(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-523445
(P2024-523445A)
(43)公表日　令和6年6月28日(2024.6.28)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/864 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*7/01 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/01		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全61頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-578738(P2023-578738)
(86)(22)出願日　令和4年6月21日(2022.6.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月9日(2024.2.9)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/066922
(87)国際公開番号　WO2022/268835
(87)国際公開日　令和4年12月29日(2022.12.29)
(31)優先権主張番号　21180613.8
(32)優先日　令和3年6月21日(2021.6.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　22168018.4
(32)優先日　令和4年4月12日(2022.4.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　522343120
ユニキュアー バイオファーマ ビー．ブイ．
ＵＮＩＱＵＲＥ ＢＩＯＰＨＡＲＭＡ Ｂ．Ｖ．
オランダ王国， １１０５ ビーピー アムステルダム， パースフーフェルヴェーク ２５
(74)代理人　100107456
弁理士　池田 成人
(74)代理人　100162352
弁理士　酒巻 順一郎
(74)代理人　100123995
弁理士　野田 雅一
(72)発明者　アッカー ブロークマンズ， セイダ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　α－シヌクレインをサイレンシングするための遺伝子構築物及びその使用

(57)【要約】

本発明は、核酸、組成物、パーキンソン病（ＰＤ）、多系統萎縮症（ＭＳＡ）及び／又は他のα－シヌクレオパチーの治療及び／又は予防における前記組成物の医学的使用に関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＲＮＡをコードする核酸配列を含む核酸であって、前記ＲＮＡに含まれるＲＮＡ配列がα－シヌクレイン（α－ｓｙｎ）遺伝子（ＳＮＣＡ）の標的配列に実質的に相補的であり、前記ＲＮＡ配列が少なくとも１５個のヌクレオチドを有し、前記ＲＮＡがヘアピンを含み、前記ＲＮＡが配列番号１、配列番号２、又は配列番号１若しくは配列番号２のバリアントを含む、核酸。
【請求項２】
前記ヘアピンが少なくとも３９個のヌクレオチドを含む、請求項１に記載の核酸。
【請求項３】
前記ＲＮＡ配列が少なくとも１８個のヌクレオチドを有する、請求項１又は２に記載の核酸。
【請求項４】
前記ＲＮＡ配列が最大３２個のヌクレオチドを有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項５】
前記標的配列が、前記α－ｓｙｎ遺伝子に含まれるエクソンの一部である、請求項１～４のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項６】
前記エクソンが、エクソン２、エクソン４及びエクソン６からなる群から選択される、請求項５に記載の核酸。
【請求項７】
前記エクソンの前記部分が、配列番号３～９及び配列番号３～９のバリアントからなる群から選択される配列からなる、請求項５又は６に記載の核酸。
【請求項８】
前記ＲＮＡ配列が、配列番号１０～１６及び配列番号１０～１６のバリアントからなる群から選択される１つの配列を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項９】
ＤＮＡ分子である、請求項１～８のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項１０】
ＤＮＡ発現カセットに含まれるＤＮＡ分子であって、前記ＤＮＡ発現カセットにおいて、プロモーター及びポリＡテールをさらに含み、前記核酸が逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）に隣接している、請求項９に記載のＤＮＡ分子。
【請求項１１】
前記プロモーターがユビキタスプロモーター；ニューロン特異的プロモーター；又はグリア特異的プロモーターである、請求項１０に記載のＤＮＡ分子。
【請求項１２】
請求項９～１１のいずれか一項に記載のＤＮＡ分子を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ビヒクル。
【請求項１３】
ＡＡＶ５又はＡＡＶ９カプシドタンパク質配列を含むカプシドを含む、請求項１２に記載のＡＡＶビヒクル。
【請求項１４】
前記ＡＡＶビヒクルが遺伝子治療ビヒクルである、請求項１２又は１３に記載のＡＡＶビヒクル。
【請求項１５】
請求項１２～１４のいずれか一項に記載のＡＡＶビヒクルと、少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤とを含む組成物。
【請求項１６】
医薬として使用するための、請求項１２～１４のいずれか一項に記載のＡＡＶビヒクル

又は請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
前記医薬が、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる転写物を減少させる及び／又はノックダウンする、請求項１６に記載の医薬として使用するためのＡＡＶビヒクル又は組成物。
【請求項１８】
前記医薬が、レビー小体及び／又はＰａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ小体の量を減少させる、請求項１６又は１７に記載の使用のためのＡＡＶビヒクル又は組成物。
【請求項１９】
前記医薬が、パーキンソン病（ＰＤ）、レビー小体型認知症（ＬＢＤ）、多系統萎縮症（ＭＳＡ）、神経障害症状、ＰＤの運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害、及び／又は嗅覚障害の臨床症状を治療及び／又は予防するために使用される、請求項１６～１８のいずれか一項に記載の使用のためのＡＡＶビヒクル又は組成物。
【請求項２０】
前記医薬がＰＤ及び／又はＭＳＡを治療及び／又は予防するために使用される、請求項１６～１９のいずれか一項に記載の使用のためのＡＡＶビヒクル又は前記ＡＡＶビヒクルを含む組成物。
【請求項２１】
請求項１２～１４のいずれか一項に記載のＡＡＶビヒクルを製造する方法。
【請求項２２】
免疫抑制化合物をさらに含む、請求項１２～１４のいずれか一項に記載のＡＡＶビヒクルを含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、特に遺伝子治療の状況において、α－シヌクレイン（α－ｓｙｎ）遺伝子（ＳＮＣＡ）の転写物を減少及び／又はノックダウンし、パーキンソン病（ＰＤ）及び他のα－シヌクレオパチーを治療及び／又は予防するための核酸、前記核酸の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
線維性α－シヌクレイン封入体は、２つの主要な神経変性疾患クラス：レビー小体型疾患、例えば、ＰＤ、レビー小体型認知症（ＬＢＤ）、例えば認知症を伴うＰＤ（ＰＤＤ）を含む、及び）レビー小体を伴う認知症（ＤＬＢ））、並びに多系統萎縮症（ＭＳＡ）を含む、Ｐａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ小体を特徴とするものを定義する。これらはまとめてシヌクレイノパチーと呼ばれる。
【０００３】
パーキンソン病（ＰＤ）は、運動症状及び非運動症状を引き起こし得る複雑な進行性神経変性障害である。ＰＤの典型的な臨床的特徴は、運動緩慢、安静時振戦、硬直、及び／又は後の段階で生じる姿勢不安定性を含む。臨床診断の前及び／又は後に、非運動症状が起こり得る。これらには、疾患の初期段階におけるうつ病、睡眠障害、疼痛及び疲労、並びに疾患の後期段階における不安、認知症及び認知機能障害が含まれる。運動症状と非運動症状の両方が患者にとって消耗性であり、介護者に負担をかける。
【０００４】
ＰＤは複雑な疾患であり、その原因は不明のままであるが、多数の遺伝子がＰＤの原因及び／又は発症に関与することが明らかになっている。ＰＤ病理学の主な特徴は、運動関連機能の中心である線条体及び皮質へ関連するドーパミン作動性投射を有する中脳脳領域である黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの神経変性である。黒質線条体ドーパミン作動性神経支配の喪失及び他の脳領域における変性に加えて、ＰＤは、不溶性α－ｓｙｎタンパク質を含有する細胞質タンパク質凝集体（レビー小体）の存在を特徴とする。
【０００５】

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

【０００６】

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

【０００７】

一般的に言えば、α－ｓｙｎタンパク質は凝集体を形成する傾向があり、これらの凝集体はニューロンにおける正常な機能及び／又は毒性作用の喪失をもたらし得、その結果、異なる脳領域において神経変性及び／又は神経炎症を引き起こす。さらに、α－ｓｙｎ遺伝子の変異又は重複／三重化は、α－シヌクレオパチーに関連することが知られている。

【０００８】

現在、疾患を治療及び／又は予防するための治療法は、遺伝子及び／又は遺伝子の転写物を完全にノックダウンすることに基づいている。しかしながら、α－ｓｙｎの重要な生理学的役割のために、α－ｓｙｎタンパク質の枯渇は、中枢神経系（ＣＮＳ）におけるシナプス伝達の減衰などの現象による患者の安全性の懸念をもたらす可能性がある。

【０００９】

したがって、望ましくない安全上のリスクを低減及び／又は予防しながら、ＰＤ及び／又は他のシヌクレイノパチーを治療及び／又は予防することができる治療法を有する必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明の第１の態様は、ＲＮＡ（「本発明のＲＮＡ」）をコードする核酸配列を含む核酸（「本発明の核酸」）であって、前記ＲＮＡに含まれるＲＮＡ配列がα－シヌクレイン（α－ｓｙｎ）遺伝子（ＳＮＣＡ）の標的配列に実質的に相補的であり、前記ＲＮＡ配列が少なくとも１５個のヌクレオチドを有し、前記ＲＮＡがヘアピンを含む、核酸に関する。

【００１１】

本発明の第２の態様は、ＤＮＡ分子（「本発明のＤＮＡ分子」）である本発明の核酸に関する。

【００１２】

本発明の第３の態様は、ＤＮＡ分子を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ビヒクル（「本発明のＡＡＶ（ビヒクル）」）に関する。

【００１３】

本発明のさらなる態様は、本発明のＡＡＶビヒクル及び少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤を含む組成物；本発明のＡＡＶビヒクルを製造する方法；及び本発明の場合、ＡＡＶビヒクルを含むキットであって、免疫抑制化合物をさらに含むキットに関する。

【発明を実施するための形態】

【００１４】

本発明は遺伝子治療に関し、特に、α－ｓｙｎ遺伝子、好ましくはヒトα－ｓｙｎ遺伝子によってコードされるＲＮＡを標的化するための遺伝子治療におけるＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）の使用に関する。

【００１５】

核酸

本発明によれば、ＲＮＡ（「本発明のＲＮＡ」）をコードする核酸配列を含む核酸（「本発明の核酸」）が提供され、前記ＲＮＡに含まれるＲＮＡ配列は、α－ｓｙｎ遺伝子の標的配列に実質的に相補的であり、前記ＲＮＡ配列は、少なくとも１５個のヌクレオチドを有し、前記ＲＮＡは、ヘアピンを含む。

【００１６】

本明細書で使用される「実質的に相補的」という用語は、２つの核酸配列が互いに相補的であることを指し、それによって２つの核酸配列は互いに結合する。「実質的に」という用語は、２つの配列間の相補性が、少なくとも部分的な阻害効果を有するのに十分な時間にわたって互いに結合するのに十分であることを意味する。もちろん、相補性が完全（完全な相補性）であることが好ましいが、いくつかのギャップ及び／又はミスマッチが許容され得る。ミスマッチの数は１０％以下でなければならない。重要な特徴は、相補性がｉｎ　ｓｉｔｕでの２本の鎖の結合を可能にするのに十分であることである。結合は、阻害効果を発揮するのに十分な強さでなければならない。

【００１７】

上記のＲＮＡをコードする前記核酸配列は、前記標的配列の相補的（「抗」）配列とは異なる最大で４ヌクレオチド；５ヌクレオチド；又は６ヌクレオチドを任意選択で有していてもよい。ＲＮＡをコードする前記核酸配列は、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる前記標的配列の相補配列とは異なる１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、又は３ヌクレオチドを有していてもよい。好ましくは、上記のような前記核酸配列は、前記標的配列の相補配列と同一である。

【００１８】

本明細書で使用される「α－ｓｙｎ遺伝子」という用語は、α－シヌクレイン遺伝子又はＳＮＣＡ遺伝子を指す。前記α－ｓｙｎ遺伝子は、本明細書に記載されるように、好ましくは哺乳動物α－ｓｙｎ遺伝子、さらに好ましくはマウス又はラットα－ｓｙｎ遺伝子、より好ましくはＮＨＰα－ｓｙｎ遺伝子、最も好ましくはヒトα－ｓｙｎ遺伝子である。α－ｓｙｎ遺伝子の全てのＳＮＰをさらに本発明に含めることができる。

【００１９】

本明細書で使用される「α－ｓｙｎタンパク質」という用語は、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。

【００２０】

典型的には、本発明による核酸は、疾患関連遺伝子の発現を減少させることを意図している。本発明によれば、上記のような前記核酸は、以下に記載されるように、例えば遺伝子送達ビヒクル、特にウイルス遺伝子送達ビヒクル、好ましくはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ビヒクルによって標的細胞に送達され得る。前記核酸は、続いてＲＮＡに転写され得る。ＲＮＡ介入（ＲＮＡｉ）の過程で、前記ＲＮＡはＤｒｏｓｈａ（すなわち、クラス２リボヌクレアーゼＩＩＩ酵素）によって、標的細胞の核内でＲＮＡの５’及び３’末端に隣接領域のない短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）又は長いヘアピンＲＮＡ（ｌｈＲＮＡ）に切断される。その後、切断されたＲＮＡは、細胞の細胞質に輸送され、前記切断されたＲＮＡは、エンドリボヌクレアーゼＤｉｃｅｒによってさらに切断されない。前記切断されたＲＮＡは、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）のＡｒｇｏｎａｕｔｅ－２（ＡＧＯ－２）によってさらに切断され、前記切断されたＲＮＡのパッセンジャーＲＮＡ配列は、ポリ（Ａ）特異的リボヌクレアーゼ（ＰＡＲＮ）によってトリミング（すなわち、切断）される。前記切断されたＲＮＡの他方の鎖は、ガイド鎖（すなわち、ガイド配列）と呼ばれる。上記のように、前記標的ＲＮＡ配列に実質的に相補的な配列を含むガイド鎖は、ＡＧＯ－２によってプロセシング及び／又は切断されない。

【００２１】

切断されたＲＮＡのパッセンジャー鎖が切り取られることなく存在し続ける状況では、前記パッセンジャー鎖は、標的外（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ：オフターゲット）配列及び／又は標的配列にさえも部分的に相補的であり得る。したがって、前記パッセンジャー鎖は

、標的外配列に結合することができる、及び／又は切断されたＲＮＡのガイド鎖と競合して前記標的配列に結合することさえできる。そのような「オフターゲット問題」は、遺伝子編集介入の精度に影響を及ぼす可能性があり、そのため低減及び／又は排除されなければならない。

【００２２】

それにより、前記パッセンジャー配列を切断することにより、「オフターゲット問題」を防止及び／又は抑制することができる。したがって、標的ｍＲＮＡに対する前記ガイド配列の結合特異性が改善され、「オフターゲット」事象が減少する。これは、本発明の好ましい実施形態である。

【００２３】

互いに相補的な２本の鎖を含み、そのうちの１本の鎖（パッセンジャー鎖）がＲＮＡｉにおいて切断されたＲＮＡが本発明に含まれる。例えば、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）及びマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）が本発明に含まれる。

【００２４】

本明細書に記載の「ＲＮＡヘアピン」又は「ヘアピン」という用語は、互いに相補的な２本の鎖と、２本の鎖を接続するループとを含むＲＮＡの二次構造を指す。一方の鎖はパッセンジャー鎖（すなわち、パッセンジャー配列）と呼ばれ、他方の鎖はガイド鎖（すなわち、ガイド配列）と呼ばれる。ＲＮＡヘアピンは、ＲＮＡ折り畳みをガイドし、リボザイムにおける相互作用を決定し、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を分解から保護し、ＲＮＡ結合タンパク質の認識モチーフとして機能することができる。

【００２５】

好ましくは一方の鎖はＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において分解され（すなわち、トリミングされる）、他方の鎖は分解されずに残り、前記「オフターゲット問題」が改善されるという条件で、２本の鎖を有する他のＲＮＡも本発明に含まれる。ｌｈＲＮＡ及び／又はｓｈＲＮＡを本発明に含めることができる。特定の実施形態では、前記ヘアピンはｓｈＲＮＡ又はｌｈＲＮＡであり得る。

【００２６】

好ましくは、上記のような前記ヘアピンは、少なくとも３９ヌクレオチド；少なくとも４４ヌクレオチド；少なくとも４９ヌクレオチド；少なくとも５４ヌクレオチド；又は少なくとも５９ヌクレオチドの配列を有する。本発明のいくつかの実施形態では、上記のヘアピンは、少なくとも３９ヌクレオチドの配列を有する。したがって、好ましくは、ＲＮＡをコードする核酸配列は、少なくとも３９ヌクレオチドの配列を有する。

【００２７】

任意選択的に、上記の前記ヘアピンは、最大８０ヌクレオチド、任意選択的に最大７８ヌクレオチド、任意選択的に最大７６ヌクレオチド、任意選択的に最大７４ヌクレオチド、任意選択的に最大７２ヌクレオチド、任意選択的に最大７０ヌクレオチド、任意選択的に最大６８ヌクレオチド、任意選択的に最大６６ヌクレオチド、さらに任意選択的に最大６４ヌクレオチドのＲＮＡ配列を有する。好ましくは、上記のような前記ヘアピンは、７２ヌクレオチドのＲＮＡ配列を有する。

【００２８】

ｍｉＲＮＡ足場

上記のような配列長を有する前記ヘアピンをコードする核酸配列は、ＡＡＶに容易に組み込むことができ、中枢神経系などの標的器官に送達することができる。さらに、前記配列長は、前記ヘアピンが正しく折り畳まれることを可能にし、その結果、前記パッセンジャー鎖は、上述のようにＲＮＡｉで切断され得る。したがって、上述のように、前記配列長を有する前記配列は、前記オフターゲット問題を低減及び／又は防止することができる。さらに、前記オフターゲット問題は、配列番号１、配列番号２、並びに配列番号１及び配列番号２のバリアントからなる群から選択される配列を有するＲＮＡによってさらに低減及び／又は防止される。

【００２９】
したがって、好ましい実施形態では、前記ＲＮＡ（本発明のＲＮＡ）は、配列番号１、配列番号２、又は配列番号１若しくは配列番号２のバリアントを含む。
【００３０】
したがって、好ましい実施形態では、本発明は、ＲＮＡをコードする核酸配列を含む核酸を提供し、前記ＲＮＡに含まれるＲＮＡ配列はα－ｓｙｎ遺伝子の標的配列に実質的に相補的であり、前記ＲＮＡ配列は少なくとも１５ヌクレオチドを有し、前記ＲＮＡはヘアピンを含み、前記ＲＮＡは配列番号１、配列番号２、又は配列番号１若しくは配列番号２のバリアントを含む。
【００３１】
配列番号１は、ｍｉＲ４５１足場又はヘアピンを指す。前記足場は、好ましくは５’から３’に、最初に（ｉ）５’－ＣＵＵＧＧＧＡＡＵＧＧＣＡＡＧＧ－３’（配列番号４６）、続いて（ｉｉ）第１のＲＮＡ配列を含むか又はこれからなる２２ヌクレオチドの配列、続いて（ｉｉｉ）その全長にわたって前記２２ヌクレオチドの第１の配列のヌクレオチド２～１８と相補的な第２のＲＮＡ配列とみなすことができる１７ヌクレオチドの配列、続いて（ｉｖ）配列５’－ＭＷＣＵＵＧＣＵＡＵＡＣＣＣＡＧＡ－３’（ＭはＧ又はＣであり、ＷはＡ又はＵである）（配列番号４７）を含む。好ましくは、後者の配列の最初の５’－Ａ／Ｃヌクレオチドは、第１又は第２のＲＮＡの第１の鎖の第１のヌクレオチドと塩基対を形成しない。
【００３２】
そのような足場は、元のｐｒｉ－ｍｉＲ４５１足場に見られるような隣接配列を含み得る。或いは、隣接配列は、他のｐｒｉ－ｍＲＮＡ構造の隣接配列によって置換され得る。本発明の例示的な足場のｐｒｉ－ｍＲＮＡ配列を表３に示す。
【００３３】
ｍｉＲ４５１足場は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を誘導することを可能にし；特に、ＲＮＡｉは、この足場のガイド鎖によって誘導される。ｐｒｉ－ｍｉＲ４５１足場は、プロセシングがカノニカルｍｉＲＮＡプロセシング経路とは異なるため、パッセンジャー鎖をもたらさない（Ｃｈｅｌｏｕｆｉ，Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，２０１０ ａｎｄ Ｙａｎｇ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，２０１０）。それにより、ｍｉＲ－４５１の使用は、パッセンジャー鎖による望ましくない潜在的なオフターゲティングを有する可能性を防止又は低減することができる。
【００３４】
配列番号２は、上記のｍｉＲ４５１足場と組み合わされたｍｉＲ－１４４足場を指す。
【００３５】
前記核酸は、上記のように、前記ＲＮＡに転写され得る。好ましくは、上記のＲＮＡは、配列番号１を含むｍｉＲ－４５１のヘアピンを含む。前記ｍｉＲ４５１の使用により、前記パッセンジャー鎖が切断されて最終的なｍｉＲ４５１に存在しないため、上記のオフターゲット問題が防止及び／又は低減される。より好ましくは、前記ＲＮＡは配列番号２を含み、二重ヘアピン構造を有する。前記構造は、前記ＲＮＡの５’末端から３’末端へと、ヘアピンｍｉＲ１４４と、それに続く前記ヘアピンｍｉＲ４５１とを含む。前記ＲＮＡが配列番号２を含む場合、前記オフターゲット問題が防止及び／又は低減されることが見出された。さらに、前記ヘアピンｍｉＲ４５１の生合成が改善され、それにより、前記ガイドストランドの量が増加する。したがって、標的ＲＮＡの転写物の阻害及び／又はノックオフを増強することができる。
【００３６】
配列番号１又は配列番号２のＲＮＡバリアントは、それぞれ配列番号１又は配列番号２を含むＲＮＡと実質的に同じ機能を有すると定義される。配列番号１又は配列番号２の前記バリアントを含むＲＮＡは、上記のように前記オフターゲット問題を防止及び／又は低減する機能を有する。配列番号１及び配列番号２の前記バリアントはまた、ＲＮＡ二次構造への折り畳みのために、それぞれ配列番号１及び配列番号２と実質的に同じ機能を有す

る。さらに、前記配列番号２の前記バリアントを含むＲＮＡは、上記のように、前記オフターゲット問題を低減及び／又は防止するだけでなく、前記ヘアピンの生合成も改善することができる。

【００３７】

本明細書に記載されるように、前記「オフターゲット問題」を低減／改善されたものとして説明する場合、前記オフターゲット問題が防止、低減、及び／又は停止されることを意味する。

【００３８】

任意選択的に、上記の配列番号１の前記バリアントは、配列番号１と実質的に同じであり、上記の配列番号１と実質的に同じ機能を有する。任意選択的に、前記バリアントは、配列番号１とは異なる少なくとも１個のヌクレオチド、又は任意選択的に最大５個のヌクレオチドを含む。場合により、配列番号１の前記バリアントは、配列番号１とは異なる最大３０ヌクレオチド；最大２５ヌクレオチド；最大２０ヌクレオチド；最大１５ヌクレオチド；又は最大１０ヌクレオチドを含む。

