

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-526310

(P2023-526310A)

(43)公表日 令和5年6月21日(2023.6.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全138頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-569265(P2022-569265)	(71)出願人	502409813		
(86)(22)出願日	令和3年5月12日(2021.5.12)		ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバ		
(85)翻訳文提出日	令和4年12月8日(2022.12.8)		ーシテイ・オブ・ペンシルベニア		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/032003		アメリカ合衆国ペンシルベニア州191		
(87)国際公開番号	WO2021/231579		04フィラデルフィア・ナインスフロア		
(87)国際公開日	令和3年11月18日(2021.11.18)		ー・シビックセンター・ブルバード36		
(31)優先権主張番号	63/043,562		00		
(32)優先日	令和2年6月24日(2020.6.24)	(74)代理人	110000741		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士法人小田島特許事務所		
(31)優先権主張番号	63/023,593	(72)発明者	ウイルソン, ジェームス・エム		
(32)優先日	令和2年5月12日(2020.5.12)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州191		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		03フィラデルフィア・デランシースト		
(31)優先権主張番号	63/038,488	(72)発明者	リート1831		
	最終頁に続く		オルドー, ジュリエット		
			アメリカ合衆国ペンシルベニア州191		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 導入遺伝子発現のDRG特異的低減のための組成物

(57)【要約】

後根神経節(DRG)における遺伝子産物の発現を特異的に抑制する遺伝子産物を、それを必要とする患者に送達するための組換えAAV(rAAV)が提供される。rAAVは、中にベクターゲノムがパッケージングされたAAVカプシドを含み、ベクターゲノムは、(a)ベクターゲノムを含む細胞において遺伝子産物の発現を導く調節配列の制御下にある、遺伝子産物のコード配列と、(b)少なくとも8つのmiR標的配列であって、各標的配列が、miR-183又はmiR-182に特異的であり、少なくとも8つのmiR標的配列が、コード配列の3'末端に作動可能に連結されている、少なくとも8つのmiR標的配列と、を含む。遺伝子産物を、それを必要とする患者に送達するための、記載のrAAVの方法及び使用も提供される。

【選択図】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

後根神経節（DRG）における遺伝子産物の発現を特異的に抑制する前記遺伝子産物を、それを必要とする患者に送達するための組換えAAV（rAAV）であって、前記rAAVが、中にベクターゲノムがパッケージングされたAAVカプシドを含み、前記ベクターゲノムが、

（a）前記ベクターゲノムを含む細胞において前記遺伝子産物の発現を導く調節配列の制御下にある、前記遺伝子産物のコード配列と、

（b）少なくとも8つのmiR標的配列であって、各標的配列が、miR-183又はmiR-182に特異的であり、前記少なくとも8つのmiR標的配列が、前記コード配列の3'末端に作動可能に連結されている、少なくとも8つのmiR標的配列と、を含む、組換えAAV（rAAV）。 10

【請求項 2】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、miR-183に特異的な、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つの標的配列を含む、請求項1に記載のrAAV。

【請求項 3】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、miR-182に特異的な、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つの標的配列を含む、請求項1に記載のrAAV。 20

【請求項 4】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、miR-183に特異的な少なくとも4つの標的配列、及び／又はmiR-182に特異的な少なくとも4つの標的配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項 5】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、miR-183に特異的な4つの標的配列、及びmiR-182に特異的な4つの標的配列を含む、請求項1に記載のrAAV。

【請求項 6】

発現カセットが、少なくとも8つのmiR標的配列を有する3'UTRを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のrAAV。 30

【請求項 7】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、200～1200ヌクレオチド長である3'UTRにある、請求項1～6のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項 8】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、連続的であるか、又は1～10のヌクレオチドのスペーサーによって分離されており、前記スペーサーが、miRNA標的配列ではない、請求項1～7のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項 9】

前記少なくとも8つのmiR標的配列の第1のものの5'末端が、遺伝子コード配列の前記3'末端から20ヌクレオチド以内である、請求項1～8のいずれか一項に記載のrAAV。 40

【請求項 10】

前記少なくとも8つのmiR標的配列の第1のものの5'末端が、遺伝子コード配列の前記3'末端から少なくとも100のヌクレオチドである、請求項1～8のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項 11】

前記ベクターゲノムが、5'UTR中のmiR-183又はmiR-182に特異的な少なくとも1つの標的配列を更に含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項 12】 50

前記少なくとも8つの標的配列の各々が、

(a) AGTGAATTCTACCAAGTGCCATA (配列番号1)、又は

(b) AGTGTGAGTTCTACCATTTGCCAAA (配列番号3)を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項13】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、連続的であり、スパーサーによって分離されていない、請求項1～12のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項14】

前記少なくとも8つのmiR標的配列の各々が、スパーサーによって分離され、各スパーサーが、独立して、(i) GGAT (配列番号5)、(ii) CACGTG (配列番号6)、又は(iii) GCATGC (配列番号7)のうちの1つ以上から選択される、請求項1～13のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項15】

スパーサーが、前記少なくとも8つのmiR標的配列の各々と、第1のmiRNA標的配列の3'及び／又は最後のmiR標的配列の5'との間に位置する、請求項1～14のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項16】

前記ベクターゲノムが、組織特異的プロモーターを含む、請求項1～15のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項17】

前記ベクターゲノムが、中枢神経系特異的プロモーター、筋特異的プロモーター、心臓特異的プロモーター、又は肝臓特異的プロモーターを含む、請求項1～16のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項18】

前記ベクターゲノムが、構成的プロモーターを含む、請求項1～15のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項19】

後根神経節(DRG)における遺伝子産物の発現を特異的に抑制する遺伝子送達のための組成物であって、核酸配列である発現カセットを含み、

(a) 前記発現カセットを含む細胞において前記遺伝子産物の発現を導く調節配列の制御下にある、前記遺伝子産物のコード配列と、

(b) 少なくとも8つのmiR標的配列であって、各標的配列が、miR-183又はmiR-182に特異的であり、前記少なくとも8つのmiR標的配列が、前記コード配列の3'末端に作動可能に連結されている、少なくとも8つのmiR標的配列と、を含む核酸配列である前記発現カセットを含む、組成物。

【請求項20】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、miR-183に特異的な、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つの標的配列を含む、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、miR-182に特異的な、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つの標的配列を含む、請求項19に記載の組成物。

【請求項22】

前記少なくとも8つのmiR標的配列が、miR-183に特異的な少なくとも4つの標的配列、及び／又はmiR-182に特異的な少なくとも4つの標的配列を含む、請求項19～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項23】

少なくとも8つのmiR標的配列が、miR-183に特異的な4つの標的配列、及びmiR-182に特異的な4つの標的配列を含む、請求項19～22のいずれか一項に記

10

20

30

40

50

載の組成物。

【請求項 24】

前記発現カセットが、少なくとも 8 つの m i R 標的配列を有する 3' UTR を含む、請求項 19～23 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

少なくとも 8 つの m i R 標的配列を有する前記 3' UTR が、200～1200 ヌクレオチド長である、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記少なくとも 8 つの m i R 標的配列が、連続的であるか、又は 1～10 のヌクレオチドのスペーサーによって分離されており、前記スペーサーが、m i R 標的配列ではない、請求項 19～25 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 27】

前記少なくとも 8 つの m i R 標的配列の第 1 のものの 5' 末端が、遺伝子コード配列の前記 3' 末端から 20 ヌクレオチド以内である、請求項 19～26 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 28】

前記少なくとも 8 つの m i R 標的配列の第 1 のものの 5' 末端が、遺伝子コード配列の前記 3' 末端から少なくとも 100 のヌクレオチドである、請求項 19～26 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 29】

前記発現カセットが、5' UTR 中の m i R-183 又は m i R-182 に特異的な少なくとも 1 つの標的配列を更に含む、請求項 19～28 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 30】

前記少なくとも 8 つの標的配列の各々が、

(a) AGTGAATTCTACCAAGTGCCATA (配列番号 1)、又は

(b) AGTGTGAGTTCTACCAATTGCCAAA (配列番号 3) を含む、請求項 19～29 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 31】

前記少なくとも 8 つの m i R 標的配列が、連続的であり、スペーサーによって分離されていない、請求項 19～30 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 32】

前記少なくとも 8 つの m i R 標的配列の各々が、スペーサーによって分離され、各スペーサーが、独立して、(i) GGAT (配列番号 5)、(ii) CACGTG (配列番号 6)、又は (iii) GCATGC (配列番号 7) のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 19～30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 33】

前記少なくとも 8 つの m i RNA 標的配列の各々の間の前記スペーサーが、同じである、請求項 26～30 又は 32 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 34】

前記発現カセットが、組換えパルボウイルス、組換えレンチウイルス、組換えレトロウイルス、又は組換えアデノウイルスであるウイルスベクターによって担持される、請求項 19～33 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 35】

前記発現カセットが、裸の DNA、裸の RNA、無機粒子、脂質粒子、ポリマーベースのベクター、又はキトサンベースの製剤である非ウイルスベクターによって担持される、請求項 19～33 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 36】

請求項 1～18 のいずれか一項に記載の rAAV、又は請求項 19～35 のいずれか一項に記載の発現カセット、及び脳室内、髄腔内、大槽内、又は静脈内注入を介した送達に好適な製剤緩衝液を含む、医薬組成物。

50

【請求項 37】

患者におけるDRGニューロンにおける遺伝子産物の発現を抑制する方法であって、前記方法が、請求項1～18のいずれか一項に記載のrAAV、請求項19～35のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項36に記載の医薬組成物を前記患者に送達することを含む、方法。

【請求項 38】

患者への髄腔内又は全身性の遺伝子療法投与後の神経変性を調節し、かつ／又は二次的な背側脊髓軸索変性を減少させるための方法であって、前記方法が、請求項1～18のいずれか一項に記載のrAAV、請求項19～35のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項36に記載の医薬組成物を前記患者に送達することを含む、方法。

10

【請求項 39】

送達された遺伝子産物の発現が、前記患者のDRGニューロンにおいて抑制される、遺伝子送達に使用するための請求項1～18のいずれか一項に記載のrAAV、請求項19～35のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項36に記載の遺伝子送達に使用するための医薬組成物。

【請求項 40】

送達された導入遺伝子の発現が、前記患者のDRGニューロンにおいて抑制される、患者に導入遺伝子を送達するための請求項1～18のいずれか一項に記載の前記rAAV、請求項19～35のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項36に記載の医薬組成物を使用する。

20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

インビボ遺伝子療法のために選択されるベクタープラットフォームは、霊長類由来のアデノ随伴ウイルス(AAV)に基づく。1960年代、遺伝子療法産物は、アデノウイルスの調製物から単離されたAAVに由来した(Hoggan, M. D. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 55:1467-1474, 1966)。これらのベクターは安全であったが、不十分な形質導入のために、臨床では、多くのプログラムが失敗した。21世紀への変わり目に、研究者らは、内因性AAVのファミリーを発見し、これは、ベクターとして好ましい安全プロファイルを保持しながら、はるかに高い形質導入効率を達成した(Gao, G., et al. J Virol 78:6381-6388, 2004)。

30

【0002】

AAVベクターに対する宿主の有害な応答は、最小限であった。激しい急性炎症応答を引き起こす非ウイルスベクター及びアデノウイルスベクターとは対照的に(Raper, S. E., et al. Mol Genet Metab 80:148-158, 2003; Zhang, Y., et al. Mol Ther 3:697-707, 2001)、AAVベクターは炎症促進性ではない。AAVベクターの投与後、細胞傷害性T細胞などのベクター形質導入細胞に対する破壊的な適応免疫応答は、最小限であった。動物及びヒトにおいて、AAVが、血清型、用量、投与経路、及び免疫抑制レジメンに応じて、特定の状況下では、カプシド又は導入遺伝子産物に対する耐性を誘導し得るという証拠がある(Gernoux, G., et al. Hum Gene Ther 28:338-349, 2017; Mays, L. E. & Wilson, J. M. Mol Ther 19:16-27, 2011; Manno, C. S., et al. Nat Med 12:342-347, 2006; Mingozzi, F., et al. Blood 110:2334-2341, 2007)。しかしながら、AAV遺伝子療法の臨床応用の最近の拡大を考慮すると、この技術の臨床的な影響を制限し得る毒性が見え始める。

40

【0003】

最も重度の毒性は、CNS及び筋骨格系を標的とする高用量AAVの静脈内投与後に発生した。非ヒト霊長類(NHP)における研究は、血小板減少症及び高トランスアミナー

50

ぜ血症の急性発症を示し、これは、場合によっては、出血及びショックの致死性の症候群に発展した (Hordeaux, J., et al. Mol Ther 26:664-668, 2018、Hinderer, C., et al. Hum Gene Ther. 29(3):285-298, 2018)。また、ほとんどの高用量AAV臨床試験において、肝臓酵素の急性上昇及び／又は血小板の低減も観察されている (AveXis, I. ZOLGENSMA Prescribing Information, 2019、Solid Biosciences Provides SGT-001 Program Update, 2019、Pfizer, Pfizer Presents Initial Clinical Data on Phase 1b Gene Therapy Study for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), 2019、Flanigan, K. T. et al. Molecular Genetics and Metabolism 126:S54, 2019)。稀ではあるが、重度の毒性は、貧血、腎不全、及び補体活性化によって特徴付けられた (Solid Biosciences, 2019、Pfizer, 2019)。

10

20

30

40

50

【0004】

より最近では、脳脊髄液 (CSF) 中に、又は高用量で血液中に、のいずれかでAAVベクターを受けたNHP及びブタでは、後根神経節 (DRG) のニューロンが変性する問題が観察されている (Hinderer, C., et al. Hum Gene Ther. 29(3):285-298, 2018、Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:68-78, 2018、Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018)。この神経毒性は、末梢神経における末梢軸索と、脊髄の後柱を通して上行する中枢軸索との両方の変性に関連する。

【0005】

当該技術分野では、毒性に対してより感受性の高い細胞において遺伝子産物の発現を最小限に抑える遺伝子療法のための組成物及び方法が必要である。

【発明の概要】

【0006】

一態様では、後根神経節 (DRG) における遺伝子産物の発現を特異的に抑制する遺伝子産物を、それを必要とする患者に送達するための組換えAAV (rAAV) が本明細書に提供される。rAAVは、中にベクターゲノムがパッケージングされたAAVカプシドを含み、ベクターゲノムは、(a) ベクターゲノムを含む細胞において遺伝子産物の発現を導く調節配列の制御下にある、遺伝子産物のコード配列と、(b) 少なくとも8つのmiR標的配列であって、各標的配列が、miR-183又はmiR-182に特異的であり、少なくとも8つのmiR標的配列が、コード配列の3'末端に作動可能に連結されている、少なくとも8つのmiR標的配列と、を含む。特定の実施形態では、少なくとも8つのmiR標的配列は、miR-183に特異的な、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つの標的配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも8つのmiR標的配列は、miR-182に特異的な、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つの標的配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも8つのmiR標的配列は、miR-183に特異的な少なくとも4つの標的配列、及び／又はmiR-182に特異的な少なくとも4つの標的配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも8つのmiR標的配列は、miR-183に特異的な4つの標的配列、及びmiR-182に特異的な4つの標的配列を含む。

【0007】

一態様では、遺伝子産物の発現を後根神経節 (DRG) において特異的に抑制する遺伝子送達のための組成物であって、(a) ベクターゲノムを含む細胞において遺伝子産物の発現を導く調節配列の制御下にある、遺伝子産物のコード配列と、(b) 少なくとも8つのmiR標的配列であって、各標的配列が、miR-183又はmiR-182に特異的であり、少なくとも8つのmiR標的配列が、コード配列の3'末端に作動可能に連結さ

れている、少なくとも8つのmiR標的配列と、を含む核酸配列である発現カセットを含む、組成物が本明細書に提供される。特定の実施形態では、少なくとも8つのmiR標的配列は、miR-182に特異的な、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つの標的配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも8つのmiR標的配列は、miR-183に特異的な少なくとも4つの標的配列、及び／又はmiR-182に特異的な少なくとも4つの標的配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも8つのmiR標的配列は、miR-183に特異的な4つの標的配列、及びmiR-182に特異的な4つの標的配列を含む。特定の実施形態では、発現カセットは、組換えパルボウイルス、組換えレンチウイルス、組換えレトロウイルス、又は組換えアデノウイルスであるウイルスベクターによって担持される。他の実施形態では、発現カセットは、裸のDNA、裸のRNA、無機粒子、脂質粒子、ポリマーベースのベクター、又はキットサンベースの製剤である非ウイルスベクターによって担持される。

10

【0008】

一態様では、rAAV又は発現カセットと、脳室内、髄腔内、大槽内、又は静脈内注入を介した送達に好適な製剤緩衝液とを含む、医薬組成物が、本明細書に提供される。

【0009】

一態様では、患者におけるDRGニューロンにおける遺伝子産物の発現を抑制するための方法が本明細書に提供され、方法は、rAAV、発現カセットを含む組成物、又は本明細書に記載の医薬組成物を送達することを含む。

【0010】

一態様では、髄腔内又は全身性の遺伝子療法投与後の神経変性を調節し、かつ／又は二次的な背側脊髓軸索変性を減少させるための方法が本明細書に提供され、方法は、rAAV、発現カセットを含む組成物、又は本明細書に記載の医薬組成物を送達することを含む。

20

【0011】

一態様では、rAAV、発現カセットを含む組成物、又は遺伝子送達で使用するための医薬組成物が本明細書に提供され、送達された遺伝子産物の発現は、患者のDRGニューロンにおいて抑制される。

【0012】

一態様では、rAAV、発現カセットを含む組成物、又は患者に導入遺伝子を送達するための医薬組成物の使用が提供され、送達された導入遺伝子の発現は、患者のDRGニューロンにおいて抑制される。

30

【0013】

本発明の他の態様及び利点は、以下の本発明の詳細な説明から、容易に明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A-1C】AAVのICM投与後の、DRG毒性及び二次軸索障害を示す。(図1A) DRGは、感覚偽単極ニューロンの細胞体を含む、これらは、末梢神経に位置する末梢軸索と、脊髓の上行性背側白質路に位置する中枢軸索とを通じて、感覚メッセージを末梢からCNSに中継する。(図1B) 軸索障害及びDRG神経変性。軸索障害(左上)は、空であるか(欠損軸索)、又はミエリンを消化するマクロファージ及び細胞デブリ(矢印)で満たされているかのいずれかである明らかな空胞として現れる。DRG病変(右上及び左下)は、単核細胞の浸潤(丸)を伴うニューロン細胞体の変性(矢印)からなる。ニッスル小体の溶解(中心性色質融解)に起因する好酸球性(ピンク)細胞質は、変性ニューロンを特徴付ける。細胞型の増加は、衛星細胞の増殖(衛星病変)及び炎症性細胞浸潤に起因する。一部の単核細胞は、浸潤し、神経細胞体を貪食する(神経貪食)。右下の写真は、AAV(この場合、GFP)によってコードされる導入遺伝子の免疫染色を示す。変性変化及び単核細胞浸潤を示すニューロンは、最も強いタンパク質発現を示すニューロンである(IHCの濃褐色染色によって証明される)。(図1C) グレード1〜グレ

40

50

ード5のDRG病変及びグレード1～グレード4の背側脊髄軸索障害の例。重症度グレードは、以下のように定義される。1 最小（10%未満）、2 軽度（10～25%）、3 中等度（25～50%）、4 顕著（50～95%）、及び5 重度（95%を超える）。グレード5は、脊髄では全く観察されなかった。矢印及び丸印は、DRGへの単核細胞の浸潤を伴う神経変性（左列）及び軸索障害（右列）を描写する。

【図2】DRG特異的サイレンシングのための例示的なAAV発現カセット設計を示す。miRNA逆相補配列（miR標的又は標的配列）の4つの短いタンデムリピートを、終止コドンとポリ-Aとの間に導入する。DRGニューロンにおいて、miR-183は、mRNAの3'非翻訳領域に結合し、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）を動員し、次いでmRNA切断を通じたサイレンシングをもたらす。miR-183を発現しない他の細胞型では、3'UTR領域からの影響なしに、翻訳及びタンパク質合成が起こる。

【図3A-3D】インビトロ及びマウスのDRGニューロンにおける導入遺伝子の発現を特異的にサイレンシングするmiR-183標的配列を示す。（図3A）miR-183又はmiR-145の標的を保有するGFP発現AAVプラスミド、並びに対照又はmiR-183の発現ベクターにより、293細胞を一過的に共トランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後にGFPタンパク質レベルを検出し、ウェスタンブロッティングでそのレベルを定量化した。実験は、3重で実施した。エラーバーは、標準偏差を示す。（図3B） 4×10^{12} gcの用量で、C57BL6/JマウスIVにAAV9、CB7、GFP対照ベクター又はAAV9、CB7、GFP-miRベクターを注入した。本発明者らは、miR-183、miR-145、及びmiR-182の3つのDRG濃縮miRをスクリーニングした。注入から2週間後にDRGを採取し、IHCを使用してGFPについて染色した。ImageJ細胞計数ツールを使用して、総DRGニューロンに対するGFP発現ニューロンのパーセンテージをカウントした。ウィルコクソン検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。（図3C）ここでは、パネル図3Bで定量化されたDRG由来のGFP免疫染色の代表的な写真を示す。（図3D）C57BL6/Jマウスに、IVでAAV-PHP.B、CB7、GFP対照ベクター又はAAV-PHP.B、CB7、GFP-miR（miR-183、miR-145、miR-182）を注入した。注入の3週間後、蛍光顕微鏡を使用して直接GFP観察のために、CNS及び肝臓を回収した。ここでは、小脳、皮質、及び肝臓の代表的な写真を示す。

【図4A-4C】NHPへのAAVhu68、GFPのICM投与後、DRGにおけるGFP発現を特異的にサイレンシングし、毒性を減少させるmiR-183標的を示す。本発明者らは、成体アカゲザルにICMを、 3.5×10^{13} GCのAAVhu68、CB7、GFP対照ベクター（ $n=2$ ；それぞれ1匹の雄、1匹の雌、5～8歳）又はAAVhu68、CB7、GFP-miR-183（ $n=4$ 、4匹の雌、5～6歳）で注入した。注入の2週間後、半数の動物を、GFP発現分析のために犠牲にし、注入の2ヶ月後、残りの半数を、GFP発現及び組織病理のために犠牲にした。（図4A）ベクター投与の2週間後の、DRG、脊髄運動ニューロン、小脳、皮質、心臓、及び肝臓のGFP免疫染色切片の代表的な写真。（図4B）NHPのDRG（感覚ニューロン）、脊髄（下位運動ニューロン）、小脳、及び皮質におけるGFP陽性細胞の定量化（ $n=2$ ：AAV、GFP、 $n=4$ ：AAV、GFP-miR-183）。DRGについて、動物当たり少なくとも2つの腰部DRG切片を定量化し、動物当たり少なくとも300個のニューロンを表した。各データポイントは、1つの異なる切片を表す。小脳及び皮質については、ImageJ細胞計数ツールを使用して、領域及び動物当たり最小5箇所の20倍の倍率視野を定量化した。平均値として示されるデータ；エラーバーは、標準偏差を示す。ウィルコクソン検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。（図4C）注入の2ヶ月後の組織病理では、背側脊髄軸索障害、末梢神経軸索障害（正中神経、腓骨神経及び橈骨神経）、並びにDRG神経変性及び単核浸潤の重症度グレードを示す。ベクター群に対して盲検化された委員会認定の獣医病理学者が、以下のように定義された重症度グレ

10

20

30

40

50

ードを確立した：1 最小（10%未満）、2 軽度（10～25%）、3 中等度（25～50%）、4 顕著（50～95%）、及び5 重度（95%超、観察されなかった）。各バーは、1匹の動物を表す。0は、病変の不在を表す。

【図5】NHPへのAAVhu68・hIDUAのICM投与後の、DRGにおけるhIDUAの発現を特異的にサイレンシングするmiR-183標的を示す。本発明者らは、成体アカゲザルにICMを、1) 1×10^{13} GCのAAVhu68・CB7・hIDUA対照ベクター（n=3、2匹の雌、1匹の雄、年齢2.5歳）、2) 予防的ステロイド処置を伴う、AAVhu68・CB7・hIDUA対照ベクター（-7日目～30日目まで1mg/kg/日のプレドニゾロン、続いて漸進的な漸減、n=3、3匹の雄、年齢2.5～3.5歳）、又は3) AAVhu68・CB7・hIDUA-miR-183（miR-183標的を含む）（n=3、2匹の雄、1匹の雌、年齢2.25～5歳）のいずれかで注入した。動物は、注入の3ヶ月後、導入遺伝子の発現及び組織病理を分析するために犠牲にされた。代表的な写真は、抗hIDUA抗体免疫蛍光（DRG、最初の行）、抗hIDUAのIHC（下位運動ニューロン、小脳、皮質）、及び抗IDUAのISH（DRG、最後の行）によるhIDUA発現の分析を示す。hIDUAのISH：曝露時間は、ステロイドの有無にかかわらず、AAVhu68・hIDUAに対して200msである。感覚ニューロンは、大量の導入遺伝子mRNAの発現を示す。AAV・hIDUA-miR-183に対する曝露時間は、1秒である。感覚ニューロンは、核及び細胞質において、低いISHシグナル（mRNA）を有する。mRNAは、このより長い曝露時間で、ニューロンを取り囲む衛星細胞において見ることができる。

【図6A-6C】miR-183媒介性サイレンシングがDRGニューロンに特異的であり、AAVhu68・hIDUAによりICMで処置されたNHPにおけるDRG毒性を、完全に阻止することを示す。（図6A）NHPのDRG（感覚ニューロン）、脊髄（下位運動ニューロン）、小脳、及び皮質における、hIDUA陽性細胞の定量化（群当たりn=3）。動物ごとに、領域当たり最小5箇所の20倍の倍率視野を定量化した。エラーバーは、標準偏差を表す。ウィルコクソン検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。（図6B）注入3ヶ月後の組織病理スコアリング：背側軸索障害累積スコア（頸部、胸部、及び腰部セグメントからの重症度グレードの合計-最大可能スコアは15）、DRG累積スコア（頸部、胸部、及び腰部セグメントからの重症度グレードの合計-最大可能スコアは15）、並びに中央値神経スコア（軸索障害及び線維症の重症度グレードの合計-最大可能スコアは10）。ベクター群に対して盲検化された委員会認定の獣医病理学者が、以下のように定義された重症度グレードを確立した：1 最小（10%未満）、2 軽度（10～25%）、3 中等度（25～50%）、4 顕著（50～95%）、及び5 重度（95%超、観察されなかった）。0は、病変の不在を表す。エラーバーは、標準偏差を表す。（図6C）hIDUA導入遺伝子特異的プローブ、高倍率のDRG感覚ニューロン及び衛星細胞を使用するISH、青色DAPIでの核の対比染色による1秒の曝露時間。矢印：DRG感覚ニューロン；矢じり：衛星細胞。

【図7A-7D】NHPのhIDUAに対するT細胞及び抗体応答を示す。成体アカゲザルに、ICMで、1) 1×10^{13} GCのAAVhu68・CB7・hIDUA対照ベクター（n=3）、2) 予防的ステロイド処置（-7日目～30日目まで1mg/kg/日のプレドニゾロン、続いて漸進的な漸減）を伴う、AAVhu68・CB7・hIDUA対照ベクター（n=3）、又は3) AAVhu68・CB7・hIDUA-miR-183（n=3）のいずれかを注入した。（図7A～図7C）注射の90日後に、PBMC、脾臓、肝臓、及び深部頸部リンパ節から単離されたリンパ球におけるインターフェロンガンマELISPOT応答。各動物は、異なるペプチドプールを表す3つの値を有する（hIDUA配列全体をカバーする3つの重複ペプチドプール）。赤色は、陽性ELISPOT応答を示し、スポット形成単位が106個のリンパ球当たり55超、及び未刺激時の培地陰性対照の3倍として定義される。（図7D）抗hIDUA抗体のELISAアッセイ、血清希釈は1：1,000。

【図8】CSFにおけるサイトカイン／ケモカインの濃度を示す。試料は、ベクターの投

与時点（0日目）、並びにベクターの投与後24時間（hour）（24時間（h））、21日（21日目）及び35日（35日目）に回収された。sCD137、エオタキシン、sFasL、FGF-2、フラクタルカイン、グランザイムA、グランザイムB、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-16、IL-17A、IL-17E/IL-25、IL-21、IL-22、IL-23、IL-28A、IL-31、IL-33、IP-10、MIP-3 α 、パーフォリン、及びTNF β といった分析物を含有するMilliplex MAPキットからの濃度を示すヒートマップ。

【図9】NHPの脳、脊髄、及びDRGにおけるベクターの生体分布を示す。成体アカゲザルに、ICMで、1) 1×10^{13} GCのAAVhu68.CB7.hIDUA対照ベクター（n=3）、2) 予防的ステロイド処置（-7日目～30日目まで1mg/kg/日のプレドニゾロン、続いて漸進的な漸減）を伴う、AAVhu68.CB7.hIDUA対照ベクター（n=3）、又は3) AAVhu68.CB7.hIDUA-miR-183（n=3）のいずれかを注入した。QIAamp DNA MiniキットでNHP組織DNAを抽出した。Taqman試薬及びベクターのrBGポリアデニル化配列を標的とするプライマー／プローブを使用した、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応によって、ベクターゲノムを定量化した。結果は、二倍体ゲノム当たりのゲノムコピーで表現される。エラーバーは、標準偏差を表す。

【図10A-10B】AAV-IDUA又はAAV-IDUA-4XmiR-183の送達後のNHPにおけるmiR-183クラスター調節遺伝子発現の分析を伴うスポンジ効果に関する研究の結果を示す。図10Aは、後根神経節（DRG）におけるmiR-183クラスター調節遺伝子mRNA定量化を提供する。図10Bは、皮質の解析からの結果を提供する。miR-183クラスター調節遺伝子（CACNA2D1又はCACNA2D2）の発現の増加はなく、DRG（高miR-183存在量）又は前頭皮質（低miR-183存在量）のいずれかにおけるAAV-IDUA又はAAV-IDUA-miR-183処置動物を比較する。

【図11】低用量（ 5×10^5 ）又は高用量（ 2.5×10^8 ）での、miR-183脱標的化配列の4つのコピーを伴うか、又は伴わない、eGFP導入遺伝子を担持するAAV9ベクターによる形質導入の結果を示す。miR-183を伴わない低用量及び高用量を、100（低用量AAV9-eGFPの場合）又は10（高用量AAV9-eGFPの場合）の感染多重度（MOI）で、アデノウイルス5型（Ad5）ヘルパー共トランスフェクションを行うか、又は行わずに試験した。全てのDRGニューロンが形質導入され、毒性の目に見える徴候は観察されなかった。DRGニューロンにおいて、GFP発現は観察されなかったが、線維芽細胞様細胞において、ある程度の発現が観察された。この所見は、4XmiR-183標的発現カセットによるGFP転写の抑制を確認した。

【図12】ラットDRG細胞における「スポンジ効果」研究からの結果を示す。これらのデータは、細胞がAAV9-eGFP-183ベクターで形質導入されると、ラットDRG細胞におけるmiR-183レベルが減少することを示す。AAV9-eGFP-miR-183は、GFP-miR-183 mRNAに対するターゲットエンゲージメントを示す。

【図13A-13C】3つの既知のmiR-183調節転写産物の発現が決定された、ラットDRG細胞における「スポンジ効果」研究からの結果を示す。図13Aは、AAV-GFP又はAAV-GFP-miR-183ベクター（又はモックベクター対照）の投与後のラットDRG細胞におけるCACNA2D1の相対発現を示す。図13Bは、AAV-GFP又はAAV-GFP-miR-183ベクター（又はモックベクター対照）の投与後のラットDRG細胞におけるCACNA2D2の相対発現を示す。図13Cは、AAV-GFP又はAAV-GFP-miR-183ベクター（又はモックベクター対照）の投与後のラットDRG細胞におけるATF3の相対発現を示す。これらの3つのmiR-183調節転写産物のmRNAレベルに変化は観察されなかった。

【図14】神経解剖学的所見及び顕微鏡的所見を示す。DRGの神経細胞体（A）は、脊髄の上行性（感覚）背側白質路（C）及び末梢神経系（D）の中に軸索を中心に向かって

10

20

30

40

50

突出させる。(A1~D1) DRG病的状態に関連する顕微鏡的病変の神経解剖学的関係。DRGにおける神経細胞体変性(丸印、A1)は、神経根の中心及び末梢の両方に延びる軸索周囲線維症(水平の矢印、B1)を伴うか、又は伴わない軸索変性(垂直の矢印、B1)を引き起こす。DRG神経根における軸索変性は、軸索周囲線維症(水平の矢印、D1)を伴うか、又は伴わない、脊髄の上行性背側白質路(垂直の矢印、C1)及び末梢神経(垂直の矢印、D1)の中に中心に向かって延びる。(A2~D2)正常なDRG、DRG神経根、脊髄の背側白質及び末梢神経。(ヘマトキシリン及びエオシン; 20倍、スケールバー=100 µm)。(E~H) DRG病的状態の様々な段階の高倍率画像。(E)変性プロセスの初期に、神経細胞体は、ミクログリア細胞及び浸潤する単核細胞(神経貪食)とともに、増殖する衛星細胞のみを含み、比較的正常であるように見える(丸印)。(F)病変が進行するにつれて、神経細胞体は、消えかけている核を有するか、又は核が存在せず、細胞質高酸素血症を有する、小さな不規則形状若しくは鋭角を有する形状の細胞によって特徴付けられる、変性の証拠(垂直の矢印)を示す。(G)神経細胞体変性(丸印)は、衛星細胞、ミクログリア細胞及び単核細胞による完全な消失を引き起こす場合があり(星形)、これは、末期の変性と考えられる。(H)正常なDRG。(ヘマトキシリン及びエオシン; 40倍、スケールバー=50 µm)。

【図15A-15D】DRG病的状態の重症度に対する研究の特徴の効果を示す。異なる(図15A)投与経路、(図15B)ベクター用量、(図15C)組織収集のための注射後の時間、及び(図15D)GLPガイドラインに準拠した研究実施による、DRG(黒色)及び背側脊髄(SC)軸索(灰色)における平均病的状態スコア。平均の標準誤差を伴う平均結果、表は、各群における動物の数(n)及びスコアリングされた組織学的切片の数(カウント)を示す。群間の比較は、各DRG並びに脊髄領域(すなわち、頸部、胸部、腰部)内のウィルコクソンの順位和検定を使用して行われ、組み合わせたp値は、0.05レベルで評価された統計学的有意性を有するフィッシャー法を使用して、全体的なDRG又は脊髄群間比較について算出された。*は、群間比較の有意性を示し、#は、ビヒクル対照群との比較のための有意性を示し(図15A)、又は(図15C)180+日時点との比較のための有意性を示す。*、# p<0.05; **、## p<0.01; ***、### p<0.001; ****、#### p<0.0001。統計記号の色コード: DRGは黒、SCは灰色。

【図16A-16B】DRG病的状態の重症度に対する動物の特徴の効果を示す。(図16A)注射時の動物の年齢が異なる、及び(図16B)動物の性別が異なる(アカゲザルのみ)、DRG(黒色)及び背側脊髄(SC)軸索(灰色)における平均病的状態スコア。平均の標準誤差を伴う平均結果、表は、各群における動物の数(n)及びスコアリングされた組織学的切片の数(カウント)を示す。群間の比較は、各DRG並びに脊髄領域(すなわち、頸部、胸部、腰部)内のウィルコクソンの順位和検定を使用して行われ、組み合わせたp値は、0.05レベルで評価された統計学的有意性を有するフィッシャー法を使用して、全体的なDRG又は脊髄群間比較について算出された。図16Aについて、*は、群間比較のための有意性を示し、#は、乳幼児群との比較のための有意性を示す。*、# p<0.05; **、## p<0.01; ***、### p<0.001; ****、#### p<0.0001。統計記号の色コード: DRGは黒、SCは灰色。

【図17A-17D】DRG病的状態の重症度に対するベクターの特徴の効果を示す。異なる(図17A)カプシド、(図17B)プロモーター、及び(図17C)導入遺伝子、並びに非分泌型導入遺伝子に対する分泌型導入遺伝子(図17D)による、DRG(黒色)及び背側脊髄(SC)軸索(灰色)における平均病的状態スコア。導入遺伝子は、SC病的状態の重症度に基づいて、1~20に並べられた。平均の標準誤差を伴う平均結果、表は、各群における動物の数(n)及びスコアリングされた組織学的切片の数(カウント)を示す。(図17A、図17B、及び図17D)群間の比較は、各DRG並びに脊髄領域(すなわち、頸部、胸部、腰部)内のウィルコクソンの順位和検定を使用して行われ、組み合わせたp値は、0.05レベルで評価された統計学的有意性を有するフィッシャー法を使用して、全体的なDRG又は脊髄群間比較について算出された。*は、群間比較のた

めの有意性を示す： $* p < 0.05$ ； $** p < 0.01$ ； $*** p < 0.001$ ； $**** p < 0.0001$ 。統計記号の色コード：DRGは黒、SCは灰色。一部の群では小さなnのため、導入遺伝子比較のための統計分析は実施されなかった。

【図18】重症度グレードの分布を伴う領域的病的状态スコアを示す。平均の標準誤差（赤色の点及び棒）並びに領域ごとの重症度グレードの分布（積み上げ棒グラフ（stacked column））を伴う、病的状态スコアの平均パーセンテージの割合。表は、各群における動物の数（n）及びスコアリングされた組織学的切片の数（カウント）を示す。平均値間の比較は、TRGとDRG、並びにDRGとSCのそれぞれの領域（すなわち、頸部、胸部、腰部）間のウィルコクソンの順位和検定を使用して行った。統計学的有意性は、0.05レベルで評価した。 $*$ は、三叉神経の神経節（TRG）とDRGとの比較の有意性を示し、 $\#$ は、DRGとSCの領域ごとの比較のための有意性を示す。 $** p < 0.01$ ； $\#\#\#\# p < 0.0001$ 。

10

【図19A-19B】末梢神経の病的状态を示す。平均の標準誤差（赤色の点、及び棒）並びに末梢神経ごとの重症度グレードの分布（積み上げ棒グラフ）を伴う、病的状态スコアの平均パーセンテージの割合。表は、各群における動物の数（n）及びスコアリングされた組織学的切片の数（カウント）を示す。一部の末梢神経は大部分の研究で収集されなかったため、統計分析は実施されなかった。

【図20A-20D】脊髄領域ごとに分けられた、DRG病的状态の重症度に対する研究の特徴の効果を示す。異なる（図20A）投与経路、（図20B）ベクター用量、（図20C）組織収集のための注射後の時間、及び（図20D）GLPガイドラインに準拠した研究実施による、DRG（黒色）及び背側脊髄（SC）軸索（灰色）領域における平均病的状态スコア。平均の標準誤差を伴う平均結果；表は、各群における動物の数（n）及びスコアリングされた組織学的切片の数（カウント）を示す。C＝頸部、T＝胸部、L＝腰部領域。

20

【図21A-21B】脊髄領域ごとに分けられた、DRG病的状态の重症度に対する動物の特徴の効果を示す。（図21A）注射時の動物の年齢が異なる、及び（図21B）動物の性別が異なる（アカゲザルのみ）、DRG（黒色）及び背側脊髄（SC）軸索（灰色）領域における平均病的状态スコア。平均の標準誤差を伴う平均結果；表は、各群における動物の数（n）及びスコアリングされた組織学的切片の数（カウント）を示す。C＝頸部、T＝胸部、L＝腰部領域。

30

【図22A-22C】脊髄領域ごとに分けられた、DRG病的状态の重症度に対するベクターの特徴の効果を示す。異なる（図22A）カプシド、（図22B）プロモーター、及び（図22C）導入遺伝子による、DRG（黒色）及び背側脊髄（SC）軸索（灰色）領域における平均病的状态スコア。導入遺伝子は、SC病的状态の重症度に基づいて、1～20に並べられた。平均の標準誤差を伴う平均結果、表は、各群における動物の数（n）及びスコアリングされた組織学的切片の数（カウント）を示す。C＝頸部、T＝胸部、L＝腰部領域。

【図23】脊髄領域ごとのDRG病的状态の重症度に対する、分泌型対非分泌型導入遺伝子の効果を示す。分泌型又は非分泌型導入遺伝子を有するDRG（黒色）及び背側脊髄軸索（灰色）領域における平均病的状态スコア。平均の標準誤差を伴う平均結果、表は、各群における動物の数（n）及びスコアリングされた組織学的切片の数（カウント）を示す。C＝頸部、T＝胸部、L＝腰部領域。

40

【図24】脳皮質におけるGFP発現を示す。C57BL6/Jマウスに、 1×10^{12} GCの用量、群当たりn＝4で、AAV-PHP.B.GFP対照ベクター又はAAV-PHP.B.GFP-miR標的ベクターをIV注射した。

【図25A-25C】miR-183、miR-182、又はmiR-145標的配列を有するAAV9.GFPベクターの投与後のGFP発現を示す。C57BL6/Jマウスに、 4×10^{12} GCのGFPをコードするベクターを、群当たりn＝3～4で、miR-183標的のタンデムリピート（4回リピート）（AAV9.CB7.CI.eGFP.miR-183.rBG）、miR-182標的（4回リピート）（AAV9.CB7

50

・C I . e G F P . m i R - 1 4 5 . r B G) 、 m i R - 1 4 5 標的 (4 回リピート) (A A V 9 . C B 7 . C I . e G F P . m i R - 1 8 2 . r B G) 、又は m i R 標的対照なし (A A V 9 . C B 7 . C I . e G F P . r B G) を I V 注射した。 m i R - 1 4 5 標的で修飾されたベクターは、 m i R 標的配列を有しない対照ベクターと比較して、心臓組織における G F P 発現の減少を示した。 4 × m i R - 1 8 3 標的配列で修飾されたベクターは、 m i R 標的及び m i R - 1 4 5 標的ベクターを有しないベクターと比較して、心臓組織における G F P 発現の増加を示した。 m i R - 1 8 3 標的配列を有するベクターは、 m i R - 1 4 5 標的配列を有するベクター及び m i R 標的配列を有しないベクターと比較して、脳皮質及び脳幹における G F P 発現の増加を示した。

【図 2 5 D】図 2 5 A ~ 図 2 5 C に示す結果からの G F P 直接蛍光強度の定量化を示す。一元配置分散分析、次いで、テューキーの多重比較検定。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

【図 2 6 A】H C T 1 1 6 細胞における m i R - 9 6、m i R - 1 8 2、及び m i R - 1 8 3 の発現を示す。発現は、m i R - 9 6 に対して示される。

【図 2 6 B】Neuro 2 a (N 2 A) 細胞における発現レベルと比較して、H C T 1 1 6 細胞における m i R - 1 8 2 及び m i R - 1 8 3 の発現を示す。

【図 2 6 C】H C T 1 1 6、ラット D R G、アカゲザル (R H) - D R G、及びヒト (H U) - D R G 細胞における m i R - 9 6、m i R - 1 8 2、及び m i R - 1 8 3 の相対的発現レベルを示す。発現レベルは、H C T 1 1 6 細胞における m i R - 9 6 と比較して示される。

【図 2 7 A - 2 7 D】A A 9 . G F P ベクターでの形質導入後の H C T 1 1 6 細胞における G F P 発現の評価を示し、m i R - 1 8 3 標的配列 (A A V . C B 7 . C I . e G F P . m i R - 1 8 2 (1 × ~ 8 ×) . r B G)、4 × m i R - 1 8 2 標的配列 (A A V . C B 7 . C I . e G F P . m i R - 1 8 2 (4 ×) . r B G)、又は 4 × m i R - 1 8 2 標的配列 + 4 × m i R - 1 8 3 標的配列 (A A V . C B 7 . C I . e G F P . m i R - 1 8 2 (4 ×) . m i R - 1 8 3 (4 ×) . r B G) の増加した数を有する (1 × ~ 8 ×)。図 2 7 A は蛍光顕微鏡法を示し、図 2 7 B は形質導入された細胞のフローサイトメトリー分析を示す。図 2 7 C 及び図 2 7 D は、図 2 7 B に提供されるように、フローサイトメトリー分析からの結果の定量化を示す。

