

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-543782
(P2024-543782A)

(43)公表日 令和6年11月26日(2024.11.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		4 C 0 8 6
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		4 C 0 8 7
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全258頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-521180(P2024-521180)	(71)出願人	524129014	アイリス メディソン、インク。 アメリカ合衆国 9 4 3 0 4 カリフォルニア州 パロアルト ヒルビュー アベニュー 3 3 4 0	
(86)(22)出願日	令和4年10月5日(2022.10.5)	(71)出願人	516181619		
(85)翻訳文提出日	令和6年5月23日(2024.5.23)	(71)出願人	516181619		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/077572	(71)出願人	516181619		
(87)国際公開番号	WO2023/060104	(71)出願人	516181619	ボード・オブ・トラステーズ、サザン・イリノイ・ユニバーシティ アメリカ合衆国、イリノイ・6 2 7 9 4 - 9 6 1 6、スプリングフィールド、ピー・オー・ボックス・1 9 6 1 6、ノース・ラトリッジ・ストリート・8 0 1	
(87)国際公開日	令和5年4月13日(2023.4.13)	(71)出願人	516181619		
(31)優先権主張番号	63/253,070	(71)出願人	516181619		
(32)優先日	令和3年10月6日(2021.10.6)	(71)出願人	516181619		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(71)出願人	516181619	最終頁に続く	
(31)優先権主張番号	63/339,363	(71)出願人	516181619		
(32)優先日	令和4年5月6日(2022.5.6)	(71)出願人	516181619		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(71)出願人	516181619		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)	(74)代理人	100083806	最終頁に続く	
		(74)代理人	弁理士 三好 秀和		
		(74)代理人	100111235		
		(74)代理人	100111235		

(54)【発明の名称】 C A G リピート疾患を治療するための組成物および方法

(57)【要約】

本開示は、阻害性二本鎖RNAの産生および治療的使用のための組成物および方法に関する。

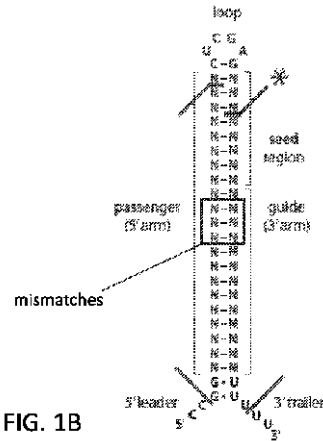


FIG. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域とハイブリダイズする第一の鎖；および

b) 前記第一の鎖とハイブリダイズする第二の鎖

を含む二本鎖RNAであって、

前記第一の鎖は、

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチ；および

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する少なくとも第二のミスマッチを含み、
ここで、

i) 前記第一のミスマッチが配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にある場合、前記第二のミスマッチは前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にあり；

ii) 前記第一のミスマッチが配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置9にある場合、前記第二のミスマッチは前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にあり；

iii) 前記第一のミスマッチが配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置10にある場合、前記第二のミスマッチは前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にあり；

iv) 前記第一のミスマッチが配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置11にある場合、前記第二のミスマッチは前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、

二本鎖RNA。

【請求項 2】

各ミスマッチが、

a) GのA、U、またはCへの置換；

b) UのA、G、またはCへの置換；

c) CのA、U、またはGへの置換

から独立して選択される置換によって生成される、請求項 1 に記載の二本鎖RNA。

【請求項 3】

前記第1の鎖が、

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にある、第一のミスマッチ；および

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであって、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、第二のミスマッチ
を含む、請求項 1 または 2 に記載の二本鎖RNA。

【請求項 4】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであって、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 5】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであって、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1～3のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 6】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであって、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号に基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1～3のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

10

【請求項 7】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、2個を超えない、請求項3～6のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 8】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、請求項3～6のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 9】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項3～6のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

20

【請求項 10】

前記第一の鎖が、

i) CUGCUGCAACUGCUGCUGCUGC (配列番号317) (CUG_NA_B);
ii) CUGCUGCAGAUGCUGCUGCUGC (配列番号318) (CUG_NA_C);
iii) CUGCUGCAGCAGCUGCUGCUGC (配列番号319) (CUG_NA_D);
iv) CUGCUGCAGCUACUGCUGCUGC (配列番号320) (CUG_NA_E);
v) CUGCUGCAGCUGAUGCUGCUGC (配列番号321) (CUG_NA_F);
vi) CUGCUGCAGCUGCAGCUGCUGC (配列番号322) (CUG_NA_G);
vii) CUGCUGCAGCUGCUCACUGCUGC (配列番号323) (CUG_NA_H); および
viii) CUGCUGCAGCUGCUGAUGCUGC (配列番号324) (CUG_NA_I)
から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項3または請求項4に記載の二本鎖RNA。

30

【請求項 11】

前記第一の鎖が配列番号804～819から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項3または請求項4に記載の二本鎖RNA。

【請求項 12】

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、前記第二および第三のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1または請求項2に記載の二本鎖RNA。

40

【請求項 13】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一、第二、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第三の置換が第三のミスマッチを生成し、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1、2、および12のいずれか一項に

50

記載の二本鎖RNA。

【請求項14】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第三の置換が第三のミスマッチを生成し、前記第二の置換および前記第三の置換が前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1、2、および12のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項15】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第三の置換が第三のミスマッチを生成し、前記第二の置換および前記第三の置換が前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1、2、および12のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項16】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、請求項12～15のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項17】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項12～15のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項18】

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第一の鎖は、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチおよび第四のミスマッチを含み、前記第二、第三および第四のミスマッチは、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1または請求項2に記載の二本鎖RNA。

【請求項19】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1、2、および18のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項20】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1、2、および18のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項21】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の

10

20

30

40

50

置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、請求項1、2、および18のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項22】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項18～21のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項23】

前記第一の鎖が、

10

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置9にある、第一のミスマッチと；

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであって、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、第二のミスマッチとを含む、請求項1または請求項2に記載の二本鎖RNA。

【請求項24】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、請求項1、2、および23のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

20

【請求項25】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、請求項1、2、および23のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

30

【請求項26】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、請求項1、2、および23のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項27】

前記第一の鎖が、配列番号298～304から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項23に記載の二本鎖RNA。

40

【請求項28】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、2個を超えない、請求項23～27のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項29】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、請求項23～27のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項30】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項23～27のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

50

【請求項 3 1】

前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の号付けに基づいて位置9にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対して第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、前記第二および第三のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、請求項1または2に記載の二本鎖RNA。

【請求項 3 2】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、請求項1、2、および31のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

【請求項 3 3】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、請求項1、2、および31のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

【請求項 3 4】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、請求項1、2、および31のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

【請求項 3 5】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、請求項31～34のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 3 6】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項31～34のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 3 7】

前記第一の鎖が、

- i) CUGCUGCUAAAGCUGCUGCUG (配列番号325) (CUG_307);
- ii) CUGCUGCUAAUACUGCUGCUG (配列番号326) (CUG_334);
- iii) CUGCUGCUAAUGAUGCUGCUG (配列番号327) (CUG_361);
- iv) CUGCUGCUAAUGCAGCUGCUG (配列番号328) (CUG_388);
- v) CUGCUGCUAAUGCACUGCUG (配列番号329) (CUG_415);
- vi) CUGCUGCUACAGAUGCUGCUG (配列番号330) (CUG_631);
- vii) CUGCUGCUACAGCAGCUGCUG (配列番号331) (CUG_658);
- viii) CUGCUGCUACAGCUGAUGCUG (配列番号332) (CUG_712);
- ix) CUGCUGCUAAUGCUGAUGCUG (配列番号336) (CUG_442);
- x) CUGCUGCUACAACUGCUGCUG (配列番号337) (CUG_604); および
- xi) CUGCUGCUACAGCUACUGCUG (配列番号338) (CUG_685)

から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 3 1 に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 3 8】