【００３９】

任意選択的に、上記の配列番号２のバリアントは、配列番号２と実質的に同じであり、上記の配列番号２と実質的に同じ機能を有する。任意選択的に、前記バリアントは、配列番号２とは異なる少なくとも１個のヌクレオチド、又は任意選択的に最大５個のヌクレオチドを含み得る。場合により、配列番号２の前記バリアントは、配列番号２とは異なる最大３０ヌクレオチド；最大２５ヌクレオチド；最大２０ヌクレオチド；最大１５ヌクレオチド；又は最大１０ヌクレオチドを含む。

【００４０】

好ましくは、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる前記標的ＲＮＡ配列に実質的に相補的な前記ＲＮＡ配列は、少なくとも１５ヌクレオチド、少なくとも１６ヌクレオチド、少なくとも１７ヌクレオチド、少なくとも１８ヌクレオチド、少なくとも１９ヌクレオチド、少なくとも２０ヌクレオチド、少なくとも２１ヌクレオチド、少なくとも２２ヌクレオチド、少なくとも２３ヌクレオチド、又は少なくとも２４ヌクレオチドを有する。好ましくは、本明細書に記載の前記ＲＮＡ配列は、少なくとも１８ヌクレオチドを有する。

【００４１】

場合により、前記ＲＮＡ配列は、最大３２ヌクレオチド、最大３１ヌクレオチド、最大３０ヌクレオチド、最大２９ヌクレオチド、最大２８ヌクレオチド、最大２７ヌクレオチド、最大２６ヌクレオチド、又は最大２５ヌクレオチドを有する。本発明のいくつかの実施形態では、前記ＲＮＡ配列は最大３２ヌクレオチドを有する。したがって、前記ＲＮＡをコードする核酸配列は、最大３２ヌクレオチドを有する。

【００４２】

上記のような配列長を有する前記ＲＮＡ配列は、上記のような前記ヘアピンのガイド鎖を構成する。上記のように、前記ガイド鎖の長さは、前記ヘアピンのガイド鎖を形成し、ＲＮＡ二次構造（すなわち、ヘアピン）の形成を可能にするように設計される。また、前記ガイド鎖の長さは、前記標的ＲＮＡに十分な結合特異性を提供するために選択される。これらは、前記オフターゲット問題の低減に寄与する。

【００４３】

α－ｓｙｎ遺伝子の標的配列（前記ＤＮＡに含まれる前記配列）に実質的に相補的なＲＮＡ配列は、以下に記載されるように、α－ｓｙｎ遺伝子の保存領域の１つに基づいて設計される。

【００４４】

好ましくは、前記保存領域は、哺乳動物α－ｓｙｎ遺伝子、より好ましくは非ヒト霊長類（ＮＨＰ）、及び／又はヒトα－ｓｙｎ遺伝子に存在する。

【００４５】

好ましくは、前記標的ＲＮＡは、前記α－ｓｙｎ遺伝子に含まれるエクソンの一部によってコードされる。エクソンはＲＮＡスプライシングによって除去されないため、エクソ

ンは前記標的ＲＮＡを設計するときに考慮に入れるのに有用である。
【００４６】
本明細書で定義される「（ａ）部分」という用語は、部分配列を指す。本明細書で定義される「エクソン」という用語は、ＲＮＡスプライシングによって除去されることなくｍＲＮＡの一部をコードする前記α－ｓｙｎ遺伝子に含まれる領域を指す。エクソンは、少なくとも１つの保存された配列を含むことができる。ＮＨＰ及びヒトα－ｓｙｎ遺伝子に含まれるエクソンを、前記標的ＲＮＡ及び前記ガイド鎖を設計するために整列させた。例えば、前記ＮＨＰα－ｓｙｎ遺伝子は、ＮＨＰα－ｓｙｎ遺伝子（遺伝子ＩＤ：７０６９８５，ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｎｅ／７０６９８５）からなる。例えば、前記ヒトα－ｓｙｎ遺伝子は、ヒトα－ｓｙｎ遺伝子（遺伝子ＩＤ：６６２２（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｎｅ／６６２２））からなる。
【００４７】
本明細書に記載の「少なくとも１つ」という用語は、本明細書に記載の保存された配列などの示された対象が１、２、３又はそれ以上の量であることを指す。
【００４８】
本明細書に記載される「保存された配列」又は「保存された領域」という用語は、高いレベルの類似性を有する様々な種に見られ得る短い長さの配列を指す。保存された配列は、類似の機能を有するＲＮＡ又はタンパク質をコードするために様々な種由来の多数の核酸配列を整列させることによって同定することができ、そのため配列の一部又は大部分は同一である。
【００４９】
α－ｓｙｎ遺伝子におけるエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５及びエクソン６の各々は、前記ガイド鎖が結合し得る標的ＲＮＡを設計するための少なくとも１つの保存領域を含む。好ましくは、前記エクソンは、エクソン２、エクソン４及びエクソン６からなる群から選択される。複数の保存された配列が、ＮＨＰα－ｓｙｎ遺伝子及び／又はヒトα－ｓｙｎ遺伝子のエクソン２、４及び６に存在することが見出されている。したがって、前記エクソンは、前記ＲＮＡの設計に有用である。
【００５０】
好ましくは、前記ガイド鎖は、エクソン２又はエクソン４の一部によって、より好ましくはエクソン４の一部によってコードされる前記標的ＲＮＡに結合する。換言すれば、標的ＲＮＡ配列は、エクソン２、エクソン４又はエクソン６の一部であり；好ましくはエクソン２又は４の一部；より好ましくはエクソン４の一部である。
【００５１】
エクソン２、エクソン４及び／又はエクソン６中の保存された配列に基づいて設計された前記標的ＲＮＡの転写産物は、以下に記載されるように、前記ガイド鎖によって低減及び／又はノックダウンされ得る。
【００５２】
本明細書に記載の「転写物」という用語は、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされるｍＲＮＡ、タンパク質及び／又はタンパク質凝集体を指す。本明細書に記載される「α－ｓｙｎ凝集体」、「α－ｓｙｎタンパク質の凝集体」、及び／又は他のバリアントという用語は、α－ｓｙｎタンパク質で構成される凝集体を指す。
【００５３】
α－ｓｙｎ遺伝子に含まれ、少なくとも保存された配列を含む任意のエクソン、例えばエクソン３及び／又はエクソン５も本発明に含まれる。
【００５４】
より好ましくは、上記のような前記エクソンの前記部分は、配列番号３～９（表１）及び配列番号３～９のバリアントからなる群から選択され、好ましくは配列番号４、７及び８からなる群から選択され、配列番号４、７及び８のバリアントからなる群から選択され、より好ましくは配列番号４及び８からなる群から選択され、配列番号４及び８のバリア

ントからなる群から選択される。換言すれば、前記エクソンの前記部分は、配列番号３～９及び配列番号３～９のバリアントからなる群から選択される配列からなる。

【００５５】

【表１】

表1. 本発明の好適な標的RNA配列

配列番号	miSNCA によって標的化される配列	標的 RNA 配列 (5'-配列-3')	長さ (ヌクレオチド)
3	02	AAGGACTTTCAAAGGCCAAGGA	22
4	05	TGGCTGAGAAGACCAAAGAGCA	22
5	07	AGAGCAAGTGACAAATGTTGGA	22
6	12	TGGCTGCTGCTGAGAAAACCAA	22
7	13	AGGAAAGACAAAAGAGGGTGTT	22
8	15	TCAAAAAGGACCAGTTGGGCAA	22
9	16	AGACTACGAACCTGAAGCCTAA	22

【００５６】

配列番号３～９の前記バリアントは、それぞれ配列番号３～９と実質的に同じ配列及び機能を有する。前記バリアントは、以下に記載されるようにガイド鎖によって結合され得、その後、前記標的ＲＮＡ及びその転写物、例えばタンパク質が減少及び／又はノックダウンされる。配列番号３～９の前記バリアントは、それぞれ配列番号３～９とは異なる少なくとも１つのヌクレオチド及び最大５つのヌクレオチドを有する。

【００５７】

本明細書に記載の「バリアント」という用語は、それぞれ前記標的配列と実質的に同一の機能を有する前記標的ＲＮＡ配列のバリアントを指す。また、以下に記載される前記ガイドストランドの前記バリアントは、以下に記載される前記ガイドストランドと実質的に同じ機能を有する。すなわち、前記ガイド鎖の前記バリアントは、前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる転写物をさらに阻害及び／又は減少させるように、前記標的ＲＮＡ又は前記標的ＲＮＡの前記バリアントに依然として結合することができる。場合により、前記標的ＲＮＡ配列の前記バリアントは、それぞれ前記標的ＲＮＡ配列とは異なる最大４ヌクレオチド、最大３ヌクレオチド、最大２ヌクレオチド又は少なくとも１ヌクレオチドを含む。

【００５８】

好ましくは、前記標的ＲＮＡに実質的に相補的な前記ＲＮＡ配列は、配列番号１０～１６（表２）及び配列番号１０～１６のバリアントからなる群から選択され、好ましくは配列番号１１、１４及び１５並びに配列番号１１、１４及び１５のバリアントからなる群、より好ましくは配列番号１１及び１５並びに配列番号１１及び１５のバリアントからなる群から選択される。したがって、前記ＲＮＡ配列は、配列番号１０～１６及び配列番号１０～１６のバリアントからなる群から選択される一配列を含む。

【００５９】

【表２】

表2. 好適なガイド鎖RNA配列

配列番号	miSNCA	ガイドRNA配列 (5’ – 3’) (miRNA配列)	長さ (ヌクレオチド)
10	02	UCCUUGGCCUUUGAAAGUCCUU	22
11	05	UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCCA	22
12	07	UCCAACAUUUGUCACUUGCUCU	22
13	12	UUGGUUUUCUCAGCAGCAGCCA	22
14	13	AACACCCUCUUUUGUCUUUCCU	22
15	15	UUGCCCAACUGGUCCUUUUUGA	22
16	16	UUAGGCUUCAGGUUCGUAGUCU	22

【００６０】

上記のように、前記標的ＲＮＡ配列に実質的に相補的な前記ＲＮＡ配列（すなわち、ガイド鎖）は、前記ＲＮＡ配列が前記標的ＲＮＡ配列に結合するように設計される。それにより、α－ｓｙｎ遺伝子のｍＲＮＡなどの転写物及び／又はタンパク質を減少及び／又はノックダウンすることができる。

【００６１】

配列番号１０～１６の前記バリアントは、配列番号１０～１６の実質的に同じ配列を有し、それぞれ配列番号１０～１６と同じ機能及び前記標的ＤＮＡへの実質的に同じ結合を有する。場合により、配列番号１０～１６の前記バリアントは、それぞれ配列番号１０～１６とは異なる少なくとも１つのヌクレオチド及び最大５つのヌクレオチドを有する。場合により、配列番号１０～１６の前記バリアントは、それぞれ配列番号１０～１６とは異なる最大４ヌクレオチド、最大３ヌクレオチド、最大２ヌクレオチド又は少なくとも１ヌクレオチドを含む。

【００６２】

配列番号１０～１６を含む本発明のｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ足場の例示的な配列を表３に示す。

【００６３】

【表３】

表3. pri-miRNA 配列

配列番号	miSNCA_	隣接 -ヘアピン RNA 配列 (22 nt*)– 隣接[5'-NNNN-3']	長さ (nt)
17	02	CUUGGGAAUGGCAAGGUCCUUGGCCUUUGAAAGUCCUU ACUUUCAAAGGCCAAGGCUCUUGCUAUACCCAGA	72
18	05	CUUGGGAAUGGCAAGGUGCUCUUUGGUCUUCUCAGCCA UGAGAAGACCAAAGAGC GUCUUGCUAUACCCAGA	72
19	07	CUUGGGAAUGGCAAGGUCCAACAUUUGUCACUUGCUCU CAAGUGACAAAUGUUGG CUCUUGCUAUACCCAGA	72
20	12	CUUGGGAAUGGCAAGGUUGGUUUUCUCAGCAGCAGCCA UGCUGCUGAGAAAACCA CUCUUGCUAUACCCAGA	72
21	13	CUUGGGAAUGGCAAGGAACACCCUCUUUUGUCUUUCCU AAGACAAAAGAGGGUGU CUCUUGCUAUACCCAGA	72
22	15	CUUGGGAAUGGCAAGGUUGCCCAACUGGUCCUUUUUGA AAAGGACCAGUUGGGCA CUCUUGCUAUACCCAGA	72
23	16	CUUGGGAAUGGCAAGGUUAGGCUUCAGGUUCGUAGUCU UACGAACCUGAAGCCUA CUCUUGCUAUACCCAGA	72

*: nt: ヌクレオチド

【００６４】

ＤＮＡ分子及び発現カセット

本発明の第２の態様は、ＤＮＡ分子（「本発明のＤＮＡ分子」）である本発明の核酸に関する。本発明によれば、好ましくはＤＮＡ分子が提供される。ＤＮＡ分子は、その鎖の１つに上記の前記核酸配列に対応する配列を含む。

【００６５】

前記ＤＮＡ分子は、上記のように前記核酸配列を保持するのに有用であり得、上記のように標的器官で形質導入されるためにＡＡＶに含まれ得る。

【００６６】

好ましくは、前記ＤＮＡ分子はＤＮＡ発現カセットを含み、前記ＤＮＡ発現カセットは；上記の前記核酸配列；プロモーター及びポリＡテールを含み；前記核酸配列の３’及び５’末端は、逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）に隣接している。換言すれば、前記ＤＮＡ分子はＤＮＡ発現カセットに含まれ、前記ＤＮＡ発現カセットでは、プロモーター及びポリＡテールをさらに含み、前記核酸は逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）に隣接している。

【００６７】

本明細書に記載の「ＤＮＡ発現カセット」という用語は、ＲＮＡ分子をコードする遺伝子又は核酸配列、プロモーター、及びポリＡテールをコードする核酸配列を含むＤＮＡ核酸配列を指す。前記ＤＮＡ発現カセットは、ＩＴＲに隣接し、ウイルスビヒクルに含まれ、その後、脳及び／又はＣＮＳの他の器官などの標的器官に送達される。

【００６８】

本明細書に記載の「プロモーター」という用語は、典型的には、連結された核酸配列の転写を駆動又は開始するための転写開始部位の５’末端に位置するＤＮＡ配列を指す。本発明のいくつかの実施形態では、プロモーターは構成的プロモーター又は遍在性プロモーター；ニューロン特異的プロモーター；及び／又はグリア特異的プロモーターである。

【００６９】

前記構成的プロモーターは、ｐｏｌ　ＩＩプロモーター、天然又は操作されたニワトリ

ベーターアクチンプロモーター（ＣＢＡ）、ＣＡＧプロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＣＭＶプロモーター（例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１６１０２６６４号パンフレットの図２に示されているようなもの）からなる群から選択され得る。

【００７０】

本明細書に記載される「グリア特異的プロモーター」という用語は、星状膠細胞、乏突起膠細胞又はミクログリア細胞などのグリア細胞における外来核酸及び／又は遺伝子の発現を増加させる際に適切に使用され得るプロモーターを指す。星状膠細胞における発現のために、ＧＦＡＰを使用し得る。乏突起膠細胞における発現のために、ＭＢＰ、ＰＬＰ、ＣＮＰ又はＭＡＧを使用し得る。ミクログリアにおける発現のために、ＣＤ６８又はＨｅｘｂを使用し得る。本発明のいくつかの好ましい実施形態では、グリア特異的プロモーターは、ＭＢＰ、ＰＬＰ、ＣＮＰ及びＭＡＧからなる群から選択される乏突起膠細胞プロモーターであり、

好ましくは、前記プロモーターはニューロン特異的プロモーターである。本明細書に記載される「ニューロン特異的プロモーター」という用語は、脳細胞などのニューロン細胞における外来核酸及び／又は遺伝子の発現を増加させるのに適切に使用され得るプロモーターを指す。

【００７１】

好ましくは、前記ニューロン特異的プロモーターは、シナプシン、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）、ヒトシナプシン１、ＣａＭＫＩＩキナーゼ、チューブリンα（Ｈｉｏｋｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２００７　Ｊｕｎ；１４（１１）：８７２－８２）及び血小板由来成長因子β鎖（ＰＤＧＦ）からなる群から選択される。より好ましくは、前記プロモーターは、ドーパミン作動性ニューロン特異的プロモーターを含む。好ましくは、前記ドーパミン作動性ニューロン特異的プロモーターは、ＴＨ（チロシンヒドロキシラーゼ）又はＦｏｒｋｈｅａｄ　Ｂｏｘ　Ａ２（ＦＯＸＡ２）から選択される。

【００７２】

前記ＤＮＡ発現カセットにおいてニューロン特異的プロモーターを使用することにより、ＣＮＳにおける前記核酸の発現が誘導及び／又は増強され、これは、α－ｓｙｎ遺伝子の前記転写物が主にＣＮＳ、例えば脳及び脊髄で、さらにより主に脳で、さらにより主にニューロンで発現されるために、α－ｓｙｎ遺伝子の前記転写物を減少及び／又はノックダウンするのに好ましい。

【００７３】

本発明に含めることができる他の適切なプロモーターは、誘導性及び／又は抑制性プロモーター、すなわち宿主細胞が特定の刺激に曝露された場合にのみ転写を開始するプロモーターである。

【００７４】

場合により、前記ＤＮＡ発現カセットは、上記のプロモーターを含む少なくとも２つのプロモーターを含む。

【００７５】

本明細書に記載の「ポリＡテール」という用語は、ＲＮＡ分子の安定性を高めるためにｍＲＮＡ分子に付加されるアデニンヌクレオチドの長鎖を指す。好ましくは、ポリＡテールは、シミアンウイルス４０ポリアデニル化（ＳＶ４０ポリＡ；配列番号４４）、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化（ＢＧＨポリＡ；配列番号４５）、ヒト成長ホルモンポリアデニル化（ｈＧＨポリＡ；配列番号７９）又は合成ポリアデニル化である。より好ましくは、前記ポリＡテールは、ＢＧＨポリＡ（配列番号４５）又はｈＧＨポリＡ；配列番号７９である。

【００７６】

好ましくは、上記のように、前記ＤＮＡ発現カセットに含まれる前記ポリＡテールは、上記のように、前記ＲＮＡ分子の３’末端に作動可能に連結する。

【００７７】

本明細書に記載される「逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）」という用語は、ＤＮＡ複製の起点及びウイルスのパッケージングシグナルとしてシスで機能する、前記ＤＮＡ発現カセットの５’及び３’末端の配列を指す。前記ＩＴＲは、好ましくはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ＩＴＲ配列からなる群から選択される。より好ましくは、前記ＩＴＲ配列は、両方ともＡＡＶ１、両方ともＡＡＶ２、両方ともＡＡＶ５、両方ともＡＡＶ６、両方ともＡＡＶ７、両方ともＡＡＶ８、又は両方ともＡＡＶ９　ＩＴＲ配列である。また、より好ましくは、前記ＤＮＡ発現カセットの５’末端の前記ＩＴＲ配列は、前記ＤＮＡ発現カセットの３’の前記ＩＴＲ配列とは異なり、前記ＩＴＲ配列は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、及びＡＡＶ９　ＩＴＲ配列から選択される。

【００７８】

前記ＩＴＲは、上記のように前記核酸配列の左端及び右端（すなわち、それぞれ５’及び３’末端）に配置される。好ましくは、前記ＩＴＲは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ＩＴＲ配列からなる群から選択される。より好ましくは、前記ＩＴＲ配列は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８又はＡＡＶ９　ＩＴＲ配列を含む。場合により、前記２つのＩＴＲ配列は、両方ともＡＡＶ１、両方ともＡＡＶ２、両方ともＡＡＶ５、両方ともＡＡＶ６、両方ともＡＡＶ７、両方ともＡＡＶ８、又は両方ともＡＡＶ９　ＩＴＲ配列を含む。また場合により、前記核酸配列の５’末端の前記ＩＴＲ配列は、前記核酸配列の３’末端の前記ＩＴＲ配列とは異なり、前記ＩＴＲ配列は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９　ＩＴＲ配列から選択されるものである。

【００７９】

ＡＡＶ

本発明によれば、上記のような前記ＤＮＡを含むＡＡＶビヒクル（「本発明のＡＡＶビヒクル」）が提供される。

【００８０】

前記核酸又は前記ＤＮＡなどの外来遺伝物質を送達するために使用されるウイルスビヒクルは、本発明の一部である。そのようなウイルスビヒクルとしては、アルファウイルス、フラビウイルス、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、麻疹ウイルス、ラブドウイルス、レトロウイルス、ニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）、ポックスウイルス、ピコルナウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスベクター、好ましくはＡＡＶ遺伝子送達ビヒクルが挙げられる。

【００８１】

本明細書に記載の「ＡＡＶビヒクル」という用語は、外来核酸、目的の遺伝子、目的の核酸、前記外来核酸を含むベクター、前記目的の遺伝子を含むベクター、上述の前記ＤＮＡ発現カセット、及び／又は上述の前記ＤＮＡ発現カセットを含むベクターなどの遺伝物質を標的細胞、器官及び／又は組織に運ぶためのビヒクルとして作用する野生型又は組換えＡＡＶを指す。

【００８２】

ＡＡＶビヒクルは、上記のように、哺乳動物への核酸又はＤＮＡ発現カセットの送達に有用なウイルスビヒクルであることが分かった。ＡＡＶビヒクルは、分裂中及び非分裂中のヒト細胞に効率的に感染する能力を有する。さらに、前記ＡＡＶビヒクルは、いかなる疾患にも関連していない。したがって、前記ＡＡＶビヒクルは、以下に記載されるように、本発明において、並びにα－ｓｙｎ遺伝子が関与する疾患を治療及び／又は予防するために有用である。

【００８３】

本発明によれば、前記ＡＡＶビヒクルは、ＲＮＡをコードする核酸配列を含む核酸を含み、前記ＲＮＡに含まれるＲＮＡ配列は、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる標的ＲＮＡ配列に実質的に相補的であり、前記ＲＮＡ配列は少なくとも１５ヌクレオチドを有し、前記ＲＮＡは、配列番号１、若しくは配列番号２、又は配列番号１若しくは２のバリアントを含むヘアピンを含む。前記標的ＲＮＡ配列に実質的に相補的な前記ＲＮＡ配列は、

配列番号１０～１６及び配列番号１０～１６のバリアント、好ましくは配列番号１１、１４及び１５並びに配列番号１１、１４及び１５のバリアント、より好ましくは配列番号１１及び１５、並びに配列番号１１及び１５のバリアントからなる群から選択される。

【００８４】

また、本発明によれば、前記ＡＡＶビヒクルは、ＲＮＡをコードする核酸配列を含むさらなる核酸を含んでいてもよく、前記ＲＮＡに含まれるＲＮＡ配列は、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる標的ＲＮＡ配列に実質的に相補的であり、前記ＲＮＡ配列は少なくとも１５ヌクレオチドを有し、前記ＲＮＡは、配列番号１、若しくは配列番号２、又は配列番号１若しくは２のバリアントを含むヘアピンを含む。前記標的ＲＮＡ配列に実質的に相補的な前記ＲＮＡ配列は、配列番号１０～１６及び配列番号１０～１６のバリアント、好ましくは配列番号１１、１４及び１５並びに配列番号１１、１４及び１５のバリアント、より好ましくは配列番号１１及び１５、並びに配列番号１１及び１５のバリアントからなる群から選択される。

