

酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩の例には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなど、ならびに非毒性のアンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンカチオンがあり、それらの例には、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどが挙げられるが、これらに限定されない。本開示の薬学的に許容される塩には、例えば非毒性無機または有機酸から形成される親化合物の従来の非毒性塩が含まれる。本開示の薬学的に許容される塩は、塩基性または酸性部分を含む親化合物から、従来の化学的方法によって合成することができる。一般に、このような塩は、これらの化合物の遊離酸または塩基形態を、適切な塩基または酸の化学量論量と、水中または有機溶媒中で、またはその2種の混合物中で反応させることによって調製することができる。一般に、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノールまたはアセトニトリルのような非水性媒体が好ましい。適切な塩のリストは、次を参照のこと。Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, and Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977); これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0184】

本明細書で使用する用語「薬学的に許容される溶媒和物」は、適切な溶媒の分子が結晶格子に組み込まれている本発明の化合物を意味する。適切な溶媒は、投与される投与量で生理学的に許容される。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水、またはそれらの混合物を含む溶液からの結晶化、再結晶化、または沈殿によって調製することができる。適切な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一水和物、二水和物および三水和物）、Nメチルピロリドン（NMP）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N,N'-ジメチルホルムアミド（DMF）、N,N'-ジメチルアセトアミド（DMAC）、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（DMEU）、1,3-ジメチル-3,4,5,6-テトラヒドロ-2-(1H)-ピリミジノン（DMPU）、アセトニトリル（ACN）、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、2-ピロリドン、安息香酸ベンジル等が挙げられる。水が溶媒である場合、溶媒和物は「水和物」と呼ばれる。

【0185】

本発明によれば、本発明の siRNA 分子の核酸配列を含むベクター、例えば AAV ベクターは、CNS 送達のために製剤化することができる。脳血液関門を通過する薬剤を使用することができる。例えば、脳血液関門内皮に siRNA 分子を標的とすることができるいくつかの細胞浸透性ペプチドを用いて、SOD1 遺伝子を標的とする siRNA 二本鎖を製剤化することができる（例えば、Mathupala, Expert Opin Ther Pat., 2009, 19, 137-140; その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0186】

投与

本発明の siRNA 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば AAV ベクターは、治療上有効な結果をもたらす任意の経路によって投与することができる。これらの経路には、腸内（腸内に）、胃腸内、硬膜外（硬膜内に）、経口（口を介して）、経皮、経皮、大脳内（大脳内に）、脳室内（脳室に入る）、皮膚上への塗布（皮膚への塗布）、皮内（皮膚自体の中）、皮下（皮膚の下）、経鼻投与（鼻を通して）、静脈内（静脈内に）、静脈内ポータス、静脈点滴（静脈内に）、動脈（動脈内）、筋肉内（筋肉内に）、心臓内（心臓内に）、骨髓内注入（骨髓内に）、くも膜下腔内（脊柱管内）、腹腔内、（腹腔へ

の輸液または注射)、膀胱内注入、硝子体内、(眼を通して)、海綿内注入(病的腔に)、腔内(陰茎の基部に)、腔内投与、子宮内、追加の羊水投与、経皮(全身分布のために無傷の皮膚を通した拡散)、経粘膜(粘膜を通した拡散)、経腔、吹送(吸入)、舌下、唇下、浣腸、点眼(結膜上)、耳下腺内、耳介(耳の中または耳を介して)、口腔(頬に向かって)、結膜、皮膚、歯(1つの歯または複数)、電気浸透、子宮頸部、内皮内、気管内、体外、血液透析、浸潤、間質性、腹腔内、羊水内、関節内、胆道内、気管支内、気管内、軟骨内(軟骨内)、仙骨内(仙骨内)、大槽内(大槽内の小脳髄腔内)、角膜内(角膜内)、歯内膜内、冠状動脈(冠動脈内)、海綿体内(陰茎の海綿体の膨張可能な空間内)、椎間板内(椎間板内)、導管内(腺管内)、十二指腸内(十二指腸内)、硬膜内(硬膜内またはその下)、表皮内(表皮内に)、食道内(食道に)、胃内(胃の内部に)、歯内組織内(歯肉内)、腹腔内(小腸の遠位部分内)、病巣内(局所の病変内または直接の導入)、管腔内(管の内腔内)、胸腔内(リンパ内)、髄内(骨の骨髓腔内)、髄膜内(髄膜内)、眼内(眼内)、卵巣内(卵巣内)、心膜内(心膜内)、胸膜内(胸膜内)、前立腺内(前立腺内)、肺内(肺または気管支内)、内腔(鼻腔または眼窩洞内)、脊髄内(脊柱内)、滑膜内(関節の滑膜腔内)、肩甲骨内(腱内)、精巣内(睾丸内)、髄腔内(脳脊髄軸の任意のレベルの脳脊髄液内)、胸腔内(胸腔内)、管腔内(器官の細管内)、腫瘍内(腫瘍内)、中耳内(オーロス媒体内)、血管内(血管または血管内)、心室内(心室内)、イオントフォoresis(可溶性塩のイオンが身体の組織に移動する電流)、灌漑(開いた創傷または体腔を浸したり洗い流す)、喉頭(喉頭に直接)、経鼻胃(鼻から胃の中に)、閉塞性包帯技術(局所経路投与後その領域を閉塞する包帯によって覆われる)、眼科(外眼に)、口腔咽頭(口および咽頭に直接)、非経口、経皮、関節周囲、硬膜外、回神経、歯周病、直腸、呼吸器(局所的または全身的效果のために経口または鼻吸入によって気道内に)、眼球後ろ(眼窩の後ろ、または眼球の後ろ)軟組織、くも膜下腔、結膜下、粘膜下層、局所、経胎盤(胎盤を通してまたは胎盤を横切って)、経気管(気管の壁を通して)、胸腔鏡(横隔膜腔を横切って、またはそれを通して)、尿管(尿管内)、尿道(尿道内)、腔、尾骨ブロック、診断、神経ブロック、胆道灌流、心臓灌流、フォトフェーシスまたは脊髄が含まれるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0187】

特定の実施形態では、本発明の siRNA 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば AAV ベクターなどのベクター組成物は、ベクターまたは siRNA 分子が中枢神経系に入り、運動ニューロンに浸透するように投与され得る。

【0188】

いくつかの実施形態では、本発明の siRNA 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば AAV ベクターは、筋肉注射によって投与することができる。Rizvanov らは、変異型ヒト SOD1 mRNA を標的とする siRNA 分子が、SOD1^{G93A} トランスジェニック ALS マウスにおいて、坐骨神経によって取り込まれ、逆行的に運動ニューロンの周辺核に輸送され、且つ変異型 SOD1 mRNA を阻害することを初めて実証した(Rizvanov AA et al., Exp. Brain Res., 2009, 195(1), 1-4; その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。もう一つの研究はまた、変異型 SOD1 遺伝子に対する小ヘアピン RNA (shRNA) を発現する AAV の筋肉伝達が、筋肉および神経支配する運動ニューロンにおいて、有意な変異型 SOD1 ノックダウンの結果をもたらすことを実証した(Towne CE et al., Mol. Ther., 2011; 19(2): 274-283; その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0189】

いくつかの実施形態では、本発明の siRNA 二本鎖を発現する AAV ベクターは、末梢注射および/または鼻腔内投与によって対象に投与することができる。siRNA 二本鎖のための AAV ベクターの末梢投与が中枢神経系、例えば運動ニューロンに輸送され得ることが当該分野で開示された(例えば、米国特許出願公開第 20100240739 号; および第 20100130594 号; これらの各々の内容は、その全体が参照により本

明細書に組み込まれる)。

【0190】

他の実施形態では、本発明の *siRNA* 分子をコードする核酸配列を含む少なくとも1つのベクター、例えば *AAV* ベクターを含む組成物は、頭蓋内投与によって対象に投与され得る(例えば、米国特許第8,119,611号参照;その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0191】

本発明の *siRNA* 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば *AAV* ベクターは、液体溶液または懸濁液として、溶液または溶液中に混濁に適した個体形態として、任意の適切な形態で投与することができる。*siRNA* 二本鎖は、任意の適切な薬学的に許容される賦形剤と共に製剤化され得る。

10

【0192】

本発明の *siRNA* 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば *AAV* ベクターは、「治療的に有効な」量、すなわち、関連する少なくとも1つの症状を緩和および/または予防するために、または疾患の状態の改善を提供するために十分な量で投与することができる。

【0193】

一実施形態では、*ALS* を有する対象の機能および/または生存を改善するために、ベクター、例えば *AAV* ベクターを治療有効量で *CNS* に投与することができる。非限定的な例として、ベクターは、くも膜下腔内に投与され得る。

20

【0194】

一実施形態では、例えば、*AAV* ベクターなどのベクターを、*siRNA* 二本鎖または *dsRNA* が脊髄および/または脳幹内の運動ニューロンおよび星状細胞を標的とするために、治療上有効な量で、対象(例えば、髄腔内投与によって対象の *CNS*)に投与し得る。非限定的な例として、*siRNA* 二本鎖または *dsRNA* は、*SOD1* タンパク質または *mRNA* の発現を減少させることができる。別の非限定的な例として、*siRNA* 二本鎖または *dsRNA* は、*SOD1* を抑制し、*SOD1* 媒介毒性を減少させることができる。*SOD1* タンパク質および/または *mRNA* ならびに *SOD1* 媒介性毒性の低下は、ほとんど炎症が増強されずに達成され得る。

【0195】

一実施形態では、ベクター、例えば *AAV* ベクターは、対象の機能低下を遅らせるために治療有効量で対象(例えば、対象の *CNS*)に投与され得る(例えば、*ALS* 機能評価尺度(*ALSFRS*)などの既知の評価方法を使用して決定される)および/または対象の人工呼吸器非依存生存期間を延長する(例えば、死亡率の減少または呼吸支援の必要性)。非限定的な例として、ベクターは、くも膜下腔内に投与され得る。

30

【0196】

一実施形態では、ベクター、例えば *AAV* ベクターは、脊髄運動ニューロンおよび/または星状細胞を形質導入するために、治療有効量を大槽に投与され得る。非限定的な例として、ベクターは、くも膜下腔内に投与され得る。

【0197】

一実施形態において、ベクター、例えば *AAV* ベクターは、脊髄運動ニューロンおよび/または星状細胞を形質導入するために、治療有効量を、髄腔内注入を用いて投与され得る。非限定的な例として、ベクターは、くも膜下腔内に投与され得る。

40

【0198】

一実施形態では、調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えば *AAV* ベクターを製剤化することができる。非限定的な例として、製剤の塩基性および/または浸透圧は、中枢神経系または中枢神経系の領域または成分における最適な薬物分布を確実にするように最適化され得る。

【0199】

一実施形態では、調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えば *AAV* ベクターは、単

50

一の経路投与によって対象に投与され得る。

一実施形態では、調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターは、多部位投与経路を介して対象に投与され得る。対象は、2、3、4、5またはそれ以上の部位に調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターを投与され得る。

【0200】

一実施形態では、対象に、ボーラス注入を用いて本発明に記載の調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターを投与することができる。

一実施形態では、対象は、数分、数時間または数日間にわたる持続的投与を用いて本発明に記載の調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターを投与され得る。注入速度は、対象、分布、製剤または別の送達パラメータに応じて変化され得る。

10

【0201】

一実施形態では、複数部位への投与のために、カテーテルを脊椎の2つ以上の部位に配置され得る。調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターは、連続および/またはボーラス注入で投与され得る。投与の各部位は異なる投薬レジメンであってもよく、または同じ投薬レジメンを投与部位ごとに使用してよい。非限定的な例として、投与部位は、頸部および腰部領域にあり得る。別の非限定的な例として、投与部位は子宮頸部領域にあり得る。別の非限定的な例として、投与部位は、腰部領域にあり得る。

【0202】

一実施形態では、対象は、本明細書に記載の調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターの投与前に、脊椎の解剖学的構造および病理について分析され得る。非限定的な例として、脊柱側弯症を有する対象は、脊柱側弯症を伴わない対象と比較して、異なる投薬レジメンおよび/またはカテーテルの位置を有し得る。

20

【0203】

一実施形態では、調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターの投与中の対象の脊椎の向きは、地面に対して垂直であり得る。

別の実施形態では、調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターの投与中の対象の脊椎の向きは、地面に対して水平であり得る。

【0204】

一実施形態では、対象の脊椎は、調節ポリヌクレオチドを含むベクター、例えばA A Vベクターの投与の間に地面と比較してある角度であり得る。地面と比較し、対象の脊椎の角度は少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150または180度であり得る。

30

【0205】

一実施形態において、投与方法および持続時間は、脊椎における広範な形質導入を提供するように選択される。非限定的な例として、髄腔内投与は、脊椎の吻側 - 尾側の長さに沿って広い形質導入を提供するために使用される。別の非限定的な例として、複数部位注入は、脊椎の吻側 - 尾側の長さに沿ってより均一な形質導入を提供する。さらに別の非限定的な例として、長期の注入により、脊椎の吻側 - 尾側の長さに沿ってより均一な形質導入を提供する。

【0206】

投薬 (Dosing)

本発明の医薬組成物は、SOD1関連障害の低減、予防および/または治療に有効な任意の量を用いて対象に投与することができる (例えば、ALS)。正確な必要量は、対象の動物種、年齢、および全体的な状態、疾患の重篤度、特定の組成物、その投与様式、その活性様式などに依存して、対象によって異なるであろう。

【0207】

本発明の組成物は、典型的には、投与の容易さおよび投与量の均一性のために、単位剤形で製剤化される。しかし、本発明の組成物の1日総使用量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定され得ることが理解されるであろう。任意の特定の患者に対する特異的治療有効性は、治療される障害および障害の重症度を含む様々な要因に依存する；

40

50

使用される特定の化合物の活性；使用される特定の組成物；患者の年齢、体重、全般的な健康状態、性別および食事；投与時間、投与経路、および使用される s i R N A 二本鎖の排泄速度；治療の持続時間；使用される特定の化合物と組み合わせるまたは同時に使用される薬物；および医学分野でよく知られている同様の要因を含む。

【0208】

一実施形態では、対象の年齢および性別を用いて、本発明の組成物の用量を決定することができる。非限定的な例として、高齢対象は、若年対象と比較して組成物のより多くの投与を受け得る（例えば、5 - 10 %、10 - 20 %、15 - 30 %、20 - 50 %、25 - 50 % または少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 90 % 以上）。別の非限定的な例として、若年対象は、高齢対象と比較して組成物のより多くの投与量を受け得る（例えば、5 ~ 10 %、10 ~ 20 %、15 ~ 30 %、20 ~ 50 %、25 ~ 50 % または少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 90 % 以上）。さらに別の非限定的な例として、女性対象は、男性対象と比較してより多い用量の組成物を受け得る（例えば、5 ~ 10 %、10 ~ 20 %、15 ~ 30 %、20 ~ 50 %、25 ~ 50 % または少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 90 % 以上）。さらに別の非限定的な例として、男性対象は、女性対象と比較してより多い用量の組成物を受け得る（例えば、5 ~ 10 %、10 ~ 20 %、15 ~ 30 %、20 ~ 50 %、25 ~ 50 % または少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 90 % 以上）。

【0209】

いくつかの特定の実施形態では、本発明の s i R N A 二本鎖を投与するための A A V ベクターの用量は、疾患状態、対象および治療戦略に応じて適合させることができる。

一実施形態では、本発明による組成物の細胞への投与は、V G をウイルスゲノム、V G / m L を組成物濃度、m L / 時間を延長された投与の速度とすると、 $[V G / 時間 = m L / 時間 * V G / m L]$ によって定義される送達速度から成る。

【0210】

一実施形態では、本発明による組成物の細胞への送達は、対象あたりの総濃度が約 1×10^6 V G から約 1×10^{16} V G の間であり得る。いくつかの実施形態では、送達は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 2.1×10^{11} 、 2.2×10^{11} 、 2.3×10^{11} 、 2.4×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 2.6×10^{11} 、 2.7×10^{11} 、 2.8×10^{11} 、 2.9×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 7.1×10^{11} 、 7.2×10^{11} 、 7.3×10^{11} 、 7.4×10^{11} 、 7.5×10^{11} 、 7.6×10^{11} 、 7.7×10^{11} 、 7.8×10^{11} 、 7.9×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.1×10^{12} 、 1.2×10^{12} 、 1.3×10^{12} 、 1.4×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 1.6×10^{12} 、 1.7×10^{12} 、 1.8×10^{12} 、 1.9×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 8.1×10^{12} 、 8.2×10^{12} 、 8.3×10^{12} 、 8.4×10^{12} 、 8

、 5×10^{12} 、 $8 \cdot 6 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 7 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 8 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 9 \times 10^{12}$ 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 $6 \cdot 7 \times 10^{13}$ 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 、または 1×10^{16} VG / 対象の組成物濃度であり得る。

【0211】

一実施形態では、本発明による組成物の細胞への送達は、対象あたりの総濃度が約 1×10^6 VG / kg から 1×10^{16} VG / kg の間である。いくつかの実施形態では、投与は、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 $2 \cdot 1 \times 10^{11}$ 、 $2 \cdot 2 \times 10^{11}$ 、 $2 \cdot 3 \times 10^{11}$ 、 $2 \cdot 4 \times 10^{11}$ 、 $2 \cdot 5 \times 10^{11}$ 、 $2 \cdot 6 \times 10^{11}$ 、 $2 \cdot 7 \times 10^{11}$ 、 $2 \cdot 8 \times 10^{11}$ 、 $2 \cdot 9 \times 10^{11}$ 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 $7 \cdot 1 \times 10^{11}$ 、 $7 \cdot 2 \times 10^{11}$ 、 $7 \cdot 3 \times 10^{11}$ 、 $7 \cdot 4 \times 10^{11}$ 、 $7 \cdot 5 \times 10^{11}$ 、 $7 \cdot 6 \times 10^{11}$ 、 $7 \cdot 7 \times 10^{11}$ 、 $7 \cdot 8 \times 10^{11}$ 、 $7 \cdot 9 \times 10^{11}$ 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 $1 \cdot 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 2 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 3 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 4 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 5 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 6 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 7 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 8 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 9 \times 10^{12}$ 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 $4 \cdot 1 \times 10^{12}$ 、 $4 \cdot 2 \times 10^{12}$ 、 $4 \cdot 3 \times 10^{12}$ 、 $4 \cdot 4 \times 10^{12}$ 、 $4 \cdot 5 \times 10^{12}$ 、 $4 \cdot 6 \times 10^{12}$ 、 $4 \cdot 7 \times 10^{12}$ 、 $4 \cdot 8 \times 10^{12}$ 、 $4 \cdot 9 \times 10^{12}$ 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 $8 \cdot 1 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 2 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 3 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 4 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 5 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 6 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 7 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 8 \times 10^{12}$ 、 $8 \cdot 9 \times 10^{12}$ 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 $6 \cdot 7 \times 10^{13}$ 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} または 1×10^{16} VG / kg の組成物濃度であり得る。

【0212】

一実施形態では、1用量あたり約 10^5 から 10^6 ウイルスゲノム(単位)を投与することができる。

一実施形態では、本発明による組成物の細胞への投与は、約 1×10^6 VG / mL から 1×10^{16} VG / mL である。いくつかの実施形態において、投与は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 $1 \cdot 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \cdot 2 \times 10^{12}$

、 1.3×10^{12} 、 1.4×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 1.6×10^{12} 、 1.7×10^{12} 、 1.8×10^{12} 、 1.9×10^{12} 、 2×10^{12} 、 2.1×10^{12} 、 2.2×10^{12} 、 2.3×10^{12} 、 2.4×10^{12} 、 2.5×10^{12} 、 2.6×10^{12} 、 2.7×10^{12} 、 2.8×10^{12} 、 2.9×10^{12} 、 3×10^{12} 、 3.1×10^{12} 、 3.2×10^{12} 、 3.3×10^{12} 、 3.4×10^{12} 、 3.5×10^{12} 、 3.6×10^{12} 、 3.7×10^{12} 、 3.8×10^{12} 、 3.9×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 6.7×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 、または 1×10^{16} V G / m L の組成物濃度であり得る。

【0213】

特定の実施形態では、所望の s i R N A 二本鎖用量は、複数の投与を用いて投与され得る（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14またはそれ以上の投与）。複数の投与を行なう場合、本明細書に記載されているような分割投与計画を使用することができる。本明細書で使用される「分割投与量」は、単回用量または一日総用量の2つ以上の用量への分割、例えば単回用量の2回以上の投与である。本明細書で使用される「単一単位用量」は、1回分用量／一回／1つの経路／1つの接触点で投与される任意の調節ポリヌクレオチド治療剤の用量、すなわち単回投与である。本明細書中使用される場合、「1日の総投与量」は、24時間に与えられる、または処方される量である。それは単一単位用量として投与することができる。一実施形態では、本発明の調節性ポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは、分割用量で対象に投与される。それらは、緩衝液中でのみ、または本明細書に記載の製剤中で製剤化することができる。

【0214】

A L S の治療方法

本発明に示されるのは、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターを細胞に導入する方法であって、該方法は、標的 S O D 1 m R N A の分解が起こるのに十分な量の該ベクターのいずれかを前記細胞に導入し、それにより細胞内の標的特異的 R N A i を活性化することを含む。いくつかの態様において、細胞は、幹細胞、運動ニューロンなどのニューロン、筋細胞、および星状細胞などのグリア細胞であり得る。