前記第一の鎖が、前記標的 CAG リピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号 743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号 743))、配列番号 866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号 866))、または配列番号 867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 867)) の番号付けに基づいて位置 9 にあり、前記第一の鎖が、前記標的 CAG リピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチ、および第四のミスマッチを含み、前記第二、第三、および第四のミスマッチが、前記第一のミスマッチの 1~7 塩基 3' 側にある、請求項 1 または請求項 2 に記載の二本鎖 RNA。

10

【請求項 3 9】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列 CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号 743) の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号 743) の番号付けに基づいて位置 9 にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの 1~7 塩基 3' 側にある、請求項 1、2、および 3 8 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 4 0】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列 GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号 866) の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号 866) の番号付けに基づいて位置 9 にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの 1~7 塩基 3' 側にある、請求項 1、2、および 3 8 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

20

【請求項 4 1】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列 UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 867) の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 867) の番号付けに基づいて位置 9 にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの 1~7 塩基 3' 側にある、請求項 1、2、および 3 8 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

30

【請求項 4 2】

前記第一の鎖が含む、前記標的 CAG リピート領域に対するミスマッチが、4 個を超えない、請求項 3 8~4 1 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 4 3】

前記第一の鎖が、配列番号 341~344 から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 3 8 に記載の二本鎖 RNA。

40

【請求項 4 4】

前記第一の鎖が、配列番号 347~367 から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 3 8 に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 4 5】

前記第 1 の鎖が、

i) 前記標的 CAG リピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号 743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号 743))、配列番号 866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号 866))、または (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 867)) の番号付けに基づいて位置 10 にある、第一のミスマッチ；および

ii) 前記標的 CAG リピート領域に対する第二のミスマッチであって、前記第一のミスマ

50

ツチの1～6塩基3'側にある、第二のミスマッチを含む、請求項1または請求項2に記載の二本鎖RNA。

【請求項46】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または45のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項47】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または45のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項48】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または45のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項49】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、2個を超えない、請求項45～48のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項50】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、請求項45～48のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項51】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項45～48のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項52】

前記第一の鎖が、配列番号305～310から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項45に記載の二本鎖RNA。

【請求項53】

前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の号付けに基づいて位置10にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対して第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、前記第二および第三のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1または2に記載の二本鎖RNA。

【請求項54】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または53のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 5 5】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または53のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 5 6】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または53のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

10

【請求項 5 7】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、請求項53～56のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 5 8】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項53～56のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

20

【請求項 5 9】

前記第一の鎖が、

- i) CUGCUGCUGAAGAUGCUGCUG (配列番号333) (CUG_2116);
- ii) CUGCUGCUGAAGCAGCUGCUG (配列番号334) (CUG_2143);
- iii) CUGCUGCUGAAGCUACUGCUG (配列番号335) (CUG_2170);
- iv) CUGCUGCUGAAACUGCUGCUG (配列番号339) (CUG_2089); および
- v) CUGCUGCUGAAGCUGAUGCUG (配列番号340) (CUG_2197).

から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項53に記載の二本鎖RNA。

30

【請求項 6 0】

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチ、および第四のミスマッチを含み、前記第二、第三、および第四のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1または請求項2に記載の二本鎖RNA。

【請求項 6 1】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または60のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

40

【請求項 6 2】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号86

50

6)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または60のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項63】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、請求項1、2、または60のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

10

【請求項64】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項60～63のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項65】

前記第一の鎖が、配列番号345、346および配列番号368～375から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項60に記載の二本鎖RNA。

【請求項66】

前記第1の鎖が、

20

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にある、第一のミスマッチ；および

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであって、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、第二のミスマッチを含む、請求項1または2に記載の二本鎖RNA。

【請求項67】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、請求項1、2、および66のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

30

【請求項68】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、請求項1、2、および66のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

40

【請求項69】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、請求項1、2、および66のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項70】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、2個を超えない

50

い、請求項 66～69 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 71】

前記第一の鎖が含む、前記標的 CAG リピート領域に対するミスマッチが、3 個を超えない、請求項 66～69 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 72】

前記第一の鎖が含む、前記標的 CAG リピート領域に対するミスマッチが、4 個を超えない、請求項 66～69 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 73】

前記第一の鎖が、

- i) CUGCUGCUGCAACUGCUGCUG (配列番号 311) (CUG_217);
 - ii) CUGCUGCUGCAGAUGCUGCUG (配列番号 312) (CUG_226);
 - iii) CUGCUGCUGCAGCAGCUGCUG (配列番号 313) (CUG_235);
 - iv) CUGCUGCUGCAGCUACUGCUG (配列番号 314) (CUG_244); および
 - v) CUGCUGCUGCAGCUGAUGCUG (配列番号 315) (CUG_253)
- から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 66 に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 74】

前記第一の鎖が配列番号 793～803 から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 66 に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 75】

前記第一の鎖が前記標的 CAG リピート領域に対して第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号 743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号 743))、配列番号 866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号 866))、または UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 867) の号付けに基づいて位置 11 にあり、前記第一の鎖が、前記標的 CAG リピート領域に対して第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、前記第二および第三のミスマッチが、前記第一のミスマッチの 1～5 塩基 3' 側にある、請求項 1 または 2 に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 76】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列 CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号 743) の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号 743) の番号付けに基づいて位置 11 にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの 1～5 塩基 3' 側にある、請求項 1、2、および 75 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 77】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列 GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号 866) の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号 866) の番号付けに基づいて位置 11 にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの 1～5 塩基 3' 側にある、請求項 1、2、および 75 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 78】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列 UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 867) の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 867) の番号付けに基づいて位置 11 にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの 1～5 塩基 3' 側にある、請求項 1、2、および 75 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 79】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、請求項75～78のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 80】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項75～78のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 81】

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の位置11にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチ、および第四のミスマッチを含み、前記第二、第三、および第四のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、請求項1または請求項2に記載の二本鎖RNA。

【請求項 82】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、請求項1、2、および81のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 83】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、請求項1、2、および81のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 84】

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、請求項1、2、および81のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 85】

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、請求項81～84のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 86】

前記第二の鎖が、前記第一の鎖に対して100%相補的である、請求項1～85のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 87】

前記第二の鎖が、前記第一の鎖に対して、1～10個のミスマッチ、3～5個のミスマッチ、4～7個のミスマッチ、または5～10個のミスマッチを含む、請求項1～85のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項 88】

前記二本鎖RNAが、18塩基～25ヌクレオチド、19～25ヌクレオチド、19～23ヌク

レオチド、または19～21ヌクレオチドの長さを有する、請求項1～85のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項89】

前記二本鎖RNAが、21ヌクレオチド～25ヌクレオチドの長さを有する、請求項1～85のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【請求項90】

請求項1～89のいずれか一項に記載の第一の鎖をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子であって、前記ヌクレオチド配列が、真核細胞において機能的であるプロモーターに作動可能に連結されている、DNA分子。

【請求項91】

組換え核酸であって、

a1) 請求項1～89のいずれか一項に記載の二本鎖RNAと；

b1) 5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドとを含み、前記組換え核酸は、

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

ii) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；

iii) 前記ループポリヌクレオチド；

iv) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；および

v) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含み、前記5'フランキングポリヌクレオチド、前記ループポリヌクレオチド、および前記3'フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、前記二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性であるか；または

a2) 請求項1～89のいずれか一項に記載の二本鎖RNAと；

b2) 5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドとを含み、前記組換え核酸は、

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

ii) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；

iii) 前記ループポリヌクレオチド；

iv) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；および

v) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含み、前記5'フランキングポリヌクレオチド、前記ループポリヌクレオチド、および前記3'フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、前記二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性であるか；または

a3) 請求項1～89のいずれか一項に記載の二本鎖RNAと；

b3) 5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドとを含み、前記組換え核酸は、

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

ii) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；

iii) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；および

iv) 前記3'フランキングポリヌクレオチド；

を含み、前記5'フランキングポリヌクレオチドおよび前記3'フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、前記二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性であるか；または

a4) 請求項1～89のいずれか一項に記載の二本鎖RNAと；

b4) 5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドとを含み、前記組換え核酸が、

10

20

30

40

50

- i) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；
- ii) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；
- iii) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；および
- iv) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含み、前記5'フランキングポリヌクレオチドおよび前記3'フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、前記二本鎖RNAの第一および／または第二の鎖に対して異種性である、