【００８５】

上記のように、前記ＤＮＡ発現カセットを送達するための前記ＡＡＶビヒクルは、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる産物の（過剰）発現レベルを改変及び／又は低減することができる。好ましくは、前記ＡＡＶビヒクルは、α－ｓｙｎ凝集体を減少及び／又はノックダウンするのに使用される。前記α－ｓｙｎ凝集体は、典型的には、前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされるタンパク質を含む。

【００８６】

本明細書に記載の「減少する」という用語は、示された被験体のレベル及び／又は量が減少又は低下することを指す。本明細書に記載の「ノックダウン」という用語は、示された対象が実質的に枯渇又は除去されているレベル及び／又は量を指す。

【００８７】

任意で、前記ＡＡＶビヒクルは、変異ＳＮＣＡ遺伝子によってコードされる転写物を減少及び／又はノックダウンするのに使用される。パーキンソン病の病歴を有する家族の研究により、この疾患の早発型（Ａ３０Ｐ、Ｅ４６Ｋ、Ａ５３Ｔ、Ｇ５１Ｄ）又は遅発型（Ｈ５０Ｑ）型をもたらす一連の家族性突然変異の同定がもたらされた。

【００８８】

好ましくは、前記ＡＡＶビヒクルは、配列番号３６（ＳＮＣＡ１４０）、配列番号７６（ＳＮＣＡ１２６）、配列番号７７（ＳＮＣＡ１１２）又は配列番号７８（ＳＮＣＡ９８）によってコードされるα－ｓｙｎアイソフォームを含むがこれらに限定されない少なくとも１つのアイソフォームを減少及び／又はノックダウンするのに使用される。より好ましくは、前記ＡＡＶビヒクルは、エクソン２、４及び／又は６を含むα－ｓｙｎ核酸配列によってコードされる少なくとも１つのアイソフォームを減少及び／又はノックダウンするのに使用される。

【００８９】

より好ましくは、上記のように、異なる標的ＲＮＡの転写物を減少及び／又はノックダウンすることを目的とする前記ＲＮＡの少なくとも２つを、α－ｓｙｎ遺伝子の転写物に対する阻害効果をさらに増強するために１つのＡＡＶビヒクル中で組み合わせることができる。したがって、以下に記載されるような前記疾患の治療及び／又は予防がさらに改善される。

【００９０】

本発明のいくつかの実施形態では、配列番号４を有する前記標的ＲＮＡを減少及び／又はノックダウンすることを目的とする前記ＲＮＡと、配列番号８を有する前記標的ＲＮＡを減少及び／又はノックダウンすることを目的とする前記ＲＮＡとの組合せを、１つのＡＡＶビヒクル中で組み合わせて、以下に記載されるようにα－ｓｙｎ遺伝子の転写物に対する阻害効果をさらに増強することができる。

【００９１】

好ましくは、前記ＡＡＶビヒクルは、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、又はＡＡＶ９ビヒクルであ

る。より好ましくは、前記ＡＡＶビヒクルはＡＡＶ５又はＡＡＶ９ビヒクル又はそのハイブリッドである。本発明のＡＡＶビヒクルはまた、ＡＡＶ２／ＡＡＶ５又はＡＡＶ２／ＡＡＶ９ハイブリッドカプシドであり得る。

【００９２】

本発明のいくつかの実施形態では、ＡＡＶビヒクルはＡＡＶ５ビヒクルである。ＡＡＶ５は、抗ＡＡＶ５中和抗体（Ｎａｂ）の有病率が他の血清型に対するＮａｂの有病率よりも低いため、本発明に有用である。さらに、ＡＡＶ５に対する既存の抗体（Ａｂ）又は低既存抗体は、通常、前記ＡＡＶ遺伝子治療ビヒクルによる形質導入、及び／又は標的器官における前記核酸の発現に影響を及ぼさない。さらに、ＡＡＶ５に対する細胞傷害性Ｔ細胞応答は臨床試験で報告されていない。

【００９３】

本発明のいくつかの実施形態では、ＡＡＶビヒクルはＡＡＶ９ビヒクルである。ＡＡＶ９は、ニューロン細胞及びグリア細胞、例えば乏突起膠細胞に外来核酸を送達するのに有用である。

【００９４】

場合により、ＡＡＶビヒクルには、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ１１、及びそれらのバリアント（例えば、アミノ酸の挿入、付加及び置換を伴うカプシドバリアント、又はハイブリッドカプシド）に由来するカプシドが含まれる。

【００９５】

好ましくは、本発明のＡＡＶビヒクルは、ＡＡＶ５及び／又はＡＡＶ９及び／又はハイブリッドカプシドタンパク質配列を含むカプシドを含む。

【００９６】

ＡＡＶカプシドは、典型的には、ＶＰ１タンパク質と、ＶＰ１の本質的にアミノ末端切断であるＶＰ２及びＶＰ３と呼ばれる２つのより短いタンパク質とを含む。３つのカプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２及びＶＰ３は、典型的には、それぞれ１：１：１０に近似する比でカプシド中に存在するが、この比、特にＶＰ３の比意に変動し得、限定とみなされるべきではない。

【００９７】

最適化されたＶＰ１：２：３化学量論を有する他のハイブリッドカプシドが本発明にさらに含まれる。前記最適化されたＶＰ　１：２：３化学量論は、標的器官への感染性及び正しいビリオンアセンブリにおいて前記ＡＡＶビヒクルを改善することができる。

【００９８】

１：１：１０に近似する比又は最適化されたＶＰ　１：２：３化学量論でカプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２及びＶＰ３を有するＡＡＶビヒクルは、ヒト対象において外来核酸配列を送達し、及び／又はＰＤに関与する器官などの標的器官を形質導入するのに有用である。

【００９９】

本明細書及び上記に記載されるように、ＡＡＶビヒクルは、ウイルスＩＴＲ及びウイルスカプシドが異なるＡＡＶ血清型に由来することを意味する「ハイブリッド」として定義され得る。ウイルスＩＴＲは、好ましくはＡＡＶ２に由来し、カプシドは、好ましくはＡＡＶ５又はＡＡＶ９であり得る異なるものに由来する。カプシド及びＩＴＲの異なる血清型の組合せを含むハイブリッドなどの他のハイブリッドも、おそらくさらに他のＩＴＲと共に、異なる血清型からのカプシド要素も本発明で使用することができる。

【０１００】

好ましくは、本発明のＡＡＶビヒクルは遺伝子治療ビヒクルである。

【０１０１】

本明細書に記載の「遺伝子療法」という用語は、α－ｓｙｎ遺伝子が関与する疾患を治療及び／又は予防するための既存の療法よりも安定した及び／又は長期の効果を有する療法を指す。安定した治療効果を達成するための好ましい方法は、前記ＡＡＶ遺伝子治療ビ

ヒクルの単回投与によるものである。前記治療の安定性は、当技術分野の科学者に知られている一般的な技術によって測定することができる。長期効果は、治療効果が持続する時間の長さによって測定することができ、及び／又はそのような治療効果を維持するために必要な注射の用量及び／又は頻度の量によって測定することができる。

【０１０２】

本明細書に記載される「治療する」又は「治療」という用語は、以下に記載されるような前記疾患及び／又は好ましくは前記疾患によって引き起こされる少なくとも１つの症状、例えば神経学的進行性疾患を停止、緩和、遅延、減速及び／又は改善することができる任意の手段を指す。そのような手段には、神経学的進行性疾患の進行の遅延及び／又は遅延、少なくとも１つの症状の発症の停止、前記疾患によって引き起こされる病気の軽減、及び／又は患者の健康状態の改善が含まれ得るが、これらに限定されない。本明細書に記載の「予防する」又は「予防」という用語は、前記疾患の新たな症状の発症を含むがこれに限定されない、前記疾患の発症を止めるための任意の手段を指す。「疾患」及び「障害」という用語は、本発明において互換的に使用することができる。

【０１０３】

前記ＡＡＶ遺伝子治療ビヒクルは、前記転写物の前記発現レベル及び／又は活性レベルに一貫した効果を提供することができる。したがって、本発明のいくつかの実施形態では、前記ＡＡＶ遺伝子治療ビヒクルは、以下に記載される疾患及び／又は症状の治療及び／又は予防に対して一貫した及び／又は長期の治療効果を提供するのに使用することができる。それにより、前記疾患及び／又は症状に罹患している患者の生活の質もまた、前記ＡＡＶビヒクルを投与することによって改善することができる。

【０１０４】

前記ＡＡＶ遺伝子治療ビヒクルの前記長期効果は、疾患及び／又は前記疾患を治療するための既存の治療と比較して、長期間にわたる疾患パラメータの改善された転帰を測定することによって評価することができる。

【０１０５】

組成物

本発明によれば、上記のような前記ＡＡＶビヒクル及び少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤を含む組成物が提供される。好ましくは、前記組成物は前記ＡＡＶ遺伝子治療ビヒクルを含む。

【０１０６】

前記組成物は、固体形態又は液体形態であり得る。本発明のいくつかの実施形態では、前記組成物は製剤である。

【０１０７】

上記及び本明細書に記載の「添加剤」又は「賦形剤」という用語は、前記組成物に少なくとも１つの機能を与えるために、前記組成物にさらに添加される物質を指す。前記機能には、前記組成物の特性を補うこと、容易な貯蔵及び／又は貯蔵寿命の延長のために前記組成物を安定化すること、免疫応答などの副作用を阻害すること、標的器官への前記ＡＡＶビヒクルの形質導入有効性を改善すること、及び／又は脳血液関門（ＢＢＢ）のバイパスを改善することが含まれるが、これらに限定されない。前記組成物の特性を変更及び／又は影響することなく、充填剤として作用する添加剤又は賦形剤を本発明にさらに含めることができる。

【０１０８】

ＡＡＶ遺伝子送達ビヒクルを投与するための薬学的に許容される賦形剤は当業者に周知であり、注射用水と同じくらい単純であり得る。それらはまた、界面活性剤、浸透圧剤、酸化防止剤などを含み得る。

【０１０９】

場合により、前記組成物は、免疫抑制化合物をさらに含む。ウイルスビヒクルの注射によって誘導される免疫応答を低減及び／又は予防することができる免疫抑制化合物が本発明に含まれ得る。免疫抑制化合物はまた、ＡＡＶ組成物とは別に投与され得る。そのよう

な組合せは、キットとして本発明に含まれる。

【０１１０】

場合により、脳内の前記ＲＮＡの生体内分布を改善するための化合物、例えば前記ヘアピンは、前記組成物にさらに含まれる。

【０１１１】

場合により、前記組成物は、水性液体、有機溶媒、緩衝剤及び賦形剤からなる群から選択される少なくとも１つの添加剤をさらに含む。場合により、水性液体は水である。また場合により、前記緩衝剤は、酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、トリス、ヒスチジン、及び４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）からなる群から選択される。さらに場合により、有機溶媒は、エタノール、メタノール、及びジクロロメタンからなる群から選択される。さらに場合により、賦形剤は、塩、糖、コレステロール又は脂肪酸である。さらに場合により、前記塩は、上記のように、塩化ナトリウム及び塩化カリウムからなる群から選択される。さらに場合により、前記糖は、上記のように、スクロース、マンニトール、トレハロース、及び／又はデキストランである。

【０１１２】

本明細書に記載の「標的器官」という用語は、前記α－ｓｙｎ遺伝子の転写物が蓄積する器官を指す。例えば、前記標的器官は、ヒト対象の脳である。凝集体などの前記α－ｓｙｎ転写物が前記器官に存在するという条件で、ＣＮＳに含まれる他の器官（すなわち、脳及び脊髄）を本発明にさらに含めることができる。

【０１１３】

用途

本発明は、上記のような前記ＡＡＶ（ビヒクル）及び／又は前記ＡＡＶ遺伝子治療ビヒクルの医薬としての使用を提供する。したがって、本発明はまた、医薬としての前記組成物の使用を提供する。

【０１１４】

「ＡＡＶ」及び「ＡＡＶビヒクル」という用語は、本明細書では互換的に使用される。上記のような前記ＡＡＶビヒクル（及び／又は前記ＡＡＶビヒクルを含む前記組成物）は、α－ｓｙｎ遺伝子の前記転写産物を減少及び／又はノックダウンすることができる。それにより、前記ＡＡＶビヒクルは、前記α－ｓｙｎ遺伝子の前記転写物によって引き起こされる疾患、典型的には前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる前記転写物の過剰発現によって引き起こされる及び／又は前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる凝集タンパク質によって引き起こされる疾患を治療及び／又は予防するのに有用である。

【０１１５】

前記転写物はｍＲＮＡ及び／又はタンパク質であり、好ましくはｍＲＮＡである。それにより、前記ＡＡＶビヒクル及び前記組成物は、前記α－ｓｙｎ遺伝子が関与する疾患の治療及び／又は予防に有用（すなわち、治療効果を有する）である。したがって、本発明によれば、上記のような前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物は、前記α－ｓｙｎ遺伝子が関与する疾患の治療及び／又は予防における医薬として使用するためのものである。

【０１１６】

前記α－ｓｙｎ遺伝子が関与する、又は前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる転写物（例えば、前記転写物の過剰発現によって）によって引き起こされる疾患及び／又は症状は、好ましくは、前記α－ｓｙｎタンパク質の過剰発現及び／又はα－ｓｙｎタンパク質の凝集体によって引き起こされる疾患である。

【０１１７】

本発明のいくつかの実施形態では、上記の前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記ＡＡＶ遺伝子治療ビヒクル及び／又は組成物は、α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる転写産物を減少及び／又はノックダウンすることによって疾患を治療及び／又は予防するのに使用される。したがって、本発明はまた、上記のような前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記ＡＡＶ遺伝子治療ビヒクル及び／又は組成物の医薬品としての使用であって、前記医薬品が

α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる転写物を減少及び／又はノックダウンする使用を提供する。

【０１１８】

前記疾患には、前記α－ｓｙｎ遺伝子の少なくとも１つの一塩基多型（ＳＮＰ）が関与する疾患がさらに含まれ得る。例えば、前記疾患は、前記α－ｓｙｎ遺伝子の少なくとも１つのＳＮＰをコードするタンパク質及び／又は凝集体によって引き起こされる。

【０１１９】

好ましくは、α－ｓｙｎタンパク質（配列番号３５）発現レベルは、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物を投与しない場合のα－ｓｙｎタンパク質発現レベルと比較して、少なくとも３０％及び／又は最大７０％低下する。より好ましくは、前記ＳＮＣＡ遺伝子によってコードされるタンパク質は、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物を投与しない内因性α－ｓｙｎタンパク質発現レベルと比較して最大５０％低下する。完全なノックダウンは、α－ｓｙｎ遺伝子の中心的役割のために好ましくない場合がある。

【０１２０】

好ましくは、上記のような前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物は、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は組成物をヒト対象に投与しない場合と比較して、上記のような前記転写物を約少なくとも３０％及び／又は最大７０％、より好ましくは最大５０％減少し得る。

【０１２１】

好ましくは、前記転写物の前記発現レベルは、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物を投与しない発現レベルと比較して、少なくとも３０％及び最大７０％、より好ましくは最大５０％低下する。より好ましくは、α－ｓｙｎタンパク質は、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物を投与しないα－ｓｙｎタンパク質レベルと比較して、少なくとも３０％及び最大７０％、さらにより好ましくは最大５０％低下する。

【０１２２】

好ましくは、前記転写物の前記発現レベルは、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物をヒト対象に投与しない場合の発現レベルと比較して、少なくとも３０％及び多くとも７０％、より好ましくは最大５０％低下する。より好ましくは、α－ｓｙｎタンパク質は、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物をヒト対象に投与しないα－ｓｙｎタンパク質レベルと比較して、少なくとも３０％及び最大７０％、さらにより好ましくは最大５０％低下する。

【０１２３】

前記ＡＡＶビヒクルを使用することによって、前記α－ｓｙｎ遺伝子の前記転写物のレベルは低下するが、完全には実質的に枯渇しない。したがって、前記転写物の過剰発現及び／又はα－ｓｙｎタンパク質の凝集体によって引き起こされる疾患が少なくとも部分的に治療及び／又は予防され、前記転写物の完全なノックダウンによって引き起こされる疾患及び／又は症状も少なくとも部分的に治療及び／又は予防される。

【０１２４】

本発明のいくつかの実施形態では、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物は、α－ｓｙｎタンパク質凝集体を還元及び／又はノックダウンするのに使用される。前記α－ｓｙｎタンパク質凝集体は、典型的には、前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされるタンパク質を含む。

【０１２５】

好ましくは、前記α－ｓｙｎ凝集体は、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物を投与しない患者／ヒト対象のα－ｓｙｎ凝集体の量と比較して、少なくとも３０％及び／又は最大７０％、より好ましくは最大５０％減少する。

【０１２６】

前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる転写物を減少及び／又はノックダウンすることが有益であるにもかかわらず、完全な枯渇（すなわち、完全なノックダウン）は、患者を危険にさらす可能性があるＣＮＳにおけるシナプス伝達の減弱及び／又は神経変性をもたらし得る。

【０１２７】
それにより、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物は、α－ｓｙｎ遺伝子が関与する疾患の治療及び／又は予防、疾患及び／又は症状の軽減及び／又は予防において有用であるが、実質的に完全なノックダウンは引き起こされず、前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる前記転写物の完全な枯渇によって引き起こされるリスクを軽減及び／又は回避する。
【０１２８】
上記のような前記ＡＡＶビヒクル及び／又は組成物は、オリゴマーα－ｓｙｎ、原線維α－ｓｙｎ、凝集α－ｓｙｎ、リン酸化α－ｓｙｎ、レビー小体及び／又はＰａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ小体の形成及び／又は存在によって引き起こされる前記疾患の治療及び／又は予防に使用することができる。
【０１２９】
好ましくは、上述の前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物は、レビー小体及び／又はＰａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ小体の量を減少及び／又はノックダウンするのに使用される。
【０１３０】
α－ｓｙｎタンパク質／凝集体は、レビー小体及びＰａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ小体の大部分を形成する（Ｐａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ封入体としても知られる）。それにより、α－ｓｙｎタンパク質を減少及び／又はノックダウンすることによって、レビー小体及び／又はＰａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ小体の量（の進行）を減少及び／又は枯渇させることができる。それにより、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物を使用することによって、以下に記載されるように、疾患及び／又は症状の治療及び／又は予防を達成するために、レビー小体及び／又はＰａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ小体の蓄積を減少させることができる。
【０１３１】
したがって、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物は、総α－ｓｙｎ、オリゴマーα－ｓｙｎ、凝集α－ｓｙｎ及びリン酸化α－ｓｙｎの量、したがってレビー小体及びパップラントー小体のレベルを減少させ、それによって疾患の進行を停止させ、及び／又は疾患症状を改善するための医薬品として使用することができる。
【０１３２】
そのような疾患及び／又は症状には、ＰＤ、ＬＢＤ、ＭＳＡの臨床症状、神経精神症状、ＰＤの運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害及び／又は嗅覚障害が含まれるが、これらに限定されない。ＰＤの運動症状又は運動症状は、四肢の硬直、振戦、並びに／又はバランス及び／若しくは協調障害、又は症状の少なくとも２つを含む。
【０１３３】
ＰＤの臨床症状には、これに限定されるものではないが、安静時振戦、運動緩徐、硬直及び姿勢反射の喪失、二次性運動症状（軽躁病、構音障害、嚥下障害、唾液分泌異常、小黒鉛症、シャッフル歩行、絶食、立ちすくみ、ジストニア、及び／又は眉間反射）及び／又は非運動症状（例えば、自律神経機能不全、認知／神経行動異常、睡眠障害、無嗅覚症、感覚異常及び／又は疼痛など）が含まれる。
【０１３４】
ＬＢＤの臨床症状には、これに限定されないが、四肢の硬直、振戦、並びに／又はバランス及び／若しくは協調障害、知的障害、幻覚、身体機能（自律神経系）の調節不良、注意及び気分の突然の変化、認知問題、睡眠障害、注意の変動、並びにうつ病及びアパシーなどのＰＤに典型的な運動障害が含まれる。
【０１３５】
ＭＳＡの臨床症状には、これに限定されないが、性機能障害、排尿障害、レム睡眠行動障害、起立性低血圧、歩調、パーキンソニズム、小脳の特徴、マルチドメイン自律神経不全、錐体路徴候及び／又は前頭実行機能障害などのＰＤに典型的な運動障害が含まれる。
【０１３６】
したがって、医薬として使用するためのＡＡＶビヒクル又は組成物は、ＰＤ、ＬＢＤ、ＭＳＡ、神経障害症状、ＰＤの運動症状、認知障害、睡眠障害、自律神経障害、及び／又

は嗅覚障害の臨床症状を治療及び／又は予防するために使用される。好ましくは、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は組成物は、ＰＤ、ＭＳＡ及び／又はＬＢＤの治療及び／又は予防に使用される。好ましくは、前記疾患はＰＤ及び／又はＭＳＡである。

【０１３７】

前記α－ｓｙｎ遺伝子の過剰発現、前記α－ｓｙｎタンパク質の凝集、及び／又はレビー小体の形成及び／又は存在は、ＰＤに罹患している患者の指標である。記載されるような前記ＡＡＶビヒクル及び／又は組成物を使用することによって、前記α－ｓｙｎ遺伝子の転写物を減少及び／又はノックダウンすることができる。それにより、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は組成物は、ＰＤを治療及び／又は予防するのに有用である。

【０１３８】

好ましくは、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は組成物は、前症候期又は症候期のＰＤ患者を治療及び／又は予防するのに使用される。

【０１３９】

本明細書に記載の「前症候期」という用語は、臨床疾患の発症前のＰＤなどのニューロン進行性疾患の期を指す。

【０１４０】

本明細書に記載の「症候期」という用語は、前記疾患の臨床診断後のＰＤなどのニューロン進行性疾患の期を指す。

【０１４１】

ＰＤ患者は、通常、上記のような前記症状の少なくとも１つが現れると、ＰＤを有することに気付く。しかし、症状発現前の段階でニューロンの大部分が失われるため、疾患の進行を治療及び／又は予防するには遅すぎる可能性がある。したがって、運動症状などのＰＤの少なくとも１つの症状が示す前に疾患進行を治療及び／又は予防する際に、前記組成物の使用などの治療法を有することが有用である。

【０１４２】

上記のように、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物はα－ｓｙｎタンパク質レベルを低下させることができ、それによって前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物は、少なくとも１つのＰＤ症状を治療及び／又は予防するのに有用である。前記症状は、疾患の初期段階でのうつ病、睡眠障害、疼痛及び疲労、並びに疾患の後期段階での不安、認知症及び認知機能障害からなる群から選択することができる。

【０１４３】

同様に、レビー小体型の沈着物は、レビー小体型認知症又はＬＢＤと呼ばれる認知症の形態を引き起こし得る。実際、ＬＢＤはパーキンソン病の運動症状の一部又は全部を引き起こす。したがって、前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物はまた、少なくとも１つのＰＤ症状を治療及び／又は予防するのに有用であることが判明し得る。