【図 2 8 A - 2 8 J】導入遺伝子発現に対する m i R 標的配列の効果を評価するためのマウス研究の結果を示す。A A V h u 6 8 . G F P (m i R 標的配列なし)、A A V h u 6 8 . G F P - m i R - 1 8 3 (4 ×)、A A V h u 6 8 . G F P - m i R - 1 8 2 (4 ×)、及び A A V h u 6 8 . G F P - m i R - 1 8 2 - m i R - 1 8 3 (4 × + 4 ×) ベクターに、I V (4 × 1 0¹² G C) 又は I C V (1 × 1 0¹¹ G C) を投与した。投与の 4 週間後に、マウスを犠牲にした。(図 2 8 A 及び図 2 8 B) D R G における導入遺伝子 (G F P) 発現のための I H C 及び所見の定量化。(図 2 8 C ~ 図 2 8 E) 脳及び脊髄における導入遺伝子 (G F P) 発現のための I H C 及び所見の定量化。(図 2 8 F ~ 図 2 8 J) 肝臓、腎臓、心臓、及び大腿四頭筋における導入遺伝子 (G F P) 発現のための I H C、並びに所見の定量化。

【図 2 9 A - 2 9 D】導入遺伝子発現の m i R 標的配列の効果を評価するための N H P 研究の結果を示す。A A V h u 6 8 . G F P (m i R 標的配列なし)、A A V h u 6 8 . G F P - m i R - 1 8 2 (4 ×)、及び A A V h u 6 8 . G F P - m i R - 1 8 2 - m i R - 1 8 3 (4 × + 4 ×) ベクターに、I C M (3 × 1 0¹³ G C) を投与した。投与の 5 週間後に、動物を犠牲にした。(図 2 9 A) 頸部、胸部、及び腰部領域からの D R G (図 2 9 A) 及び脊髄 (図 2 9 B) における導入遺伝子 (G F P) 発現のための I H C。(図 2 9 C 及び図 2 9 D) D R G 毒性 / 二次軸索障害のスコアリング。 m i R 標的配列を有するベクターは、G F P 発現の同様のサイレンシング及び病的状態の低減を示した。

【図 3 0 A - 3 0 C】複数の研究にわたる、対照動物 (ナイーブ及び I C M ビヒクル投与) におけるバックグラウンド D R G / T R G (図 3 0 A)、脊髄 (図 3 0 B)、及び末梢神経 (図 3 0 C) 所見の発生率及び重症度を示す。

【図 3 1 A - 3 1 B】複数の研究にわたって、既存対照動物（ナীব及び I C M ビヒクル投与）におけるバックグラウンド D R G 毒性の発生率及び重症度を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書に提供される組成物及び方法は、m i R N A 標的配列の使用を通じて D R G ニューロンにおける導入遺伝子の発現を抑制するための遺伝子送達の療法に有用である。本明細書で使用される場合、「抑制」という用語は、導入遺伝子発現の部分的な低減、又は完全な消滅、又はサイレンシングを含む。導入遺伝子発現は、選択された導入遺伝子に好適なアッセイを使用して評価されてもよい。提供される組成物及び方法は、神経変性、二次背側脊髄軸索変性、及び／又は単核細胞浸潤によって特徴付けられる D R G の毒性を減少させる。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、遺伝子産物コード配列の 3' 側の非翻訳領域（U T R）に、m i R N A 標的配列を含む。本明細書に提供されるように、発現カセット又はベクターゲノムは、少なくとも 8 つの m i R 標的配列を含む。特定の実施形態では、各標的配列は、独立して選択され、m i R - 1 8 3 又は m i R - 1 8 2 に特異的である。特定の実施形態では、発現カセットは、4 つの独立して選択された m i R - 1 8 3 標的配列と、4 つの独立して選択された m i R - 1 8 2 標的配列とを含み、m i R 標的配列は、コード配列の 3' 末端に作動可能に連結される。他の実施形態では、発現カセットは、8 つの m i R - 1 8 3 標的配列又は 8 つの m i R - 1 8 3 標的配列を含む。本明細書に記載されるように、m i R 配列の他の組み合わせを選択してもよい。好適には、2 つ以上の m i R N A 標的配列がタンデムで提供され、任意選択的に、スパーサー配列によって分離される。特定の実施形態では、3 つ以上の m i R N A 標的配列がタンデムで提供され、任意選択的に、スパーサー配列によって分離される。特定の実施形態では、8 個の m i R N A 配列がタンデムで提供され、任意選択的に、スパーサー配列によって分離される。様々な送達システムは、対象（例えば、ヒト患者）に発現カセットを送達するために使用され得る。かかる送達系は、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、又は非ベクターベースの系（例えば、リポソーム、裸の D N A、裸の R N A など）であってもよい。これらの送達系は、中枢神経系（C N S）、末梢神経系（P N S）、又は静脈内若しくは代替の送達経路に直接送達するために使用され得る。他の実施形態では、これらの組成物及び方法は、遺伝子療法ベクター（例えば、r A A V）の全身送達のために使用される。特定の実施形態では、これらの組成物及び方法は、高用量のベクター（例えば、r A A V）が送達される場合に有用である。特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物及び方法は、低減された用量、低減された長さ、及び／又は低減された数の免疫調節物質が、遺伝子療法ベクター（例えば、r A A V 媒介性遺伝子療法）と同時投与されることを可能にする。特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物及び方法は、ウイルスベクター（例えば、r A A V）の投与前、投与時、及び／又は投与後に、免疫抑制剤又は免疫調節療法を同時投与する必要性を排除する。

【0016】

「5' U T R」は、遺伝子産物のコード配列の開始コドンの上流にある。5' U T R は、一般に、3' U T R よりも短い。一般に、5' U T R は、約 3 ヌクレオチド長～約 2 0 0 ヌクレオチド長であるが、任意選択的に、より長くてもよい。

【0017】

「3' U T R」は、遺伝子産物のコード配列の下流にあり、一般に、5' U T R よりも長い。特定の実施形態では、3' U T R は、約 2 0 0 ヌクレオチド長～約 8 0 0 ヌクレオチド長であるが、任意選択的に、より長くても、又はより短くてもよい。

【0018】

本明細書で使用される場合、「m i R N A」又は「m i R」は、マイクロ R N A を指し、それは、m R N A を調節し、タンパク質へのその翻訳を低減する小さな非コード R N A 分子である。m i R N A は、ヌクレオチドの領域である「シード配列」を含み、相補的な塩基対形成によって m R N A に特異的に結合し、m R N A の破壊又はサイレンシングをもたらす。特定の実施形態では、シード配列は、成熟 m i R N A に位置し（5' から 3' へ）

、一般に、miRNAの2～7位又は2～8位（センス（+）鎖の5'末端から）に位置するが、鎖長よりも長くてもよい。特定の実施形態では、シード配列の長さは、miRNA配列の長さの約30%以上であり、少なくとも7ヌクレオチド～約28ヌクレオチド長、少なくとも8ヌクレオチド～約28ヌクレオチド長、7ヌクレオチド～28ヌクレオチド長、8ヌクレオチド～18ヌクレオチド長、12ヌクレオチド～28ヌクレオチド長、約20～約26ヌクレオチド、約22ヌクレオチド、約24ヌクレオチド、又は約26ヌクレオチドであり得る。

【0019】

本明細書で使用される場合、「miRNA標的配列」又は「miR標的配列」は、DNAプラス鎖上に位置する配列（5'から3'へ）であり、miRNAシード配列を含むmiRNA配列に少なくとも部分的に相補的である。miRNA標的配列は、コードされた導入遺伝子産物の非翻訳領域に対して外因性であり、導入遺伝子発現の抑制が所望される細胞で、miRNAによって特異的に標的化されるように設計される。「miR-183クラスター標的配列」という用語は、miR-183、-96及び-182（Dambal, S. et al. Nucleic Acids Res 43:7173-7188, 2015によって記載されている、参照により本明細書に援用されるもの）を含む、miR-183クラスター（代替的にファミリーと称される）のうちの1つ以上のメンバーに応答する標的配列を指す。理論に束縛されることを意図するものではないが、導入遺伝子（遺伝子産物をコードする）のメッセンジャーRNA（mRNA）は、miRNAを含有する発現カセットが送達される細胞型に存在し、その結果、3'UTR miRNAの標的配列に対するmiRNAの特異的結合が、mRNAのサイレンシング及び切断を引き起こし、それによって、miRNAを発現する細胞においてのみ、導入遺伝子の発現が低減又は排除される。

【0020】

典型的には、miRNA標的配列は、少なくとも7ヌクレオチド～約28ヌクレオチド長、少なくとも8ヌクレオチド～約28ヌクレオチド長、7ヌクレオチド～28ヌクレオチド、8ヌクレオチド～18ヌクレオチド長、約12～約28ヌクレオチド長、約20～約26ヌクレオチド、約22ヌクレオチド、約24ヌクレオチド、又は約26ヌクレオチドであり、miRNAシード配列に相補的である少なくとも1つの連続領域（例えば、7又は8ヌクレオチド）を含有する。特定の実施形態では、標的配列は、miRNAシード配列と正確な相補性（100%）を有する配列、又はmiRNAシード配列といくつかのミスマッチを含む部分的な相補性を有する配列を含む。特定の実施形態では、標的配列は、miRNAシード配列と100%相補的である少なくとも7～8のヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、標的配列は、miRNAシード配列と100%相補的である配列からなる。特定の実施形態では、標的配列は、シード配列と100%相補的である配列の複数コピー（例えば、2又は3コピー）を含む。特定の実施形態では、100%相補性の領域は、標的配列の長さの少なくとも30%を含む。特定の実施形態では、標的配列の残部は、miRNAに対して少なくとも約80%～約99%の相補性を有する。特定の実施形態では、DNAプラス鎖を含む発現カセットでは、miRNA標的配列は、miRNAの逆相補である。

【0021】

特定の実施形態では、操作された発現カセット又はベクターゲノムが、本明細書に提供され、DRGにおける導入遺伝子の発現を抑制するために、並びに／又はDRG毒性及び／若しくは軸索障害を低減若しくは排除するために、導入遺伝子に作動可能に連結されたmiR-183ファミリー又はクラスターのうちの1つ以上のメンバーを対象とする少なくとも1つのコピーのmiR標的配列を含む。特定の実施形態では、操作された発現カセット又はベクターゲノムは、複数のmiRNA標的配列を含み、miRNA標的配列の数が、DRG毒性及び／又は軸索障害を低減及び／又は排除するために、DRGにおける導入遺伝子の発現を低減又は最小化するのに十分であるようにする。発現カセット又はベクターゲノムは、任意の好適な担体系、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターを介して

、任意の経路を介して送達され得るが、髄腔内投与に特に有用である。

【0022】

本明細書で使用される場合、「髄腔内送達」又は「髄腔内投与」という用語は、脊柱管への、より詳細には、脳脊髄液（CSF）へ到達するようにクモ膜下腔空間内への注入を介した、投与経路を指す。髄腔内送達は、腰部穿刺、脳室内（側脳室内（ICV）を含む）、後頭下／槽内、及び／又はC1-2穿刺を含み得る。例えば、材料は、腰部穿刺の手段によって、クモ膜下腔全体に拡散させるために導入され得る。別の例では、大槽内への注射であってもよい。

【0023】

本明細書で使用される場合、「槽内送達」又は「槽内投与」という用語は、大槽小脳延髄（cisterna magna cerebellomedullaris）の脳脊髄液内への直接的な投与経路、より詳細には、後頭下穿刺を介した、又は大槽内への直接的な注入による、又は永久的に配置されたチューブを介した、投与経路を指す。

【0024】

意外にも、DRGにおける発現を抑制するための本明細書に記載のmiR-183標的配列を含む組成物は、これらに限定されないが、ニューロン（例えば、錐体細胞、プルキンエ細胞、顆粒細胞、紡錘細胞、及び介在神経細胞を含む）、又はグリア細胞（例えば、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、及び上衣細胞を含む）を含む、中枢神経系内の1つ以上の異なる細胞型（DRG以外）において増強された導入遺伝子発現を提供することが観察されている。この観察は、当初、髄腔内送達経路に従って行われたが、この発現増強効果は、CNS送達経路に限定されない。発現の増強は、静脈内送達後にも観察されており、他の経路、例えば、静脈内（例えば、特に高用量送達）、筋肉内（特に高用量送達）、又は他の全身送達経路を使用して達成されてもよい。特定の実施形態では、本明細書に記載のmiR-183標的配列を含む組成物は、心臓組織における導入遺伝子発現の増強を提供する（図24Aを参照）。例えば、本発明者らは、対照ベクターと比較して、miR-183標的含有ベクターを用いたDRGにおけるGFP発現の統計学的に有意な低減を観察したが、一方で、発現は、腰部運動ニューロン及び小脳で増強された。この強化された発現はまた、DRG並びに8つの他の領域にわたる病的状態の著しい低減、すなわち、頸部、胸部、及び腰部脊椎における背側脊髓軸索障害、並びに正中神経、腓骨神経及び橈骨神経の軸索障害と関連付けられた。

【0025】

特定の実施形態では、導入遺伝子のCNS発現の増強を回避するために（DRG発現を抑制しながら）、CNSを標的としない導入遺伝子を含む発現カセット用のmiR-182標的配列及び／又はmiR-96標的配列を選択したい場合がある。例えば、骨格筋又は肝臓への送達のための導入遺伝子を含む発現カセットは、CNS発現のいかなる増強も避けたいが、必要とされ得る高用量と関連し得るDRG毒性及び／又は軸索障害を防止し得る。

【0026】

特定の実施形態では、ベクターゲノム又は発現カセットは、miR-183の標的配列である少なくとも1つのmiRNA標的配列を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノム又は発現カセットは、

AGTGAATTCTACCAGTGCCATA

（配列番号1）を含むmiR-183標的配列を含む（miR-183シード配列に相補的な配列には、下線が引かれている）。特定の実施形態では、ベクターゲノム又は発現カセットは、miR-183シード配列に100%相補的な配列の2コピー以上（例えば、2又は3コピー）を含む。特定の実施形態では、miR-183標的配列は、約7ヌクレオチド〜約28ヌクレオチド長であり、miR-183シード配列に少なくとも100%相補的である少なくとも1つの領域を含む。特定の実施形態では、miR-183標的配

列は、配列番号1に部分的に相補的な配列を含有し、したがって、配列番号1にアラインメントさせた場合、1つ以上のミスマッチがある。特定の実施形態では、miR-183標的配列は、配列番号1にアラインメントさせた場合、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のミスマッチを有する配列を含み、ミスマッチは非連続であり得る。特定の実施形態では、miR-183標的配列は、100%相補性の領域を含み、また、miR-183標的配列の長さの少なくとも30%を含む。特定の実施形態では、100%相補性の領域は、miR-183シード配列と100%相補性を有する配列を含む。特定の実施形態では、miR-183標的配列の残部は、miR-183と少なくとも約80%~約99%相補性を有する。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、miR-183標的配列を含み、切断された配列番号1、すなわち、配列番号1の5'末端若しくは3'末端のいずれか又は両方で、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のヌクレオチドを欠く配列を含む。発現カセット又はベクターゲノムは、少なくとも8つのmiR標的配列を含む。特定の実施形態では、各標的配列は、独立して選択され、miR-183又はmiR-182に特異的である。特定の実施形態では、発現カセットは、4つの独立して選択されたmiR-183標的配列と、4つの独立して選択されたmiR-182標的配列とを含み、miR標的配列は、コード配列の3'末端に作動可能に連結される。他の実施形態では、発現カセットは、8つのmiR-183標的配列又は8つのmiR-183標的配列を含む。本明細書に記載されるように、miR配列の他の組み合わせを選択してもよい。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、導入遺伝子及び1つのmiR-183標的配列を含む。なお他の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、又は少なくとも7つのmiR-183若しくはmiR-182標的配列を含む。更に他の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、8つのmiR-183標的配列を含む。

10

20

30

40

50

【0027】

導入遺伝子及びmiR-182を含む組成物は、後根神経節毒性を最小化又は排除し、及び／又は軸索障害を防止することが観察されている。しかしながら、miR-182標的配列を含む発現カセット又はベクターゲノムは、この目的には有効であるが、意外にもmiR-183標的配列を有した複合体で見出されたように、CNS発現を増強することが観察されていない。したがって、これらの組成物は、遺伝子がCNS以外を標的とすることが望ましい場合がある。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムが、本明細書に提供され、1つ以上のmiR-183ファミリーの標的配列を含み、導入遺伝子を欠く（すなわち、miR-183ファミリーの標的配列（複数可）が、異種遺伝子産物をコードする配列に作動可能に連結されていない）。

【0028】

本明細書に提供されるように、発現カセット又はベクターゲノムは、少なくとも8つのmiR標的配列を含む。特定の実施形態では、各標的配列は、独立して選択され、miR-183又はmiR-182に特異的である。特定の実施形態では、発現カセットは、4つの独立して選択されたmiR-183標的配列と、4つの独立して選択されたmiR-182標的配列とを含み、miR標的配列は、コード配列の3'末端に作動可能に連結される。他の実施形態では、発現カセットは、8つのmiR-183標的配列又は8つのmiR-183標的配列を含む。本明細書に記載されるように、miR配列の他の組み合わせを選択してもよい。特定の実施形態では、ベクターゲノム又は発現カセットは、miR-182の標的配列である少なくとも1つのmiRNA標的配列を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノム又は発現カセットは、miR-182標的配列を含み、AGTGTGAGTTCTACCATTTGCCAAA（配列番号3）を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノム又は発現カセットは、miR-182シード配列に100%相補的である配列の2コピー以上（例えば、2又は3コピー）を含む。特定の実施形態では、miR-182標的配列は、約7ヌクレオチド~約28ヌクレオチド長であり、miR-182シード配列に少なくとも100%相補的である少なくとも1つの領域を含む。特定の実施形

態では、*miR-182* 標的配列は、配列番号 3 に部分的に相補的な配列を含有し、したがって、配列番号 3 とアラインメントさせた場合、1 つ以上のミスマッチがある。特定の実施形態では、*miR-183* 標的配列は、配列番号 3 とアラインメントさせた場合、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個のミスマッチを有する配列を含み、ミスマッチは非連続であり得る。特定の実施形態では、*miR-182* 標的配列は、100% 相補的な領域を含み、また、*miR-182* 標的配列の長さの少なくとも 30% を含む。特定の実施形態では、100% 相補性の領域は、*miR-182* シード配列と 100% 相補性を有する配列を含む。特定の実施形態では、*miR-182* 標的配列の残部は、*miR-182* と少なくとも約 80% ~ 約 99% 相補性を有する。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、*miR-182* 標的配列を含み、切断された配列番号 3 すなわち、配列番号 3 の 5' 末端若しくは 3' 末端のいずれか又は両方で、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 のヌクレオチドを欠く配列を含む。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、導入遺伝子と、1 つの *miR-182* 標的配列とを含む。更に他の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、少なくとも 2 つ、3 つ、又は 4 つの *miR-182* 標的配列を含む。

10

20

30

40

50

【0029】

特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、2 つ以上の連続する *miRNA* 標的配列を有し、連続的であり、スパーサーによって分離されていない。特定の実施形態では、*miRNA* 標的配列のうちの 2 つ以上は、スパーサーによって分離されている。特定の実施形態では、スパーサーは、約 1 ~ 約 12 ヌクレオチド、又は約 2 ~ 約 10 ヌクレオチド長、又は約 3 ~ 約 10 ヌクレオチド、約 4 ~ 約 6 ヌクレオチド長、又は 3、4、5、6、7、8、9、10、若しくは 11 ヌクレオチド長の非コード配列である。任意選択的に、単一の発現カセットは、3 つ以上の *miRNA* 標的配列を含んでもよく、任意選択的に、それらの間に異なるスパーサー配列を有する。特定の実施形態では、1 つ以上のスパーサーは、独立して、(i) *GGAT* (配列番号 5)、(ii) *CACGTG* (配列番号 6)、又は (iii) *GCATGC* (配列番号 7) から選択される。特定の実施形態では、スパーサーは、第 1 の *miRNA* 標的配列の 3' 及び／又は最後の *miRNA* 標的配列の 5' に位置する。特定の実施形態では、*miRNA* 標的配列間のスパーサーは同じである。

【0030】

特定の実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子と、1 つの *miR-183* 標的配列と、1 つ以上の異なる *miRNA* 標的配列とを含む。特定の実施形態では、発現カセットは、*miR-96* 標的配列：*mRNA* 及び *DNA* プラス鎖 (5' から 3' へ) *AGCAA A AATGTGCTAGTGCCAAA* (配列番号 2)、*miR-182* 標的配列：*mRNA* 及び *DNA* プラス鎖 (5' から 3' へ)：及び／又は *AGTGTGAGTTCTACCA TTGCCAAA* (配列番号 3) を含む。

【0031】

miR-145 は、文献では、脳に関連しているが、これまでの研究では、*miR-145* 標的配列は、後根神経節における導入遺伝子の発現の低減には効果がないことが示されている。*miR-145* 標的配列：*mRNA* 及び *DNA* プラス鎖 (5' から 3' へ)：A *GGGATTCCTGGGA A AACTGGAC* (配列番号 4)。

【0032】

本明細書に提供されるように、発現カセット及びベクターゲノムは、導入遺伝子を含み、標的細胞における導入遺伝子産物の発現を導く調節配列に作動可能に連結されるか、又はその制御下にある。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、導入遺伝子を含み、本明細書に提供される 1 つ以上の *miRNA* 標的配列に作動可能に連結される。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、複数の *miRNA* 標的配列を含むように設計される。*miRNA* 標的配列は、導入遺伝子の *UTR* に組み込まれる (すなわち、遺伝子のオープンリーディングフレームの 3' 又は下流)。

【0033】

「導入遺伝子」という用語は、標的細胞に挿入される外因性供給源からのDNA配列を指すように本明細書で使用される。導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質、又は他の産物をコードする導入遺伝子に隣接するベクター配列に対して異種のヌクレオチド配列である。核酸コード配列は、標的細胞中で産生される遺伝子の導入遺伝子転写、翻訳、及び／又は発現を可能にする様式で調節要素に作動可能に連結される。異種核酸配列（導入遺伝子）は、任意の生物に由来し得る。rAAVは、1つ以上の導入遺伝子を含み得る。特定の実施形態では、導入遺伝子は、遺伝子編集酵素（例えば、CRISPR-Cas酵素又はメガヌクレアーゼ）である。更なる実施形態では、導入遺伝子は、標的細胞ゲノムに導入される（「ノックインされる」）ヌクレオチド配列である。発現カセット又はベクターゲノムは、そのような導入遺伝子を単独で、又は遺伝子編集酵素をコードする配列と組み合わせて含有し得る。

10

【0034】

「タンデムリピート」という用語は、2つ以上の連続するmiRNA標的配列の存在を指すように本明細書で使用される。これらのmiRNA標的配列は、連続的であり得、すなわち、一方の3'末端が、介在配列なしで、次の配列の5'末端のすぐ上流にあるように、又はその逆で、互いの後に直接的に配置され得る。別の実施形態では、miRNA標的配列のうちの2つ以上が、短いスペーサー配列によって分離されている。

【0035】

本明細書で使用される場合、「スペーサー」としては、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチド長の任意の選択された核酸配列であり、2つ以上の連続するmiRNA標的配列の間に位置する。特定の実施形態では、スペーサーは、1～8ヌクレオチド長、2～7ヌクレオチド長、3～6ヌクレオチド長、4ヌクレオチド長、4～9ヌクレオチド、3～7ヌクレオチド、又はより長い数値である。好適には、スペーサーは、非コード配列である。特定の実施形態では、スペーサーは、4つの（4）ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、スペーサーは、GGATである。特定の実施形態では、スペーサーは、6つの（6）ヌクレオチドである。特定の実施形態では、スペーサーは、CACGTG又はGCATGCである。

20

【0036】

特定の実施形態では、タンデムリピートは、同じmiRNA標的配列の少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又はそれ以上を含有する。特定の実施形態では、タンデムリピートは、異なるものについて同じであり得る最大8個のmiRNA標的配列を含む。特定の実施形態では、発現カセットは、8つのmiR-183標的配列、例えば、配列番号27のベクターゲノムで提供されるように、スペーサー配列によって分離された7つの同一の標的配列、又は配列番号28のベクターゲノムで提供されるように、スペーサー配列によって分離された8つの同一の標的配列を含有する。特定の実施形態では、タンデムリピートは、少なくとも2つの異なるmiRNA標的配列、少なくとも3つの異なるmiRNA標的配列、又は少なくとも4つの異なるmiRNA標的配列などを含有する。特定の実施形態では、タンデムリピートは、2つ又は3つの同じmiRNA標的配列、及び異なる第4のmiRNA標的配列を含有してもよい。

30

40

【0037】

特定の実施形態では、発現カセットには、少なくとも2つの異なるセットのタンデムリピートが存在し得る。例えば、3'UTRは、導入遺伝子のすぐ下流のタンデム反復と、UTR配列と、UTRの3'末端に近接する2つ以上のタンデム反復と、を含み得る。別の例では、5'UTRは、1つ、2つ以上のmiRNA標的配列を含み得る。別の例では、3'は、タンデム反復を含有し得、5'UTRは、少なくとも1つのmiRNA標的配列を含有し得る。

【0038】

特定の実施形態では、発現カセットは、2つ、3つ、4つ、又はそれより多いタンデムリピートを含有し、導入遺伝子の終止コドンの約0～20ヌクレオチド以内に開始する。

50

他の実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子の終止コドンから少なくとも100～約4000のヌクレオチドでmiRNAタンデム反復を含む。

【0039】

「含む (comprising)」とは、他の構成要素又は方法ステップを含むことを意味する用語である。「含む (comprising)」が使用される場合、関連する実施形態は、他の構成要素又は方法ステップを除外する「からなる (consisting of)」という用語、及び実施形態又は発明の性質を実質的に変化させる任意の構成要素又は方法ステップを除外する「本質的にからなる (consisting essentially of)」という用語を使用する記述を含むことを理解されたい。本明細書の様々な実施形態は、「含む (comprising)」という言葉を用いて示されているが、様々な状況下では、関連する実施形態は、「からなる (consisting of)」又は「本質的にからなる (consisting essentially of)」という言葉を使用して記載されることも理解されるべきである。

10

【0040】

「a」又は「an」という用語は、1つ以上を指し、例えば、「ベクター (a vector)」は、1つ以上のベクターを表すことを留意されたい。したがって、「a」(又は「an」)、「1つ以上 (one or more)」、及び「少なくとも1つ (at least one)」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0041】

本明細書で使用される場合、「約 (about)」という用語は、別途指定されない限り、与えられた参照からプラス又はマイナス10%の可変性を意味する。

20

【0042】

1. 発現カセット

本明細書に記載される「発現カセット」は、標的細胞におけるその発現を誘導する調節配列及びUTRのmiRNA標的配列に作動可能に連結された機能的な遺伝子産物をコードする核酸配列を含む。本明細書に記載されるように、miRNA標的配列は、導入遺伝子の発現が望ましくない及び／又は導入遺伝子の発現レベルの低減が所望される細胞に存在するmiRNAによって、特異的に認識されるように設計される。特定の実施形態では、miRNA標的配列は、後根神経節における導入遺伝子の発現を特異的に低減する。特定の実施形態では、miRNA標的配列は、3'UTR、5'UTR、及び／又は3'UTR及び5'UTRの両方に位置する。本明細書に見出されるmiRNA標的配列の考察は、参照により本明細書に援用される。

30

【0043】

一実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子産物のDRG発現を低減又は排除しながら、ヒト対象における発現のために設計される。一実施形態では、発現カセットは、脳脊髄液及び脳を含む中枢神経系(CNS)における発現のために設計される。特定の実施形態では、発現カセット又はベクターゲノムは、神経細胞(錐体細胞、プルキンエ細胞、顆粒細胞、紡錘細胞、及び介在神経細胞など)並びにグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、及び上皮細胞など)を含む、CNSに存在する1つ以上の細胞型(後根神経節を除く)における導入遺伝子の発現又は増強された発現のために設計される。特定の実施形態では、導入遺伝子の発現の増強は、1つ以上の細胞型で達成され、CNSの別の細胞型における導入遺伝子の発現がほとんど又は全くない。特定の実施形態では、発現カセットは、CNSの細胞以外の細胞での発現に有用である。

40

【0044】

本明細書で使用される場合、「発現」又は「遺伝子発現」という用語は、遺伝子からの情報が、機能的な遺伝子産物の合成に使用されるプロセスを指す。遺伝子産物は、タンパク質、ペプチド、又は核酸ポリマー(RNA、DNA、又はPNAなど)であり得る。

【0045】

本明細書で使用される場合、「調節配列」又は「発現制御配列」という用語は、イニシエーター配列、エンハンサー配列、及びプロモーター配列などの核酸配列を指し、それら

50

が操作可能に連結されるタンパク質コード核酸配列の転写を誘導するか、抑制するか、さもなければ制御する。

【0046】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結される」という用語は、遺伝子産物をコードする核酸配列に連続している発現制御配列、及び／又はその転写及び発現をトランスで若しくは離れて作用する両方の発現制御配列を指す。

【0047】

核酸配列又はタンパク質を説明するために使用される「外因性」という用語は、核酸又はタンパク質が、染色体又は宿主細胞に存在する位置では、天然に発生しないことを意味する。外因性核酸配列はまた、同じ宿主細胞又は対象に由来し、それらに挿入されるが、非天然状態（例えば、異なるコピー数、又は異なる調節エレメントの制御下）で存在する配列を指す。

【0048】

核酸配列又はタンパク質を説明するために使用される場合、「異種」という用語は、核酸又はタンパク質が、それが発現される宿主細胞若しくは対象とは異なる生物又は同じ生物の異なる種に由来したことを意味する。「異種」という用語は、タンパク質、又はプラスミド、発現カセット、若しくはベクターにおける核酸に関連して使用される場合、タンパク質又は核酸は、当該タンパク質又は核酸が天然には互いに同じ関係で認められない別の配列若しくはサブ配列で存在することを示す。

【0049】

一実施形態では、調節配列は、プロモーターを含む。一実施形態では、プロモーターは、ニフトリβ-アクチンプロモーターである。更なる実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス最初期エンハンサー及びニフトリβ-アクチンプロモーター（CB7プロモーター）のハイブリッドである。別の実施形態では、好適なプロモーターとしては、限定されないが、伸長因子1アルファ（EF1アルファ）プロモーター（例えば、Kim DW et al, Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene. 1990 Jul 16; 91 (2): 217-23を参照されたい）、シナプシン1プロモーター（例えば、Kugler S et al, Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. Gene Ther. 2003 Feb; 10 (4): 337-47を参照されたい）、神経特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター（例えば、Kim J et al, Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. Endocrinology. 2004 Feb; 145 (2): 613-9. Epub 2003 Oct 16を参照されたい）、又はCB6プロモーター（例えば、Large-Scale Production of Adeno-Associate Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene, Mol Biotechnol. 2016 Jan; 58 (1): 30-6. doi: 10.1007/s12033-015-9899-5を参照されたい）が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0050】

好適なプロモーターを選択することができ、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、又は誘導性／調節性プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。構成的

10

20

30

40

50

プロモーターの例は、ニワトリベーターアクチンプロモーターである。様々なニワトリベーターアクチンプロモーターが単独で、又は様々なエンハンサーエレメント（例えば、CB7は、サイトメガロウイルスエンハンサーエレメントを有するニワトリベーターアクチンプロモーターであるCAGプロモーターであり、プロモーターと、ニワトリベーターアクチンの第1のエキソン及び第1のイントロンと、ウサギベーターグロビン遺伝子のスプライスアクセプターとを含む、CBhプロモーターと組み合わせて記載されている、S J Gray et al, Hu Gene Ther, 2011 Sep; 22 (9) : 1143-1153）。組織特異的であるプロモーターの例は、肝臓（アルブミン、Miyatake et al., (1997) J. Virol., 71: 5124-32; B型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandig et al., (1996) Gene Ther., 3: 1002-9; アルファ-フェトプロテイン (AFP) : Arbut hnot et al., (1996) Hum. Gene Ther., 7: 1503-14）、ニューロン（ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) プロモーター、Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol., 13: 503-15; ニューロフィラメント軽鎖遺伝子、Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5611-5; 及びニューロン特異的vgf遺伝子: Piccioli et al., (1995) Neuron, 15: 373-84）、並びに他の組織について周知である。代替的には、調節可能なプロモーターが選択されてもよい。例えば、WO2011/126808B2を参照されたい（参照により本明細書に援用される）。

10

20

【0051】

一実施形態では、調節配列は、エンハンサーを更に含む。一実施形態では、調節配列は、1つのエンハンサーを含む。別の実施形態では、調節配列は、2つ以上の発現エンハンサーを含む。これらのエンハンサーは、同じであり得るか、又は異なり得る。例えば、エンハンサーは、アルファmic/bikエンハンサー、又はCMVエンハンサーを含んでもよい。このエンハンサーは、互いに隣接して位置する2つのコピー中に存在し得る。代替的に、エンハンサーの二重コピーは、1つ以上の配列によって分離される。

【0052】

一実施形態では、調節配列は、イントロンを更に含む。更なる実施形態では、イントロンは、ニワトリベーターアクチンイントロンである。他の好適なイントロンには、当該技術分野で既知のものが含まれ、ヒトβ-グロブリンイントロン、及び／又は市販のPromega（登録商標）イントロン、並びにWO2011/126808に記載のものであり得る。

30

【0053】

一実施形態では、調節配列は、ポリアデニル化シグナル（ポリA）を更に含む。更なる実施形態では、ポリAは、ウサギグロビンポリAである。例えば、WO2014/151341を参照されたい。代替的には、別のポリA、例えば、ヒト成長ホルモン（hGH）ポリアデニル化配列、SV40ポリA、又は合成ポリAが、発現カセットに含まれ得る。

【0054】

発現カセットは、任意の好適な非ウイルスベクター送達系を介して、又は好適なウイルスベクターによって送達され得る。好適な非ウイルスベクター送達系は、当該技術分野において既知であり（例えば、Ramamoorth and Narvekar. J Clin Diagn Res. 2015 Jan; 9 (1) : GE01-GE06、参照により本明細書に援用される）、当業者によって容易に選択され得、例えば、裸のDNA、裸のRNA、デンドリマー、PLGA、ポリメタクリレート、無機粒子、脂質粒子、ポリマーベースのベクター、又はキトサンベースの製剤を含み得る。

40

【0055】

発現カセットの記載が、本明細書にわたって記載される他の組成物、レジメン、態様、実施形態及び方法に適用されるように意図されることを理解されたい。

【0056】

50

2. ベクター

本明細書で使用される「ベクター」は、核酸配列を含む生物学的又は化学的部分であり、核酸配列の複製又は発現のために適切な標的細胞に導入され得る。ベクターの例としては、限定されないが、組換えウイルス、プラスミド、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、デンドリマー、細胞透過性ペプチド（CPP）コンジュゲート、磁性粒子、又はナノ粒子が挙げられる。一実施形態では、ベクターは、核酸分子であり、機能的な遺伝子産物をコードする外因性核酸若しくは異種核酸又は操作された核酸を含み、その後、適切な標的細胞に導入され得る。かかるベクターは、好ましくは、1つ以上の複製起点と、組換えDNAが挿入され得る1つ以上の部位とを有する。ベクターは、しばしば、ベクターを有する細胞を、有しない細胞から選択することができる手段を有しており、例えば、それらは薬剤耐性遺伝子をコードしている。一般的なベクターには、プラスミド、ウイルスゲノム、及び「人工染色体」が含まれる。ベクターの生成、産生、特徴付け、又は定量化の従来の方法は、当業者に利用可能である。

10

【0057】

特定の実施形態では、ベクターは、非ウイルスプラスミドであり、その記載される発現カセット（例えば、「裸のDNA」、「裸のプラスミドDNA」、RNA、及びmRNA）を含み、様々な組成物及びナノ粒子（例えば、ミセル、リポソーム、カチオン性脂質-核酸組成物、ポリグリカン組成物、及び他のポリマー、脂質及び／又はコレステロール系-核酸コンジュゲート、並びに本明細書に記載されるような他の構築物を含む）と結合される。例えば、X. Su et al, Mol. Pharmaceuticals, 2011, 8 (3), pp 774-787; web publication: March 21, 2011, WO2013/182683, WO2010/053572、及びWO2012/170930を参照されたい（これらの全ては、参照により本明細書に援用される）。

20

【0058】

特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターは、「複製欠陥ウイルス」又は「ウイルスベクター」は、合成又は人工のウイルス粒子を指し、機能的な遺伝子産物をコードする核酸配列と、DRG脱標的化（detargeting）miRNA標的配列とを含む発現カセットが、ウイルスのカプシド若しくはエンベロープにパッケージングされ、同様に、ウイルスのカプシド若しくはエンベロープ内にパッケージングされるいずれのウイルスゲノム配列も、複製欠陥である（つまり、標的細胞に感染する能力を保持するが、子孫ビリオンを生成することはできない）。一実施形態では、ウイルスベクターのゲノムは、複製に必要とされる酵素をコードする遺伝子を含まない（ゲノムは、人工ゲノムの増幅及びパッケージングに必要とされるシグナルに隣接してコードされる核酸配列のみを含有する「ガットレス（gutless）」であるように操作されることができる）が、これらの遺伝子は、産生中に供給され得る。したがって、後代ビリオンによる複製及び感染が、複製に必要とされるウイルス酵素の存在下以外で生じることができないために、遺伝子療法における使用のために安全であると考えられる。

30

【0059】

本明細書で使用される場合、組換えウイルスベクターは、任意の好適なウイルスベクターである。実施例は、例示的な組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）を提供する。他の好適なウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルス、ポックスウイルス、ボカウイルス、ハイブリッドAAV／ボカウイルス、単純ヘルペスウイルス、又はレンチウイルスが挙げられ得る。好ましい実施形態では、これらの組換えウイルスは、複製不能である。

40

【0060】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、ベクター（例えば、組換えAAV）が産生されるパッケージング細胞株を指し得る。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞（例えば、ヒト、昆虫、又は酵母）であり得、任意の手段、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、形質転換、ウイルス感染、

50

トランスフェクション、リボソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合によって細胞に導入される、外因性DNA又は異種DNAを含有する。宿主細胞の例としては、限定されないが、単離された細胞、細胞培養物、Escherichia coli細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳類細胞、非哺乳類細胞、昆虫細胞、HEK-293細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、中枢神経系の細胞、ニューロン、グリア細胞、又は幹細胞が挙げられ得る。

【0061】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」という用語は、機能的な遺伝子産物の発現が所望される任意の標的細胞を指す。標的細胞の例としては、限定されないが、肝臓細胞、腎臓細胞、中枢神経系の細胞、ニューロン、グリア細胞、及び幹細胞が挙げられる。特定の実施形態では、ベクターは、エキスピボで標的細胞に送達される。特定の実施形態では、ベクターは、インピボで標的細胞に送達される。

10

【0062】

本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」は、ウイルスベクター内にパッケージングされる核酸配列を指す。一実施例では、「ベクターゲノム」は、少なくとも、5'から3'へ、ベクター特異的配列と、標的細胞でその発現を導く調節制御配列に作動可能に連結された機能的な遺伝子産物をコードする核酸配列と、非翻訳領域（複数可）のmiRNA標的配列と、ベクター特異的配列と、を含む。例えば、AAVベクターゲノムは、逆位末端反復配列と、発現カセットとを含有し、発現カセットは、例えば、標的細胞において発現を指示する調節制御配列に作動可能に連結された機能的な遺伝子産物をコードする核酸配列と、非翻訳領域のmiRNA標的配列とを含む。本明細書に記載されるように、miRNA標的配列は、導入遺伝子の発現が望ましくない（例えば、後根神経節）及び／又は導入遺伝子の発現レベルの低減が所望される細胞において、miRNA配列によって特異的に認識されるように設計される。

20

【0063】

ベクターの記載が、本明細書にわたって記載される他の組成物、レジメン、態様、実施形態及び方法に適用されるように意図されることを理解されたい。

【0064】

3. アデノ随伴ウイルス（AAV）

一態様では、AAVカプシドと、その中にパッケージングされたベクターゲノムとを含む、組換えAAV（rAAV）が本明細書に提供される。

30

【0065】

特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAVの5'逆位末端反復（ITR）、本明細書に記載の発現カセット、及びAAVの3'ITRを含む。一実施形態では、ベクターゲノムは、rAAVベクターを形成するrAAVカプシド内にパッケージングされる核酸配列を指す。かかる核酸配列は、発現カセットに隣接するAAV逆位末端反復配列（ITR）を含有する。一実施例では、「ベクターゲノム」は、少なくとも、5'から3'へ、AAVの5'ITRと、標的細胞でその発現を導く調節制御配列に作動可能に連結された機能的な遺伝子産物をコードする核酸配列と、非翻訳領域（複数可）のmiRNA標的配列と、AAVの3'ITRと、を含む。特定の実施形態では、ITRは、AAV2由来であり、カプシドは、異なるAAV由来である。あるいは、他のITRが使用され得る。本明細書に記載されるように、miRNA標的配列は、導入遺伝子の発現が望ましくない、及び／又は導入遺伝子の発現レベルの低減が所望される細胞のmiRNA配列によって、特異的に認識されるように設計される。

40

【0066】

ITRは、ベクター生成の際にゲノムの複製及びパッケージングに関与する遺伝子要素であり、rAAVを生成するために必要とされる唯一のウイルスシス要素である。一実施形態では、ITRは、カプシドを供給するのとは異なるAAV由来である。好ましい実施形態では、AAV2由来のITR配列、又はその欠失バージョン（ΔITR）が、利便性のため、及び規制当局の承認を加速させるために使用され得る。しかしながら、他のAA

50

V 供給源に由来する I T R が選択され得る。I T R の供給源が A A V 2 由来であり、A A V カプシドが別の A A V 供給源由来である場合、得られるベクターは、擬似型と称され得る。典型的には、A A V ベクターゲノムは、A A V の 5' I T R、コード配列及び任意の調節配列、並びに A A V の 3' I T R を含む。しかしながら、これらのエレメントの他の構成も好適であり得る。D 配列及び末端分離部位 (t r s) が欠失している、Δ I T R と称される 5' I T R の短縮バージョンが記載されている。他の実施形態では、全長 A A V 5' I T R 及び A A V 3' I T R が使用される。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、130 塩基対の短縮 5' 及び／又は 3' A A V 2 I T R を含み、ここで、外部「a」要素は欠失される。短縮された I T R は、内部 A エlement を鋳型として使用して、ベクター DNA 増幅中に 145 塩基対の野生型長さに戻される。

10

【0067】

本明細書で使用される「A A V」という用語は、天然に存在するアデノ随伴ウイルス、当業者に、かつ／又は本明細書に記載の組成物及び方法の観点において利用可能であるアデノ随伴ウイルス、並びに人工 A A V を指す。アデノ随伴ウイルス (A A V) ウイルスベクターは、A A V タンパク質カプシドを有する A A V D N a s e 耐性粒子であり、その中にパッケージングされる発現カセットは、標的細胞に送達するための A A V の逆位末端反復配列 (I T R) に隣接している。A A V カプシドは、60 カプシド (c a p) タンパク質サブユニット、V P 1、V P 2、及び V P 3 からなり、選択される A A V に応じて、およそ 1:1:10~1:1:20 の比で二十面体対称に配置される。上述の A A V ウイルスベクターのカプシドの供給源として、様々な A A V が選択されてもよい。例えば、米国特許出願公開第 2007/0036760-A1 号、米国特許出願公開第 2009/0197338-A1 号、E P 1310571 を参照されたい。2019 年 2 月 27 日に出願された P C T / U S 19/19861、及び 2019 年 2 月 27 日に出願された P C T / U S 19/19804 も参照されたい。また、W O 2003/042397 (A A V 7 及び他のサル A A V)、米国特許第 7790449 号及び米国特許第 7282199 号 (A A V 8)、W O 2005/033321 及び米国特許第 7,906,111 号 (A A V 9)、並びに W O 2006/110689 及び W O 2003/042397 (r h. 10) も参照されたい。これらの文献は、A A V を生成するために選択され得る他の A A V も記載し、参照により援用される。ヒト又は非ヒト霊長類 (N H P) から単離又は操作され、十分に特徴付けられた A A V のうち、ヒト A A V 2 は、遺伝子導入ベクターとして開発された最初の A A V であり、異なる標的組織及び動物モデルにおける効率的な遺伝子導入実験に広く使用されている。別途指定されない限り、本明細書に記載の A A V カプシド、I T R、及び他の選択される A A V 成分は、限定されないが、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 6.2、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 8 b p、A A V r h 10、A A V h u 37、A A V 7 M 8、及び A A V A n c 80、A A V r h 90 (2020 年 4 月 28 日に出願された P C T U S 20/30273)、A A V r h 91 (2020 年 4 月 28 日に出願された P C T U S 20/30266)、並びに A A V r h 92、r h 93、及び r h 91.93 (2020 年 4 月 28 日に出願された P C T U S 20/30281) として一般に特定されている A A V、既知の若しくは言及された A A V のうちのいずれかのバリエーション、又はまだ発見されていない A A V 若しくはそのバリエーション、あるいはそれらの混合物を含む、任意の A A V の中から容易に選択され得る。例えば、参照により本明細書に援用される、W O 2005/033321 を参照されたい。一実施形態では、A A V カプシドは、A A V 9 カプシド又はそのバリエーションである。特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、r A A V ベクターの名称で「A A V」という用語の後の数値又は数値及び文字の組み合わせによって指定される。