【0215】

本発明には、治療を必要とする対象における異常な S O D 1 機能に関連する A L S を治療するための方法が開示される。該方法は、必要に応じて、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む少なくともベクター、例えば A A V ベクターを含む組成物の治療有効量を対象に投与することを含む。非限定的な例として、s i R N A 分子は、A L S が治療的に処置されるように、S O D 1 遺伝子発現をサイレンシングさせ、S O D 1 タンパク質産生を阻害し、対象における A L S の1つ以上の症状を減少させることができる。

【0216】

いくつかの実施形態において、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターを含む組成物は、対象の中枢神経系に投与される。他の実施形態では、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターを含む組成物は、対象の筋肉に投与される。

【0217】

特に、本発明の s i R N A 分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば A A V ベクターは、運動ニューロン、星状膠細胞および小膠細胞を含むグリア細胞、および／また

はT細胞のようなニューロンを囲む他の細胞を含む特定のタイプの標的細胞に投与され得る。ヒトのALS患者および動物のSOD1 ALSモデルにおける研究は、グリア細胞が運動ニューロンの機能不全および死において初期の影響を与えることを暗示している。周囲の保護グリア細胞中の正常なSOD1は、変異SOD1が運動ニューロンに存在するにもかかわらず、運動ニューロンが死ぬのを防ぐことができる(例えば、Phillips and Rothstein, Exp. Neurol., 2014, May 22, pii: S0014-4886(14)00157-5によるレビュー;その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0218】

いくつかの特定の実施形態では、本発明のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えばAAVベクターは、ALSの治療法として使用することができる。

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、ALSの治療のための単独療法または併用療法として投与される。

【0219】

SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二本鎖をコードするベクター、例えばAAVベクターは、1つ以上の他の治療剤と組み合わせて使用することができる。「~と組み合わせて」とは、薬剤を同時に投与しなければならないこと、および/または共に投与するように製剤化しなければならないことを暗示することを意図するものではない。尤も、これらの投与方法は本開示の範囲内である。組成物は、1つまたはそれ以上の他の所望の治療または医療処置と同時に、その前に、またはその後に投与することができる。一般に、各薬剤は、その薬剤について決定された用量および/または時間スケジュールで投与される。

【0220】

本発明のsiRNA分子の核酸配列をコードするベクター、例えばAAVベクターと組み合わせて使用され得る治療剤は、抗酸化剤、抗炎症剤、抗アポトーシス剤、カルシウム調節剤、抗グルタミン酸作動薬、構造タンパク質阻害剤、および金属イオン調節に關与する化合物の、小分子化合物であり得る。

【0221】

本明細書に記載されるベクターと組み合わせて使用され得る、ALSを治療するために試験される化合物としては、限定されるものではないが、以下が含まれる。抗グルタミン酸作動薬：リルゾール、トピラメート、タラパネル、ラモトリギン、デキストロメトルファン、ガバペンチンおよびAMPA拮抗薬；抗アポトーシス剤：ミノサイクリン、フェニル酪酸ナトリウムおよびアリモクロモール；抗炎症剤：ガングリオシド、セレコキシブ、シクロスポリン、アザチオプリン、シクロホスファミド、プラズマフォレシス、グラチラマー酢酸塩およびサリドマイド；セフトリアキソン(Berry et al., PLoS One, 2013, 8(4))；ベータラクタム抗生物質；ブラミベキソール(ドーパミンアゴニスト)(Wang et al., Amyotrophic Lateral Scler., 2008, 9(1), 50-58)；米国特許公開第20060074991号のニメスリド；米国特許公開第20130143873号に開示されているジアゾキシド)；米国特許出願公開第20080161378号で開示されたラゾロン誘導体；酸化ストレス誘発細胞死を阻害するフリーラジカルスカベンジャー、例えばプロモクリプチン(米国特許公開第20110105517号)；PCT特許公開第2013100571号で議論されたフェニルカルバメート化合物；例えば、米国特許第6,933,310号および第8,399,514号ならびに米国特許公報第20110237907号および第20140038927号で開示された神経保護化合物；および米国特許公開第20070185012号に教示される糖ペプチド；これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0222】

本発明のsiRNA分子の核酸配列をコードするベクター(例えば、AAVベクター)との併用療法で使用され得る治療剤は、神経細胞喪失を保護することができるホルモンま

たは変異体であり得、例えば、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）またはその断片など（米国特許公開第20130259875号）；エストロゲン（例えば、米国特許第6,334,998号および第6,592,845号）であり；これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0223】

神経栄養因子は、ALSを治療するための本発明のsiRNA分子の核酸配列をコードするベクター、例えばAAVベクターとの併用療法において使用され得る。一般的に、神経栄養因子は、ニューロンの生存、成長、分化、増殖および/または成熟を促進する物質、またはニューロンの活性の増加を刺激する物質と定義される。いくつかの実施形態では、本方法は、治療を必要とする対象への1つ以上の栄養因子の送達をさらに含む。栄養因子としては、IGF-I、GDNF、BDNF、CNTF、VEGF、コリベリン、サリプロデン、チロトロピン放出ホルモンおよびADNF、ならびにそれらの変異体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0224】

ひとつの態様では、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二本鎖の核酸配列をコードするベクター、例えばAAVベクターは、AAV-IGF-Iのような神経栄養因子を発現するAAVベクターやAAV-GDNFと同時投与することができる（Vincent et al., 神経分子医学, 2004, 6, 79-85；その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）および（Wang et al., J Neurosci., 2002, 22, 6920-6928；その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

20

【0225】

いくつかの実施形態では、ALSを治療するための本発明の組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、くも膜下腔内および/または脳室内に必要な対象に投与され、siRNA分子またはsiRNA分子を含むベクターが、血液脳関門および血液脊髄障壁の一方または両方を通過することを可能にする。いくつかの態様では、この方法は、対象の中樞神経系（CNS）に本発明のsiRNA分子の核酸配列をコードするベクター、例えばAAVベクターを含む組成物を、治療上有効な量を直接（例えば、輸液ポンプおよび/または投与足場を使用して）投与する方法（例えば、脳室内投与および/または髄腔内投与）を含む。このベクターは、ALSが治療的に処置されるように、SOD1遺伝子発現をサイレンシングするかまたは抑制し、および/または対象におけるALSの1つ以上の症状を減少させるために使用され得る。

30

【0226】

ある態様では、治療された対象において、運動ニューロン変性、筋力低下、筋萎縮、筋肉硬化、呼吸困難、発語の不明瞭化、線維束性攣縮の発症、前頭側頭型認知症および/または早発死を含むがこれらに限定されないALSの症状が改善される。他の態様において、本発明の組成物は、脳および脊髄の一方または両方に適用される。他の態様において、筋肉協調および筋肉機能の一方または両方が改善される。他の態様において、対象の生存が延長される。

【0227】

一実施形態では、ベクター、例えば本発明のsiRNAをコードするAAVベクターを対象に投与することにより、対象のCNS中の変異型SOD1を減少させ得る。別の実施形態では、対象へのベクター、例えばAAVベクターの投与は、対象のCNSにおける野生型SOD1を減少させ得る。さらに別の実施形態では、対象へのベクター、例えばAAVベクターの投与は、対象のCNSにおける変異型SOD1および野生型SOD1の両方を減少させ得る。突然変異体SOD1および/または野生型SOD1は、CNS、CNSの領域、または対象のCNSの特定の細胞において、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%

40

50

、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100%または95～100%減少し得る。非限定的な例として、ベクター、例えばAAVベクターは、運動ニューロン（例えば、腹側角運動ニューロン）および/または星状細胞において、野生型SOD1の発現を少なくとも50%低下させ得る。別の非限定的な例として、ベクター、例えばAAVベクターは、運動ニューロン（例えば、腹側角運動ニューロン）および/または星状細胞において少なくとも50%変異SOD1の発現を低下させ得る。さらに別の非限定的な例として、ベクター、例えばAAVベクターは、運動ニューロン（例えば、腹側角運動ニューロン）および/または星状細胞において、野生型SOD1および変異型SOD1の発現を少なくとも50%低下させ得る。

10

【0228】

一実施形態では、対象へのベクター、例えばAAVベクターの投与は、脊髄における突然変異体および/または野生型SOD1の発現を低下させ、突然変異体および/または野生型SOD1の発現の低下は、対象におけるALSの影響を低減させる。

【0229】

一実施形態では、ベクター、例えばAAVベクターは、ALSの初期段階にある対象に投与することができる。初期段階の症状には、衰弱して軟弱なまたは硬く堅固で痙攣した筋肉、筋肉のけいれんおよび引きつり（線維束性収縮）、筋肉量の喪失（萎縮）、疲労、平衡感覚異常、不明瞭な発語、握力低下、および/または歩行時のつまずきなどが含まれるがこれに限定されない。症状は1つの身体領域に限定されるか、または軽度の症状が複数の領域に現れる場合がある。非限定的な例として、ベクター、例えばAAVベクターの投与は、ALSの症状の重篤度および/または発生を低減し得る。

20

【0230】

一実施形態において、ベクター、例えばAAVベクターは、ALSの中期段階にある対象に投与され得る。ALSの中期段階は、初期段階と比較してより広範な筋肉症状を含んでおり、ある筋肉には麻痺が出る一方、他の筋肉は衰弱しているか影響されず継続的な筋肉の引きつり（線維束性収縮）があり、使用されない筋肉が、関節が硬く痛みを伴って時には変形するような拘縮を引き起こし、嚥下筋肉の衰弱が、窒息を引き起こしたり、摂食や唾液の対処がより困難になったりし、呼吸筋の衰弱が、特に横になった時に呼吸不全を引き起こし、および/または、制御不能かつ不適切な笑いまたは泣き（情動調節障害）の発作を有し得るが、これらに限定されない。非限定的な例として、ベクター、例えばAAVベクターの投与は、ALSの症状の重篤度および/または発生を低減し得る。

30

【0231】

一実施形態において、ベクター、例えばAAVベクターは、ALSの後期段階にある対象に投与され得る。ALSの後期段階は、ほとんど麻痺した随意筋を含み、肺の内外への空気の移動を補助する筋肉が著しく損なわれる、可動性が非常に限られる、不十分な呼吸が、疲労、あいまいな思考、頭痛、および、感染症または疾患（例えば、肺炎）に対する易罹患性を引き起こし、発語が困難になり、口での飲食が不可能になり得るが、これらに限定されない。

40

【0232】

一実施形態では、ベクター、例えばAAVベクターは、C9orf72の突然変異を有するALS患者を治療するために使用され得る。

一実施形態では、ベクター、例えばAAVベクターは、TDP-43の突然変異を有するALS患者を治療するために使用され得る。

【0233】

一実施形態では、ベクター、例えばAAVベクターは、FUS変異を有するALS患者

50

を治療するために使用され得る。

定義

他に記載がない限り、以下の用語およびフレーズは、以下に説明する意味を有する。この定義は本質的に限定することを意味するものではなく、本発明の特定の態様をより明確に理解するのに役立つ。

【0234】

本明細書で使用される「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含む）またはポリリボヌクレオチド（D-リボースを含む）のいずれか、または、プリンもしくはピリミジン塩基または修飾されたプリンもしくはピリミジン塩基のNグリコシドである他のタイプのポリヌクレオチドからなる任意の核酸ポリマーを指す。「核酸」という語、「ポリヌクレオチド」という語、および「オリゴヌクレオチド」という語の間には、その長さに意図された区別はなく、これらの用語は互換的に使用される。これらの語は、分子の一次構造のみを指す。したがって、これらの語は、二本鎖および一本鎖DNA、ならびに二本鎖および一本鎖RNAを含む。

10

【0235】

本明細書で使用される「RNA」または「RNA分子」または「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を指す；用語「DNA」または「DNA分子」または「デオキシリボ核酸分子」は、デオキシリボヌクレオチドのポリマーを指す。DNAおよびRNAは、例えば、DNA複製およびDNAの転写によって、それぞれ天然に合成することができ、また化学的に合成することもできる。DNAおよびRNAは、一本鎖（すなわち、それぞれssRNAまたはssDNA）または複数鎖（例えば、二本鎖、すなわちdsRNAおよびdsDNA）であり得る。本明細書で使用されている「mRNA」または「メッセンジャーRNA」という語は、1つまたはそれ以上のポリペプチド鎖のアミノ酸配列をコードする一本鎖RNAを指す。

20

【0236】

本明細書で使用される「RNA干渉」または「RNAi」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または干渉または「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調節機構を指す。RNAiは、植物、動物およ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。RNAiは、外来RNA（例えば、ウイルスRNA）を自然に除去するために細胞内で自然発生する。天然RNAiは、他の類似のRNA配列に分解機構を移動させる遊離dsRNAから切断された断片を介して進行する。RNAiは、RNA誘発サイレンシング複合体（RISC）によって制御され、細胞の細胞質内の短鎖/低分子dsRNA分子によって開始され、触媒性RISC成分であるアルゴニン酸と相互作用する。dsRNA分子は外因的に細胞に導入することができる。外因性dsRNAは、リボヌクレアーゼタンパク質Dicerを活性化することによってRNAiを開始させ、dsRNAを結合および切断して、各末端に少数の不對オーバーハング塩基を有する21-25塩基対の二本鎖断片を生成する。これらの短い二本鎖断片は、低分子干渉RNA（siRNA）と呼ばれる。

30

【0237】

本明細書中で使用される場合、用語「短分子干渉RNA」、「低分子干渉RNA」または「siRNA」は、RNAiを案内または仲介することができる約5~60ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を含むRNA分子（またはRNA類似体）を指す。好ましくは、siRNA分子は、約15-30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、約16-25ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、約18-23ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、約19-22ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）（例えば、19、20、21または22ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体）、約19-25ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、および約19-25ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を含む。「短い」siRNAという語は、5~23ヌクレオチド、好ましくは21ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、例えば19、20、2

40

50

1 または 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 という語は、2
4 ~ 60ヌクレオチド、好ましくは約 24 ~ 25ヌクレオチド、例えば 23, 24, 25
、または 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ならば、19ヌクレオチド未
満（例えば、16, 17または18ヌクレオチド、または5ヌクレオチド未満）を含み得
る。同様に、より長い s i R N A が、R N A i 媒介する能力を保持する限り、または短い
s i R N A へのさらなるプロセッシング（例えば、酵素プロセッシング）を欠く翻訳抑制を保
持する限り、長い s i R N A は、いくつかの例では、26を超えるヌクレオチド（例えば
、27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55、またはさらには60ヌクレ
オチド）を含み得る。s i R N A は、一本鎖 R N A 分子（s s - s i R N A ）または二本
鎖 R N A 分子（d s - s i R N A ）であり得、これらは、s i R N A 二本鎖と呼ばれる二
本鎖構造を形成するようにハイブリダイズされたセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。

10

20

30

40

50

【0238】

本明細書中で使用される場合、s i R N A 分子の「アンチセンス鎖」または「第1鎖」
または「ガイド鎖」という用語は、サイレンシングのために標的とされる遺伝子の m R N A
の約 10 ~ 50ヌクレオチドの部分、例えば、約 15 - 30、16 - 25、18 - 23
または 19 - 22ヌクレオチド、に対して実質的に相補的な鎖を指す。アンチセンス鎖ま
たは第1の鎖は、標的特異的サイレンシングを導くために所望の標的 m R N A 配列に十分
相補的な配列を有し、例えば、R N A i の機構またはプロセスによって所望の標的 m R N A
の破壊を引き起こすのに十分な相補性を有する。

【0239】

本明細書中で使用される場合、s i R N A 分子の「センス鎖」または「第2鎖」または
「パッセンジャー鎖」という用語は、アンチセンス鎖または第1鎖に相補的な鎖を指す。
s i R N A 分子のアンチセンス鎖およびセンス鎖は、二本鎖構造を形成するようにハイブ
リダイズされる。本明細書中で使用される場合、「s i R N A 二本鎖」は、サイレンシン
グの標的となる遺伝子の m R N A の約 10 ~ 50ヌクレオチドの部分に十分な相補性を有
する s i R N A 鎖、およびこの s i R N A 鎖と二本鎖を形成するのに十分な相補性を有す
る s i R N A 鎖を含む。

【0240】

本明細書中で使用される場合、用語「相補的」は、互いに塩基対を形成するポリヌクレ
オチドの能力を指す。塩基対は、典型的には、逆平行ポリヌクレオチド鎖中のヌクレオチ
ド単位間の水素結合によって形成される。相補的ポリヌクレオチド鎖は、ワトソン・クリ
ック様式（例えば、Tに対するA、Uに対するA、Gに対するC）、または二本鎖の形成
を可能にする他の任意の様式で塩基対を形成することができる。当業者が認識しているよ
うに、DNAでなくRNAを用いる場合、チミンではなくウラシルがアデノシンに相補的
であると考えられる塩基である。しかし、Uが本発明の文脈において示される場合、特に
断らない限り、Tを置換する能力が示唆されている。完全な相補性または100%相補性
は、1つのポリヌクレオチド鎖の各ヌクレオチド単位が第2のポリヌクレオチド鎖のヌク
レオチド単位と水素結合を形成し得る状況を指す。完全な相補性よりも低いというのは、
2本の鎖のヌクレオチド単位の一部が、すべてではないが互いに水素結合を形成し得る状
況を指す。例えば、2つの20量体について、各鎖上の2つの塩基対のみが互いに水素結
合を形成し得る場合、ポリヌクレオチド鎖は10%の相補性を示す。同じ例において、各
鎖上の18個の塩基対が相互に水素結合を形成することができる場合、ポリヌクレオチ
ド鎖は90%の相補性を示す。

【0241】

本明細書で使用されている「実質的に相補的」という語は、s i R N A が、所望の標的
m R N A と結合し、標的 m R N A の R N A サイレンシングを引き起こすのに十分な配列（
例えば、アンチセンス鎖中に）を有することを意味する。

【0242】

本明細書中で使用されている「標的設定」という語は、標的核酸にハイブリダイズし所

望の効果を誘導する核酸配列の設計および選択のプロセスを意味する。

「遺伝子発現」という用語は、核酸配列が首尾よく転写されるプロセスを指し、そしてほとんどの場合翻訳されてタンパク質またはペプチドを産生することを指す。分かりやすく言えば、「遺伝子発現」の測定を参照する場合、これは、測定値が転写の核酸産物（例えば、RNAまたはmRNA）由来であるか、あるいは翻訳のアミノ酸産物（例えば、ポリペプチドまたはペプチド）由来であることを意味すると理解されるべきである。RNA、mRNA、ポリペプチドおよびペプチドの量またはレベルを測定する方法は、当技術分野で周知である。

【0243】

本明細書で使用される場合、用語「突然変異」は、遺伝子の構造の任意の変化を指し、その結果、次世代に伝達され得る変異体（「突然変異体」とも呼ばれる）の形態をもたらすことを指す。遺伝子の突然変異は、DNA中の単一塩基の変化、または遺伝子または染色体のより大きな部分の欠失、挿入、または再編成によって引き起こされ得る。

【0244】

本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、本発明のsiRNA分子のような異種分子を輸送、形質導入またはそうでなければその担体として作用する任意の分子または部分を意味する。「ウイルスベクター」は、目的の分子、例えば導入遺伝子をコードするかまたは含む1つまたは複数のポリヌクレオチド領域を含んでおり、1つのポリペプチドまたは複数のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNA（siRNA）のような調節核酸を含むベクターである。ウイルスベクターは、遺伝物質を細胞に投与するために一般に使用される。ウイルスベクターは、特定の用途のためにしばしば改変される。ウイルスベクターの種類には、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターが含まれる。

【0245】

本明細書で使用される「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」または「AAVベクター」という用語は、アデノ随伴ベクターの成分を含むかまたはそれから派生し、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞に感染するのに適した任意のベクターを指す。用語AAVベクターは、典型的には、siRNA二本鎖をコードする核酸分子を含むAAV型ウイルス粒子またはビリオンを示す。AAVベクターは、血清型の組み合わせ（すなわち、「偽型」AAV）または種々のゲノム（例えば、一本鎖または自己相補性）を含む種々の血清型に由来し得る。さらに、AAVベクターは複製欠損および/または標的化されていてもよい。

【0246】

本明細書において、「遺伝子の発現を阻害する」という句は、遺伝子の発現産物の量を減少させることを意味する。発現産物は、遺伝子から転写されたRNA分子（例えば、mRNA）またはその遺伝子から転写されたmRNAから翻訳されたポリペプチドである。典型的には、mRNAレベルの低下は、それから翻訳されるポリペプチドのレベルの低下をもたらす。発現レベルは、mRNAまたはタンパク質を測定するための標準的な技術を用いて決定することができる。

【0247】

本明細書中で使用される場合、用語「in vitro」は、例えば、生物の中ではなく試験管または反応容器中、細胞培養中、ペトリ皿中などの人工環境（例えば、動物、植物または微生物）において生じる事象を指す。

【0248】

本明細書で使用される「in vivo」という用語は、生物内（例えば、動物、植物、または微生物、またはそれらの細胞もしくは組織）で起こる事象を指す。

本明細書で使用する「修飾（改変）された」という用語は、本発明の分子の変化した状態または構造を指す。分子は、化学的、構造的、および機能的に多くの態様で修飾することができる。

【0249】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、用語「合成」は、人間の手によって製造、調製、および／または製造されることを意味する。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたはその他の分子の合成は、化学的または酵素的であってもよい。