【０１４４】

さらに、前記α－ｓｙｎ遺伝子及び／又は前記α－ｓｙｎ遺伝子によってコードされる凝集タンパク質の過剰発現は、運動及びバランスに影響を及ぼす及び／又はそれを妨げる及び／又は自律神経系の機能を破壊する進行性脳障害であるＭＳＡのリスクを増加させ得る。疾患は、最初はシャイドラーガー症候群として知られていた。現在、ＭＳＡは「散発性」であると考えられており、これは疾患を引き起こす確立された遺伝的又は環境的要因がないことを意味する。

【０１４５】

パーキンソン病の患者にも多くの臨床症状が存在するが、ＭＳＡの患者は典型的には若年で症状の発症を示し、平均発症は５０歳代前半である。多くの患者は最初にパーキンソン病と診断されるが、経時的に、症状の程度、重症度、及び種類が変化し、ＭＳＡの診断の可能性が高くなる。

【０１４６】

重要な違いは、ＭＳＡの症状及び経過をパーキンソン病と区別する。特に、ＭＳＡは、上記のように、小脳、脳のバランス及び協調中心、並びに自律神経系を含む脳のいくつか

の領域に影響を及ぼす。さらに、パーキンソン病は、黒質線条体領域として知られる脳の運動制御部分のドーパミン産生ニューロンに影響を及ぼすが、ＭＳＡはニューロンとグリア細胞の両方に影響を及ぼす。

【０１４７】

ＭＳＡでは、過剰リン酸化α－ｓｙｎは、Ｐａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ封入体（又はＧＣＩ）に見られる。それにより、本発明のＡＡＶビヒクル及び／又は組成物はまた、Ｐａｐｐ－Ｌａｎｔｏｓ介在物の量を減少及び／又は阻害することにおいて、並びにＭＳＡを治療及び／又は予防することにおいて有用であり得る。

【０１４８】

ＣＮＳ疾患などの他の疾患は、ＡＡＶビヒクル及び／又はＡＡＶビヒクルを含む組成物を使用する同様のアプローチによって治療及び／又は予防することができ、前記疾患は遺伝子の過剰発現によって引き起こされるが、前記遺伝子の転写物の完全なノックアウトはあまり望ましくない。

【０１４９】

さらに、α－ｓｙｎ遺伝子の転写物の蓄積によって引き起こされる進行性神経障害の異なる段階（すなわち、段階）では、患者は異なる症状及び／又は異なる病気レベルを発症する可能性がある。前記ＡＡＶビヒクル及び／又は前記組成物は、治療レジメンを絶えず修正することなく、前記異なる症状及び／又は異なる疾病レベルを治療及び／又は予防するための溶液を提供する。

【０１５０】

方法

本発明によれば、上記のような前記ＡＡＶビヒクルを作製する方法が提供される。

【０１５１】

場合により、前記ＡＡＶビヒクルは、哺乳動物細胞を使用することによって作製することができる。場合により、前記ＡＡＶビヒクルは、昆虫細胞、好ましくはバキュロウイルスを使用することによって作製することができる。上記のようなＤＮＡ発現カセットを含むＡＡＶ遺伝子治療ビヒクルの適切な製造方法は、国際公開第２００７／０４６７０３号パンフレット、国際公開第２００７／１４８９７１号パンフレット、国際公開第２００９／０１４４４５号パンフレット、国際公開第２００９／１０４９６４号パンフレット、国際公開第２０１１／１２２９５０号パンフレット、国際公開第２０１３／０３６１１８号パンフレットに記載されており、それらはその全体が本明細書に組み込まれ、特にそれらの製造方法について参照される。場合により、前記組成物は、前記免疫抑制化合物をさらに含む。

【０１５２】

本発明によれば、上記のような前記組成物を作製する方法が提供される。

【０１５３】

キット

上記の疾患又は障害を治療及び／又は予防する目的で、上記のＡＡＶビヒクル及び上記の少なくとも１つの添加剤をキットに組み合わせることができる。前記キットは、前記ＡＡＶビヒクル及び少なくとも１つの前記添加剤を保持及び／又は収容するための手段を任意に含むことができる。

【０１５４】

本発明のいくつかの実施形態では、上記で説明したように、キットは、本発明のＡＡＶビヒクル及び上記の免疫抑制化合物を含む。医療従事者及び患者は、ラベル及び／又は説明書に従い、前記ＡＡＶビヒクルをヒト対象に適用することが容易であり得る。

【０１５５】

本発明のＡＡＶビヒクル及び少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤を含む組成物を含むキットも提供されることが理解される。したがって、場合により、前記キットは、水性液体、有機溶媒、緩衝剤及び賦形剤からなる群から選択される少なくとも１つの添加剤をさらに含む。場合により、水性液体は水である。また場合により、前記緩衝剤は、酢

酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、トリス、ヒスチジン、及び４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）からなる群から選択される。さらに場合により、有機溶媒は、エタノール、メタノール、及びジクロロメタンからなる群から選択される。さらに、賦形剤は、塩、糖、コレステロール又は脂肪酸である。さらに場合により、前記塩は、上記のように、塩化ナトリウム、塩化カリウムからなる群から選択される。さらに場合により、前記糖は、上記のように、スクロース、マンニトール、トレハロース、及び／又はデキストランである。

【図面の簡単な説明】

【０１５６】

【図１】ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡの他のスプライシングバリアント（ＳＮＣＡ１４０、ＳＮＣＡ１２６、ＳＮＣＡ１１２、ＳＮＣＡ９８）、及びｍｉＳＮＣＡ候補配列によって標的化される領域内の領域（候補２、５、７、１２、１３、１５、１６）。

【図２】（Ａ）ｍｉＲ４５１骨格のみを有する元の発現カセット、及び（Ｂ）ｍｉＲ１４４が骨格に含まれる改善された発現カセットについてのベクターマップ。

【図３】ｍｉＳＮＣＡ候補の二重ルシフェラーゼアッセイ滴定

【図４】二重ルシフェラーゼアッセイ：元の及び改善されたｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５のｔＴｉｔｒａｔｉｏｎ。

【図５】ｍＲＮＡレベル及びタンパク質レベルの両方でのＨＥＫ２９３Ｔ細胞における用量依存性内因性α－ｓｙｎ低下。ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡとａ－ｓｙｎタンパク質レベルとの間に有意な相関が観察された。

【図６Ａ】内因性ｍｉＲＮＡに対するｍｉＳＮＣＡ５の発現レベル。

【図６Ｂ】内因性ｍｉＲＮＡに対するｍｉＳＮＣＡ１５の発現レベル。

【図７】ｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５のｍｉＲＮＡプロセシング。

【図８】プラスミドのｐＶＤ１５０２プラスミドａｐ。

【図９Ａ】野生型（ｗｔ）ラットにおける投与研究の経路。ＡＡＶ５－ＧＦＰ　ｖＤＮＡレベル。

【図９Ｂ】野生型（ｗｔ）ラットにおける投与研究の経路。ハウスキーピング遺伝子としてのＧＡＰＤＨに対するＡＡＶ５－ＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現。

【図１０－１】ａ－ｓｙｎ　ＫＩラットにおける作用研究の機構。（Ａ）ｖＤＮＡレベル；（Ｂ）ｍｉＳＮＣＡ５レベル。

【図１０－２】ａ－ｓｙｎ　ＫＩラットにおける作用研究の機構。（Ｃ）ｍｉＳＮＣＡ１５レベル；（Ｄ）線条体におけるＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ低下。

【図１１】ｍｉＳＮＣＡ候補による線虫ＰＤモデルにおける運動表現型のレスキュー。

【図１２】ｉｎ　ｖｉｖｏ試験＃２及びこの試験からの群４のプールされた試料からのラット脳組織から抽出されたｍｉＲＮＡのプロセシング。

【図１３】ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈａ５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデル）における線条体におけるｖＤＮＡレベルを示す図である。ｖＤＮＡレベルは、同じ用量のＡＡＶ５非関連ｍｉＲ処理又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ処理を受けた全ての群において同等であった

【図１４】ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈａ５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデル）における線条体におけるｍｉＳＮＣＡレベル。（Ａ）ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５を注射した群ではｍｉＳＮＣＡ５レベルが高く；（Ｂ）ｍｉＳＮＣＡ１５レベルは、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５を注射した群において高かった。

【図１５】ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデル）における線条体におけるヒトＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベル；ヒトＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベルは、ＡＡＶ５非関連ｍｉＲと同時又は連続的に注射されたＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ群において最も高かった。ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５を同時注射又は連続注射したＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ群では、ヒトＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベルは有意に低かった。

【図１６】ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－Ｈａ５３Ｔ－ａＳｙ

ｎラットモデル）における線条体におけるヒトα－ｓｙｎタンパク質レベル。ヒトα－ｓｙｎタンパク質レベルは、ＡＡＶ５非関連ｍｉＲと同時又は連続的に注射されたＡＡＶ１／２－Ｈａ５３Ｔ－ａＳｙｎ群において最も高かった。ヒトα－ｓｙｎタンパク質レベルはＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５を同時注射又は連続注射したＡＡＶ１／２－ＨＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ群において有意に低かった。

【図１７】ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデル）における線条体のドーパミントランスポーターレベル（（［１２５Ｉ］－ＲＴＩ－１２１オートラジオグラフィーによって評価）；ＡＡＶ５非関連ｍｉＲを連続的に注射したＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ群では、ドーパミントランスポーターレベルが有意に低下した（ＰＤ患者で観察されるものと同様）。ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５の連続注射は、ドーパミントランスポーターの喪失をレスキューした。

【図１８】ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデル）における線条体におけるドーパミン及びドーパミン代謝産物レベル（ＬＣ／ＭＳによって評価）；（Ａ）ドーパミンレベルは、ＡＡＶ５非関連ｍｉＲを連続的に注射したＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ群の同側線条体において有意に減少した（ＰＤ患者で観察されるものと同様）。ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５の連続注射は、ドーパミン喪失をレスキューした。（Ｂ）ドーパミン代謝産物とドーパミンとの間の比は、ＡＡＶ５非関連ｍｉＲを順次注射したＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ群の同側線条体で有意に増加し、ドーパミン代謝回転の欠損を示した（ＰＤ患者で観察されるものと同様）。ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５の連続注射は、ドーパミンターンオーバーの喪失をレスキューした。

【図１９】ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデル）における運動行動試験（シリンダー試験、足の非対称性の評価）。（Ａ）ベースライン（注射前）では、いずれの処理群においても足の使用非対称はなかった；（Ｂ）ＡＡＶ５非関連ｍｉＲを連続的に注射したＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ群では、処理後５６日目に対側足の過小使用が観察された（ＰＤ患者で観察されたものと同様）。ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５の連続注入は、この運動欠損をレスキューした。

【図２０－１】免疫組織化学によって評価した、ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデル）の黒質における（Ａ）ＴＨ及び（Ｂ）ヒトａ－ｓｙｎ；連続注射群のみを評価した。（Ａ）黒質ＴＨ陽性細胞は、ＡＡＶ５非関連ｍｉＲを連続的に注射したＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ動物において、ＡＡＶ５非関連ｍｉＲを連続的に注射したＡＡＶ１／２－空ベクター動物に対して有意に減少した（ＰＤ患者で観察されるものと同様）。ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５の連続注入はＴＨニューロン喪失をレスキューした。（Ｂ）黒質ａ－ｓｙｎ陽性細胞がＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５によって減少し、標的関与が確認された。

【図２０－２】免疫組織化学によって評価した、ｉｎ　ｖｉｖｏ試験３（パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデル）の黒質における（Ｃ）ａ－ｓｙｎ陽性ＴＨニューロン；連続注射群のみを評価した。（Ｃ）黒質中のＴＨ陽性細胞は、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５処理群において、ａ－ｓｙｎの発現が有意に低かった。

【図２１－１】ＲＴ－ｑＰＣＲ及びウエスタンブロットによってそれぞれ評価された、ｍｉＳＮＣＡ候補による線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＰＤモデルにおけるＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ及びα－ｓｙｎタンパク質発現の減少。（Ａ）ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベル、Ｌ１段階での処理及び１日目に測定；（Ｂ）ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベル、Ｌ４段階での処理及び１、４、８及び１１日目に測定；（Ｃ）ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベル、１日目の処理及び１、４、８及び１１日目に測定。ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベル及びα－ｓｙｎタンパク質レベルの両方が、ＥＶ処理群と比較して、ｍｉＳＮＣＡ候補によって低下した。

【図２１－２】ＲＴ－ｑＰＣＲ及びウエスタンブロットによってそれぞれ評価された、ｍｉＳＮＣＡ候補による線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＰＤモデルにおけるＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ及びα－ｓｙｎタンパク質発現の減少。（Ｄ）α－ｓｙｎタンパク質レベル、Ｌ　１段階での処理及び１日目に測定；（Ｂ）α－ｓｙｎタンパク質レベル、Ｌ　４段階での処理及び１、４、８及び１１日目に測定；（Ｃ）α－ｓｙｎタンパク質レベル、１日目の処理、並びに１、４、８及び１１日目に測定。ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベル及びα－ｓｙｎタンパク質レベルの両方が、ＥＶ処理群と比較して、ｍｉＳＮＣＡ候補によって低下した。
【図２２】（Ａ）Ｌ１、（Ｂ）Ｌ４又は（Ｃ）１日目段階での処理後の、ｍｉＳＮＣＡ候補による線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＰＤモデルにおける運動表現型レスキュー。
【図２３－１】Ｌ１段階で全長ＳＮＣＡ　ＲＮＡｉ、ｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５　ｍｉＲＮＡで処理し、処理後のそれらの成体期の１日目及び４日目に収集した線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）試料の低分子ＲＮＡ配列決定結果。（Ａ）ｍｉＳＮＣＡ５及び（Ｂ）ｍｉＳＮＣＡ１５は正しくプロセシングされており、関連する試料において見出すことができる。（Ｃ）全長ＳＮＣＡ処理線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）試料内のｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５配列、並びに他の全ての設計ｍｉＳＮＣＡ（ｍｉＳＮＣＡ２、ｍｉＳＮＣＡ７、ｍｉＳＮＣＡ１２、ｍｉＳＮＣＡ１３、ｍｉＳＮＣＡ１６）。
【図２３－２】図２３－１の続きである。
【０１５７】
本発明の実施例
材料及び方法
ＳＮＣＡ　ｍｉＲＮＡガイド鎖の設計。
　ｍｉＳＮＣＡ（ｍｉＲＮＡガイド鎖）を、最も一般的なＳＮＣＡ　ｍＲＮＡバリアントの一般的なＲＮＡ配列；ＳＮＣＡ１４０、ＳＮＣＡ１２６、ＳＮＣＡ１１２及びＳＮＣＡ９８を標的とするように設計した。ｍｉＲＮＡを、ＳＮＣＡの主要なｍＲＮＡバリアントの全てと共通の領域において設計した（図１）（ＭｃＬｅａｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１２　Ｍｏｌ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ　４９（２）２３０－２３９）。ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ配列の標的領域は、エクソン２、エクソン４及びエクソン６の一部である。これらのエクソンの外側の最も一般的なＳＮＰ（Ａ３０Ｐ）は、ガイドＲＮＡに含まれることが回避された。保存された配列のそれぞれを使用して、２２ヌクレオチド（ｎｔ）を有するいくつかの異なるガイド鎖を生成した。ＳＮＣＡを標的とする１７個のガイドを設計し、ｍｉＲ４５１足場に組み込んだ：ｍｉＳＮＣＡ２（配列番号２４）、ｍｉＳＮＣＡ５（配列番号２５）、ｍｉＳＮＣＡ７（配列番号２６）、ｍｉＳＮＣＡ１２（配列番号２７）、ｍｉＳＮＣＡ１３（配列番号２８）、ｍｉＳＮＣＡ１５（配列番号２９）、ｍｉＳＮＣＡ１６（配列番号３０）、ｍｉＳＮＣＡ１（配列番号８０）、ｍｉＳＮＣＡ３（配列番号８１）、ｍｉＳＮＣＡ４（配列番号８２）、ｍｉＳＮＣＡ６（配列番号８３）、ｍｉＳＮＣＡ９（配列番号８４）、ｍｉＳＮＣＡ１０（配列番号８５）、ｍｉＳＮＣＡ１１（配列番号８６）、ｍｉＳＮＣＡ１４（配列番号８７）、ｍｉＳＮＣＡ１８（配列番号８８）、ｍｉＳＮＣＡ１９（配列番号８９）。これらの構築物は、ｍｉＲ１４４ヘルパーではなく、ｍｉＲ４５１を骨格としてのみ含有していた。これらを、二重ルシフェラーゼアッセイを使用して二重ルシフェラーゼレポータープラスミドにおける連結ＳＮＣＡレポーター遺伝子（配列番号３４）の発現を低下させるそれらの有効性についてｉｎ　ｖｉｔｒｏで試験した。これらの１７個のｍｉＲＮＡのうち、ＩＴＲ含有ベクター（配列番号２４～３０）においてコードされた７個のｍｉＲＮＡ（ｍｉＳＮＣＡ２、ｍｉＳＮＣＡ５、ｍｉＳＮＣＡ７、ｍｉＳＮＣＡ１２、ｍｉＳＮＣＡ１３、ｍｉＳＮＣＡ１５及びｍｉＳＮＣＡ１６のｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ；配列番号１７～２３）が、用量依存的様式でＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベルを低下させる可能性を示した（図３）。
【０１５８】
　ｍｉＳＮＣＡガイドを以下の基準に基づいて選択した：ｍｉＲＮＡガイド配列は、＞４Ｇ、＞４　Ｃ、＞５　Ａ及び＞５Ｔ　ｎｔのストレッチを含むべきではなく；３０％～７０％のＧＣ含有量；ｓｉＳＰＯＴＲ分析（ｈｔｔｐｓ：／／ｓｉｓｐｏｔｒ．ｉｃｔｓ．

ｕｉｏｗａ．ｅｄｕ．／ｓｉｓｐｏｔｒ／ｔｏｏｌｓ／ｌｏｏｋｕｐ／ｅｖａｌｕａｔｅ．ｈｔｍｌ）を使用することによって、エクソン１ａ標的化ガイドについてはｍｉＲＮＡシード配列の４０００未満の予測オフターゲット遺伝子及びイントロン１標的化ガイドについてはｍｉＲＮＡシード配列の５０００未満の予測オフターゲット遺伝子；及び－４４ｋｃａｌ／モル～－５５ｋｃａｌ／モルのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列折り畳みエネルギー）を有するべきである。陰性対照を作製するために、スクランブルガイドをｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験用に設計し、ｍｉＳＣＲ（配列番号９０）と命名した。

【０１５９】

選択されたｍｉＳＮＣＡガイドは、以下の基準：サルＳＮＣＡ遺伝子配列による保存（アカゲザル、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＣ＿０４１７６８．１）を満たし；ｍｉＲＮＡガイド配列は、＞４　Ｇ又は＞４　Ｃ　ｎｔのストレッチを含まず；２０％～７０％のＧＣ含有量；４０％～７０％のＧＣシード含有量；－４５ｋｃａｌ／モル～－５５ｋｃａｌ／モルのプレｍｉＲＮＡ配列折り畳みエネルギーをゆうし；内因性ｍｉＲＮＡシードとの一致はない。

【０１６０】

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

【０１６１】

元のＳＮＣＡ足場（足場１）は、足場としてただ１つのｍｉＲ４５１からなる。改善されたＳＮＣＡ足場（足場２）は、ｍｉＲ－１４４ヘアピン及び１つのｍｉｒ－４５１下流足場からなる。足場２は、元の構築物の改良されたバージョンであり、ｍｉＳＮＣＡのプロセシングのためのヘルパーであるｍｉＲ１４４を含有する。ｍｉＲ１４４ヘアピンの配置は（ほとんどがｍｉＲ４５１ヘアピン配列と比較して）常にｍｉＲ４５１ヘアピン配列の５’末端にある。ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡを標的化するために７つのＳＮＣＡ構築物（足場１）（配列番号３７～４３）を作製し、ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡの異なる部分を標的化するために２つの改善されたＳＮＣＡ構築物（足場２）を生成した（配列番号９１及び９２）。

【０１６２】

二重レポータールシフェラーゼアッセイ

二重ルシフェラーゼアッセイ及び内因性α－ｓｙｎ低下のために、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を使用した。二重ルシフェラーゼアッセイのために、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞（１×１０^{5}細胞／ウェル）を２４ウェル組織培養処理プレートに三重に播種した。細胞を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、連結されたＳＮＣＡレポーター配列（配列番号３４）（１０ｎｇ）を有するレポータープラスミド（配列番号３３）及び様々な量（０．１～１～１０～１００ｎｇ）のｍｉＳＮＣＡ候補を有するプラスミドで同時トランスフェクトした。次いで、細胞をトランスフェクションの２日後に収集し、ＰｒｏｍｅｇａのＤｕａｌ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅアッセイキットを使用して、ウミシイタケルシフェラーゼ及びホタルルシフェラーゼ活性について細胞試料を分析した。アッセイは、ＧｌｏＭａｘ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅリーダーで行った。α－ｓｙｎ低下は、ＲＬ／ＦＬ活性比の低下として測定した。実験を平均３回繰り返した。

【０１６３】

トランスフェクション及び内因性α－ｓｙｎ低下

ｍｉＳＮＣＡ候補による内因性α－ｓｙｎ低下を評価するために、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を使用した。これらのアッセイのために、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞（５×１０^{5}細胞／ウェル）を６ウェル組織培養処理プレートに三重に播種した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（Ｔｈｅｒｍｏ　ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、様々な量（５０～２００～１０００ｎｇ）のｍｉＳＮＣＡ候補を有するプラスミドで細胞をトランスフェクションした。次いで、トランスフェクションの２日後に細胞を回収した。細胞試料を

、ＳＮＣＡのｍＲＮＡレベル及びα－ｓｙｎタンパク質レベルについて分析した。実験を平均３回繰り返した。

【０１６４】

バキュロウイルスシード作製用ＤＮＡ構築物

異なるｍｉＳＮＣＡ構築物を有する発現カセットを、プラスミドを含むＩＴＲにサブクローニングしてｐＶＤ１４９６（配列番号３７）、ｐＶＤ１４９７（配列番号３８）、ｐＶＤ１４９８（配列番号３９）、ｐＶＤ１４９９（配列番号４０）、ｐＶＤ１５００（配列番号４１）、ｐＶＤ１５０１（配列番号４２）及びｐＶＤ１５０２（配列番号４３；図８）を作製した。

【０１６５】

これらのｐＶＤプラスミドは全て、ＣＡＧプロモーター、及びプロモーター活性に必要なイントロンを担持し、続いてｍｉＲ４５１骨格（配列番号２４－３０）及びｂＧＨポリＡ配列中のｍｉＳＮＣＡ構築物を担持する（図２のＡ）。