20

30

40

【0068】

本明細書で使用される場合、A A V に関して「バリエーション」という用語は、既知の A A V 配列に由来する任意の A A V 配列を意味し、保存的アミノ酸置換を有する A A V 配列、及びアミノ酸配列又は核酸配列にわたって、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 9

50

7%、少なくとも99%以上の配列同一性を共有するAAV配列を含む。別の実施形態では、AAVカプシドは、任意の記載又は既知のAAVカプシド配列から最大約10%のバリエーションを含み得るバリエーションを含む。すなわち、AAVカプシドは、本明細書に提供され、かつ／又は当該技術分野で既知のAAVカプシドと、約90%の同一性～約99.9%の同一性、約95%～約99%の同一性、又は約97%～約98%の同一性を共有する。一実施形態では、AAVカプシドは、AAVカプシドと少なくとも95%の同一性を共有する。AAVカプシドのパーセント同一性を決定する場合、比較は、可変タンパク質（例えば、vp1、vp2、又はvp3）のうちのいずれかにわたって行われ得る。

【0069】

ITR又は他のAAV成分は、当業者に利用可能な技術を使用して、AAVから容易に単離又は操作され得る。かかるAAVは、学術的、商業的、又は公的供給源（例えば、American Type Culture Collection, Manassas, VA）から単離、操作、又は入手することができる。あるいは、AAV配列は、文献又は例えばGenBank、PubMedなどのデータベースで利用可能であるような公開された配列を参照することによって、合成又は他の好適な手段を通して操作され得る。AAVウイルスは、従来の分子生物学的な技術によって操作することができ、これらの粒子を、核酸配列の細胞特異的送達のため、免疫原性を最小限に抑えるため、安定性及び粒子寿命を調整するため、効率的な分解のため、核への正確な送達のためなどに最適化することを可能にする。

【0070】

本明細書で使用される場合、「rAAV」及び「人工AAV」という用語は、限定されないが、カプシドタンパク質と、その中にパッケージングされるベクターゲノムとを含むAAVを意味し、ベクターゲノムは、AAVとは異種の核酸を含む。一実施形態では、カプシドタンパク質は、天然に存在しないカプシドである。かかる人工カプシドは、選択されたAAV配列（例えば、vp1カプシドタンパク質の断片）を、同じAAVの非隣接部分である異なる選択されたAAVからか、非AAVウイルス供給源からか、又は非ウイルス供給源から得ることができる異種配列と組み合わせて使用して、任意の好適な技術によって生成され得る。人工AAVは、限定されないが、擬似型AAVカプシド、キメラAAVカプシド、組換えAAVカプシド、又は「ヒト化」AAVカプシドであり得る。1つのAAVのカプシドが異種カプシドタンパク質に置き換えられている擬似型ベクターは、本発明に有用である。一実施形態では、AAV2/5及びAAV2/8は、例示的な擬似型ベクターである。選択される遺伝子要素は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合を含む任意の好適な方法によって送達され得る。かかる構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作における当業者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技法を含む。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) を参照されたい。

【0071】

本明細書で使用される場合、「AAV9カプシド」は、(a) 参照により本明細書に組み込まれるGenBank登録：AAS99264（参照により本明細書に援用される）（AAV vp1カプシドタンパク質は、配列番号17に再現される）のアミノ酸配列、及び／又は(b) GenBank受入番号：AY530579.1: (nt1...2211)（配列番号16に再現される）のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を有するAAV9を指す。このコード配列からのいくつかの変化は、本発明によって包含され、GenBank登録：AAS99264及びUS7906111（同様に、WO2005/033321）における参照アミノ酸配列と約99%同一性を有する配列を含み得る（すなわち、参照配列からの約1%未満の変化）。かかるAAVは、例えば、天然単離物（例えば、hu68、hu31若しくはhu32）、又はアミノ酸置換、欠失、

若しくは付加を有する AAV9 のバリエーションを含み得る（例えば、AAV9 カプシドと整列される任意の他の AAV カプシド、例えば、US9, 102, 949、US8, 927, 514、US2015/349911、WO2016/049230A1、US9, 623, 120、US9, 585, 971 に記載されているものなどの、対応する位置から「動員される (recruited)」代替的な残基から選択されたアミノ酸置換を含むが、これらに限定されない）。しかし、他の実施形態では、AAV9 の他のバリエーション、又は上記の参照配列に少なくとも約 95% 同一性を有する AAV9 カプシドが選択され得る。例えば、米国特許出願公開第 2015/0079038 号を参照されたい。カプシド、したがってコーディング配列を生成する方法、及び rAAV ウイルスベクターの産生のための方法が報告されている。例えば、Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (10), 6081-6086 (2003) 及び US2013/0045186A1 を参照されたい。

10

【0072】

AAVhu68 は、vp1 (配列番号 9) の 67 位及び 157 位の 2 つのコードされたアミノ酸により、別の系統群 F のウイルスである AAV9 とは異なる。対照的に、他の系統群 F の AAV (AAV9、hu31、hu31) は、67 位に Ala 及び 157 位に Ala を有する。配列番号 9 の番号付けに基づいて、157 位にバリン (Val 又は V) を有し、任意選択的に、67 位にグルタミン酸 (Glu 又は E) を有する、新規の AAVhu68 カプシド及び／又は操作された AAV カプシドが提供される。また、WO2018/160582 も参照されたい (配列表を含めて)、その全体が参照により本明細書に援用される)。

20

【0073】

本明細書で使用される場合、AAV の群に関連する「系統群 (clade)」という用語は、AAV vp1 アミノ酸配列のアラインメントに基づいて、(少なくとも 1000 複製物のうちの) 少なくとも 75% のブートストラップ値及び 0.05 以下のポアソン補正距離測定値による隣接結合 (Neighbor-Joining) アルゴリズムを使用して決定されるような、互いに系統的に関連する AAV の群を指す。隣接結合アルゴリズムは、文献に記載されている。例えば、M. Nei and S. Kumar, Molecular Evolution and Phylogenetics (Oxford University Press, New York (2000)) を参照されたい。このアルゴリズムを実装するために使用することができるコンピュータプログラムが利用可能である。例えば、MEGA v2.1 プログラムは、修正された Nei-Gojobori 法を実装する。これらの技術及びコンピュータプログラム、並びに AAV vp1 カプシドタンパク質の配列を使用して、当業者は、選択された AAV が、本明細書で特定されるクレードのうちの 1 つに含まれるか、別の系統群に含まれるか、又はこれらのクレード外にあるかを容易に決定することができる。例えば、Gao, et al, J Virol, 2004 Jun; 78 (10): 6381-6388 (これは、クレード A、B、C、D、E 及び F を同定し、かつ新規 AAV の核酸配列、GenBank 受託番号 AY530553~AY530629 を提供する) を参照されたい。また、WO2005/033321 も参照されたい。

30

40

【0074】

特定の実施形態では、AAVhu68 カプシドは、更に、以下のうちの 1 つ以上によって特徴付けられる。AAV hu68 カプシドタンパク質は、配列番号 9 の 1~736 の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生される AAVhu68 vp1 タンパク質、配列番号 8 から産生される vp1 タンパク質、又は配列番号 9 の 1~736 の予測アミノ酸配列をコードする配列番号 8 に対して少なくとも 70% 同一の核酸配列から産生される vp1 タンパク質、配列番号 9 の少なくとも約 138~736 のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生される AAVhu68 vp2 タンパク質、配列番号 8 の少なくともヌクレオチド 412~2211 を含む配列から産生される vp2 タンパク質、又は配列番号 9 の少なくとも約 138~736 の

50

アミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号8の少なくともヌクレオチド412～2211に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp2タンパク質、並びに／あるいは配列番号9の少なくとも約203～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるAAVhu68 vp3タンパク質、配列番号8の少なくともヌクレオチド607～2211を含む配列から産生されるvp3タンパク質、又は配列番号9の少なくとも約203～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号8の少なくともヌクレオチド607～2211に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp3タンパク質を含む。

【0075】

AAVhu68のvp1、vp2、及びvp3タンパク質は、典型的には、配列番号9の全長vp1アミノ酸配列（アミノ酸1～736）をコードする同じ核酸配列によってコードされる選択的スプライシングバリエーションとして発現される。任意選択的に、vp1コード配列は、vp1、vp2、及びvp3タンパク質を発現させるために単独で使用される。代替的に、この配列は、vp1固有領域（約aa1～約aa137）及び／又はvp2固有領域（約aa1～約aa202）を有しない配列番号9のAAVhu68 vp3アミノ酸配列（約aa203～736）をコードする核酸配列、又はそれに相補的な鎖、対応するmRNA若しくはtRNA（配列番号8の約nt607～約nt2211）、又は配列番号9のaa203～736をコードする配列番号8に対して少なくとも70%～少なくとも99%（例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%）同一の配列のうちの1つ以上と共発現され得る。追加的に、又は代替的に、vp1コード配列及び／又はvp2コード配列は、vp1固有領域（約aa1～約137）を有しない配列番号9のAAVhu68 vp2アミノ酸配列（約aa138～736）をコードする核酸配列若しくはそれに相補的な鎖、対応するmRNA若しくはtRNA（例えば、配列番号8のnt412～22121）、又は配列番号9の約aa138～736をコードする配列番号8と少なくとも70%～少なくとも99%（例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%）同一の配列と、共発現され得る。

【0076】

本明細書に記載されるように、rAAVhu68は、配列番号9のvp1アミノ酸配列をコードするAAVhu68核酸配列、及び任意選択的に、追加の核酸配列（例えば、vp1及び／又はvp2固有領域を含まないvp3タンパク質をコードする配列）由来のカプシドを発現する産生システムで産生されたrAAVhu68カプシドを有する。単一の核酸配列vp1を使用した産生から得られたrAAVhu68は、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質の異種集団を産生する。より具体的には、AAVhu68カプシドは、vp1タンパク質内、vp2タンパク質内、及びvp3タンパク質内に部分集合体を含有し、配列番号9の予測アミノ酸残基からの修飾を有する。これらの亜集団は、最低限、脱アミド化アスパラギン（N又はAsn）残基を含む。例えば、アスパラギン-グリシン対におけるアスパラギンは、高度に脱アミド化される。

【0077】

一実施形態では、AAVhu68 vp1核酸配列は、配列番号8の配列、又はそれに相補的な鎖、例えば、対応するmRNA若しくはtRNAを有する。特定の実施形態では、vp2及び／又はvp3タンパク質は、追加的又は代替的に、例えば、選択された発現系においてvpタンパク質の比率を変化させるために、vp1とは異なる核酸配列から発現され得る。特定の実施形態では、vp1固有領域（約aa1～約aa137）及び／又はvp2固有領域（約aa1～約aa202）を有しない配列番号9のAAVhu68 vp3アミノ酸配列（約aa203～736）若しくはそれに相補的な鎖、対応するmRNA若しくはtRNA（配列番号8の約nt607～約nt2211）をコードする核酸配列も提供される。特定の実施形態では、vp1固有領域（約aa1～約137）を含まない配列番号9のAAVhu68 vp2アミノ酸配列（約aa138～736）又はそ

10

20

30

40

50

れに相補的な鎖、対応する mRNA 若しくは tRNA（配列番号 8 の nt 412～221）をコードする核酸配列も提供される。

【0078】

しかしながら、配列番号 9 のアミノ酸配列をコードする他の核酸配列は、rAAVhu68 カプシドの産生に使用するために選択され得る。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号 8 の核酸配列、又は配列番号 8 に対して少なくとも 70%～99% 同一、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を有し、配列番号 9 をコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号 8 の核酸配列、又は配列番号 8 の約 nt 412～約 nt 221 に対して少なくとも 70%～99%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を有し、配列番号 9 の vp2 カプシドタンパク質（約 aa 138～736）をコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号 8 の約 nt 607～約 nt 221 の核酸配列、又は配列番号 8 の nt と少なくとも 70%～99%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を有し、配列番号 9 の vp3 カプシドタンパク質（約 aa 203～736）をコードする。

10

【0079】

特定の実施形態では、AAVhu68 カプシドは、配列番号 8 の核酸配列、又は本明細書に記載の修飾（例えば、脱アミド化アミノ酸）を含む配列番号 9 の vp1 アミノ酸配列をコードする少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% の配列を使用して産生される。特定の実施形態では、vp1 アミノ酸配列は、配列番号 9 に再現される。

20

【0080】

本明細書で使用される、vp カプシドタンパク質を参照するために使用される場合、「異種」という用語又はその任意の文法的変形は、例えば、異なる修飾アミノ酸配列を有する vp1、vp2、又は vp3 モノマー（タンパク質）を有する、同じではない要素からなる集団を指す。配列番号 9 は、AAVhu68 vp1 タンパク質のコードされたアミノ酸配列を提供する。vp1、vp2、及び vp3 タンパク質（代替的にアイソフォームと称される）に関連して使用される「異種」という用語は、カプシド内の vp1、vp2、及び vp3 タンパク質のアミノ酸配列の違いを指す。AAV カプシドは、予測されたアミノ酸残基の修飾を有する、vp1 タンパク質内、vp2 タンパク質内、及び vp3 タンパク質内に亜集団を含有する。これらの亜集団は、最低限、特定の脱アミド化アスパラギン（N 又は Asn）残基を含む。例えば、特定の亜集団は、アスパラギン-グリシン対における少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、又は 4 つの高度に脱アミド化されたアスパラギン（N）位置を含み、任意選択的に他の脱アミド化アミノ酸を更に含み、脱アミド化は、アミノ酸変化及び他の任意選択的な修飾をもたらす。参照により本明細書に援用される「Novel Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors, AAV Vectors Having Reduced Capsid Deamidation and Uses Therefor」と題する 2019 年 2 月 27 日に出願された PCT/US19/19861、及び 2019 年 2 月 27 日に出願された PCT/US19/19804 を参照されたい。

30

40

【0081】

本明細書で使用される場合、vp タンパク質の「亜集団」は、別途指定されない限り、少なくとも 1 つの定義された共通の特徴を有し、少なくとも 1 つの群メンバーから、参照群の全てのメンバーよりも少ないメンバーからなる vp タンパク質の群を指す。

【0082】

例えば、vp1 タンパク質の「亜集団」は、別途指定されない限り、組み立てられた AAV カプシドにおいて、少なくとも 1 つの vp1 タンパク質であり、全ての vp1 タンパ

50

ク質よりも少ない。v p 3の「亜集団」は、別途指定されない限り、組み立てられたA A Vカプシドにおいて、1つのv p 3タンパク質から、全てのv p 3タンパク質よりも少なくてもよい。例えば、組み立てられたA A Vカプシドにおいて、v p 1タンパク質は、v p タンパク質の亜集団であり得、v p 2タンパク質は、v p タンパク質の別の亜集団であり得、v p 3はなお、v p タンパク質の更なる亜集団である。別の例では、v p 1、v p 2、及びv p 3タンパク質は、例えば、少なくとも1つ、2つ、3つ、又は4つの高度脱アミド化アスパラギン、例えば、アスパラギン-グリシン対で異なる修飾を有する亜集団を含み得る。

【0083】

別途指定されない限り、高度脱アミド化は、参照アミノ酸位置での予測アミノ酸配列と比較して、参照アミノ酸位置での少なくとも45%の脱アミド化、少なくとも50%の脱アミド化、少なくとも60%の脱アミド化、少なくとも65%の脱アミド化、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は最大約100%の脱アミド化を指す（例えば、配列番号9 [A A V h u 6 8]の番号付けに基づくアミノ酸57のアスパラギンの少なくとも80%が、v p 1タンパク質の合計に基づいて脱アミド化され得るか、又は合計v p 1、v p 2、及びv p 3タンパク質の合計に基づいて脱アミド化され得る）。かかるパーセンテージは、2Dゲル、質量分析技術、又は他の好適な技術を使用して決定され得る。

【0084】

A A V h u 6 8カプシドタンパク質において、4個の残基（N 5 7、N 3 2 9、N 4 5 2、N 5 1 2）は、70%を超える脱アミド化レベルを日常的に示し、様々なロットにわたって、ほとんどの場合90%を超える。更なるアスパラギン残基（N 9 4、N 2 5 3、N 2 7 0、N 3 0 4、N 4 0 9、N 4 7 7、及びQ 5 9 9）も、様々なロットにわたって最大約20%の脱アミド化レベルを示す。脱アミド化レベルは、最初にトリプシン消化を使用して特定され、キモトリプシン消化で検証された。

【0085】

A A V h u 6 8カプシドは、v p 1タンパク質内、v p 2タンパク質内、及びv p 3タンパク質内に亜集団を含み、配列番号9の予測されるアミノ酸残基からの修飾を有する。これらの亜集団は、最低限、特定の脱アミド化アスパラギン（N又はA s n）残基を含む。例えば、特定の部分集合体は、配列番号9のアスパラギン-グリシン対中に少なくとも1つ、2つ、3つ、又は4つの高度脱アミド化アスパラギン（N）位置を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を更に含み、脱アミド化は、アミノ酸の変化及び他の任意選択的な修飾をもたらす。

【0086】

他の実施形態では、方法は、r A A Vの収率を増加させること、したがって、細胞溶解の前に、又は細胞溶解を必要とせずに、上清中に存在するr A A Vの量を増加させることを伴う。この方法は、A A V h u 6 8 v p 1カプシドタンパク質のアミノ酸番号を有する整列に基づいて、A A V V P 1カプシド遺伝子を操作して、67位にG l u、157位にV a l、又は両方を有するカプシドタンパク質を発現させることを伴う。他の実施形態では、方法は、V P 2カプシド遺伝子を操作して、157位にV a lを有するカプシドタンパク質を発現することを伴う。更に他の実施形態では、r A A Vは、修飾カプシドを有し、67位にG l u及び157位にV a lの、v p 1及びv p 2のカプシドタンパク質の両方を含む。

【0087】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるr A A Vは、自己相補性A A Vである。「自己相補性A A V」は、組換えA A V核酸配列によって担持されるコード領域が、分子内二本鎖DNA鑄型を形成するように設計されている構築物を指す。感染時には、第2の鎖の細胞媒介性合成を待つのではなく、s c A A Vの2つの相補性の片割れが会合して、即時の複製及び転写に備えのある1つの二本鎖DNA（d s DNA）ユニットを形成するで

10

20

30

40

50

あろう。例えば、D M McCarty et al, “Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”, Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254を参照されたい。自己相補性AAVは、例えば、米国特許第6,596,535号、同第7,125,717号、及び同第7,456,683号に記載されており、その各々は参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0088】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるrAAVは、ヌクレアーゼ耐性である。かかるヌクレアーゼは、単一のヌクレアーゼ、又はヌクレアーゼの混合物であり得、エンドヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼであり得る。ヌクレアーゼ耐性rAAVは、AAVカプシドが完全に組み立てられたことを示し、産生プロセスから存在し得る汚染核酸を除去するために設計されたヌクレアーゼインキュベーションステップ中の分解（消化）から、これらのパッケージングされたゲノム配列を保護する。多くの場合、本明細書に記載のrAAVは、DNase耐性である。

【0089】

本明細書に記載される組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）は、既知の技術を使用して生成され得る。例えば、WO2003/042397、WO2005/033321、WO2006/110689、US7588772B2を参照されたい。かかる方法は、AAVカプシドをコードする核酸配列と、機能的rep遺伝子と、AAV逆位末端配列（ITR）に隣接する本明細書に記載の発現カセットと、発現カセットをAAVカプシドタンパク質にパッケージングすることを可能にするように機能する適切なヘルパーと、を含有する宿主細胞を培養することを含む。また、AAVカプシドをコードする核酸配列と、機能的rep遺伝子と、記載のベクターゲノムと、ベクターゲノムをAAVカプシドタンパク質にパッケージングすることを可能にするように機能する適切なヘルパーと、を含有する宿主細胞も本明細書に提供される。一実施形態では、宿主細胞は、HEK293細胞である。これらの方法は、参照により本明細書に援用されるWO2017/160360A2に更に詳細に記載されている。

【0090】

当業者に利用可能なrAAVの他の産生方法も利用することができる。好適な方法としては、バキュロウイルス発現系又は酵母を介した生成が挙げられ得るが、これらに限定されない。例えば、Robert M. Kotin, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15; 20(R1):R2-R6. Published online 2011 Apr 29. doi:10.1093/hmg/ddr141、Aucoin MG et al., Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. Biotechnol Bioeng. 2006 Dec 20; 95(6):1081-92、SAMI S. THAKUR, Production of Recombinant Adeno-associated viral vectors in yeast. Thesis presented to the Graduate School of the University of Florida, 2012、Kondratov O et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells, Mol Ther. 2017 Aug 10. pii: S1525-0016(17)30362-3. doi:10.1016/j.ym

10

20

30

40

50

the. 2017. 08. 003. [Epub ahead of print]、Mietzsch M et al, OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsidation of Foreign DNA. Hum Gene Ther Methods. 2017 Feb; 28 (1): 15–22. doi: 10.1089/hgtb.2016.164.、Li L et al. Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic source of DNA for gene transfer. PLoS One. 2013 Aug 1; 8 (8): e69879. doi: 10.1371/journal.pone.0069879. Print 2013、Galibert L et al, Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. J Invertebr Pathol. 2011 Jul; 107 Suppl: S80–93. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.008、及び Kotin RM, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15; 20 (R1): R2–6. doi: 10.1093/hmg/ddr141. Epub 2011 Apr 29を参照されたい。

【0091】

2ステップの高塩濃度でのアフィニティークロマトグラフィー精製、続いて、アニオン交換樹脂クロマトグラフィーを使用して、ベクター薬物製品を精製し、空のカプシドを除去する。これらの方法は、「Scalable Purification Method for AAV9」と題するWO2017/160360により詳細が記載されており、参照により本明細書に援用される。簡潔には、パッケージングされたゲノム配列を有するrAAV9粒子を、ゲノム欠損AAV9中間体から分離するための方法は、組換えAAV9ウイルス粒子及びAAV9カプシド中間体を含む懸濁液を、高性能液体クロマトグラフィーに供することを伴い、AAV9ウイルス粒子及びAAV9中間体を、10.2のpHで平衡化された強アニオン交換樹脂に結合させ、約260及び約280での紫外吸光度について溶出液をモニタリングしながら、塩勾配に供する。rAAV9には最適未満であるが、pHは約10.0～10.4の範囲であってもよい。この方法では、AAV9全カプシドは、A260/A280の比が変曲点に達するときに溶離される画分から収集される。一実施例では、アフィニティークロマトグラフィーステップのために、ダイアフィルトレーションされた産物を、AAV2/9血清型を効率的に捕捉するCapture Select (商標) Poros-AAV2/9アフィニティ樹脂 (Life Technologies) に適用してもよい。これらのイオン性条件下、残留細胞DNA及びタンパク質の顕著なパーセンテージは、カラムを通して流れ、AAV粒子は、効率的に捕捉される。

【0092】

rAAVの特徴付け又は定量化のための従来の方法は、当業者に利用可能である。空及び充填粒子の含有量を算出するために、選択された試料 (例えば、本明細書の実施例では、イオジキサノール勾配で精製された調製物、ここで、GCの数=粒子の数) についてのVP3バンド容量が、ロードされたGC粒子に対してプロットされる。得られた線形方程式 ($y = mx + c$) を用いて、試験物品ピークのバンド体積中の粒子の数を算出する。次いで、ロードした20 μ L当たりの粒子の数 (pt) に50を掛けて、粒子 (pt) / mLを得る。Pt / mLをGC / mLで割り算し、ゲノムコピーに対する粒子の比率 (pt / GC) を得る。Pt / mL – GC / mLは、空pt / mLを与える。空pt / mLをp

t / mL で割り、100 を掛け算することによって、空粒子のパーセンテージを得る。一般に、空のカプシド及びパッケージングされたゲノムを含む AAV ベクター粒子をアッセイするための方法は、当該分野において既知である。例えば、Grimm et al., Gene Therapy (1999) 6:1322-1330、Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7:122-128。変性カプシドについて試験するために、方法は、処理された AAV ストックを、3つのカプシドタンパク質を分離することが可能な任意のゲルからなる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（例えば、緩衝液中に 3~8% のトリス酢酸塩を含有する勾配ゲル）に供することと、次いで、試料材料が分離されるまでゲルを試行することと、ナイロン又はニトロセルロース膜、好ましくはナイロンの上でゲルをブロッティングすることと、を含む。次いで、抗-AAV カプシド抗体は、変性したカプシドタンパク質、好ましくは、抗-AAV カプシドモノクローナル抗体、最も好ましくは、B1 抗-AAV-2 モノクローナル抗体に結合する一次抗体として使用される (Wobus et al., J. Viral. (2000) 74:9281-9293)。次いで、一次抗体に結合し、一次抗体、より好ましくは、抗体に共有結合した検出分子を含有する抗 IgG 抗体、最も好ましくは、西洋ワサビペルオキシダーゼに共有結合したヒツジ抗マウス IgG 抗体との結合を検出するための手段を含む、二次抗体が使用される。一次抗体と二次抗体との間の結合を半定量的に決定するために、結合を検出するための方法、好ましくは、放射性アイソトープ放射、電磁放射、又は比色変化を検出することができる検出方法、最も好ましくは、化学発光検出キットが使用される。例えば、SDS-PAGE では、カラム画分からの試料を採取し、還元剤（例えば、DTT）を含有する SDS-PAGE ローディングバッファー中で加熱することができ、カプシドタンパク質は、プレキャスト勾配ポリアクリルアミドゲル（例えば、Novex）で分解された。Silver Express (Invitrogen, CA) を製造元の指示に従って、又は他の好適な染色方法、すなわち、SYPRO ルビー若しくはクマシー色素を用いて、銀染色を実施してもよい。一実施形態では、カラム画分中の AAV ベクターゲノム (vg) の濃度は、定量的リアルタイム PCR (Q-PCR) によって測定することができる。試料は希釈され、DNase I（又は別の好適なヌクレアーゼ）で消化されて、外因性 DNA が除去される。ヌクレアーゼの不活性化後、試料は、更に希釈され、プライマー及びプライマー間の DNA 配列に特異的な TaqMan（商標）蛍光発生プローブを用いて増幅される。規定レベルの蛍光（閾値サイクル、Ct）に到達するのに必要とされるサイクル数は、Applied Biosystems Prism 7700 配列検出システム上で各試料について測定される。AAV ベクター中に含有されるものと同一の配列を含有するプラスミド DNA を用いて、Q-PCR 反応における標準曲線を生成する。試料から得られたサイクル閾値 (Ct) の値を使用して、プラスミド標準曲線の Ct 値に対してそれを正規化することによって、ベクターゲノム力価を決定する。デジタル PCR に基づくエンドポイントアッセイも使用可能である。

【0093】

一態様では、広域スペクトル血清プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼ K（例えば、Qiagen から購入可能）を利用する最適化 q-PCR 方法が使用される。より特定的には、最適化された qPCR ゲノム力価アッセイは、標準アッセイと同様であるが、但し、DNase I 消化の後に、試料をプロテイナーゼ K 緩衝液で希釈し、プロテイナーゼ K で処理した後、熱不活性化させる。好適には、試料は、試料サイズと等しい量のプロテイナーゼ K バッファーで希釈される。プロテイナーゼ K バッファーは、2 倍以上に濃縮されてもよい。典型的には、プロテイナーゼ K 処理は、約 0.2 mg/mL であるが、0.1 mg/mL ~ 約 1 mg/mL で変動し得る。処理ステップは、一般に、約 55 °C で約 15 分間実施されるが、より低い温度（例えば、約 37 °C ~ 約 50 °C）でより長時間（例えば、約 20 分間 ~ 約 30 分間）、又はより高い温度（例えば、最高約 60 °C）でより短時間（例えば、約 5 ~ 10 分間）実施されてもよい。同様に、熱失活は、一般に、約 95 °C で約 15 分間であるが、温度を下げてよく（例えば、約 70 ~ 約 90 °C）、時間を延ばしてもよい（例えば、約 20 分間 ~ 約 30 分間）。次いで、試料は希釈され（例えば、10

00倍)、標準アッセイで記載されるように、TaqMan分析に供される。

【0094】

追加的に、又は代替的に、ドロップレットデジタルPCR (ddPCR) が使用され得る。例えば、ddPCRによる一本鎖及び自己相補性AAVベクターゲノム力価を決定するための方法が記載されている。例えば、M. Lock et al, Hum Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr; 25 (2) : 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14を参照されたい。

【0095】

また、カプシドタンパク質のvp1、vp2、及びvp3の比を決定する方法も利用可能である。例えば、Vamseedhar Rayaprolu et al, Comparative Analysis of Adeno-Associated Virus Capsid Stability and Dynamics, J Virol. 2013 Dec; 87 (24) : 13150-13160、Buller RM, Rose JA. 1978. Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. J Virol. 25: 331-338、及びRose JA, Maizel JV, Inman JK, Shatkin AJ. 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. J Virol. 8: 766-770.

【0096】

rAAVの記載が、本明細書にわたって記載される他の組成物、レジメン、態様、実施形態及び方法に適用されるように意図されることを理解されたい。

【0097】

4. 医薬組成物

導入遺伝子及びmiRNA標的配列を含む発現カセットを含む医薬組成物は、液体懸濁液、凍結乾燥又は凍結組成物、又は別の好適な製剤であってもよい。特定の実施形態では、組成物は、発現カセットと、懸濁液を形成する生理学的に適合する液体（例えば、溶液、希釈剤、担体）とを含む。かかる液体は、好ましくは水性であり、緩衝剤（複数可）、界面活性剤（複数可）、pH調整剤（複数可）、防腐剤（複数可）、又は他の好適な賦形剤（複数可）を1つ以上含み得る。好適な成分が以下でより詳細に考察される。医薬組成物は、水性懸濁液及び任意の選択された賦形剤、並びに発現カセットを含む。

【0098】

導入遺伝子及びmiRNA標的配列を含む発現カセットは、本明細書全体に記載されている通りである。例えば、発現カセットは、(a) 組換えウイルスを含む細胞において遺伝子産物の発現を導く調節配列の制御下にある遺伝子産物のコード配列と、(b) 細胞において遺伝子産物の発現を導く調節配列と、(c) コード配列の5'にある5'非翻訳領域(UTR)配列と、(d) コード配列の3'にある3'UTR配列と、e) 少なくとも2つのタンデム後根神経節(DRG)特異的miRNA標的配列とを含み、少なくとも2つのmiRNA標的配列は、少なくとも1つの第1のmiRNA標的配列と、同じか又は異なり得る少なくとも1つの第2のmiRNA標的配列と、を含む核酸配列であり得る。

【0099】

特定の実施形態では、医薬組成物は、発現カセットを含み、発現カセットは、導入遺伝子、及びmiRNA標的配列、並びに非ウイルス送達系を含む。これには、例えば、裸のDNA、裸のRNA、無機粒子、脂質又は脂質様粒子、キトサンベースの製剤、並びに当該技術分野で既知で、記載されている他のもの（例えば、上に引用されたRamamoorthy及びNarvekarに例示される）が含まれ得る。

【0100】

他の実施形態では、医薬組成物は、発現カセット（導入遺伝子及びmiRNA標的配列を含む）を含む懸濁液であり、非ウイルスベクター系又はウイルスベクター系において操

10

20

30

40

50

作されている。かかる非ウイルスベクター系は、例えば、プラスミド若しくは非ウイルス遺伝要素、又はタンパク質ベースのベクターを含み得る。

【0101】

特定の実施形態では、医薬組成物は、非複製ウイルスベクターを含む。好適なウイルスベクターには、例えば、組換えアデノウイルス、組換えレンチウイルス、組換えポカウイルス、組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）、又は別の組換えパルボウイルスなどの任意の好適な送達ベクターが含まれ得る。特定の実施形態では、ウイルスベクターは、それを必要とする患者に遺伝子産物を送達するための組換えAAVである。

【0102】

一実施形態では、医薬組成物は、発現カセットを含み、導入遺伝子及びmiRNA標的配列、並びに脳室内（ICV）、髄腔内（IT）、大槽内、又は静脈内（IV）注入を介した送達に好適な製剤緩衝液を含む。一実施形態では、導入遺伝子及びmiRNA標的配列を含む発現カセットは、組換えAAVにパッケージングされる。

【0103】

一実施形態では、本明細書に提供される組成物は、水性懸濁液中に溶解される界面活性剤、防腐剤、賦形剤、及び／又は緩衝剤を含む。一実施形態では、緩衝液は、PBSである。別の実施形態では、緩衝液は、人工脳脊髄液（CSF）、例えば、エリオット製剤緩衝液、又はハーバード装置灌流液（最終イオン濃度（mM単位）：Na 150、K 3.0、Ca 1.4、Mg 0.8、P 1.0、Cl 155）である。様々な好適な溶液が既知であり、緩衝化生理食塩水、界面活性剤、約100mMの塩化ナトリウム（NaCl）～約250mMの塩化ナトリウムに相当にイオン強度に調整された生理学的に適合する塩若しくは塩の混合物、又は同等のイオン濃度に調整された生理学的に適合する塩のうちの1つ以上を含むものが含まれる。

【0104】

好適には、配合物は、生理学的に許容されるpH、例えば、pH6～8、又はpH6.5～7.5、pH7.0～7.7、又はpH7.2～7.8の範囲に調整される。脳脊髄液のpHは約7.28～約7.32であるため、髄腔内送達では、この範囲内のpHが望ましいものであり得、一方、静脈内送達のためには、6.8～約7.2のpHが望ましいものであり得る。しかし、最も広い範囲内の他のpH、及びこれらの部分範囲が、他の送達経路用に選択されてもよい。

【0105】

好適な界面活性剤、又は界面活性剤の組み合わせは、非毒性である非イオン性界面活性剤の中から選択されてもよい。一実施形態では、例えば、中性pHを有し、8400の平均分子量を有する、ポロキサマー188としても知られている、Pluronic（登録商標）F68 [BASF]などの、一級ヒドロキシル基末端の二官能性ブロックコポリマー界面活性剤が選択される。他の界面活性剤及び他のポロキサマー、すなわち、ポリオキシエチレン（ポリ（エチレンオキシド））の2つの親水性鎖に隣接するポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中心疎水性鎖からなる非イオン性トリブロックコポリマー、SOLUTOL HS 15（マクロゴール15ヒドロキシステアレート）、LABRASOL（ポリオキシカプリン酸グリセリド）、ポリオキシ10オレイルエーテル、TWEEN（ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル）、エタノール、及びポリエチレングリコールが選択され得る。一実施形態では、製剤は、ポロキサマーを含む。これらのコポリマーは、一般的に、文字「P」（ポロキサマーの場合）の後に3桁の数字で命名され、最初の2桁×100は、ポリオキシプロピレンコアのおおよその分子質量を与え、最後の1桁×10は、ポリオキシエチレン含有量のパーセンテージを与える。一実施形態では、ポロキサマー188が選択される。界面活性剤は、懸濁液の最大約0.0005%～約0.001%の量で存在してもよい。

【0106】

一実施例では、製剤は、例えば、水中に塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、デキストロース、硫酸マグネシウム（例えば、硫酸マグネシウム・7H₂O）、塩化カリウム、塩

10

20

30

40

50

化カルシウム（例えば、塩化カルシウム・ $2\text{H}_2\text{O}$ ）、二塩基性リン酸ナトリウム、及びそれらの混合物のうちの1つ以上を含む、緩衝化食塩水溶液を含有することができる。好適には、髄腔内送達では、モル浸透圧濃度は、脳脊髄液と適合する範囲内（例えば、約275～約290）であり、例えば、emedicine.medscape.com/article/2093316-overviewを参照されたい。任意選択的に、髄腔内送達では、商業的に入手可能な希釈剤が懸濁化剤として、又は別の懸濁化剤及び他の任意選択的な賦形剤と組み合わせて使用され得る。例えば、Elliotts B（登録商標）溶液 [Lukare Medical] を参照されたい。

【0107】

他の実施形態では、製剤は、1つ以上の浸透促進剤を含有し得る。好適な浸透促進剤の例には、例えば、マンニトール、グリココール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、カプリル酸ナトリウム、カプリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、又はEDTAが含まれ得る。

【0108】

更に、薬学的に許容される担体と、本明細書に記載される核酸配列を含むベクターと、を含む医薬組成物が提供される。本明細書で使用される場合、「担体」は、任意の及び全ての溶媒、分散媒体、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイドなどを含む。薬学的活性物質に対するかかる媒体及び薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。補足活性成分を組成物中に組み込むこともできる。リポソーム、ナノカプセル、ミクロ粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞などのような送達ビヒクルが、本発明の組成物を好適な宿主細胞に導入するために使用され得る。特に、rAAVベクターは、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、又はナノ粒子などのいずれかに封入された送達のために配合され得る。一実施形態では、治療有効量の当該ベクターが、医薬組成物に含まれる。担体の選択は、本発明の制限ではない。防腐剤又は化学的安定剤などの他の従来の薬学的に許容される担体。好適な例示的な防腐剤には、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルパニリン、グリセリン、フェノール、及びパラクロロフェノールが含まれる。好適な化学的安定剤には、ゼラチン及びアルブミンが含まれる。

【0109】

「薬学的に許容される」という語句は、宿主に投与されるときにアレルギー又は類似の有害反応を生じない分子実体及び組成物を指す。

【0110】

本明細書で使用される場合、「投薬量」又は「量」という用語は、対象に治療の過程で送達される総投薬量若しくは総量、あるいは単一単位（又は複数単位若しくは分割投薬量）投与で送達される投薬量若しくは量を指し得る。

【0111】

本明細書に記載の水性懸濁液又は医薬組成物は、それを必要とする対象に、任意の好適な経路又は異なる経路の組み合わせによって送達されるように設計される。

【0112】

一実施形態では、医薬組成物は、脳室内（ICV）、髄腔内（IT）、又は大槽内注入を介した送達のために配合される。一実施形態では、本明細書に記載の組成物は、それを必要とする対象に、静脈内注入によって送達するために設計される。代替的に、他の投与経路（例えば、経口、吸入、鼻腔内、気管内、動脈内、眼内、筋肉内、及び他の非経口経路）を選択してもよい。

【0113】

本明細書で使用される場合、「髄腔内送達」又は「髄腔内投与」という用語は、脊柱管への注入、より具体的には、脳脊髄液（CSF）へ到達するようにクモ膜下腔内への注入を介した、薬物の投与経路を指す。髄腔内送達は、腰部穿刺、脳室内穿刺、後頭下／大槽

10

20

30

40

50

内穿刺、及び／又はC1－2穿刺を含み得る。例えば、材料は、腰部穿刺の手段によって、クモ膜下腔全体に拡散させるために導入され得る。別の例では、大槽内への注射であってもよい。鼻腔内送達は、ベクター拡散を増加させ、かつ／又は投与によって引き起こされる毒性及び炎症を低減し得る。例えば、Christian Hinderer et al, Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna, Mol Ther Methods Clin Dev. 2014;1:14051. Published online 2014 Dec 10. doi:10.1038/mtm.2014.51を参照されたい。

10

【0114】

本明細書で使用される場合、「大槽内送達」又は「大槽内投与」という用語は、脳室の脳脊髄液への、又は小脳延髄槽内への直接的な薬物の投与経路、より具体的には、後頭下穿刺を介した、又は大槽内への直接的な注入若しくは永久的に配置されたチューブを介した薬物の投与経路を指す。

【0115】

一態様では、本明細書に記載されるベクターを製剤緩衝液中に含む医薬組成物が、本明細書に提供される。特定の実施形態では、複製欠陥ウイルス組成物は、ヒト患者にとって、範囲内の全ての整数又は分数量を含む約 1.0×10^9 GC～約 1.0×10^{16} GC（体重70 kgの平均対象を治療するため）、好ましくは 1.0×10^{12} GC～ 1.0×10^{14} GCの範囲にある一定量の複製欠陥ウイルスを含むように投薬量単位で製剤化され得る。一実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、又は 9×10^9 GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、又は 9×10^{10} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、又は 9×10^{11} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、又は 9×10^{12} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、又は 9×10^{13} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、又は 9×10^{14} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、又は 9×10^{15} GCを含むように製剤化される。一実施形態では、ヒトへの適用のために、用量は、範囲内の全ての整数又は少数を含む、用量当たり 1×10^{10} ～約 1×10^{12} GCの範囲で当り得る。

20

30

40

【0116】

一実施形態では、本明細書に記載されるrAAVを製剤緩衝液中に含む医薬組成物が提供される。一実施形態では、rAAVは、約 1×10^9 ゲノムコピー（GC）／mL～約 1×10^{14} GC／mLで製剤化される。更なる実施形態では、rAAVは、約 3×10^9 GC／mL～約 3×10^{13} GC／mLで製剤化される。なお更なる実施形態では、rAAVは、約 1×10^9 GC／mL～約 1×10^{13} GC／mLで製剤化される。一実施

50

形態では、 $rAAV$ は、少なくとも約 1×10^{11} GC/mLで製剤化される。一実施形態では、本明細書に記載の $rAAV$ を含む医薬組成物は、脳質量1グラム当たり約 1×10^9 GC～脳質量1グラム当たり約 1×10^{14} GCの用量で投与される。

【0117】

特定の実施形態では、組成物は、任意の好適な経路による送達のために、好適な水性懸濁媒体（例えば、緩衝生理食塩水）中に製剤化され得る。本明細書に提供される組成物は、高用量のウイルスベクターの全身送達に有用である。 $rAAV$ の場合、高用量は、少なくとも 1×10^{13} GC、又は少なくとも 1×10^{14} GCであり得る。しかしながら、改善された安全性のために、本明細書に提供されるmiRNA配列は、他のより低い用量で送達される発現カセット及び／又はベクターゲノムに含まれ得る。

10

【0118】

特定の実施形態では、組成物は、本質的に同時に2つの異なる経路によって送達される。

【0119】

医薬組成物の記載が、本明細書にわたって記載される他の組成物、レジメン、態様、実施形態、及び方法に適用されるよう意図されることを理解されたい。

【0120】

5. 治療方法

特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、所望の導入遺伝子産物を、患者に送達するのに有用であり、一方で、後根神経節ニューロンにおける導入遺伝子発現を抑制するのに有用である。方法は、導入遺伝子及びmiRNA標的配列を含む発現カセットを含む組成物を、患者に送達することを伴う。有用な導入遺伝子としては、欠損又は欠損遺伝子を置き換え、不活性化又は「ノックアウト」、又は「ノックダウン」又は望ましくない高レベルで発現している遺伝子の発現を低減させる、又は所望の治療効果を有する遺伝子産物を送達する様々な遺伝子産物をコードする遺伝子産物が含まれる。

20

【0121】

好適には、治療方法は、本明細書に記載の導入遺伝子を含む発現カセット又はベクターゲノムを含むベクターを、本明細書に記載の複数のmiRNA標的配列と組み合わせて患者に投与することを含む。好適には、これらの発現カセット及びベクターゲノムは、好適なウイルス（例えば、AAV）キャプシドにパッケージングされる。特定の実施形態では、発現カセットは、8つのmiRNA標的化配列（例えば、 $4 \times \text{miRNA-182}$ 標的化配列 + $4 \times \text{miRNA-183}$ 標的化配列、又は他の組み合わせ）を含んでもよい。他の実施形態では、miRNA標的化配列の様々な組み合わせが生成され得る。