組換え核酸。

【請求項92】

組換え核酸が、

- a) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；
- b) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；
- c) 前記ループポリヌクレオチド；
- d) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；および
- e) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含む、請求項91に記載の組換え核酸。

【請求項93】

前記5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドがmiR33に由来するものである、請求項91または請求項92に記載の組換え核酸。

【請求項94】

前記組換え核酸が、

- a) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；
- b) 前記二本鎖RNAの前記第一の鎖；
- c) 前記二本鎖RNAの前記第二の鎖；および
- d) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含む、請求項91に記載の組換え核酸。

【請求項95】

前記5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドがmiR451に由来するものである、請求項91または請求項94に記載の組換え核酸。

【請求項96】

請求項91～95のいずれか一項に記載の組換え核酸をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子。

【請求項97】

前記5'フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgaggcagctctg (配列番号738)によってコードされる、請求項96に記載のDNA分子。

【請求項98】

前記ループポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列tggtctggcaatacctg (配列番号739)によってコードされる、請求項96または請求項97に記載のDNA分子。

【請求項99】

前記3'フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列gggagggcctgccctgactgccac (配列番号740)によってコードされる、請求項96～98のいずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項100】

配列番号579～656のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を含む、請求項96～99のいずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項101】

前記5'フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列acctactgactgccaggcgacttggaatggcaagg (配列番号854)によってコードされる、請求項96に記載のDNA分子。

【請求項 102】

前記3'フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列tcttgctatacccgaaaaacgtgccaggaagagaac (配列番号855)によってコードされる、請求項96または請求項101に記載のDNA分子。

【請求項 103】

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列acctactgactgccagggcacttggaatggcaagg (配列番号854)によってコードされる；

ii) 前記3'フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列tcttgctatacccgaaaacgtgccaggaagagaac (配列番号855)によってコードされる；および

iii) 前記第一の鎖または前記第二の鎖が、配列番号379～456のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によってコードされる、

請求項96に記載のDNA分子。

【請求項 104】

前記5'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号856に記載のヌクレオチド配列によってコードされている、請求項96に記載のDNA分子。

【請求項 105】

前記3'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号857に記載のヌクレオチド配列によってコードされている、請求項96または請求項104に記載のDNA分子。

【請求項 106】

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号856に記載のヌクレオチド配列によってコードされている；

ii) 前記3'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号857に記載のヌクレオチド配列によってコードされている；および

iii) 前記第一の鎖または前記第二の鎖が、配列番号379～456のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によってコードされている、

請求項96に記載のDNA分子。

【請求項 107】

前記5'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号858に記載のヌクレオチド配列によってコードされている、請求項96に記載のDNA分子。

【請求項 108】

前記3'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号859に記載のヌクレオチド配列によってコードされている、請求項96または請求項107に記載のDNA分子。

【請求項 109】

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号858に記載のヌクレオチド配列によってコードされている；

ii) 前記3'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号859に記載のヌクレオチド配列によってコードされている；および

iii) 前記第一の鎖または前記第二の鎖が、配列番号379～456のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によってコードされている、

請求項96に記載のDNA分子。

【請求項 110】

請求項96～109のいずれか一項に記載のDNA分子を含む、組換え発現ベクター。

【請求項 111】

ヌクレオチド配列が、真核細胞において機能的であるプロモーターに作動可能に連結されている、請求項110に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 112】

前記プロモーターが、RNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターである、請求項111に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 113】

前記プロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、U

10

20

30

40

50

6プロモーター、EF1 α プロモーターまたはH1プロモーターである、請求項111または請求項112に記載の組換え発現ベクター。

【請求項114】

5'アデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)配列および3'AAV ITR配列を含む、請求項110～113のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター。

【請求項115】

請求項91～95のいずれか一項に記載の組換え核酸をコードするヌクレオチド配列を含む、組換え発現ベクター。

【請求項116】

ヌクレオチド配列が、真核細胞において機能的であるプロモーターに作動可能に連結されている、請求項115に記載の組換え発現ベクター。

【請求項117】

前記プロモーターが、RNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターである、請求項116に記載の組換え発現ベクター。

【請求項118】

前記プロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、U6プロモーター、EF1 α プロモーターまたはH1プロモーターである、請求項116または請求項117に記載の組換え発現ベクター。

【請求項119】

5'アデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)配列および3'AAV ITR配列を含む、請求項115～118のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター。

【請求項120】

請求項110～119のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターを含む送達媒体。

【請求項121】

非ウイルス性送達媒体である、請求項120記載の送達媒体。

【請求項122】

脂質ナノ粒子である、請求項121に記載の送達媒体。

【請求項123】

ウイルス粒子である、請求項120に記載の送達媒体。

【請求項124】

請求項110～119のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターを含むウイルス粒子。

【請求項125】

アデノ随伴ウイルス(AAV)粒子である、請求項126に記載のウイルス粒子。

【請求項126】

前記AAV粒子がAAV9キャプシドを含む、請求項125に記載のウイルス粒子。

【請求項127】

前記AAV粒子がAAV2キャプシドを含む、請求項125に記載のウイルス粒子。

【請求項128】

a) 請求項110～119のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター；および
b) 薬学的に許容される賦形剤
を含む組成物。

【請求項129】

a) 請求項120～123のいずれか一項に記載の送達媒体；および
b) 薬学的に許容される賦形剤
を含む組成物。

【請求項130】

a) 請求項124～127のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターを含むウイルス粒子；および
b) 薬学的に許容される賦形剤

10

20

30

40

50

を含む組成物。

【請求項 1 3 1】

CAGリピート伸長障害を有する個体において疾患関連CAGリピート含有RNAの翻訳を選択的に減少させる方法であって、有効量の請求項 1 1 0～1 1 9のいずれか一項記載の発現ベクター、請求項 1 2 0～1 2 3のいずれか一項記載の送達媒体、請求項 1 2 4～1 2 7のいずれか一項記載のウイルス粒子、または請求項 1 2 8～1 3 0のいずれか一項記載の医薬組成物を前記個体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 1 3 2】

前記リピート伸長障害が、ハンチントン病、脊髄小脳失調症1型、脊髄小脳失調症2型、脊髄小脳失調症3型、脊髄小脳失調症6型、脊髄小脳失調症7型、脊髄小脳失調症12型、脊髄小脳失調症17型、脊髄および球筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、または鎖骨頭蓋異形成症である、請求項 1 3 1に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記投与が、前記個体の中枢神経系への直接注射を含む、請求項 1 3 1または請求項 1 3 2に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記直接注射が、脳室内注射、実質内注射、髄腔内注射、線条体内注射、視床内注射、大槽内注射、軟膜下注射、またはそれらのいずれかの組合せである、請求項 1 3 3に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記投与により、疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドに対する非疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドの比を1.0超にする、請求項 1 3 1～1 3 4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記投与により、疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドに対する非疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドの比を1.1～1.8にする、請求項 1 3 1～1 3 4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記投与により、疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドに対する非疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドの比を1.8超にする、請求項 1 3 1～1 3 4のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

相互参照

本出願は、2021年10月6日出願の米国仮特許出願第63/253,070号、および2022年5月6日出願の米国仮特許出願第63/339,363号の利益を主張するものであり、これらの出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

電子的に提出された資料の参照による組み込み

配列リストは、2022年10月4日に作成され、1,298 KBのサイズを有する配列リストXML「IRIS-001WO_SEQ_LIST」として本明細書に提供される。配列リストXMLの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

【0 0 0 4】

リピート伸長障害は、DNAリピートの伸長によって引き起こされる常染色体優性遺伝疾患である。DNAリピートは、単一ヌクレオチドから12量体またはそれ以上で構成され得る。リピート伸長が症候性になる閾値は、特定の疾患によって異なる。リピート伸長に