【０１６６】

ｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５の改善された構築物バージョンもまた、ｍｉＳＮＣＡ５ガイド配列又はｍｉＳＮＣＡ１５ガイド配列をｍｉＲ１４４ヘルパーｍｉＲＮＡの下流側であるｍｉＲ４５１に組み込むことによって作製され（ｍｉＲ１４４及びｍｉＲ４５１を含む足場；図２のＢ）、したがって、ｍｉＲ１４４－ｍｉＳＮＣＡ５（配列番号３１）及びｍｉＲ１４４－ｍｉＳＮＣＡ１５（配列番号３２）を作製した。これらの発現カセットを、ＡＡＶ５パッケージングのためのＩＴＲ領域を含有するｐＶＤ１５８７（配列番号９１）及びｐＶＤ１５８８（配列番号９２）にサブクローン化した。

【０１６７】

ＡＡＶ５ベクター

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

【０１６８】

ｉｎ ｖｉｔｒｏモデル及び形質導入アッセイ

ヒトα－ｓｙｎ ｍＲＮＡ及びタンパク質レベルに対するＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡの効果を測定するために、患者由来のｉＰＳＣ由来ドーパミン作動性ニューロン（ＤＡニューロン）を使用した。ＩＰＳＣ細胞株（表４）は、ＮＩＮＤＳ ＲＵＣＤＲリポジトリから入手した。

【０１６９】

【表４】

表 4. iPSC 細胞株及び対照

短縮名	対象 ID	細胞株 ID	影響を受ける遺伝子	遺伝子型
A53T	NDS00188	ND50050	SNCA	ALA53THR
同系対照	NDS00188	ND50085	SNCA	同系 (編集)
編集(ヘテロ接合)	NDS00188	ND50086	SNCA	ヘテロ接合 (編集)
SNCA3X	NDS00201	ND50040	SNCA	SNCA3つ組
対照	NDS00159	ND41865	なし	非患者対照

【０１７０】
ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃのＰＳＣＤｏｐａｍｉｎｅｒｇｉｃｎｅｕｒｏｎＤｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎキットを使用して、ｉＰＳＣ細胞をＤＡニューロンに分化させた。

【０１７１】
上記のｉｎｖｉｔｒｏ細胞モデルを、ウイルスの様々な感染多重度（ＭＯＩ）でバキュロウイルス産生ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補を使用して形質導入した。細胞を５×１０^{5}細胞／ウェルでＰＤＬ－ラミニン又はＰＬＯ－ラミニンコーティング６ウェルプレートに播種した。３～４日の継代後、細胞を１０^{4}、１０^{5}、１０^{6}及び１０^{7}／細胞のＭＯＩで形質導入した。次いで、形質導入の７～１５日後に細胞を回収した。細胞試料をＲＮＡ及びＤＮＡ単離に使用して、ベクターＤＮＡレベル、ｍｉＳＮＣＡ発現、ＳＮＣＡｍＲＮＡ及びａ－ｓｙｎタンパク質発現を決定した。

【０１７２】
次世代シーケンシング（ＮＧＳ）を使用したＲＮＡ単離及び低分子ＲＮＡシーケンシング

ａ．ＨＥＫ産生ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補由来

ＲＮＡを、Ａｌｌｐｒｅｐ ＤＮＡ／ＲＮＡ Ｍｉｃｒｏキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ（ＨＥＫ産生）形質導入ＤＡニューロン（ＭＯＩは１０^{6}／細胞）から単離した。Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを使用してＲＮＡの完全性を決定し、Ｎａｎｏｄｒｏｐを使用してＲＮＡを定量した。次いで、試料を低分子ＲＮＡ配列決定のためにＧｅｎｏｍｅＳｃａｎ ＢＶ（Ｌｅｉｄｅｎ、オランダ）に送った。Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＮｏｖａＳｅｑ ６０００ ＰＥ １５０配列決定と組み合わせた最終ライブラリーのＢｌｕｅＰｉｐｐｉｎサイズ選択を含むＮｅｂＮｅｘｔ低分子ＲＮＡライブラリー調製法を使用して、ＧｅｎｏｍｅＳｃａｎによって低分子ＲＮＡ配列決定を行った。データを、ＣＬＣ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｓｕｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して分析した。ｍｉＳＮＣＡ候補の発現値を、アノテーションされたｍｉＲＮＡ配列カウント全体に対するｍｉＳＮＣＡ候補のＲＮＡカウントとして表した。ｍｉＳＮＣＡ候補のプロセシングを、ｍｉＳＮＣＡ生ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ配列を配列決定されたＲＮＡ分子に対してアラインメントすることによって分析した。様々なサイズのｍｉＳＮＣＡ分子及びそれらのカウントを得た。

【０１７３】
ｂ．バキュロウイルス産生ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補由来

ＲＮＡを、Ｚｙｍｏｇｅｎ ＲＮＡ単離キットを使用してＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補（バキュロウイルス産生）形質導入細胞（ＤＡニューロン、前脳ニューロン及び／又はＬＵＨＭＥＳ由来ＤＡニューロン）から単離する。Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを使用してＲＮ

Ａの品質を決定し、Ｎａｎｏｄｒｏｐを使用してＲＮＡを定量した。次いで、試料は、次世代シーケンシング法を使用した低分子ＲＮＡシーケンシングのためにＧｅｎｏｍｅＳｃａｎ　ＢＶ（Ｌｅｉｄｅｎ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）に送られる。ＣＬＣ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｓｕｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してデータを分析して、ｍｉＳＮＣＡ候補の発現値に関する情報を抽出し、また、バキュロウイルス産生ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補から発現されたｍｉＳＮＣＡ候補のプロセシングを見出す。

【０１７４】

ｉｎ　ｖｉｖｏ試験＃２、群＃４（以下に記載）のラット脳線条体試料からＲＮＡを単離した。これらの動物に、線条体にＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５及びＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５の両方を注射し、そのプロセシングされた配列を試料の配列決定分析において見出した。ＡｌｌＰｒｅｐ　ＤＮＡ／ＲＮＡ単離キットを使用してＲＮＡを単離した。Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを用いてＲＮＡの品質を試験し、Ｎａｎｏｄｒｏｐを用いて定量した。次いで、試料は、次世代シーケンシング法を使用した低分子ＲＮＡシーケンシングのためにＧｅｎｏｍｅＳｃａｎ　ＢＶ（Ｌｅｉｄｅｎ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）に送られた。ＣＬＣ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｓｕｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してデータを分析して、バキュロウイルス産生ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補から発現されたｍｉＳＮＣＡ候補のプロセシングを評価した。

【０１７５】

低分子ＲＮＡシーケンシング（ＮＧＳ）データ解析

データ分析は、ＣＬＣ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｗｏｒｋｂｅｎｃｈ　１０　ｓｕｉｔを使用して行った。トリミングされた低分子ＲＮＡ配列リードをカウントし、ｍｉＲｂａｓｅデータベースを使用してアノテーションした。ｍｉＳＮＣＡ分子は、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ配列をこれらの低分子ＲＮＡライブラリーに対してアラインメントすることによってアノテーションされる。ｍｉＳＮＣＡ候補の発現値を、アノテーションされた小ＲＮＡカウント全体に対するｍｉＳＮＣＡ候補カウントのカウント数として表した。最も発現したｍｉＳＮＣＡ分子を、様々なサイズのｍｉＳＮＣＡの相対的なカウントを調べること、ｐｒｅ－ｍｉＳＮＣＡを低分子ＲＮＡライブラリーにアラインメントすること、及びそこから得られたＲＮＡカウントを使用することによって分析した。

【０１７６】

細胞及び動物組織からのベクターＤＮＡの単離及び定量

ＤＮＡ抽出を、ＡｌｌＰｒｅｐ　ＤＮＡ／ＲＮＡ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を製造者の説明書に従って使用して行った。ベクターゲノムコピーを、ベクターのポリＡ領域に対するプライマーを用いたＴａｑＭａｎ　ｑＰＣＲアッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用することによって定量した。定量（ＧＣ／ｕｇＤＮＡ）は、線状化ｐＶＤプラスミドを使用し、様々な量のこの線状化プラスミドで標準曲線を作成して行った。このように作成した標準曲線を用いて、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡを形質導入した細胞から単離したＤＮＡからベクターＤＮＡコピー数を算出した。

【０１７７】

トランスフェクションしたＨＥＫ細胞からのＲＮＡ及びタンパク質の単離並びにｍＳＮＣＡ及びα－ｓｙｎタンパク質レベルの定量

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

【０１７８】

タンパク質の単離には、ＰｈｏｓＳＴＯＰホスファターゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ）及びＥＤＴＡ不含プロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ）を含むＲＩＰＡ緩衝剤（Ｓｉｇｍａ）を使用した。タンパク質の抽出のために、緩衝剤を細胞ペレットに添加し、細胞を４Ｃ、４００ｒｐｍで３０分間撹拌した。次いで、細胞抽出物を最高速度で遠心分離した。清澄化さ

れた上清をα－ｓｙｎ及び総タンパク質測定、すなわちＨＴＲＦ及びＢＣＡアッセイに使用した。

【０１７９】

ｍＳＮＣＡレベルの検出のために、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎベースの ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを、ＳＮＣＡに対して設計されたプライマーセットを使用して使用した（表５）。結果は、ハウスキーピング遺伝子：ＵＢＥ、ＣＹＣ　１及びＡＣＴＢの平均発現に対して正規化された未処理試料に対する処理試料のΔΔサイクル閾値（ΔΔＣｔ）を使用して倍率変化として表示した（表５）。

【０１８０】

【表５】

表 5. HEK 細胞の RT-qPCR のためのプライマー配列

プライマー標的	遺伝子の種類	フォワードプライマー	リバースプライマー
SNCA1	導入遺伝子	AAATGTTGGAGGAGCAGTGG (配列番号 48)	TCCAGAATTCCTTCCTGTGG (配列番号 49)
UBE	ハウスキーピング遺伝子	TGCCTGAGATTGCTCGGATCT (配列番号 50)	TCGCATACTTCTGAGTCCATTC (配列番号 51)
CYC1	ハウスキーピング遺伝子	AGCCTACAAGAAAGTTTGCCTAT (配列番号 52)	TCTTCTTCCGGTAGTGGATCTT (配列番号 53)
ACTB	ハウスキーピング遺伝子	GTCTTCCCCTCCATCGTG (配列番号 54)	TCTTGCTCTGGGCCTCGT (配列番号 55)

【０１８１】

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

【０１８２】

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

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

【０１８３】

ｍｉＳＮＣＡ発現のために、以下のプロトコルを使用し：ＡｌｌＰｒｅｐ　ＤＮＡ／ＲＮＡ　Ｍｉｃｒｏキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して全ＲＮＡを単離した。２３　ｎｔのｍｉＳＮＣＡ５及び２２　ｎｔのｍｉＳＮＣＡ１５を検出するために設計されたＴａｑｍａｎ　ｓｔｅｍ－ｌｏｏｐ－ｍｉＲＮＡアッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用してＲＴ－ｑＰＣＲを使用した。発現レベルをｍｉＲＮＡ分子／ｕｇ総ＲＮＡとして表した。

【０１８４】

これらのＴａｑｍａｎアッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）のアッセイＩＤは：ｍｉＳＮＣＡ５＿２３ｎｔについては、ＣＴＮＫＲＶ７；ｍｉＳＮＣＡ１５＿２２ｎｔについては、ＣＴＴＺ９ＫＹである。ｍＲＮＡ発現のために、ＡｌｌＰｒｅｐ　ＤＮＡ／ＲＮＡ　Ｍｉｃｒｏ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて全ＲＮＡを単離した。

【０１８５】

２つの異なるＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを使用して、ＳＮＣＡ及びＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現を測定した：

１．ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎベースの ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを使用して、ＳＮＣＡ又はＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現を測定した。ハウスキーピング遺伝子として使用された遺伝子は；ＡＣＴＢ、Ｂ２Ｍ、ＧＡＰＤＨ、ＨＰＲＴである。プライマー配列を表６に示す。

２．ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡのためのＴａｑｍａｎアッセイハウスキーピング遺伝子のための即時使用型Ｔａｑｍａｎアッセイのための ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ発現及びＴａｑｍａｎＩＤのために設計されたプライマー及びプローブ配列を表７に示す。

【０１８６】

【表６】

表 6. 動物組織からの SYBR Green ベースの RT-qPCR 用のプライマー配列

プライマー標的	遺伝子の種類	フォワードプライマー	リバースプライマー
SNCA1	導入遺伝子	AAATGTTGGAGGAGCAGTGG (配列番号 48)	TCCAGAATTCCTTCCTGTGG (配列番号 49)
SNCA2	導入遺伝子	ATGTTGGAGGAGCAGTGGTG (配列番号 56)	TGTCAGGATCCACAGGCATA (配列番号 57)
GFP	導入遺伝子	AGCAAAGACCCCAACGAGAA (配列番号 58)	GCGGCGGTCACGAAC TC (配列番号 59)
B2M	ハウスキーピング遺伝子	GCCATCCACCGGAGAATG (配列番号 60)	GGTGGAACTGAGACACGTAGCA (配列番号 61)
GAPDH	ハウスキーピング遺伝子	TGCCCCCATGTTTGTGATG (配列番号 62)	GCTGACAATCTTGAGGGAGTTGT (配列番号 63)
ACTB	ハウスキーピング遺伝子	AGCGTGGCTACAGCTTCACC (配列番号 64)	AAGTCTAGGGCAACATAGCACAGC (配列番号 65)
HPRT	ハウスキーピング遺伝子	GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT (配列番号 65)	GCCACATCAACAGGACTCTTGTA (配列番号 67)

【０１８７】

【表７】

表 7. 動物組織からの Taqman RT-qPCR 用のプライマー配列

プライマー標的	遺伝子の種類	フォワードプライマー	リバースプライマー	プローブ配列
SNCA1	導入遺伝子	AAATGTTGGAGGAGCAGTGG (配列番号 48)	TCCAGAATTCCTTCCTGTGG (配列番号 49)	AGCAGGGAGCATTGCAGCAGC (配列番号 68)
SNCA2	導入遺伝子	ATGTTGGAGGAGCAGTGGTG（配列番号 56)	TGTCAGGATCCACAGGCATA (配列番号 57)	CAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAA（配列番号 69)

【０１８８】

動物組織からのＬＣ－ＭＳ／ＭＳ

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

【０１８９】

組織抽出脳切片を、組織ディスメンブレータを使用して、１０$^{-2}$Ｍ酢酸ナトリウム、１０$^{-4}$Ｍ ＥＤＴＡ及び７．５％メタノール（ｐＨ３．８）を含有する１００～７５０μｌの０．１Ｍ ＴＣＡ中でホモジナイズした。タンパク質濃度の測定のために１０μｌのホモジネートを除去した。次いで、試料を微量遠心機で１０，０００ｇにて４℃で２０分間回転させた。生体アミン分析のために上清を新しい微量遠心管に移した。

【０１９０】

生体アミン分析ドーパミン、ＨＶＡ、及びＤＯＰＡＣレベルは、塩化ベンゾイル（ＢＺＣ）で分析物を誘導体化した後、高感度で特異的な液体クロマトグラフィー／質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）方法によって決定した。上清５μｌを、アセトニトリル中５００ ｍＭ $NaCO_3$（水溶液）及び２％ ＢＺＣのそれぞれ１０μｌで処理した。４分後、$^{13}C_6$－誘導体化ドーパミン－d_4、ＨＶＡ及びＤＯＰＡＣをそれぞれ２００ｐｇ含有する内部標準溶液（３％硫酸を含有する２０％アセトニトリル中）１０μｌを添加することによって反応を停止した。液体クロマトグラフィーは、Ｗａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣを使用して２．０×５０ｍｍ、１．７μｍ粒子Ａｃｑｕｉｔｙ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（Ｗａｔｅｒｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ，ＵＳＡ）上で行った。移動相Ａは０．１５％ギ酸水溶液であり、移動相Ｂはアセトニトリルであった。試料を、ＳＣＩＥＸ ６５００＋ＱＴｒａｐ質量分析計（ＡＢ Ｓｃｉｅｘ、Ｆｒａｍｉｎｇｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ）に送達する前に、６００μｌ／分の流速で１１分間かけて９８～５％の移動相Ａの勾配によって分離した。以下のＭＲＭ遷移を定量目的のためにモニターした：４６６から１０５、ＢＺＣ－ドーパミン；４８８から１１１，$^{13}C_6$－ＢＺＣ－ドーパミン－d_4；３０４から１５０、ＢＺＣ－ＨＶＡ；３１０から１１１、$^{13}C_6$－ＢＺＣ－ＨＶＡ；３９４から１０５、ＢＺＣ－ＤＯＰＡＣ；４０６から１１１、$^{13}C_6$－ＢＺＣ－ＤＯＰＡＣ。自動化されたピーク積分を、ＳＣＩＥＸ Ｍｕｌｔｉｑｕａｎｔソフトウェアバージョン３．０．２を使用して行った。適切な統合を確実にするために、全てのピークを目視検査した。ピーク面積比（$P_{分析物}$／$P_{I.S.}$）対内部標準の濃度に基づいて構築された検量線を使用して、線形回帰によって試料中のドーパミン、ＨＶＡ、及びＤＯＰＡＣのレベルを計算した。レベルを組織抽出物中のタンパク質濃度に対して正規化した。

【０１９１】
タンパク質アッセイ組織ホモジネート中のタンパク質濃度を、提供されたキットの説明書に記載されているＰｉｅｒｃｅ（商標）ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＭＡ ＵＳＡ）を使用して決定した。ＰＯＬＡＲｓｔａｒ Ｏｍｅｇａプレートリーダー（ＢＭＧ ＬＡＢＴＥＣＨ，Ｏｆｆｅｎｂｕｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して吸光度を測定した。
【０１９２】
導入遺伝子由来ヒトα－ｓｙｎのＥＬＩＳＡ
全ての動物の新鮮凍結切片からの解剖線条体組織を、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ：１１８３６１５３００１）を含有する溶解緩衝液中でホモジナイズした。試料を４℃で３０分間撹拌した後、遠心分離（４℃で１３５０００ ｒｐｍで１０分間）して上清を生成した。０．００１ｍｇ／ｍｌの濃度で１：５００希釈を使用して、上清の一部を使用して総タンパク質レベルを決定した（ＢＣＡアッセイ、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）。上清の別の部分を、製造者の説明書（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ：８４４１０１）に従ってＥＬＩＳＡ手順に供した。ａＳｙｎの量に対する発光カウントを定量するＣＬＡＲＩＯｓｔａｒシステムを使用して試料を分析した。αＳｙｎのレベルをｐｇ／ｍｇ総タンパク質（Ｐｉｅｒｃｅ（商標）ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＭＡ ＵＳＡ）として表した。
【０１９３】
ドーパミントランスポーター（ＤＡＴ）結合
線条体ＤＡＴのレベルを、２０μｍの新鮮凍結組織から調製したクライオスタット切断切片における［１２５ Ｉ］－ＲＴＩ－１２１結合オートラジオグラフィーによって評価した。簡潔には、解凍したスライドを、５０ ｍＭ Ｔｒｉｓ、１２０ ｍＭ ＮａＣｌ及び５ ｍＭ ＫＣｌを含有する結合緩衝剤（２×１５分、室温）に入れた。次いで、切片を、５０ｐＭ［１２５Ｉ］－ＲＴＩ－１２１（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ、比活性２２００ Ｃｉ／μｍｏｌ）を含有する同じ緩衝剤中に２５℃で１２０分間入れて、総結合を決定した。非特異的結合は、１００μＭのＧＢＲ １２９０９（Ｔｏｃｒｉｓ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）の存在下で観察されるものと定義した。次いで、全てのスライドを氷冷結合緩衝剤で洗浄し（４×１５分）、氷冷蒸留水ですすぎ、風乾した。次いで、［１２５Ｉ］マイクロスケール標準（Ａｍｅｒｓｈａｍ）と共に、スライドをオートラジオグラフィーフィルム（Ｋｏｄａｋ）に貼り付け、室温で約７日間放置した後、現像した。次いで、ＭＣＩＤソフトウェア（Ｉｍａｇｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｃ，Ｏｎｔａｒｉｏ，Ｃａｎａｄａ）を使用してオートラジオグラムを分析した。各動物由来の３つの線条体のデンシトメトリー分析を行い、β放出［１４Ｃ］マイクロスケール標準からｃ．ｐ．ｍ．対光学密度の基準曲線を計算し、これを使用してシグナルの強度をｎＣｉ／ｇとして定量した。バックグラウンド強度を各読み取り値から差し引いた。次いで、データを各処理群の平均±標準誤差信号強度として表した。非特異的結合を同じ方法で計算し、合計から差し引いて特異的結合を得た。非特異的結合は、典型的には、総結合の１％未満を占めることが見出された。
【０１９４】
免疫蛍光及び立体構造
免疫蛍光：凍結スライド式ミクロトーム（Ｌｅｉｃａ Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．，Ｒｉｃｈｍｏｎｄ Ｈｉｌｌ，ＯＮ）で、脳を冠状面で４０μｍの厚さで凍結切片化し、６系列の切片を凍結保護剤（３０％グリセロール、３０％エトキシエタノール、４０％ ＰＢＳ）中に保存した。単一の一連の中脳切片を使用して、二重標識免疫蛍光法を実施して、ヘマグルチニン（ＨＡ）タグ付きヒトａＳｙｎ及びチロシンヒドロキシラーゼ（ＴＨ）を明らかにした。簡潔には、遊離浮遊切片において、ＴＨ（ヒツジ抗ＴＨ、１：１０００、Ｐｅｌ Ｆｒｅｅｚ、Ｐ ６０１０１；二次抗体、Ａｌｅｘａ ｆｌｕｏｒロバ抗ヒツジ、Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ａ ２１０９９、１：５００）及

びＨＡ（ウサギ抗ＨＡ、１：１０００；Ａｂｃａｍ、ＡＢ　９１１０；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒロバ抗ウサギ、１：５００、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ａ　２１２０６、１：５００）のレベル及び分布を二重標識免疫蛍光によって評価した。

【０１９５】

立体構造：黒質緻密部（ＳＮｃ）内のヒトα－ｓｙｎ共局在化あり及びなしのＴＨ＋ｖｅニューロン数の推定を、立体学的原理に従ってＳｔｅｒｅｏ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｏｒソフトウェア（ＭＢＦ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、ウィリストン、ＶＴ）を使用して行った。前方ＳＮから後方ＳＮまでそれぞれ２４０μｍで分離された７つ又は８つの切片を、それぞれの場合を数えるために使用した。組織切片の可視化のためにモノクロデジタルカメラに連結されたＺｅｉｓｓ顕微鏡（ＡｘｉｏＩｍａｇｅｒ　Ｍ２及びＡｐｏｔｏｍｅ，Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ，Ｃａｎａｄａ）を使用して立体解析を行った。ヒトα－ｓｙｎ封入体を含む及び含まないＴＨ＋ｖｅニューロンの総数を、光学分画法を使用してコード化スライドから推定した。分析された各組織切片について、切片厚を経験的に評価し、各切片の上部及び底部に約２μｍ厚のガードゾーンを使用した。ＳＮｃを低倍率（５倍）下で輪郭を描き、ＴＨ＋ｖｅニューロンを４０倍の倍率下でカウントした。Ｓｔｅｒｅｏ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｏｒソフトウェア（ＭｉｃｒｏＢｒｉｇｈｔｆｉｅｌｄ、ＶＴ、ＵＳＡ）を使用して、立体パラメータを経験的に決定した（すなわち、グリッドサイズ、カウントフレームサイズ、及びディスセクタ高さ）。許容誤差係数（ＣＥ）は、Ｇｕｎｄｅｒｓｏｎ　ＣＥ（ｍ＝１）として知られるＷｅｓｔらの手順に従って計算した。０．１０未満のＧｕｎｄｅｒｓｏｎ値が認められた。