【0250】

本明細書中で使用される場合、用語「トランスフェクション」は、外因性核酸を細胞に導入する方法を指す。トランスフェクションの方法には、化学的方法、物理的处理およびカチオン性脂質または混合物が含まれるが、これらに限定されない。細胞にトランスフェクトすることができる薬剤のリストは大きく、*siRNA*、センスおよび／またはアンチセンス配列、1つまたは複数の遺伝子をコードして発現プラスミドに編成されたDNA、タンパク質、タンパク質断片、その他を含むが、これに限定されない。

10

【0251】

本明細書中で使用される場合、「オフターゲット」とは、任意の1つ以上の標的、遺伝子または細胞転写産物に対する任意の意図しない効果をいう。

本明細書で使用される「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題または合併症を伴わずにヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに適していると同時に合理的な利益／リスク比に見合った化合物、材料、組成物および／または投薬形態を指す。

【0252】

本明細書中で使用される場合、薬剤の「有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果、例えば臨床結果をもたらすのに十分な量であり、したがって「有効量」は、それが適用される状況に依存する。例えば、ALSを治療する薬剤を投与する状況において、薬剤の有効量は、例えば、薬剤の投与なしで得られた応答と比較して、ALSの本明細書で定義されるような治療を達成するのに十分な量のことである。

20

【0253】

本明細書中で使用される場合、用語「治療有効量」は、疾患、障害および／または状態に罹患しているかまたは罹患しやすい対象に投与される場合に、感染症、疾患、障害および／または状態を治療し、その症状を改善し、診断し、予防し、および／または、その発症を遅らせるために十分な、投与される薬剤（例えば、核酸、薬物、治療薬、診断薬、予防薬など）の量を意味する。

【0254】

30

本明細書中で使用される場合、用語「対象」または「患者」は、本発明による組成物が投与され得る任意の生物を指すのであって、例えば、実験的、診断的、予防的および／または治療的目的のためのものである。典型的な対象には、動物および／または植物（例えば、マウス、ラット、ウサギなどの哺乳動物、チンパンジーのような非ヒト霊長類、およびその他の類人猿およびサル種、およびヒト）が含まれる。

【0255】

本明細書中で使用される場合、用語「予防する」または「予防」は、状態または疾患の発症、進行または悪化を、数週間、数ヶ月または数年を含む期間、遅延または防止することを指す。

【0256】

40

本明細書で使用する「治療」または「治療する」という用語は、疾患の治療または改善に使用される1つまたは複数の特定の手順の適用を指す。特定の実施形態では、特定の手順は、1つ以上の医薬品の投与である。本発明の文脈において、特定の手順は、SOD1遺伝子を標的とする1つ以上の*siRNA*二本鎖またはコードされた*dsRNA*の投与である。

【0257】

本明細書で使用される場合、用語「改善」または「改善する」は、状態または疾患の、少なくとも1つの指標の重篤度を軽減することを指す。例えば、神経変性障害の文脈において、改善には、ニューロン損失の減少が含まれる。

【0258】

50

本明細書中で使用される場合、用語「投与する」は、対象に医薬品または組成物を提供することを指す。

本明細書中で使用される場合、用語「神経変性」は、神経細胞死をもたらす病理学的状態を指す。多数の神経学的障害は、共通の病的状態として神経変性を共有する。例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病および筋萎縮性側索硬化症（ALS）はすべて、慢性的な神経変性を引き起こすが、これは数年にわたる遅く進行性の神経細胞死を特徴とし、また急性神経変性は、卒中などの虚血または外傷性脳損傷などの外傷の結果、または脊髄損傷または多発性硬化症によって引き起こされる脱髄または外傷による軸索切断の結果による、神経細胞死の突然の発症を特徴とする。いくつかの神経障害では、主に1種類のニューロン細胞が退行性であり、例えばALSにおける運動ニューロン変性である。

10

【0259】

同等のものおよび適用範囲

当業者であれば、本明細書に記載された本発明による特定の実施形態について多くの同等のものを認識するか、またはルーチンの実験のみを用いて確認することができるであろう。本発明の範囲は、上記の説明に限定されるように意図されているのではなく、添付の特許請求の範囲に記載されている。

【0260】

特許請求の範囲において、「a」、「an」および「the」などの不定冠詞は、文脈からその逆であることあるいは明らかに示されていない限り、1つまたはそれ以上のものを意味する。ある群の1つまたはそれ以上の構成員の間に「or」を含む請求項または説明は、文脈からその逆であることあるいは明らかに示されていない限り、群の構成員の1つ、1つ以上、またはすべてが所与の製品またはプロセスに存在しているか、使用されているか、または関連している場合に、満たされているとみなされる：本発明は、群の構成員の1つだけが所与の製品またはプロセスに存在しているか、使用されているか、または関連している実施形態を含む。本発明は、2つ以上の、またはグループメンバー全体が、所与の製品またはプロセスに存在し、採用され、または関連する実施形態を含む。

20

【0261】

「～からなる（comprising）」という語は、開かれていることを意図しており、追加の要素またはステップを含めることを許可するが、追加の要素またはステップを含めることを必要とはしていないことにも留意されたい。「～からなる（comprising）」という語が本明細書で 사용되는場合、「から構成されている（consisting of）」という語もこのように包含され、明示される。

30

【0262】

範囲が与えられている場合、エンドポイントが含まれる。さらに、別途示されない限り、あるいは文脈および当業者の理解から明白でない限り、範囲として表される値は、本発明の多様な実施形態において記載された範囲内の任意の特定の値または部分範囲、当該範囲の下限の単位の10分の1までと想定される（文脈上明確に別途指示されている場合を除く）と理解されるべきである。

【0263】

さらに、先行技術に含まれる本発明の特定の実施形態はすべて、特許請求の範囲のいずれか1つまたはそれ以上から明白に除外され得ることが理解されるべきである。そのような実施形態は、当業者に知られているとみなされるので、除外が明示的に本明細書に記載されていなくても除外されてよい。本発明の組成物の任意の特定の実施形態（例えば、任意の抗生物質、治療または有効成分；任意の製造方法；任意の使用方法など）は、先行技術の存在に関係なく、何らかの理由で、任意の1つ以上の請求項から除外することができる。

40

【0264】

使用されている語は、限定ではなく説明のための言葉であり、その広い意味で本発明の真の範囲および精神から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲内で変更が可能である

50

ことを理解されたい。

【0265】

本発明は、記載された幾つかの実施形態に関して、ある程度の長さで、ある程度の特殊性を以て説明されているが、本発明は、そのような特殊性、実施形態、または任意の特定の実施形態に限定されるように意図されておらず、本発明は、添付の特許請求の範囲を参照して解釈されるべきである。その理由は、先行技術を考慮してそのような請求の範囲を可能な限り広く解釈するためであり、また本発明の意図する範囲を効果的に包含するためである。

【0266】

実施例

実施例1：SOD1 siRNAの設計と合成

SOD1 siRNAの設計

ヒトSOD1遺伝子を標的とするsiRNAを同定するためにsiRNA設計を行った。このデザインでは、表2に記載されるように、ヒト((GenebankアクセスNO. NM_000454.4(配列番号:1)))について、NCBI Refseqコレクションから(リリース63)(配列番号:2))からのカニクイザル((Genebank アクセスNO. XM_005548833.1))について、および、Ensemblプロジェクトからの(リリース75))アカゲザル(SOD1トランスクリプトENSMUT00000002415(配列番号:3))についてのSOD1トランスクリプトを使用した。

【0267】

【表2】

表2. SOD1遺伝子配列

SOD1トランスクリプト	アクセスNo.	配列番号
ヒト SOD1 cDNA (981bp)	NM_000454.4	1
カニクイザル SOD1 cDNA (465bp)	XM_005548833.1	2
アカゲザル SOD1 cDNA (464bp)	ENSMUT00000002415	3

siRNA二本鎖は、アンチセンス鎖の2-18位についてヒトSOD1転写物と100%の同一性を有するように設計され、アンチセンス鎖の2-18位について非ヒト霊長類SOD1転写産物と部分的または100%の同一性を有する。全てのsiRNA二本鎖において、アンチセンス鎖の1位はUに操作され、センス鎖の位置19はこの位置で二本鎖を不対合するようにCに操作された。

【0268】

SOD1 siRNA配列選択

ヒト、カニクイザルおよびアカゲザルSOD1遺伝子に対する予測されたアンチセンス鎖の選択性、およびmiRBase20.0中のアンチセンス鎖の2-7位のシード配列とヒト配列との一致の欠如に基づき、全部で169個のアンチセンスおよび169個のセンスヒトSOD1由来のオリゴヌクレオチドが合成され、二本鎖に形成された(表3)。siRNA二本鎖は、in vitro内因性SOD1遺伝子発現に対する阻害活性について試験された(SOD1 mRNAレベル)。

【0269】

10

20

30

40

【表 3 - 1】

表3. ヒトSOD1 dsRNAのセンスおよびアンチセンス鎖配列

開始	siRNA 二本鎖ID	SS ID	センス鎖配列 (5'-3')	配列 番号	AS ID	アンチセンス鎖配列 (5'-3')	配列 番号
26	D-2741	7414	CGGAGGUCUGGCCUA UAACdTdT	4	7415	UUUAUAGGCCAGACCUCC GdTdT	173
27	D-2742	7416	GGAGGUCUGGCCUAU AAACdTdT	5	7417	UUUUUAUAGGCCAGACCUC CdTdT	174
28	D-2743	7418	GAGGUCUGGCCUAUA AAGCdTdT	6	7419	UCUUUAUAGGCCAGACCU CdTdT	175
29	D-2744	7420	AGGUCUGGCCUAUAA AGUCdTdT	7	7421	UACUUUAUAGGCCAGACC UdTdT	176
30	D-2745	7422	GGUCUGGCCUAUAAA GUACdTdT	8	7423	UUACUUUAUAGGCCAGAC CdTdT	177
32	D-2746	7424	UCUGGCCUAUAAAGU AGUCdTdT	9	7425	UACUACUUUAUAGGCCAG AdTdT	178
33	D-2747	7426	CUGGCCUAUAAAGUA GUCCdTdT	10	7427	UGACUACUUUAUAGGCCA GdTdT	179
34	D-2748	7428	UGGCCUAUAAAGUAG UCGCdTdT	11	7429	UCGACUACUUUAUAGGCC AdTdT	180
35	D-2749	7430	GGCCUAUAAAGUAGU CGCCdTdT	12	7431	UGCACUACUUUAUAGGC CdTdT	181
36	D-2750	7432	GCCUAUAAAGUAGUC GCGCdTdT	13	7433	UCGCGACUACUUUAUAGG CdTdT	182
37	D-2751	7434	CCUAUAAAGUAGUCG CGGCdTdT	14	7435	UCCGCGACUACUUUAUAG GdTdT	183
74	D-2752	7436	GUCGUAGUCUCCUGC AGCCdTdT	15	7437	UGCUGCAGGAGACUACGA CdTdT	184

10

20

【 0 2 7 0 】

【表 3 - 2】

76	D-2753	7438	CGUAGUCUCCUGCAG CGUCdTdT	16	7439	UACGCUGCAGGAGACUAC GdTdT	185
77	D-2754	7440	GUAGUCUCCUGCAGC GUCCdTdT	17	7441	UGACGCUGCAGGAGACUA CdTdT	186
78	D-2755	7442	UAGUCUCCUGCAGCG UCUCdTdT	18	7443	UAGACGCUGCAGGAGACU AdTdT	187
149	D-2756	7444	AUGGCGACGAAGGCC GUGCdTdT	19	7445	UCACGGCCUUCGUCGCCA UdTdT	188
153	D-2757	7446	CGACGAAGGCCGUGU GCGCdTdT	20	7447	UCGCACACGGCCUUCGUC GdTdT	189
157	D-2758	7448	GAAGGCCGUGUGCGU GCUCdTdT	21	7449	UAGCACGCACACGGCCUU CdTdT	190
160	D-2759	7450	GGCCGUGUGCGUGCU GAACdTdT	22	7451	UUUCAGCACGCACACGGC CdTdT	191
177	D-2760	7452	AGGGCGACGGCCCAG UGCCdTdT	23	7453	UGCACUGGGCCGUCGCC UdTdT	192
192	D-2761	7454	UGCAGGGCAUCAUCA AUUCdTdT	24	7455	UAAUUGAUGAUGCCCUGC AdTdT	193
193	D-2762	7456	GCAGGGCAUCAUCAA UUUCdTdT	25	7457	UAAAUUGAUGAUGCCCUG CdTdT	194
195	D-2763	7458	AGGGCAUCAUCAAUU UCGCdTdT	26	7459	UCGAAAUUGAUGAUGCCC UdTdT	195
196	D-2764	7460	GGGCAUCAUCAAUUU CGACdTdT	27	7461	UUCGAAAUUGAUGAUGCC CdTdT	196
197	D-2765	7462	GGCAUCAUCAAUUUC GAGCdTdT	28	7463	UCUCGAAAUUGAUGAUGC CdTdT	197
198	D-2766	7464	GCAUCAUCAAUUUCG AGCCdTdT	29	7465	UGCUCGAAAUUGAUGAUG CdTdT	198
199	D-2767	7466	CAUCAUCAAUUUCGA GCACdTdT	30	7467	UUGCUCGAAAUUGAUGAU GdTdT	199
206	D-2768	7468	AAUUUCGAGCAGAAG GAACdTdT	31	7469	UUUCCUUCGUCGAAAU UdTdT	200
209	D-2769	7470	UUCGAGCAGAAGGAA AGUCdTdT	32	7471	UACUUUCCUUCGUCUGCA AdTdT	201
210	D-2770	7472	UCGAGCAGAAGGAAA GUACdTdT	33	7473	UUACUUUCCUUCGUCUG AdTdT	202
239	D-2771	7474	AAGGUGUGGGGAAGC AUUCdTdT	34	7475	UAAUGCUUCCCCACACCU UdTdT	203
241	D-2772	7476	GGUGUGGGGAAGCAU UAACdTdT	35	7477	UUUAAUGCUUCCCCACAC CdTdT	204
261	D-2773	7478	GACUGACUGAAGGCC UGCCdTdT	36	7479	UGCAGGCCUUCAGUCAGU CdTdT	205
263	D-2774	7480	CUGACUGAAGGCCUG CAUCdTdT	37	7481	UAUGCAGGCCUUCAGUCA GdTdT	206
264	D-2775	7482	UGACUGAAGGCCUGC AUGCdTdT	38	7483	UCAUGCAGGCCUUCAGUC AdTdT	207
268	D-2776	7484	UGAAGGCCUGCAUGG AUUCdTdT	39	7485	UAAUCCAUGCAGGCCUUC AdTdT	208
269	D-2777	7486	GAAGGCCUGCAUGGA UUCCdTdT	40	7487	UGAAUCCAUGCAGGCCUU CdTdT	209
276	D-2778	7488	UGCAUGGAUCCAUG UUCCdTdT	41	7489	UGAACAUGGAUCCAUGC AdTdT	210
278	D-2779	7490	CAUGGAUCCAUGUU CAUCdTdT	42	7491	UAUGAACAUGGAUCCA GdTdT	211
281	D-2780	7492	GGAUCCAUGUUCAU GAGCdTdT	43	7493	UCUCAUGAACAUGGAAUC CdTdT	212
284	D-2781	7494	UCCAUGUUCAUGAG UUUCdTdT	44	7495	UAAACUCAUGAACAUGGA AdTdT	213
290	D-2782	7496	GUUCAUGAGUUUGGA GAUCdTdT	45	7497	UAUCUCCAAACUCAUGAA CdTdT	214
291	D-2783	7498	UUCAUGAGUUUGGAG AUACdTdT	46	7499	UUAUCUCCAAACUCAUGA AdTdT	215
295	D-2784	7500	UGAGUUUGGAGAUAA UACCDdTdT	47	7501	UGUAUUUUCUCCAAACUC AdTdT	216

【表 3 - 3】

296	D-2785	7502	GAGUUUGGAGAUAAU ACACdTdT	48	7503	UUGUAUUUAUCUCCAAACU CdTdT	217
316	D-2786	7504	AGGCUGUACCAGUGC AGGdCdTdT	49	7505	UCCUGCACUGGUACAGCC UdTdT	218
317	D-2787	7506	GGCUGUACCAGUGCA GGUCdTdT	50	7507	UACCUGCACUGGUACAGC CdTdT	219
329	D-2788	7508	GCAGGUCCUCACUUU AAUCdTdT	51	7509	UAUUAAAGUGAGGACCUG CdTdT	220
330	D-2789	7510	CAGGUCCUCACUUUA AUCCdTdT	52	7511	UGAUUAAAGUGAGGACCU GdTdT	221
337	D-2790	7512	UCACUUUAAUCCUCU AUCCdTdT	53	7513	UGAUAGAGGAUUAAAGUG AdTdT	222
350	D-2791	7514	CUAUCCAGAAAACAC GGUCdTdT	54	7515	UACCGUGUUUUCUGGAUA GdTdT	223
351	D-2792	7516	UAUCCAGAAAACACG GUGCdTdT	55	7517	UCACCGUGUUUUCUGGAU AdTdT	224
352	D-2793	7518	AUCCAGAAAACACGG UGGCdTdT	56	7519	UCCACCGUGUUUUCUGGA UdTdT	225
354	D-2794	7520	CCAGAAAACACGGUG GGCCdTdT	57	7521	UGCCCACCGUGUUUUCUG GdTdT	226
357	D-2795	7522	GAAAACACGGUGGGC CAACdTdT	58	7523	UUUGGCCACCGUGUUUU CdTdT	227
358	D-2796	7524	AAAACACGGUGGGCC AAACdTdT	59	7525	UUUUGGCCACCGUGUUU UdTdT	228
364	D-2797	7526	CGGUGGGCCAAAGGA UGACdTdT	60	7527	UUCAUCCUUUGGCCACC GdTdT	229
375	D-2798	7528	AGGAUGAAGAGAGGC AUGCdTdT	61	7529	UCAUGCCUCUCUUAUCC UdTdT	230
378	D-2799	7530	AUGAAGAGAGGCAUG UUGCdTdT	62	7531	UCAACAUGCCUCUCUUA UdTdT	231
383	D-2800	7532	GAGAGCAUGUUGGA GACdCdTdT	63	7533	UGUCUCCAACAUGCCUCU CdTdT	232
384	D-2801	7534	AGAGGCAUGUUGGAG ACUCdTdT	64	7535	UAGUCUCCAACAUGCCUC UdTdT	233
390	D-2802	7536	AUGUUGGAGACUUGG GCACdTdT	65	7537	UUGCCCAAGUCUCCAACA UdTdT	234
392	D-2803	7538	GUUGGAGACUUGGGC AAUCdTdT	66	7539	UAUUGCCCAAGUCUCCAA CdTdT	235
395	D-2804	7540	GGAGACUUGGGCAAU GUGCdTdT	67	7541	UCACAUUGCCCAAGUCUC CdTdT	236
404	D-2805	7542	GGCAAUGUGACUGCU GACdCdTdT	68	7543	UGUCAGCAGUCACAUUGC CdTdT	237
406	D-2806	7544	CAAUGUGACUGCUGA CAACdTdT	69	7545	UUUGUCAGCAGUCACAUU GdTdT	238
417	D-2807	7546	CUGACAAAGAUGGUG UGGCdTdT	70	7547	UCCACACCAUCUUUGUCA GdTdT	239
418	D-2808	7548	UGACAAAGAUGGUGU GGCCdTdT	71	7549	UGCCACACCAUCUUUGUC AdTdT	240
469	D-2809	7550	CUCAGGAGACCAUUG CAUCdTdT	72	7551	UAUGCAAUGGUCUCCUGA GdTdT	241
470	D-2810	7552	UCAGGAGACCAUUGC AUCCdTdT	73	7553	UGAUGCAAUGGUCUCCUG AdTdT	242
475	D-2811	7554	AGACCAUUGCAUCAU UGGCdTdT	74	7555	UCCAAUGAUGCAAUGGUC UdTdT	243
476	D-2812	7556	GACCAUUGCAUCAUU GGCCdTdT	75	7557	UGCCAAUGAUGCAAUGGU CdTdT	244
480	D-2813	7558	AUUGCAUCAUUGGCC GCACdTdT	76	7559	UUGCGGCCAAUGAUGCAA UdTdT	245
487	D-2814	7560	CAUUGGCCGCACACU GGUCdTdT	77	7561	UACCAGUGUGCGGCCAAU GdTdT	246
494	D-2815	7562	CGCACACUGGUGGUC CAUCdTdT	78	7563	UAUGGACCACCAGUGUGC GdTdT	247
496	D-2816	7564	CACACUGGUGGUCCA UGACdTdT	79	7565	UUCAUGGACCACCAGUGU GdTdT	248