10

20

30

40

50

よって引き起こされる50以上の異なる疾患がある。リピート伸長は遺伝子のコード領域または非コード領域で起こる。リピート伸長は、遺伝子によってコードされるタンパク質に欠陥を引き起こす可能性がある;遺伝子発現の調節を変える;毒性のあるRNAを生成したり、染色体を不安定にしたりする。

【0005】

リピートを含む遺伝子の変異型と野生型の両方の発現を阻害すると、重大な副作用を引き起こす可能性がある。したがって、変異型リピート伸長アレルの抑制は、リピート伸長障害の望ましい治療戦略である。変異型アレル特異的阻害のための現在の戦略には、疾患関連一塩基多型(SNP)または欠失をアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA干渉剤で標的化することが含まれる。しかしながら、リピート伸長変異に関連するSNPを同定するには、大規模な臨床コホートにおける詳細な集団特異的遺伝学的研究が必要である。さらに、標的SNPの頻度または変異型リピート伸長アレル上の位置に応じて、特定の罹患した個人または集団を除外することができる。

【0006】

概要

【0007】

本開示は、a) CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域とハイブリダイズする第1の鎖、およびb)第1の鎖とハイブリダイズする第2の鎖を含む二本鎖RNAを提供する。ここで、第1の鎖は、i) 標的CAGリピート領域に対する第1のミスマッチ;およびii) 標的CAGリピート領域に対する少なくとも第2のミスマッチを含む。本開示は、二本鎖RNAの第1の鎖をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子を提供し、ここで、ヌクレオチド配列は、真核細胞において機能的であるプロモーターに機能的に連結されている。本開示は、a) 本開示の二本鎖RNA;およびb) マイクロRNA足場を含む組換え核酸を提供する;本開示は、そのような組換え核酸をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターも提供する。本開示は、a) 本開示の二本鎖RNAおよびb) マイクロRNA足場を含む組換え核酸をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子を提供する;本開示はまた、かかるDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。本開示はまた、そのようなDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。本開示は、本開示の組換え発現ベクターを含むウイルスおよび非ウイルス送達ビヒクルを提供する;並びにそのような送達ビヒクルを含む医薬組成物を提供する。本開示は、疾患関連CAGリピート含有RNAの翻訳を選択的に減少させる方法を提供する。

【0008】

いくつかの態様において、本開示は、5'~3'を含む二本鎖RNAを提供する。(a) 5'リーダー配列;(b) パッセンジャー配列またはガイド配列を含む5'ステム;(c) 1~6塩基の5'リンカー;(d) 末端ループ;1~6塩基の3'リンカー;(f) 以下を含む3'ステム:(i) 5'ステムがパッセンジャー配列を含む場合はガイド配列;または(ii) 5'ステムがガイド配列を含む場合はパッセンジャー配列;および(g) 3'トレーラー配列;ここで、ガイド配列はCAGリピート含有RNA(例えばmRNAまたはmRNA前駆体)のCAGリピート領域を標的とし、CAGリピート領域に対して1~5塩基のミスマッチを含み、塩基のミスマッチはガイド配列の位置8~16に位置する。

【0009】

この特許又は出願のファイルは、彩色された少なくとも1つの図面を含む。この特許又は特許出願公開の写しは、請求及び必要な手数料の納付により、庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1A~1D:カスタムU6プロモーター駆動構築物から発現されたshRNAのクローニング及びデザイン。(図1A) カスタマイズされたpxTRC-EGFP-puroのためのプラスミドマップ。(図1B) 最初のshRNA発現カセット(配列番号760)。(図1C) shRNAプロセシングの精度および量を改善するためのshRNA構築物の改変(配列番号761)。(図1D) shHD1L-1デザイン(配列番号762)。図1B~1Dについて、緑色のマーキングは、5'

10

20

30

40

50

リーダーおよび3'トレーラー配列上のDrosha切断、および5'上部ステムおよび3'上部ステムにおけるDicer切断を示す; およびガイド鎖のミスマッチ位置は紫色の枠で囲まれている。

【図2】図2A~2C: shRNA発現のためのmiRNA miR33足場デザイン。(図2A) miR33 miRNA構造および配列要素(配列番号763)。(図2B) shRNAクローニングおよび発現のための一般化されたmiR33足場(配列番号764)。(図2C) shHD-33完全模倣デザイン(配列番号765)。図2A~2Cについて、緑色のマーキングは、5'リーダーおよび3'トレーラー配列上のDrosha切断、および5'アッパーステムおよび3'アッパーステムにおけるDicer切断を示す; およびガイド鎖中のミスマッチ位置は紫色で囲まれている。

【図3】図3A~3B: HTTのCAGリピート伸長を標的とする選択shRNAの細胞ベースの評価。(図3A) CAGリピートを標的とするいくつかのshRNAに対するHEK293Tルシフェラーゼアッセイの結果。野生型(wt)および変異体(mut)コンストラクトを示し、ルシフェラーゼ活性パーセントをスクランブルshRNAを対照にして正規化した。2つの独立した複製の平均を示す。誤差は平均の標準誤差(S.E.M.)である。統計的有意性は、0.05(*)または0.01(**)未満のp値によって示される。(図3B) ウェスタンブロットによってアッセイされ、Hillプロット方程式に適合する、患者由来細胞におけるHTT wtおよびmutタンパク質の定量化ノックダウン。単一複製または2つの複製の平均が示される。誤差はS.E.M.である。

【図4】HTT mRNAのCAGリピート領域に完全に一致するガイド配列を有するウイルスにコードされたshRNAに対してHTT mRNAのCAGリピート領域に対してミスマッチを含むガイド配列を有するウイルスにコードされたshRNAに関するshRNA量を比較するグラフであり、ここで、ミスマッチはガイド配列の位置8~16に位置する。

【図5】図5は、アリル選択的shRNAをコードするレンチウイルス構築物が、正常なHTTアリルと比較して、shHD-33fullおよびshHD33-fullmimicで形質導入された線維芽細胞における病原性HTTアリル(mut-HTT)の発現を有意に減少させたことを示すグラフである。

【図6】図6は、zQ175マウスの線条体におけるDARPP32およびGFP染色の共局在を示す。

【図7】図7A~図7Bは、AAV9-shScr処置群に対するAAV9-shHD33-Full-Mimic処置群のzQ175マウスの線条体における野生型(WT)およびmut HTTタンパク質のウェスタンブロット分析を示す。

【図8】図8は、線条体における用量依存的なAAV送達およびGFP発現を示す。

【図9】図9は、組換えAAVベクターを介して送達された低分子結合RNA(sbrRNA)によるin vivoでのアリル選択的ノックダウンを示す。

【図10】図10は、sbrRNAをコードする組換えAAVを含む組換えAAVビリオンのICV投与後の小脳における形質導入効率を示す。

【図11】図11は、SCA2マウスモデルにおける組換えAAVベクターを介して送達された低分子結合RNA(sbrRNA)によるin vivoでのアリル選択的ノックダウン(左パネル)およびATXN2-Q127マウスにおける病理の分子マーカーである重要な小脳遺伝子の発現の部分的回復(右パネル)を示す。

【図12】図12は、ATXN2-Qマウスにおける野生型(WT)遺伝子発現の保存に対するsbrRNAの効果を示す。タンパク質レベルは、CAGリピートを含む非標的遺伝子については変化しなかった。

【図13】図13A~13Eは、ノックダウンに対するレジストリの効果を示す。(図13(A) 上から順に配列番号: 406、873、406、406、406、874、875のガイド鎖カラム; 上から順に配列番号: 876、876、877、878、876、879、876のループカラム; 上から順に配列番号: 881、880、880、880、880、882、883、884のパッセンジャーストランドカラム)(図13(E) 上から順に配列番号868、869、870、871および872)。