【０１９６】

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

【０１９７】

ｉｎ　ｖｉｖｏ試験

試験１．野生型（ＷＴ）ラットにおける投与経路試験

本試験では、ＡＡＶ５－ＧＦＰを黒質（ＳＮ）、線条体又は大槽のいずれかに投与した１４日後に、導入遺伝子発現（ＧＦＰ）の分布を評価した。１群当たりＮ＝５匹の合計２つの処理群（合計Ｎ＝１０、雌Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット、Ｅｎｖｉｇｏ、ＵＳＡ）を使用した。１日目に、動物は、ＳＮへのＡＡＶ５－ＧＦＰの両側４　ｕｌ定位的注射、ＡＡＶ５－ＧＦＰの線条体への３×３ｕｌ（両側）定位的注射又は大槽へのＡＡＶ５－ＧＦＰの２５ｕｌ注射を受けた。群を表８に示す。

【０１９８】

【表８】

表 8. *in vivo* 試験 1 の群。

群	AAV5-GFP (D1)	注射部位の 体積/数	標的 (両側性)	最終手順– 脳	N
1	AAV5-GFP, 5 x 10^{10} gc/脳	4 µl x 1	SN	D14	5
2	AAV5-GFP, 2.5 x 10^{11} gc/脳	4 µl x 1	SN	D14	5
3	AAV5-GFP, 2.5 x 10^{11} gc/脳	3 µl x 3	線条体	D14	5
4	*AAV5-GFP, 4.5 x 10^{12} gc/脳	25 µl x 1	ICM	D14	5

*ストック AAV5 25 µl (1.8 x 10^{14} gc/ml)

【０１９９】

ＳＮ内注射の場合、定位座標は－５．２ｍｍＡＰであり、ブレグマに対して－／＋２ｍｍＭＬであり、針は頭蓋骨の下－７．５ｍｍに下げられ、歯棒は－３．３に設定された。線条体定位注射座標は部位１：＋１．３ｍｍ　ＡＰ、－／＋２．８ＭＬ、－４．５ＤＶ；部位２：＋０．２ｍｍ　ＡＰ、－／＋３．０ＭＬ、－５．０　ＤＶ；部位３：部位２：－０．６ｍｍ　ＡＰ、－／＋４．０ＭＬ、－５．５　ＤＶであり；歯棒は－３．３に設定された。ウイルスベクターを０．５ｕｌ／分の速度で投与し、各注射後に５分間の待機時間を許容した。ＩＣＭ投与は、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１３　Ａｃｔａ　Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ　Ｅｘｐ（Ｗａｒｓ）７３（２）：３０４－１１から適合させた方法に従って行った。

【０２００】

１４日目に、ラットに過剰量のイソフルランを投与し、氷冷０．９％生理食塩水による経心灌流を介して　　殺した。次に脳を取り出し、右半球を４％パラホルムアルデヒド中で（一晩）後固定し、スクロース溶液中で凍結保護した。次いで、右半球前脳及び中脳を、組織学的手順のために凍結スライド式ミクロトームで切断した。左半球を目的の領域に新鮮に解剖し、分子分析のために個々に凍結した。

【０２０１】

試験２．ａ－ｓｙｎ　ＫＩラットにおける作用機序試験

本試験では、２つのＡＡＶ－ｍｉＳＮＣＡ候補の作用機序をヒトαシヌクレインＫＩラットで評価した。１群当たりＮ＝３匹の動物（合計Ｎ＝９、Ｅｎｖｉｇｏ、いＵＳＡ）を含む合計３つの処理群を使用した。１日目に、全ての動物に、線条体へのＡＡＶ５の３×３ｕｌ片側注射を行った。反対側は対照とし、ＡＡＶ５注射と同じ方法で製剤緩衝液を注射した。群を表９に示す。

【０２０２】

【表９】

表 9. *in vivo* 試験 2 の群。

群	同側 (AAV5)	対側性(緩衝剤)	ラット系列	最終手順- 脳 試料	N
1	AAV5-miSCR	製剤化緩衝剤	ラット-KI	D43	3
2	AAV5-miSNCA5	製剤化緩衝剤	ラット-KI	D43	3
3	AAV5-miSNCA15	製剤化緩衝剤	ラット-KI	D43	3
4	AAV5- miSNCA5+AAV5- miSNCA15	製剤化緩衝剤	ラット-KI	D43	3

AAV5 力価 = 合計 2.5 x 10Exp11 gc/脳, 線条体内 3 部位

ラット-KI = Envigo ヒトαシヌクレインノックインラット

【０２０３】
線条体定位注射座標は部位１：＋１．３ｍｍ　ＡＰ、－／＋２．８ＭＬ、－４．５ＤＶ；部位２：＋０．２ｍｍ　ＡＰ、－／＋３．０ＭＬ、－５．０　ＤＶ；部位３：部位２：－０．６ｍｍ　ＡＰ、－／＋４．０ＭＬ、－５．５ＤＶであり；歯棒は－３．３に設定された。ウイルスベクターを０．５ｕｌ／分の速度で投与し、各注射後に５分間の待機時間を許容した。

【０２０４】
４３日目に、全てのラットに過剰量のイソフルランを投与し、氷冷０．９％生理食塩水で経心灌流した。その後、脳を可能な限り迅速に除去し、左右の半球を分割した。各群の全ての動物において、以下の領域：前頭前皮質、線条体、海馬、視床下部、視床、後皮質、小脳、腹側中脳及び脳幹を、左半球と右半球とに分けて新たに解剖し、ドライアイス上で凍結し、分子分析のために－８０℃で保存した。

【０２０５】
試験３．ＡＡＶ－Ｓｙｎラットモデルにおける試験
本試験は、ＳＮＣＡ　ｍＲＮＡを標的化する２つの人工ｍｉＲＮＡ（ａＳｙｎをコードする）が、パーキンソン病のＡＡＶ１／２－ｈＡ　５３Ｔ－ａＳｙｎラットモデルにおいてドーパミン作動性機能を保護する能力を評価するために設計された。このモデルは、ＡＡＶ１／２ヒトＡ５３Ｔα－ｓｙｎ（ＡＡＶ１／２－ｈＡ５３Ｔ－ａＳｙｎ）及びＡＡＶ５－ｍｉＲＮＡ（ｍｉＳＮＣＡ又は無関係な（対照）ｍｉＲＮＡのいずれか）をＷＴラットの片側に注射することを含む。これらの２つのウイルスの注射に関して、共注射群と逐次注射群の２つの群が存在した。共注射群では、２つのウイルスを１日目に注射し（表１０の群１～４）、連続群では、ＡＡＶ１／２－Ｈａ５３Ｔ－ａＳｙｎを１日目に注射し、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡを１４日目に注射した（表１０の群５～８）。表１０に示される日に、単一のウイルス又は組合せを定位的技術に従って右黒質に片側投与した。前肢非対称性を評価するために、手術前（ベースライン、－３日目）並びに１４日目、２１日目、４２日目及び５６日目（ＡＡＶ投与の２、３、６及び８週間後）に、シリンダー試験で行動評価を行った。群を表１０に示す。

【０２０６】

【表１０】

表 10. ***in vivo*** **試験 3 の群。**

群	ウイルスベクター-1	ウイルスベクター-2	挙動	最終手順、D57	N
	SN 内、体積 2 ul		D-3, 14, 21, 42, 56 シリンダー試験	殺傷、脳	

【０２０７】

【表１１】

1	D1: AAV1/2-EV	D1: AAV5-未関連 miR (6E10 gc/脳)	✓	✓	12
2	D1: AAV1/2-hA53T-aSyn	D1: AAV5-未関連 miR (6E10 gc/脳)	✓	✓	12
3	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D1: AAV5-miSNCA5 (6E10 gc/脳)	✓	✓	12
4	D1: AAV1/2-hA53T-aSyn	D1: AAV5-miSNCA15 (6E10 gc/脳)	✓	✓	12
5	D1: AAV1/2-EV	D14: AAV5-未関連 miR (6E10 gc/脳)	✓	✓	12
6	D1: AAV1/2-hA53T-aSyn	D14: AAV5-未関連 miR (6E10 gc/脳)	✓	✓	12
7	D1:AAV1/2-hA53T-aSyn	D14: AAV5-miSNCA5 (6E10 gc/脳)	✓	✓	12
8	D1: AAV1/2-hA53T-aSyn	D14: AAV5-miSNCA15 (6E10 gc/脳)	✓	✓	12

AAV1/2-hA53T-aSyn = AAV1/2 ヒトA53Tαシヌクレイン、3 x 10^{12}gp/ml

AAV1/2-EV = 空aSyn ベクター3 x 10^{12}gp/ml

AAV5-miSNCA-5 = 6 x 10^{01} gc/脳

AAV5- miSNCA-15 = 6 x 10^{01} gc/脳

AAV5-未関連 miR-対照, 6 x 10^{01} gc/脳

SN =黒質

D = 日

群 1-4 はD1 におけるAAV の同時注射である

群 5-8 はD1 及びD14 におけるAAV の連続的注射である

【０２０８】

５７日目に、動物を死後評価のために　　殺した。血液、試料を収集し、必要に応じて処理し、保存した。

【０２０９】

本研究の主要評価項目には以下が含まれた：

・前肢の非対称性の評価（シリンダー試験による）

・線条体ドーパミン及び代謝産物レベルの定量（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる）

・ドーパミントランスポーターの定量化（オートラジオグラフィーによる）

・線条体導入遺伝子由来ａＳｙｎレベルの定量（ＥＬＩＳＡによる）

【０２１０】

含まれる任意のエンドポイント：
・ヒトａＳｙｎとの共発現を伴う又は伴わない（二重標識免疫蛍光による）黒質におけるチロシンヒドロキシラーゼ陽性（ＴＨ＋ｖｅ）細胞の定量化
・Ｉｂａ－１免疫反応性による（免疫蛍光による）黒質におけるミクログリアの活性化状態の定性的評価

【０２１１】

殺及び試料採取を以下のように行った：動物をイソフルランで深く麻酔し、次いで、０．２％ヘパリンを含有する氷冷０．９％生理食塩水による経心的灌流による放血によって殺した。脳を腹側上方で氷冷ステンレス鋼ラット脳マトリックスに入れ、最初に視床下部のレベルで、冠状面で切断した。線条体全体を含む脳の吻側部分を－４２℃に冷却したイソペンタン中で直ちに凍結し、後にＤＡＴオートラジオグラフィーのために切片化し、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるドーパミン及びドーパミンの代謝産物（ＨＶＡ及びＤＯＰＡＣ）のレベル並びにＥＬＩＳＡによるヒトａＳｙｎのレベルの定量のために解剖した。組織を－８０℃のロックフリーザーに保存した。分子アッセイのために、追加の関心領域（追加の線条体解離を含む）を表１１に従って収集した。

【０２１２】

【表１２】

表 11. 目的の脳領域及び対応するアッセイ及び試料の取り扱い。

目的領域	アッセイ	使用緩衝剤	フォーマット
線条体	オートラジオグラフィー	なし、凍結切片化	スライド上
線条体	LCMS	以下 LCMS 方法を参照	上清
線条体	ELISA	RIPA、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤	アッセイ間でアリコートを共有
線条体	TR-FRET	RIPA、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤	
線条体	Q-PCR (DNA)	なし、凍結切片化して解剖した	チューブ内
線条体	RT-QPCR (miRNA、RNA)	なし、凍結切片化して解剖した	チューブ内
線条体	バックアップ	なし、凍結切片化して解剖した	チューブ内

【０２１３】

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

【０２１４】

試験４．線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＰＤモデルにおける運動表現型の表現型レスキュー

本試験では、線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＰＤモデル（ＯＷ４０；ｖａｎ Ｈａｍ ｅｔ ａｌ ２００８ ＰＬｏＳ Ｇｅｎｅｔ ４（３）：ｅ １０００２７）における変化した運動行動の表現型レスキューに対するｍｉＳＮＣＡ候補の発現の影響を評価した。このモデルでは、ヒトα－ｓｙｎは、線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）の体壁筋において

過剰発現される。このα－ｓｙｎ過剰発現は、対照蠕虫と比較した場合、蠕虫の動きを遅くする。ＳＮＣＡ ｍＲＮＡレベルを減少させ、それによってＲＮＡｉによるα－ｓｙｎタンパク質レベルを減少させる効果を、全長ＳＮＣＡ遺伝子又は本発明者らのｍｉＳＮＣＡ構築物を使用して研究した。これらの構築物の１つを含む二本鎖ＲＮＡを、摂食によって生物に導入した。ＯＷ ４０線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）に、その寿命の異なる段階：幼生段階１（Ｌ１）、幼生段階４（Ｌ４）及びその成体期の１日目に、陰性対照としての空のＴ ４４４Ｔプラスミド、又は全長ＳＮＣＡ遺伝子又は本発明者らのｍｉＳＮＣＡ候補の１つ（ｍｉＳＮＣＡ５、ｍｉＳＮＣＡ１３又はｍｉＳＮＣＡ１５）のいずれかを過剰発現する大腸菌を給餌した。２５℃及び１５℃で処理実験を繰り返した。それらの成体期の１日目、４日目及び８日目における処理の後、それらの動き（μｍ／秒としての速度）を測定するように設定されたハイスループットトラッキングセットアップを使用して蠕虫をビデオ追跡した（Ｐｅｒｎｉ ｅｔ ａｌ ２０１８ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ３０６ ５７－６７）。

【０２１５】

さらなる読み取りは、ウエスタンブロット分析を使用したＳＮＣＡ ｍＲＮＡ及びα－ｓｙｎタンパク質レベルのＲＴ－ｑＰＣＲであった。ＳＮＣＡ ｍＲＮＡのＲＴ－ｑＰＣＲに使用したプライマー配列を表１２に示す。

【０２１６】

【表１３】

表 12. SNCA mRNA の RT-qPCR に使用したプライマー

プライマー標的	遺伝子の種類	フォワードプライマー	リバースプライマー
SNCA1	導入遺伝子	GACTTTCAAAGGCCAAGGAG (配列番号 70)	GGAGCCTACATAGAGAACAC (配列番号 71)
SNCA2	導入遺伝子	ATTGCAGCAGCCACTGGCTTTG (配列番号 72)	GGCTTCAGGTTCGTAGTCTTG (配列番号 73)
PMP3	ハウスキーピング遺伝子	CACTCATCTCTATGACGACGTTTC (配列番号 74)	CACCGTCGAGAAGCTGTAGA (配列番号 75)

【０２１７】

α－ｓｙｎタンパク質レベルの検出のために、ウエスタンブロット分析を使用した。この目的のために、タンパク質を、ＲＩＰＡ緩衝剤及びＴｉｓｓｕｅ ｌｙｚｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して抽出した。異なる処理条件からの同様のタンパク質量をＳＤＳ ＰＡＧＥにロードし、α－ｓｙｎレベルを検出するために抗ヒトα－ｓｙｎ抗体（表１２）を使用してウエスタンブロットを行った。チューブリンを正常化のために使用し、抗チューブリン抗体を使用して検出した（表１３）。

【０２１８】

【表１４】

表 13. *線虫(C.elegans)*のウェスタンブロット解析に使用した抗体

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

【０２１９】
結果：
ｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験
人工ｍｉＳＮＣＡ構築物のｉｎ　ｖｉｔｒｏサイレンシング有効性
　ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのｍｉＳＮＣＡ構築物のｍｉＳＮＣＡノックダウン効力を評価するために、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ＳＮＣＡ遺伝子をコードするウミシイタケルシフェラーゼレポーターにより同時トランスフェクションした。ホタルルシフェラーゼ（ＦＬ）遺伝子を同じレポーターベクターから発現させ、トランスフェクション効率を補正するための内部対照として用いた。最初のスクリーニングでは、ＨＥＫ細胞を、１ｎｇ～１０ｎｇ～５０ｎｇ又は２５０ｎｇのそれぞれのｍｉＳＮＣＡ構築物及びＳＮＣＡ遺伝子を担持するＤｕａｌ　Ｌｕｃレポーターにより同時トランスフェクトした。ＳＮＣＡ遺伝子を標的とするように設計された１７のｍｉＳＮＣＡ構築物のうち、ｍｉＳＮＣＡ２、ｍｉＳＮＣＡ５、ｍｉＳＮＣＡ７、ｍｉＳＮＣＡ１２、ｍｉＳＮＣＡ１３、ｍｉＳＮＣＡ１５及びｍｉＳＮＣＡ１６は、ＲＬ／ＦＬ比の用量依存的減少を誘導した。効力をさらに決定するために、上述の構築物を滴定実験にさらに使用した。構築物を異なる濃度：０．１、１、１０又は１００ｎｇで１０ｎｇのＳＮＣＡルシフェラーゼレポータープラスミドと共にＨＥＫ２９３Ｔ細胞に同時トランスフェクションした。これらの結果によれば、ｍｉＳＮＣＡプラスミド１００ｎｇでのトランスフェクションは、滴定実験において使用された全てのｍｉＳＮＣＡ候補物について少なくとも５０％の減少を示した（図３）。ｍｉＳＮＣＡ５、ｍｉＳＮＣＡ１３及びｍｉＳＮＣＡ１５を、ｍＳＮＣＡレベルの低下におけるそれらの比較的大きい効力のために、異なるモデルにおけるさらなる試験のために選択した。
【０２２０】
　ｍｉＳＮＣＡ候補、すなわちｍｉＲ４５１の天然のコンパニオンの効力を改善するために、改変されたｍｉＲ１４４をｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５の足場に付加した（図２のＢ）（配列番号３２～３３）。これらの構築物を、改変されたｍｉＲ１４４が、ｍｉＳＮＣＡ候補を有するｍｉＲ４５１の５’末端の足場に付加されるように設計した。元のｍｉＳＮＣＡ候補及び改善されたｍｉＳＮＣＡ候補の有効性を評価するために、二重ルシフェラーゼアッセイを行った。構築物（ｍｉＳＮＣＡ５（配列番号２５）、ｍｉＳＮＣＡ１５（配列番号２９）、ｍｉＳＮＣＡ５＋ｍｉＲ１４４（配列番号３１）、ｍｉＳＮＣＡ１５＋ｍｉＲ１４４（配列番号３２）及び対照ｍｉＲＮＡを、２４ウェルあたり異なる量：０．１、１、１０又は１００ｎｇで１０ｎｇのＳＮＣＡルシフェラーゼレポータープラスミドと共にＨＥＫ２９３Ｔ細胞に同時トランスフェクションした。これらの結果によれば、ｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５の効力が少なくとも２～３倍改善された（図４）。
【０２２１】
トランスフェクト細胞における内因性ＳＮＣＡ発現の低下
　ｍｉＳＮＣＡ５、ｍｉＳＮＣＡ１３及びｍｉＳＮＣＡ１５構築物を、細胞におけるＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ発現のノックダウンを試験するために選択した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞にお

ける内因性ＳＮＣＡ遺伝子発現のノックダウンを、トランスフェクション細胞に対するＲＴ－ＱＰＣＲによって確認した。５０ｎｇ～２００ｎｇ～１０００ｎｇのｍｉＲＮＡプラスミドのトランスフェクションは、試験した全てのｍｉＳＮＣＡ候補によって４０％未満のＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ発現の減少をもたらした。結果は、ＨＴＲＦによって測定されたα－ｓｙｎレベルの用量依存的減少というタンパク質レベルでも一致していた（図５）。

【０２２２】

形質導入細胞におけるｍｉＲＮＡの発現レベル（低分子ＲＮＡ配列決定データ）

成熟型ｍｉＲＮＡの発現レベルを、ｍｉＲＢａｓｅ及び目的のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列を使用することによってアノテーションされる全リードの数に基づいて定量した。10^6／細胞のＭＯＩでＨＥＫ産生ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡを形質導入されたＤＡニューロンにおける上位３０及び３５の最も発現されたｍｉＲＮＡの発現レベルが得られ（図６Ａ及び６Ｂ）、ｍｉＳＮＣＡ５（図６Ａ）及びｍｉＳＮＣＡ１５（図６Ｂ）の発現レベルは、十分に内因性ｍｉＲＮＡレベルの範囲内であった。

【０２２３】

細胞におけるトランスフェクション時のｍｉＳＮＣＡ構築物のプロセシング（ＮＧＳデータ）

ｍｉＲＮＡのプロセシングを、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列に対するリードのアラインメントによっても調べた。ｍｉＳＮＣＡ５について最も豊富な形態の長さが２４ｎｔであり、続いて、２３ｎｔ及び２５ｎｔであり（図７のＡ）；ｍｉＳＮＣＡ１５については、２２ｎｔであり、続いて、２４ｎｔ及び２３ｎｔであった（図７のＢ）。

【０２２４】

ヒト細胞におけるＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ形質導入

ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５及びＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５がパッケージングされた発現カセットを形質導入及び送達する能力を調べるために、ＤＡニューロン又は前脳ニューロン及び／又はＬＵＨＭＥＳ由来ＤＡニューロンを様々な感染多重度（ＭＯＩ）；10^4、10^5、10^6及び10^7で形質導入する。ベクターＤＮＡレベルを測定し、これらの細胞において用量依存的なｖＤＮＡレベルの増加があるはずである。ＲＮＡを形質導入細胞から単離し、ＲＴ－ｑＰＣＲ　Ｓｙｂｅｒ　Ｇｒｅｅｎアッセイを用いてＳＮＣＡのｍＲＮＡレベルを測定する。これらの形質導入細胞におけるＳＮＣＡレベルの用量依存的ｍＲＮＡ減少が予想される。

【０２２５】

バキュロウイルス産生構築物からのｍｉＳＮＣＡ構築物のプロセシング（ＮＧＳデータ）

ｉｎ　ｖｉｖｏ試験＃２、群＃４からラット脳組織から抽出したｍｉＲＮＡのプロセシングも調査して、バキュロウイルス産生ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡのプロセシングを評価した。これらの試料に対して低分子ＲＮＡ配列決定を行い、データをｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列に対するリードとアラインメントした。ｍｉＳＮＣＡ５について最も豊富に存在する形態の長さは、２３ｎｔであり、続いて、２４ｎｔ及び２５ｎｔであり；ｍｉＳＮＣＡ１５については、２２ｎｔであり、続いて、２４ｎｔ及び２３ｎｔであった（図１２）。