10

20

30

40

【表 3 - 4】

497	D-2817	7566	ACACUGGUGGUCCAU GAACdTdT	80	7567	UUUCAUGGACCACCAGUG UdTdT	249
501	D-2818	7568	UGGUGGUCCAUGAAA AAGCdTdT	81	7569	UCUUUUUCAUGGACCACC AdTdT	250
504	D-2819	7570	UGGUCCAUGAAAAAG CAGCdTdT	82	7571	UCUGCUUUUCAUGGACC AdTdT	251
515	D-2820	7572	AAAGCAGAUACUUG GGCCdTdT	83	7573	UGCCCAAGUCAUCUGCUU UdTdT	252
518	D-2821	7574	GCAGAUACUUGGGC AAACdTdT	84	7575	UUUUGCCCAAGUCAUCUG CdTdT	253
522	D-2822	7576	AUGACUUGGGCAAAG GUGCdTdT	85	7577	UCACCUUUGCCCAAGUCA UdTdT	254
523	D-2823	7578	UGACUUGGGCAAAGG UGGCdTdT	86	7579	UCCACCUUUGCCCAAGUC AdTdT	255
524	D-2824	7580	GACUUGGGCAAAGGU GGACdTdT	87	7581	UCCACCUUUGCCCAAGU CdTdT	256
552	D-2825	7582	GUACAAAGACAGGAA ACGCdTdT	88	7583	UCGUUUCUGUCUUUGUA CdTdT	257
554	D-2826	7584	ACAAAGACAGGAAAC GCUCdTdT	89	7585	UAGCGUUUCCUGUCUUUG UdTdT	258
555	D-2827	7586	CAAAGACAGGAAACG CUGCdTdT	90	7587	UCAGCGUUUCCUGUCUUU GdTdT	259
562	D-2828	7588	AGGAAACGUGGAAG UCGCdTdT	91	7589	UCGACUUCAGCGUUUCC UdTdT	260
576	D-2829	7590	GUCGUUUGGCUUGUG GUGCdTdT	92	7591	UCACCACAAGCCAAACGA CdTdT	261
577	D-2830	7592	UCGUUUGGCUUGUGG UGUCdTdT	93	7593	UACACCACAAGCCAAACG AdTdT	262
578	D-2831	7594	CGUUUGGCUUGUGGU GUACdTdT	94	7595	UUACACCACAAGCCAAAC GdTdT	263
579	D-2832	7596	GUUUGGCUUGUGGUG UAACdTdT	95	7597	UUUACACCACAAGCCAAA CdTdT	264
581	D-2833	7598	UUGGCUUGUGGUGUA AUUCdTdT	96	7599	UAAUUACACCACAAGCCA AdTdT	265
583	D-2834	7600	GGCUUGUGGUGUAAU UGGCdTdT	97	7601	UCCAAUUACACCACAAGC CdTdT	266
584	D-2835	7602	GCUUGUGGUGUAAUU GGGCdTdT	98	7603	UCCCAUUACACCACAAG CdTdT	267
585	D-2836	7604	CUUGUGGUGUAAUUG GGACdTdT	99	7605	UUCCCAUUACACCACAA GdTdT	268
587	D-2837	7606	UGUGGUGUAAUUGGG AUCCdTdT	100	7607	UGAUCCCAUUACACCAC AdTdT	269
588	D-2838	7608	GUGGUGUAAUUGGGA UCGCdTdT	101	7609	UCGAUCCCAUUACACCA CdTdT	270
589	D-2839	7610	UGGUGUAAUUGGGAU CGCCdTdT	102	7611	UGCGAUCCCAUUACACC AdTdT	271
593	D-2840	7612	GUAAUUGGGAUCGCC CAACdTdT	103	7613	UUUGGGCGAUCCCAUUA CdTdT	272
594	D-2841	7614	UAAUUGGGAUCGCCC AAUCdTdT	104	7615	UAUUGGGCGAUCCCAU AdTdT	273
595	D-2842	7616	AAUUGGGAUCGCCCA AUACdTdT	105	7617	UUAUUGGGCGAUCCCAU UdTdT	274
596	D-2843	7618	AUUGGGAUCGCCCCA UAACdTdT	106	7619	UUUAUUGGGCGAUCCCA UdTdT	275
597	D-2844	7620	UUGGGAUCGCCCCAU AAACdTdT	107	7621	UUUUUUGGGCGAUCCCA AdTdT	276
598	D-2845	7622	UGGGAUCGCCCCAUA AACdTdT	108	7623	UGUUUUGGGCGAUCCC AdTdT	277
599	D-2846	7624	GGAUCGCCCCAAUAA ACACdTdT	109	7625	UUGUUUUGGGCGAUCC CdTdT	278
602	D-2847	7626	AUCGCCCCAUAACA UUCdTdT	110	7627	UGAAUGUUUUGGGCGA UdTdT	279
607	D-2848	7628	CCAAUAAACAUCCCC UUGCdTdT	111	7629	UCAAGGGAUGUUUUG GdTdT	280

【表 3 - 5】

608	D-2849	7630	CAAUAAACA UCCCU UGGCdTdT	112	7631	UCCAAGGGAAUGUUUAU	281
609	D-2850	7632	AAUAAACA UCCCUU GGACdTdT	113	7633	UUCCAAGGGAAUGUUUAU	282
610	D-2851	7634	AUAAACA UCCCUUG GAUCdTdT	114	7635	UAUCCAAGGGAAUGUUUA	283
611	D-2852	7636	UAAACA UCCCUUGG AUGCdTdT	115	7637	UCAUCCAAGGGAAUGUUU	284
612	D-2853	7638	AAACA UCCCUUGGA UGUCdTdT	116	7639	UACAUCCAAGGGAAUGUU	285
613	D-2854	7640	AACA UCCCUUGGAU GUACdTdT	117	7641	UUACAUCCAAGGGAAUGU	286
616	D-2855	7642	AUCCCUUGGAUGUA GUCCdTdT	118	7643	UGACUACAUCCAAGGGAA	287
621	D-2856	7644	CUUGGAUGUAGUCUG AGGCdTdT	119	7645	UCCUCAGACUACAUCCAA	288
633	D-2857	7646	CUGAGGCCCUUAAC UCACdTdT	120	7647	UUGAGUUAAGGGGCCUCA	289
635	D-2858	7648	GAGGCCCUUAACUC AUCCdTdT	121	7649	UGAUGAGUUAAGGGGCCU	290
636	D-2859	7650	AGGCCCUUAACUCA UCUCdTdT	122	7651	UAGAUGAGUUAAGGGGCC	291
639	D-2860	7652	CCCUUAACUCAUCU GUUCdTdT	123	7653	UAAACAGAUGAGUUAAGGG	292
640	D-2861	7654	CCUUAACUCAUCUG UUACdTdT	124	7655	UUAACAGAUGAGUUAAGG	293
641	D-2862	7656	CCUUAACUCAUCUGU UAUCdTdT	125	7657	UAUAACAGAUGAGUUAAG	294
642	D-2863	7658	CUUAACUCAUCUGUU AUCCdTdT	126	7659	UGAUAAACAGAUGAGUUA	295
643	D-2864	7660	UUAACUCAUCUGUUA UCCdTdT	127	7661	UGGAUAAACAGAUGAGUUA	296
644	D-2865	7662	UAACUCAUCUGUUAU CCUCdTdT	128	7663	UAGGAUAAACAGAUGAGUU	297
645	D-2866	7664	AACUCAUCUGUUAUC CUGCdTdT	129	7665	UCAGGAUAAACAGAUGAGU	298
654	D-2867	7666	GUUAUCCUGCUAGCU GUACdTdT	130	7667	UUACAGCUAGCAGGAUAA	299
660	D-2868	7668	CUGCUAGCUGUAGAA AUGCdTdT	131	7669	UCAUUUCUACAGCUAGCA	300
661	D-2869	7670	UGCUGAGCUGUAGAAA UGUCdTdT	132	7671	UACAUUUCUACAGCUAGC	301
666	D-2870	7672	GCUGUAGAAAUGUAU CCUCdTdT	133	7673	UAGGAUACAUUUCUACAG	302
667	D-2871	7674	CUGUAGAAAUGUAUC CUGCdTdT	134	7675	UCAGGAUACAUUUCUACA	303
668	D-2872	7676	UGUAGAAAUGUAUCC UGACdTdT	135	7677	UUCAGGAUACAUUUCUAC	304
669	D-2873	7678	GUAGAAAUGUAUCCU GAUCdTdT	136	7679	UAUCAGGAUACAUUUCUA	305
673	D-2874	7680	AAUGUAUCCUGAUA AACCdTdT	137	7681	UGUUUAUCAGGAUACAUU	306
677	D-2875	7682	GUUCCUGAUAACA UUACdTdT	138	7683	UUAAUGUUUAUCAGGAUA	307
692	D-2876	7684	UUAAACACUGUAAUC UUACdTdT	139	7685	UUAGAUAUACAGUGUUUA	308
698	D-2877	7686	ACUGUAAUCUAAAAA GUGCdTdT	140	7687	UCACUUUUUAGAUAUACAG	309
699	D-2878	7688	CUGUAAUCUAAAAAG UGUCdTdT	141	7689	UACACUUUUUAGAUAUACA	310
700	D-2879	7690	UGUAAUCUAAAAAGU GUACdTdT	142	7691	UUACACUUUUUAGAUAUAC	311
701	D-2880	7692	GUAAUCUAAAAAGUG UAACdTdT	143	7693	UUUACACUUUUUAGAUAU	312

10

20

30

40

【表 3 - 6】

706	D-2881	7694	CUUAAAAGUGUAAUU	144	7695	UCACAAUACACUUUUA	313
			GUGCdTdT			GdTdT	
749	D-2882	7696	UACCUGUAGUGAGAA	145	7697	UAGUUUCUCACUACAGGU	314
			ACUCdTdT			AdTdT	
770	D-2883	7698	UUAUGAUCACUUGGA	146	7699	UUCUCCAAGUGAUCUA	315
			AGACdTdT			AdTdT	
772	D-2884	7700	AUGAUCACUUGGAAG	147	7701	UAAUCUCCAAGUGAUC	316
			AUUCdTdT			UdTdT	
775	D-2885	7702	AUCACUUGGAAGAUU	148	7703	UACAAUUCUCCAAGUGA	317
			UGUCdTdT			UdTdT	
781	D-2886	7704	UGGAAGAUUUGUAUA	149	7705	UAACUAUACAAAUUCUCC	318
			GUUCdTdT			AdTdT	
800	D-2887	7706	UAUAAAACUCAGUUA	150	7707	UUUUUAACUGAGUUUAU	319
			AAACdTdT			AdTdT	
804	D-2888	7708	AAACUCAGUAAAAU	151	7709	UGACAUUUUAACUGAGUU	320
			GUCCdTdT			UdTdT	
819	D-2889	7710	GUCUGUUUCAAGAC	152	7711	UCAGGUCAUUGAAACAGA	321
			CUGCdTdT			CdTdT	
829	D-2890	7712	AUGACCUGUAUUUUG	153	7713	UUGGCAAAUACAGGUCA	322
			CCACdTdT			UdTdT	
832	D-2891	7714	ACCUGUAUUUUGCCA	154	7715	UGUCUGGCAAAUACAGG	323
			GACCdTdT			UdTdT	
833	D-2892	7716	CCUGUAUUUUGCCAG	155	7717	UAGUCUGGCAAAUACAG	324
			ACUCdTdT			GdTdT	
851	D-2893	7718	UAAAUACAGAUUGGG	156	7719	UAUACCCAUCUGUGAUUU	325
			UAUCdTdT			AdTdT	
854	D-2894	7720	AUCACAGAUUGGUUAU	157	7721	UUUAAUACCCAUCUGUGA	326
			UAACdTdT			UdTdT	
855	D-2895	7722	UCACAGAUUGGUUAU	158	7723	UUUUAAUACCCAUCUGUG	327
			AAACdTdT			AdTdT	
857	D-2896	7724	ACAGAUUGGUUAUUA	159	7725	UAGUUUAAUACCCAUCUG	328
			ACUCdTdT			UdTdT	
858	D-2897	7726	CAGAUUGGUUAUUA	160	7727	UAAGUUUAAUACCCAUCU	329
			CUUCdTdT			GdTdT	
859	D-2898	7728	AGAUGGGUAUUAAAC	161	7729	UCAAGUUUAAUACCCAUC	330
			UUGCdTdT			UdTdT	
861	D-2899	7730	AUGGGUAUUAAACU	162	7731	UGACAAGUUUAAUACCCA	331
			GUCCdTdT			UdTdT	
869	D-2900	7732	UAAACUUGUCAGAAU	163	7733	UGAAAUUCUGACAAGUUU	332
			UUCCdTdT			AdTdT	
891	D-2901	7734	UCAUUAAGCCUGUG	164	7735	UAUUCACAGGCUUGAAUG	333
			AAUCdTdT			AdTdT	
892	D-2902	7736	CAUUAAGCCUGUGA	165	7737	UUAUUCACAGGCUUGAAU	334
			AUACdTdT			GdTdT	
906	D-2903	7738	AAUAAAAACCCUGUA	166	7739	UCCAACAGGGUUUUUAU	335
			UGGCdTdT			UdTdT	
907	D-2904	7740	AUAAAAACCCUGUAU	167	7741	UGCCAACAGGGUUUUUA	336
			GGCCdTdT			UdTdT	
912	D-2905	7742	AACCCUGUAUGGCAC	168	7743	UUAAGUGCCAUACAGGGU	337
			UUACdTdT			UdTdT	
913	D-2906	7744	ACCCUGUAUGGCACU	169	7745	UAUAAGUGCCAUACAGGG	338
			UAUCdTdT			UdTdT	
934	D-2907	7746	GAGGCUAUUAAAAGA	170	7747	UGAUUCUUUAAUAGCCU	339
			AUCCdTdT			CdTdT	
944	D-2908	7748	AAAGAAUCCAAAUUC	171	7749	UUUUGAAUUUGGAUUCU	340
			AAACdTdT			UdTdT	
947	D-2909	7750	GAAUCCAAAUUCAA	172	7751	UUAGUUUGAAUUUGGAU	341
			CUACdTdT			CdTdT	

SOD1 siRNA 合成

ホスホラミダイトオリゴマー化化学によって、ABI3900 合成機 (Applied Biosystems 社) でオリゴリボヌクレオチドを合成した。固体支持体は、2'-デオキシ-チミジン (米国バージニア州スターリングの Glen Research 社から購入) を充填したポリスチレンであり、合成スケールが 0.2 μmol であった。S

10

20

30

40

50

AFC ProliGo社（ハンブルグ、ドイツ）から補助合成試薬、DNAおよびRNAホスホラミダイトを得た。具体的には、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-O-(2-シアノエチル-N,Nジイソプロピル)ウリジン(U)のホスホラミダイトモノマー、チミジン(dT)、4-N-アセチルシチジン(C^AC)、6-N-ベンゾイルアデノシン(A^BZ)および2'-O-t-ブチルジメチルシリルを有する2-N-イソブチルルグアノシン(GⁱB^u)を用いてオリゴマー配列を構築した。全ホスホラミダイト(アセトニトリル中70mM)のカップリング時間が、活性剤として5-エチルチオ-1H-テトラゾール(ETT)(アセトニトリル中0.5M)を使用して3分であった。合成機で最終的なジメトキシトリチル保護基の除去を実施し、配列を合成した(「DMTオフ」合成)。固相合成の完了時に、オリゴリボヌクレオチドを固体支持体から切断し、水性メチルアミン(40%)とエタノール中メチルアミン(33%)の1:1(v/v)混合物を用いて脱保護した。その溶液を45にし、90分後にN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)で希釈し、トリエチルアミン三フッ化水素酸(TEA·HF)を加えた。45で2時間インキュベートした後、1M NaOAcおよびアセトンとエタノールとの4:1(v/v)の混合物でオリゴリボヌクレオチドを沈殿させた。ペレットを1M NaCl水溶液に溶解し、サイズ排除クロマトグラフィーにより脱塩した。これは、HiTrap 5mLカラム(GEヘルスケア社)を備えたAKTA精製装置HPLCシステム(GEヘルスケア社、フライブルク、ドイツ)を用いて実施した。MALDI質量分析法またはESI質量分析法によって、オリゴリボヌクレオチドの同一性を確認した。RNA一本鎖からsiRNAを生成するために、等モル量の相補的センス鎖およびアンチセンス鎖を混合し、20mM NaCl、4mMリン酸ナトリウムpH6.8緩衝液中でアニールした。使用するまでsiRNAを凍結保存した。

10

20

30

40

50

【0275】

実施例2：ヒトSOD1 mRNA抑制に対するSOD1 siRNAのin vitroスクリーニング

siRNAを標的とするヒトSOD1(表3に記載)を、SOD1 mRNAを定量するためbDNA(分岐DNA)法を用いて、HeLa細胞の内在性SOD1発現の阻害について評価した。用量2種類のアッセイによる結果を用いて、4種の培養細胞での用量反応実験のためのSOD1 dsRNA二本鎖のサブセットを選択し、IC50を算出した。

【0276】

細胞培養およびトランスフェクション

ATCC(ドイツ、ヴェーゼルのLGC Standards社と提携したATCC)からHeLa細胞を入手し、5%CO₂加湿インキュベーター内、37で、ウシ胎仔血清10%(GIBCO/Life Technologies社のUltra-low IgG)およびPen/Strep1%(Biochrom GmbH社、ベルリン、ドイツ)を含むよう補充したHAMのF-12培地(Biochrom GmbH社、ベルリン、ドイツ)で培養した。

【0277】

siRNAによるトランスフェクションのため、96ウェルプレートにHeLa細胞を密度19,000~20,000細胞/ウェルで播種した。製造者の指示に従って、リポフェクタミン2000(Invitrogen/Life Technologies社)を用いてsiRNAのトランスフェクションを行った。2通りの用量投与スクリーニングでは、SOD1 siRNA濃度1nMまたは0.1nMを用いた。用量応答実験では、SOD1 siRNA濃度10、2.5、0.6、0.16、0.039、0.0098、0.0024、0.0006、0.00015および0.000038nMを用いて実施した。対照ウェルに、ルシフェラーゼsiRNA、Aha-1 siRNA、PLGF siRNAまたは関係のないsiRNAの対照混合物をトランスフェクションした。

【0278】

分枝DNAアッセイ - QuantiGene 2.0

s i R N A とともに 2 4 時間インキュベーションした後、培地を除去し、細胞を 1 5 0 μ l 溶解混合液（溶解混合液 1 に対しヌクレアーゼフリー水 2 ）で溶解し、その後 5 3 で 6 0 分間インキュベートした。8 0 μ l ワーキングプローブセット（W o r k i n g P r o b e S e t ）S O D 1 （遺伝子標的）、9 0 μ l ワーキングプローブセット G A P D H （内在性対照）および、2 0 μ l または 1 0 μ l の細胞溶解物を捕捉用プレートに添加した。捕捉用プレートを、（S O D 1 では）5 5 、（G A P D H では）5 3 でインキュベートした（約 1 6 ~ 2 0 時間）。翌日、その捕捉用プレートを、少なくとも 3 0 0 μ l の 1 x 洗浄バッファー（ヌクレアーゼフリー水、緩衝液成分 1 および洗浄バッファー成分 2 ）を用いて 3 回洗浄した（最後の洗浄後、プレートを逆さまにし、清潔なペーパータオルで吸い取った）。S O D 1 捕捉用プレートに 1 0 0 μ l の増幅前ワーキング試薬（p r e - A m p l i f i e r W o r k i n g R e a g e n t ）を加え、アルミニウムホイルでシールし、5 5 で 1 時間インキュベートした。1 時間インキュベーションした後、洗浄工程を繰り返し、その後、S O D 1 および G A P D H 捕捉用プレートいずれにも、1 0 0 μ l の増幅ワーキング試薬（A m p l i f i e r W o r k i n g R e a g e n t ）を加えた。5 5 （S O D 1 ）または 5 3 （G A P D H ）で 1 時間インキュベートした後、洗浄および乾燥の工程を繰り返し、1 0 0 μ l の標識プローブ（L a b e l P r o b e ）を加えた。捕捉用プレートを 5 0 （S O D 1 ）または 5 3 （G A P D H ）で 1 時間インキュベートした。その後、プレートを 1 x 洗浄バッファーで洗浄し、乾燥させ、捕捉プレートに基質 1 0 0 μ l を加えた。暗所で 3 0 分間インキュベートした後、1 4 2 0 発光カウンター（W A L L A C V I C T O R L i g h t 、P e r k i n E l m e r 社、ロートガウ - ユーゲスハイム、ドイツ）を用いて発光を読み取った。

【 0 2 7 9 】

b D N A データ解析

各 S O D 1 s i R N A または対照 s i R N A について、4 つのウェルを並行してトランスフェクションし、個々のデータポイントをそれぞれのウェルから収集した。それぞれのウェルについて、S O D 1 m R N A レベルを G A P D H m R N A レベルに標準化した。所与の S O D 1 s i R N A の活性は、対照ウェルの平均 S O D 1 m R N A 濃度（G A P D H m R N A に標準化）に比して、処理された細胞の S O D 1 m R N A 濃度のパーセント（G A P D H m R N A に標準化）で表された。

【 0 2 8 0 】

表 3 に配列が示されている S O D 1 s i R N A を 1 n M または 0 . 1 n M のいずれかで試験した i n v i t r o H e L a スクリーニングの結果を表 4 に示している。表 4 に、それぞれの S O D 1 s i R N A について、対照と比較して、処理した細胞中に残存する S O D 1 m R N A （G A P D H m R N A に標準化）の平均パーセントおよび標準偏差を示す。1 n M で S O D 1 s i R N A の多数が、H e L a 細胞の S O D 1 m R N A レベルを 8 0 % 以上低下させるのに有効であった。さらに、0 . 1 n M で S O D 1 s i R N A の多数が、H e L a 細胞の S O D 1 m R N A レベルを 8 0 % 以上低下させるのに有効であった。