【図14】図14は、ガイド配列スクリーニングシステムの概略図である。

10

20

30

40

50

【図 15】図 15 は、種々のガイド配列を用いたノックダウンおよびアリル選択性を示す。

【図 16】図 16 は、ガイド配列スクリーニングおよびアリル選択性を示す。

【図 16】図 17 は、ノックダウンおよびアリル選択性に対する標的 CAG リピート領域に対するミスマッチの数の影響を示す。

【図 17】図 17 は、ノックダウンおよびアリル選択性に対する、標的 CAG リピート領域に対するミスマッチの数の影響を示す。

【図 18】図 18 は、ミスマッチが位置 8、9、10、または 11 にある場合の、ノックダウンおよびアリル選択性に対する単一ミスマッチの影響を示す。

【図 19】第一のミスマッチが位置 8、9、10、または 11 にある場合の、第一のミスマッチと第二のミスマッチとの間の距離の、ノックダウンおよびアリル選択性に対する影響を示す。

10

【図 20】図 20 は、標的 CAG との 3 つのミスマッチ (左パネル) または 4 つのミスマッチ (右パネル) を有するガイド配列におけるミスマッチ間の距離の、ノックダウンおよびアリル選択性に対する影響を示す。

【図 21】図 21 は、第一のミスマッチが位置 9、10、または 11 にある場合の、標的 CAG との 3 つのミスマッチを有するガイド配列におけるミスマッチ間の距離の、ノックダウンおよびアリル選択性に対する影響を示す。

【図 22】図 22 は、表 6 を提供する。

【図 23】図 23 は、表 7 を提供する。

【図 24】図 24 は、表 8 を提供する。

20

【図 25】図 25 は、miR451 の 5' および 3' フランキングポリヌクレオチドを含む sbRNA のヌクレオチド配列を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0011】

リピート伸長障害は、正常なアリルに対して疾患アリルを選択的に阻害する上で大きな障害となる。本開示は、リピート数の違いを利用し、リピート含有タンパク質のアリル選択的阻害を達成することができる二本鎖 RNA を提供する。二本鎖 RNA は、リピート含有標的 RNA 分子 (例えば mRNA または mRNA 前駆体) のリピート領域を標的とし、ガイド配列の 8~16 の位置 (例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、または 16) において標的 mRNA または pre-mRNA のリピート領域に対して 1~5 (例: 1、2、3、4、または 5) の核酸塩基のミスマッチを含み、これは、野生型に対して突然変異タンパク質の発現を選択的に阻害する二本鎖 RNA の能力を高める。リピートを含有する標的 mRNA または pre-mRNA のリピート領域を標的とし、ガイド配列の 8~16 の位置におけるリピート領域に対して 1~5 のミスマッチを含むベクターによりコードされた二本鎖 RNA の標準設計は、5' 切断部位のプロセッシングにおける位置シフトを明らかにした。プロセッシングにおけるシフトのために、ガイド配列におけるミスマッチの位置もシフトし、それらをオフセットまたは望ましくない位置に配置した。オフセットまたは望ましくない位置にミスマッチを有する二本鎖 RNA は、望ましい機能を有さない可能性がある。本開示の二本鎖 RNA の設計は、ベクター発現のために改変されており、ミスマッチを望ましい位置に配置し、より予測可能な 5' 切断部位を提供するための適切なプロセッシングを強化している。

30

40

【0012】

本開示をより詳細に説明する前に、本明細書で使用する特定の用語の定義を提供することは、本開示を理解するのに役立つであろう。追加の定義は、本開示全体にわたって記載される。

【0013】

本明細書において、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲、または整数範囲は、別段の指示がない限り、列挙された範囲内の任意の整数の値、および適切な場合には、その分数 (整数の 10 分の 1 および 100 分の 1 など) を含むものと理解されるべきである。また、ポリマーサブユニット、サイズまたは厚さなどの任意の物理的特徴に関する本明細書に列挙された任意の数範囲は、別段の指示がない限り、列挙された範囲内の任意の整数

50

を含むものと理解されるべきである。本明細書において使用される用語「約」は、別段の指示がない限り、示された範囲、値、または構造の±20%を意味する。本明細書において使用される用語「a」および「an」は、列挙された成分の「1つ以上」を指すことが理解されるべきである。代替の(例:"or")の使用は、代替のいずれか、両方、またはそれらの任意の組み合わせを意味するものと理解されるべきである。本明細書において使用される用語「含む」、「有する」および「含む」は同義的に使用され、これらの用語およびその変形は、非限定的であると解釈されることを意図している。

【0014】

本明細書において使用される用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、ポリデオキシリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチドなどの共有結合したヌクレオチドサブユニットから構成される任意の核酸ポリマーを指す。核酸の例としては、RNAおよびDNAが挙げられる。

10

【0015】

本明細書において使用される用語「RNA」は、1つ以上のリボヌクレオチドを含む分子を指し、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離されたRNA、合成RNA、組換えRNA、ならびに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または改変によって天然に存在するRNAとは異なる修飾RNAを含む。RNA分子のヌクレオチドは、標準ヌクレオチドまたは非天然に存在するヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドを含むことができる。

【0016】

20

本明細書中で使用される場合、「DNA」とは、1つ以上のデオキシリボヌクレオチドを含む分子を指し、二本鎖DNA、一本鎖DNA、単離されたDNA、合成DNA、組換えDNA、ならびに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または改変によって天然に存在するDNAとは異なる修飾DNAを含む。DNA分子のヌクレオチドは、標準的なヌクレオチドまたは非標準的なヌクレオチド(例えば、天然に存在しないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチド)を含むことができる。

【0017】

本明細書中で使用される場合、「ヌクレオシド」とは、核酸塩基部分および糖部分を含む化合物を意味する。ヌクレオシドには、天然に存在するヌクレオシド(DNAおよびRNAに見られるような)および修飾ヌクレオシドが含まれるが、これらに限定されない。ヌクレオシドは、リン酸部分に結合することができる。

30

【0018】

本明細書中で使用される場合、「ヌクレオチド」とは、リン酸結合基をさらに含むヌクレオシドを意味する。本明細書中で使用される場合、「結合ヌクレオシド」は、リン酸結合によって結合されていてもいなくてもよく、したがって、「結合ヌクレオチド」を含むが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、「結合ヌクレオシド」とは、連続的な配列(すなわち、連結されたヌクレオシド間には付加的なヌクレオシドは存在しない)で結合されたヌクレオシドである。

【0019】

本明細書中で使用される場合、「核酸塩基」または「塩基」とは、糖部分と結合させて、オリゴヌクレオチドに組み込むことができるヌクレオシドを生成することができ、原子群が別のオリゴヌクレオチドまたは核酸の相補的な天然に存在する核酸塩基と結合することができる原子群を意味する。核酸塩基は、天然に存在してもよく、または修飾されていてもよい。

40

【0020】

本明細書中で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」とは、複数の結合ヌクレオシドを含む化合物を意味する。ある態様において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の未修飾リボヌクレオシド(RNA)および/または未修飾デオキシリボヌクレオシド(DNA)および/または1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む。

【0021】

50

本明細書において、「オリゴマー化合物」とは、2つ以上のサブ構造を含むポリマー構造を意味する。ある態様において、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオチドを含む。ある態様において、オリゴマー化合物は、1つ以上の共役基および/または末端基を含む。ある態様において、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオチドを含む。オリゴマー化合物には、天然に存在する核酸も含まれる。

【0022】

本明細書において、「一本鎖」とは、その相補体とハイブリダイズせず、安定な自己二重鎖を形成するのに十分な自己相補性を欠くオリゴマー化合物を意味する。

【0023】

本明細書において、「二本鎖」とは、その相補体と部分的または完全にハイブリダイズして安定な二本鎖分子を形成するオリゴマー化合物を意味する。二本鎖オリゴマー化合物は、互いにハイブリダイズした相補的オリゴマー化合物の2本の別々の鎖、または安定な自己二重鎖を形成するのに十分な自己相補性を有する単一のオリゴマー化合物から構成され得る。安定な自己二本鎖は、ステム-ループ構造および/またはバルジを含み得る。