30

【0122】

好適な導入遺伝子の例は、1つ以上の神経変性障害の治療に有用である。かかる障害としては、限定されないが、伝染性海綿状脳症（例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病）、デュシェンヌ筋ジストロフィー（DMD）、筋細管ミオパチー及び他のミオパチー、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、多発性硬化症、アルツハイマー病、ハンチントン病、カナバン病、外傷性脳損傷、脊髄損傷（ATI335、Novartisによる抗nogol）、片頭痛（Alder BiopharmaceuticalsによるALD403、EliによるLY2951742、Labrys BiologicsによるRN307）、リソソーム蓄積症、脳卒中、中枢神経系に影響を及ぼす感染症が含まれ得る。リソソーム蓄積症の例としては、例えば、ゴーシェ病、ファブリー病、ニーマン・ピック病、ハンター症候群、糖原病II（ポンペ病）、又はテイ・サックス病が挙げられる。これらの病態（例えば、DMD及びミオパチー）のいくつかに対して、本明細書に提供される組成物は、骨格筋及び心筋の形質導入又は発明のための高用量の発現カセット（例えば、ウイルスベクターによって運ばれる）に関連する軸索障害を低減又は排除するのに有用である。

40

【0123】

更に他の核酸は、Nogo受容体の機能成分であり、多発性硬化症、パーキンソン病又

50

は本態性振戦を有する患者における本態性振戦に関連する、ロイシンリッチリピート及び免疫グロブリン様ドメイン含有タンパク質1 (LINGO-1) を対象とする免疫グロブリンをコードし得る。かかる市販の抗体の1つは、オクレリズマブ (Biogen, B I B 0 3 3) である。例えば、米国特許第8, 425, 910号を参照されたい。一実施形態では、核酸構築物は、ALSを有する患者に有用な免疫グロブリン構築物をコードする。好適な抗体の例としては、ALS酵素スーパーオキシドジスムターゼ1 (SOD1) 及びそのバリエーションに対する抗体 (例えば、ALSバリエーションG93A、C4F6 SOD1抗体)、MS785 (ダーリン-1結合領域を対象とする)、神経突起伸長インヒビター (NOGO-A又はレチキュロン4) に対する抗体 (例えば、GSK1223249、オザネズマブ (ヒト化、GSK、多発性硬化症に有用とも記載されている) が挙げられる。核酸配列は、アルツハイマー病を有する患者において有用な免疫グロブリンをコードするように設計又は選択され得る。かかる抗体構築物は、例えば、アデュマヌカブ (Biogen)、バビニューズマブ (Eli Lilly、Aβのアミノ末端を対象とするヒト化mAb)、ソラネズマブ (Eli Lilly、可溶性Aβの中央部分に対するヒト化mAb)、ガンテネルマブ (Chugai及びHoffmann-La Roche、Aβのアミノ末端及び中央部分の両方を対象とする完全ヒトmAbである)、クレネズマブ (Genentech、単量体エピトープ及び構造エピトープに作用するヒト化mAb、Aβのオリゴマー形態及びプロトフィブリル形態を含む)、BAN2401 (Eisai Co., Ltd、Aβプロトフィブリルに選択的に結合するヒト化免疫グロブリンG1 (IgG1) mAb、Aβプロトフィブリルのクリアランスを促進する、及び／又は脳のニューロンに対するそれらの毒性効果を中和すると考えられている)、GSK933776 (Aβのアミノ末端を対象とするヒト化IgG1モノクローナル抗体)、AAB-001, AAB-002, AAB-003 (Fc操作バビニューズマブ)、SAR228810 (プロトフィブリル及び低分子量Aβを対象とするヒト化mAb)、BIB037/BART (不溶性線維ヒトAβに対する完全ヒトIgG1、Biogen Idec)、m266、tg2576などの抗Aβ抗体 (Aβオリゴマーに対して相対的特異性) [Brody and Holtzman, Annu Rev Neurosci, 2008; 31: 175-193] を含む。他の抗体は、ベータアミロイドタンパク質、Aβ、ベータセクレターゼ、及び／又はtauタンパク質を標的としてもよい。更に他の実施形態では、抗βアミロイド抗体は、エフェクター機能を最小限に抑えるためにβアミロイドを標的とするIgG4モノクローナル抗体に由来するか、又はアミロイド関連造影異常 (ARIA) 及び炎症応答を回避するためにFc領域を欠くscFv以外の構築物が選択される。これらの実施形態のいくつかにおいて、scFv構築物の1つ以上の重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域は、本明細書に提供される別の好適な免疫グロブリン構築物において使用される。これらのscFv及び他の操作された免疫グロブリンは、Fc領域を含む免疫グロブリンと比較して、血清中の免疫グロブリンの半減期を減少させ得る。抗アミロイド分子の血清中濃度を減少させることは、血清中の非常に高いレベルの抗アミロイド抗体が、高負荷のアミロイドプラークを伴う脳血管を不安定化させ、血管透過性を引き起こす可能性があるため、ARIAのリスクを更に減少させ得る。パーキンソン病を有する患者の治療のための他の免疫グロブリン構築物をコードする核酸は、例えば、ロイシンリッチリピートキナーゼ2、ダーダリン (dardarin) (LRRK2) 抗体、抗シヌクレイン抗体及びアルファシヌクレイン抗体、並びにDJ-1 (PARK7) 抗体を含む構築物を発現するように操作又は設計され得る。他の抗体としては、PRX002 (Prothena及びRoche) パーキンソン病並びに関連するシヌクレイン病が含まれ得る。これらの抗体、具体的には、抗シヌクレイン抗体は、1つ以上のリソソーム蓄積症の治療にも有用であり得る。

【0124】

dr g 毒性を低減又は防止するために、本明細書に提供されるmiR-182標的及び／又はmiR-183標的配列を含有する発現カセットに操作される、中枢神経系 (CNS) 障害又は疾患 (例えば、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ALS

10

20

30

40

50

又は様々ながんを含む）に関連する状態を治療するための免疫グロブリン構築物をコードする核酸構築物を操作又は選択することができる。かかる免疫グロブリンとしては、ナタリズマブ（ヒト化抗 $\alpha 4$ -インテグリン、iNATA、タイサブリ、Biogen Id ec及びE lan P h a r m a c e u t i c a l s、2006年に承認）、アレムツズマブ（Campath（登録商標）-1H、ヒト化抗CD52）、リツキシマブ（Rit ux in（登録商標）、キメラ抗CD20）、ダクリズマブ（ゼナパックス、ヒト化抗CD25）、オクレリズマブ（ヒト化、抗CD20、Roche）、ウステキヌマブ（CNT O-1275、ヒト抗IL12p40+IL23p40）、抗LINGO-1、抗CD30抗体（例えば、ブレンツキシマブ-ベドチン（Adcentris（登録商標））、及びch5D12（キメラ抗CD40）、並びにrHlgM22（再ミエリン化モノクローナル抗体、A corda及びMayo Foundation for Medical Education and Research）などを含み得るか、又はそれに由来し得る。更に他の抗 $\alpha 4$ -インテグリン抗体、抗CD20抗体（例えば、ofatum umab（Arzerra（登録商標）、Gaztvaro（登録商標）、Gazvva／オビヌツズマブ（obinutuzumab））、Mabthera（登録商標）、抗CD52抗体、抗VEGF又は抗VEGF2抗体（例えば、Cyramza（登録商標）（ラムシルマブ）、抗CD38抗体（例えば、Darzalex（登録商標）（ダラツムマブ）、抗EGFR（例えば、Erb it ux（登録商標）（セツキシマブ）又はVe ct i b i x（登録商標）（パニツムマブ）、抗Her2抗体、例えば、トラスツズマブ又はペルツズマブ、抗PD1抗体（例えば、ニボルマブ）、抗RANKL（例えば、デノスマブ）、抗PD-L1抗体（例えば、アテゾリズマブ）、抗EGFR（例えば、パニツムマブ）、抗CTLA4抗体（例えば、イピムマブ）、抗IL17抗体、抗CD19抗体、抗SEMD4抗体、及びCD40抗体は、本明細書に記載のAAVベクターを介して送達され得る。更に他の免疫グロブリン構築物又はモノクローナル抗体は、本発明での使用のために選択され得る。例えば、US2018／0339065を参照されたく、参照により本明細書に援用される。抗体は、CNS標的化され得るか、又は他の経路を介して送達され得る。

10

20

【0125】

中枢神経系の様々な感染症に対する抗体も、本発明によって企図される。かかる感染性疾患としては、真菌性疾患（例えば、クリプトコッカス髄膜炎、脳膿瘍、脊髄硬膜外感染症、例えば、Cryptococcus neoformans、Coccidioides immitis、Mucorales目、Aspergillus種、及びCandida種によって引き起こされる）、原虫性疾患（トキソプラズマ症、マラリア、及び原発性アメーバ性髄膜脳炎、例えば、病原体Toxoplasma gondii、Taenia solium、Plasmodium falciparum、Spirometra mansonioides（孤虫症）、Echinococcus種（神経包虫症の病因）によって引き起こされる、並びに脳アメーバ症など）、細菌性疾患（例えば、結核、ハンセン病、神経梅毒、細菌性髄膜炎、ライム病（Borrelia burgdorferi）、ロッキー山紅斑熱（Rickettsia rickettsia）、CNSノカルジア症（Nocardia種）、CNS結核（Mycobacterium tuberculosis）、CNSリステリア症（Listeria monocytogenes）、脳膿瘍、及び神経ボレリア症）、ウイルス感染（例えば、ウイルス性髄膜炎、東部ウマ脳炎（EEE）、セントルイス脳炎、ウエストナイルウイルス及び／又は脳炎、狂犬病、カリフォルニア脳炎ウイルス、ラクロス脳炎、麻疹脳炎、灰白髄炎など、これらは、例えば、ヘルペスファミリーウイルス（HSV）、HSV-1、HSV-2（新生児単純ヘルペス脳炎）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、ビッカースタッフ脳炎、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV、TCN-202などがTherac lone Sciencesによって開発中）、ヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）、Bウイルス（herpesvirus simiae）、フラビウイルス脳炎、日本脳炎、マレーバレー熱、JCウイルス（進行性多巣性白質脳症）、

30

40

50

ニパウイルス（N i V）、麻疹ウイルス（亜急性硬化性全脳炎）によって引き起こされ得る）、及び他の感染症（例えば、亜急性硬化性全脳炎、進行性多巣性白質脳症、ヒト免疫不全ウイルス（後天性免疫不全症候群（A I D S））、化膿性連鎖球菌、及び他のβ溶血性連鎖球菌（例えば、小児自己免疫性連鎖球菌感染関連精神神経障害（P A N D A S））及び／又はシデナム舞踏病、並びにギラン・バレー症候群、並びにプリオン）が挙げられ得る。

【0126】

好適な抗体構築物の例としては、例えば、W O 2 0 0 7 / 0 1 2 9 2 4 A 2（2015年1月29日）に記載されているものが挙げられ得る（参照により本明細書に援用される）。

10

【0127】

例えば、本明細書に提供される d r g 標的化配列を含む他の核酸配列は、抗プリオン免疫グロブリン構築物をコードする配列に作動可能に連結され得る。かかる免疫グロブリンは、C D 2 3 0（表面抗原分類230）としても知られている、主要なプリオンタンパク質（P r P、プリオンタンパク質又はプロテアーゼ耐性タンパク質に関して）を対象とし得る。P r Pのアミノ酸配列は、例えば、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000302に提供されている（参照により本明細書に援用される）。タンパク質は、複数のアイソフォーム（正常なP r P C、疾患を引き起こすP r P S c、及びミトコンドリアに位置するアイソフォーム）で存在し得る。ミスフォールドしたバージョンのP r P S cは、様々な認知障害及び神経変性疾患（例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病、ウシ海綿状脳症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症候群、致死性家族性不眠症、及びクールー病）に関連している。

20

【0128】

好適な遺伝子産物の例としては、家族性高コレステロール血症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症、及び希少疾患又は孤児疾患の治療に有用な治療遺伝子（複数可）のコード配列に作動可能に連結される本明細書に提供される m i R - 1 8 2 / m i R - 1 8 3 標的配列を含むベクターゲノムから発現されたものが含まれ得る。かかる希少疾患の例としては、脊髄性筋萎縮症（S M A）、ハンチントン病、レット症候群（例えば、メチル-C p G 結合タンパク質2（M e C P 2）、U n i P r o t K B - P 5 1 6 0 8）、アンジェルマン病（例えば、E 6 A Pとしても知られるユビキチン-タンパク質リガーゼ E 3 A（U B E 3 A）、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、フリードライヒ運動失調症（例えば、フラタキシン）、プログラニューリン（P R G N）（前頭部認知症（F T D）、進行性非流暢性失語症（P N F A）、及び意味認知症を含む非アルツハイマー性脳変性に関連する）などが挙げられる。他の有用な遺伝子産物としては、カルバモイルシンセターゼ I、オルニチントランスカルバミラーゼ（O T C）、アルギノコハク酸シンテターゼ、アルギノコハク酸リアーゼ欠乏症の治療のためのアルギノコハク酸リアーゼ（A S L）、アルギナーゼ、フマル酢酸ヒドロラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、アルファー1アンチトリプシン、アカゲザルアルファーフェトプロテイン（A F P）、アカゲザル絨毛性ゴナドトロピン（C G）、グルコース-6-ホスファターゼ、ポリヒビリノーゲンデアミナーゼ、シスタチオンベーターシンターゼ、分枝鎖ケト酸デカルボキシラーゼ、アルブミン、イソバレリル-c o A デヒドロゲナーゼ、プロピオニル C o A カルボキシラーゼ、メチルマロニル C o A ムターゼ、グルタリル C o A デヒドロゲナーゼ、インスリン、ベーターグルコシダーゼ、ピルビン酸カルボキシレート、肝ホスホリラーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシンデカルボキシラーゼ、H-タンパク質、T-タンパク質、嚢胞性線維症膜貫通制御因子（C F T R）配列、及びジストロフィン遺伝子産物〔例えば、ミニ-又はマイクロ-ジストロフィン〕が挙げられる。更に他の有用な遺伝子産物は、酵素補充療法に有用であり得るような酵素を含み、これは酵素の不十分な活性に起因する様々な状態において有用である。例えば、マンノース-6-リン酸を含む酵素は、リソソーム蓄積症の治療に利用され得る（例えば、好適な遺伝子は、β-グルクロニダーゼ（G U S B）をコードする遺伝子を含む）。

30

40

50

【0129】

本明細書に提供されるm i R標的化配列を有するr A A V含有ベクターゲノムを介して送達され得る更なる例示的な遺伝子としては、限定されないが、グルコースー6ーホスファターゼ（糖原病又は1 A型欠損症（G S D 1）に関連する）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（P E P C K、P E P C K欠損症に関連する、サイクリン依存性キナーゼ様5（C D K L 5、発作及び重度神経発達障害に関連するセリン／スレオニンキナーゼ9（S T K 9）としても知られる、ガラクトースー1ーリン酸ウリジルトランスフェラーゼ（ガラクトース血症に関連する）、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（フェニルケトン尿症（P K U）に関連する）、分岐鎖αケト酸脱水素酵素（メープルシロップ尿症に関連する）、フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ（チロシン血症1型に関連する）、メチルマロニルC o Aムターゼ（メチルマロン酸血症に関連する）、中鎖アシルC o Aデヒドロゲナーゼ（中鎖アシルC o Aデヒドロゲナーゼ欠損症に関連する）、オルニチントランスカルバミラーゼ（O T C、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に関連する）、アルギニノコハク酸シンテターゼ（A S S 1、シトルリン血症に関連する）、レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（L C A T、欠乏症）、メチルマロン酸血症（M M A）、ニーマン・ピック病、C 1型）、プロピオン酸血症（P A）、低密度リポタンパク質受容体（L D L R）タンパク質（家族性高コレステロール血症（F H）に関連する）、UDPーグルクロノシルトランスフェラーゼ（クリグラー・ナジャー病に関連する）、アデノシンデアミナーゼ（重症複合免疫不全症に関連する）、ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（痛風及びレッシュ・ナイハン症候群に関連する）、ビオチミダーゼ（ビオチミダーゼ欠損症に関連する）、アルファーガラクトシダーゼA（aーG a l A、ファブリー病に関連する）、A T P 7 B（ウィルソン病に関連する）、ベーターグルコセレブロシダーゼ（ゴーシェ病2型及び3型に関連する）、ペルオキシソーム膜タンパク質7 0 k D a（ツェルウェーガー症候群に関連する）、アリアルスルファターゼA（A R S A、異染性白質ジストロフィーに関連する）、ガラクトセレブロシダーゼ（G A L C、クラッペ病に関連する酵素）、アルファーグルコシダーゼ（G A A、ポンペ病に関連する）、スフィンゴミエリナーゼ（S M P D 1、ニーマン・ピック病A型に関連する遺伝子）、アルギニノコハク酸シンターゼ（成人発症I I型シトルリン血症（C T L N 2）に関連する）、カルバモイルリン酸シンターゼ1（C P S 1、尿素サイクル異常症に関連する）、生存運動ニューロン（S M N）タンパク質（脊髄性筋萎縮症に関連する）、セラミダーゼ（ファーバー脂肪肉芽腫症に関連する）、bーヘキソサミニダーゼ（G M 2ガングリオシドーシス及びテイ・サックス病及びサンドホフ病に関連する）、アスパルチルグルコサミニダーゼ（アスパルチルグルコサミン尿症に関連する）、aーフコシダーゼ（フコシドーシスに関連する）、αーマンノシダーゼ（アルファーマンノシドーシスに関連する）、ボルホビリノーゲンデアミナーゼ（急性間欠性ポルフィリン症（A I P）に関連する）、アルファー1アンチトリプシン（アルファー1アンチトリプシン欠損症（肺気腫）の治療用）、エリスロポエチン（サラセミア又は腎不全による貧血の治療用）、血管内皮増殖因子、アンジオポエチンー1、及び線維芽細胞増殖因子（虚血性疾患の治療用）、トロンボモジュリン及び組織因子経路阻害因子（例えば、アテローム性動脈硬化症、血栓症、又は塞栓症で見られる閉塞した血管の治療用）、芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ（A A D C）及びチロシンヒドロキシラーゼ（T H）（パーキンソン病の治療用）、ベータアドレナリン受容体、ホスホランバンに対するアンチセンス若しくはその変異体、筋（小胞体）アデノシントリホスファターゼー2（S E R C A 2）、及び心臓アデニル酸シクラーゼ（うっ血性心不全の治療用）、腫瘍抑制因子遺伝子（p 5 3など、様々ながんの治療用）、サイトカイン（様々なインターロイキンのうちの炎症性及び免疫障害及びがんの治療用のものなど）、ジストロフィン若しくはミニジストロフィン及びユートロフィン若しくはミニユートロフィン（筋ジストロフィーの治療用）、並びにインスリン又はG L Pー1（糖尿病の治療用）から選択される遺伝子と作動可能に連結される。更なる目的の遺伝子及び疾患としては、例えば、遺伝性感覚及び自律神経失調症V I型などのジストニン遺伝子関連疾患（D S T遺伝子はジストニンをコードする、タンパク質のサイズ（約

10

20

30

40

50

7570aa)により必要とされ得るデュアルAAVベクター、痛みを感じることができなくなる機能変異体の欠失、及び肢端紅痛症などの痛み状態を引き起こす機能変異体の獲得などのSCN9A関連疾患を含む。別の状態は、NEFL遺伝子(ニューロフィラメント軽鎖)における変異によるCharcot-Marie-Tooth 1F型及び2E型であり、可変性の臨床的及び電気生理学的発現を伴う進行性末梢運動及び感覚性ニューロパシーによって特徴付けられる。特定の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、ムコ多糖症(MPS)障害の治療において使用され得る。かかるベクターは、MPS I(ハーラー、ハーラー・シャイエ及びシャイエ症候群)を治療するための α -L-イズロニダーゼ(IDUA)をコードする核酸配列、MPS II(ハンター症候群)を治療するためのイズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)をコードする核酸配列、MPS III A、B、C、及びD(サンフィリップ症候群)を治療するためのスルファミダーゼ(sulfamidase)(SGSH)をコードする核酸配列、MPS IV A及びB(モルキオ症候群)を治療するためのN-アセチルガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ(GALNS)をコードする核酸配列、MPS VI(マロトー・ラミー症候群)を治療するためのアリアルスルファターゼB(ARSB)をコードする核酸配列、MPS VII(ヒアルロニダーゼ欠損症)を治療するためのヒアルロニダーゼをコードする核酸配列、並びにMPS VIII(スライ症候群)を治療するためのベータグルクロニダーゼをコードする核酸配列を運ぶことを含み得る。例えば、www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php;rarediseases.info.nih.gov/diseasesを参照されたい。

10

20

【0130】

m i R 標的化配列に作動可能に連結され得る発現カセット又はベクターゲノム中の他の好適な遺伝子の例としては、例えば、ホルモン並びに増殖因子及び分化因子を挙げることができ、限定されないが、インスリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1(GLP1)、成長ホルモン(GH)、副甲状腺ホルモン(PTH)、成長ホルモン放出因子(GRF)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオポエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)、エリスロポエチン(EPO)(例えば、ヒト、イヌ、又はネコepoを含む)、結合組織増殖因子(CTGF)、神経栄養因子、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)、上皮増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、インスリン様増殖因子I及びII(IGF-I及びIGF-II)、トランスフォーミング増殖因子 α スーパーファミリーのうちのいずれか1つ(TGF α 、アクチビン、インヒビンを含む)、又は骨形成タンパク質(BMP) BMP 1~15のうちのいずれか、成長因子のヘレグリン/ニューレグリン/ARIA/neu分化因子(NDF)ファミリーの増殖因子のうちのいずれか1つ、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィンNT-3及びNT-4/5、毛様体神経栄養因子(CNTF)、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、ニュールツリン、アグリニン、セマフォリン/コラプシンのファミリーのうちのいずれか1つ、ネトリン1及びネトリン2、肝細胞増殖因子(HGF)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグ、及びチロシンヒドロキシラーゼが挙げられ得る。

30

40

【0131】

他の有用な導入遺伝子産物としては、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン(IL)、IL-1~IL-36(例えば、ヒトインターロイキンIL-1、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、IL-11、IL-12、IL-13、IL-18、IL-31、IL-35)、単球走化性タンパク質、白血病阻害因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、Fasリガンド、腫瘍壊死因子 α 及び β 、インターフェロン α 、 β 、及び γ 、幹細胞因子、flk-2/flt3リガンドなどのサイトカイン並びにリンホカインを含むがこれらに限定されない免疫系を制御するタンパク質が含まれる。免疫系によって産生される遺伝子産物も本発明

50

において有用である。これらには、免疫グロブリン I g G、I g M、I g A、I g D、及び I g E、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、一本鎖抗体、T細胞受容体、キメラT細胞受容体、一本鎖T細胞受容体、クラスI及びクラスII MHC分子、並びに操作された免疫グロブリン及びMHC分子が含まれるがこれらに限定されない。例えば、特定の実施形態では、rAAV抗体は、例えば、抗I g E、抗IL31、抗CD20、抗NGF、抗GnRHなどのイヌ又はネコ抗体を送達するように設計され得る。有用な遺伝子産物としては、補体調節タンパク質、膜補因子タンパク質(MCP)、崩壊促進因子(DAF)、CR1、CF2、CD59、及びC1エステラーゼ阻害剤(C1-INH)などの補体制御性タンパク質も含まれる。更に他の有用な遺伝子産物としては、ホルモン、成長因子、サイトカイン、リンホカイン、制御性タンパク質、及び免疫系タンパク質の受容体のうちのいずれか1つが含まれる。本発明は、低密度リポタンパク質(LDL)受容体、高密度リポタンパク質(HDL)受容体、超低密度リポタンパク質(VLDL)受容体、及びスカベンジャー受容体を含む、コレステロール制御及び／又は脂質調節のための受容体を包含する。本発明はまた、糖質コルチコイド受容体及びエストロゲン受容体、ビタミンD受容体及び他の核受容体を含むステロイドホルモン受容体スーパーファミリーのメンバーなどの遺伝子産物を包含する。加えて、有用な遺伝子産物としては、jun、fos、max、mad、血清応答因子(SRF)、AP-1、AP2、myb、MyoD及びミオゲニンなどの転写因子、タンパク質を含むETSボックス、TFE3、E2F、ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ZF5、NFAT、CREB、HNF-4、C/EBP、SP1、CCAATボックス結合タンパク質、インターフェロン制御因子(IRF-1)、ウィルス腫瘍タンパク質、ETS結合タンパク質、STAT、GATAボックス結合タンパク質、例えばGATA-3、並びに翼状螺旋タンパク質のフォークヘッドファミリーが含まれる。

10

20

30

40

50

【0132】

dr g-脱標的化配列は、遺伝子編集のための送達ベクターにおいて使用され得る。dr g-脱標的化配列は、ヌクレアーゼの下流に送達され得る。一実施形態では、コード配列は、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様(TAL)エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、及びクラスター化された規則的な間隔の短い回文反復(CRISPR)/エンドヌクレアーゼ(Cas9、Cpf1など)から選択されるヌクレアーゼをコードする。好適なメガヌクレアーゼの例は、例えば、米国特許8,445,251号、同第9,340,777号、同第9,434,931号、同第9,683,257号、及びWO2018/195449に記載されている。他の好適な酵素としては、核酸プログラム様式でRNAに結合することができるヌクレアーゼ不活性S. pyogenes CRISPR/Cas9(Nelles et al, Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9, Cell, 165(2):P488-96(April 2016))、及び塩基エディター(例えば、Levy et al. Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses, Nature Biomedical Engineering, 4, 97-110(Jan 2020))が挙げられる。特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼではない。特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、CRISPR関連ヌクレアーゼではない。特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、TALENではない。一実施形態では、ヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼではない。特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、ホーミングエンドヌクレアーゼのLAGLIDADG(配列番号24)ファミリーのメンバーである。特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、22塩基対認識配列配列番号25-CAAAACGTCGTGAGACAGTTTGを認識し、切断する、ホーミングエンドヌクレアーゼのI-CreIファミリーのメンバーである。例えば、WO2009/059195を参照されたい。I-CreI及び他のホーミングエンドヌクレアーゼを包括的に再設計し

て、哺乳動物、酵母、植物、細菌、及びウイルスゲノムにおける部位を含む、広範に分散したDNA部位を標的とすることができる、モノ-LAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼを合理的に設計するための方法が記載された(WO2007/047859)。

【0133】

好適な遺伝子編集標的としては、例えば、限定されないが、肝臓発現遺伝子、例えば、プロプロテイン変換酵素サブチリシン／ケキシニン9型(PCSK9)(コレステロール関連障害)、トランスサイレチン(TTR)(トランスサイレチンアミロイドーシス)、HАО、アポリポタンパク質C-I-II(APOC3)、第V-I-II因子、第IX因子、低密度リポタンパク質受容体(LDLr)、リポタンパク質リパーゼ(LPL)(リポタンパク質リパーゼ欠損症)、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)、カルノシナーゼ(CN1)、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ(SMPD1)(ニーマン・ピック病)、次亜酸グアニンホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)、分岐アルファ-ケト酸デヒドロゲナーゼ(BCKDC)複合体(マップルシン病)、エリスロポエチン(EPO)、カルバミルホスフェートシンテターゼ(CPS1)、N-アセチルグルタミン酸シンテラーゼ(NAGS)、アルギニノコハク酸シンテラーゼ(シトルリン血症)、アルギノコハク酸リアーゼ(ASL)(アルギニノコハク酸尿症)、及びアルギナーゼ(AG)が挙げられる。

10

【0134】

他の編集遺伝子標的としては、例えば、ヒドロキシメチルピランシンターゼ(HMBS)、カルバモイルシンセターゼI、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)、アルギノコハク酸シンテターゼ、アルグノコハク酸リアーゼ(argunosuccinate lyase)欠乏症の治療のためのアルギノコハク酸リアーゼ(ASL)、アルギナーゼ、フマル酢酸ヒドロラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、アルファ-1アンチトリプシン、アカゲザルアルファ-フェトプロテイン(AFP)、アカゲザル絨毛性ゴナドトロピン(CG)、グルコース-6-ホスファターゼ、ポリホビリノーゲンデアミナーゼ、シスタチオンベーターシンターゼ、分枝鎖ケト酸デカルボキシラーゼ、アルブミン、イソバレリル-CoAデヒドロゲナーゼ、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ、メチルマロニルCoAムターゼ、グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ、インスリン、ベーターグルコシダーゼ、ピルビン酸カルボキシレート、肝ホスホリラーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシンデカルボキシラーゼ、H-タンパク質、T-タンパク質、嚢胞性線維症膜貫通制御因子(CFTR)配列、及びジストロフィン遺伝子産物[例えば、ミニ-又はマイクロジストロフィン]が挙げられ得る。更に他の有用な遺伝子産物は、酵素補充療法に有用であり得るような酵素を含み、これは酵素の不十分な活性に起因する様々な状態において有用である。例えば、マンノース-6-リン酸を含む酵素は、リソソーム蓄積症の治療に利用され得る(例えば、好適な遺伝子は、 β -グルクロニダーゼ(GUSB)をコードする遺伝子を含む)。別の例では、遺伝子産物は、ユビキチンタンパク質リガーゼ、グルコース-6-ホスファターゼ(糖原病又は1A型欠損症(GSD1)に関連する)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK、PEPCK欠損症に関連する、サイクリン依存性キナーゼ様5(CDKL5、発作及び重度神経発達障害に関連するセリン／スレオニンキナーゼ9(STK9)としても知られる、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ(ガラクトース血症に関連する)、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PAH)(フェニルケトン尿症(PKU)に関連する)、ヒドロキシ酸オキシダーゼ1(GO/HAO1)及びAGXTを含む1型原発性高酸素血症に関連する遺伝子産物、BCKDH、BCKDH-E2、BAKDH-E1a、及びBAKDH-E1bを含む分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素(メープルシロップ尿症に関連する)、フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ(チロシン血症1型に関連する)、メチルマロニルCoAムターゼ(メチルマロン酸血症に関連する)、中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ(中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ欠損症に関連する)、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC、

20

30

40

50

オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に関連する)、アルギニノコハク酸シンターゼ (ASS1、シトルリン血症に関連する)、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT、欠乏症)、メチルマロン酸血症 (MMA)、NPC1ニーマン・ピック病、C1型に関連する)、プロピオン酸血症 (PA)、TTR (トランスチレチン (TTR) 関連遺伝性アミロイドーシスに関連する)、低密度リポタンパク質受容体 (LDLR) タンパク質 (家族性高コレステロール血症 (FH) に関連する)、LDLRバリエーション (例えばWO2015/164778に記載)、PCSK9、ApoE及びApoCタンパク質 (認知症に関連する)、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (クリグラー・ナジャー病に関連する)、アデノシンデアミナーゼ (重症複合免疫不全症に関連する)、ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (痛風及びレッシュ・ナイハン症候群に関連する)、ピオチミダーゼ (ピオチミダーゼ欠損症に関連する)、アルファ-ガラクトシダーゼA (α-Gal A、ファブリー病に関連する)、ベータ-ガラクトシダーゼ (GLB1) (GM1ガングリオシドーシスに関連する)、ATP7B (ウィルソン病に関連する)、ベータ-グルコセレブロシダーゼ (ゴーシェ病2型及び3型に関連する)、ペルオキシソーム膜タンパク質70kDa (ツェルウェーガー症候群に関連する)、アリアルスルファターゼA (ARSA、異染性白質ジストロフィーに関連する)、ガラクトセレブロシダーゼ (GALC、クラッペ病に関連する酵素)、アルファ-グルコシダーゼ (GAA、ポンペ病に関連する)、スフィンゴミエリナーゼ (SMPD1、ニーマン・ピック病A型、ニーマン・ピック病B型、ニーマン・ピック病C型に関連する遺伝子)、アルギニノコハク酸シンターゼ (成人発症II型シトルリン血症 (CTLN2) に関連する)、カルバモイルリン酸シンターゼ1 (CPS1、尿素サイクル異常症に関連する)、生存運動ニューロン (SMN) タンパク質 (脊髄性筋萎縮症に関連する)、セラミダーゼ (ファバー脂肪肉芽腫症に関連する)、b-ヘキソサミニダーゼ (GM2ガングリオシドーシス及びテイ・サックス病及びサンドホフ病に関連する)、アスパルチルグルコサミニダーゼ (アスパルチルグルコサミン尿症に関連する)、α-フコシダーゼ (フコシドーシスに関連する)、α-マンノシダーゼ (アルファ-マンノシドーシスに関連する)、ボルホビリノーゲンデアミナーゼ (急性間欠性ポルフィリン症 (AIP) に関連する)、アルファ-1アンチトリプシン (アルファ-1アンチトリプシン欠損症 (肺気腫) の治療用)、エリスロポエチン (サラセミア又は腎不全による貧血の治療用)、血管内皮増殖因子、アンジオポエチン-1、及び線維芽細胞増殖因子 (虚血性疾患の治療用)、トロンボモジュリン及び組織因子経路阻害因子 (例えば、アテローム性動脈硬化症、血栓症、又は塞栓症で見られる閉塞した血管の治療用)、芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ (AADC) 及びチロシンヒドロキシラーゼ (TH) (パーキンソン病の治療用)、パーキンソン病の治療用PRKN、ベータアドレナリン受容体、ホスホランバンに対するアンチセンス若しくはその変異体、筋 (小胞体) アデノシントリホスファターゼ-2 (SERCA2)、及び心臓アデニル酸シクラーゼ (うっ血性心不全の治療用)、腫瘍抑制因子遺伝子 (p53など、様々ながんの治療用)、サイトカイン (様々なインターロイキンのうちの炎症性及び免疫障害及びがんの治療用のものなど)、ジストロフィン若しくはミニジストロフィン及びユートロフィン若しくはミニユートロフィン (筋ジストロフィーの治療用)、並びにインスリン又はGLP-1 (糖尿病の治療用) から選択される遺伝子と作動可能に連結される。

10

20

30

40

【0135】

タンパク質、ペプチド、又はポリペプチド (例えば、免疫グロブリンとして) の配列決定方法は、当業者に既知である。タンパク質の配列が分かると、ウェブベース及び市販のコンピュータプログラム、並びにアミノ酸配列を核酸コード配列に逆翻訳するサービスベースの企業が存在する。例えば、EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/st/で利用可能)、Gene Infinity (geneinfinity.org/sms/sms_backtranslation.htmlで利用可能)、Expasy (expasy.org/tools/で利用可能) による逆翻訳配列を参照されたい。一実施形態では、RNA及び/又はcDNAコード配列は、ヒト細胞における最

50

適な発現のために設計される。

【0136】

特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、髄腔内又は全身的遺伝子療法投与後の神経変性を調節する、及び／又は二次的な背側脊髄軸索変性を減少させるための方法に有用である。したがって、本明細書に提供される組成物は、CNSへの遺伝子療法の送達に特に有用であるが、それらは、例えば、高用量の遺伝子療法がDRG形質導入及び毒性をもたらし得る全身IV送達を含む、他の送達経路にも有用であり得る。方法は、導入遺伝子及びmiRNA標的を含む発現カセット又はベクターゲノムを含む組成物を患者に送達することを伴う。

【0137】

特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、DRGにおける導入遺伝子発現を抑制する方法に有用である。特定の実施形態では、方法は、DRGにおける導入遺伝子の発現レベルを抑制するために、miR-183標的配列を含む発現カセット又はベクターゲノムを送達することを含む。特定の実施形態では、方法は、DRGにおける導入遺伝子発現を抑制するのに有用な発現カセット又はベクターゲノムを送達することを含み、発現カセット又はベクターゲノムは、少なくとも2個のmiR-183標的配列、少なくとも3個のmiR-183標的配列、少なくとも4個のmiR-183標的配列、少なくとも5個のmiR-183標的配列、少なくとも6個のmiR-183標的配列、又は少なくとも7個のmiR-183標的配列を含む。特定の実施形態では、方法は、DRGにおける導入遺伝子発現を抑制するのに有用な発現カセット又はベクターゲノムを送達することを含み、発現カセット又はベクターゲノムは、8つのmiR-183標的配列を含む。特定の実施形態では、方法は、錐体ニューロン、プルキンエニューロン、顆粒細胞、紡錘ニューロン、介在神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、及び／又は上皮細胞のうちの1つ以上から選択される、CNSに存在する1つ以上の細胞における発現を増強する。

【0138】

特定の実施形態では、網膜、内耳、及び嗅覚受容器の下位運動ニューロンにおける導入遺伝子の発現を送達及び／又は増強するのに有用な方法が提供され、1つ以上のmiR-183標的配列及び／又は複数のmiR-183標的配列に作動可能に連結された導入遺伝子を含む発現カセット又はベクターゲノムを送達することを含む。特定の実施形態では、細胞又は組織は、肝臓又は心臓のうちの1つ以上であり得る。

【0139】

更に別の実施形態では、CNSに存在する細胞に発現カセット又はベクターゲノムを送達することを含む方法が提供され、発現カセット又はベクターゲノムは、1つ以上のmiR-183標的配列を含み、トランス遺伝子（すなわち、異種遺伝子産物をコードする配列）を欠く。かかる実施形態では、CNSの細胞へのmiR-183の送達が達成される。特定の実施形態では、miR-183配列を含む発現カセット又はベクターゲノムの送達は、DRG発現の抑制及びCNSに存在する特定の他の細胞における遺伝子発現の増強をもたらす。

【0140】

特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、CNS以外の細胞における導入遺伝子の発現を増強するための方法に有用である。特定の実施形態では、CNS以外の細胞における発現を増強する方法は、miR-182標的配列を含む発現カセット又はベクターゲノムを患者に送達することを含む。

【0141】

一実施形態では、懸濁液は、約6.8～約7.32のpHを有する。

【0142】

これらの用量及び濃度の送達のために好適な体積は、当業者によって決定され得る。例えば、約1µL～150mLの容量が選択されてもよいが、より高容量が、成人用に選択されてもよい。典型的には、新生児のために、好適な体積は、約0.5mL～約10mL

10

20

30

40

50

、より年長の乳児のために、約 0.5 mL ~ 約 1.5 mL が選択され得る。幼児のために、約 0.5 mL ~ 約 2.0 mL の体積が選択され得る。小児のために、最大約 3.0 mL の体積が選択され得る。10 代前半及び 10 代のために、最大約 5.0 mL の体積が選択され得る。更に他の実施形態では、患者は、約 5 mL ~ 約 1.5 mL の体積での髄腔内投与を受けてもよく、これが選択されるか、又は約 7.5 mL ~ 約 1.0 mL を受けてもよい。他の適切な体積及び投薬量が決定され得る。投薬量を調整して、任意の副作用に対する治療的利益のバランスをとり、かかる投薬量は、組換えベクターが利用される治療適用に応じて変化し得る。

【0143】

一実施形態では、本明細書に記載の rAAV を含む組成物は、脳質量 1 グラム当たり約 1×10^9 GC ~ 脳質量 1 グラム当たり約 1×10^{14} GC の用量で投与される。特定の実施形態では、rAAV は、体重 1 kg 当たり約 1×10^9 GC ~ 体重 1 kg 当たり約 1×10^{13} GC の用量で全身に同時投与される。

10

【0144】

一実施形態では、対象は、治療有効量の本明細書に記載の発現カセットを送達される。本明細書で使用される場合、「治療有効量」は、標的細胞に送達し、標的細胞で発現させ、DRG 発現を特異的に脱標的化する遺伝子産物及び miRNA 標的配列をコードする核酸配列を含む発現カセットの量を指す。

【0145】

様々な病態の治療のために送達するための rAAV の使用は、以前に記載されている。これらの rAAV の発現カセットは、例えば、DRG における導入遺伝子の発現を低減する、並びに／又は DRG 毒性及び／若しくは軸索障害を低減若しくは排除するように、本明細書に記載の 8 つの miRNA 標的配列（例えば、miR-183 標的配列、miR-182 標的配列、又はそれらの組み合わせを含む）を含むように修飾され得る。miRNA 標的配列を含むように修飾され得る rAAV ベクターゲノムの例としては、WO2017/136500 (MPSI)、WO2017/181113 (MPSII)、WO2019/108857 (MPSIIIA)、WO2019/108856 (MPSIIIB)、MPSIV、MPSVII、WO2017/106354 (SMN1)、WO2018/160585 (SMN1) に記載の遺伝子、CLN1、CLN2、CLN3、CLN4、CLN5、CLN6、CLN8（例えば、WO2018/209205 (バッテン病)）、WO2015/164723 (抗 HER2 抗体の AAV 媒介性送達を参照されたい) によって引き起こされるバッテン病を含む。

20

30

【0146】

他の好適な導入遺伝子としては、例えば、WO2015/138348 (OTC)、WO2015/164778 (FH の LDLR バリエーション)、WO2017/106345 (Crigler-Najjar)、WO2017/106326 (抗 PCSK9 Ab)、WO2017/180857 (血友病 A、第 VII 因子)、WO2017/180861 (血友病 B、第 IX 因子)、並びに筋細管ミオパチーの治療用の試験におけるベクター (AT132、AAV8、Audentes など) が挙げられ得る。

【0147】

本明細書に記載の導入遺伝子及び複数の miRNA 標的配列を含む発現カセット又はベクターゲノムは、本明細書に記載されるように生成され得る。特定の実施形態では、8 つの miRNA 標的化配列（例えば、 $4 \times$ miR-182 標的化配列 + $4 \times$ miR-183 標的化配列、又は他の組み合わせ）を含む発現カセットは生成され得る。他の実施形態では、miRNA 標的化配列の様々な組み合わせが生成され得る。好適には、これらの発現カセット及びベクターゲノムは、好適なウイルス（例えば、AAV）キャプシドにパッケージングされる。

40

【0148】

特定の実施形態では、AAV、アルファレーイズロニダーゼ (AAV、IDUA) 遺伝子療法ベクターは、IDUA 遺伝子のコード配列（例えば、配列番号 15 の nt 193

50

8～3908を参照されたい)に作動可能に連結されたmiRNA183クラスター(miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む)の8つのmiR標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー(同じであってもよく、又は互いに異なってもよい)によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の複数のコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの単一のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの2つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183クラスターメンバーの3つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183クラスターの2つ以上のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

10

【0149】

特定の実施形態では、AAV・イズロン酸-2-スルファターゼ(AAV・IDS)遺伝子療法ベクターは、IDS遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183クラスター(miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む)の8つのmiR標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー(同じであってもよく、又は互いに異なってもよい)によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の3～6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの単一のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの2つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183クラスターメンバーの3つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183クラスターの2つ以上のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

20

30

【0150】

特定の実施形態では、AAV・N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ(AAV・SGSH)遺伝子療法ベクターは、SGSH遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183クラスター(miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む)の8つのmiR標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー(同じであってもよく、又は互いに異なってもよい)によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の3～6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183クラスターのメンバーに対応する追加の標的

40

50

配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスタメンバーの単一のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスタメンバーの2つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183 クラスタメンバーの3つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183 クラスタの2つ以上のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

【0151】

特定の実施形態では、AAV.N-アセチル-アルファ-D-グルコサミニダーゼ (AAV.NAGLU) 遺伝子療法ベクターは、NAGLU 遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183 クラスタ (miR-182 標的配列、及びmiR-183 標的配列、又はそれらの組み合わせを含む) の8つのmiR 標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR 標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スペーサー (同じであってもよく、又は互いに異なってもよい) によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスタ標的配列の3~6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183 クラスタメンバーに少なくとも約80%~約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183 標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183 クラスタのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスタメンバーの単一のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスタメンバーの2つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183 クラスタメンバーの3つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183 クラスタの2つ以上のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

【0152】

特定の実施形態では、AAV.生存運動ニューロン1 (AAV.SMN1) 遺伝子療法ベクターは、SMN1 遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183 クラスタ (miR-182 標的配列、及びmiR-183 標的配列、又はそれらの組み合わせを含む) の8つのmiR 標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR 標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スペーサー (同じであってもよく、又は互いに異なってもよい) によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスタ標的配列の3~6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183 クラスタメンバーに少なくとも約80%~約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183 標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183 クラスタのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスタメンバーの単一のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスタメンバーの2つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183 クラスタメンバーの3つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183 クラスタの2つ以上のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

【0153】

特定の実施形態では、AAV.トリペプチジルペプチダーゼ1 (AAV.TPP1) 遺

10

20

30

40

50

伝子療法ベクターは、TPP1遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183クラスター（miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む）の8つのmiR標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー（同じであってもよく、又は互いに異なってもよい）によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の複数のコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの単一のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの2つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183クラスターメンバーの3つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183クラスターの2つ以上のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