【 0 2 8 1 】

10

20

30

【表 4 - 1】

表 4. SOD1 遺伝子発現抑制活性について 2 通りの用量による HeLa 細胞の SOD1 siRNA in vitro スクリーニング結果

siRNA 二本鎖 ID	1 nM SOD1 siRNA から 24 時 間後の残存 SOD1 mRNA [対照の%]	SD [%]	0.1 nM SOD1 siRNA から 24 時 間後の残存 SOD1 mRNA [対照の%]	SD [%]
D-2741	87.2	2.7	70.6	3
D-2742	86.9	4.3	79.5	8.5
D-2743	89.6	3.6	80.6	8.8
D-2744	83.8	7.2	75.9	8.5
D-2745	95.1	9.1	84.1	6.8
D-2746	111.3	3.6	92.0	7.2
D-2747	100.0	6.1	92.9	4.4
D-2748	100.4	3.1	91.6	12
D-2749	87.1	2.9	96.4	13
D-2750	94.2	7.1	93.1	8
D-2751	85.4	7.2	96.1	8
D-2752	27.2	3.6	70.2	6.5
D-2753	25.5	4.8	67.5	4.5
D-2754	23.2	4	70.2	2.3
D-2755	36.6	3.7	75.5	11
D-2756	9.1	0.7	29.2	2.6
D-2757	3.9	0.6	9.0	1.8
D-2758	6.4	1.1	13.9	2.8
D-2759	6.7	1.1	14.1	1
D-2760	32.3	3.4	61.9	8.8
D-2761	12.9	3.6	41.7	8.3
D-2762	16.9	2.6	41.2	10
D-2763	5.7	1.3	10.5	3.4
D-2764	9.2	2.7	19.5	4.9
D-2765	13.6	1.9	29.4	8.8
D-2766	8.7	1.1	28.1	6.6
D-2767	10.4	1.6	24.7	5.9
D-2768	13.0	1.4	27.7	7.3
D-2769	25.3	1.9	57.4	7.5
D-2770	14.9	1.6	35.5	4.4
D-2771	11.4	1.8	32.6	8.6
D-2772	10.6	1.3	27.9	4.7
D-2773	14.3	1.4	35.7	3.1
D-2774	7.1	1.3	23.0	1.5
D-2775	9.8	0.9	31.3	3.3

【 0 2 8 2 】

【表 4 - 2】

D-2776	11.1	2.9	31.3	5.3
D-2777	47.8	5.5	80.9	4.6
D-2778	7.4	0.6	26.5	4.2
D-2779	7.9	0.6	17.9	3
D-2780	12.5	1.3	31.7	5.6
D-2781	16.3	2.3	39.1	8
D-2782	10.2	3.1	25.4	3
D-2783	13.5	3.5	33.4	6.5
D-2784	12.3	2.5	36.3	5.4
D-2785	14.6	3	30.5	7.4
D-2786	16.2	3.5	42.6	8
D-2787	14.4	4.2	37.3	6.5
D-2788	9.8	3	21.6	6.6
D-2789	18.5	5.9	48.9	12
D-2790	11.6	3.8	28.1	5.6
D-2791	8.9	1.8	26.6	5.6
D-2792	8.1	1.4	25.6	5.3
D-2793	9.3	1.6	26.6	3
D-2794	8.9	1.9	25.8	4.2
D-2795	22.6	3.4	59.5	9.9
D-2796	15.1	0.7	43.0	1.9
D-2797	21.1	2.5	43.0	1.3
D-2798	10.4	1.2	28.0	5.1
D-2799	11.0	1.2	29.8	3.3
D-2800	21.3	2.4	52.4	4.7
D-2801	12.3	3.3	28.7	4
D-2802	8.4	1.8	18.8	3.7
D-2803	5.9	1	12.1	4.1
D-2804	11.8	1.6	28.9	7.5
D-2805	13.5	2.6	34.5	7.5
D-2806	5.5	1.1	10.4	2.5
D-2807	8.5	1.3	24.2	6.6
D-2808	9.5	1.5	26.0	1.4
D-2809	7.5	0.9	17.7	2.8
D-2810	12.1	2	43.1	8.3
D-2811	5.6	0.8	16.7	7
D-2812	14.2	1.4	42.5	8.2
D-2813	29.0	3.4	66.7	13
D-2814	35.7	3.5	73.4	15
D-2815	30.3	1.9	74.3	12
D-2816	14.6	2.1	47.2	5.1
D-2817	27.5	1.8	70.5	6.6
D-2818	9.6	0.8	32.9	7.2

10

20

30

40

【 0 2 8 3 】

【表 4 - 3】

D-2819	9.0	0.8	29.1	3
D-2820	10.8	1.4	38.7	3.5
D-2821	5.8	0.4	19.4	6.1
D-2822	10.5	2.5	46.3	6.8
D-2823	3.5	1.1	18.8	3.5
D-2824	9.9	3.2	43.8	0.8
D-2825	6.6	2.6	29.7	1.1
D-2826	8.0	1.9	40.6	7.2
D-2827	7.0	1.2	25.2	4.5
D-2828	6.4	2.2	22.4	1.7
D-2829	14.8	2.7	45.5	7.4
D-2830	9.4	2	28.5	6.5
D-2831	8.6	2.8	28.4	6.6
D-2832	12.3	3.2	43.4	3.2
D-2833	20.5	5.2	66.7	9.1
D-2834	10.7	2.5	35.9	2.2
D-2835	11.6	2.4	37.7	4
D-2836	24.1	3.3	57.0	4.2
D-2837	98.7	12	96.7	4.3
D-2838	20.5	4	49.5	1.4
D-2839	10.0	2.4	31.9	4.3
D-2840	50.2	8.3	89.2	7.4
D-2841	70.8	11	87.1	7.9
D-2842	79.7	21	90.9	3.6
D-2843	24.2	1.2	57.2	8.4
D-2844	21.5	6.4	51.4	1
D-2845	12.9	2.2	39.4	7.3
D-2846	10.2	2.6	30.5	2.6
D-2847	40.5	9.7	70.0	6.5
D-2848	41.8	7	63.7	6
D-2849	24.7	6.8	51.3	8.1
D-2850	79.4	7.5	76.5	16
D-2851	28.1	6.5	72.0	8.8
D-2852	13.8	2.1	56.9	4.8
D-2853	32.1	9.5	72.2	12
D-2854	21.5	3.9	58.8	10
D-2855	39.8	10	75.4	5.5
D-2856	14.4	3.4	40.4	5.8
D-2857	8.6	1	18.4	4.5
D-2858	10.1	1.1	19.1	4.8
D-2859	10.9	1.3	20.9	5.4
D-2860	7.4	1.3	11.7	3.8
D-2861	5.0	1.4	12.6	2.6

10

20

30

40

【 0 2 8 4 】

【表 4 - 4】

D-2862	5.5	1	13.8	2.7
D-2863	8.2	1.3	26.5	4.3
D-2864	9.1	1.6	40.2	3.4
D-2865	6.3	0.6	22.8	3.4
D-2866	7.0	1.7	17.8	4.3
D-2867	9.3	0.8	31.7	6.2
D-2868	10.3	2.5	30.8	6.5
D-2869	9.4	4.3	34.7	4.6
D-2870	5.9	0.6	18.1	2.6
D-2871	6.5	1.1	13.5	1.5
D-2872	10.5	1	31.3	5.3
D-2873	7.0	1.1	20.8	3.7
D-2874	9.4	2.4	35.3	5.7
D-2875	5.4	1.1	13.5	2.4
D-2876	14.1	4.6	45.9	5.2
D-2877	64.5	9.8	64.0	9
D-2878	57.0	14	62.9	8.1
D-2879	71.4	12	79.4	8.6
D-2880	79.7	11	100.9	4.9
D-2881	72.8	12	82.8	5.6
D-2882	64.4	8.8	73.2	6.9
D-2883	80.1	4.9	86.3	13
D-2884	69.6	5.8	74.2	13
D-2885	76.9	2	76.7	18
D-2886	74.0	0.7	80.4	3.4
D-2887	77.7	8.7	88.6	16
D-2888	70.3	5.1	66.2	2.2
D-2889	71.2	3	67.3	7.3
D-2890	75.3	7.9	71.2	6.4
D-2891	74.6	8.4	72.4	4.3
D-2892	72.5	6.9	71.6	5.7
D-2893	73.9	3.8	83.7	2.9
D-2894	66.9	5.7	72.4	4.9
D-2895	71.6	8.9	72.1	9
D-2896	71.0	5.6	74.4	1.3
D-2897	74.4	7.9	78.0	3.8
D-2898	74.0	5.8	73.5	1.6
D-2899	71.0	10	74.1	9.7
D-2900	71.3	4.1	77.8	5.8
D-2901	64.8	9.4	82.0	11
D-2902	53.6	5.2	82.7	15
D-2903	66.8	2.6	101.1	13
D-2904	62.6	7.8	87.5	20

10

20

30

40

【 0 2 8 5 】

【表 4 - 5】

D-2905	67.1	14	74.0	41
D-2906	64.0	3.2	73.9	12
D-2907	66.4	7.3	82.0	11
D-2908	72.6	20	85.2	23
D-2909	80.0	7.3	77.2	12

HeLa細胞を対象に0.1nMで最も活性の高いSOD1 siRNAのうち12種類を用量応答実験で評価した。表5ではHeLa細胞を対象に、その選択された12種類のSOD1 siRNAについて対照と比較し、SOD1 mRNA50%の抑制をもたらすIC50濃度を示す。この実験的パラダイムでは、その12種類のSOD1 siRNAは特に強力なものであり、IC50値1~8pMを示した。

【0286】

【表 5】

表5. SOD1遺伝子発現抑制活性についてHeLa細胞を対象としたSOD1 siRNAのin vitroアッセイのIC50の結果

siRNA 二本鎖ID	平均IC50 値 (pM)
D-2757	1
D-2806	4
D-2860	2
D-2861	2
D-2875	4
D-2871	5
D-2758	5
D-2759	5
D-2866	4
D-2870	4
D-2823	6
D-2858	8

以下の表6に、SOD1 siRNAの12種類のIC50を同定するために用いたHeLa細胞に関する用量応答データを詳細に示す。HeLa細胞では、全12種類のsiRNAにpM IC50があることを明らかにした。表5に示すSOD1 siRNAのIC50に関するデータは、以下の表6にまとめたデータの要約である。

【0287】

【表 6】

表 6. HeLa 細胞の SOD1 siRNA の 12 種類の用量反応データ

siRNA 二本鎖 ID	残存 SOD1 mRNA (対照の%)										IC50 (nM)
	10 nM	25 nM	06 nM	016 nM	0039 nM	00098 nM	00024 nM	00006 nM	000015 nM	0000038 nM	
D-2757	2	2	2	3	6	16	33	57	77	86	0.001
D-2806	2	3	3	6	13	32	59	83	90	105	0.004
D-2860	5	5	5	6	10	22	50	68	87	92	0.002
D-2861	4	4	4	5	10	25	51	73	81	92	0.002
D-2875	4	4	4	7	15	34	62	78	82	92	0.004
D-2871	4	5	4	8	18	43	62	78	87	90	0.005
D-2758	5	5	5	9	17	41	70	81	97	111	0.005
D-2759	4	4	4	7	15	35	63	82	87	94	0.005
D-2866	3	3	4	8	17	39	54	79	80	76	0.004
D-2870	4	5	5	8	18	41	59	77	93	101	0.004
D-2823	3	3	4	7	20	42	65	81	86	92	0.006
D-2858	5	5	5	9	21	46	72	82	88	94	0.008

10

実施例 3 : SH-SY5Y 細胞、U87 細胞およびヒト初代星状細胞の内在性 SOD1 mRNA 発現に対する選択された SOD1 siRNA の in vitro スクリーニング

20

ATCC (ドイツ、ヴェーゼルの LGC Standards 社と提携した ATCC) から SH-SY5Y 細胞を入手し、5% CO₂ 加湿インキュベーター内、37 °C で、FCS 15% (GIBCO/Life Technologies 社の Ultra-low IgG)、L-グルタミン 1% (Biochrom GmbH 社、ベルリン、ドイツ) および Pen/Strep 1% (Biochrom GmbH 社、ベルリン、ドイツ) を含むように補充した Dulbecco の MEM (Biochrom GmbH 社、ベルリン、ドイツ) で培養した。

【0288】

ATCC (ドイツ、ヴェーゼルの LGC Standards 社と提携した ATCC) から U87MG 細胞を入手し、5% CO₂ 加湿インキュベーター内、37 °C で、FCS 10% (GIBCO/Life Technologies 社の Ultra-low IgG)、および Pen/Strep 1% (Biochrom GmbH 社、ベルリン、ドイツ) を含むように補充した ATCC 配合イーグル最小必須培地 (ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium) (ドイツ、ヴェーゼルの LGC Standards 社と提携した ATCC) で培養した。

30

【0289】

LONZA (Lonza Sales 社、バーゼル、スイス) からヒト初代星状細胞を入手し、5% CO₂ 加湿インキュベーター内、37 °C で、AGM Single Quot キット (Lonza Sales 社 Ltd、バーゼル、スイス) を用いて補充した ABM 基礎培地 (ABM Basal Medium) (Lonza Sales 社、バーゼル、スイス) で培養した。

40

【0290】

SH-SY5Y 細胞にリポフェクタミン 2000 (Invitrogen/Life Technologies 社)、U87 細胞に RNAiMAX (Invitrogen/Life Technologies 社) およびヒト初代星状細胞にリポフェクタミン 2000 (Invitrogen/Life Technologies 社) のトランスフェクション試薬を用いたことを除いて、HeLa 細胞について記載したのとほぼ同じ方法で 12 種類の siRNA (D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-287

50

0、D-2823、D-2858)を用いてSH-SY5Y細胞、U87MG細胞およびヒト初代星状細胞のトランスフェクションのほか、bDNAを用いたSOD1およびGAPDH mRNAレベルの定量を実施した。

【0291】

以下の表7、8、9にそれぞれ、SOD1 siRNAの12種類(D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823、D-2858)のIC50を同定するために用いたSH-SY5Y細胞、U87MG細胞およびヒト初代星状細胞に関する用量反応データを詳細に示す。U87細胞では、全12種類のsiRNAにpM IC50があることを明らかにした。

10

【0292】

表10にIC50値を示す。ヒト初代星状細胞の方が、総じてSH-SY5YやU87MG細胞よりもIC50値が高かった。

【0293】

【表7】

表7. SH-SY5Y細胞のSOD1 siRNAの12種類の用量反応データ

siRNA 二本鎖 ID	残存SOD1 mRNA (対照の%)										IC50 (nM)
	10 nM	25 nM	06 nM	016 nM	0039 nM	00098 nM	00024 nM	00006 nM	000015 nM	000003 nM	
D-2757	8	13	16	22	36	55	72	92	107	114	0.013
D-2806	11	12	15	26	40	71	103	121	117	131	0.025
D-2860	11	15	17	26	42	63	79	86	92	96	0.022
D-2861	12	14	16	19	37	60	82	83	87	94	0.017
D-2875	20	25	35	59	79	92	96	95	99	104	0.234
D-2871	15	19	23	42	71	87	95	94	99	96	0.103
D-2758	24	35	36	58	91	96	134	123	105	94	0.369
D-2759	10	11	16	25	43	67	85	94	104	108	0.026
D-2866	17	19	24	42	72	93	93	102	103	101	0.105
D-2870	19	22	26	40	62	88	100	105	105	105	0.078
D-2823	11	16	25	47	64	84	91	98	105	95	0.099
D-2858	16	21	25	46	68	91	92	95	103	116	0.106

20

30

【0294】

【表 8】

表 8. U87MG細胞のSOD1 siRNAの12種類の用量応答データ

siRNA 二本鎖 ID	残存SOD1 mRNA (対照の%)										IC50 (nM)
	10 nM	25 nM	06 nM	0.16 nM	0.039 nM	0.0098 nM	0.0024 nM	0.0006 nM	0.00015 nM	0.00003 nM	
D-2757	3	4	3	4	5	8	19	50	86	99	0.001
D-2806	4	3	3	3	4	8	18	49	81	106	0.001
D-2860	4	4	5	5	6	8	20	46	72	93	0.001
D-2861	5	6	6	6	8	15	39	67	87	93	0.001
D-2875	4	5	5	5	6	9	19	45	76	99	0.001
D-2871	5	5	5	5	6	11	24	50	77	86	0.001
D-2758	7	9	6	7	10	25	64	99	103	112	0.004
D-2759	6	6	5	6	8	21	50	80	93	104	0.002
D-2866	4	4	4	5	8	17	38	64	86	94	0.001
D-2870	5	5	5	5	7	7	13	31	63	85	0.003
D-2823	4	4	4	4	6	13	34	61	74	94	0.001
D-2858	7	6	6	7	8	14	33	54	71	94	0.001

【 0 2 9 5 】

【表 9】

表 9. ヒト初代星状細胞のSOD1 siRNAの12種類の用量反応データ

siRNA 二本鎖 ID	残存SOD1 mRNA (対照の%)										IC50 (nM)
	10 nM	25 nM	06 nM	0.16 nM	0.039 nM	0.0098 nM	0.0024 nM	0.0006 nM	0.00015 nM	0.000038 nM	
D-2757	29	30	35	48	66	87	95	101	95	103	0.123
D-2806	26	32	35	47	63	78	87	95	95	98	0.113
D-2860	29	38	39	51	68	82	94	93	94	101	0.192
D-2861	27	33	38	47	62	73	88	93	96	102	0.114
D-2875	25	28	39	47	72	80	100	105	105	118	0.151
D-2871	25	34	42	52	63	83	97	100	97	108	0.182
D-2758	27	29	31	41	51	71	86	91	95	98	0.049
D-2759	34	39	41	53	70	83	97	101	98	103	0.219
D-2866	30	32	35	46	65	78	84	87	92	95	0.118
D-2870	34	34	38	48	71	74	82	91	92	98	0.163
D-2823	27	31	40	53	67	80	84	86	92	97	0.186
D-2858	29	30	37	55	72	91	93	100	104	104	0.197

表 10 の SOD1 siRNA の IC50 データは、表 7、8 および 9 に示すデータの要約である。

【 0 2 9 6 】

【表 10】

表 10. SOD1 遺伝子発現抑制活性について、SH-SY5Y 細胞、U87MG 細胞およびヒト初代星状細胞における SOD1 siRNA の *in vitro* アッセイの IC50 の結果

siRNA 二本鎖 ID	SH-SY5Y 平均 IC50 値 (pM)	U87MG 平均 IC50 値 (pM)	ヒト初代星状細胞
D-2757	13	1	123
D-2806	25	1	113
D-2860	22	1	192
D-2861	17	1	114
D-2875	234	1	151
D-2871	103	1	182
D-2758	369	4	49
D-2759	26	2	219
D-2866	105	1	118
D-2870	78	3	163
D-2823	99	1	186
D-2858	106	1	197

実施例 4：SOD1 を標的とする siRNA

有効であることが確認されている SOD1 siRNA のパッセンジャー - ガイド二本鎖を発現ベクター内に遺伝子操作し、中枢神経系または神経細胞系の細胞にトランスフェクションさせる。siRNA ノックダウン試験に利用されるオーバーハングは siRNA の標準的な dTdT であるが、構築物のオーバーハングは、あらゆるジヌクレオチドのオーバーハングを含み得る。

【0297】

使用される細胞は、初代細胞または多能性幹細胞 (iPS 細胞) に由来するものであってもよい。

次に、SOD1 ノックダウンを測定し、ディープシーケンスを実施して、発現ベクターに投与したそれぞれの構築物からプロセシングされた正確なパッセンジャー鎖およびガイド鎖を決定する。

【0298】

ノックダウン、例えば RNA 誘導性サイレンシング複合体 (RISC) プロセシングの有効性を明らかにするため、パッセンジャー鎖に対するガイド鎖比を算出する。

N 末端を配列決定して分裂部位を決定し、標的の均質な分裂の割合を算出する。分裂率は 90% を上回ることが予想される。

【0299】

並行試験で HeLa 細胞を同時にトランスフェクションし、SOD1 の *in vitro* ノックダウンを分析する。オフターゲット効果を明らかにするため対照としてルシフェラーゼ構築物を用いる。

【0300】

ディープシーケンスを再度実施する。

実施例 5：SOD1 を標的とするパッセンジャーおよびガイドの配列

本発明に照らして、SOD1 siRNA を設計した。表 11A および 11B にこれを示す。これらの表にパッセンジャー鎖とガイド鎖を記載する。表 11A および 11B では、配列名称の「miR」構成要素は、必ずしも miRNA 遺伝子の配列番号付けに対応し

ているわけではない（例えば、VOYmiR-101は配列の名称であり、必ずしもmiR-101がその配列の一部であることを意味するものではない）。

【0301】

【表11A-1】

表11A. パッセンジャーおよびガイド配列（5' - 3'）

名称	二本鎖ID	SS ID	パッセンジャー	パッセンジャー配列番号	AS ID	ガイド	ガイド配列番号
VOY プレ 001_D-2806_開始構 築物 (天然ヌクレオ チド18個と19位は C; 3' 末端の CC ジ ヌクレオチド)	D-2910	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAAC <u>CC</u>	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOY プレ 002_D-2806_p19MM U (19位はU、ミスマ ッチを形成)	D-2911	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACAAU <u>CC</u>	344	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOY プレ 003_D-2806_p19GU ペア (19位はG、GU ペアを形成)	D-2912	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACAAG <u>CC</u>	345	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOY プレ 004_D-2806_p19AU ペア (19はA、AU ペ アを形成)	D-2913	7756	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>ACC</u>	346	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOY プレ 005_D-2806_CMM (中央ミスマッチ)	D-2914	7757	CAAUGUG AC <u>AG</u> CUG ACAAACC	347	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOY プレ 006_D-2806_p19DEL (19位欠失)	D-2915	7758	CAAUGUG ACUGCUG ACAACC	348	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOY プレ 007_D-2806_p19ADD (19位にヌクレオチ ド付加; 付加はU; C 及び末端 CC ジヌク レオチドを保持)	D-2916	7759	CAAUGUG ACUGCUG ACAAUCC C	349	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOY プレ 008_D-2806_Uルー プ	D-2917	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAAC <u>CC</u>	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343