【０２２６】

ｉｎ　ｖｉｖｏ試験

試験１．ＷＴラットにおけるＡＡＶ５－ＧＦＰの異なる投与経路は、パーキンソン病に罹患した標的領域において良好なカバレッジを示した。

標的脳領域にｍｉＳＮＣＡ候補を送達するためのＡＡＶ５ベクターの適切性に対処するために、パーキンソン病において有意なα－ｓｙｎ病理を示す脳領域（脳幹、中脳、皮質）のカバレッジをＡＡＶ５投与後に評価した。異なる投与経路：黒質（ＳＮ）、線条体又は大槽を試験した。ＧＦＰをレポーター遺伝子として使用した。ＳＮ中、試験された２つの用量で、又は線条体中、試験された単回用量で注射されたＡＡＶ５－ＧＦＰは、脳内のＡＡＶ－ＧＦＰ　ｖＤＮＡレベル（図９Ａ）及び対応するＧＦＰ　ｍＲＮＡ発現（図９Ｂ）によって評価されるように、標的領域における適切な生体内分布を示した。大槽に（脳脊髄液に直接）注入されたＡＡＶ５－ＧＦＰは、程度は低いが、検査された全ての脳領域

を同等にカバーする。したがって、ＡＡＶ５は、パーキンソン病治療のための目的の脳領域にｍｉＳＮＣＡ候補を送達するのに適切なベクターであると結論付けられた。

【０２２７】

試験２．ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補は、ａ－ｓｙｎ　ＫＩラットにおけるヒトＳＮＣＡｍＲＮＡ発現を低下させた

ヒトＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ発現の低下における２つの設計候補（ｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５）の能力を評価するために、ＡＡＶ５－ｍｉＳＣＲ（非標的スクランブル対照）、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５又はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５を成体ａ－ｓｙｎ　ＫＩラットの左線条体に注射した。１つの群には、等価用量のＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５とＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５との併用を注射した。ｍｉＳＮＣＡ１３は、ＳＮＣＡ　ＫＩラットモデルのヒト化部分の外側の領域を標的とし、ＷＴラットＳＮＣＡ遺伝子に対して３つのミスマッチを有するため、ｉｎ　ｖｉｖｏ試験から除外した。右線条体に製剤緩衝剤を注入し、これをさらなる対照として用いた。使用した単回用量では、ＡＡＶ５注射した脳半球でｖＤＮＡが検出されたが、対照半球では、ｖＤＮＡレベルは定量下限（ＬＬＯＱ）未満であった（図１０－１のＡ）。形質導入は、ベクター特異的様式（図１０－１のＢ及び図１０－２のＣ）でｍｉＳＮＣＡ候補５及び１５又は両方の組合せの発現をもたらし：ｍｉＳＮＣＡ５はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５注入半球においてのみ検出され、ｍｉＳＮＣＡ１５はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５注入半球においてのみ検出され、ｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＣＮＡ　１５はＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５＋ＡＡＶ５　ｍｉＳＮＣＡ１５注入群において検出された。使用した単回用量では、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５及びＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５＋ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５は、対照線条体（図１０－２のＤ）と比較して、２つの異なるＲＴ－ＱＰＣＲ　ＳＮＣＡアッセイ（プライマーセットＳＮＣＡ１及びプライマーセットＳＮＣＡ　２）によって評価すると、注射した線条体におけるＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ発現の減少に有効であった。本試験は、パーキンソン病の治療のためのヒトＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ発現及びα－ｓｙｎ毒性を減少させるためのＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補の作用機序を支持する。

【０２２８】

試験３．ＡＡＶ－Ｓｙｎラットモデルにおける試験

ＡＡＶ－Ｓｙｎラットモデルにおいて、異なるＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補を試験した。

【０２２９】

ＳＮＣＡレベルを低下させ、それによってα－ｓｙｎウイルス過剰発現の運動表現型ヒトＡ５３Ｔ変異体を改善するという概念のｉｎ　ｖｉｖｏ証明を示すために、ラットＰＤモデルを使用した（ＡＡＶ１／２－Ｈａ５３Ｔ－ａＳｙｎ）。右黒質（ＳＮ）に、ＡＡＶ１／２－ｈＳＮＣＡ及びＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡウイルスの両方の片側注射を行った。同時注射群と連続的注射群の両方において、使用した単回用量では、線条体においてＡＡＶ５注射した脳半球でｖＤＮＡが検出され（図１３）、対照半球（左線条体）では、ｖＤＮＡレベルは定量下限（ＬＬＯＱ）未満であった（図示せず）。形質導入は、ベクター特異的様式でｍｉＳＮＣＡ５及びｍｉＳＮＣＡ１５の発現をもたらし（図１４のＡ及びＢ）：ｍｉＳＮＣＡ５は、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５注入半球においてのみ検出され、ｍｉＳＮＣＡ１５は、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５注入半球においてのみ検出され、陰性対照群からの他の試料においてはどちらも検出されなかった。Ａ　５３　Ｔ－ａＳｙｎ動物では、使用した単回用量で、無関係のｍｉＲＮＡ（黒の実線）を注射した対照線条体（図１５）と比較して、Ｔａｑｍａｎ　ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイ（ＳＮＣＡ　２プライマーとプローブの組合せ）によって評価したところ、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ５及びＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ１５が注射部位線条体におけるＳＮＣＡ　ｍＲＮＡ発現の減少に有効であった。ｍｉＳＮＣＡ発現はまた、ＥＬＩＳＡによって測定される低下したα－ｓｙｎタンパク質レベルによって反映されるタンパク質レベルでの低下を示した（図１６）。［１２５　Ｉ］－ＲＴＩ－１２１オートラジオグラフィーによって測定されたドーパミントランスポーターの欠損は、ＰＤ患者の場合と同様に、対照ｍｉＲＮＡ（無関係なｍｉＲ、表１０の群６

）を連続的に注射したＡ　５３　Ｔ－ａＳｙｎ動物において明らかであり、ｍｉＳＮＣＡ処理群（表１０の群７及び８）において補正した（図１７）。このモデルにおける代謝産物の変化に関連して、Ｈａ５３Ｔ－ａＳｙｎ誘導性線条体ドーパミン欠損のｍｉＳＮＣＡ候補による補正が観察された。図１８のＡは試験群のドーパミンレベルを示し、図１８のＢはＬＣ／ＭＳによって測定された（ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ）／ＤＡレベルを示す。

【０２３０】

左足使用の非対称性パーセントによって測定される運動行動は、ベースラインレベルと比較して、５６日目にｍｉＳＮＣＡ５処理又はｍｉＳＮＣＡ１５処理を受けた連続注射群において有意に改善された（図１９のＡ及び図１９のＢ）。

【０２３１】

分子的、生化学的及び運動行動の結果は、組織学的観察によって裏付けられた。黒質におけるドーパミン作動性（ＴＨ陽性）及びα－ｓｙｎ陽性ニューロンの免疫染色及び定量化は、両方のＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡ候補（連続注入群）がドーパミン作動性（ＴＨ）ニューロン細胞喪失をレスキューし（図２０－１のＡ）、ヒトα－ｓｙｎ細胞数を減少させた（図２０－１のＢ）ことを示した。これは、α－ｓｙｎを発現した陽性ドーパミン作動性（ＴＨ）細胞の割合の減少によって反映された（図２０－２のＣ）。黒質におけるＩｂａ１免疫反応性によって評価される、このモデルにおける炎症の減少もまた予想される。

【０２３２】

全体として、ＡＡＶ５－ｍｉＳＮＣＡは、ＡＡＶ－Ｓｙｎラットモデルにおいて疾患表現型を回復させ、運動表現型を改善し、分子変化及び神経化学変化をレスキューし、ｍｉＳＮＣＡ処理がα－ｓｙｎ毒性を低下させるための有効な治療法であることが証明された。

【０２３３】

試験４．ｍｉＳＮＣＡ候補配列を用いた線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＰＤモデルにおける表現型救済

異なるプラスミド発現大腸菌によって供給された線虫間の移動速度を比較するために、条件ごとに１００匹の線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）をビデオ追跡した。結果によれば、全長ＳＮＣＡ発現又はｍｉＳＮＣＡ発現大腸菌によって給餌された蠕虫は、空のプラスミドで形質転換された大腸菌によって給餌された蠕虫と比較して、運動速度の改善を示した（図１１）。完全長ＳＮＣＡ又はｍｉＳＮＣＡで処理した蠕虫は、その動きを追跡した全ての日において、未処理の蠕虫と比較して速度が上昇した。これらの結果は、ＳＮＣＡ遺伝子の発現を減少させ、それによってα－ｓｙｎレベルを低下させることが、この線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＰＤモデルにおける運動表現型を改善することを示す。さらに、結果は、異なる寿命段階での蠕虫の処理が可能であることを証明している。

【０２３４】

ｍｉＳＣＮＡによる処理は、それらを幼生段階又は成体段階で処理した場合、線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＰＤモデルにおいてＳＮＣＡ　ｍＲＮＡレベル（図２１－１のＡ～２１－１のＣ）及びα－シヌクレインタンパク質レベル（図２１－２のＤ～２１－２のＦ）を低下させた。これと一致して、ｍｉＳＮＣＡ処理は、陰性対照蠕虫（ＥＶ処理蠕虫）と比較して、ｍｉＳＮＣＡ処理蠕虫における遊泳速度の改善として、図２２に示されるように、このモデルにおける運動表現型挙動をレスキューした。

【０２３５】

ｍｉＳＮＣＡ５、ｍｉＳＮＣＡ１５及び全長ＳＮＣＡで処理された線虫から収集された線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）試料で行われた低分子ＲＮＡシーケンシングによって、試料中の正しく処理されたｍｉＳＮＣＡ候補の存在が証明される（図２３－１及び２３－２）。ｍｉＳＮＣＡ５配列及びｍｉＳＮＣＡ１５配列、同様にまた、他のｍｉＳＮＣＡ配列（例えば、ｍｉＳＮＣＡ　７、ｍｉＳＮＣＡ１２及びｍｉＳＮＣＡ１３）が、ＳＮＣＡ全長処理試料から検出された。

【図面】

【図１】

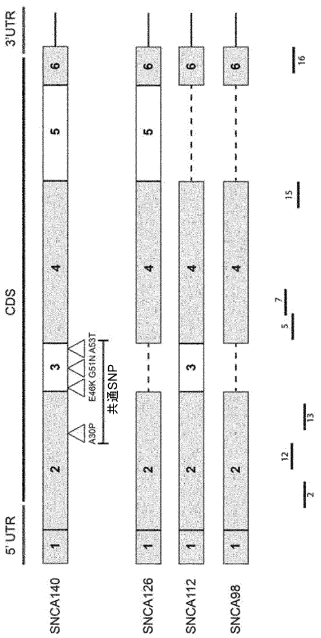


図 1

【図２】

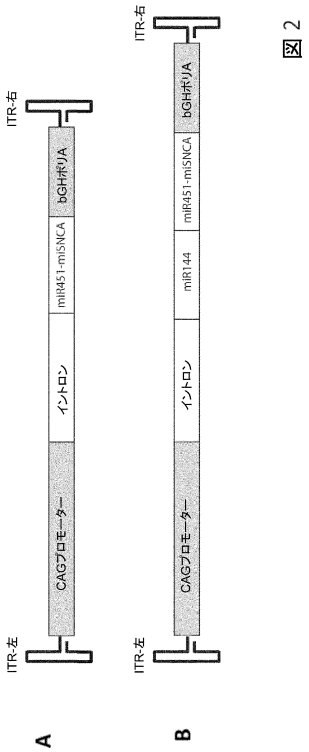


図 2

【図３】

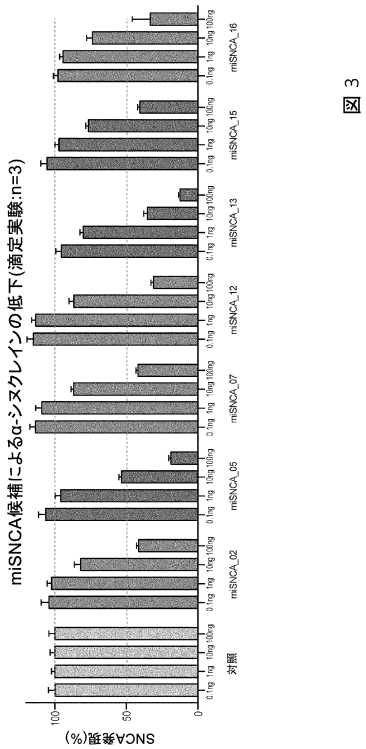


図 3

【図４】

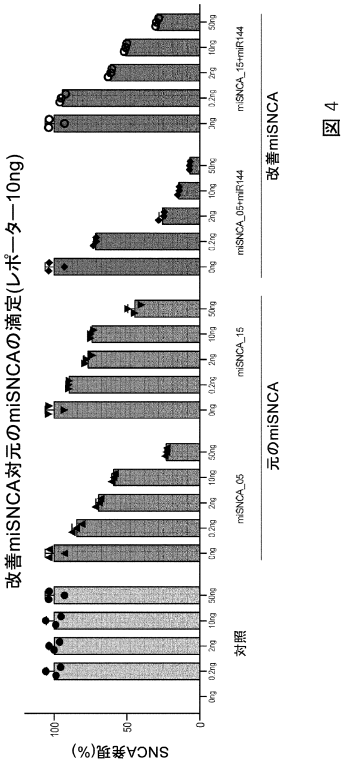


図 4

【図５】

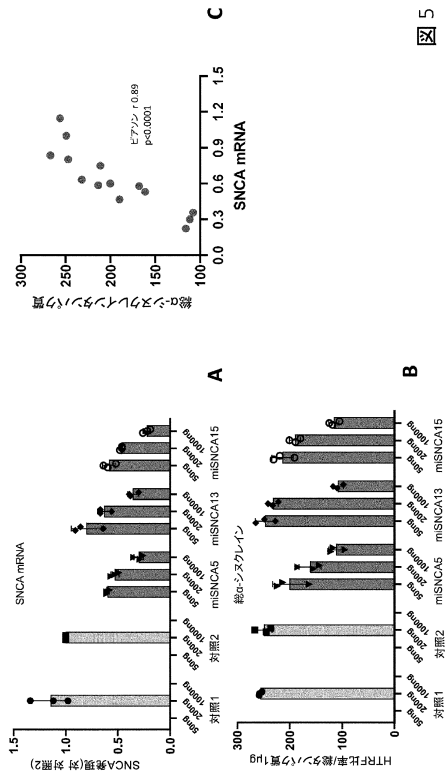


図５

【図６Ａ】

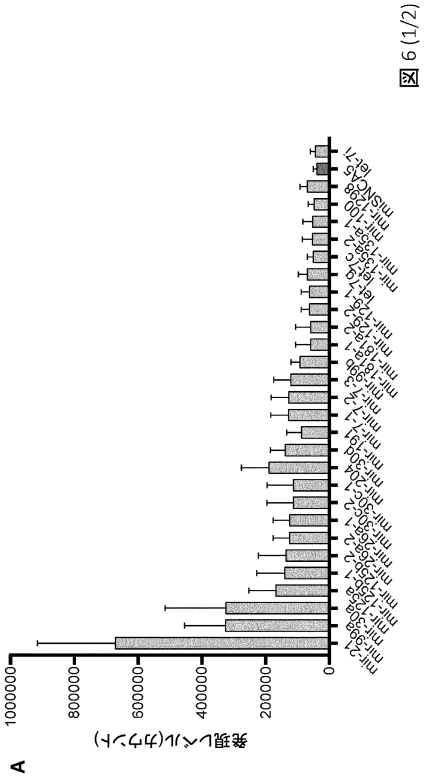


図６(1/2)

【図６Ｂ】

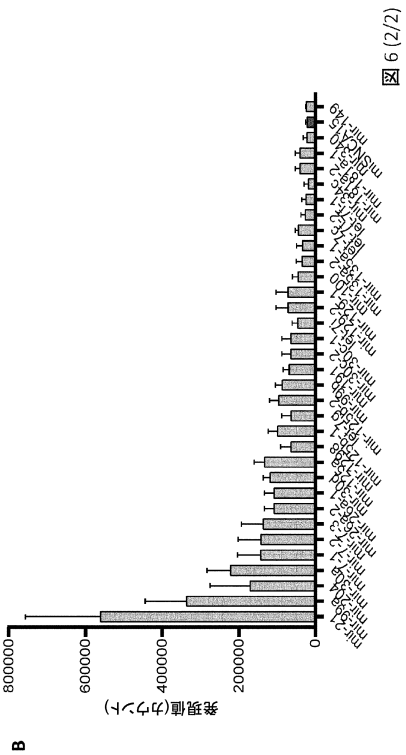


図６(2/2)

【図７】

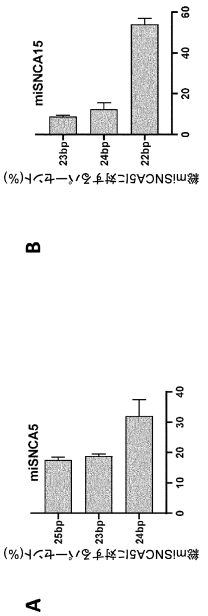


図７

【図８】

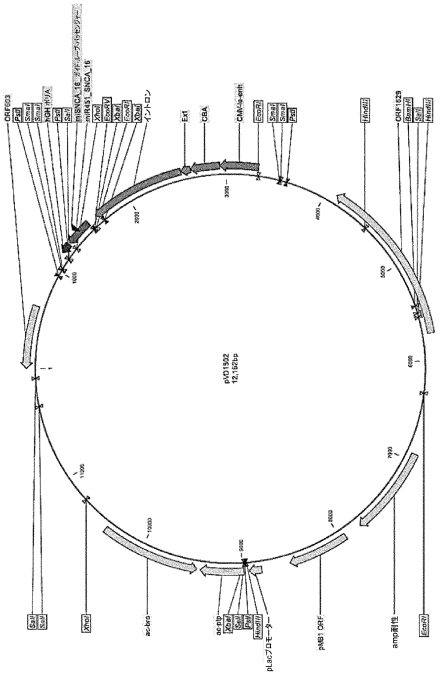


図８

【図９Ａ】

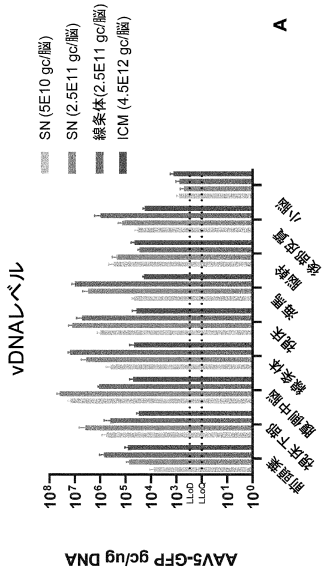


図９(1/2)

【図９Ｂ】

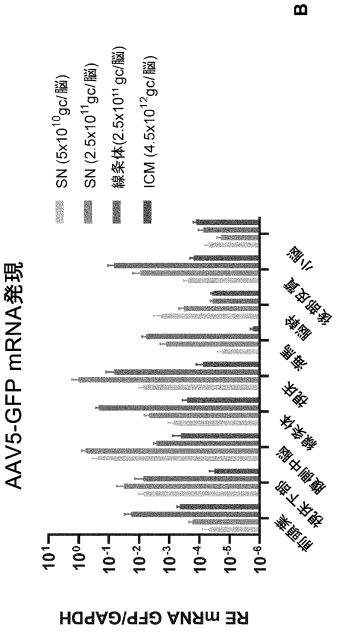


図９(2/2)

【図１０－１】

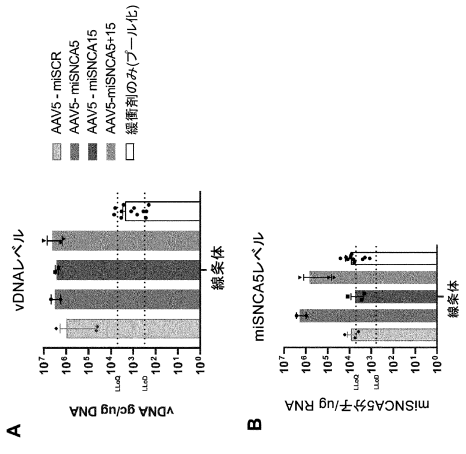


図１０(1/2)

【図１０－２】

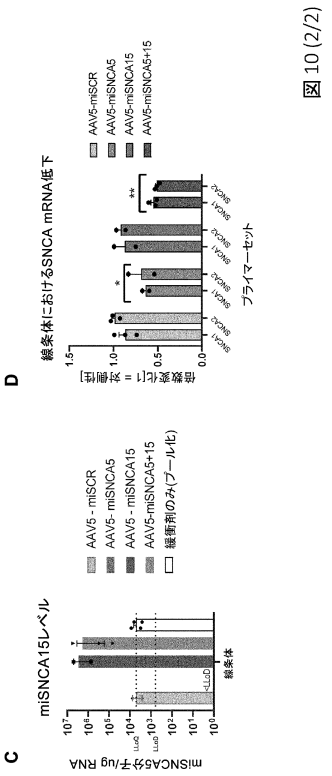


図 10 (2/2)