10

【0154】

特定の実施形態では、AAV．抗ヒト上皮増殖因子受容体2抗体（AAV．抗HER2）遺伝子療法ベクターは、抗HER2抗体のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183クラスター（miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む）の8つのmiR標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー（同じであってもよく、又は互いに異なってもよい）によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の3～6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの単一のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの2つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183クラスターメンバーの3つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183クラスターの2つ以上のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

20

30

【0155】

特定の実施形態では、AAV．オルニチントランスカルバミラーゼ（AAV．OTC）遺伝子療法ベクターは、OTC遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183クラスター（miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む）の8つのmiR標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー（同じであってもよく、又は互いに異なってもよい）によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の3～6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し

40

50

得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスターメンバーの単一のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスターメンバーの2つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183 クラスターメンバーの3つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183 クラスターの2つ以上のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

【0156】

特定の実施形態では、AAV、低密度リポタンパク質受容体(AAV、LDLR)遺伝子療法ベクターは、LDLR遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiRNA183 クラスター(miR-182 標的配列、及びmiR-183 標的配列、又はそれらの組み合わせを含む)の8つのmiR 標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR 標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スペーサー(同じであってもよく、又は互いに異なってもよい)によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスター標的配列の3~6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183 クラスターメンバーに少なくとも約80%~約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183 標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183 クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスターメンバーの単一のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスターメンバーの2つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183 クラスターメンバーの3つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183 クラスターの2つ以上のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

【0157】

特定の実施形態では、AAV、ウリジンニリン酸グルクロノシルトランスフェラーゼ1A1(AAV、UGT1A1)遺伝子療法ベクターは、UGT1A1遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183 クラスター(miR-182 標的配列、及びmiR-183 標的配列、又はそれらの組み合わせを含む)の8つのmiR 標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR 標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スペーサー(同じであってもよく、又は互いに異なってもよい)によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスター標的配列の3~6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183 クラスターメンバーに少なくとも約80%~約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183 標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183 クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスターメンバーの単一のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183 クラスターメンバーの2つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183 クラスターメンバーの3つのmiR 標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスペーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183 クラスターの2つ以上のmiR 標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

【0158】

特定の実施形態では、AAV．抗プロタンパク質転換酵素サブチリシン、／ケキシシ9型抗体（AAV．抗PCSK9 Ab）遺伝子療法ベクターは、抗PCSK9 Ab遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183クラスター（miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む）の8つのmiR標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー（同じであってもよく、又は互いに異なってもよい）によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の3～6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの単一のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの2つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183クラスターメンバーの3つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183クラスターの2つ以上のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

10

20

【0159】

特定の実施形態では、AAV．因子VIIII（AAV．FVIIII）遺伝子療法ベクターは、FVIIII遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183クラスター（miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む）の8つの標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー（同じであってもよく、又は互いに異なってもよい）によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の3～6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2、3、又は4つのコピーを含む。かかるベクターゲノムは、任意選択的に、miR-183クラスターのメンバーに対応する追加の標的配列を含有し得る。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの単一のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスターメンバーの2つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも1つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターは、miR-183クラスターメンバーの3つのmiR標的配列、及び任意選択的に、少なくとも2つのスパーサーを含有する。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、互いに配列が異なるmiR-183クラスターの2つ以上のmiR標的配列を含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターゲノムは、非AAVベクターによって担持される。

30

40

【0160】

特定の実施形態では、AAV．因子IX（AAV．IX）遺伝子療法ベクターは、FIX遺伝子のコード配列に作動可能に連結されたmiR-183クラスター（miR-182標的配列、及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせを含む）の8つのmiR標的配列を含むベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、同じmiR標的配列の複数のコピーを含み、各々は、スパーサー（同じであってもよく、又は互いに異なってもよい）によって分離されている。別の実施形態では、ベクターゲノムは、miR-183クラスター標的配列の3～6つのコピーを含み、任意選択的に、標的配列のうちの1つ以上は、miR-183クラスターメンバーに少なくとも約80%～約99%相補的である。別の実施形態では、ベクターは、miR-183標的配列の1、2

50

10

20

30

40

50

0.1^1 GC/g 、約 $4.0 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $4.5 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $5.0 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $5.5 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $6.0 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $6.5 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $7.0 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $7.5 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $8.0 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $8.5 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $9.0 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $9.5 \times 10^{11} \text{ GC/g}$ 、約 $1.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $1.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $2.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $3.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $3.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $4.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $4.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $5.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $5.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $6.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $6.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $7.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $7.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $8.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $8.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $9.0 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $9.5 \times 10^{12} \text{ GC/g}$ 、約 $1.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $1.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $2.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $2.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $3.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $3.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $4.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $4.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $5.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $5.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $6.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $6.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $7.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $7.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $8.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $8.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $9.0 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、約 $9.5 \times 10^{13} \text{ GC/g}$ 、又は約 $1.0 \times 10^{14} \text{ GC/g}$ 脳質量である。

10

【0163】

特定の実施形態では、本明細書に提供されるmiR標的配列含有組成物は、患者が必要とする免疫抑制性併用療法の用量、持続時間、及び／又は量を最小限に抑える。現在、そのような併用療法のための免疫抑制剤としては、グルココルチコイド、ステロイド、代謝拮抗剤、T細胞阻害剤、マクロライド（例えば、ラパマイシン若しくはラパログ）、及び細胞分裂阻害剤（アルキル化剤を含む）、代謝拮抗剤、細胞傷害性抗生物質、抗体、イムノフィリンに対して活性のある物質が挙げられるが、これらに限定されない。免疫抑制剤には、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、白金化合物、メトトレキサート、アザチオプリン、メルカプトプリン、フルオロウラシル、ダクチノマイシン、アントラサイクリン、マイトマイシンC、プレオマイシン、ミトラマイシン、IL-2受容体（CD25）特異的抗体又はCD3特異的抗体、抗IL-2抗体、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、IFN- β 、IFN- γ 、オピオイド、又はTNF- α （腫瘍壊死因子- α ）結合剤を含み得る。特定の実施形態では、免疫抑制療法は、遺伝子療法投与の0、1、2、7日前、又はそれ以前に開始され得る。かかる療法は、同じ日に2つ以上の薬剤、（例えば、プレドネリゾン、ミコフェノール酸モフェチル（MMF）及び／又はシロリムス（すなわち、ラパマイシン）の同時投与を含み得る。これらの薬物のうちの1つ以上が、遺伝子療法投与後に、同じ用量又は調整された用量で継続され得る。かかる療法は、約1週間（7日間）、約60日間であり得る。特定の実施形態では、本明細書に提供されるmiR標的配列含有組成物は、遺伝子療法（例えば、rAAV）ベクターの送達前、送達中、又は送達後の免疫抑制療法の必要性を排除する。

20

30

【0164】

一実施形態では、本明細書に記載される発現カセットを含む組成物は、必要とする対象に1回投与される。特定の実施形態では、発現カセットは、rAAVを介して送達される。

40

【0165】

方法の記載が、本明細書にわたって記載される他の組成物、レジメン、態様、実施形態及び方法に適用されるように意図されることを理解されたい。

【0166】

6. キット

特定の実施形態では、キットが提供され、製剤（任意選択的に、凍結される）中に懸濁された濃縮された発現カセット（例えば、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターで）を含み、任意選択的な希釈緩衝液、並びに髄腔内、脳室内、又は大槽内投与に必要とされ

50

るデバイス及び構成要素が提供される。別の実施形態では、キットは、追加的に又は代替的に、静脈内送達のための構成要素を含み得る。一実施形態では、キットは、注入を可能にするために、十分な緩衝液を提供する。そのような緩衝液は、濃縮されたベクターの約 1 : 1 ~ 1 : 5 希釈、又はそれ超の希釈を可能にし得る。他の実施形態では、より多量若しくはより少量の緩衝液又は滅菌水が含まれ、治療を行う医師により、用量滴定及び他の調整が可能になる。更に他の実施形態では、キットには、デバイスの 1 つ以上の構成要素が含まれる。好適な希釈緩衝液、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 又はグリセロール / P B S が利用可能である。

【0167】

キットの記載が、本明細書にわたって記載される他の組成物、レジメン、態様、実施形態及び方法に適用されるように意図されることを理解されたい。

【0168】

7. デバイス

一態様では、本明細書に提供される組成物は、例えば、WO 2017 / 136500 (その全体が参照により本明細書に援用される) に記載されている方法及び／又はデバイスを介して髄腔内投与され得る。代替的に、他のデバイス及び方法が選択され得る。要約すると、方法は、脊椎針を患者の大槽内に前進するステップと、1本の可撓性チューブを脊椎針の近位ハブに連結し、バルブの出口ポートを可撓性チューブの近位端に連結するステップと、当該前進ステップ及び連結ステップ後、チューブを患者の脳脊髄液で自吸させた後で、一定量の等張溶液を含む第1の容器をバルブのフラッシュ入口ポートに連結するステップと、その後、一定量の医薬組成物を含む第2の容器をバルブのベクター入口ポートに連結するステップと、を含む。第1及び第2容器をバルブに連結した後、流体流れのための通路は、ベクター入口ポートとバルブの出口ポートとの間に開かれ、医薬組成物は脊椎針を通して患者に注入され、医薬組成物の注入後、流体流れのための通路は、フラッシュ入口ポートとバルブの出口ポートを通して開かれ、等張溶液は、医薬組成物を患者にフラッシュするために脊椎針中に注入される。この方法及びこのデバイスは、各々任意選択的に、本明細書に提供される組成物の髄腔内送達のために使用され得る。代替的には、他の方法及びデバイスが、かかる髄腔内送達のために使用され得る。

【0169】

デバイスの記載が、本明細書にわたって記載される他の組成物、レジメン、態様、実施形態及び方法に適用されるように意図されることを理解されたい。

【実施例】

【0170】

ここで、以下の実施例を参照しながら、本発明を説明する。これらの実施例は例示のみを目的として提供され、本発明がこれらの実施例に限定されるものとして決して解釈されるべきではなく、本明細書に提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形例を包含すると解釈されるべきである。

【0171】

実施例 1 : 方法

動物

動物手順は全て、ペンシルベニア大学の施設内動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって承認された。アカゲザル (Macaca Mulatta) は、Covance Research Products, Inc (Alice, TX) 及びPrimagen / Prelabs Primates (Hines, IL) から調達した。動物は、国際実験動物管理評価認証協会 (AAALAC) 認定のペンシルベニア大学の非ヒト霊長類研究プログラム施設内に、ステンレス鋼製スクイズバックケージ内に収容された。動物は、給餌、視覚及び聴覚刺激、操作、及び社会的相互作用などの様々な豊かさ (enrichment) を享受した。

【0172】

C56BL/6Jマウス（ストック番号000664）は、Jackson Laboratoryから購入した。動物を、豊かさを伴う1ケージ当たり2～5匹の標準的なケージで、ペンシルベニア大学の遺伝子療法プログラムでAAALAC国際認定のマウス用バリアビバリウムに収容した（Nestlets巢材）。バリア施設のケージ、給水瓶、及び床敷は、オートクレーブ処理し、ケージは、週に1回交換された。自動制御された12時間の明暗サイクルが維持された。各暗期は、19:00時（±30分）に開始した。放射線照射された実験用げっ歯類の餌は、自由摂食で提供された。

【0173】

ベクター

AAV9.PHP.Bトランスプラスミド（pAAV2/PHP.B）は、製造元のマニュアルに従って、pAAV2/9（Penn Vector Core）を鋳型として使用して、QuikChange Lightning部位特異的変異導入キット（Agilent Technologies, Santa Clara, CAカタログ番号210515）で生成した。pAAV2/9及びpAAV2/hu68は、Penn Vector Coreによって提供された。AAVベクターを作製し、Penn Vector Coreによって滴定した（Lock, M., et al. Hum Gene Ther 21:1259-1271, 2010に以前に記載されている）。簡単に説明すると、HEK293細胞を三重でトランスフェクトし、培養上清を収集して濃縮し、イオジキサノール勾配で精製した。精製したベクターを、以前に記載されているように、ウサギベクターグロビンポリA配列を標的とするプライマーを使用して、デジタルドロップレットPCRで滴定した（Lock, M., et al. Hum Gene Ther Methods 25:115-125, 2014）。ヒトアルファ-レイズロニダーゼ（hIDUA）配列は、hIDUAアイソフォームの前駆タンパク質配列NP_000194.2の逆翻訳及びコドン最適化を通して取得し、CB7プロモーター下でクローニングした。後根神経節（DRG）濃縮マイクロRNA配列を、mirbase.org.において入手可能な公開データベースから選択した。DRG濃縮miRの標的の4つのタンデムリピートを、緑色蛍光タンパク質（GFP）又はhIDUAシスプラスミドの3'非翻訳領域（UTR）にクローニングした。

【0174】

インビボ試験

マウスは、miR標的の有無にかかわらず、0.1mL中、 1×10^{12} ゲノムコピー（GC、 5×10^{13} GC/kg）のAAV-PHP.B、又は 4×10^{12} GC（ 2×10^{14} GC/kg）の強化GFPをコードするAAV9ベクターを、外側尾静脈を介して受け、注入の21日後、CO₂の吸入によって安楽死させた。組織を、脳から始めて迅速に収集し、10%の中性緩衝ホルマリンで約24時間浸漬固定し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で短時間洗浄し、4℃でPBS中の15%及び30%スクロースで順次平衡化した。次いで、組織を最適な切断温度の包埋媒体で凍結し、直接GFP可視化用に凍結切片を作製した（脳は、30µmで切片化し、他の組織は、8µm厚で切片化した）。画像は、Nikon Eclipse Ti-E蛍光顕微鏡を用いて取得した。DRGにおけるGFP発現を、免疫組織化学（IHC）によって分析した。DRGを含む脊柱をホルマリン中で24時間固定し、軟質になるまで10%のエチレンジアミン四酢酸（pH7.5）中で脱灰し、標準プロトコルに従ってパラフィン包埋した。切片を、エタノール及びキシレンシリーズを通して脱パラフィン化し、10mMのクエン酸緩衝液（pH6.0）中で6分間沸騰し、抗原賦活化を行い、2%のH₂O₂（15分間）、アビジン/ビオチンブロッキング試薬（各15分間；Vector Laboratories, Burlingame, CA）、及びブロッキング緩衝液（PBS中に1%のロバ血清+0.2%のTriton、10分間）で順次ブロッキングした後、ブロッキング緩衝液に希釈された一次抗体（37℃で1時間）及びビオチン化二次抗体（1:500希釈、45分間；Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA）でインキュベーションした。GFPに対するウサギ抗体を一次抗体として使用した（NB600-

10

20

30

40

50

308, Novus Biologicals, Centennial, CO; 1:500希釈)。DABを基質として用いるVectastain Elite ABCキット (Vector Laboratories, Burlingame, CA) は、結合した抗体を、褐色沈殿物として可視化することを可能にした。

【0175】

非ヒト霊長類 (NHP) は、透視ガイダンス下で、 3.5×10^{13} GCのAAVhu68. GFPベクター、又は 1×10^{13} GCのAAVhu68. hIDUAベクターを受け、1mLの総容量で大槽内に注入された (Katz, N., et al. Hum Gene Ther Methods 29:212-219, 2018によって、以前に記載されているように)。安全性の読み取りのために、定期的な採血及び脳脊髄液 (CSF) タップを行った。血清化学、血液学、凝固、及びCSFの分析は、契約施設のAntech Diagnostics (Morrisville, NC) によって行われた。動物を、静脈内ペントバルビタール過剰投与で安楽死させ、剖検した。次いで、網羅的な組織病理学的検査用に、組織を採取した。回収した組織を直ちにホルマリンに固定し、パラフィン包埋した。組織病理のために、組織切片を、標準プロトコルに従って、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した。GFP発現のためのIHCは、マウスの研究で記載されているように行ったが、GFPに対して異なる抗体を使用した (ヤギ抗体、NB100-1770, Novus Biologicals; 1:500希釈、4°Cで一晩のインキュベーション)。hIDUAに対する免疫染色は、IHCに関する上記のプロトコルに従って、hIDUAに対するヒツジ抗体 (AF4119, R&D Systems, Minneapolis, MN; 1:200希釈) を使用して行った。加えて、切片を、同じ一次抗体を使用して、免疫蛍光 (IF) によってhIDUAに対して染色した。IFの場合、切片を、上に記載のように脱パラフィン化し、抗原賦活化用に処理し、次いで、PBS中1%のロバ血清+0.2%のTritonで15分間ブロッキングした後、ブロッキング緩衝液に希釈された一次抗体 (室温で2時間、1:50希釈) 及びFITC標識二次抗体 (45分間、Jackson ImmunoResearch, 1:100希釈) を用いて、順次インキュベーションした。DAPIを核の対比染色に用い、切片を、Fluoromount G中でマウントした。

【0176】

インサイツハイブリダイゼーション (ISH) は、内因性サルIDUAのRNAに結合しないベクターゲノムから転写されたコドン最適化RNAに特異的なプローブを使用して行った。Life Technologies (Carlsbad, CA) によってZ字型プローブ対を合成し、製造元のプロトコルに従って、Life Technologies ViewRNA ISH 組織アッセイキットを使用して、パラフィン切片上でISHを行った。陽性シグナルを示すFast Red沈殿物の析出を、ローダミンフィルターセットを使用した蛍光顕微鏡によって画像化した。IDUAのIHCを用いた組織切片を、Aperio Versaスライドスキャナー (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) を使用して定量化の目的でスキャンした。

【0177】

組織病理及び形態測定

ベクター群に対して盲検化された委員会認定の獣医病理学者が、重症度グレードを確立し、以下の定義がなされた：病変の不在として0、最小 (10%未満) として1、2軽度 (10~25%)、3中等度 (25~50%)、4顕著 (50~95%)、及び5重度 (95%超)。背側軸索障害スコアは、各動物において、少なくとも3つの頸部切片、3つの胸部切片、及び3つの腰部切片から確立された。DRG重症度グレードは、少なくとも3つの頸部セグメント、3つの胸部セグメント、及び3つの腰部セグメントから確立された。中央値神経スコアは、軸索障害及び線維症の重症度グレードの合計であり、最大可能スコアが10で、左及び右の神経の遠位部及び近位部で確立された。導入遺伝子発現の定量化のために、委員会認定獣医病理学者は、未処置の動物から得られた対照スライドからのシグナルと比較することによって、抗GFP抗体又は抗hIDUA抗体で免疫染色され

た細胞をカウントした。20倍の倍率視野当たりの陽性細胞の総数を、ImageJ細胞計数ツールを使用して、構造当たり及び動物当たりで、少なくとも5つの視野上でカウントした。

【0178】

ベクター生体分布

QIAamp DNA Miniキット (Qiagen カタログ番号51306) で NHP組織DNAを抽出し、ベクターゲノムを、Taqman試薬 (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA) 及びベクターのrBGポリアデニル化配列を標的とするプライマー／プローブを使用して、リアルタイムPCRによって定量化した。

10

【0179】

免疫学

hIDUAに対する末梢血T細胞応答を、hIDUA導入遺伝子に特異的なペプチドライブラリを使用して、以前に公開された方法に従ってインターフェロンガンマ酵素結合免疫吸着スポットアッセイによって測定した (Gao et al., 2009)。陽性応答の基準は、 10^6 リンパ球当たり>55スポット形成単位、かつ未刺激時の培地陰性対照の3倍であった。加えて、T細胞応答を、試験90日目に、剖検後、脾臓、肝臓、及び深部頸部リンパ節から抽出したリンパ球においてアッセイした。血清中のhIDUAに対する抗体を測定した (1:1, 000試料希釈) (Hinderer, C., et al. Mol Ther 23:1298-1307, 2015によって以前に記載されているように)。

20

【0180】

サイトカイン／ケモカイン分析：CSF試料を回収し、分析時まで -80°C で貯蔵した。CSF試料を、以下の分析物を含むMilliplex MAPキットを使用して分析した：sCD137、エオタキシン、sFasL、FGF-2、フラクタルカイン、グランザイムA、グランザイムB、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-16、IL-17A、IL-17E／IL-25、IL-21、IL-22、IL-23、IL-28A、IL-31、IL-33、IP-10、MIP-3 α 、パーフォリン、TNF β 。CSF試料は、二重で評価し、Luminex (登録商標) xPONENT (登録商標) 4.2、Bio-Plex Manager (商標) ソフトウェア6.1を使用して、FLEXMAP 3D機器で分析した。分析には、20%未満の%CVを有する試料のみが含まれた。

30

【0181】

インビトロ研究

miR-183ヒトマイクロRNA発現プラスミドは、OrigeneのMI0000273ベクターから、GFPと部分的な内部リボソーム進入部位をコードするKpnI-PstI断片を欠失させることによって修飾された。我々は、一過性トランスフェクション及び抗GFP免疫プロットによって、修飾ベクターからのGFP発現が欠如していることを確認した。GFP発現カセットの3'-UTRに位置するマイクロRNA結合部位を有するGFPシスプラスミドを用いて、HEK293細胞でポリエチレンイミン媒介性の一過性トランスフェクションを行った。トランスフェクションの72時間後、細胞を、プロテアーゼ阻害剤を含む50mMのTris-HCl、pH8.0、150mMのNaCl、及び0.5%のTriton X-100中で溶解した。合計13 μg の細胞溶解物を、抗GFP免疫プロット、続いて電気化学発光に基づくシグナル検出及び定量化に使用した。統計解析用に三重で実験を行った。

40

【0182】

統計分析

群間の統計学的差異を、ウィルコクソン順位和検定を使用して評価した。

【0183】

実施例2：導入遺伝子発現のマイクロRNA媒介性阻害は、AAVによる後根神経節の毒

50

性を低減する

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを血液又は脳脊髄液を介して非ヒト霊長類 (NHP) の CNS に送達することは、後根神経節 (DRG) の毒性と関連する。これは、高効率の形質導入によって引き起こされる可能性があり、導入遺伝子産物の過剰産生から、小胞体ストレスが引き起こされ得る。本発明者らは、対応する導入遺伝子 mRNA の 3' 非翻訳領域内のベクターゲノムに、miRNA 標的配列を導入することによって、CNS 特異的 AAV 遺伝子療法に関連する毒性を排除するアプローチを開発した。ITR.CB7.CI.eGFP.miR-145 (4 コピー) . ウサギベータグロビン、3' ITR の発現カセットは、配列番号 10 に提供される。ITR.CB7.CI.GFP.miR-182 (4 コピー) . ウサギベータグロビン、3' ITR の発現カセットは、配列番号 11 に提供される。ITR.CB7.CI.GFP.miR-96 (4 コピー) . ウサギベータグロビン、3' ITR は、配列番号 12 に提供される。ITR.CB7.CI.GFP.miR-183 (4 コピー) . ウサギベータグロビン、3' ITR は、配列番号 13 に提供される。

10

20

30

40

50

【0184】

AAV ベクターは、NHP で DRG 変性を引き起こす

NHP での DRG 毒性における経験に基づいて、毒性の重症度を定量化するシステムを開発した。本発明者らは、DRG の脊髄に沿って位置する細胞体、末梢神経内の軸索、及び背側白質路を上行する軸索を評価した (図 1B)。原発性病変は、DRG に位置する感覚ニューロン細胞体の変性であると考えられる。病変は、組織学的に、好酸球増加症、不規則な細胞形状、ニッスル物質の破壊 (中心性色質融解)、及び単核細胞浸潤とともに核境界の喪失によって特徴付けられる (図 1B)。高レベルの導入遺伝子タンパク質を発現している細胞は、変性を受ける可能性が高くなり、緑色蛍光タンパク質 (GFP、図 1B) を発現する AAV ベクターの ICM 投与を受けた動物で、導入遺伝子産物を免疫染色することによって証明される。細胞体の死の二次的なものとして、軸索障害があり、それは、遠位軸索及び近位軸索の変性である。軸索障害は、軸索の欠損、細胞デブリを取り囲む膨張したミエリン鞘、及びマクロファージによって特徴付けられる (図 1B)。図 1C は、異なるレベルの DRG 毒性及び脊髄軸索障害の例を示す。グレードは、高倍率視野組織病理検査における罹患組織の割合に基づく。1 最小 (10% 未満)、2 軽度 (10~25%)、3 中等度 (25~50%)、4 顕著 (50~95%)、及び 5 重度 (95% を超える)。

【0185】

本発明者らのこれまでの実績では、ICM 又は腰部穿刺 (LP) 経路を介して CSF に AAV ベクターを投与された幼若 / 成体 NHP は、27 件の研究にわたって総計で 219 匹のサルになり、これは、以前に公開された毒性試験 (Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:68-78, 2018; Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018) 及び以下の実施例に記載される NHP 実験、並びにいくつかの未公開研究を包含している。この実績には、5 つのカプシド、20 個の導入遺伝子、5 つのプロモーター (CAG、CB7、UBC、hSyn、及び MeP426)、 1×10^{12} GC ~ 3×10^{14} GC の用量、勾配又はカラムによって精製されたベクター、3 つの製剤 (リン酸緩衝食塩水及び 2 つの異なる人工 CSF)、並びに様々な発達段階のカニクイザル及びマカクザルが含まれる。全ての実験群において、DRG 毒性及び軸索障害が観察された。病的状態は、注入後約 1 ヶ月でピークに達し、最長 6 ヶ月間 (成熟マカクで評価された最長期間である) 進行しない。ほとんどの場合、病的状態は軽度から中等度である。しかしながら、GFP を発現するベクターを高用量で ICM 注入すると、失調症に関連する重篤な病的状態を引き起こし得る。

【0186】

DRG ニューロンで特異的に発現された miRNA は、AAV 導入遺伝子の発現を除去することができる

DRG毒性を軽減する方法を検討する際、いくつかのメカニズムを評価した。以前の研究では、ヒトIDUA又はヒトIDを発現するAAV9ベクターをICM投与されたNHPを免疫抑制することによって、形質導入されたDRGに対する破壊的な適応免疫応答の役割を分析した。ミコフェノール酸モフェチル(MMF)及びラパマイシンでの処置は、ベクター及び導入遺伝子産物に対する適応免疫応答を鈍化させたが、DRG毒性及び軸索障害に顕著な影響を与えなかった(Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:68-78, 2018, Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018)。

【0187】

以前に調査されていない1つの可能性は、高度に形質導入されたDRGにおける導入遺伝子産物の過剰発現が、細胞体及び関連する軸索の神経傷害及び変性、それに続く反応性炎症応答の原因であるかどうかである(図2A)。したがって、DRGにおける導入遺伝子の発現を特異的に除去するために、DRGニューロンでのみ発現されるmiRNA標的を、導入遺伝子の3'非翻訳領域にクローニングした(図2B)。ベクターから発現される任意のmRNAは、内因的に発現されるmiRNAによって破壊されるであろう。

【0188】

miRNA戦略の活性及び特異性を評価するために、インビトロアッセイを使用した。発現カセットの3'非翻訳領域に標的miRNA配列の4反復(リピート)コンカテマーを含むようにAAVシスプラスミドを構築した(図2B)。AAVシスプラスミドを、miR-183を発現するプラスミドとともに、HEK293細胞にともトランスフェクションした。導入遺伝子であるGFPの発現は、それが同種の認識配列を含む場合にのみ、miR-183の存在下で低減された(図3A)。

【0189】

AAVベクター内の潜在的なmiRNA標的のインビボ活性及び特異性を、C57BL/6Jマウスにおいてスクリーニングした。本発明者らは、miRNA-183複合体(miR-182及びmiR-183)並びにmiR-145のうちの2つのメンバー由来のmiRNA標的の有無で、GFP発現ベクターを評価した。最初、miR-183複合体の別のメンバーであるmiR-96を試験したが、マウス皮質で導入遺伝子の発現が減少することから、それを排除した(示さず)。動物は、標的DRGへのAAV9の高用量静脈内(IV)注入、及びCNSを標的とする高用量のAAV-PPH.B(AAV9-PPH.B.CB7.CI.GFP.rBG)注入を受けた。動物を21日目に剖検し、免疫組織化学(IHC)及び脳及び肝臓における直接蛍光顕微鏡法によって、DRGにおけるGFPの発現について分析した。DRGニューロンにおけるGFPの発現は、miR-183標的及びmiR-182標的を含むベクターにより実質的に低減したが、miR-145標的は効果を有しなかった(図3B及び図3C)。miR標的のいずれかを含むベクターによる肝臓又は他のCNS区画における発現の明らかな低減はなかった。発現は、miR-183ベクターによりCNSでわずかに増強されたようであった(図3D)。このマウス実験では、ベクター誘発性のDRG毒性がNHPでのみ観察されたため、病的状態におけるmiR-183導入遺伝子の抑制の影響を評価することができなかった。

【0190】

miR-183による限定された導入遺伝子の発現は、NHPにおけるDRG毒性を低減する

マウスにおける心強いデータに基づいて、NHPでGFP miR-183発現カセットを評価した。本発明者らは、アカゲザルのCB7プロモーター(3.5×10¹³GC)から、GFP(AAV9.CB7.CI.GFP.rBG)(N=2)又はGFP miR-183(AAV9.CB7.CI.GFP.miR-183.rBG)(N=4)を発現するAAVhu68ベクターをICM注入した。14日目に、動物の半数を、GFP発現について剖検した(図4B-GFP発現についての代表的なIHC;図4B-発現の定量化)。残りの動物は60日目に剖検して、発現及びDRG毒性を評価した(図4C

10

20

30

40

50

－DRG変性、背側脊髄軸索障害、及び末梢神経の軸索障害）。動物は、臨床的続発症を伴うことなく、ICM投与ベクターに耐性を示した。miR-183ベクターを用いたDRGにおけるGFP発現の統計学的に有意な減少、並びに他の箇所（腰部運動ニューロン、小脳、皮質、心臓、及び肝臓を含む）での増強又は同様の発現があった（図4A及び図4B、表1）。これは、9つの領域にわたる病的状態の著しい低減と関連した（頸部、胸部、及び腰部脊椎におけるDRG並びに背側脊髄軸索障害、並びに正中神経、腓骨神経及び橈骨神経の軸索障害、図4C）。ベクターにmiR-183標的がない場合、全ての領域で病的状態が存在し、グレード4、グレード2、及びグレード1の間で均等に分布した。miR-183ベクターの場合、最大の病的状態はグレード2であり、領域のわずか11%に存在し、残りの領域はグレード1（72%）又は病理なし（16%）のいずれかであった。

10

【0191】

これらの研究で、miR-183標的を含むベクターにより、DRG感覚ニューロンにおけるGFPの発現が選択的に抑制されることが実証された。他のCNSニューロン及び末梢臓器は影響を受けなかった。したがって、DRG毒性及び二次軸索障害は、高度免疫原性／毒性導入遺伝子（GFP）の文脈で、顕著／重度レベルから最小レベルに低減された。

【0192】

実施例3：miRNA標的配列を有するベクターゲノムを含むAAVを介した送達後のDRGにおける治療用タンパク質の発現の特異的抑制

20

本発明者らは、ヒトIDUA（I型ムコ多糖症を有する患者において欠損している酵素）を発現するベクターを使用して、NHPにおいて、miR-183標的配列を更に評価した。このヒト導入遺伝子を用いた研究が、NHPにおけるDRG毒性に初めて光を当てた（Hordeaux, J., et al. *Mol Ther Methods Clin Dev* 10: 79-88, 2018）。実験には、3つの群が含まれた（N=3／群）：1）群1-miR-183標的を含まない対照ベクター単独（AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG）、2）群2-ステロイドで処置（-7日目～30日目までプレドニゾロン1mg/kg/日、続いて漸進的な漸減）された動物におけるmiR-183標的を含まない対照ベクター（AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG）、及び3）群3-miR-183標的を有するベクター（AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.miR-183.rBG）。全てのベクターゲノムには、ニワトリβ-アクチンプロモーター及びCMVエンハンサーエレメント（CB7プロモーターと称する）の制御下のhIDUAコード配列、ニワトリβ-アクチンスプライスドナーからなるキメライトロン（CI）（973bp、GenBank: X00182.1）、及びウサギβ-グロビンスプライスアクセプターエレメント、並びにウサギβ-グロビンポリアデニル化シグナル（rBG、127bp、GenBank: V00882.1）。ITR.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG.ITRのベクターゲノムは、配列番号14で提供されている。ITR.CB7.CI.hIDUAcoV1.miR-183.rBG.ITRのベクターゲノムは、配列番号15提供されている。全ての動物は、構成的プロモーターであるCB7からhIDUAを発現するAAVhu68ベクター（ 3.5×10^{13} GC）のICM注入を受けた。GFP発現のために、半数の動物を14日目に剖検した。90日目に剖検を行い、導入遺伝子の発現（表1の個々のデータポイント）及びDRG関連の毒性（表2の個々のデータポイント）を評価した。

30

40

【0193】

全ての群由来の動物が、ベクター関連の臨床所見又は臨床病理学的な異常を有さず、ICMベクターに耐容性を示した（表3及び表4）。CSF中の髄液細胞増多は非常に低く、第2群で1匹、第3群で1匹に限定された（表5）。T細胞応答（ELISPOTによる測定）及びhIDUAに対する抗体の両方が、3つの群全てにおいて検出された（図7A～図7D）。CSFサイトカインは、注入後21日目及び35日目、群1と比較して群3で減少したが、一方、群2（ステロイド）では、24時間でレベルが減少した（図8）

50

。21～35日目が導入遺伝子のピーク発現に対応し、過剰発現誘発性のストレスが予想される時点である。免疫蛍光及びインサイツハイブリダイゼーション（ISH）を使用して、対照ベクター（miR-183標的を含まない、図5及び図6A）を使用した群1及び群2において、DRGにおいて高発現のhIDUAが観察された。他のCNS区画では（脊髄の下位運動ニューロン並びに小脳及び皮質のニューロンを含む）、低レベルから中程度のhIDUAの発現が検出された（図5及び図6A）。miR-183標的をベクターに組み込むと（すなわち、AAVhu68.hIDUA-miR-183／群3）、免疫蛍光及び免疫組織化学によって強調されるように、CNS（すなわち、脊髄、小脳、及び皮質）における発現を減少させることなく、DRGニューロンにおけるhIDUA発現が除去された（図5及び図6A）。mRNAレベル（図5）では、形質導入ニューロンにおける細胞質ISHシグナルは、AAVhu68.hIDUAを投与された動物の面積の42％から、AAVhu68.hIDUA-miR-183を投与された動物の7％まで減少させ（図6A）、これは83％の低減を表している。CNS及びDRG全体にわたるベクターの生体分布が、全ての群にわたって本質的に同じであったことから、miR-183によるDRGにおけるhIDUA発現の低減は、遺伝子導入が減少したためではなかった（図9）。ステロイドは、群1と比較して、DRG（ $p=0.0001$ ）における発現を中程度に減少させ、下位運動ニューロンにおける発現を増加させた（図5及び図6A）。予想通り、対照ベクター（群1）との投与は、GFP発現ベクターと比較して比較的穏やかなDRG、後側柱、及び末梢神経の病的状態を引き起こした。しかしながら、病的状態は、miR-183標的含有ベクター（群3、図6B）で形質導入された動物のDRG（ $p=0.0583$ ）、後側柱（ $p<0.0001$ ）、及び末梢（正中）神経（ $p=0.0137$ ）において、全く存在しなかった。ステロイド（群2）との併用治療は、親ベクター（すなわち、miR-183標的を含有しない）の毒性を低減させなかった（図6B）が、代わりに、末梢神経（ $p=0.0256$ ）及び背側柱（ $p=0.066$ ）において毒性を悪化させる傾向と関連があった。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. NHP の個々の導入遺伝子発現数

NHP id	ベクター	導入遺伝子 + D R G ニューロン %	導入遺伝子 + 運動 ニューロン %	導入遺伝子 + 高倍率 視野ごとの細胞、小 脳	導入遺伝子 + 高倍 率視野ごとの細胞 、大脳皮質
RA2309	AAVhu68.CB7.Cl.eGFP.rBG	0.9; 22; 8.7	28.6; 23.8; 18.75; 23.1; 25	7; 3; 1; 5; 2	9; 13; 3; 2; 1
RQ9475	AAVhu68.CB7.Cl.eGFP.rBG	56.5; 2.4	52.6; 50; 53.8; 50	2; 5; 1; 3; 16	3; 2; 0; 1; 1
RA2102	AAVhu68.CB7.Cl.eGFP.miR183.rBG	0; 1.6; 0.7	26.9; 55.9	8; 5; 2; 5; 10	4; 29; 10; 9; 2
RA1652	AAVhu68.CB7.Cl.eGFP.miR183.rBG	0.3; 0; 0; 5	57.1; 73.7; 70; 37.5	10; 4; 7; 10; 4	10; 6; 8; 4; 11
RA2141	AAVhu68.CB7.Cl.eGFP.miR183.rBG	5.1; 0; 0; 0	80.8; 60.7; 80; 37.5; 39.5	22; 15; 7; 3; 30	1; 1; 4; 4; 1
RA2027	AAVhu68.CB7.Cl.eGFP.miR183.rBG	0; 0	60; 68.2; 14.3; 45	13; 23; 35; 106; 23	3; 1; 2; 1; 3
17C024	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.rBG	48.7; 25.2; 47.4; 40.6; 36.7	26.1; 45.7; 23.5; 7.7; 14.3; 0	2; 3; 2; 4	8; 5; 17; 0; 0
17C031	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.rBG	34.5; 29.6; 49; 37; 33.7	28.6; 38.1; 19; 22.2; 50; 50	3; 2; 2; 3; 6	0; 11; 1; 1; 0
17C016	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.rBG + ステロイド	7.8; 10.1; 3.9; 10.2; 1.8	47.6; 43.5	1; 0; 1; 2; 4	7; 8; 10; 10; 8
17C019	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.rBG + ステロイド	14.8; 26.6; 15.7; 19.5; 1.1; 33	26.7; 31.8	2; 4; 4; 12; 1	6; 1; 2; 3; 5
17C029	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.rBG	12.4; 10.9; 13.1; 9.8; 8.9	15; 4.8; 46.7; 0	5; 6; 2; 3; 1	3; 2; 11; 10; 23
17C020	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.rBG + ステロイド	2.5; 6; 4; 2.9; 4.7	80; 70; 84; 80; 66.7; 30	5; 4; 10; 4; 6	11; 6; 5; 10; 33
17-167	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.miR183.rBG	1.6; 0.5; 0; 0; 0.4	25; 19.4; 42.9; 7.7	5; 4; 2; 6; 3	12; 4; 6; 3; 6
17-215	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.miR183.rBG	0; 0; 0; 0; 0	42.9; 41.7; 12.5; 29.4; 52.9; 35.7	1; 1; 2; 6; 6	4; 4; 1; 5; 3
17-102	AAVhu68.CB7.Cl.hIDU.AcoV1.miR183.rBG	0.8; 0.4; 1.9; 1.8; 0	39.3; 41.2; 31.8; 28	12; 11; 3; 2; 11	7; 4; 12; 8; 6

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. 個々の DRG 病的状態、脊髄後柱の軸索障害、並びに末梢神経の軸索障害及び線維症の重症度のグレード

NHP id	ベクター	DRG	背側脊髄	末梢神経
RA2309	AAVhu68.CB7.CI.eGFP.rBG	4; 1; 1	4; 1; 2	正中 ; 4 腓骨 ; 2 橈骨 ; 2
RQ9475	AAVhu68.CB7.CI.eGFP.rBG	N/A (D14)	N/A (D14)	N/A (D14)
RA2102	AAVhu68.CB7.CI.eGFP.miR183.rBG	1; 0; 0	1; 1; 1	正中 ; 1 腓骨 ; 1 橈骨 ; 0
RA1652	AAVhu68.CB7.CI.eGFP.miR183.rBG	2; 1; 2	1; 1; 1	正中 ; 1 腓骨 ; 1 橈骨 ; 1
RA2141	AAVhu68.CB7.CI.eGFP.miR183.rBG	N/A (D14)	N/A (D14)	N/A (D14)
RA2027	AAVhu68.CB7.CI.eGFP.miR183.rBG	N/A (D14)	N/A (D14)	N/A (D14)
17C024	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG	2; 2; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	3; 3; 1; 1; 1; 1; 1; 1	正中 ; 4; 4; 3; 1
17C031	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG	1; 1; 1; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	1; 1; 1; 1; 1; 1; 1; 1	正中 ; 1; 1; 0; 0
17C016	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG + ステロイド	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	1; 1; 1; 0; 0; 0; 1; 1	正中 ; 1; 1; 1; 1
17C019	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG + ステロイド	2; 1; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	3; 2; 1; 1; 1; 1; 1	正中 ; 4; 4; 4; 4
17C029	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	1; 1; 1; 1; 1; 1; 1	正中 ; 0; 0; 0; 0
17C020	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG + ステロイド	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 1; 1; 0; 0; 0; 1; 1	3; 2; 3; 3; 3; 4; 4; 4; 4	正中 ; 2; 3; 2; 1
17-167	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.miR183.rBG	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	正中 ; 0; 0; 0; 0
17-215	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.miR183.rBG	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	正中 ; 0; 0; 0; 0
17-102	AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.miR183.rBG	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	正中 ; 0; 0; 0; 0

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3. AAV. h IDUAベクターを ICM注入されたNHPにおける血液化学

動物の番号及び群	時間	総タンパク質	アルブミン	グロブリン	A/G 比	AST	ALT	アルカリホスファ	GGT	総ビリルビン	BUN	クレアチニン
		g/d	g/d	g/d	-	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/d	mg/d	mg/d
		L	L	L	-	L	L	L	L	L	L	L
17C024 AAVhu68.hID UA	ベースライン	5.6	3.8	1.8	2.1	33	40	703	64	0.1	27	0.6
	0 日目	6.0	3.7	2.3	1.6	28	36	682	61	0.1	23	0.4
	7 日目	6.1	3.9	2.2	1.8	30	33	680	64	0.1	30	0.5
	21 日目	5.9	3.7	2.2	1.7	25	22	825	66	0.1	21	0.5
	35 日目	5.9	3.4	2.5	1.4	32	24	777	74	0.1	22	0.5
	60 日目	5.9	3.7	2.2	1.7	28	30	815	74	0.1	28	0.4
	90 日目	5.5	3.6	1.9	1.9	29	25	689	76	0.1	24	0.6
17C031 AAVhu68.hID UA	ベースライン	5.7	3.8	1.9	2.0	35	39	539	36	0.1	27	0.5

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

動物の番号及び群	時点	総タンパク質	アルブミン	グロブリン	A/G 比	AST	ALT	アルカリホスファ	GGT	総ビリルビン	BUN	クレアチニン
		g/d L	g/d L	g/d L	-	IU/ L	IU/ L	IU/ L	IU/ L	mg/d L	mg/d L	mg/d L
	イン											
	0 日 目	6.5	4.0	2.5	1.6	37	43	570	47	0.2	23	0.4
	7 日 目	6.3	3.9	2.4	1.6	27	39	547	45	0.1	26	0.5
	21 日 目	6.6	3.9	2.7	1.4	33	34	476	39	0.1	25	0.6
	35 日 目	6.3	3.4	2.9	1.2	32	31	591	42	0.1	24	0.5
	60 日 目	6.2	4.0	2.2	1.8	32	33	545	45	0.1	25	0.4
	90 日 目	6.0	3.6	2.4	1.5	34	27	478	43	0.1	24	0.5
17C029 AAVhu68.hID UA	ベ ー ス ラ イ ン	6.8	3.6	3.2	1.1	41	43	574	74	0.1	27	0.7
	0 日 目	6.9	4.0	2.9	1.4	27	40	607	79	0.1	18	0.7

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

動物の番号及び群	時点	総タンパク質	アルブミン	グロブリン	A/G 比	AST	ALT	アルカリホスフ	GGT	総ビリルビン	BUN	クレアチニン
		g/d L	g/d L	g/d L	-	IU/ L	IU/ L	IU/ L	IU/ L	mg/d L	mg/d L	mg/d L
	7 日 目	7.1	3.8	3.3	1.2	29	40	503	71	0.1	24	0.6
	21 日 目	6.9	3.9	3.0	1.3	49	38	557	77	0.1	15	0.6
	35 日 目	6.6	3.6	3.0	1.2	30	33	555	76	0.1	19	0.6
	60 日 目	6.3	4.0	2.3	1.7	38	43	545	86	0.1	22	0.6
	90 日 目	6.2	3.7	2.5	1.5	31	23	506	81	0.1	20	0.6
17C016 AAVhu68.hID UA + ステロイド	ベ ー ス ラ イ ン	6.0	3.9	2.1	1.9	42	35	623	59	0.2	16	0.5
	0 日 目	6.8	4.1	2.7	1.5	33	58	588	59	0.2	16	0.4
	7 日 目	6.3	3.9	2.4	1.6	26	28	444	51	0.1	20	0.5
	21 日	6.4	3.7	2.7	1.4	29	23	393	44	0.2	16	0.6