10

20

30

40

【0302】

【表 1 1 A - 2】

VOY プレ 009_D-2806_AU ルー プ	D-2918	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOY プレ 010_D-2806_mir-22- ループ	D-2919	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-101_プレ 001 hsa-mir-155; D-2806	D-2923	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-102_プレ 001 操作; D-2806; let-7b ステム	D-2924	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-103_プレ 002 操作; D-2806_p19MMU; let-7b ステム	D-2925	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACAAUCC	344	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-104_プレ 003 操作; D-2806_p19GU ペア; let-7b ステム	D-2926	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACAAGCC	345	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-105_プレ 004 操作; D-2806_p19AU ペア; let-7b ステム	D-2927	7756	CAAUGUG ACUGCUG ACAAACC	346	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-106_プレ 005 操作; D-2806_CMM; let-7b ステム	D-2928	7757	CAAUGUG ACAGCUG ACAAACC	347	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-107_プレ 006 操作; D-2806_p19DEL; let-7b ステム	D-2929	7758	CAAUGUG ACUGCUG ACAACC	348	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-108_プレ 007 操作; D-2806_p19ADD; let-7b ステム	D-2930	7765	CAAUGUG ACUGCUG ACAAUCC C	355	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343

10

20

30

40

【表 1 1 A - 3】

VOYmiR-109_プレ 008 操作; D-2806_U ループ; let-7b システム	D-2931	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-110_プレ 009 操作; D-2806_AU ループ; let-7b システム	D-2932	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-111_プレ 010 操作; D-2806_mir-22-ループ; let-7b システム	D-2933	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-112_プレ 001 操作; PD; D-2806; let-7b システム、 不安定	D-2934	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-113_プレ 002 操作; D-2806_p19MMU; let-7b システム、 不安定	D-2935	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACAAUCC	344	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-114_プレ 005 操作; D-2806_CMM; let-7b システム、不安定	D-2936	7757	CAAUGUG ACAGCUG ACAAACC	347	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-115_プレ 010 操作; D-2806_mir-22-ループ; let-7b システム、 不安定	D-2937	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-116_プレ 003 操作; D-2806_p19GU ペア; let-7b システム、 不安定	D-2938	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACAAGCC	345	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-117_プレ 001 操作; D-2757; let-7b システム	D-2939	7766	CGACGAA GGCCGUG UGCGCCC	356	7767	UCGCA CACGG CCUUC GUCGU U	357
VOYmiR-118_プレ 001 操作; D-2823; let-7b システム	D-2940	7768	UGACUUG GGCAAAG GUGGCCC	358	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359

10

20

30

40

【表 1 1 A - 4】

VOYmiR-119_プレ 001 操作; D-2866; let-7b ステム	D-2941	7770	AACUCAU CUGUUAU CCUGCCC	360	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-127	D-2942	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	7753	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-102.860	D-2943	7772	CCCCUUA ACUCAUC UGUUGCC	362	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR102.861	D-2944	7774	CCCUUAA CUCAUCU GUUACCC	364	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-102.866	D-2945	7776	AACUCAU CUGUUAU CUUGCCC	366	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-102.870	D-2946	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUUGCC	367	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-102.823	D-2947	7779	UGACUUG GGCAAAG GUGAGCC	369	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-104.860	D-2948	7780	CCCCUUA ACUCAUC UGUUGCC	370	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-104.861	D-2949	7781	CCCUUAA CUCAUCU GUUAGCC	371	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-104.866	D-2950	7782	AACUCAU CUGUUAU CUUAGCC	372	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361

10

20

30

40

【表 1 1 A - 5】

VOYmiR-104.870	D-2951	7783	GCUGUGG AAAUGUA UCUUGCC	373	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-104.823	D-2952	7784	UGACUUG GGCAAAG GUAGGCC	374	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-109.860	D-2953	7772	CCCCUUA ACUCAUC UGUCCCC	362	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-104.861	D-2954	7774	CCCUUAA CUCAUCU GUUACCC	364	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-104.866	D-2955	7776	AACUCAU CUGUUAU CUUGCCC	366	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-109.870	D-2956	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUUCCC	367	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-109.823	D-2957	7779	UGACUUG GGCAAAG GUGAGCC	369	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-114.860	D-2958	7785	CCCCUUA ACACAUC UGUUACC	375	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-114.861	D-2959	7786	CCCUUAA CUGAUCU GUUAACC	376	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-114.866	D-2960	7787	AACUCAU CUCUUAU CUUGCCC	377	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361

10

20

30

40

【表 1 1 A - 6】

VOYmiR-114.870	D-2961	7788	GCUGUGG AAUUGUA UCUUGCC	378	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-114.823	D-2962	7789	UGACUUG GGGAAAG GUGAGCC	379	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-116.860	D-2963	7780	CCCCUUA ACUCAUC UGUUGCC	370	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-116.861	D-2964	7781	CCCUUAA CUCAUCU GUUAGCC	371	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-116.866	D-2965	7790	AACUCAU CUGUUAU CUUGGCC	380	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-116.870	D-2966	7783	GCUGUGG AAAUGUA UCUUGCC	373	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-116.823	D-2967	7784	UGACUUG GGCAAAG GUAGGCC	374	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VoymiR-127.860	D-2968	7791	CCCCUUA ACUCAUU UGUUCCC	381	7773	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VoymiR-127.861	D-2969	7774	CCCUUAA CUCAUCU GUUACCC	364	7775	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VoymiR-127.866	D-2970	7776	AACUCAU CUGUUAU CUUGCCC	366	7771	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361

10

20

30

40

【表 1 1 A - 7】

VoymiR-127.870	D-2971	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUUCCC	367	7778	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VoymiR-127.823	D-2972	7792	UGACUUG GGCAAAG GUAGCCC	382	7769	UCCAC CUUUG CCCAA GUCAU U	359
VOYmiR-120	D-2973	7793	CAAUGUG ACUGCUG ACAAA	383	7794	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU C	384

10

【 0 3 0 8 】

【表 1 1 B】

20

表 1 1 B. パッセンジャーおよびガイド配列 (5' - 3')

名称	二本鎖 ID	SS ID	パッセン ジャー	パッセン ジャー 配列番号	AS ID	ガイド	ガイド 配列番号
VOY プレ 011_D-2806_パ ッセンジャー ガイド鎖、パッ センジャー鎖上 の 3'末端 C でス ワップ	D-2920	7761	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGUC	351	7762	CAAUG UGACU GCUGA CAAAU C	352
VOY プレ 012_D-2806_パ ッセンジャー ガイド鎖、パッ センジャー鎖上 の 3'末端 C でス ワップ	D-2921	7761	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGUC	351	7763	CAAUG UGACU GCUGA CAAUU C	353
VOY プレ 013_D-2806_パ ッセンジャー ガイド鎖、パッ センジャー鎖上 の 3'末端 C でス ワップ	D-2922	7764	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGAC	354	7762	CAAUG UGACU GCUGA CAAAU C	352

30

40

実施例 6 : AAV - miRNA ベクター中の SOD1 siRNA 構築物

表 1 1 にまとめた SOD1 siRNA のパッセンジャー - ガイド二本鎖を AAV - m
iRNA 発現ベクター内に遺伝子操作する。ITR から ITR へ、列挙される 5' から 3

50

への構築物は、突然変異体 ITR、プロモーター (CMV、U6 または CB6 プロモーターのいずれかであり、CMVie エンハンサー、CBA プロモーターおよび SV40 イントロンを含む)、表 11 のパッセンジャー鎖およびガイド鎖 (パッセンジャー鎖とガイド鎖との間のループ、パッセンジャー鎖の前の 5' フランキング領域およびガイド鎖の後の 3' フランキング領域を有する)、ウサギグロビンポリ A および野生型 ITR を含む。In vitro および in vivo 試験を実施し、AAV-miRNA 発現ベクターの有効性を検証する。

【0309】

実施例 7: HeLa 細胞における構築物の活性

実施例 6 に記載されている SOD1 siRNA 構築物 7 種類 (VOYmiR-103、VOYmiR-105、VOYmiR-108、VOYmiR-114、VOYmiR-119、VOYmiR-120 および VOYmiR-127) および二本鎖 mCherry の対照を、その構築物の活性を検証するために HeLa にトランスフェクションした。

10

【0310】

A. パッセンジャーおよびガイド鎖の活性

SOD1 siRNA 構築物 7 種類と二本鎖 mCherry の対照を HeLa 細胞にトランスフェクションした。48 時間後、内在性 mRNA 発現を評価した。SOD1 siRNA 構築物全 7 種類では、75 ~ 80 % のノックダウンを伴うガイド鎖の高い活性と、パッセンジャー鎖の低い活性または活性不存在とが示された。SOD1 siRNA 候補ベクターのガイド鎖は、高い活性を示し、75 ~ 80 % の SOD1 のノックダウンをもたらしたが、パッセンジャー鎖では活性がほとんどない、または全くないことが示された。

20

【0311】

B. SOD1 の構築物の活性

SOD1 siRNA 構築物 7 種類および二本鎖 mCherry (dsCherry) の対照を 1×10^4 v.g / 細胞、 1×10^3 v.g / 細胞または 1×10^2 v.g / 細胞の MOI で HeLa 細胞にトランスフェクションした。72 時間後、内在性 mRNA 発現を評価した。SOD1 siRNA 構築物全 7 種類が、 1×10^3 v.g / 細胞で効率的なノックダウンを示した。図 1 に示すように、SOD1 siRNA 構築物のほとんどで、活性が高い (ノックダウン 75 ~ 80 %) ことが示された。

30

【0312】

実施例 8: HEK 細胞における構築物の活性

実施例 6 に記載された SOD1 siRNA 構築物 30 種類 (VOYmiR-102.860、VOYmiR-102.861、VOYmiR-102.866、VOYmiR-102.870、VOYmiR-102.823、VOYmiR-104.860、VOYmiR-104.861、VOYmiR-104.866、VOYmiR-104.870、VOYmiR-104.823、VOYmiR-109.860、VOYmiR-109.861、VOYmiR-109.866、VOYmiR-109.870、VOYmiR-109.823、VOYmiR-114.860、VOYmiR-114.861、VOYmiR-114.866、VOYmiR-114.870、VOYmiR-114.823、VOYmiR-116.860、VOYmiR-116.861、VOYmiR-116.866、VOYmiR-116.870、VOYmiR-116.823、VOYmiR-127.860、VOYmiR-127.861、VOYmiR-127.866、VOYmiR-127.870、VOYmiR-127.823)、VOYmiR-114 の対照および二本鎖 mCherry を細胞にトランスフェクションし、構築物の活性を検証した。

40

【0313】

A. HEK293 のパッセンジャーおよびガイド鎖の活性

構築物 30 種類および対照 2 つを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。24 時間後、内在性 mRNA 発現を評価した。構築物のほとんどでは、ガイド鎖の活性が高

50

く（図2）、パッセンジャー鎖の活性が低い、あるいは活性がみられない（図3）ことが示された。

【0314】

B. HeLaのパッセンジャーおよびガイド鎖の活性

HeLa細胞に構築物30種類および対照2つをトランスフェクションした。48時間後、内在性mRNA発現を評価した。ほとんどの構築物では、ガイド鎖の活性が高く（図4）、パッセンジャー鎖の活性が低い、あるいは活性がみられない（図5）ことが示された。

【0315】

C. HeLaおよびHEK293の相関

構築物30種類のノックダウンは、HeLa細胞とHEK293細胞との間で類似していた。その構築物30種類は、構築物のガイド鎖に対してノックダウンを示した（図2および4を参照せよ）。構築物のガイド鎖のほとんどが、ノックダウン70～90%を示した。

【0316】

D. キャプシドの選択

HeLaとHEK293のトップの構築物をAAVにパッケージングし、HeLa感染を実施する。その構築物をパッケージングする最良のAAVを割り出すため、AAV2またはAAV-DJ8のいずれかにパッケージングされたmCherryをMOI 10vg/細胞、1e2vg/細胞、1e3vg/細胞、1e4vg/細胞または1e5vg/細胞でHeLa細胞に感染させ、40時間後にその発現を評価した。トップの構築物をパッケージングするためキャプシドとしてAAV2を選択した。

【0317】

E. AAV2産生

HeLaおよびHEK293のトップの構築物をAAV2（1.6kb）にパッケージングし、このほか、二本鎖mCherry（ds-mCherry）の対照もパッケージングした。分析前にパッケージングした構築物にイオジキサノール精製を実施した。AAV力価を表12に示す。

【0318】

【表12】

表12. AAV力価

構築物	AAV力価(μl当りのゲノム)
VOYmir-102 860	5.5E+08
VOYmir-102 861	1.0E+09
VOYmir-102 823	9.1E+08
VOYmir-104 861	1.2E+09
VOYmir-104 866	8.0E+08
VOYmir-104 823	5.7E+08
VOYmir-109 860	3.1E+08
VOYmir-109 861	8.9E+08
VOYmir-109 866	6.0E+08
VOYmir-109 823	6.0E+08
VOYmir-114 860	4.7E+08
VOYmir-114 861	3.7E+08
VOYmir-114 866	1.0E+09
VOYmir-144 823	1.7E+09
VOYmir-116 860	1.0E+09
VOYmir-116 866	9.1E+08
VOYmir-127 860	1.2E+09
VOYmir-127 866	9.0E+08
ds-mCherry	1.2E+09

HeLa細胞におけるSOD1ノックダウンに対する形質導入の効果を図6に示す。さ

らに、HeLa細胞において、より大きいMOI（ 1.0×10^5 と比較した 1.0×10^4 ）では、全ての構築物についてノックダウンの増加を示さなかった。

【0319】

F．ヒト運動ニューロン前駆細胞（HMNP）における構築物の活動

実施例8Eに記載されるような上位18のpri-miRNA構築物およびmCherryの対照を、 1.0×10^5 のMOIでヒト運動ニューロン前駆細胞（HMNP）に感染させた。48時間後、内在性mRNA発現を評価した。約半数の構築物がHMNPのSOD1を50%以上サイレンシングさせ、その内の4つが70%以上サイレンシングさせた（図7）。

【0320】

G．in vivo研究用の構築物の選抜

標的配列に大きな影響を及ぼし、カセットにわずかな影響を及ぼした上位12の構築物が選択される。AAV-rh10キャプシド内にパッケージングされた構築物を注射用に製剤し、構築物が及ぼすin vivoへの影響を研究するため哺乳類に投与した。

【0321】

実施例9：構築物のIn Vitro研究

AAV2にパッケージングされた実施例8Dに記載の18の構築物およびmCherry対照をこの研究に使用した。この研究には、培地（500mlのDMEM/F-12 GLUTAMAX（商標）補充物（Life Technologies、Cat# 10565-018）、50mlのFBS（Life Technologies、Cat# 16000-044、lot: 1347556）、5mlのMEM非必須アミノ酸溶液（100x）（Cat# 11140-050）、および5mlのHEPES（1M）（Life Technologies、Cat# 15630-080））中のHEK293T細胞（Fisher Scientific、Cat# HCL4517）、培地（500mlのDMEM/F-12 GLUTAMAX（商標）補充物（Life Technologies、Cat# 15630-080）、50mlのFBS（Life Technologies、Cat# 16000-044、lot: 1347556）、5mlのMEM非必須アミノ酸溶液（100x）（Cat# 11140-050）、および5mlのHEPES（1M）（Life Technologies、Cat# 15630-080））中のU251MG細胞（P18）（Sigma、Cat# 09063001-1VL）、または、培地（AGM Single Quot Kit Supplement & Growth Factor（Lonza、Cat# CC-4123）を補充した500mlのABM基礎培地（Lonza、Cat# CC-3186））中の正常ヒト星状細胞（HA）（Lonza、Cat# CC-2565）を用いて構築物を試験した。HEK293T細胞（96ウェルプレートに 5×10^4 細胞/ウェル）、U251MG細胞（96ウェルプレートに 2×10^4 細胞/ウェル）およびHA細胞（96ウェルプレートに 2×10^4 細胞/ウェル）を播種し、細胞の感染に使用したMOIは 1.0×10^5 であった。48時間後に細胞を分析したが、その結果を表13に表す。

【0322】

10

20

30

【表 1 3】

表 1 3. 相対SOD1 mRNAレベル

構築物	相対SOD1 mRNAレベル(%) (GAPDHに標準化)		
	HEK293T	U251MG	HA
VOYmiR-102.823	19.5	49.6	87.3
VOYmiR-102.860	1.7	5.3	19.2
VOYmiR-102.861	1.1	13.9	42.6
VOYmiR-104.823	49.9	69.6	102.7
VOYmiR-104.861	1.0	10.7	36.3
VOYmiR-104.866	12.3	54.6	85.5
VOYmiR-109.823	23.0	46.1	84.6
VOYmiR-109.860	1.9	8.3	35.6
VOYmiR-109.861	1.9	22.7	57.3
VOYmiR-109.866	4.1	38.5	67.9
VOYmiR-114.823	19.3	44.7	82.3
VOYmiR-114.860	1.4	4.7	17.6
VOYmiR-114.861	1.1	9.7	48.1
VOYmiR-114.866	4.0	38.7	78.2
VOYmiR-116.860	1.1	4.8	15.8
VOYmiR-116.866	5.5	40.2	73.7
VOYmiR-127.860	1.0	2.1	7.4
VOYmiR-127.866	1.0	15.4	43.8
mCherry	100.0	100.2	100.1

10

20

ほとんどの構築物について、HEK293T細胞において80%以上のノックダウンが観察された。U251MG細胞およびHA細胞において、構築物の半分以上が80%を超えるノックダウンを示した。

【0323】

実施例10：用量依存性のSOD1の減少

30

実施例8Eに記載されたトップ18のpri-miRNA構築物4つとmCherryの対照を、 1.0×10^2 、 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 または 1.0×10^6 のMOIで、ヒト星状細胞株(U251MG)または初代ヒト星状細胞(HA)にトランスフェクトした。48時間後に内因性mRNA発現を評価したが、その用量依存的サイレンシングを図8(U251MG)と図9(HA)に示す。すべての構築物について、用量の増加はまた、ノックダウンされたSOD1 mRNAの量の増加と関連した。

【0324】

実施例11：SOD1ノックダウンの時間的経過

SOD1 siRNAの陰性対照および陽性対照である2つのpri-miRNA構築物(VOYmiR-120およびVOYmiR-122)を、ヒト星状細胞株(U251MG)にトランスフェクトした。図10に示すように、相対SOD1 mRNAを60時間測定した。hSOD1のノックダウンのうち70~75%は、Nucleofectorトランスフェクション後の両方のpri-miR構築物について見られたが、中でも12~24時間の間に最大のノックダウンを示した。

40

【0325】

実施例12：SOD1ノックダウンと鎖のパーセント

VOYmiR-104を、50 pM、100 pMおよび150 pMの濃度でHeLa細胞にトランスフェクトし、未処理(UT)細胞と比較した。相対的なSOD1 mRNA、ガイド鎖のパーセントおよびパッセンジャー鎖のパーセントを、図11A-11Cに示

50

すように、36、72、108および144時間で決定した。最も高い濃度(150 pM)は発現の最大低下を示したが、3つの用量すべてがSOD1の発現の有意な減少を示した。

【0326】

実施例13：SOD1を標的とする構築物

構築物をイヌSOD1のために設計した。その構築物を表14に示す。イヌSOD1は、本発明で標的とする領域において、ヒトと100%保存されている。パッセンジャー鎖およびガイド鎖の配列は、表に記載されている。表14において、配列の名称の「miR」構成要素は、必ずしもmiRNA遺伝子の配列番号付けに対応するわけではない(例えば、dVOYmiR-102は配列の名称であり、必ずしもmiR-102が配列の一部であることを意味するものではない)。

【0327】

【表14】

表14. イヌの配列(5' - 3')

名称	二本鎖ID	SS ID	パッセンジャー	パッセンジャー配列番号	AS ID	ガイド	ガイド配列番号
dVOYmiR-102.788	D-2974	7795	GCAGGUCC UCACUUUA AUGCC	385	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-102.805	D-2975	7797	GGCAAUGU GACUGCUG ACCCC	387	7798	UGUCAGCA GUCACAUU GCCUU	388
dVOYmiR-104.788	D-2976	7799	GCAGGUCC UCACUUUA AUUCC	389	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-104.805	D-2977	7800	GGCAAUGU GACUGCUG AUGCC	390	7798	UGUCAGCA GUCACAUU GCCUU	388
dVOYmiR-109.788	D-2978	7801	GCAGGUCC UCACUUUA AUCCC	391	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-109.805	D-2979	7802	GGCAAUGU GACUGCUG AUACC	392	7798	UGUCAGCA GUCACAUU GCCUU	388
dVOYmiR-114.788	D-2980	7803	GCAGGUCC UGACUUUA AUCCC	393	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-114.805	D-2981	7804	GGCAAUGU GUCUGCUG AUACC	394	7798	UGUCAGCA GUCACAUU GCCUU	388
dVOYmiR-116.788	D-2982	7801	GCAGGUCC UCACUUUA AUCCC	391	7796	GAUUAAG UGAGGACC UGCUU	386
dVOYmiR-116.805	D-2983	7802	GGCAAUGU GACUGCUG AUACC	392	7798	UGUCAGCA GUCACAUU GCCUU	388
dVoymiR-127.788	D-2984	7801	GCAGGUCC UCACUUUA AUCCC	391	7805	GAUUAAG UGAGGACC UGCUUU	395
dVoymiR-127.805	D-2985	7802	GGCAAUGU GACUGCUG AUACC	392	7806	UGUCAGCA GUCACAUU GCCUUU	396