【図１１】

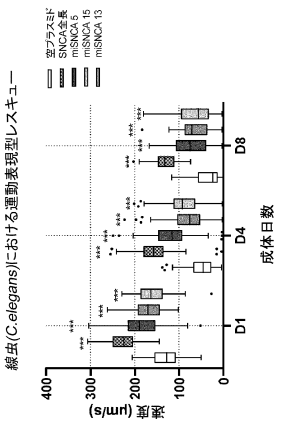


図 11

【図１２】

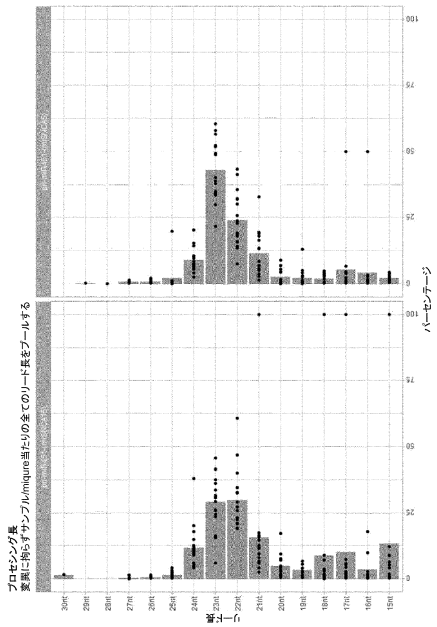


図 12

【図１３】

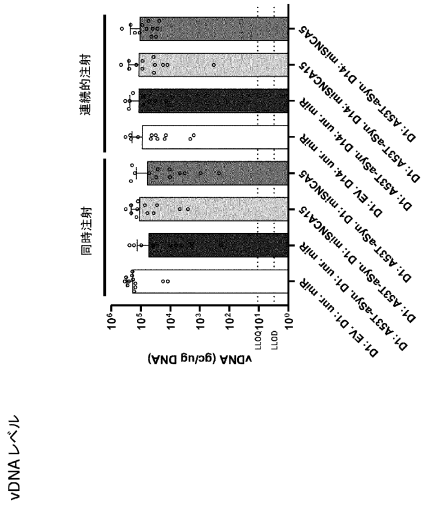


図 13

【図１４】

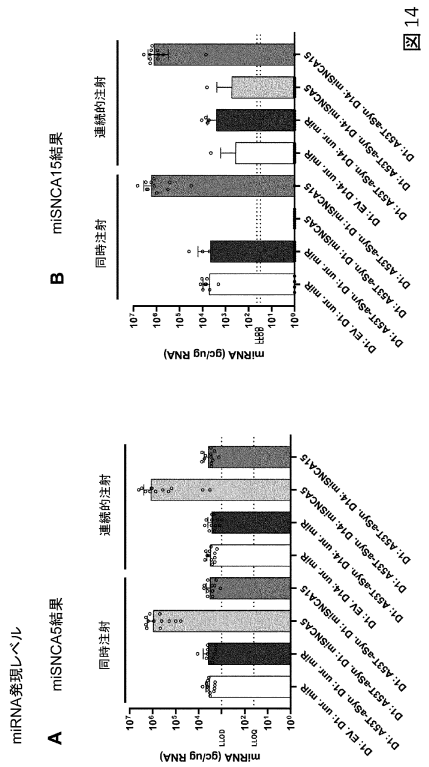


図 14

【図１５】

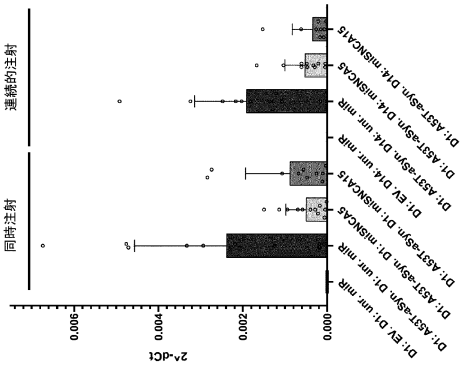


図 15

【図１６】

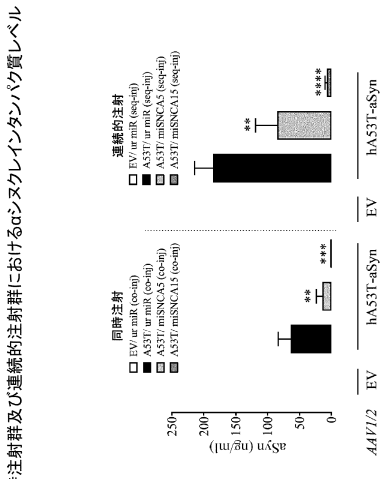


図 16

【図１７】

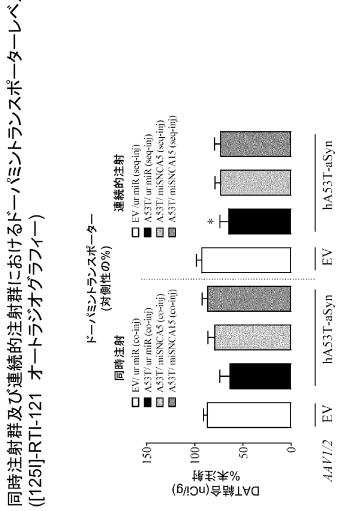


図 17

【図１８】

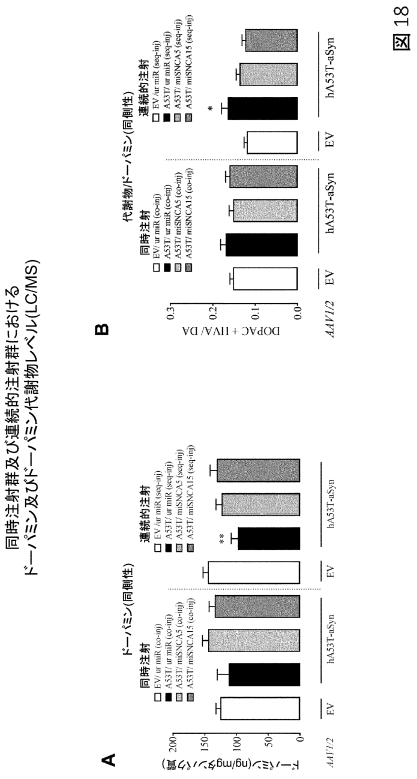


図 18

【図１９】

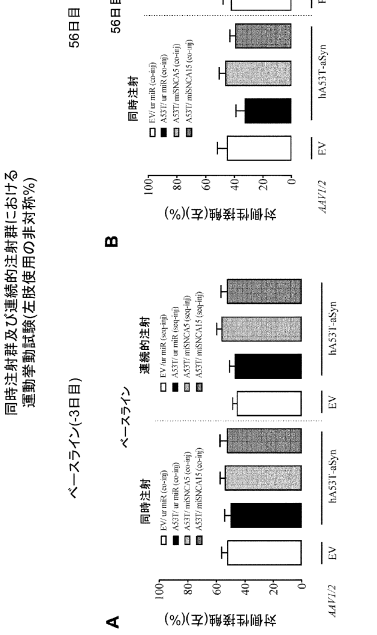


図 19

【図２０－１】

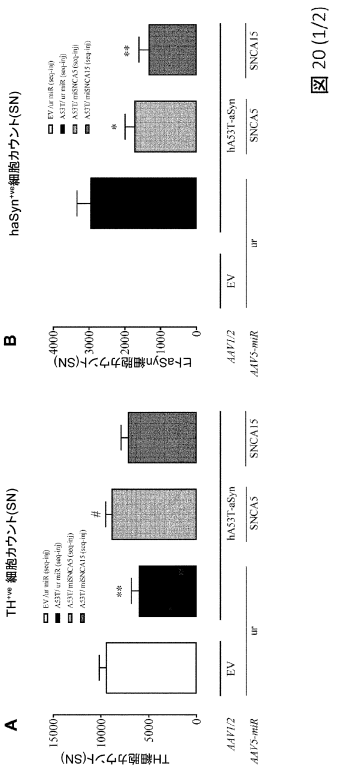


図 20 (1/2)

【図２０－２】

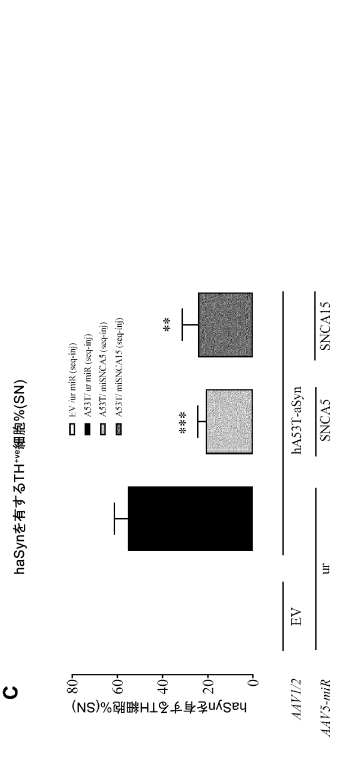


図 20 (2/2)

【図２１－１】

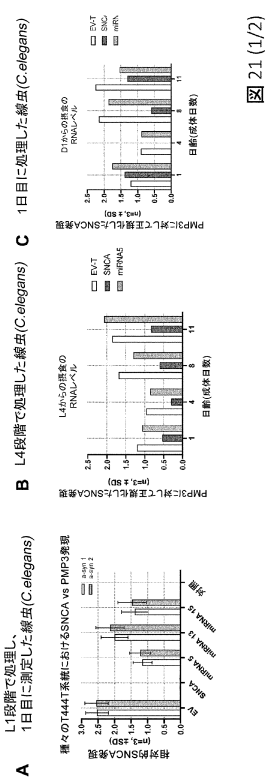


図 21 (1/2)

【図２１－２】

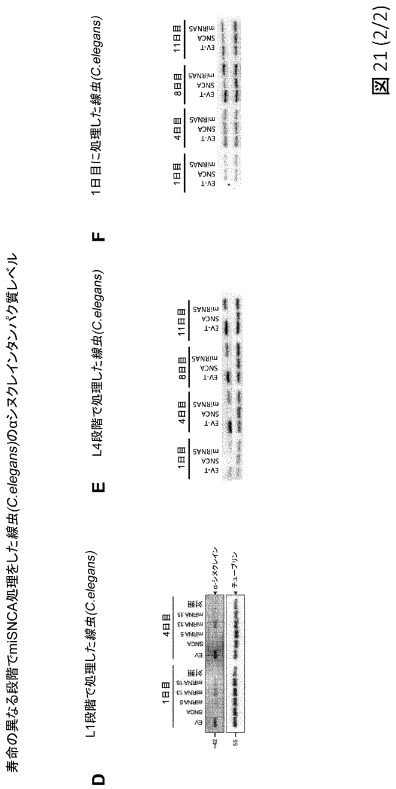


図 21 (2/2)

【図２２】

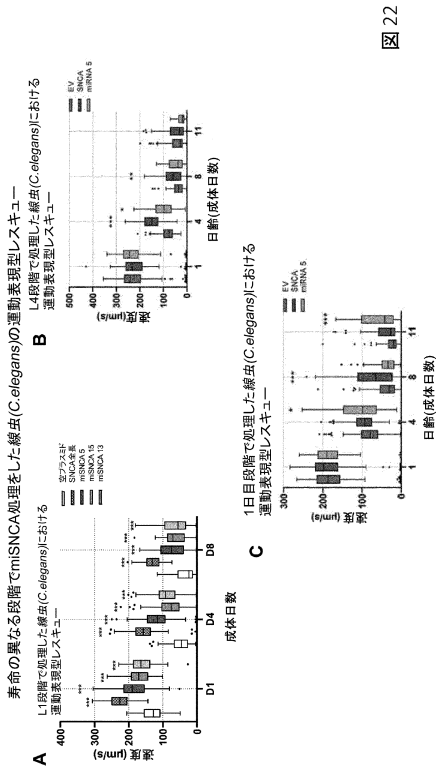


図 22

【図２３－１】

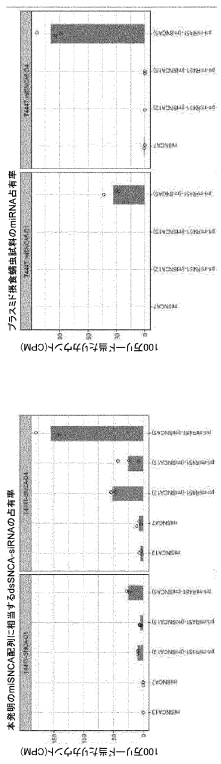
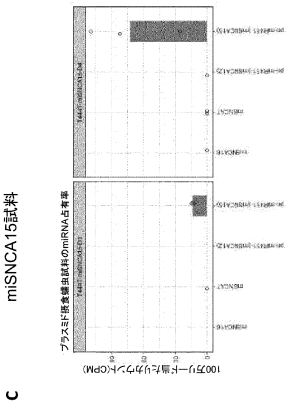


図 23. (1/2) 全長SNCA, miSNCA5及びmiSNCA 15で処理した線虫(C.elegans)試料の低分子RNAシークエンシングの結果

【図２３－２】

図 23. (2/2)



【配列表】

2024523445000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/066922

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/713 A61P25/16
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2019/070891 A1 (PREVAIL THERAPEUTICS INC [US]) 11 April 2019 (2019-04-11) pages 9, 13; claims 1-30; figures 5,6	1-5, 9-17, 19-21 6-8,18, 22

Y A	WO 2021/113270 A1 (SHAPE THERAPEUTICS INC [US]; HUSS DAVID [US]; MALI PRASHANT [US]) 10 June 2021 (2021-06-10) paragraphs [0259], [0267], [0292] - [0295]; figure 15; examples 12-15; sequences 113,114,118	6-8,18, 22 1-5, 9-17, 19-21

Y A	WO 2009/079399 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; TAN PAMELA [DE]) 25 June 2009 (2009-06-25) claims 1,8,10,14,22,62-67; sequences 124,148,150,390,414	6-8 1-5,9-22

	-/--	

X Further documents are listed in the continuation of Box C.

X See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 October 2022	17/10/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bucka, Alexander

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/066922

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/028816 A1 (GENZYME CORP [US]) 6 February 2020 (2020-02-06)	6-8
A	paragraphs [0077], [0097]; claims 1-10,13-16,18,19,28-34,40,41,81-84; examples 1-5; sequences 5,24,53	1-5,9-22
X	WO 2010/129791 A1 (UNIV NEW JERSEY MED [US]; MOURADIAN MARY MARAL [US]; JUNN EUNSUNG [US]) 11 November 2010 (2010-11-11) claims 1-18; figure 1; examples 1,2	1-5,9, 12, 14-17, 19-21
A	WO 2006/039253 A2 (CHILDRENS MEMORIAL HOSPITAL [US]; BOHN MARTHA C [US]; SAPRU MOHAN [US]) 13 April 2006 (2006-04-13) claims 1-13,27-29,37; examples 1-4,13-17	1-22
A	ZHARIKOV ALEVTINA D. ET AL: "shRNA targeting [alpha]-synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION , vol. 125, no. 7 15 June 2015 (2015-06-15), pages 2721-2735, XP055907128, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI64502 Retrieved from the Internet: URL:https://www.jci.org/articles/view/64502/version/2/pdf/render.pdf figures 1-3 -& Zharikov Alevtina D. ET AL: "Supplemental Figures 1-11: shRNA targeting [alpha]-synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model", The Journal of Clinical Investigation, 15 June 2015 (2015-06-15), XP055907245, Retrieved from the Internet: URL:https://dm5migu4zj3pb.cloudfront.net/manuscripts/64000/64502/JCI64502sd.pdf [retrieved on 2022-03-30] figures S2, S3	1-22
A	KIM YOUNG-CHO ET AL: "RNA Interference of Human [alpha]-Synuclein in Mouse", FRONTIERS IN NEUROLOGY, vol. 8, 31 January 2017 (2017-01-31), XP055907131, DOI: 10.3389/fneur.2017.00013 figures 1,2; tables 1,2	1-22

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/066922

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/102664 A1 (UNIQURE IP BV [NL]) 30 June 2016 (2016-06-30) page 14; claims 1,8-13; figure 2; sequence 22	1-22
A	YE HAN ET AL: "A microRNA embedded AAV alpha-synuclein gene silencing vector for dopaminergic neurons", BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1386, 14 February 2011 (2011-02-14), pages 15-24, XP028186550, ISSN: 0006-8993, DOI: 10.1016/J.BRAINRES.2011.02.041 [retrieved on 2011-02-19] figures 1,3	1-22
A	KHODR CHRISTINA E ET AL: "Targeting alpha-synuclein with a microRNA-embedded silencing vector in the rat substantia nigra: Positive and negative effects", BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1550, 21 January 2014 (2014-01-21), pages 47-60, XP028616892, ISSN: 0006-8993, DOI: 10.1016/J.BRAINRES.2014.01.010 figures 1-3	1-22
A	WO 2020/104435 A1 (UNIQURE IP BV [NL]) 28 May 2020 (2020-05-28) claims 1,7,8; sequence 1	1-22
A	WO 2020/104295 A1 (UNIQURE IP BV [NL]) 28 May 2020 (2020-05-28) claims 1,5,6; sequence 49	1-22
A	TITZE-DE-ALMEIDA SIMONEIDE S. ET AL: "The Promise and Challenges of Developing miRNA-Based Therapeutics for Parkinson's Disease", CELLS, vol. 9, no. 4, 31 March 2020 (2020-03-31), page 841, XP055907136, DOI: 10.3390/cells9040841 table 1	1-22
A	WO 2011/133889 A2 (COLD SPRING HARBOR LAB [US]; HANNON GREGORY J [US] ET AL.) 27 October 2011 (2011-10-27) figures 4,7,12; examples 4-7	1-22
A	WO 2012/068405 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; BENNETT C FRANK [US] ET AL.) 24 May 2012 (2012-05-24) claim 1; table 1; sequences 16,18	1-22

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/066922

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/045034 A2 (SIRNA THERAPEUTICS INC [US]; MCSWIGGEN JAMES [US] ET AL.) 19 May 2005 (2005-05-19) pages 37,38; claims 1-30; sequence 92	1-22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/066922

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed:

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

      [ ] on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/066922

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019070891 A1	11-04-2019	AU 2018346102 A1	30-04-2020
		AU 2020260476 A1	26-11-2020
		BR 112020006671 A2	01-12-2020
		CA 3078501 A1	11-04-2019
		CN 111465691 A	28-07-2020
		CN 112501208 A	16-03-2021
		EP 3692151 A1	12-08-2020
		IL 273768 A	31-05-2020
		IL 279669 A	01-03-2021
		JP 2020537542 A	24-12-2020
		JP 2022060228 A	14-04-2022
		KR 20200078513 A	01-07-2020
		KR 20220010062 A	25-01-2022
		US 2020231970 A1	23-07-2020
		US 2020318115 A1	08-10-2020
		WO 2019070891 A1	11-04-2019
WO 2021113270 A1	10-06-2021	AU 2020395113 A1	09-06-2022
		CA 3159944 A1	10-06-2021
		CN 115038789 A	09-09-2022
		EP 4069842 A1	12-10-2022
		WO 2021113270 A1	10-06-2021
WO 2009079399 A2	25-06-2009	US 2009176729 A1	09-07-2009
		US 2010204306 A1	12-08-2010
		US 2011257247 A1	20-10-2011
		WO 2009079399 A2	25-06-2009
WO 2020028816 A1	06-02-2020	AR 114540 A1	16-09-2020
		AU 2019314529 A1	25-03-2021
		BR 112021001980 A2	04-05-2021
		CA 3108526 A1	06-02-2020
		CN 112805382 A	14-05-2021
		CO 2021002637 A2	30-07-2021
		EP 3830265 A1	09-06-2021
		IL 280581 A	25-03-2021
		JP 2021534814 A	16-12-2021
		KR 20210062627 A	31-05-2021
		SG 11202101072U A	30-03-2021
		TW 202022116 A	16-06-2020
		US 2021309999 A1	07-10-2021
		WO 2020028816 A1	06-02-2020
WO 2010129791 A1	11-11-2010	US 2012129912 A1	24-05-2012
		US 2016264965 A1	15-09-2016
		US 2017369881 A1	28-12-2017
		WO 2010129791 A1	11-11-2010
WO 2006039253 A2	13-04-2006	AT 439440 T	15-08-2009
		CA 2580189 A1	13-04-2006
		EP 1799826 A2	27-06-2007
		US 2007172462 A1	26-07-2007
		US 2010286242 A1	11-11-2010
		WO 2006039253 A2	13-04-2006
WO 2016102664 A1	30-06-2016	AU 2015370903 A1	20-07-2017
		BR 112017013573 A2	06-03-2018
		CA 2971920 A1	30-06-2016

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/066922

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 108064292 A	22-05-2018
		CO 2017007335 A2	05-01-2018
		DK 3237618 T3	24-06-2019
		EA 201791417 A1	29-12-2017
		EP 3237618 A1	01-11-2017
		EP 3540063 A1	18-09-2019
		ES 2732023 T3	20-11-2019
		HR P20190992 T1	20-09-2019
		HU E043842 T2	30-09-2019
		JP 6839094 B2	03-03-2021
		JP 2018502601 A	01-02-2018
		JP 2021000136 A	07-01-2021
		KR 20170120572 A	31-10-2017
		LT 3237618 T	10-07-2019
		NZ 733296 A	29-10-2021
		PL 3237618 T3	30-09-2019
		PT 3237618 T	04-07-2019
		SI 3237618 T1	30-09-2019
		TR 201908969 T4	22-07-2019
		US 2017355989 A1	14-12-2017
		US 2019144860 A1	16-05-2019
		US 2020339992 A1	29-10-2020
		WO 2016102664 A1	30-06-2016
WO 2020104435 A1	28-05-2020	AU 2019385638 A1	03-06-2021
		CA 3119721 A1	28-05-2020
		EP 3884067 A1	29-09-2021
		US 2022025433 A1	27-01-2022
		WO 2020104435 A1	28-05-2020
WO 2020104295 A1	28-05-2020	AU 2019385598 A1	03-06-2021
		CA 3121010 A1	28-05-2020
		CN 113383077 A	10-09-2021
		EP 3884050 A1	29-09-2021
		IL 283274 A	29-07-2021
		JP 2022507283 A	18-01-2022
		US 2020199625 A1	25-06-2020
		US 2022010314 A1	13-01-2022
		WO 2020104295 A1	28-05-2020
WO 2011133889 A2	27-10-2011	AU 2011242576 A1	06-12-2012
		AU 2016204409 A1	14-07-2016
		AU 2018220005 A1	06-09-2018
		AU 2020294243 A1	28-01-2021
		CA 2795815 A1	27-10-2011
		CY 1121014 T1	11-12-2019
		DK 2561078 T3	14-01-2019
		EP 2561078 A2	27-02-2013
		EP 3502254 A1	26-06-2019
		ES 2699630 T3	12-02-2019
		HR P20182039 T1	08-02-2019
		HU E040278 T2	28-02-2019
		LT 2561078 T	10-01-2019
		PL 2561078 T3	28-02-2019
		PT 2561078 T	03-12-2018
		SI 2561078 T1	31-01-2019
		US 2012021516 A1	26-01-2012
		US 2013179999 A1	11-07-2013

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/066922

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2015197749 A1	16-07-2015
		US 2017342410 A1	30-11-2017
		US 2020048633 A1	13-02-2020
		US 2021254064 A1	19-08-2021
		WO 2011133889 A2	27-10-2011
WO 2012068405 A2	24-05-2012	AU 2011329777 A1	02-05-2013
		AU 2016225852 A1	29-09-2016
		CA 2817960 A1	24-05-2012
		CA 3077910 A1	24-05-2012
		EP 2640853 A2	25-09-2013
		EP 3521451 A1	07-08-2019
		JP 6126009 B2	10-05-2017
		JP 2014501507 A	23-01-2014
		JP 2017079786 A	18-05-2017
		US 2014005252 A1	02-01-2014
		US 2018073022 A1	15-03-2018
		US 2021087562 A1	25-03-2021
		WO 2012068405 A2	24-05-2012
WO 2005045034 A2	19-05-2005	EP 1675948 A2	05-07-2006
		WO 2005045034 A2	19-05-2005

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*25/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/02		
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ	*25/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/16		
Ａ６１Ｐ	*37/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*31/711(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711		
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		

,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

オランダ王国， １１０５ ビーピー アムステルダム， パースフーフェルヴェーク ２５， ケア オブ ユニキュア アイピー ビー．ブイ．

(72)発明者 バレス サンチェス， アストリッド

オランダ王国， １１０５ ビーピー アムステルダム， パースフーフェルヴェーク ２５， ケア オブ ユニキュア アイピー ビー．ブイ．

Ｆターム（参考） 4B065 AA95X AB01 AC14 BA30 CA23 CA44

4C084 AA13 AA19 MA05 NA05 NA13 NA14 ZA021 ZA022 ZA151 ZA152 ZA211 ZA212 ZA241 ZA242 ZB082 ZC751 ZC752

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA05 NA13 NA14 ZA02 ZA15 ZA21 ZA24

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 MA05 NA05 NA13 NA14 ZA02 ZA15 ZA21