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

動物の番号及び群	時点 目	総タンパク質	アルブミン	グロブリン	A/G 比	AST	ALT	アルカリホスフ	GGT	総ビリルビン	BUN	クレアチニン
		g/d L	g/d L	g/d L	-	IU/ L	IU/ L	IU/ L	IU/ L	mg/d L	mg/d L	mg/d L
	35 日 目	6.9	3.9	3.0	1.3	32	29	364	41	0.1	21	0.5
	60 日 目	6.5	3.8	2.7	1.4	41	29	525	63	0.2	23	0.5
	90 日 目	5.7	3.6	2.1	1.7	32	29	752	79	0.1	12	0.5
17C019 AAVhu68.hID UA + ステロイド	ベ ー ス ラ イ ン	5.5	3.4	2.1	1.6	35	42	338	49	0.1	31	0.6
	0 日 目	6.3	3.7	2.6	1.4	32	39	383	49	0.1	19	0.6
	7 日 目	6.1	3.6	2.5	1.4	26	34	322	47	0.1	30	0.7
	21 日 目	6.0	3.3	2.7	1.2	28	32	332	53	0.1	19	0.7
	35 日 目	5.9	3.5	2.4	1.5	42	38	378	49	0.1	27	0.6
	60 日 目	5.6	3.6	2.0	1.8	35	36	437	61	0.2	23	0.5

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

動物の番号及び群	検査項目	総タンパク質	アルブミン	グロブリン	A/G 比	AST	ALT	アルカリホスファ	GGT	総ビリルビン	BUN	クレアチニン
		g/d	g/d	g/d	-	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/d	mg/d	mg/d
	単位	L	L	L	-	L	L	L	L	L	L	L
	日 目											
	90 日 目	5.6	3.6	2.0	1.8	41	34	650	73	0.2	21	0.6
17C020 AAVhu68.hID UA + ステロイド	ベ ー ス ラ イ ン	6.1	4.1	2.0	2.1	26	33	641	87	0.1	21	0.7
	0 日 目	6.5	4.1	2.4	1.7	21	25	538	61	0.1	12	0.6
	7 日 目	6.9	4.0	2.9	1.4	21	28	463	58	0.1	21	0.7
	21 日 目	6.6	4.0	2.6	1.5	23	29	456	55	0.1	13	0.5
	35 日 目	6.2	3.7	2.5	1.5	22	26	309	54	0.1	20	0.6
	60 日 目	6.2	4.1	2.1	2.0	26	27	516	90	0.1	19	0.5
	90 日 目	6.1	3.8	2.3	1.7	23	22	605	82	0.1	16	0.6

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

動物の番号及び群	経路	総タンパク質	アルブミン	グロブリン	A/G 比	AST	ALT	アルカリホスフ	GGT	総ビリルビン	BUN	クレアチニン
		g/d L	g/d L	g/d L	-	IU/ L	IU/ L	IU/ L	IU/ L	mg/d L	mg/d L	mg/d L
17~167 AAVhu68.hID UA-miR-183	ベースライン	6.6	3.9	2.7	1.4	24	21	764	112	0.1	18	0.5
	0日目	6.7	4.1	2.6	1.6	27	21	606	88	0.1	20	0.4
	7日目	6.6	3.9	2.7	1.4	31	27	606	87	0.1	24	0.6
	21日目	6.8	4.2	2.6	1.6	29	27	584	102	0.1	22	0.5
	35日目	6.6	4.0	2.6	1.5	35	34	642	93	0.1	16	0.5
	60日目	6.0	3.7	2.3	1.6	37	25	689	79	0.1	15	0.6
	90日目	6.6	3.9	2.7	1.4	24	21	764	112	0.1	18	0.5
17~215 AAVhu68.hID UA-miR-183	ベースライン	6.1	3.4	2.7	1.3	24	34	536	51	0.1	22	0.5

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

動物の番号及び群	時点	総タンパク質	アルブミン	グロブリン	A/G 比	AST	ALT	アルカリホスフ	GGT	総ビリルビン	BUN	クレアチニン
		g/d L	g/d L	g/d L	-	IU/ L	IU/ L	IU/ L	IU/ L	mg/d L	mg/d L	mg/d L
	ン											
	0 日 目	6.5	3.6	2.9	1.2	29	50	568	54	0.2	21	0.5
	7 日 目	6.3	3.7	2.6	1.4	24	35	499	46	0.1	27	0.6
	21 日 目	6.2	3.5	2.7	1.3	31	37	526	58	0.1	21	0.5
	35 日 目	6.0	3.4	2.6	1.3	33	47	619	57	0.1	18	0.4
	60 日 目	6.1	3.7	2.4	1.5	40	50	628	45	0.2	18	0.5
	90 日 目	6.3	3.9	2.4	1.6	27	42	856	55	0.1	17	0.6
17~102 AAVhu68.hID UA-miR-183	ベ ー ス ラ イ ン	6.7	3.8	2.9	1.3	24	31	613	57	0.1	20	6.7
	0 日 目	7.0	3.6	3.4	1.1	32	35	632	57	0.1	13	7.0
	7 日 目	6.9	3.9	3.0	1.3	31	25	601	57	0.1	16	6.9

10

20

30

40

50

【表 3 - 8】

動物の番号及び群	時点	総タンパク質	アルブミン	グロブリン	A/G 比	AST	ALT	アルカリホスフ	GGT	総ビリルビン	BUN	クレアチニン
		g/d	g/d	g/d	-	IU/ L	IU/ L	IU/ L	IU/ L	mg/d L	mg/d L	mg/d L
		L	L	L	-	L	L	L	L	L	L	L
	日 目											
	21 日 目	7.0	3.8	3.2	1.2	31	30	611	65	0.1	20	7.0
	35 日 目	6.8	3.8	3.0	1.3	28	29	684	59	0.1	20	6.8
	60 日 目	6.4	3.8	2.6	1.5	34	36	588	44	0.1	20	6.4
	90 日 目	7.0	4.0	3.0	1.3	27	28	576	41	0.1	18	7.0

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4. AAV. h IDUAベクターを ICM 注入された NHP における全血球数

動物の番号及び群	経時	WBC	RBC	HGB	HCT	血小板	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球
		$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$
17C024 AAVhu68.hIDUA	ベースライン	8.6	6.1	13.1	43	305	2838	5246	344	172	0
	0日目	6.1	5.5	12.7	40	304	3294	2562	183	61	0
	7日目	5.3	5.1	11.2	38	343	1060	3869	265	106	0
	21日目	6.7	5.7	12.8	42	289	1742	4422	335	201	0
	35日目	5.6	5.6	12.7	42	377	1792	3584	168	56	0
	60日目	6.6	5.8	13.0	42	356	1716	4488	198	198	0
	90日目	5.4	5.7	13.1	41	399	1674	3456	162	108	0
17C031 AAVhu68.hIDUA	ベースライン	11.9	5.3	12.6	41	386	4879	6188	476	357	0

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

動物の番号及び群	時点	WBC	RBC	HGB	HCT	血小板	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球
		$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$	/ μL	/ μL	/ μL	/ μL	/ μL
	イン										
	0日目	5.5	5.2	12.5	41	366	2255	2970	165	110	0
	7日目	14.4	4.8	11.2	39	357	8064	5040	864	432	0
	21日目	10.7	5.4	12.8	43	410	5136	4815	428	321	0
	35日目	9.7	5.3	12.8	43	267	4559	4559	388	194	0
	60日目	8.3	5.3	12.7	42	390	2988	4731	332	249	0
	90日目	8.4	4.9	12.1	39	414	4284	2940	672	420	84
17C029 AAVhu68.hID UA	ベースライン	15.5	5.9	12.7	43	561	4495	9610	775	620	0
	0日目	15.1	5.7	12.6	41	493	9362	4681	755	302	0

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

動物の番号及び群	測定 時点	WBC	RBC	HGB	HCT	血小板	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球
		$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$
	7 日 目	11.2	5.8	12. 7	43	576	2800	728 0	784	33 6	0
	21 日 目	10.6	5.8	12. 6	42	496	4982	477 0	530	31 8	0
	35 日 目	12.0	5.8	13. 1	44	511	2520	828 0	600	60 0	0
	60 日 目	11.6	5.8	13. 6	43	497	3480	719 2	696	23 2	0
	90 日 目	19.6	5.7	12. 9	42	283	1489 6	352 8	980	19 6	0
17C016 AAVhu68.hID UA + ステロイド	ベ ー ス ラ イ ン	10.2	5.9	13. 5	44	235	1734	775 2	306	40 8	0
	0 日 目	8.9	5.6	12. 9	44	353	3382	507 3	356	89	0
	7 日 目	9.6	5.5	12. 3	41	346	2976	595 2	576	96	0
	21 日 目	11.9	5.4	12. 4	41	424	2856	833 0	595	11 9	0

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

動物の番号及び群	点 時 目	WBC	RBC	HGB	HCT	血小板	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球
		$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^6/\mu$ L	g/d L	%	$\times 10^3/\mu$ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L
	35 日 目	7.9	5.4	12. 7	43	352	4977	252 8	316	79	0
	60 日 目	8.7	5.6	12. 8	43	380	2610	565 5	348	87	0
	90 日 目	8.4	5.4	12. 7	41	357	2940	495 6	420	84	0
	ベ ー ス ラ イ ン	10.7	5.5	13. 4	40	257	6099	406 6	214	32 1	0
	0 日 目	10.6	6.4	13. 9	49	358	7208	265 0	318	42 4	0
	7 日 目	10.8	5.9	13. 1	44	286	3564	604 8	108 0	10 8	0
17C019 AAVhu68.hID UA + ステロイド	21 日 目	12.3	5.7	12. 9	41	462	5658	590 4	492	24 6	0
	35 日 目	12.4	5.9	13. 4	45	297	7812	372 0	620	24 8	0
	60 日 目	8.6	5.8	13. 4	43	373	3612	438	430	17	0

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

動物の番号及び群	点 時 目	WBC	RBC	HGB	HCT	血小板	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球
		$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^6/\mu$ L	g/d L	%	$\times 10^3/\mu$ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L
				4				6		2	
	90 日 目	11.1	5.5	13. 0	41	349	8214	244 2	333	11 1	0
17C020 AAVhu68.hID UA + ステロイド	ベ ー ス ラ イ ン	14.6	6.5	14. 1	47	357	4818	876 0	584	43 8	0
	0 日 目	15.4	6.1	13. 7	44	339	8778	539 0	616	61 6	0
	7 日 目	14.0	6.0	13. 4	43	378	4060	868 0	840	42 0	0
	21 日 目	14.4	5.7	12. 9	42	327	6336	705 6	720	14 4	14 4
	35 日 目	11.1	6.2	13. 9	45	369	2664	777 0	444	22 2	0
	60 日 目	10.8	6.2	14. 0	45	380	4104	594 0	324	43 2	0
	90 日 目	7.2	5.9	13. 5	44	296	2376	453 6	216	72	0

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

動物の番号及び群	時点	WBC	RBC	HGB	HCT	血小板	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球
		$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$
17~167 AAVhu68.hID UA-miR-183	ベ ー ス ラ イ ン	10.6	5.4	13. 7	44	245	1802	816 2	530	10 6	0
	0 日 目	7.2	5.1	12. 2	40	373	936	590 4	288	72	0
	7 日 目	7.6	4.9	12. 2	39	258	1140	608 0	304	76	0
	21 日 目	10.2	5.5	13. 4	45	270	3468	571 2	714	10 2	20 4
	35 日 目	10.6	5.3	13. 2	42	275	5406	466 4	424	10 6	0
	60 日 目	9.5	5.2	13. 4	42	115	3515	551 0	380	95	0
	90 日 目	10.6	5.4	13. 7	44	245	1802	816 2	530	10 6	0
17~215 AAVhu68.hID UA-miR-183	ベ ー ス ラ イ	12.9	5.8	12. 7	44	380	2709	954 6	387	25 8	0

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

動物の番号及び群	時点	WBC	RBC	HGB	HCT	血小板	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球
		$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$
	ン										
	0日目	10.0	5.5	11.9	40	374	3600	590	300	20	0
	7日目	11.2	5.4	12.0	40	423	2800	761	560	22	0
	21日目	11.8	5.2	11.3	39	375	2242	908	236	11	11
	35日目	12.5	5.6	12.4	42	337	5125	662	500	25	0
	60日目	10.3	5.4	12.1	39	315	3811	597	309	20	0
	90日目	13.7	5.3	12.1	38	415	8494	479	274	13	0
17~102 AAVhu68.hID UA-miR-183	ベースライン	5.3	6.0	14.0	46	518	530	381	371	53	53
	0日目	12.4	5.9	13.5	44	478	6944	458	496	37	0
	7日目	9.2	5.8	13.	44	501	3312	496	368	55	0

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

動物の番号及び群	日 目	WBC	RBC	HGB	HCT	血小板	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球
		$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^6/\mu$ L	g/d L	%	$\times 10^3/\mu$ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L	/ μ L
	日 目			1				8		2	
	21 日 目	9.0	5.9	14. 0	45	510	2250	594 0	540	27 0	0
	35 日 目	9.4	6.4	14. 5	49	409	3760	488 8	564	18 8	0
	60 日 目	9.1	6.2	14. 6	46	410	3276	500 5	455	36 4	0
	90 日 目	7.8	5.9	14. 4	44	528	3042	421 2	312	23 4	0

10

20

【表 5】

表 5. AAV. h IDUAベクターを ICM注射されたNHPにおけるCSF白血球数
(μ L当たりの細胞数)

群	動物の番 号	0 日 目	21 日 目	35 日 目	60 日 目	90 日目
AAVhu68.hIDUA	17C024	0	1	2	1	2
	17C031	0	1	2	1	1
	17C029	0	0	0	0	0
AAVhu68.hIDUA+ ステロイド	17C016	0	0	0	0	3
	17C019	0	1	2	1	0
	17C020	0	0	5	1	血液汚染
AAVhu68.hIDUA- miR-183	17~167	0	2	3	1	1
	17~215	0	1	2	1	1
	17~102	0	3	7	2	0

40

NHPにおけるAAV誘発性DRG毒性は、神経細胞アポトーシスを介して生じる。

DRGにおけるニューロン変性の機序を検討するために、細胞アポトーシス及び折り畳み不全タンパク質応答（UPR）のマーカーについて免疫組織化学（IHC）を行った。初期の研究は、アポトーシスの下流マーカーであるカスパーゼ-3の活性化に焦点を当てた。H&E評価に基づいて神経変性を示した動物のDRGは、細胞浸潤の増加とともに、活性化カスパーゼ-3について陽性のIHC染色を示した。AAV6注射されていない動物由来のDRG及び脾臓由来のDRGは、それぞれ、陰性対照及び陽性対照として機能した。NRGにおけるカスパーゼ-3陽性ニューロンは、hIDUA群と比較して、GFP群において高かった。それぞれの場合において、miR-183標的配列を含むことで、活性化カスパーゼ-3を有する細胞の数が減少した。IHCによるカスパーゼ-8の上方制御を評価することによって、外因性経路と称されるものにおいて、適応免疫又は先天性免疫によって誘導されるアポトーシスを評価した。全てのベクター群にわたる変性神経細胞体は、活性化カスパーゼ-8に対して陰性であったが、浸潤細胞は、内部陽性対照として機能するカスパーゼ-8に対して強く陽性であった。切片を、内因性アポトーシスの共通マーカーであるカスパーゼ9の活性化についても評価した。IHCは、AAVhu68・eGFPを受けた動物において、DRGの複数の変性神経細胞体においてカスパーゼ（caspase）-9を示した。しかしながら、AAVhu68・eGFP・miRNAを受け、神経変性を示した動物において、カスパーゼ-9は観察されなかった。miR-183の有無にかかわらず、AAVhu68・hIDUAベクターを受けた動物からのニューロンにおけるカスパーゼ9の明確な増加はなかったが、このことは、単に、AAVhu68・eGFPと比較して、これらのベクターで観察された病変の発生率の減少の関数であった可能性があり、これにより、組織学的切片上の変性の適切な段階でニューロンを見つける可能性を低減させる。アポトーシスの主要な機序と考えられるアポトーシスの内因性経路は、ミトコンドリアの膜透過性の増加及びカスパーゼ9の活性化に起因するシトクロムCの放出を介して媒介される。折り畳み不全タンパク質応答（UPR）を介したアポトーシスは、内因性経路を通じて生じる。

【0195】

高レベルの導入遺伝子産物からのタンパク質過剰発現に起因する毒性の提唱された機序を裏付けるために、活性化転写因子6（ATF6）のためのIHCを実施した。UPRは、ゴルジ体においてATF6活性化の引き金となり、細胞質断片を生成し、核に移行して、ER関連結合エレメントの転写を活性化する。興味深いことに、ATF6についてのIHCは、AAVhu68・eGFP、AAVhu68・hIDUA、及びAAVhu68・eGFP・miR-183を受けた動物のDRGにおけるニューロン及び神経衛星細胞の細胞質において多焦点陽性であり、このことは、病変の重症度に対応していた。対照的に、AAVhu68・hIDUA・miR-183、及び未処理のAAV注射されていない対照NHPを受けた動物は、ATF6に対して拡散した陰性であった。AAVhu68・eGFPを注射した動物において、最高レベルのATF6発現が観察され、続いて、AAVhu68・hIDUA及びAAVhu68・eGFP・miR-183が観察された。全体的な研究所見と一致して、miR-183を有するベクターを受けた動物は、ATF6陽性の低減を示し、このことは、細胞ストレスの低減を示している。

【0196】

DRGの毒性は、高全身用量のベクター又はCSFへのベクターの直接送達に依存する任意の療法によって生じる可能性が高い。この安全上の懸念は、霊長類に限定され、通常は無症候性であった。しかしながら、DRG毒性は、自己受容の欠損（Hinderer, C., et al. Hum Gene Ther. 29(3):285-298, 2018）又は難治性神経障害性疼痛に起因する失調症などの実質的な罹患を引き起こす可能性がある。米国食品医薬品局は最近、NHPでのDRG毒性のために、遅発性SMAに対する髄腔内AAV9の臨床試験を一時停止したが、このリスクがAAV療法の開発をどのように制限し得るかを強調している（Novartis. Novartis announces AVXS-101 intrathecal study update, 2

10

20

30

40

50

019)。

【0197】

もともと、この毒性は、外来カプシド又は導入遺伝子のエピトープを対象として、DRG形質導入ニューロンに対する破壊的なT細胞免疫によって引き起こされると仮定された。しかしながら、MMF及びラパマイシンなどの強力な免疫抑制レジメンは、毒性試験における毒性を防ぐことができず(Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:68-78, 2018、Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018)、また、この研究でも、ステロイドで毒性を防ぐことはできなかった。進行性ではないが、遅発性のDRG変性の時間経過は、適応免疫が役割を果たしたという考えを支持しなかった。もし細胞傷害性T細胞が関与していたならば、DRGの変性及び単核細胞の浸潤が、早期に始まり、経時的に進行することが観察されていたであろう。

10

【0198】

高レベルのDRG形質導入で、細胞ストレスが生み出され、これが高度に形質導入されたDRGニューロンにおける変性をもたらす可能性がある。毒性は、導入遺伝子のmRNA及びタンパク質の発現を抑制することによって、防止され得るため、カプシド又はベクターDNAが、細胞のストレッサーとはなり得ない。組織学的分析では、変性が、最高レベルの導入遺伝子タンパク質を発現するDRGニューロンに限定されることが実証された。ニューロン変性は、カスパーゼ-3及びカスパーゼ-9の活性化にも関連しており、これは、T細胞媒介性細胞死とは対照的に、細胞内のストレス源によって引き起こされるアポトーシスを示唆している。miR-183を介した導入遺伝子発現の細胞特異的除去によるDRG変性の低減は、カプシド又はベクターDNAではなく、導入遺伝子由来のmRNA又はタンパク質の過剰発現が、このプロセスを駆動することを示唆している。miR標的又は未処理の動物を用いた対照と比較して、miR標的を含まないベクターを受けた動物のニューロン及び衛星細胞におけるATF6染色の増加は、UPRを暗示するが、誘発する機序は、非分泌型(GFP)導入遺伝子と分泌型(IDUA)導入遺伝子とで異なる場合がある。

20

【0199】

自己限定的ではないが、遅延したDRG神経変性の時間経過は、非免疫毒性が、高度に形質導入されたサブセットの細胞に限定されるという考えと一致する。DRG毒性及び軸索障害が可逆的であるかどうかは不明である。成体動物を6ヶ月追跡した結果、病的状態における一貫した低減は観察されなかった。ICM注入後、NHPでDRG毒性が観察された唯一の実験は、ベクターが1ヶ月齢のマカクに投与され、4年後に剖検された場合であった(Hordeaux et al., 2019)。乳児霊長類がDRG毒性に耐性を有するか、又はそのDRGニューロンが再生能を有するか、又は病変がこの長期間にわたって退縮する可能性がある。

30

【0200】

所見は、DRG毒性が導入遺伝子の過剰発現によって引き起こされるという支持を示した。したがって、DRG毒性の重症度は、用量、プロモーター強度、及び導入遺伝子の性質に影響されるはずである。霊長類において、感覚ニューロンが最も効率的に形質導入される細胞の1つである理由は、まだ理解されていない。DRGは、CNSの外側に存在し、多孔質で有窓の毛細血管を有するため、全身投与ベクターによって容易にアクセスされる。全身ベクターは、末梢軸索からの取り込まれた後、逆行性輸送を介してDRGニューロンにアクセスすることもできる。髄腔内(クモ膜下腔内)空間に存在する感覚神経区画の解剖学的構造により、CSFに送達されるベクターの高い形質導入が促進され得る。後根のDRGニューロンの軸索は、CSFに曝され、ICM/LP投与後に、ベクターへの容易なアクセスが提供される。DRGの細胞外液へのクモ膜下腔の開放的なアクセスにより、DRGの神経細胞体及び他の細胞へのICM/LPベクターの直接接触が可能になるはずである。miR-183によるDRGニューロン内の導入遺伝子発現の抑制は、この

40

50

m i Rの影響を受けるはずがないD R Gの他の細胞における導入遺伝子発現の分析を容易にした。I S Hで、周囲のグリア衛星細胞における導入遺伝子のm R N Aが明らかになり、直接的な形質導入を示唆し得る（図6 C）。グリア細胞における導入遺伝子のm R N Aの機能的意義は未知である。

【0201】

ベクター導入遺伝子の発現を選択的に阻害すると、D R G毒性が低減され、潜在的に排除されるはずである。これを達成するための鍵は、他の場所における発現に影響を与えることなく、D R Gニューロンにおける発現を特異的に消滅させるための戦略である。現在、カプシド修飾又は組織特異的プロモーターを通じてこの特異性を達成する方法は存在しない。m i R-183の標的をベクターに含めることで、ベクターの製造、効力、又は生体分布に影響を与えることなく、D R G毒性を低減／排除する所望の結果が達成された。上記のh I D U AのN H P研究では、併用ステロイドとともに非m i R-183ベクターを受けた群が含まれた（A A V試験における免疫介在性の毒性を緩和するための標準的なアプローチである）。ステロイド治療群では、D R G毒性が低減されず、実際、毒性を悪化させる傾向があった。この実験は、A A V遺伝子療法試験における予防的ステロイドの限界を実証する。

【0202】

D R G毒性を減少させるためのこのアプローチのモジュール性は、A A V誘発性のD R G毒性を軽減することが望まれる場合に、C N S遺伝子療法に関して考慮されるいずれのA A Vベクターにおけるその使用を示唆する。このアプローチは、治療用途で、幅広いA A Vベクターにわたって使用することができる。

【0203】

実施例4：m i R-183クラスター標的配列を有する発現構築物のインビトロ及びインビボ評価

インビトロアッセイを使用して、m i R N A標的配列を有する構築物の活性及び特異性を評価した。上の実施例2に記載されるように、H E K 293細胞（又は別の好適な細胞株）を、G F P導入遺伝子を有するシスプラスミド、並びにm i R-182及びm i R-183などの1つ以上のm i R N Aを発現するプラスミドで共トランスフェクトされ得る。シスプラスミドは、発現カセットの3' U T R中の様々な数の対応する標的m i R N A配列で設計され、代替的なスペーサー配列が導入される。トランスフェクションの72時間後、G F Pの発現を定量化して、相対的な発現レベルを決定する。ラット、アカゲザル、又はヒトD R G細胞も形質導入して、様々な構築物の有効性を評価することができる。加えて、m i R-96、m i R-182、及びm i R-183を発現するH C T 116細胞株を用いて、スクリーニングアッセイを開発した（図26 A及び図26 B）。

【0204】

インビトロ研究の結果に基づいて、G F Pの発現を低減又は排除する配列（いくつかのリピートを含む）及びスペーサーの好適な組み合わせが特定される。例えば、図24は、A A V-P H P、B、G F Pベクターでの形質導入後の脳皮質におけるG F Pの発現に対する、m i R-183、m i R-182、m i R-96、又はm i R-96を含む効果を示す。例えば、D R Gの脱標的化（すなわち、G F P発現の低減）を含む、C N Sでの発現レベルを評価するための例示的なインビボマウス研究が、実施例2にも提供されている。

【0205】

H C T細胞株は、N H P及びヒトD R Gと比較して、同様の比率のm i R-183／m i R-182を再現する好適なモデルである（図26 C）。図27 A～図27 Dは、4つのm i R-182標的配列を有するベクター、並びにm i R-182及びm i R-183標的配列（4つのm i R-182標的配列及び4つのm i R-183標的配列）の組み合わせを有する構築物を用いてH C T 116細胞を形質導入した結果を示す。G F P発現の減少は、m i R-183標的コピーの増加とともに、観察された。更に、4つのm i R-182標的配列を有するか、又は4つのm i R-182標的配列と4つのm i R-182

標的配列の組み合わせのいずれかを有するベクターは、4つのmiR-183標的配列を有するベクターと比較して、より高いサイレンシング（GFP発現の低減）をもたらす（図27C及び図27D）。

【0206】

インビトロで好ましい減少した発現レベルを示したmiR-182標的配列のみ、並びにmiR-182及びmiR-183標的配列の組み合わせを有する構築物もまた、インビボで評価した。AAVhu68ベクターの投与後、CNS及びDRGの細胞における毒性及び導入遺伝子発現のレベル（脱標的化の程度）を評価した。マウスは、GFP導入遺伝子を有する発現カセット、miR標的配列なし、miR-183標的配列の4つのコピー、miR-182標的配列の4つのコピー、又はmiR-182標的配列の4つのコピー、及びmiR-183標的配列の4つのコピーを含むベクターの 4×10^{12} GC I V又は 1×10^{11} GC I C Vを受け取った（配列番号28も参照されたい）。図28A及び図28Bに示される結果は、miR-182標的配列又はmiR-182標的配列+miR-183標的配列を有する構築物が、DRGにおける導入遺伝子発現をサイレンシングしたことを実証する。しかしながら、脳及び脊髄（図28C～図28E）及び末梢組織（図28F～図28J）における導入遺伝子発現は、保存された。また、AAVhu68ベクターを用いたNHP研究（ 3×10^{13} のICM送達）は、miR-182標的配列の4つのコピーを有する構築物、又はDRGにおけるmiR-182標的配列の4つのコピー及びmiR-183標的配列の4つのコピーを有する構築物が、導入遺伝子発現をサイレンシングしたことを実証した（図29A及び図28B）。更に、両方の構築物は、減少したDRG毒性及び背側軸索障害に関連付けられた（図29C及び図29D）。

【0207】

実施例5：ムコ多糖症II型（MPS II）の治療のためのヒトイズロン酸-2-スルファターゼ（hIDS）導入遺伝子の脱標的化

MPS II（ハンター症候群）の治療のための1つの戦略は、rAAVベースのCNS特異的遺伝子療法を介して、患者の欠陥イズロン酸-2-スルファターゼを機能的に置換することである（例えば、国際特許出願第PCT/US2017/027770号を参照されたい。参照により本明細書に援用される）。DRG毒性を低減するために、MPS IIの治療のためのAAVベクターゲノムは、miR標的配列を導入することによって修飾される。したがって、hIDSコード配列を含むAAVベクターゲノムは、1つ、2つ、3つ、又は4つのmiR-183標的配列を用いて設計される。インビボでのDRG脱標的化の有効性は、例えば、hIDSをコードするAAVベクターをNHPに髄腔内投与した後で測定される。

【0208】

実施例6：脊髄性筋萎縮症（SMA）の治療のためのSMN1導入遺伝子の脱標的化

SMAは、hSMN1遺伝子の変異又は欠失によって引き起こされる常染色体劣性障害である。rAAVベクターを介した機能的なSMNタンパク質の送達は、SMAの治療に有効であるものの、DRG毒性が観察されている。好適なベクターとしては、国際特許出願第PCT/US2018/019996号（参照により本明細書に援用される）に記載されているもの、及びAAV9ベースの遺伝子療法であるZolgensma（登録商標）が挙げられる。ヒトSMN1をコードするAAVベクターの送達後のDRG毒性の低減又は排除は、miRNA標的配列（miR-182及びmiR-183によって認識されるものなど）をベクターゲノムに組み込むことによって達成される。したがって、hSMN1転写産物をコードする核酸配列を、1つ、2つ、3つ、又は4つのmiRNA標的配列と組み合わせる有する、AAVベクター（AAV9又はAAVhu68カプシドを有するものを含む）が生成される。標的配列は、例えば、miR-182及びmiR-183標的配列、又はそれらの組み合わせから選択される。hSMN1発現AAVベクターのI V投与又は髄腔内投与後のDRG毒性は、NHPモデルで評価される。

【0209】

実施例7：miRNA標的配列を有する肝臓特異的遺伝子療法ベクター

遺伝子療法に関して、肝臓組織における導入遺伝子の発現の改善が望まれる場合、AAVベクターゲノムは、miRNA標的配列を含むように修飾され得る。例えば、機能性低密度リポタンパク質受容体（hLDLR）遺伝子を発現し、AAV8カプシドを有するように設計されたrAAVは、家族性高コレステロール血症（FH）の治療に好適である（例えば、国際特許出願第PCT/US2016/065984号を参照されたい。参照により本明細書に援用される）。肝臓組織におけるhLDLR導入遺伝子の発現の増強は、hLDLRコード配列を、1つ、2つ、3つ、又は4つのmiR-182標的配列と組み合わせるベクターゲノムを含むrAAVを使用して達成される。同様に、血友病A（第VII因子）及び血友病B（第IX因子）の治療のための遺伝子療法としては、肝臓に対して指向性を有するベクターが挙げられる（例えば、国際特許出願第PCT/US2017/027396号及び国際特許出願第PCT/US2017/027400号を参照されたい。参照により本明細書に援用される）。肝臓におけるヒト第VII因子及び第IX因子のより効果的な送達及び発現は、導入遺伝子と組み合わせ、1つ、2つ、3つ、又は4つのmiR-182標的配列を有するベクターゲノムを含むrAAVを送達することによって達成される。

10

【0210】

実施例8：miRNA標的配列の代替的コピーを有するベクターゲノムにおけるDRG脱標的化配列の評価

AAV9ベクターを、前述のようにCB7プロモーター下で緑色蛍光タンパク質（eGFP）をコードするように設計した。発現カセットは、単一のmiR-183脱標的化配列、miR-183脱標的化配列の2つのコピー、miR-183脱標的化配列の3つのコピー、又はeGFPの3'UTR中のmiR-183脱標的化配列の8つのコピーを含むように設計された。これらのベクターは、記載されるように作製され、滴定される [Lock et al. Hum, Gene Ther., Oct 2010; 21(10): 1259-1271]。簡潔には、HEK293細胞を三重でトランスフェクトし、細胞を溶解し、ベクターを回収し、濃縮し、前述のように精製する。精製したベクターを、以前に記載されているように、ウサギベクターグロビンポリA配列を標的とするプライマーを使用して、ドロップレットデジタルPCRで滴定する (Lock et al. Hum, Gene Ther Methods; 2014年4月; 25(2): 115-125を参照されたい)。

20

30

【0211】

eGFP導入遺伝子及びmiR-183の1つのコピーを含むベクターゲノムの配列は、配列番号20に提供される。eGFP導入遺伝子及びmiR-183脱標的化配列の2つのコピーを含む例示的なベクターゲノムは、配列番号21に提供される。eGFP導入遺伝子及びmiR-183の3つのコピーを含むベクターゲノムの配列は、配列番号22に提供される。eGFP導入遺伝子及びmiR-183脱標的化配列の4つのコピーを含む例示的なベクターゲノムは、配列番号23に提供される。eGFP導入遺伝子及びmiR-183脱標的化配列の7つのコピーを含む例示的なベクターゲノムは、配列番号26に提供される。eGFP導入遺伝子及びmiR-183脱標的化配列の8つのコピーを含む例示的なベクターゲノムは、配列番号27に提供される。代替的に、ベクターゲノムは、miR標的配列の組み合わせを有する。例えば、配列番号28は、miR-182標的配列の4つのコピー及びmiR-183標的配列の4つのコピーを含むベクターゲノムを提供する。

40

【0212】

AAV9ベクター、AAV9.CB7.CI.eGFP.rBG、AAV9.CB7.CI.eGFP.miR-183.rBG、及びAAV9.CB7.CI.eGFP.miR-183.rBGを、実施例1に記載されるように構築した。AAV9.CB7.CI.eGFP.miR-183.rBG及びAAV9.CB7.CI.eGFP.miR-183.rBGベクターゲノムは、eGFPコード配列の3'UTRにおけるmiR-183又はmiR-145脱標的化配列の4つのコピーを含み、dr g及び他の組織並び

50

に細胞型における発現レベルに対する効果を、前述の実施例に記載の方法を使用して評価した。図24Aは、miR-145標的を含むように修飾された標的が、対照のno-miRベクターと比較して、心臓における発現の減少を示したことを示す。4×miR-183標的を有するベクターは、no-miR及びmiR-145標的ベクターと比較して、心臓におけるGFP形質導入の増加を示した。図24Bは、4×miR-183標的を有するベクターが、no-miR及びmiR-145ベクターと比較して、脳皮質及び脳幹におけるGFP形質導入の増加を示したことを示す。

【0213】

実施例9：導入遺伝子に作動可能に連結されたmiR標的化配列を含むrAAVは、miR-183クラスター調節遺伝子の発現を増加させない。

ヒトCACNA2D1及びCACNA2D2遺伝子（メンバーは、電位依存性カルシウムチャネルをコードする）は、miR-183クラスター（miR-183/-96/-182）の予測標的であり、以前の出版物は、ヒトドナー由来のDRGにおける、3つ全てのmiRNAと、CACNA2D1及びCACNA2D2発現との間に有意な逆相関を示唆する。例えば、Peng et al, “mirR-183 cluster scales mechanical pain sensitivity by regulating basal and neuropathic pain genes”. Science. 2017 Jun 16; 356(6343): 1168-1171. doi: 10.1126/science.aam7671. Epub 2017 Jun 1を参照されたい。miR-183がCACNA2D発現を下方制御することが報告されている。したがって、CACNA2Dの発現の増加は、おそらく、「スポンジ効果」から生じ、これは、疼痛及び圧力に対する感受性の増加をもたらすと予想される。

【0214】

4×miR-183標的配列の有無にかかわらずeGFP又はIDUAを含むベクターゲノムを含有するストックrAAVを、ラットDRG培地で 2.5×10^{12} /mLに希釈し、古い培地を除去した後、0.25mLのベクターを24ウェルプレートの各DRG含有ウェルに添加した。24時間後、培地を除去し、新鮮な培地と交換した。形質導入は、3個の複製物で行われた（すなわち、AAV-GFPについて3個のウェル、AAV-GFP-miR-183については3個のウェル（モック対照について2個のウェル））。形質導入を増強するために、AAVベクターとともに、MOI 10で、アデノウイルスAD5（SignaGen Laboratories、Rockville、MD）も添加した。RNAを各ウェルについて別々に単離し、q-RT-PCRに（1つの反応/ウェル、2個の複製物で）使用した。形質導入の72時間後に、DRG培養物から総RNAを抽出した。

【0215】

標的遺伝子、CACNA2D1及びCACNA2D2に対するmiR-183の発現レベル及び潜在的なスポンジ効果を、ラットCACNA2D1（アッセイID Rn01442580）及びCACNA2D2（アッセイID: Rn00457825）に特異的なプライマーを使用して決定した。図11は、低濃度（ 5×10^5 ）又は高濃度（ 2.5×10^8 ）での、miR-183脱標的化配列の4つのコピーを伴うか、又は伴わない、eGFP導入遺伝子を有する様々なAAV9ベクターによる形質導入の結果を示す。miR-183を伴わない低用量及び高用量を、100（低用量AAV9-eGFPの場合）又は10（高用量AAV9-eGFPの場合）の感染多重度（MOI）で、アデノウイルス5型（Ad5）ヘルパー共トランスフェクションを行うか、又は行わずに試験した。全てのDRGニューロンが形質導入され、毒性の目に見える徴候は観察されなかった。DRGニューロンにおいて、GFP発現は観察されなかったが、線維芽細胞様細胞において、ある程度の発現が観察された。この所見は、（×4）miR-183標的配列を有するベクターゲノムによるGFP転写の抑制を確認する。

【0216】

NHPにおけるmiR-183スポンジ効果研究

動物にAAV-IDUA又はAAV-IDUA-4Xmir-183ベクター (n=3/群)を投与した非ヒト霊長類 (NHP)アカゲザル研究 (19-04)から、DRG (腰部)及び脳 (前頭皮質)組織を得た。miRNeasy Mini Kitを全RNA単離に使用し (Qiagen、Germantown、MD)、次いで、抽出されたRNAを、プロトコルの指示に従って、TaqMan (商標) MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)で逆転写させた。定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)を実施し、製造元の指示に従って、hsa-mir-183-5p (アッセイID 002269)及びRNU6B (アッセイID 00193) (Applied Biosystems Inc.、Foster City、CA、USA)に特異的なプライマーを有するTaqMan MicroRNA Assayキットを使用して、異なる組織におけるmir-183の存在量を決定した。同様に、mir-183の直接標的のうちの2つ、すなわち、CACNA2D1及びCACNA2D2の存在量を、CACNA2D1 (アッセイID Hs00984840)及びCACNA2D2 (アッセイID: Hs01021049)にそれぞれ特異的なプライマーを有するTaqMan遺伝子発現アッセイキットを使用して測定した。各qPCRアッセイは、生物学的複製物からの100ngの総RNAに由来するcDNAを用いて3個の複製物で実施され、比較閾値サイクル (Ct)法により分析した。mir-183の平均発現レベルを、内因性対照遺伝子としてRNU6Bで正規化し、CACNA2D1及びCACNA2D2の平均レベルを $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を使用してGAPDHで正規化した (Schmittgen TD、Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. Nat Protoc. 2008; 3 (6): 1101-8.)。

10

20

30

40

50

【0217】

DRG (高mir-183存在量)又は前頭皮質 (低mir-183存在量)のいずれかにおけるAAV-IDUA又はAAV-IDUA-mir-183投与動物を比較するmir-183クラスター調節遺伝子 (CACNA2D1又はCACNA2D2)の発現の増加はなかった (図10A及び図10B)。

【0218】

ラット新生児後根神経節 (DRG) ニューロン細胞培養

ラットDRGニューロン (LONZA WALKERSVILLE INC)を解凍し、7mLの推奨培地 (PNGM BulletKit: 2mMのL-グルタミン、50µg/mLのゲンタマイシン/37ng/mLのアムホテリシン、及び2%のNSF-1を含有するPrimary Neuron Basal Medium)に加えた。次いで、約5.0E5のDRGニューロンを含有する8mLの培地を、細胞を添加する直前に、ポリD-リジン (30µg/mL、Sigma)でコーティングした24ウェル組織培養プレートの8ウェル間で分割した。細胞を37℃、5%CO₂インキュベーター中で4時間インキュベートした後、培地を除去し、新鮮な予熱した培地と交換した。シュワン細胞増殖を阻害するために、最初の4時間のインキュベーションの後に、有糸分裂細胞阻害剤 (17.5µg/mLのウリジンを5µL及び7.5µg/mLの5-フルオロ-2-デオキシウリジン/培地mLを5µL)を添加した。細胞を37℃、5%CO₂でインキュベートし、5日目に培地を完全に变化させ、その後3日ごとに50%培地を変化させた。初期の培養の6日後、上述のようにAAVベクターを用いてRAD DRGニューロンを形質導入した。

【0219】

図12は、ラットDRG細胞におけるmir-183スポンジ効果研究の効果を示す。これらのデータは、細胞がAAV9-eGFP-mir-183ベクターで形質導入されると、ラットDRG細胞におけるmir-183レベルが減少したことを示す。所見は、発現されたGFP-mir-183 mRNAの標的配列の係合を示した。

【0220】

図13A及び図13Bは、3つの既知のmiR-183調節転写産物に対する、ラットDRG細胞におけるmiR-183スポンジ効果研究の効果を示す。図13Aは、モックベクター、AAV-GFP、又はAAV-GFP-miR-183ベクターによる形質導入後のラットDRG細胞における相対発現CACANA2D1を示す。図13Bは、モックベクター、AAV-GFP、又はAAV-GFP-miR-183ベクターによる形質導入後のラットDRG細胞におけるCACANA2D2の相対発現を示す。図13Cは、モックベクター、AAV-GFP、又はAAV-GFP-miR-183ベクターによる形質導入後のラットDRG細胞におけるATF3の相対発現を示す。これらの既知のmiR-183調節転写産物のmRNAレベルの相対発現に変化はない。形質導入されていないモックウェル及びGFP-miR-183形質導入されたウェルと比較して、差は観察されなかった。これらのデータは、これらの細胞におけるスポンジ効果の不存在を示す。miR-183の残りのレベルのいずれかが十分であるか、又はクラスターの他のメンバー(miR-96及び/又はmiR-182)が、miR-183の利用可能性の減少を補うことができる可能性がある。

10

【0221】

実施例10：DRG病的状態のメタアナリシス

血液又は脳脊髄液(CSF)を介して非ヒト霊長類(NHP)にアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを投与することで、後根神経節(DRG)病的状態を引き起こす可能性がある。この病的状態は、ほとんどの場合、最小限から中程度であり、罹患した動物において臨床的に無症状であり、単核細胞浸潤、神経変性、及び中心軸索及び末梢軸索の二次軸索病変による組織病理学的分析によって特徴付けられる。256 NHPにおける33の非臨床研究からデータを集計し、異なる投与経路、用量、時間経過、研究実施、動物の年齢、性別、カプシド、プロモーター、カプシド精製方法、及び導入遺伝子の間のDRG病的状態の重症度のメタアナリシスを行った。DRG病的状態は、CSFにAAVを投与したNHPの83%、及び静脈内(IV)経路を介したNHPの32%で観察された。本発明者らは、注射時の用量及び年齢が、重症度に顕著に影響を及ぼす一方で、性別は影響を及ぼさないことを示す。DRG病的状態は、急性時点(すなわち、14日以下)では存在せず、注射後1~5ヶ月までは類似しており、6ヶ月後にはそれほど重症ではなかった。ベクター精製方法は、影響を及ぼさず、本発明者らが試験した全てのカプシド及びプロモーターは、いくつかのDRG病的状態を引き起こした。5つの異なるカプシド、5つの異なるプロモーター、及び20の異なる導入遺伝子からのここに提示されるデータは、NHPを使用した非臨床研究において、DRG病的状態が、AAV遺伝子療法後にほぼ普遍的であることを示唆する。治療用導入遺伝子を受けた動物のいずれも、なんら臨床的徴候を示さなかった。神経伝導速度などの感受性技術の組み込みは、少数の動物において、末梢神経軸索症の重症度と相関する修飾を示すことができる。ヒトCNS試験及び高用量IV研究における感覚神経障害のモニタリングは、臨床的に顕著なDRG病的状態が生じるかどうかを決定することは慎重であるように思われる。