【0024】

「単離された」とは、その自然環境から単離された、または人工的に産生された物質を指す。細胞に関して本明細書で使用される場合、「単離された」とは、その自然環境から単離された(例えば、被験体、器官、組織、または体液から)細胞を指す。核酸に関して本明細書で使用される場合、「単離された」とは、その自然環境から単離された、または精製された(例えば、細胞、細胞小器官または細胞質から)、組換え的に産生された、増幅された、または合成された核酸を指す。態様において、単離された核酸は、ベクター内に含まれる核酸を含む。

【0025】

本明細書で使用される場合、遺伝子の用語「野生型」または「非変異体」形態とは、正常なまたは非病原性活性(例えば、神経変性疾患の発症、発症または進行のより高いリスクをもたらす反復領域伸長などの突然変異を欠くタンパク質)に関連するタンパク質をコードする核酸を指す。

【0026】

本明細書で使用される場合、用語「突然変異」とは、遺伝子の構造、例えば遺伝子配列のいずれかの変化を指し、その結果、遺伝子の改変された形態が生じ、それは次の世代に受け継がれても(遺伝性突然変異)、受け継がれなくても(体細胞突然変異)よい。遺伝子突然変異には、DNAにおける単一塩基の置換、挿入、または欠失、または反復伸長を含む、遺伝子または染色体の複数の塩基またはより大きなセクションの置換、挿入、欠失、または再配列が含まれる。

【0027】

本明細書で使用される場合、用語「阻害核酸」とは、標的核酸、例えば標的RNA、mRNA、またはpre-mRNAの少なくとも一部にハイブリダイズし、その発現または活性を阻害するガイド鎖配列を含む核酸を指す。阻害核酸は、標的核酸のタンパク質コード領域(例えばエクソン)または非コード領域(例えば、5' UTR、3' UTR、イントロンなど)を標的とし得る。ある態様において、阻害核酸は、一本鎖または二本鎖分子である。阻害核酸は、別個の鎖上(例えば二重の二本鎖)または同一鎖中(例えば、一本鎖、自己アニーリング二本鎖構造)のパッセンジャー鎖配列をさらに含むことができる。ある態様において、阻害核酸は、siRNA、shRNA、pri-miRNA、pre-miRNA、またはmiRNAなどのRNA分子である。ある態様において、阻害核酸は、pri-miRNA、pre-miRNA、miRNA、またはshRNAなどの二本鎖RNA(dsRNA)である。

【0028】

本明細書において、「マイクロRNA」または「miRNA」とは、標的mRNAの切断、標的mRNAの翻訳抑制、標的mRNA分解、またはそれらの組み合わせによって標的遺伝子のサイレンシングを媒介することができる小さな非コードRNA分子を指す。典型的には、miRNAは、一次miRNA(pri-miRNA)と呼ばれるヘアピンまたはステムループ(例えば

、自己相補的な一本鎖骨格を有する)二重構造として転写され、これは、pre-miRNAに酵素的に加工される(例:Drosha、DGCR8、Pashaなどにより)。pre-miRNAは細胞質に輸送され、そこでDicerによって酵素的に加工されて、パッセンジャー鎖とのmiRNA二重鎖、次いで一本鎖の成熟miRNA分子が生成され、これはその後、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)にロードされる。miRNAへの言及は、合成または人工miRNAを含み得る。

【0029】

本明細書で使用される場合、「合成miRNA」または「人工miRNA」または「amiRNA」または「低分子結合RNA」(sbrRNA)は、ステム配列内の内因性miRNAガイド配列およびパッセンジャー配列が、標的遺伝子の高効率RNAサイレンシングを指示する異種ガイド配列および異種パッセンジャー配列で置換されている、内因性、修飾または合成pri-miRNAまたはpre-miRNA(例えば、miRNA骨格または足場)を指す(例えば、Eamens et al.(2014)、Methods Mol.Biol.1062:211~224を参照されたい。)。ある態様において、ガイド配列およびパッセンジャー配列の相補性の性質(例えば、塩基の数、ミスマッチの位置、膨隆のタイプなど)は、合成miRNAが構築される内因性miRNA骨格におけるガイド配列およびパッセンジャー配列の相補性の性質と類似していても異なってもよい。

【0030】

本明細書で使用される場合、用語「マイクロRNA骨格」、「miR骨格」、「マイクロRNA足場」または「miR足場」は、ステム配列が目的の異種RNAで置換された、pri-miRNAまたはpre-miRNA足場を指し、目的のmiRNAによって標的とされる遺伝子でRNAサイレンシングを指示する機能的な成熟miRNAを産生することができる。場合によっては、miR骨格は、5'フランキング領域(本明細書では「5'フランキングポリヌクレオチド」または「5'リーダー」とも呼ばれる)、ループモチーフ領域(本明細書では「ループポリヌクレオチド」とも呼ばれる)、および3'フランキング領域(本明細書では「3'フランキングポリヌクレオチド」または「3'トレーラー」とも呼ばれる)を含む。場合によっては、miR骨格は、5'フランキング領域および3'フランキング領域を含む(ループモチーフ領域は含まない)。miR骨格は、野生型miRNA足場から完全にまたは部分的に誘導され得るか、または完全に人工的な配列であり得る。

【0031】

本明細書において使用される場合、用語「短いヘアピンRNA」または「shRNA」は、前駆体miRNA(pre-miRNA)を形成する従来のステム-ループshRNAを含む。「shRNA」はまた、マイクロRNA埋め込みshRNA(miRNAベースのshRNA)を含み、ここで、miRNA二本鎖のガイド鎖およびパッセンジャー鎖は、既存の(または天然の)miRNAまたは修飾されたもしくは合成された(設計された)miRNAに組み込まれる。転写されると、従来のshRNAは、一次miRNA(pri-miRNA)または天然のpri-miRNAに非常に類似した構造を形成する。pri-miRNAは、その後、Droshaおよびそのコファクターによってpre-miRNAにプロセッシングされる。したがって、「shRNA」という用語は、pri-miRNA分子およびpre-miRNA分子を含む。

【0032】

「ステム-ループ構造」とは、主に一本鎖ヌクレオチドの領域(末端ループ部分)によって片側が連結された二本鎖または自己二本鎖(ステム部分)を形成することが既知または予測されるヌクレオチドの領域を含む二次構造を有する核酸を指す。「ヘアピン」、「自己二本鎖」および「フォールドバック」構造という用語も、本明細書ではステム-ループ構造を指すために使用される。このような構造は当技術分野で周知であり、この用語は当技術分野で周知の意味で一貫して使用される。当技術分野で周知のように、二次構造は正確な塩基対を必要としない。したがって、ステムは1つ以上の塩基のミスマッチまたはバルジを含むことができる。あるいは、塩基対は正確であり得る、すなわち、いかなるミスマッチも含まない。

【0033】

本明細書において使用される、阻害核酸の用語(例えば、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の相補性)は、サイレンシングの標的とされるmRNAまたはpre-mRNAの約10~50ヌクレオチド(例えば、約15~30、16~25、18~23または19~22ヌクレオチド)の領域に対して実質的に相補的である配列を指す。ガイド配列は、標的特異的サイレンシングを指示するために、例えば、RNAi装置またはプロセスによる標的mRNAの破壊を誘発するために、または標的mRNAの翻訳を減少させるために、標的mRNA配列に対して十分に相補的である。ある態様において、ガイド鎖配列は、Dicerによる切断後に残る成熟ガイド配列を指す。

【0034】

本明細書中で使用する場合、阻害核酸の用語「パッセンジャー鎖配列」とは、標的mRNAまたはpre-mRNAに相同であり、阻害核酸のガイド鎖配列に部分的または完全に相補的な配列を指す。阻害核酸のガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列は、ハイブリダイズして二本鎖構造(例えば、二本鎖二重鎖または一本鎖自己アニーリング二本鎖構造の形成)を形成する。ある態様において、ガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列は、Dicerによる切断後に残る成熟配列を指す。