10

20

30

40

50

実施例 14：調節ポリヌクレオチドの位置が及ぼす影響

A．ウイルス力価への影響

図 12 に示すように、*siRNA* 分子 (*VOYmiR-114* または *VOYmiR-126*) を 6 つの異なる位置で発現ベクター (ゲノムサイズ 2400 ヌクレオチド; *scAAV*) に組み込んだ。図 12 では、「*ITR*」は逆方向末端反復であり、「*I*」はイントロンを表し、「*P*」はポリ A であり、「*MP*」は *siRNA* 分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。ウイルス力価を、*TaqMan* PCR を用いて位置 6 および対照 (調節ポリヌクレオチドなしの構築物; *scAAV*) について評価し、その結果を表 15 に示す。

【0328】

【表 15】

10

表 15. ウイルス力価

siRNA 分子	siRNA 分子位置	ウイルス力価 (15cm ディッシュ毎の VG)
VOYmiR-114	位置 1	5.5E+10
VOYmiR-114	位置 2	5.5E+10
VOYmiR-114	位置 3	4.5E+10
VOYmiR-114	位置 4	3.7E+10
VOYmiR-114	位置 5	6.5E+10
VOYmiR-114	位置 6	2.5E+10
VOYmiR-126	位置 1	1.6E+10
VOYmiR-126	位置 2	3.2E+10
VOYmiR-126	位置 3	6.0E+10
VOYmiR-126	位置 4	1.6E+10
VOYmiR-126	位置 5	9.5E+09
VOYmiR-126	位置 6	6.0E+10
-	対照	2.1E+11

20

30

B．ゲノムの完全性への影響

siRNA 分子 (*VOYmiR-114*) を、図 12 に示すように、6 つの異なる位置の発現ベクター (ゲノムサイズ 2400 ヌクレオチド; *scAAV*) および調節ポリヌクレオチドなしの対照 (*scAAV*) に組み込んだ。図 12 では、「*ITR*」は逆方向末端反復であり、「*I*」はイントロンを表し、「*P*」はポリ A であり、「*MP*」は *siRNA* 分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。精製された *AAV* 調製物からウイルスゲノムを抽出し、中性アガロースゲル上に流した。短縮型ゲノムはすべての構築物で見られるが、その短縮型ゲノムのおよそのパーセント (合計のパーセント) を表 16 に示す。

40

【0329】

【表 1 6】

表 1 6. 短縮型ゲノム

構築物	全体の%
位置1	50
位置2	41
位置3	49
位置4	34
位置5	33
位置6	59
対照	9

10

短縮型ゲノムは位置 6 が最大値であり位置 4 および 5 が最小値だった。

【0 3 3 0】

C. ノックダウン効率への影響

図 1 2 に示すように、6 つの異なる位置で s i R N A 分子 (V O Y m i R - 1 1 4) を発現ベクター (A A V 2) (ゲノムサイズ 2 4 0 0 ヌクレオチド ; s c A A V) に組み込んだ。図 1 2 では、「 I T R 」は逆方向末端反復であり、「 I 」はイントロンを表し、「 P 」はポリ A であり、「 M P 」は s i R N A 分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。 1×10^4 v g / 細胞, 1×10^3 v g / 細胞および 1×10^2 v g / 細胞で H e L a 細胞の形質導入を実施した。 S O D 1 mRNA の発現 (対照の % (e G F P) として) を感染の 7 2 時間後に測定した結果を表 1 7 に示す。

20

【0 3 3 1】

【表 1 7】

表 1 7. S O D 1 の発現

構築物	SOD1 mRNA 発現 (対照%)		
	1×10^4 vg/細胞	1×10^3 vg/細胞	1×10^2 vg/細胞
位置 1	40	59	69
位置 2	31	46	75
位置 3	50	66	81
位置 4	21	34	55
位置 5	49	52	67
位置 6	31	37	62
対照(eGFP)	100	100	94

30

40

位置 3 は最も高い S O D 1 mRNA 発現を示し (対照の % として)、位置 4 は最も低い S O D 1 mRNA 発現を示した (対照の % として)。

【0 3 3 2】

実施例 1 5 : ゲノムサイズの影響

A. ウイルス力価への影響

図 1 2 に示すように、s i R N A 分子 (V O Y m i R - 1 1 4) を位置 1、2、5 および 6 の発現ベクター (ゲノムサイズ 2 k b ; s c A A V) に組み込んだ。図 1 2 では、「 I T R 」は逆方向末端反復であり、「 I 」はイントロンを表し、「 P 」はポリ A であり、

50

「MP」はsiRNA分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。siRNA分子を含まない二本鎖対照（ゲノムサイズ1.6kb；scAAV ctrl）と、二本鎖発現ベクター（scAAV miR114；ITR（105ヌクレオチド）-プロモーター（～900ヌクレオチド）-siRNA分子（158ヌクレオチド）-ポリA配列（127ヌクレオチド）およびITRを含む調節ポリヌクレオチド、ならびにsiRNA分子を含まない対照（eGFP；scAAV）を比較した。ウイルス力価をTaqMan PCRを用いて測定した結果を表18に示す。

【0333】

【表18】

10

表18. ウイルス力価

構築物	サイズ	ウイルス力価(15cm培養皿 ごとにVG)
位置1	2 kb	95E+10
位置2	2 kb	12E+11
scAAV miR114	1.6 kb	11E+11
位置5	2 kb	24E+10
位置6	2 kb	11E+11
対照	2 kb	22E+11

20

位置5の構築物で最も低いウイルス力価、位置2の構築物で最も高いウイルス力価が観察された。

【0334】

B. ゲノムの完全性への影響

図12に示すように、siRNA分子（VOYmiR-114）を位置1、2、5および6の発現ベクター（ゲノムサイズ2kb；scAAV）に組み込んだ。図12では、「ITR」は逆方向末端反復であり、「I」はイントロンを表し、「P」はポリAであり、「MP」はsiRNA分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。siRNA分子を含まない二本鎖対照（ゲノムサイズ1.6kb；scAAV ctrl）と、二本鎖発現ベクター（scAAV miR114；ITR（105ヌクレオチド）-プロモーター（～900ヌクレオチド）-siRNA分子（158ヌクレオチド）-ポリA配列（127ヌクレオチド）およびITRを含む調節ポリヌクレオチド、ならびにsiRNA分子を含まない対照（eGFP；scAAV）を比較した。短縮型のゲノムはすべての構築物で見られ、その短縮型ゲノムのおよそのパーセント（全体中のパーセント）を表19に示す。

30

【0335】

【表19】

表19. 短縮型ゲノム

40

構築物	サイズ	全体の%
位置1	2 kb	34
位置2	2 kb	30
scAAV miR114	1.6 kb	20
位置5	2 kb	21
位置6	2 kb	46
対照	2 kb	5

全ての構築物はいくつかの短縮型ゲノムを有することが断定された。

【0336】

50

異なる *siRNA* 分子の効果を究明するためのさらなる研究を行った。図 12 に示すように、*VOYmir-114* および *VOYmir-126* を、位置 3 で別個の発現ベクター（ゲノムサイズ 1.6 kb ; *ssAAV*）に挿入した。図 12 では、「*ITR*」は逆方向末端反復であり、「*I*」はイントロンを表し、「*P*」はポリ A であり、「*MP*」は *siRNA* 分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。*VOYmir-114* 構築物の場合、ベクターゲノムの 5' 末端（1526 ヌクレオチド）と調節ポリヌクレオチドの中心（可撓性ループの中央）の間の距離は 1115 ヌクレオチドである。*VOYmir-126* 構築物の場合、ベクターゲノムの 5' 末端（1626 ヌクレオチド）と調節ポリヌクレオチドの中心（可撓性ループの中央）との間の距離は 1164 ヌクレオチドである。

【0337】

VOYmir-114 構築物について、ウイルス力価（15 cm 培養皿当たりの VG）は約 1.1×10^{11} であった。*VOYmir-126* 構築物について、イントロンプロンプウイルス力価（15 cm 培養皿当たりの VG）は約 1.2×10^{12} であった。対照は約 2.1×10^{11} （15 cm 培養皿当たりの VG）であった。*VOYmir-114* は約 20% の短縮型ゲノムを有し、*VOYmir-126* は約 15% の短縮型ゲノムを有し、対照は約 5% の短縮型ゲノムを有した。

【0338】

実施例 16：一本鎖構築物の影響

A．ウイルス力価への影響

図 12 に示すように、位置 1、3 および 5 の発現ベクター（ゲノムサイズ 4.7 kb ; *ssAAV*）に *siRNA* ポリヌクレオチド（*VOYmir-114*）を組み込んだ。また *siRNA* ポリヌクレオチド（ゲノムサイズ 2 kb ; *ssAAV*）なしで試験した対照もあった。図 12 では、「*ITR*」は逆方向末端反復であり、「*I*」はイントロンを表し、「*P*」はポリ A であり、「*MP*」は *siRNA* 分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。ウイルス力価を *TaqMan* PCR を用いて評価した結果を表 20 に示す。

【0339】

【表 20】

表 20. ウイルス力価

構築物	ウイルス力価(15cm 培養皿ごとに VG)
位置1	5.0×10^{11}
位置3	7.5×10^{11}
位置5	3.5×10^{11}
対照	2.5×10^{11}

位置 3 が最も高いウイルス力価を示し、位置 1 そして位置 5 の順で続いた。

【0340】

B．ゲノムの完全性への影響

図 12 に示すように、位置 1、3 および 5 の発現ベクター（ゲノムサイズ 4.7 kb ; *ssAAV*）に *siRNA* 分子（*VOYmir-114*）を組み込んだ。また調節性ポリヌクレオチドなしで試験した対照もあった（ゲノムサイズ 2 kb ; *ssAAV*）。図 12 では、「*ITR*」は逆方向末端反復であり、「*I*」はイントロンを表し、「*P*」はポリ A であり、「*MP*」は *siRNA* 分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。精製された *AAV* 調製物からウイルスゲノムを抽出し、中性アガロースゲル上に流した。すべての構築物に短縮型ゲノムが観察され、短縮型ゲノムのおよそのパーセント（全体中のパーセント）を表 21 に示す。

【0341】

【表 2 1】

表 2 1. 短縮型ゲノム

構築物	全体の%
位置1	48
位置3	30
位置5	72
対照	0

短縮型ゲノムは位置 5 が最大値であり位置 3 が最小値であった。

【0 3 4 2】

C. ノックダウン効率への影響

図 1 2 に示すように、位置 1、3 および 5 の発現ベクター（ゲノムサイズ 4.7 kb ; ssAAV）に siRNA 分子（VOYmiR-114）を組み込んだ。siRNA 分子を含まない一本鎖対照（ゲノムサイズ 2 kb ; ssAAV ctrl）、siRNA 分子を含まない二本鎖対照（ゲノムサイズ 1.6 kb ; scAAV ctrl）、siRNA 分子を含む二本鎖発現ベクター（ゲノムサイズ 2.4 kb ; scAAV miR114）が存在した。図 1 2 では、「ITR」は逆方向末端反復であり、「I」はイントロンを表し、「P」はポリ A であり、「MP」は siRNA 分子を含む調節ポリヌクレオチドを示す。1 x 10⁴ vg / 細胞, 1 x 10³ vg / 細胞および 1 x 10² vg / 細胞で HeLa 細胞の形質導入を実施した。SOD1 mRNA 発現（対照（eGFP）の % として）を感染の 72 時間後に測定し、その結果を表 2 2 に示す。

【0 3 4 3】

【表 2 2】

表 2 2. SOD1 の発現

構築物	SOD1 mRNA 発現(対照%)		
	1 x 10 ⁴ vg/細胞	1 x 10 ³ vg/細胞	1 x 10 ² vg/細胞
位置 1	62	85	87
位置 3	77	93	99
位置 5	59	82	84
ssAAV 対照	100	101	108
scAAV 対照	95	97	102
scAAV miR114	23	33	62

位置 3 は最も高い SOD1 mRNA 発現（対照の % として）を有し、次いで位置 1 であり、最も低い SOD1 mRNA 発現を有する一本鎖構築物（対照の % として）は位置 5 であった。一本鎖構築物のいずれも、siRNA ポリヌクレオチドを用いた二本鎖対照ほど低いノックダウン効率を有さなかった。

【0 3 4 4】

実施例 17: in vivo での SOD1 ノックダウン

pri-miRNA の in vivo 生物活性を測定するために、自己相補の pri-miRNA (VOYmiR-114.806、VOYmiR127.806、VOYmiR102.860、VOYmiR109.860、VOYmiR114.860、VOYmiR116.860、VOYmiR127.860、VOYmiR102.861、VOYmiR104.861、VOYmiR109.861、VOYmiR114.86

1、VOYmiR109.866、VOYmiR116.866、またはVOYmiR127.866)がCBAプロモーターを有するAAV-DJにパッケージングされた。

【0345】

マウスにおいて、これらのパッケージされたpri-miRNAまたはビヒクルのみの対照(5%ソルビトールおよび0.001%F-68を含むリン酸緩衝化生理食塩水)を、10分間の点鼻内注入によって投与した。ヒトSOD1を発現し、体重約20~30gの雌または雄のTg(SOD1)3Cje/Jマウス(Jackson Laboratory、バーハーバー、メイン州)に線条体を標的とする5μLの被験物質の片側注入をする(ブレグマに対し、前後+0.5mm、中外+2mm。頭蓋骨表面に対し、背腹3.8mm)。被験物質を、33ゲージ針を用いて、予め充填されポンプ制御されたハミルトンマイクロシリンジ(1701モデル、10μL)を用いて、毎分0.5μLで注射する(被験物質当たり5匹の動物)。注射後1、2、3、4または6週間で動物を屠殺し、脳を摘出し、1mmの冠状スラブからの注入部位を包含する同側の線条ならびに隣接する1mmの冠状スラブからの線条体組織を解剖し、瞬間凍結させる。マウス組織サンプルを溶解し、ヒトSOD1タンパク質レベル、SOD1およびマウスGAPDH(mGAPDH)mRNAレベルを定量する。SOD1タンパク質レベルを、ELISA(eBioscience(Affymetrix、サンディエゴ、カリフォルニア州))により定量し、全タンパク質レベルをBCA分析(ThermoFisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州)によって定量する。各組織サンプルについて、全タンパク質に対して標準化されたSOD1タンパク質のレベルは、2回の測定の平均値で計算される。これら標準化したSOD1タンパク質レベルをビヒクル群に対してさらに標準化し、次に平均して群(治療群)の平均を得る。SOD1およびmGAPDH mRNAレベルをqRT-PCRによって定量する。各組織サンプルについて、SOD1/mGAPDH(標準化したSOD1 mRNAレベル)の比率を、3回の測定の平均値で計算する。次いで、これらの比率を平均して群(治療群)の平均値を得る。これらの群の平均は、ビヒクル群に対してさらに標準化される。

【0346】

ヒト以外の霊長類においては、被験物質(CBAプロモーターを有するAAV-DJにパッケージされたpri-miRNAの 1×10^{13} - 3×10^{13} vg)またはビヒクルは、髄腔内腰椎ポータスにより投与される。約2.5~8.5kgの体重のメスのカニクイザル(Macaca fascicularis、CR Research Model Houston、ヒューストン、テキサス州)には、腰椎に位置するカテーテルの先端を有する移植された単一髄腔内カテーテルを受け入れる。被験物質を、約60分間隔で、1mLポータス注射(毎分1mL)を3回投与する(被験物質当たり4匹の動物)。投与後4~6週間で動物を屠殺し、選択した組織を採取して生物分析および組織学的評価を行う。SOD1タンパク質およびmRNAレベルを、ビヒクル群に対して、CBAプロモーターを有するAAV-DJにパッケージングされたpri-miRNAでの治療後における抑制について評価する。

【0347】

実施例18:VOYmiR-114.806を用いたin vivoでのSOD1ノックダウン

Tg(SOD1)3Cje/Jマウスにおいて、実施例17に記載のように、CBAプロモーターを有するAAVDJ中にVOYmiR-114.806をパッケージングした。マウスに、一方向性線条体投与によって投与した。投与量は 3.7×10^9 vgであった。1週間または2週間後、標準化したSOD1タンパク質レベルの有意な減少はなかった。ビヒクル対照群のSOD1タンパク質濃度は、1週間および2週間後にそれぞれ $98 \pm 11\%$ (標準偏差)および $98 \pm 10\%$ であった。第3週までに、VOYmiR-114.806は、標準化SOD1タンパク質レベルをビヒクル対照群の $84 \pm 1\% \pm 2\% 9.0\%$ に減少させたが、これは統計的に有意であった($p < 0.05$ 、Dunnettのポストホック分析による一元配置ANOVA)。第4週および第6週までに、VOYm

i R - 1 1 4 . 8 0 6 は、正常化 S O D 1 タンパク質レベルをそれぞれビヒクル対照グループの $73 + 7.9\%$ ($p < 0.0001$) および $75 + 7.4\%$ ($p < 0.0001$) 減少させた。これらの結果は、C B A プロモーターを有する A A V - D J にパッケージングされた V O Y m i R - 1 1 4 . 8 0 6 が、S O D 1 タンパク質レベルをダウンモジュレーションするのに *in vivo* で有効であることを実証している。さらに、これらの結果は、C B A プロモーターを有する A A V D J 中にパッケージングされた V O Y m i R - 1 1 4 . 8 0 6 の 3.7×10^9 v g の総線条体用量が S O D 1 タンパク質レベルの有意なダウンモジュレーションをもたらしたことを実証する。

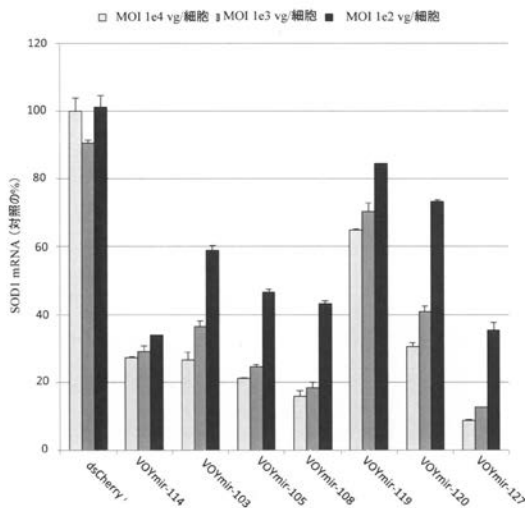
【0348】

本発明は、記載された幾つかの実施形態に関して、ある程度の長さで、ある程度の特殊性を以て説明されているが、本発明は、そのような特殊性、実施形態、または任意の特定の実施形態に限定されるように意図されておらず、本発明は、添付の特許請求の範囲を参照して解釈されるべきである。その理由は、先行技術を考慮してそのような請求の範囲を可能な限り広く解釈するためであり、また本発明の意図する範囲を効果的に包含するためである。

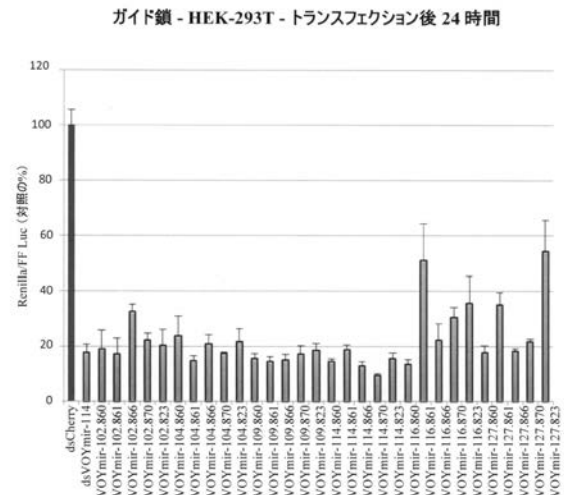
【0349】

本明細書で言及された全ての刊行物、特許出願、特許およびその他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配する。さらに、セクション見出し、材料、方法、および実施例は、例示的なものに過ぎず、限定することを意図するものではない。