20

30

【0222】

導入

組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)を使用する遺伝子治療は、非ヒト霊長類(J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 68-78, 2018; J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 79-88, 2018)及びブタ(C. Hinderer, et al. Hum Gene Ther, 2018)を使用する前臨床研究において、後根神経節(DRG)の感覚ニューロンにおける組織病理所見と結びついている。病態は、背側脊髄路の中心軸索及び末梢神経の末梢軸索の両方に影響を与える二次軸索障害に加えて、DRG内の単核細胞浸潤及び感覚ニューロン変性として現れる(図14)。DRG病的状態又は毒性は、脳脊髄液(CSF)へのAAV投与(J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 68-78, 2018; J. Hordeaux, et al. Mol Ther Met

40

50

hods Clin Dev 10, 79–88, 2018; B. A. Perez, et al. Brain Sci 10, 2020) 又は中枢神経系 (CNS) を標的とする全身性高用量投与 (C. Hinderer, et al. Hum Gene Ther, 2018) を使用する非臨床研究において報告されている。病的状態が最小限から中程度であったほとんどの研究において、動物は無症状のままであった。進行性固有受容欠損症及び運動失調症を伴うより重度の病理学的及び明らかな毒性は、高用量静脈内 (IV) ベクター注射の14日以内のブタの研究において観察された (C. Hinderer, et al. Hum Gene Ther, 2018)。ミコフェノール酸モフェチルとラパマイシンの組み合わせを使用した免疫抑制は、NHPにおける組織病理所見を排除しなかった (J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 68–78, 2018、J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 79–88, 2018)。ヒト臨床試験におけるDRG病的状態の意義は未知である。NHP研究のほとんどは、動物の数が少なく、統計学的分析の機会が限られているため、33の研究からデータを集計し、合計256のマカクについてメタアナリシスを行い、投与経路、用量、時間経過、研究実施、動物の年齢、性別、カプシド、プロモーター、カプシド精製方法、及び導入遺伝子の効果を探した。

10

【0223】

材料及び方法

データ入手可能性に関する声明

集計されたデータは、研究に資金を提供したスポンサーが権利を有する特定の導入遺伝子を除き、提供された実験の詳細とともに提示する。

20

【0224】

動物

このメタアナリシスには、33件の研究から237匹のアカゲザル及び19匹のカニクイザルが含まれていた。動物手順は全て、ペンシルベニア大学の施設内動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって承認された。アカゲザル (Macaca mulatta) 又はカニクイザル (Macaca fascicularis) は、Covance Research Products, Inc. (Alice, TX)、Primgen/Prelabs Primates (Hines, IL)、MD Anderson (Bastrop, TX) から調達したか、又は寄贈された。動物は、University of Pennsylvania又はChildren's Hospital of Philadelphiaで、Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) のInternational-accredited Nonhuman Primate Research Program施設のステンレス鋼製スクイーズバックケージ内に収容された。動物は、給餌、視覚及び聴覚刺激、操作、及び社会的相互作用などの様々な豊かさ (enrichments) を享受した。

30

【0225】

試験物又は対象物の投与

CSF投与のために、NHPは、以前に記載されているように (N. Katz, et al. Hum Gene Ther Methods 29, 212–219, 2018)、透視ガイダンス下で、大槽内に注射された滅菌人工CSF (ビヒクル) 中で希釈されたベクターを受けた。麻酔した動物において、透視ガイダンス下で腰部穿刺を行った。脊椎針をL4–5又はL5–6空間に挿入した後、CSFの戻りによって、及び／又は最大1mLの造影剤 (イオヘキソール180) を注射することによって、配置を確認した。静脈内投与のために、カテーテルを伏在静脈内に配置し、ベクターを滅菌1倍ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水で希釈した。

40

【0226】

50

神経伝導速度検査

動物を、ケタミン／デクスメトミジンの組み合わせで鎮静し、横臥位又は仰臥位で手術台に配置し、ヒートバックで体温を維持した。カソードが記録部位に最も近くになるように、刺激装置のプロブを正中神経上に配置し、2つの針電極を、第ⅠⅠ指の末節骨のレベル（参照電極）及び基節骨のレベル（記録電極）で皮下に刺入し、一方、接地電極を刺激プロブ（カソード）の近位に配置した。小児刺激装置は、ピーク振幅応答に達するまで段階的に増加した刺激を伝えた。最大10個の最大刺激を平均化し、正中神経について報告した。記録部位から刺激カソードまでの距離（cm）を測定し、伝導速度を算出するために使用した。伝導速度及び感覚神経活動電位（SNAP）振幅の平均を報告した。

【0227】

10

ベクター

研究のために、AAVベクターを作製し、既に記載されているようにPenn Vector Coreによって滴定した（M. Lock et al. Hum Gene Ther 21, 1259-1271, 2010、M. Lock, et al. Hum Gene Ther Methods 25, 115-125, 2014）。簡単に説明すると、HEK293細胞を三重でトランスフェクトし、培養上清を収集して濃縮し、イोजキサノール勾配で精製した。Good Laboratory Practice（GLP）準拠の毒性研究のために、ベクターもまた、HEK293細胞のトリプルトランスフェクションによって産生され、既に記載されているように（J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 79-88, 2018）、POROS（商標）Capture Select（商標）AAV9樹脂（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA）を使用してアフィニティクロマトグラフィーによって精製された。

【0228】

20

組織病理

大部分の研究では、委員会認定の獣医病理学者は、最初に試験物／治療群を盲検化し、確立された重症度スコアを、病変の不在について0、最小（10%未満）について1、軽度（10～25%）について2、中等度（25～50%）について3、顕著（50～95%）について4、及び重度（95%を超える）について5と定義した。これらのスコアは、ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色した組織の顕微鏡での評価に基づいており、%は、平均高倍率視野における病変によって影響を受けた組織の割合を表す。全てのGLP及び一部の非GLP臨床研究では、査読は、外部の委員会認定の獣医病理学者によって完了した。DRG変性及び脊髄の背側軸索障害からの重症度スコアは、頸部、胸部、及び腰部のセグメントから確立された。しかしながら、評価された切片数は、研究によって異なっていた。いくつかの研究において、所与のセグメントについて複数の組織切片がスライド上に存在する場合、スコアは、DRG及び脊髄の個々の切片に割り当てられた。これらを、単一の代表的なスコアについて平均化した。本発明者らは、脊髄軸索障害を、全てのDRGから来る軸索の照合を表すため、DRG病的状態のより良い指標と考えている。本発明者らは、この書類全体で、DRG病的状態を、DRG細胞体及び脊髄、又は脊髄単独の組織病理学的所見と定義する。末梢神経軸索症のグレードは、正中（近位及び／又は遠位）、橈骨、尺骨、坐骨（近位及び／又は遠位）、腓骨、脛骨、及び／又は胸骨神経の評価に基づいて確立された。近位及び遠位の正中神経について評価が実施されたとき、近位セグメントは、腕神経叢から肘までの神経の部分に対応し、遠位セグメントは、肘から手のひらまでの神経の部分に対応していた。存在する場合、末梢神経における軸索周囲（すなわち、神経内膜）線維症について、重症度スコアを与えた。末梢神経が両側とも評価された場合の研究では、軸索障害及び軸索周囲スコアを、各神経について平均化した。

【0229】

30

40

データ抽出

病的状態スコア及び全ての関連する研究情報を含む生データを研究ファイルから抽出し、単一のExcelスプレッドシートに集計した。2名が独立して、事前に決定された検

50

索条件に基づいてスコアを抽出し、ソートしてグラフを生成し、統計を実行した。抽出された出力の間に矛盾が生じた場合、平等に責任を有する品質管理について合意に達した。

【0230】

統計

各々のパラメータ（すなわち、注射時の年齢、カプシド、投与経路、時間経過、プロモーター、性別、ベクター精製方法、及び用量）について、Rプログラム（バージョン3.5.0、<https://cran.r-project.org>）内の関数「`wilcox.test`」を有するウィルコクソンの順位和検定を使用して、各々のDRG又はSCセグメント（すなわち、頸部、胸部、腰部）についての各々の群の対間の病的状態スコアの比較を行った。次いで、Rの「`metap`」パッケージ中の関数「`sumlog`」を有するフィッシャー法を使用して、全体的なDRG又はSCの群間比較のための3つの比較から、組み合わせたp値を算出した。統計学的有意性は、0.05レベルの組み合わせたp値で評価した。

10

【0231】

結果

DRG病的状態評価

本発明者らは、ニューロン及びその対応する軸索の神経解剖学的評価及び全身評価に基づき、DRGニューロンに対する病変を正確に評価し、スコアリングする方法を開発した。一次感覚ニューロンの神経細胞体は、DRG内に位置するクモ膜下腔空間内の各々の脊髄後根の基部にある卵形腫脹である。DRGニューロンは、偽単極性であり、1つの末梢分枝が末梢神経内に延び、1つの中央分枝は、脊髄白質路内で背側に上行する（図14）。神経変性がDRGに均一に影響を及ぼさないことは、代表的な試料を提供するために、頸部、胸部、及び腰部領域から複数のDRGが収集される必要があることを意味するというのが、本発明者らの経験である。DRGにおける病的状態は、単核炎症性細胞及び増殖する常在衛星細胞を伴う単核細胞浸潤として現れ、神経変性は、その後の段階で見られるようになる（図14、A1の丸印）。神経細胞体損傷に続いて起こるのは、神経根（図14、B1）、脊髄の上行性背側経路（図14、C1）、及び末梢神経（図14、D1）におけるDRG軸索突起に沿った軸索変性（すなわち、軸索障害）である。正常な対応物を伴う典型的な組織病理学的所見は、図14のA1～D2に示されており、DRG病的状態の様々な段階の高倍率画像も示されている。変性プロセスの初期に、神経細胞体は、ミクログリア細胞及び浸潤する単核細胞（神経貪食）とともに、増殖する衛星細胞のみを含み、比較的正常であるように見える（図14のパネルE）。病変が進行するにつれて、神経細胞体は、消えかけている核を有するか、又は核が存在せず、細胞質高酸素血症を有する、小さな不規則形状若しくは鋭角を有する形状の細胞によって特徴付けられる、変性の証拠（図14のパネルF、垂直の矢印）を示す。末期神経細胞体変性（図14のパネルG、丸印）は、衛星細胞、ミクログリア細胞、及び単核細胞によるそれらの完全な消失（図14のパネルG、星形）を伴う。DRG及び対応する軸索における組織学的所見の重症度は、平均高倍率視野に対して影響を受けるニューロン又は軸索のパーセンテージに基づいてグレード分けされる。病変の不在について0、最小（10%未満）について1、2 軽度（10～25%）、3 中等度（25～50%）、4 顕著（50～95%）、及び5 重度（95%を超える）。DRGは、ニューロンの存在量が正常であり、少数のニューロンのみが所与の切片上で変性を示す、モザイクを表す。本発明者らは、脊髄軸索障害を、全てのDRGから来る軸索の照合を表すため、DRG病的状態のより良い指標と考えている。本発明者らは、この書類全体で、DRG病的状態を、DRG細胞体及び脊髄、又は脊髄単独の組織病理学的所見と定義する。

20

30

40

【0232】

研究と集団の特徴

本発明者らは、2013～2020年のGene Therapy Program at Pennにおいて、AAVベクター又はビヒクル対照を注射した256匹の動物を含む33の研究からのデータを集計した。これらの研究のまとめを以下の表に示す。

50

【表 6】

表. NHP集合体及び研究の特徴付け

パラメータ	動物の数					
種	アカゲザル(全て)	アカゲザル(雄)	アカゲザル(雌)	カニクイザル(全て)	カニクイザル(雄)	カニクイザル(雌)
	237	134	103	19	13	6
性別	雄			雌		
	147			109		
年齢	乳幼児(1 ヶ月)		幼若期(1~3 歳)		成体(>3 歳)	
	4		58		194	
投与経路**	IV	ICM	LP		IV+ICM	IM
	27	213	6		4	4
用量範囲	IV			ICM 及び LP		
	1e13 GC/kg~2e14 GC/kg			1e12 GC~3e14 GC		
カプシド	5					
プロモーター	5					
導入遺伝子	20					
ICM/LP 研究のためのカプシド製造	GLP 研究 (カラム精製したベクター)			非 GLP (イオジキサノール精製したベクター)		
	101			103		

**注射されていない n=2(病的状態なし)

【0233】

DRG 病的状態の重症度に対する研究の特徴の効果

DRG 病的状態は、AAV ICM 又は LP を受けた NHP の 83% (170 / 205 匹)、IV 経路の NHP の 32% (8 / 25 匹)、併用 ICM + IV の 100% (4 / 4 匹)、及び筋肉内の 0% (IM、0 / 4 匹) で観察された。病理学者は、DRG における重症度スコア、並びに脊髄及び末梢神経における対応する軸索に基づいて DRG 病変をグレード分けした。DRG 並びに脊髄領域 (頸部、胸部、及び腰部) ごとにスコアを得た。平均スコアは、図 15 ~ 17 に示され、領域別に分割されたデータは、図 20 ~ 23 に示される。DRG における重症度は、各脊髄領域が DRG に由来する軸索の全体をグループ分けするために、脊髄における重症度よりも低かったため、いくつかの DRG からの病的状態スコアを照合した (図 14)。病的状態の重症度に著しく影響した試験設計パラメータは、投与経路 (ROA)、用量、及び剖検時点であった (図 15 A ~ 図 15 C)。非臨床実験室試験のための GLP 実践の遵守 (連邦規則集第 58 条のタイトル 21 に設定されている通り) は、病的状態の重症度に影響を与えなかった (図 15 D)。IM を除く全ての ROA は、ビヒクル対照と比較した場合、DRG 及び脊髄の両方において有意な病的状態を引き起こした ($p = 0.04$ DRG 及び脊髄、IV 対ビヒクル、 $p < 0.001$ DRG 及び $p < 0.0001$ 脊髄、他の全ての経路対ビヒクル)。ICM、LP、及び ICM / IV はいずれも、IV よりも類似しており、かつ有意に悪かった (IV 対 ICM $p < 0.0001$ 、IV 対 LP $p = 0.02$ 、IV 対 ICM / IV $p = 0.0006$ - 図 15 B)。IM (図示せず) は、病的状態を引き起こさず (全てのスコアが 0)、

ビヒクル対照と同様であった。以下の全ての分析について、CSF内投与（すなわち、ICM又はLP）を行った動物のみを検討した。2つの低い方の用量範囲（ $< 3E + 12$ GC及び $3E + 12 \sim 1E + 13$ GC）は、類似していたが、一方、最大用量範囲（ $> 1E + 13$ GC）は、最低用量範囲（ $p = 0.009$ 、脊髄）及び中間用量範囲（ $p = 0.001$ DRG、 $p = 0.05$ 脊髄、図15B）の両方よりも有意に悪い病的状態スコアが得られた。注射後の時点（すなわち、剖検を実施し、組織を分析したとき）は、21～60日、90日、及び120～169日の間に同様の病的状態の重症度を示した。病的状態は、早期（すなわち、14日目）の時点では見られず、180日以上長期フォローアップは、他の全ての時点と比較して重症度の有意な低減を示した（ $p < 0.0001$ 脊髄、 $p < 0.0001$ DRG D90、 $p < 0.001$ DRG 他の時点）。

10

【0234】

DRG病的状態の重症度に対する動物の特徴の効果

ベクター投与時の年齢は、病的状態の重症度に顕著な影響を及ぼした。幼若期動物は、成体と比較した場合、重症度の低いDRG変性を有していた（ $p = 0.003$ ）が、同様の脊髄軸索障害を有していた（図16A）。乳幼児として治療された4匹の動物は、既に報告されているように（J. H ordeaux et al. Hum Gene Ther 30, 957–966, 2019）、DRG又は脊髄病的状態の徴候を有しなかった。この結果は、小さなn及び研究エンドポイント（注射から4年後）の考えられる影響に起因して、慎重に解釈する必要がある。図15A～図15Dに示されるように、研究期間は、病的状態の重症度に影響を有しており、注射時の年齢及び／又は研究期間が、病的状態が存在しないことを裏付けているかどうかは不明である。追加的に、重要なことに、性別は、SC又はDRG病的状態に影響を及ぼさなかった（図16B）。

20

【0235】

DRG病的状態の重症度に対するベクターの特徴の効果

DRG神経変性は、全てのカプシドで存在したが、血清型間で重症度に若干の差があった（図17A）。このようなバリエーションは、DRGに限定され、脊髄スコアでは見られない場合、DRGが、脊髄断面よりもサンプリングアーチファクトに影響されやすいモザイクを表すため、意味がない場合がある。軸索障害及びDRGスコアは、AAVhu68よりもAAV1で（ $p = 0.01$ 脊髄、 $p = 0.0004$ DRG）、かつAAV9よりもAAV1で（ $p = 0.007$ 脊髄及びDRG—図17A）、両方とも有意に悪かった。ユビキタスプロモーターCAG、CB7、及びUbCは、いずれも互いに類似していたが、一方、CAGは、hSyn（ $p = 0.028$ ）よりも悪い軸索障害を引き起こし、CB7（ $p = 0.001$ ）、UbC（ $p = 0.002$ ）及びhSyn（ $p = 0.0003$ 、図17B）より悪いMeP426を引き起こした。20個の異なる導入遺伝子を試験し、1つを除く全てがDRG病的状態を引き起こした（図17C）。病的状態の重症度は、導入遺伝子間で大きく変動した（0.5～2.7の平均脊髄軸索障害スコア）。病的状態の重症度は、分泌型導入遺伝子と比較して非分泌型導入遺伝子で20～25%低かった（図17D；DRGについては、分泌型平均＝0.61、非分泌型平均＝0.47、 $p = 0.05$ ；SCについては、分泌型平均＝1.17、非分泌型平均＝0.94、 $p = 0.02$ ）。更に、精製方法（すなわち、非GLP研究におけるイオジキサノール及びGLP研究におけるカラムクロマトグラフィー）は、DRG病的状態の存在又は重症度に影響を与えなかった（図15D）。

30

40

【0236】

DRG病的状態の領域的重症度及び臨床的症状

頸部、胸部、及び腰部脊椎に関する病的状態の領域的な差を評価した。また、三叉神経の神経節（TRG）も、クモ膜下腔空間の内側の頭蓋底部に位置するDRGと同様の特徴を有する感覚神経節を表すため、分析した。図18は、各領域における実際の病的状態スコアの分布及び平均を示す。TRG病的状態は、頸部及び腰部DRGと類似していた（有意ではない）が、胸部DRGは、重症度のスコアが低かった（ $p = 0.007$ ）。SC領域スコアはいずれも、それらの対応するDRGスコアよりも有意に悪く（ $p < 0.000$

50

1)、このことは、いくつかのDRGからの一致したSC照合軸索であり、それは、より多くの病変を含むことを意味している。切片の大部分は、正常又は低い(グレード1)重症度スコアを有し、グレード4のスコアはほとんど報告されておらず、グレード5のスコアは非常に稀にしか報告されていない(グレード5は、平均高倍率視野における病変によって影響を受ける組織表面の95%以上に相当する)(図18)。精神状態、姿勢、及び歩行のケージ側評価、並びに脳神経、固有受容、運動強度、感覚機能、及び反射の拘束された評価を伴う神経学的検査を実施した。AAV ICM又はLPを投与された204匹の動物のうち、運動失調及び/又は振戦の臨床的徴候を有する明らかな病的状態が発現したのは3匹のみであった。全ての3つの受けたベクターは、1E+13 GCを超える用量でGFPをコードし、病的状態は、注射の21日後に現れた。正中神経の神経伝導速度は、56匹の動物で記録された。2つは、注射から28日後で、顕著な両側感覚振幅低減を発現し、剖検まで持続した。これは、顕著な(グレード4の重症度の)軸索障害及び正中神経の神経内膜線維症と相関関係にあったが、明らかな臨床の後遺症はなかった。ほとんどの動物は、末梢神経における軸索障害及び線維症の重症度グレードが低かった(図19)。

10

【0237】

考察

DRG病的状態及び二次軸索障害は、本発明者らのNHP研究の大部分では最小限であり、訓練されていない目で発見することは困難な可能性がある。ICM AAV投与を評価する本発明者らの最初のGLP毒性研究(J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 79-88, 2018)では、初期病理評価を行ったCROは、神経病理で経験を積んだ査読病理学者によってのみ捕捉された病変を見逃した。神経変性はまばらであり、DRGは、ほとんど正常なニューロンと所与の切片上の数少ない変性事象とのモザイクであるため、堅牢な組織学的分析のために複数のDRGを収集する必要があることを発見した(脊髄領域当たり少なくとも3つを推奨する)。DRGニューロン損傷を検出し、定量化する、より簡単な方法は、脊髄における軸索変性を評価することによって、細胞体内の病的状態の二次的な結果を評価することに伴う。このことは、検出が容易であり、複数のDRGから来る上行線維の照合を表す。

20

【0238】

正しい組織を収集し、慎重に分析したところ、本発明者らは、AAV ICMを受けたNHPの83%、及びAAV IVを受けたNHPの32%において、DRG病的状態の証拠をいくつか発見した。病的状態を示すIV用量は、1E+13 GC/kgと低く、この用量は、いくつかの血友病試験のために診療所で現在評価されている(B. S. Doshi and V. R. Ther Adv Hematol 9, 273-293, 2018)。製造精製方法は、病的状態に影響を及ぼさなかった。本発明者らが試験した全てのカプシド及び全てのプロモーターは、あるレベルのDRG病的状態を示し、このことは、カプシド又はプロモーターを変更することが実行可能な解決策ではないことを示唆する。非臨床研究の設計と臨床翻訳に関連して、注射時の用量及び年齢が重症度に顕著に影響を及ぼす一方で、性別は影響を及ぼさないことが分かった。病的状態の重症度に最も大きな影響を及ぼす本発明者らの研究の態様は、導入遺伝子であり、これは、導入遺伝子の過剰発現が変性につながる初期の事象を駆動するという本発明者らの仮説と一致する。ほとんどの導入遺伝子について、最小有効用量(MED)を上回る無有害作用量(NOAE)を特定することはできなかった。

30

40

【0239】

時間経過は、急性時点(すなわち、14日以下)は組織病理を示さない一方で、より長い研究(すなわち、180日を超える)は、より重症度の低い病的状態を示す傾向があり、このことが、経時的な進行の欠如及び可能な部分寛解を示唆するため、研究設計のために考慮することが重要である。本発明者らの保健当局での経験には、2つの剖検時点を組み込むことを含んでおり、1つは、病的状態の発症後(すなわち、約1ヶ月)であり、も

50

う1つは、病的状態が悪化していないことを示すためのものである（すなわち、4～6ヶ月）。本発明者らのメタアナリシスに含まれる1ヶ月齢で投与された4匹のNHP乳幼児は、動物が注射のほぼ4年後に剖検されたときに良好な導入遺伝子発現レベルがあったにもかかわらず、DRG及びSC軸索病的状態が存在しないことが顕著であった（J. H o r d e a u x e t a l . H u m G e n e T h e r 30, 957-966, 2019）。この観察結果は、乳幼児への投与時のより良好な安全プロファイル、又は急性病的状態が進行せず、実際に解消することを示唆している可能性がある。この研究では、早期の時点での剖検はなかった。

【0240】

治療用導入遺伝子（すなわち、GFPなどのレポーター遺伝子ではない）を受けた動物のいずれも、臨床所見を示さなかった。後の研究で、本発明者らは、神経伝導速度測定の使用を通じた感覚ニューロン病的状態の日常的なモニタリングを組み込んだ。本発明者らは、臨床的後遺症の証拠はなく、より重度の末梢神経軸索障害及び線維症（すなわち、グレード4の重症度）に関連する2匹の動物においてNCV異常を発見した。

【0241】

まとめると、本発明者らは、DRGにおける病的状態が、AAVベクターがクモ膜下腔空間に送達されるとき、及び多くの研究において、より高い用量が全身投与されるとき、ほぼ全てのNHP研究において一貫した所見であることを示す。本発明者らのメタアナリシスは、顕著な臨床的後遺症が存在しないことが驚くべきことである。他の種における他の非臨床研究の慎重な分析は、新生児ブタを除いてDRG病的状態の証拠を示すことができず、このことは、NHPがこの潜在的な病的状態を評価するための最良のモデルであることを示唆している。ヒトCNS試験及び高用量IV研究における感覚神経障害のモニタリングは、臨床的に顕著なDRG病的状態が生じるかどうかを決定することは慎重であるように思われる。

【0242】

実施例11：対照NHPの背景病的状態

以前の研究からの結果の分析を実施して、既存対照NHP動物（ナীব対照及びビヒクル投与対照を含む）からの組織における病的状態のバックグラウンドレベルを決定した。合計で、7匹のナীব動物及び17匹のビヒクル投与（ICMを介して）対照からデータを収集した。結果は、CNS及びPNSにおける病的状態の発生率が概して低かったことを示した。AAV関連DRG/TRG毒性は、典型的には、浸潤の有無にかかわらず、ニューロン細胞体の変性に関連付けられる。対照動物では、この所見は、ビヒクル投与された動物13匹のうちの4匹、及びナীবな動物4匹のうちの1匹に存在した（図30A）。脊髄では、ビヒクル投与動物17匹のうち0匹、及びナীব動物6匹のうち1匹で、背側感覚性白質路における軸索変性（軸索障害）が観察された（図30B）。末梢神経において、神経感覚線維における軸索変性（軸索症）は、ビヒクル投与された14匹の動物のうちの3匹、及び4匹のナীব動物のうちの1匹で観察された（図30C）。

【0243】

DRG毒性が観察された場合、重症度は、1（最小）までスコア化された。AAVベクターの送達は、グレード1所見の発生率を増加させ、グレード2以上の所見と関連付けられた。AAV処置動物対対照動物からのスコアの例を図31A及び図31Bに示す。

【0244】

所見は、DRG毒性を評価するための可能性のある閾値を示唆する。例えば、高レベルの信頼性は、DRG、背側脊髄、及び／又は末梢神経におけるグレード2の所見に割り当てられ得る。代替的に、又は追加的に、毒性は、グレード1所見の発現率の増加に関連付けられ得る。

【0245】

（配列表フリーテキスト）

以下の情報は、数値識別子<223>の下でフリーテキストを含む配列を提供する。

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
1	<223>miR-183 標的
2	<223>mirR-96 標的
3	<223>miR-182 標的
4	<223>miR-145 標的
5	<223>スパーサー(i)
6	<223>スパーサー(ii)
7	<223>スパーサーiii
10	<223>ITR.CB7.CI.eGFP.miR145.rBG.ITR <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130) <223>5'-AAV2-ITR <220> <221>その他の特徴 <222>(1)..(130) <223>5'-AAV2-ITR <220> <221>プロモーター <222>(198)..(579) <223>CMV IE プロモーター <220> <221>プロモーター <222>(582)..(863) <223>CB プロモーター <220> <221>その他の特徴 <222>(1979)..(2698) <223>eGFP 遺伝子 <220> <221>その他の特徴 <222>(2705)..(2727) <223>miR145 <220>

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<221>その他の特徴 <222>(2728)..(2731) <223>スパーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2732)..(2754) <223>miR145 <220> <221>その他の特徴 <222>(2755)..(2760) <223>スパーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2761)..(2783) <223>miR145 <220> <221>その他の特徴 <222>(2784)..(2789) <223>スパーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2790)..(2812) <223>miR145 <220> <221>その他の特徴 <222>(2981)..(3198) <223>3'ITR
11	<223>ITR.CB7.CI.eGFP.miR182.rGB.ITR <220> <221>その他の特徴 <222>(1)..(130) <223>5'ITR(AAV2) <220>

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<221>その他の特徴 <222>(198)..(579) <223>CMV IE プロモーター <220> <221>その他の特徴 <222>(582)..(863) <223>CB プロモーター <220> <221>その他の特徴 <222>(958)..(1930) <223>ニワトリペーダ-アクチンイントロン <220> <221>その他の特徴 <222>(1979)..(2698) <223>eGFP コード配列 <220> <221>その他の特徴 <222>(2705)..(2728) <223>miR182 <220> <221>その他の特徴 <222>(2729)..(2732) <223>スパーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2733)..(2756) <223>miR182 <220> <221>その他の特徴 <222>(2757)..(2760) <223>スパーサー <220> <221>その他の特徴

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<222>(2763)..(2786) <223>miR182 <220> <221>その他の特徴 <222>(2787)..(2792) <223>スペーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2793)..(2816) <223>miR182 <220> <221>ポリ A_シグナル <222>(2858)..(2984) <220> <221>その他の特徴 <222>(3073)..(3202) <223>3'ITR
12	<223>ITR.CB7.eGFP.miRNA96.rBG.ITR <220> <221>その他の特徴 <222>(1979)..(2699) <223>eGFP コード配列 <220> <221>その他の特徴 <222>(2705)..(2727) <223>miR96 <220> <221>その他の特徴 <222>(2728)..(2731) <223>スペーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2732)..(2754)

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<223>miR96 <220> <221>その他の特徴 <222>(2755)..(2760) <223>スペーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2761)..(2783) <223>miR96 <220> <221>その他の特徴 <222>(2784)..(2789) <223>スペーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2790)..(2812) <223>miR96
13	<223>ITR.CB7.CI.eGFP.miRNA183.rBG.ITR <220> <221>その他の特徴 <222>(1979)..(2698) <223>eGFP コード配列 <220> <221>その他の特徴 <222>(2705)..(2726) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2727)..(2730) <223>スペーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2731)..(2752)

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2753)..(2758) <223>スペーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2781)..(2786) <223>スペーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2787)..(2808) <223>miRNA183
14	<223>ITR.CB7.Cl.hIDUAcoV1.rBG.ITR
15	<223>ITR.CB7.Cl.hIDUAcoV1.miR183.ITR <220> <221>その他の特徴 <222>(1938)..(3908) <223>hIDUAcoV1 <220> <221>その他の特徴 <222>(3915)..(3936) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(3937)..(3940) <223>スペーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(3941)..(3962) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<222>(3963)..(3968) <223>スパーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(3969)..(3990) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(3991)..(3996) <223>スパーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(3997)..(4018) <223>miRNA183
20	<223>CB7.C1eGFP.miR183(1x).RBG <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130) <223>AAV2-5'ITR <220> <221>エンハンサー <222>(198)..(579) <223>ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期(IE)エンハンサー <220> <221>プロモーター <222>(582)..(862) <223>ニワトリベータアクチン(CB)プロモーター <220> <221>イントロン <222>(956)..(1928) <223>ニワトリベータ-アクチンイントロン <220> <221>その他

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<222>(1977)..(2696) <223>eGFP コード配列 <220> <221>その他の RNA <222>(2699)..(2720) <223>miR183 <220> <221>ポリ A_シグナル <222>(2762)..(2888) <223>ウサギグロビンポリ A <220> <221>反復領域 <222>(2977)..(3106) <223>AAV2-3'ITR
21	<223>CB7.CI.eGFP.miRNA183(2×).RBG <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130) <223>AAV2-5'ITR <220> <221>エンハンサー <222>(198)..(579) <223>hCMV IE エンハンサー <220> <221>プロモーター <222>(582)..(862) <223>CB プロモーター <220> <221>イントロン <222>(956)..(1928) <223>ニワトリベータ-アクチンイントロン <220> <221>その他の特徴

10

20

30

40

50

【表 7 - 9】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<222>(1977)..(2696) <223>eGFP コード配列 <220> <221>その他の RNA <222>(2701)..(2722) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2701)..(2722) <223>スパーサー <220> <221>その他の特徴 <222>(2723)..(2728) <223>スパーサー <220> <221>その他の RNA <222>(2729)..(2750) <223>miRNA183 <220> <221>ポリ A_シグナル <222>(2792)..(2916) <223>ウサギグロビンポリ A
22	<223>CB7.CI.eGFP.miRNA183(3x).RBG <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130) <223>AAV2-5'ITR <220> <221>エンハンサー <222>(198)..(579) <223>CMV IE エンハンサー <220> <221>プロモーター

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 0】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<222>(582)..(862) <223>CB プロモーター <220> <221>イントロン <222>(956)..(1928) <223>ニワトリベータアクチンプロモーター <220> <221>その他の特徴 <222>(1977)..(2696) <223>eGFP コード配列 <220> <221>その他の RNA <222>(2703)..(2724) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2725)..(2728) <223>スパーサー <220> <221>その他の RNA <222>(2729)..(2750) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2751)..(2756) <223>スパーサー <220> <221>その他の RNA <222>(2757)..(2778) <223>miRNA183 <220> <221>ポリ A_シグナル <222>(2819)..(2945)

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<223>ウサギグロビンポリ A <220> <221>反復領域 <222>(3034)..(3163)
23	<223>CB7.CI.eGFP.miRNA183.RBG <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130) <223>AAV2=5'ITR <220> <221>エンハンサー <222>(198)..(579) <223>hCMV IE エンハンサー <220> <221>プロモーター <222>(582)..(862) <223>CB プロモーター <220> <221>イントロン <222>(956)..(1926) <223>ニワトリベータ-アクチンイントロン <220> <221>その他の特徴 <222>(1977)..(2696) <223>eGFP コード配列 <220> <221>その他の RNA <222>(2703)..(2724) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2725)..(2729) <223>スパーサー

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<220> <221>その他の RNA <222>(2729)..(2750) <223>miRNA183 <220> <221>その他の RNA <222>(2757)..(2778) <223>miRNA183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2779)..(2784) <223>スペーサー <220> <221>その他の RNA <222>(2785)..(2806) <223>miRNA183 <220> <221>ポリ A_シグナル <222>(2848)..(2974) <223>ウサギグロビンポリ A <220> <221>反復領域 <222>(3063)..(3192) <223>AAV2-3'ITR
24	<223>LAGLIDADG
25	<223>エンドヌクレアーゼ認識部位
26	<223>pAAV.CB7.CI.eGFP.miRNA183(7X).RBG(p6031)-cl1 <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130) <223>5'ITR <220> <221>エンハンサー

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 3】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<222>(198)..(579) <223>CMV IE エンハンサー <220> <221>プロモーター <222>(582)..(862) <223>CB プロモーター <220> <221>TATA_シグナル <222>(836)..(839) <223>TATA <220> <221>イントロン <222>(956)..(1928) <223>ニワトリベータ-アクチンイントロン <220> <221>その他の特徴 <222>(1977)..(2696) <223>eGFP <220> <221>その他の特徴 <222>(2729)..(2760) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2757)..(2778) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2785)..(2806) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2815)..(2836)

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 4】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2858)..(2879) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2884)..(2905) <223>miR183 <220> <221>ポリ A_シグナル <222>(2939)..(3065) <223>ウサギグロビンポリ A <220> <221>反復領域 <222>(3154)..(3283) <223>3'ITR
27	<223>pAAV.CB7.CI.eGFP.miRNA183(8×).RBG(P6015) <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130) <223>5'ITR <220> <221>エンハンサー <222>(198)..(579) <223>CMV IE エンハンサー <220> <221>プロモーター <222>(582)..(862) <223>CB プロモーター <220> <221>TATA_シグナル <222>(836)..(839)

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 5】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<220> <221>イントロン <222>(956)..(1928) <223>ニワトリペーテ-アクチンイントロン <220> <221>その他の特徴 <222>(1977)..(2696) <223>eGFP <220> <221>その他の特徴 <222>(2703)..(2724) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2729)..(2750) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2757)..(2778) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2785)..(2806) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2815)..(2836) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2841)..(2862) <223>miR183 <220>

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 6】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<221>その他の特徴 <222>(2869)..(2890) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2895)..(2916) <223>miR183 <220> <221>ポリ A_シグナル <222>(2950)..(3076) <223>ウサギグロビンポリ A <220> <221>反復領域 <222>(3165)..(3294) <223>3'ITR
28	<223>pAAV.CB7.CI.eGFP.miR182.miR183.rBG <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130) <223>5'ITR <220> <221>エンハンサー <222>(198)..(579) <223>CMV IE エンハンサー <220> <221>プロモーター <222>(582)..(863) <223>CB プロモーター <220> <221>TATA_シグナル <222>(836)..(839) <223>TATA <220>

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 7】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<221>その他の特徴 <222>(836)..(2698) <223>eGFP <220> <221>イントロン <222>(958)..(1930) <220> <221>その他の特徴 <222>(2705)..(2728) <223>miR182 <220> <221>その他の特徴 <222>(2733)..(2756) <223>miR182 <220> <221>その他の特徴 <222>(2763)..(2786) <223>miR182 <220> <221>その他の特徴 <222>(2793)..(2816) <223>miR182 <220> <221>その他の特徴 <222>(2825)..(2846) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2851)..(2872) <223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2879)..(2900)

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 8】

配列番号(フリーテキストを含む)	<223>の下でのフリーテキスト
	<223>miR183 <220> <221>その他の特徴 <222>(2905)..(2926) <223>miR183 <220> <221>ポリ A_シグナル <222>(2960)..(3086) <223>ウサギグロビンポリ A <220> <221>反復領域 <222>(3175)..(3304) <223>3'ITR

10

20

【0 2 4 6】

本明細書に引用される全ての刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に援用される。2019年12月20日に出願されたPCT/US19/67872、2018年12月21日に出願された米国仮特許出願第62/783,956号、2019年10月23日に出願された米国仮特許出願第62/924,970号、2019年11月13日に出願された米国仮特許出願第62/934,915号、2020年2月10日に出願された米国仮特許出願第62/972,4040号、2020年4月6日に出願された米国仮特許出願第63/005,894号、2020年5月12日に出願された米国仮特許出願第63/023,593号、2020年6月12日に出願された米国仮特許出願第63/038,488号、2020年6月24日に出願された米国仮特許出願第63/043,562号、2020年9月16日に出願された米国仮特許出願第63/079,299号、及び2021年2月22日に出願された米国仮特許出願第63/152,042号は、それらの全てが参照により本明細書に援用される。同様に、本明細書に参照され、添付の配列表(21-9594PCT__ST25.txt)に表示される配列番号は、参照により援用される。本発明は、特定の実施形態を参照して記載されているが、本発明の趣旨から逸脱することなく修正を行うことができることが理解されよう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲の範囲内に収まることが意図される。