【0035】

本明細書中で使用する場合、用語「5'アーム」または「5'ステム」とは、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖を含む二本鎖RNA(例えば、shRNA、pre-miRNA、pri-mRNA)の一部を指す。

【0036】

本明細書中で使用する場合、用語「3'アーム」または「3'ステム」とは、5'ステムのガイド鎖に対するパッセンジャー鎖、または5'ステムのパッセンジャー鎖に対するガイド鎖を含む二本鎖RNAの一部を指す。

【0037】

本明細書中で使用する場合、「二本鎖」とは、阻害核酸に関して使用する場合、互いにハイブリダイズして二本鎖構造を形成する2つの核酸鎖(例えば、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖)を指す。二本鎖は、2つの別々の核酸鎖によって、または自己相補性領域(例えば、ヘアピンまたはステムループ)を有する単一の核酸鎖によって形成され得る。

【0038】

本明細書中で使用する場合、「標的核酸」とは、アンチセンス化合物がハイブリダイズする核酸分子を意味する。標的核酸は、標的遺伝子によってコードされるmRNA(標的mRNA)またはpre-mRNA(標的pre-mRNA)であり得る。

【0039】

本明細書中で使用する場合、「標的化」または「標的化される」とは、アンチセンス化合物の特定の標的核酸分子または標的核酸分子の特定の領域への会合を意味する。二本鎖RNAは、それが標的核酸に対して十分に相補的であり、生理学的条件下でのハイブリダイゼーションを可能にする場合、標的核酸を標的とする。

【0040】

本明細書において使用される場合、用語「相補的」は、ポリヌクレオチドが互いに塩基対を形成する能力を指す。塩基対は、典型的には、逆平行ポリヌクレオチド鎖または単一の自己アニーリングポリヌクレオチド鎖におけるヌクレオチドサブユニット間の水素結合によって形成される。相補的ポリヌクレオチド鎖は、ワトソン-クリック様式(例:AからT、AからU、CからG)で、または二本鎖の形成を可能にする任意の他の様式で、塩基対を形成することができる。ある態様において、相補的ヌクレオチドは、GおよびU(ゆらぎ塩基対)を含む。当業者に明らかなように、DNAとは対照的にRNAを使用する場合、チミンよりむしろウラシルが、アデノシンに相補的であると考えられる塩基である。さらに、「U」が本発明の文脈において示される場合、別段の記載がない限り、「T」を置換する能力が理解される。相補性はまた、非修飾および修飾核酸塩基(例えば、シトシンの代わりに5-メチルシトシン)の間のワトソン-クリック塩基対合を包含する。二つのポリヌクレオチド鎖間の全相補性、完全相補性または100%相補性は、一つのポリヌクレオチド鎖の

各ヌクレオチドが第二のポリヌクレオチド鎖のヌクレオチド単位と水素結合を形成することができる場合である。％相補性は、整列した参照配列(例えば、標的mRNA、パッセンジャー鎖)に相補的である核酸分子中の隣接ヌクレオチド配列のヌクレオチド数を、ヌクレオチドの総数で割って100倍した数を指す。このようなアラインメントにおいて、塩基対を形成しない核酸塩基/ヌクレオチドはミスマッチと呼ばれる。連続するヌクレオチド配列の％相補性を計算する際には、挿入および欠失は認められない。相補性の計算において、核酸塩基のワトソン-クリック塩基対形成能が保持されている限り、核酸塩基への化学修飾は考慮されないことが当業者には理解される(例えば、5-メチルシトシンは、％相補性を計算する目的ではシトシンと同じとみなされる)。

【0041】

10

本明細書において、核酸塩基に関して「非相補的」とは、互いに水素結合を形成しない核酸塩基対を意味する。

【0042】

本明細書において、「ミスマッチ」とは、第1および第2のオリゴマー化合物が整列している場合に、第2のオリゴマー化合物の対応する位置において核酸塩基と対合することができない第1のオリゴマー化合物の核酸塩基を意味する。第1および第2のオリゴマー化合物のいずれかまたは両方は、オリゴヌクレオチドであり得る。塩基対を形成しないヌクレオチドには、自己対形成ヌクレオチド(A-A、T-T、U-U、C-C、およびG-G)、AおよびC、CおよびU、CおよびT、AおよびGが含まれる。ある態様において、ミスマッチは、G-Uゆらぎ塩基対を含まない。

20

【0043】

2つ以上の核酸配列間の「同一性パーセント」とは、参照配列(すなわち、％同一性=同一のヌクレオチドの数/整列領域におけるヌクレオチドの総数(例えば、隣接ヌクレオチド配列)×100)によって共有される核酸分子中の隣接するヌクレオチド配列のヌクレオチドの割合を指す。挿入および欠失は、隣接するヌクレオチド配列の同一性パーセントの計算においては許容されない。同一性の計算において、核酸塩基のワトソン-クリック塩基対形成能が保持される限り、核酸塩基への化学修飾は考慮されないことが当業者によって理解される(例えば、5-メチルシトシンは％同一性を計算する目的でシトシンと同じとみなされる)。

【0044】

30

本明細書中で使用される場合、用語「ハイブリダイズすること」または「ハイブリダイズする」とは、逆平行鎖上の塩基対間で水素結合を形成し、それによって二本鎖を形成する2つの核酸鎖をいう。特定の機構に限定されないが、ペアリングの最も一般的な機構は、相補的な核酸塩基間のワトソン-クリック、フーグスティーヌまたは逆フーグスティーヌ水素結合であり得る水素結合を含む。2つの核酸鎖間のハイブリダイゼーションの強度は、所定のイオン強度およびpHで、標的配列の50％が相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする温度として定義される融解温度(T_m)によって記述することができる。

【0045】

本明細書中で使用される場合、「異種」とは、天然の(天然に存在する)核酸には見出されない核酸をいう。例えば、マイクロRNAの成分(例えば、5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、3'フランキングポリヌクレオチド)に対して、異種ガイド配列および異種パッセンジャー配列は、天然のマイクロRNAとは関連しないヌクレオチド配列を含む。本明細書中で使用される場合、「ガイド配列」は、配向にかかわらず、二本鎖RNAの(または「ターゲティング鎖」、ここで「ターゲティング鎖」は標的RNAにハイブリダイズする)と交換可能である。

40

【0046】

本明細書中で使用される場合、「発現カセット」とは、核酸コード配列の一部または全部が転写され得る、核酸(例えば、導入遺伝子)を含む任意のタイプの遺伝子構築物をいう。いくつかの態様において、発現は、例えば、転写された遺伝子から生物学的に活性なポリペプチド産物または阻害RNA(例えば、siRNA、shRNA、miRNA)を生成するための

50

核酸の転写を含む。いくつかの態様において、導入遺伝子は、発現制御配列に操作可能に連結される。

【0047】

本明細書中で使用される場合、用語「導入遺伝子」とは、自然にまたは遺伝子工学手段によって別の細胞に導入され、転写され得、任意に翻訳され得る外因性核酸をいう。

【0048】

本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子発現」とは、核酸が核酸分子から転写され、多くの場合、ペプチドまたはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。プロセスは、転写、転写後制御、転写後修飾、翻訳、翻訳後制御、翻訳後修飾、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。「遺伝子発現」の測定への言及は、転写産物(例えば、RNAまたはmRNA)または翻訳産物(例えば、ペプチドまたはタンパク質)の測定を指すことができる。

10

【0049】

本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子の発現を阻害する」とは、遺伝子の発現を減少させる、下方制御する、抑制する、ブロックする、低下させる、または停止させることを意味する。遺伝子の発現産物は、遺伝子から転写されるRNA分子(例えばmRNA)、または遺伝子から転写されるmRNAから翻訳されるポリペプチドであり得る。mRNAのレベルの減少は、そこから翻訳されるポリペプチドのレベルの減少をもたらす。いくつかの実施形態において、発現の阻害は、ポリペプチドをコードしているmRNAの産生に実質的に影響を及ぼすことなく、そのポリペプチドのレベルを減少させる。発現のレベルは、mRNAまたはタンパク質を測定するための標準的な技術を用いて決定することができる。