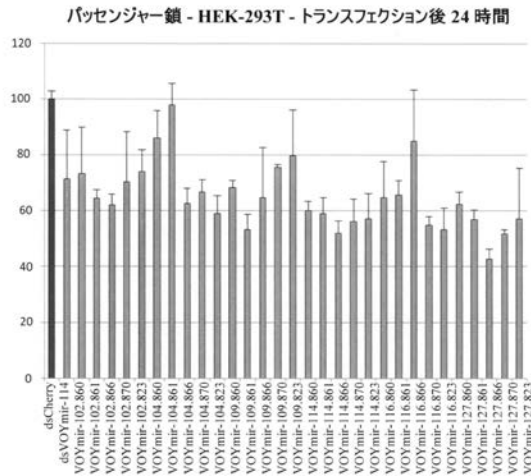
【図 1】



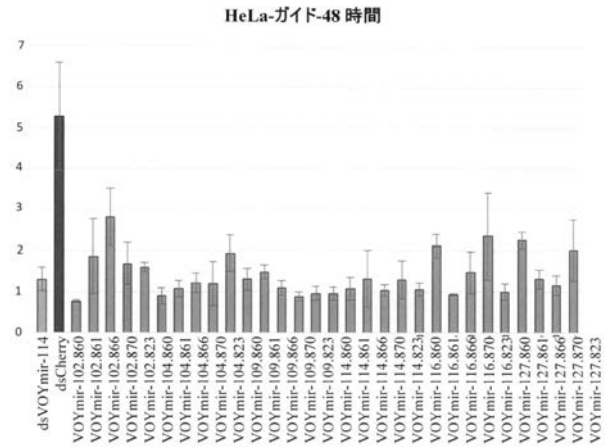
【図 2】



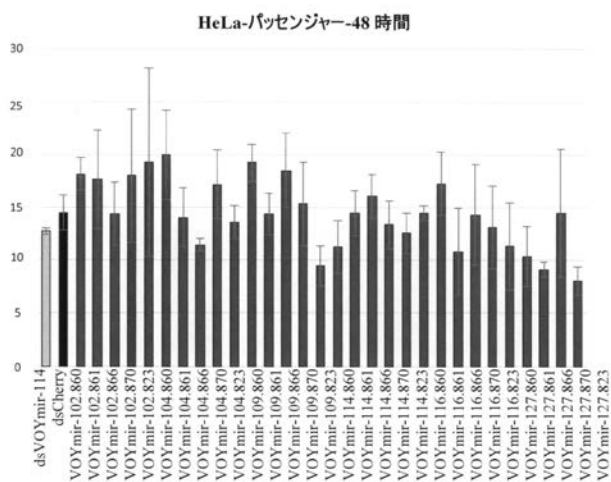
【図 3】



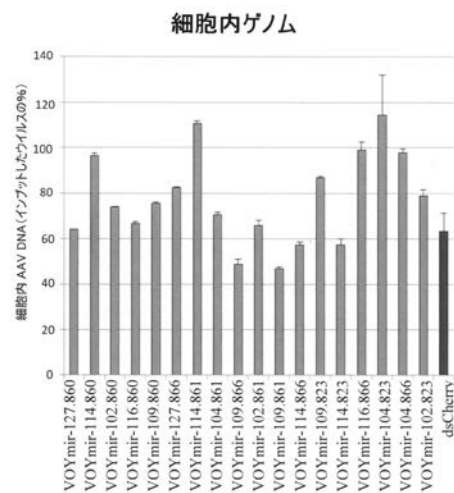
【図 4】



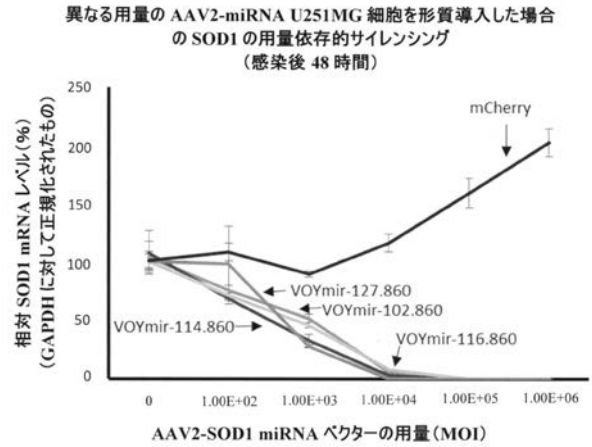
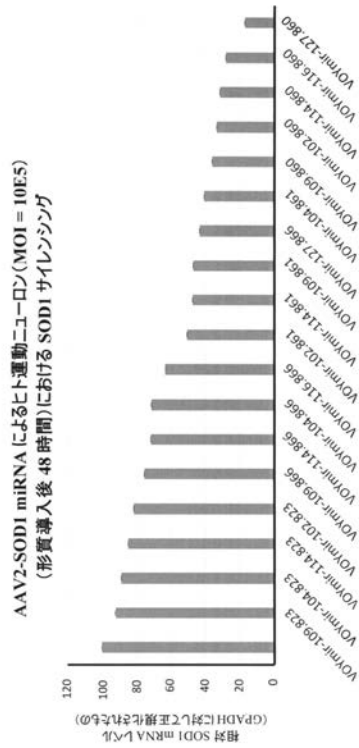
【図 5】



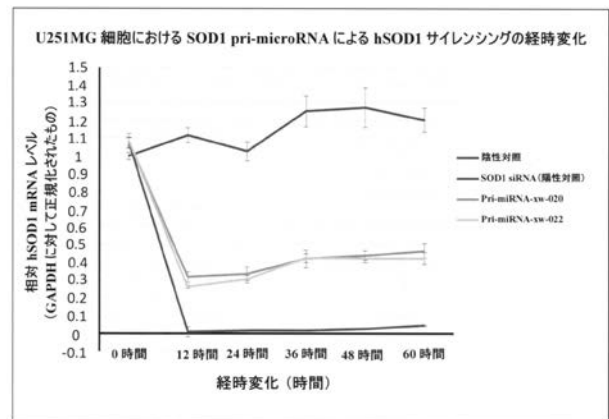
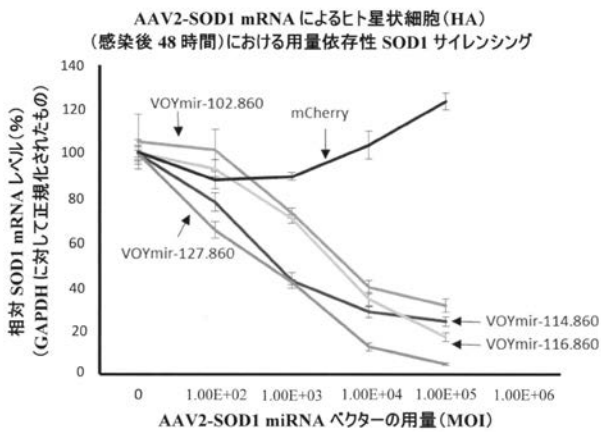
【図 6】



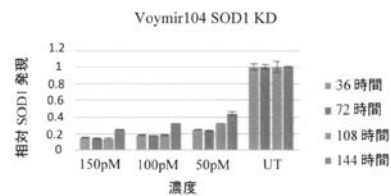
【 図 8 】



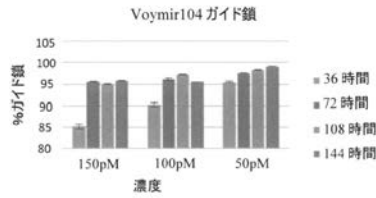
【 ㊦ 1 0 】



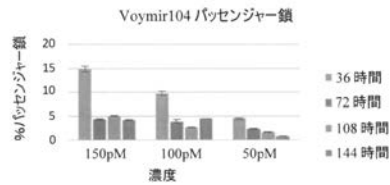
【 図 1 1 A 】



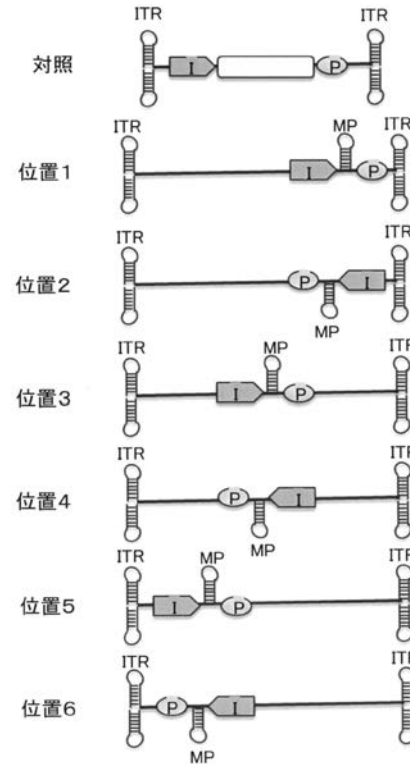
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



【図 1 2】



【配列表】

2017535266000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年6月17日(2016.6.17)

【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】

2つの逆方向末端反復（ITR）の間に位置する核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターであって、前記核酸配列は、それが発現した場合に、細胞中のSOD1の遺伝子発現を阻害または抑制し、前記核酸配列は、センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含み、前記センス鎖配列は、表3、表11または表14に列挙された配列のヌクレオチド配列と3ヌクレオチド以下で異なる少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖配列は、表3、表11または表14に列挙された配列のヌクレオチド配列と3ヌクレオチド以下で異なる少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含み、前記センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列は、少なくとも4ヌクレオチド長の相補性領域を共有する、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター。

【請求項 2】

前記核酸配列が、siRNA二本鎖のセンス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含む、請求項1に記載のAAVベクター。

【請求項 3】

前記siRNA二本鎖が、siRNA二本鎖ID番号D-2741～ID番号D-29

85からなる群から選択される、請求項2に記載のAAVベクター。

【請求項4】

前記siRNA二本鎖が、siRNA ID: D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823、およびD-2858の核酸配列からなる群から選択される、請求項2に記載のAAVベクター。

【請求項5】

前記相補性領域が少なくとも17ヌクレオチドの長さである、請求項1に記載のAAVベクター。

【請求項6】

前記相補性領域が19から21ヌクレオチドの長さである、請求項5に記載のAAVベクター。

【請求項7】

前記相補性領域が19ヌクレオチドの長さである、請求項6に記載のAAVベクター。

【請求項8】

前記センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列が、独立して、30ヌクレオチド以下である、請求項1に記載のAAVベクター。

【請求項9】

前記センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列の少なくとも1つが、少なくとも1ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項1に記載のAAVベクター。

【請求項10】

前記センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列の少なくとも1つが、少なくとも2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項9に記載のAAVベクター。

【請求項11】

前記AAVベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8およびAAV-DJおよびそれらの変異体からなる群から選択されるキャプシド血清型を含む、請求項1に記載のAAVベクター。

【請求項12】

細胞中のSOD1遺伝子の発現を阻害する方法であって、請求項1～11のいずれか一項に記載のAAVベクターを含む組成物を前記細胞に投与することを含む方法。

【請求項13】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記哺乳類細胞が運動ニューロンである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記哺乳類細胞が星状細胞である、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

治療を必要とする対象における筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療および改善の少なくとも一方を行う方法であって、請求項1～11のいずれか一項に記載のAAVベクターを含む組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項17】

前記SOD1の発現が阻害または抑制される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記SOD1が野生型SOD1、少なくとも1つの突然変異を有する突然変異SOD1、または野生型SOD1および少なくとも1つの突然変異を有する突然変異SOD1である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記SOD1の発現が、約20%～約100%阻害または抑制される、請求項16に記

載の方法。

【請求項 20】

前記 A L S が、同定された S O D 1 遺伝子突然変異を有する家族性 A L S である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 A L S が散発性 A L S である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

S O D 1 遺伝子が細胞内で機能効果をもたらす変異を含む細胞における S O D 1 遺伝子の発現を抑制する方法であって、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の A A V ベクターを含む組成物を前記細胞に投与することを含む方法。

【請求項 23】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記哺乳動物細胞が運動ニューロンである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記哺乳類細胞が星状細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/60562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/11, C12N 15/113, C12N 15/85 (2016.01) CPC - C12N 15/111, C12N 15/113, C12N 15/1137, C12N 15/85 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) IPC(8) - C12N 15/11, C12N 15/113, C12N 15/85 (2016.01) CPC - C12N 15/111, C12N 15/113, C12N 15/1137, C12N 15/85 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12N 2310/11, C12N 2310/14, C12Y 115/01001 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar Search terms: adeno-associated virus, adeno associated virus, AAV, inverted terminal repeat, SOD1, SOD 1, superoxid dismutase, siRNA, duplex, vector		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2003/0180756 A1 (SHI et al.) 25 September 2003 (25.09.2003) para [0012], [0025], [0088], [0117], [0225]	1-2, 5-11 ----- 3-4
Y — A	US 2011/0039914 A1 (PAVCO et al.) 17 February 2011 (17.02.2011) para [0047], [0048], [0060]; p 37, Table 2, Sequence No. 10378	1-2, 5-11 ----- 3-4
Y — A	BY999593, GenBank EST No. BY999593, BY999593 human cDNA library, immortalized cell line of corneal epithelial cells Homo sapiens cDNA clone cp1739 3-, mRNA sequence, 14 April 2008 [online], [Retrieved on 5 April 2016]. Retrieved from the internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/BY999593 > Entire document	1-2, 5-11 ----- 3-4
Y — A	US 20060229268 A1 (BENJAMIN et al.) 12 October 2006 (12.10.2006) para [0053], [0087]; Table 3; SEQ ID NO: 490	1-2, 5-11 ----- 3-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 April 2016		Date of mailing of the international search report 19 APR 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/60562

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-----please see extra sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-11, limited to SEQ ID NOs: 4 and 173 (siRNA duplex No. D-2741), SEQ ID NOs: 123 and 292 (siRNA duplex No. D-2860), and (siRNA duplex No. D-2861)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/60562

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following Inventions or groups of Inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all Inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-11, drawn to a composition comprising an adeno-associated viral (AAV) vector comprising a nucleic acid sequence positioned between two inverted terminal repeats (ITRs) for inhibiting or suppressing expression of SOD 1 in a cell. The composition will be searched to the extent that the nucleic acid sequence of the AAV vector encompasses:

- the sense strand of SEQ ID NO: 4 (first sense strand of Table 3; corresponds to sense strand of siRNA duplex D-2741),
- the antisense strand of SEQ ID NO: 173 (first antisense strand of Table 3; corresponds to antisense strand of siRNA duplex D-2741),
- the siRNA duplex No. D-2741.

It is believed that claims 1-3, 5-11, limited to SEQ ID NOs: 4 and 173 (siRNA duplex No. D-2741), encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a composition comprising an AAV vector comprising a nucleic acid sequence of siRNA duplex No. D-2741, namely SEQ ID NOs: 4 and 173. Additional nucleic acid sense and antisense strand sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected nucleic acid sense and antisense strand sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be composition comprising and AAV vector comprising a nucleic acid sequence comprising the sense strand SEQ ID NO: 5 and the antisense strand SEQ ID NO: 174, i.e. claims 1-3, 5-11, limited to SEQ ID NOs: 5 and 174 (siRNA duplex No. D-2742).

Group II: Claims 12-15 and 22-25, drawn to a method for inhibiting the expression of SOD 1 gene in a cell

Group III: Claims 16-21, drawn to a method for treating and/or ameliorating amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in a subject in need of treatment

The inventions listed as Groups I+, II, and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I+ requires a composition of matter comprising an AAV vector, while Groups II and III are drawn to methods. Further, the technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific nucleic acid sense and antisense strand sequences recited therein. Each invention requires a nucleic acid sense strand sequence and nucleic acid antisense strand sequence, not required by any of the other inventions.

Group II requires method steps for inhibiting the expression of SOD 1 gene in a cell, not required by Groups I+ and III.

Group III requires method steps for treating and/or ameliorating amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in a subject in need of treatment, not required by Groups I+ and II.

Common Technical Features

The feature shared by the inventions listed as Groups I+ is the AAV vector of claim 1. Groups II and III also share this feature with Group I+.

Another feature shared by Groups I+, II, and III is the AAV vector described in claims 2-11.

Another feature shared by Groups II and III is the method step of administering a composition comprising an AAV vector in order to inhibit SOD1 [claim 12, 22] or treat amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [claim 16].

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2003/0180756 A1 to Shi et al. (hereinafter "Shi").

Shi discloses [claim 1] an adeno-associated viral (AAV) vector comprising a nucleic acid sequence positioned between two inverted terminal repeats (ITRs) for inhibiting or suppressing expression of SOD 1 in a cell (para [0117] "The AAV-based expression vector to be used typically includes the 145 nucleotide AAV inverted terminal repeats (ITRs) flanking a restriction site that can be used for subcloning of the nucleic acid of the invention, either directly using the restriction site available, or by excision of the transgene with restriction enzymes followed by blunting of the ends, ligation of appropriate DNA linkers, restriction digestion, and ligation into the site between the ITRs."; para [0025] "Fig. 5A depicts a rAAVrh.10 vector that expresses a microRNA targeting SOD1... ITRs mark the inverted repeats of the AAV"; para [0225] "Taken together, our data show that both synthetic siRNAs and hairpin vectors can selectively down-regulate the expression of mutant SOD1, even when the mutant mRNA differs from wild-type by only a single nucleotide").

wherein said nucleic acid sequence comprises a sense strand sequence and an antisense strand sequence (para [0012] "a first target sequence of about 19 to about 25 nucleotides, which is essentially complementary, e.g., at least about 95 percent identical, to a portion of a nucleotide sequence of a target nucleic acid or the complement thereof; ... a second target sequence of about 19 to about 25 nucleotides that is essentially complementary to the first target sequence; ... wherein the RNA inhibits expression of a target gene comprising a sequence that is essentially complementary to the first or the second target sequence"),

wherein the sense strand sequence comprises at least 15 contiguous nucleotides and the antisense strand sequence comprises at least 15 contiguous nucleotides (para [0012] "about 19 to about 25 nucleotides"), and

wherein said sense strand sequence and antisense strand sequence share a region of complementarity of at least four nucleotides in length (para [0012] "The first and the second target sequences may consist of about 19 to about 23 nucleotides and may be perfectly complementary to each other").

— please see continuation on next extra sheet —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/60562

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Shi further discloses [claim 4] wherein the nucleic acid sequence comprises a sense strand sequence and an antisense strand sequence of an siRNA duplex (para [0012] "It may have the structure of an siRNA. The first and the second target sequences may consist of about 19 to about 23 nucleotides and may be perfectly complementary to each other").

Shi further discloses [claim 5] wherein the region of complementarity is at least 17 nucleotides in length (para [0012] "The first and the second target sequences may consist of about 19 to about 23 nucleotides and may be perfectly complementary to each other").

Shi further discloses [claim 6] wherein the region of complementarity is between 19 and 21 nucleotides in length (para [0012] "The first and the second target sequences may consist of about 19 to about 23 nucleotides and may be perfectly complementary to each other").

Shi further discloses [claim 7] wherein the region of complementarity is 19 nucleotides in length (para [0012] "The first and the second target sequences may consist of about 19 to about 23 nucleotides and may be perfectly complementary to each other").

Shi further discloses [claim 8] wherein the sense strand sequence and the antisense strand sequence are, independently, 30 nucleotides or less (para [0012] "The first and the second target sequences may consist of about 19 to about 23 nucleotides and may be perfectly complementary to each other").

Shi further discloses [claim 9] wherein at least one of the sense strand sequence and the antisense strand sequence comprise a 3' overhang of at least 1 nucleotide (para [0088] "These RNAs are expected to form hairpin structures, wherein the first and the second target sequences hybridize to essentially form the stem of the hairpin and the spacer sequence corresponds essentially to the loop at the closed end of the hairpin structure. In some embodiments, the hairpins contain ... 3' overhangs of five or fewer uridines.").

Shi further discloses [claim 10] wherein at least one of the sense strand sequence and the antisense strand sequence comprise a 3' overhang of at least 2 nucleotides (para [0088] "3' overhangs of five or fewer uridines.").

Shi further discloses [claim 11] wherein the AAV vector comprises a capsid serotype AAVrh10 (para [0025] "Fig. 5A depicts a rAAVrh.10 vector that expresses a microRNA targeting SOD1").

Shi further discloses administering a composition comprising an AAV vector in order to inhibit SOD1 [claim 12, 22] and treat amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [claim 16] (para [0149] "The vast majority of ALS-causing SOD1 mutations are single-nucleotide point mutations that alter single amino acid in the protein (<http://www.alsod.org/>). Accordingly, ALS can be treated or prevented by a method comprising administering to the subject a pharmaceutically effective amount of a nucleic acid of the invention comprising a first targeting sequence that is essentially complementary, and preferably perfectly complementary, to a sequence of the SOD1 gene comprising a point mutation or complement thereof").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups. Groups I+, II, and III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28		
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088		
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N 15/00	G	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,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,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 サー、ディナー ウェン イー

アメリカ合衆国 0 1 7 4 8 マサチューセッツ州 ホプキントン ハックルベリー ロード 1 5

(72)発明者 ホウ、ジンジャオ

アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州 ベルモント ヒル ロード 4 9 アパートメント 5 5

(72)発明者 ノンネンマッチャー、マシュー イー .

アメリカ合衆国 0 2 2 1 5 マサチューセッツ州 ボストン クイーンズベリー ストリート 9 8 アpartment 1 0

(72)発明者 ジョウ、ペンチェン

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州 レキシントン パンクス アベニュー 1 7

(72)発明者 ホスバッハ、マルクス

ドイツ連邦共和国 9 5 3 2 6 クルムバッハ ヴァイエラー シュトラッセ 3 0

(72)発明者 デッカート、ヨヘン

ドイツ連邦共和国 9 5 3 2 6 クルムバッハ オーバーハッケン 1 2

F ターム(参考) 4C084 AA13 MA16 MA17 MA23 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59

MA60 MA63 MA65 MA66 MA70 NA14 ZA021 ZA941 ZC411

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA94 ZC41

4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA02 ZA94 ZC41