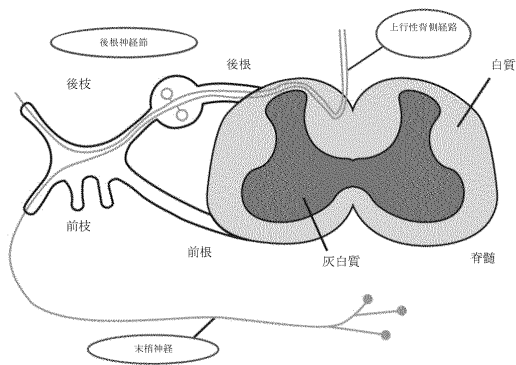
30

40

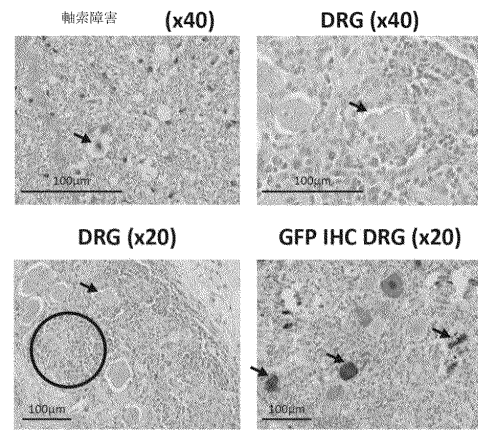
50

【図面】

【図 1 A】

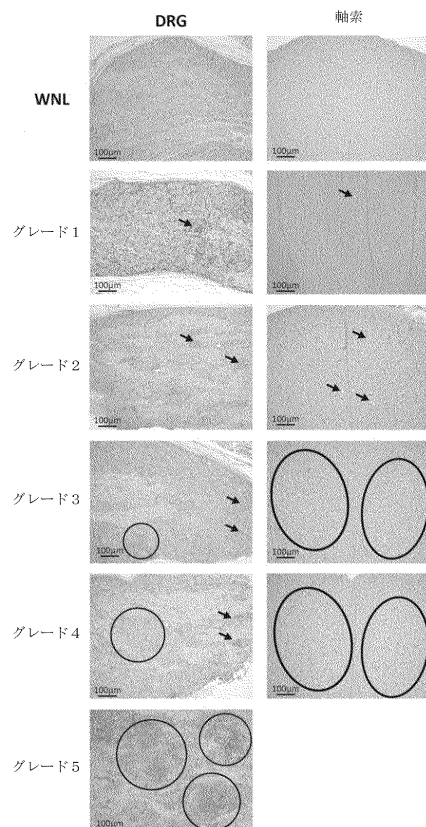


【図 1 B】

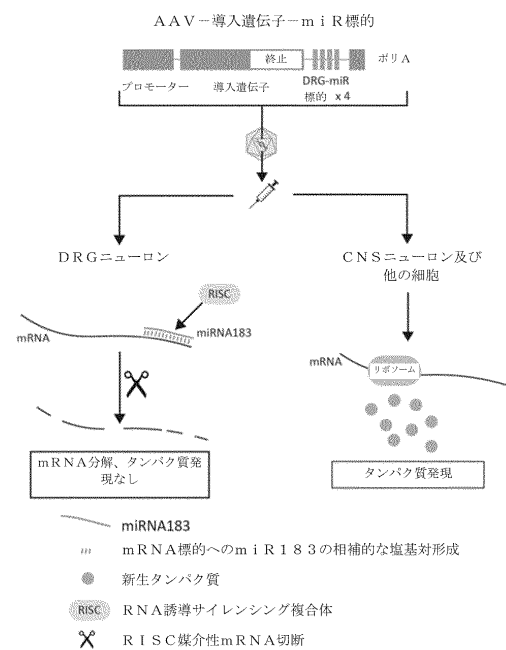


10

【図 1 C】



【図 2】



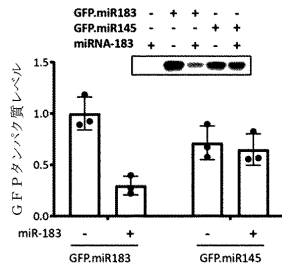
20

30

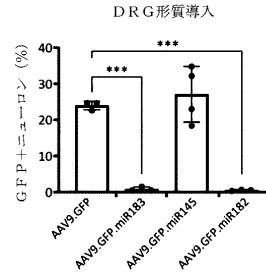
40

50

【図 3 A】

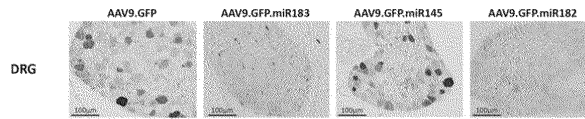


【図 3 B】

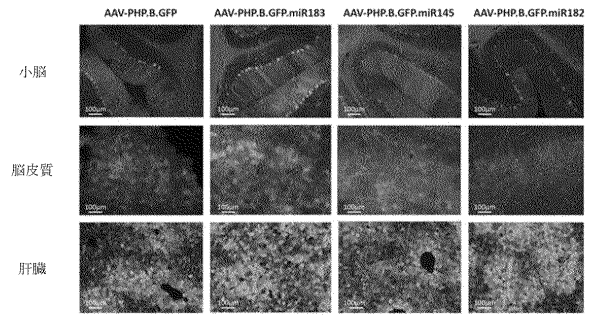


10

【図 3 C】



【図 3 D】



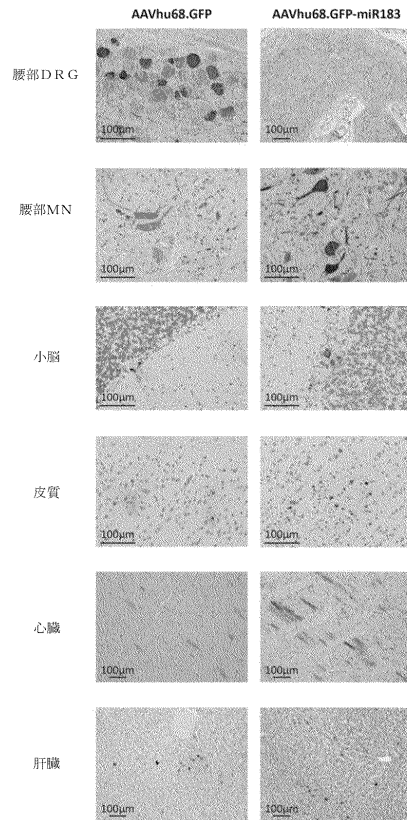
20

30

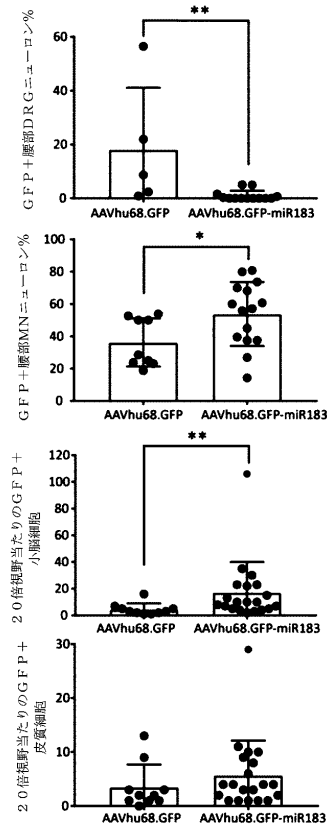
40

50

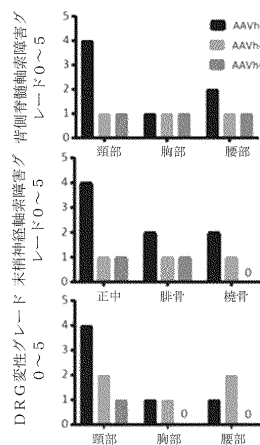
【図 4 A】



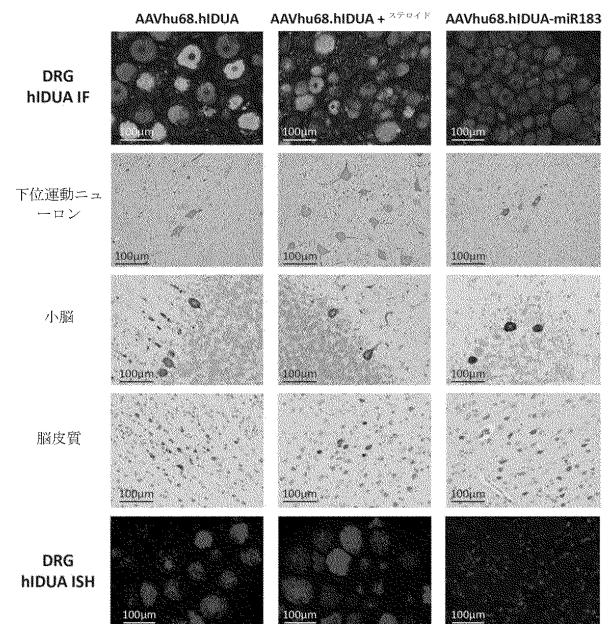
【図 4 B】



【図 4 C】



【図 5】



10

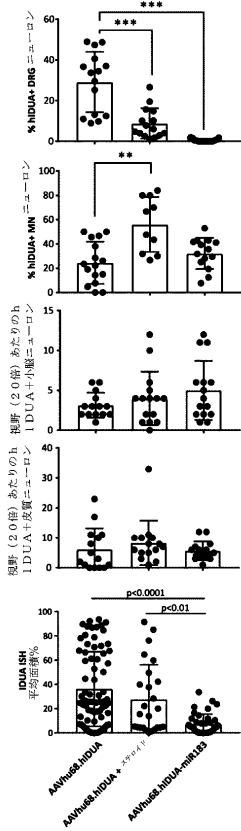
20

30

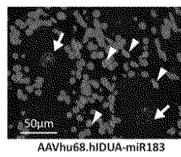
40

50

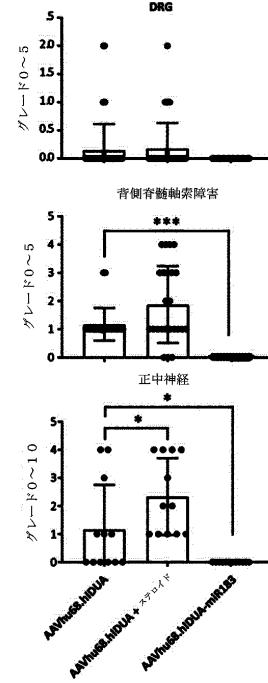
【図 6 A】



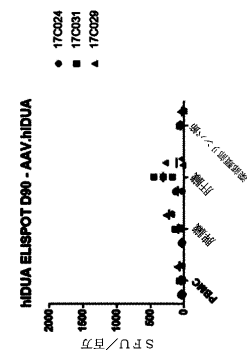
【図 6 C】



【図 6 B】



【図 7 A】



10

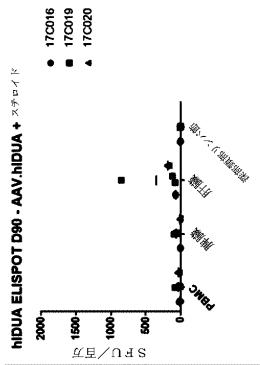
20

30

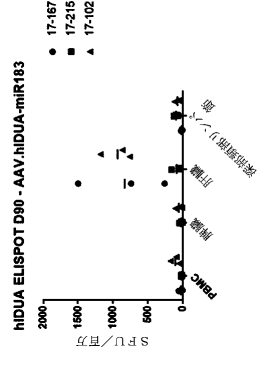
40

50

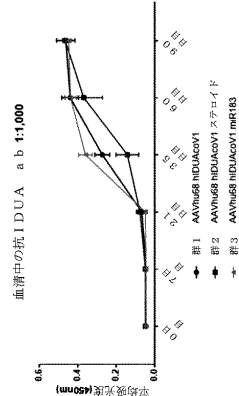
【図 7 B】



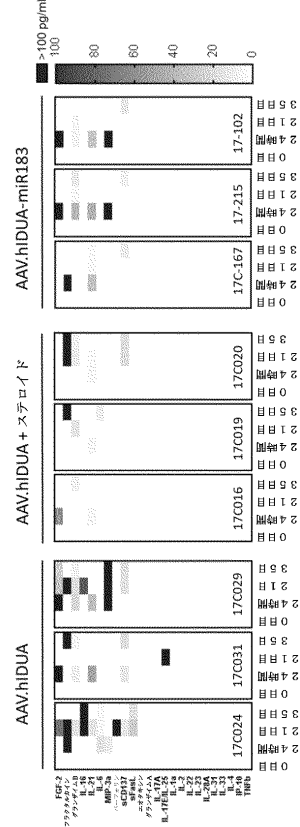
【図 7 C】



【図 7 D】



【図 8】



10

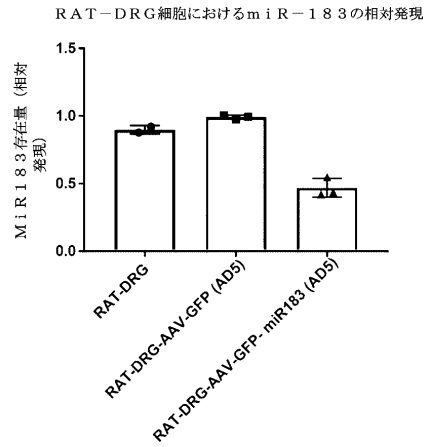
20

30

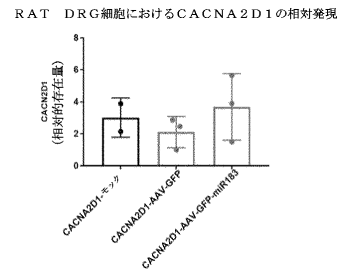
40

50

【図 1 2】

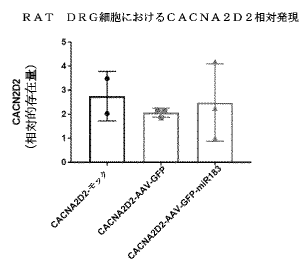


【図 1 3 A】

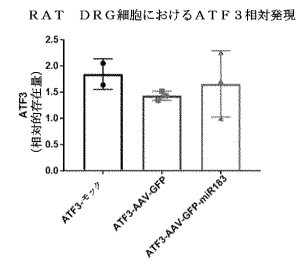


10

【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



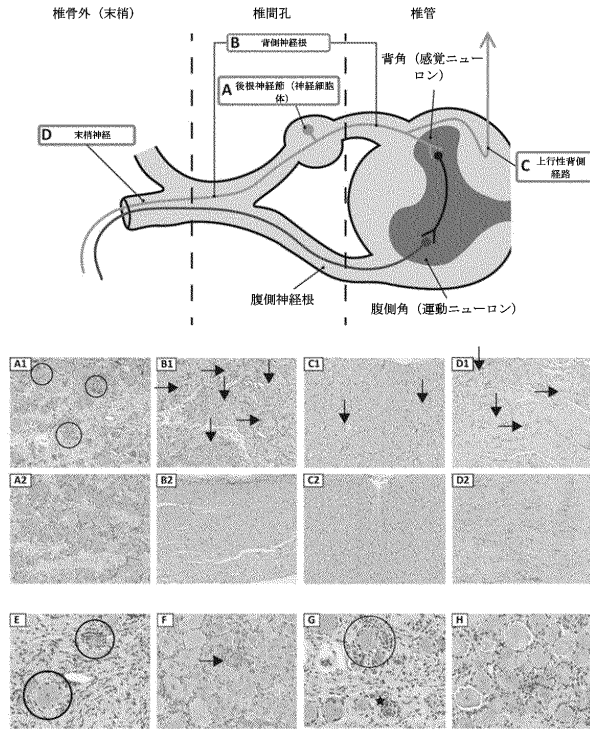
20

30

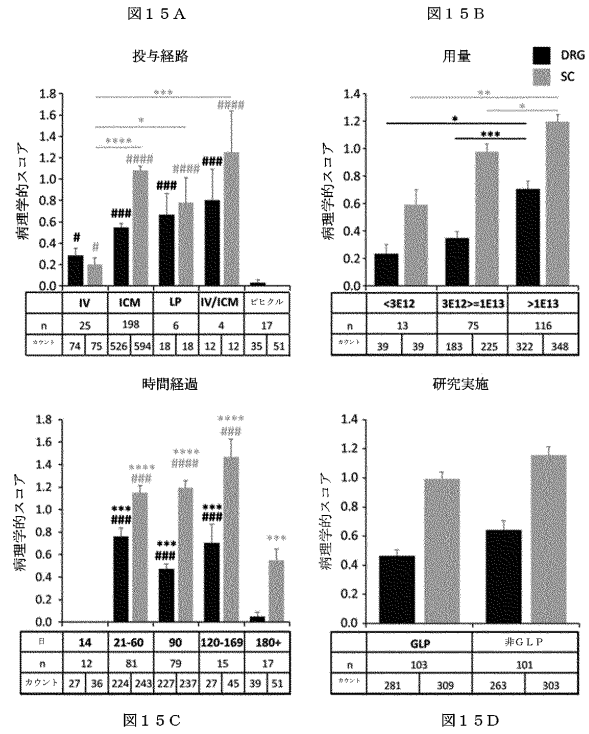
40

50

【図 14】



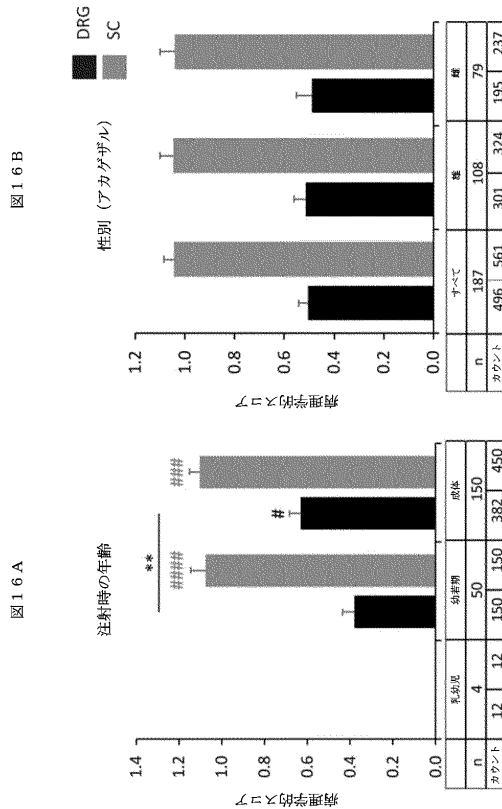
【図 15 A - D】



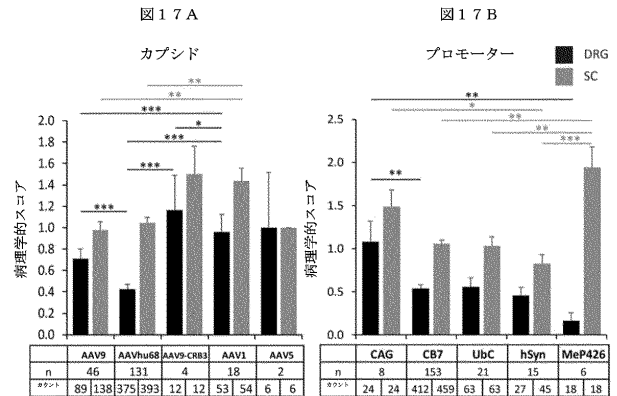
10

20

【図 16 A - B】



【図 17 A - B】

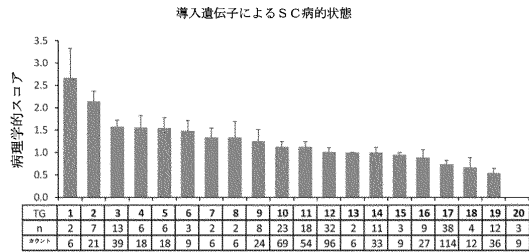


30

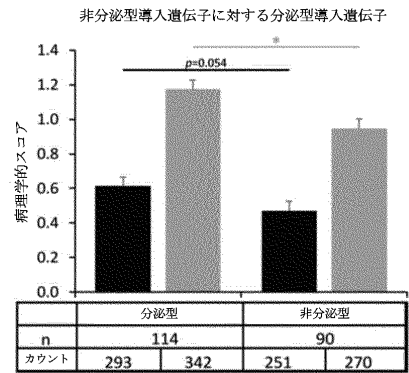
40

50

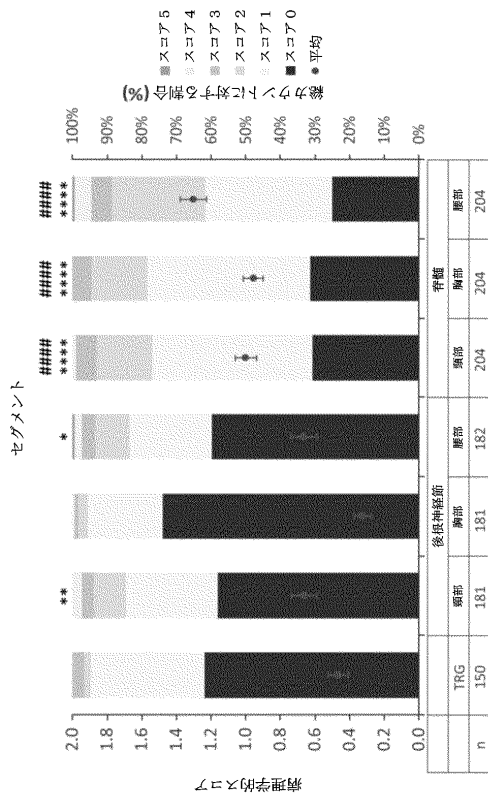
【図 17 C】



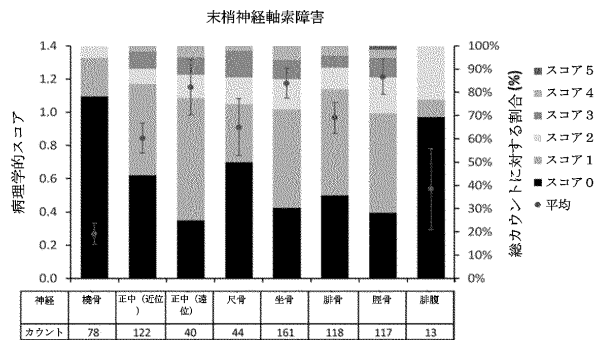
【図 17 D】



【図 18】



【図 19 A】



10

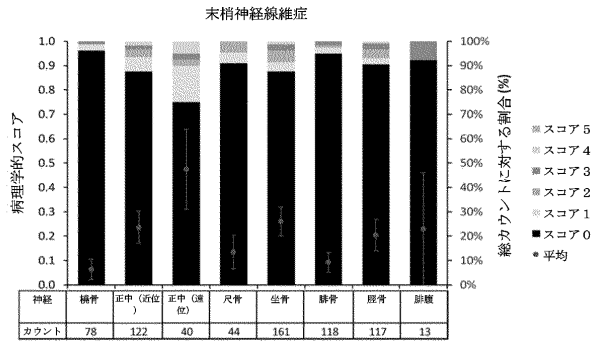
20

30

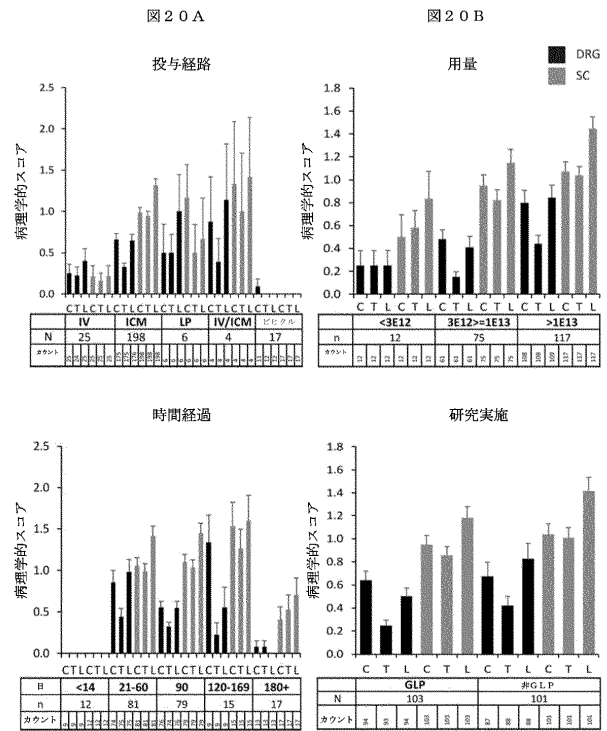
40

50

【図 19 B】



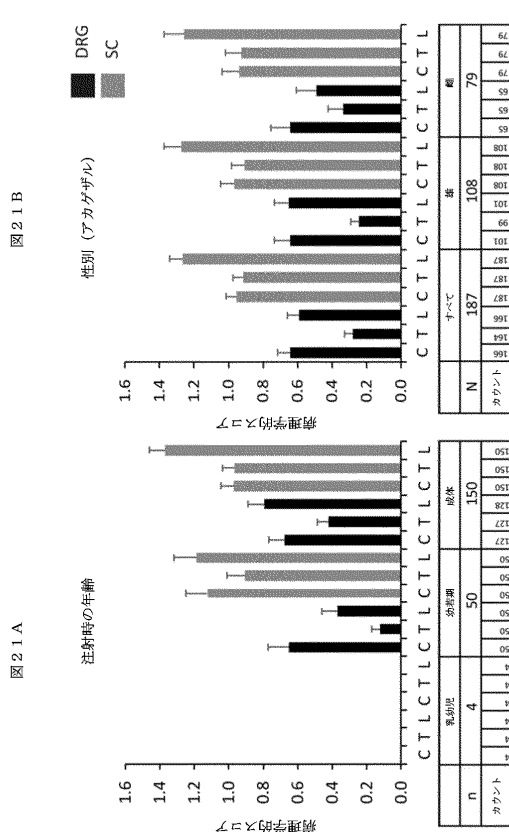
【図 20 A - D】



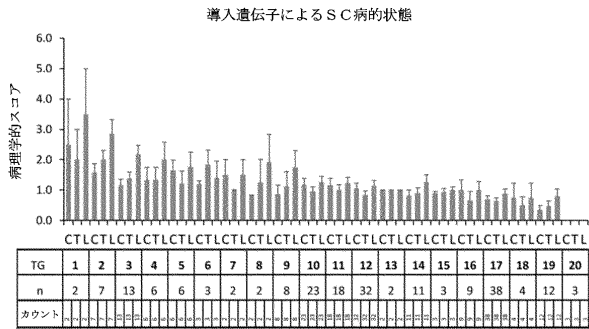
10

20

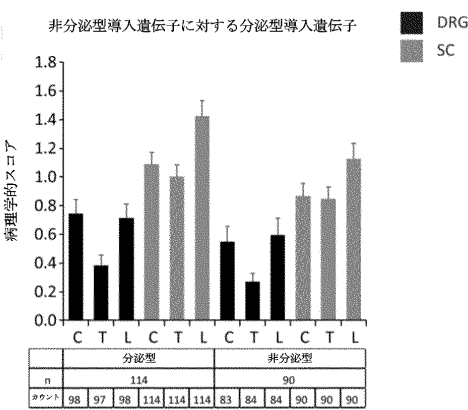
【図 21 A - B】



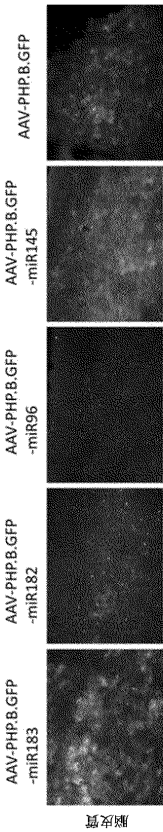
【図 2 2 C】



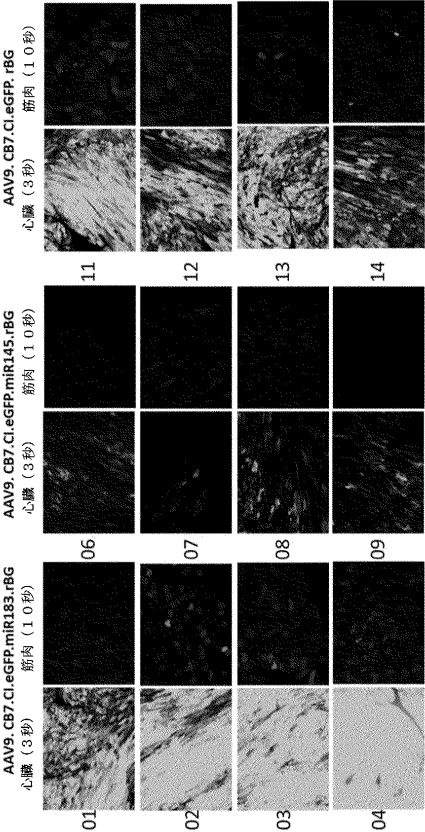
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5 A】



10

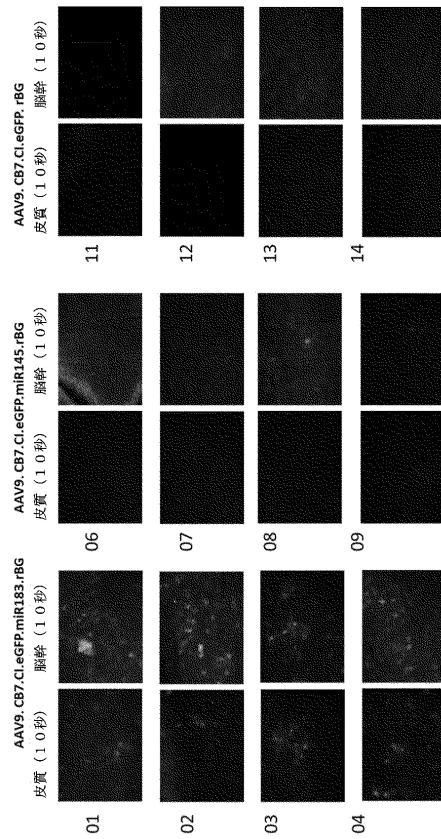
20

30

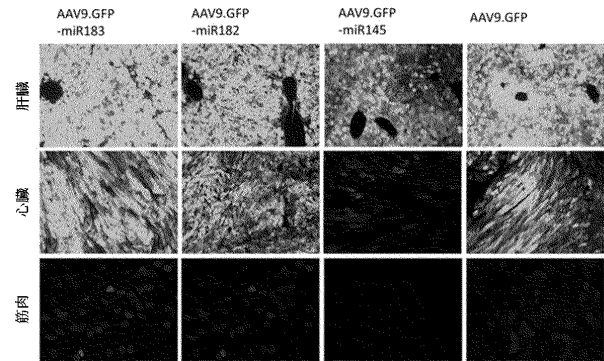
40

50

【図 2 5 B】



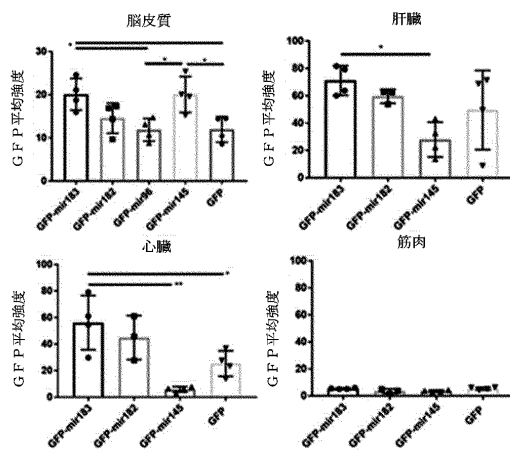
【図 2 5 C】



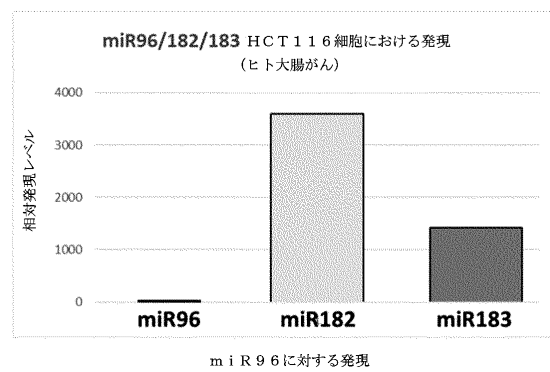
10

20

【図 2 5 D】



【図 2 6 A】

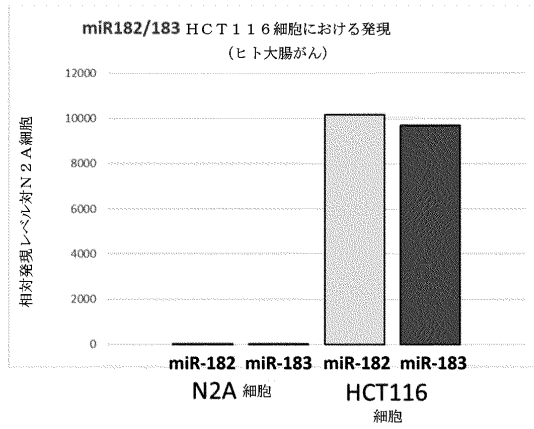


30

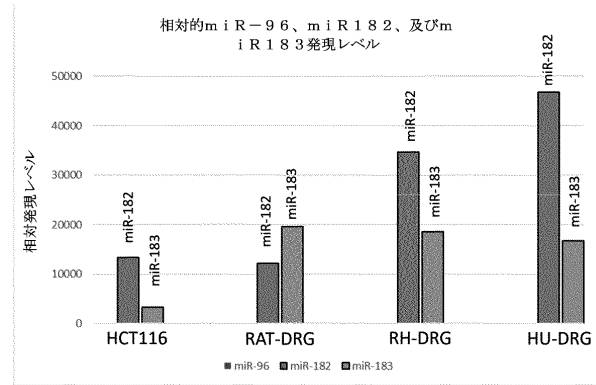
40

50

【図 26 B】

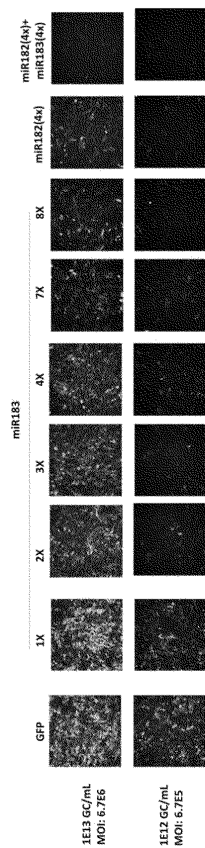


【図 26 C】

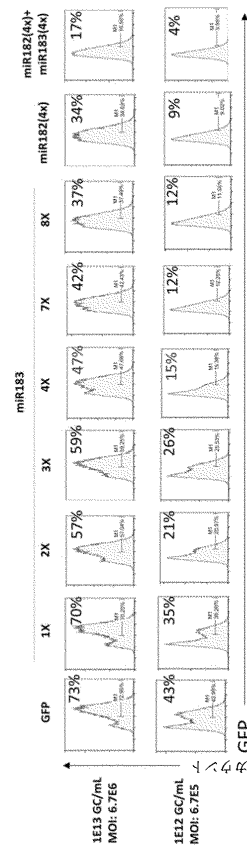


10

【図 27 A】



【図 27 B】



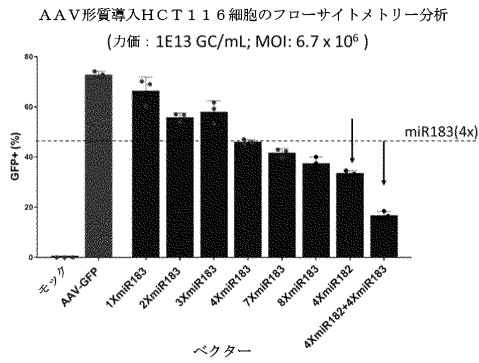
20

30

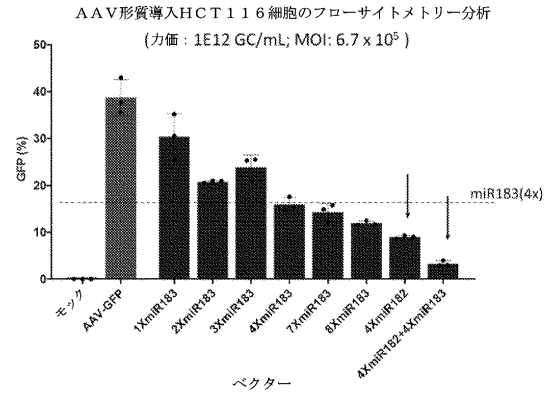
40

50

【図 27 C】

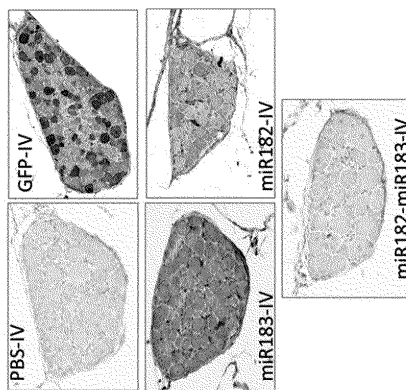


【図 27 D】

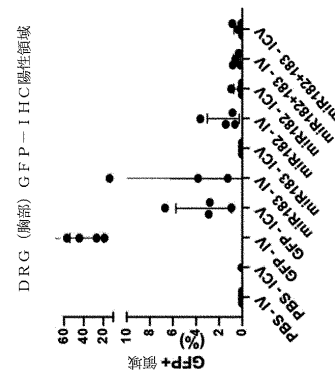


10

【図 28 A】

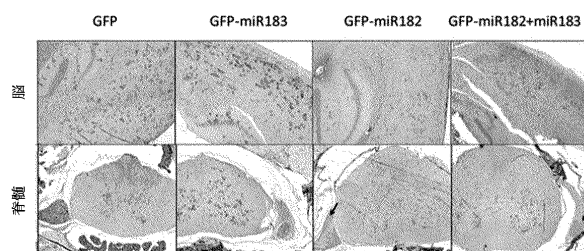


【図 28 B】

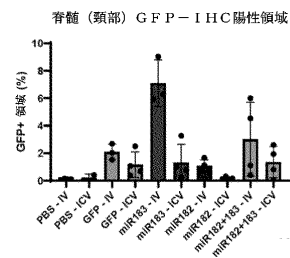


20

【図 28 C】



【図 28 D】

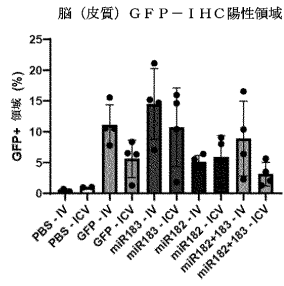


30

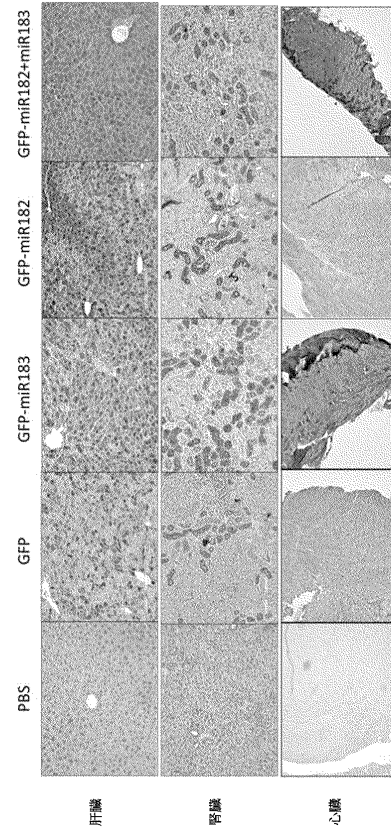
40

50

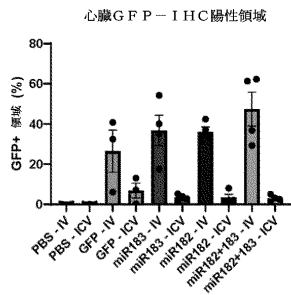
【図 28 E】



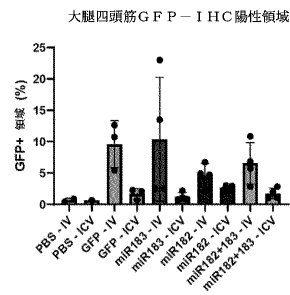
【図 28 F】



【図 28 G】



【図 28 H】



10

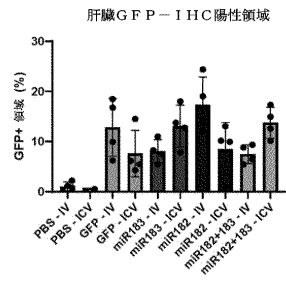
20

30

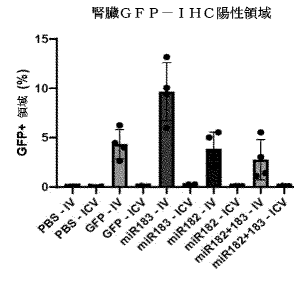
40

50

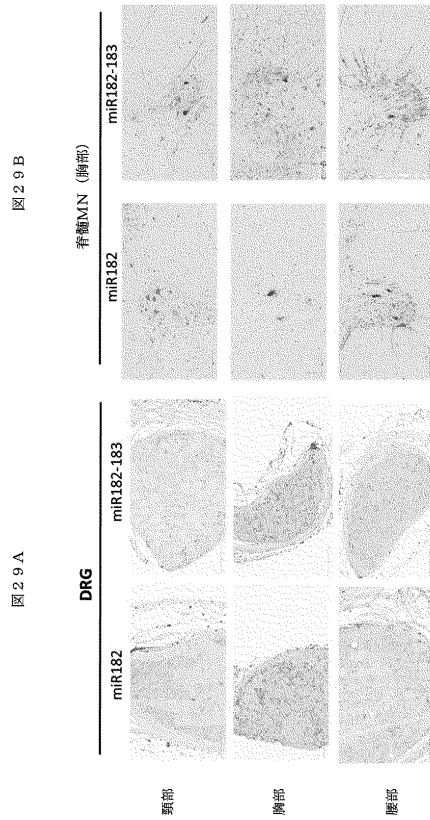
【図 28 I】



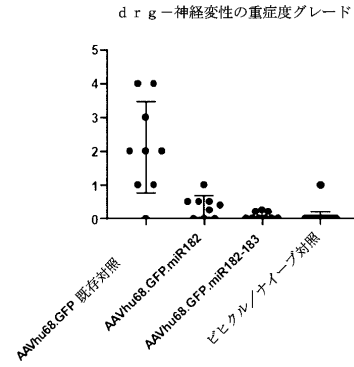
【図 28 J】



【図 29 A - B】



【図 29 C】



10

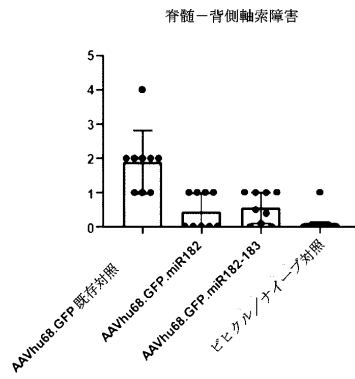
20

30

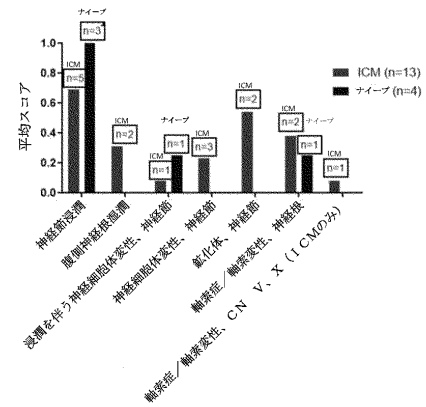
40

50

【図 29 D】

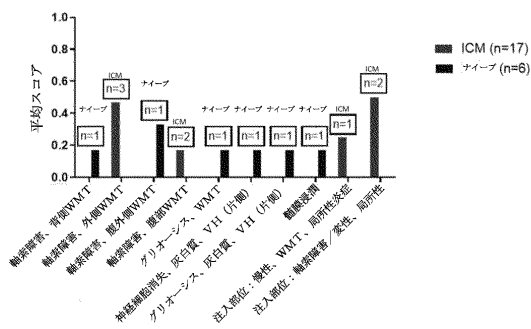


【図 30 A】

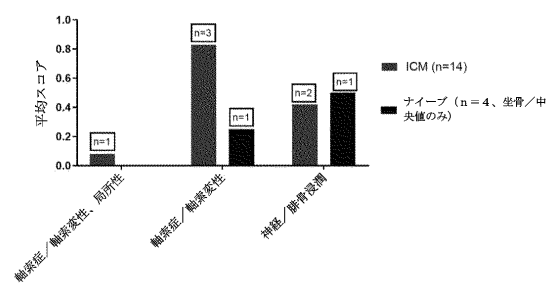


10

【図 30 B】

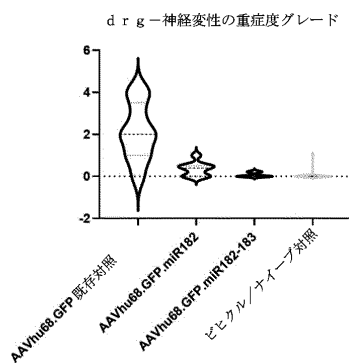


【図 30 C】

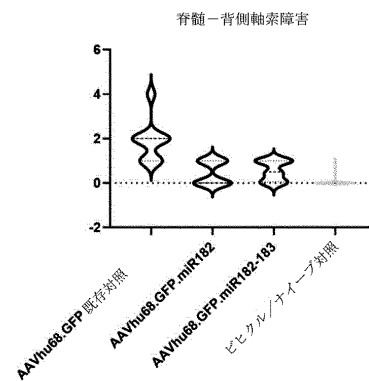


20

【図 31 A】



【図 31 B】



30

40

50

【配列表】

2023526310000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/032003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/86 A61K48/00 C12N15/11 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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	Hordeaux Juliette ET AL: "MicroRNA-mediated inhibition of transgene expression reduces dorsal root ganglion toxicity by AAV vectors in primates", Sci. Transl. Med, 11 November 2020 (2020-11-11), pages 1-15, XP055843100, Retrieved from the Internet: URL: https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/scitranslmed.aba9188 [retrieved on 2021-09-21] the whole document ----- -/--	1-40
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 September 2021		05/10/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lewis, Birgit

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/032003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	HORDEAUX JULIETTE ET AL: "Adeno-Associated Virus-Induced Dorsal Root Ganglion Pathology", HUMAN GENE THERAPY, vol. 31, no. 15-16, 25 June 2020 (2020-06-25), pages 808-818, XP055843115, GB ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2020.167 Retrieved from the Internet: URL:https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10. 1089/hum.2020.167> the whole document	1-40
A	----- ANJA GEISLER ET AL: "MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy", WORLD JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 6, no. 2, 1 January 2016 (2016-01-01) , page 37, XP055484454, ISSN: 2220-315X, DOI: 10.5493/wjem.v6.i2.37 the whole document figures 2,4	1-40
A	----- XIE JUN ET AL: "MicroRNA-regulated, Systemically Delivered rAAV9: A Step Closer to CNS-restricted Transgene Expression", MOLECULAR THERAPY, ELSEVIER INC, US, vol. 19, no. 3, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 526-535, XP009148361, ISSN: 1525-0016	1-40
A	----- GREIG JENNY A. ET AL: "Intramuscular Injection of AAV8 in Mice and Macaques Is Associated with Substantial Hepatic Targeting and Transgene Expression", PLOS ONE, vol. 9, no. 11, 1 November 2014 (2014-11-01), page e112268, XP055843135, DOI: 10.1371/journal.pone.0112268 Retrieved from the Internet: URL:https://storage.googleapis.com/plos-co rpus-prod/10.1371/journal.pone.0112268/1/p one.0112268.pdf?X-Goog-Algorithm=GOOG4-RSA -SHA256&X-Goog-Credential=wombat-sa@plos-p rod.iam.gserviceaccount.com/20210921/auto/ storage/goog4_request&X-Goog-Date=20210921 T100441Z&X-Goog-Expires=86400&X-Goog-Signe dHeaders=h> the whole document	1-40
	----- -/--	

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/032003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015/167003 A1 (NALDINI LUIGI [IT] ET AL) 18 June 2015 (2015-06-18) figure 1; table 1 -----	1-40
X,P	WO 2020/227166 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 12 November 2020 (2020-11-12) example 9 -----	1-40
X,P	WO 2020/219766 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 29 October 2020 (2020-10-29) figures 2,18 page 16, line 19 - page 20, line 22 -----	1-40
X,P	WO 2020/132455 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 25 June 2020 (2020-06-25) figures 2A, 2B page 12, line 8 - page 16, line 8 examples 2-6 -----	1-40
X,P	WO 2021/081217 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 29 April 2021 (2021-04-29) figure 3; example 3 page 76, lines 16-30 -----	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/032003

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

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

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ 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 13~~ter~~.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 13~~ter~~.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.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/US2021/032003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015167003 A1	18-06-2015	CA 2609142 A1 CN 101287834 A DK 2002003 T3 EP 2002003 A2 EP 3002330 A1 ES 2564823 T3 HU E027013 T2 IL 187679 A JP 5956709 B2 JP 2008545406 A JP 2013226139 A KR 20080041601 A KR 20130114758 A PL 2002003 T3 SG 162726 A1 US 2010041737 A1 US 2015167003 A1 US 2019032059 A1 WO 2007000668 A2	04-01-2007 15-10-2008 21-03-2016 17-12-2008 06-04-2016 29-03-2016 28-10-2016 31-08-2016 27-07-2016 18-12-2008 07-11-2013 13-05-2008 17-10-2013 30-06-2016 29-07-2010 18-02-2010 18-06-2015 31-01-2019 04-01-2007
WO 2020227166 A1	12-11-2020	TW 202108760 A WO 2020227166 A1	01-03-2021 12-11-2020
WO 2020219766 A1	29-10-2020	NONE	
WO 2020132455 A1	25-06-2020	AU 2019401314 A1 CA 3123600 A1 CO 2021008538 A2 KR 20210107037 A SG 11202105907Q A US 2021077553 A1 WO 2020132455 A1	24-06-2021 25-06-2020 19-07-2021 31-08-2021 29-07-2021 18-03-2021 25-06-2020
WO 2021081217 A1	29-04-2021	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	

(32)優先日 令和2年6月12日(2020.6.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/152,042

(32)優先日 令和3年2月22日(2021.2.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/079,299

(32)優先日 令和2年9月16日(2020.9.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

4 7 フィラデルフィア・ヘッドハウスコート 2 0 3

F ターム (参考) 4B065 AA90Y AA95X AB01 BA02 CA44
 4C084 AA13 MA56 MA65 MA66 NA06 ZC02
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA56 MA65 MA66 NA06 ZC02
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA56 MA65 MA66 NA06 ZC02