20

【0050】

本明細書において使用される場合、「ベクター」とは、(例えば、阻害核酸をコードする導入遺伝子)、細胞間で核酸分子を輸送することができ、適切な発現制御配列に操作可能に連結された場合に核酸分子の発現を実施することができる遺伝的構築物を指す。発現制御配列は、転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列を含むことができる;スプライシングおよびポリアデニル化(polyA)シグナルのような効率的RNAプロセッシングシグナル;細胞質mRNAを安定化する配列;翻訳効率を高める配列(すなわちKozakコンセンサス配列);タンパク質の安定性を高める配列;必要に応じて、コードされた産物の分泌を促進する配列。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、トランスポゾン、コスミド、ファージミド、染色体、人工染色体、ウイルス、ビリオン、脂質ナノ粒子などであり得る。一旦適切な宿主細胞に形質転換されると、ベクターは宿主ゲノムから独立して複製し機能するか、場合によってはゲノム自体に組み込まれ得る。

30

【0051】

本明細書中で使用される場合、「宿主細胞」とは、目的の組成物、例えば、阻害核酸を含有する、または含有することができる任意の細胞を指す。実施形態において、宿主細胞は、齧歯類細胞(例えば、マウスまたはラット)または霊長類細胞(例えば、サル、チンパンジー、ヒト)などの哺乳類細胞である。実施形態において、宿主細胞は、インビトロまたはインビボであり得る。実施形態において、宿主細胞は、樹立された細胞株または初代細胞由来であり得る。実施形態において、宿主細胞は、リピート伸長疾患または疾患を有する、または有することが疑われる患者から得ることができる。実施形態において、宿主細胞は、線維芽細胞などの非CNS細胞である。実施形態において、宿主細胞は、ニューロン、グリア細胞、星状細胞、またはミクログリア細胞などのCNSの細胞である。

40

【0052】

本明細書において、「伸長リピート含有遺伝子」または「伸長リピート含有RNA」とは、反復領域(例えば、CAGリピート)を含む塩基配列を有する突然変異遺伝子によってコードされる突然変異遺伝子またはRNA分子(例えばmRNA前駆体またはmRNA)を指し、ここで、反復領域は、遺伝子によってコードされる「正常な」伸長リピート含有遺伝子またはRNAに典型的に存在する塩基リピートの所定の数または範囲を超えて伸長される

50

。リピート領域の存在または長さは、RNAまたはコードされたタンパク質の正常なプロセッシング、機能または活性に影響し、「リピート伸長」または「伸長リピート」疾患または障害を引き起こす可能性がある。伸長リピートは、連続する世代でサイズが変化する不安定な(動的な)突然変異であり得る。伸長される反復は、ジヌクレオチド反復、トリヌクレオチド反復、テトラヌクレオチド反復、ペンタヌクレオチド反復、ヘキサヌクレオチド反復などであり得る。ある態様において、反復は、CAG反復またはポリグルタミンである。伸長リピート含有遺伝子によってコードされる伸長リピート含有遺伝子またはRNAは、「病的ア ril」または「病原性ア ril」とも呼ばれ得る。ある態様において、遺伝子によってコードされるCAG反復含有遺伝子またはRNAの病的または病原性ア rilは、30個以上の連続するCAG反復を有する。

10

【0053】

「リピート伸長疾患または障害」または「伸長リピート疾患または障害」とは、遺伝子によってコードされる「正常な」伸長リピート含有遺伝子またはRNAに典型的に存在する塩基反復の所定の数または範囲を超える塩基リピート配列の伸長(expansion)によって引き起こされる疾患または障害を指す。リピート伸長疾患または障害は、リピート伸長のサイズに応じて著しく変化する表現型で現れ得る。リピート伸長疾患または障害は、主に神経変性疾患である。いくつかのリピート伸長疾患は、眼科疾患である。ある態様において、リピート伸長または障害は、ポリグルタミン病である。

【0054】

本明細書で使用される場合、「神経変性疾患」または「神経変性障害」とは、病理学的状態として神経細胞死を示す疾患または障害を指す。神経変性疾患は、慢性神経変性、例えば、数年間にわたる緩徐で進行性の神経細胞死、または急性神経変性、例えば、突然発症または神経細胞死を示し得る。慢性神経変性疾患の例としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症1~8型(SCA1~8)、前頭側頭型認知症(FTD)、および筋萎縮性側索硬化症(ALS)が挙げられる。神経変性疾患は、主に1つのタイプのニューロンまたは複数のタイプのニューロンの死を示し得る。

20

本明細書で使用される場合、「対象」、「患者」、および「個体」は、本明細書では交換可能に使用され、治療または治療のために選択される生体(例えば哺乳類)を指す。対象の例としては、ヒト並びに霊長類(サル、チンパンジー)、ウシ、ウマ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット、ブタ、およびそれらのトランスジェニック種などの非ヒト哺乳動物が挙げられる。

30

【0055】

A. 二本鎖RNA

【0056】

本開示は、人工マイクロRNAまたはshRNAとして機能する人工二本鎖RNAを提供する。本開示の二本鎖RNAは、標的RNA(例えばmRNAまたはmRNA前駆体)転写物の発現を調節する。二本鎖RNAは、調節の前に細胞内で処理される前駆体分子を含む。二本鎖RNAは、細胞に送達するために、プラスミド、ベクター、ゲノム、または他の核酸発現ベクターにコードされ得る。

【0057】

ある態様において、人工二本鎖RNAは、5'~3'に含む:(a) 5'リーダー配列;(b) パッセンジャー配列またはガイド配列を含むか、または実質的に含む5'ステム;(c) 1~6塩基の5'リンカー;(d) 末端ループ;(e) 1~6塩基の3'リンカー;(f) 以下を含む、または実質的に含む3'ステム:(i) 5'ステムがパッセンジャー配列を含む、または実質的にパッセンジャー配列を含むガイド配列;または(ii) 5'ステムがガイド配列を含む、または実質的にガイド配列を含むパッセンジャー配列;および(g) 3'トレーラー配列;ここで、ガイド配列は、CAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とし、CAGリピート領域に対して1~5塩基のミスマッチを含み、塩基のミスマッチはガイド配列の位置8~16に位置する。

40

【0058】

50

ある態様において、二本鎖RNAは、安定な自己二重鎖を形成する少なくとも部分的な自己相補性を有する単一のRNAオリゴヌクレオチド化合物を指す。特に明記しない限り、二本鎖RNAにおけるヌクレオチド位置の番号付けは、一本鎖RNA上の5'から3'方向へ数える。同様に、特に明記しない限り、ヌクレオチド配列は、一本鎖RNA上の5'から3'方向へ読み取られる。

【0059】

本開示の人工二本鎖RNAは、5'フランキング配列とも呼ばれる5'リーダーを含む。5'リーダー配列は、野生型マイクロRNA配列に由来するか、または野生型マイクロRNA配列から全体的もしくは部分的に得られ、または全体的もしくは部分的に人工的であってもよい。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列は、野生型pre-miRNA足場またはpri-miRNA足場のフランキング配列に由来するか、または野生型pre-miRNA足場のフランキング配列から全体的もしくは部分的に得られる。

【0060】

5'リーダー配列は、パッセンジャー配列またはガイド配列を含むか、または実質的にパッセンジャー配列またはガイド配列を含む5'ステムに連続的に連結されている。5'リーダー配列は、任意の長さであってもよい。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列は、長さが約1ヌクレオチド～約1,000ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約900ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約800ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約700ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約600ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、1ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約75ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約25ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または長さが約1ヌクレオチド～約10ヌクレオチドである。

【0061】

ある態様において、5'リーダーは、5'バルジ配列を含む。本明細書中で使用される場合、用語「バルジ配列」とは、二本鎖でそれに対向する核酸に対して非相補的である核酸の領域を指す。例えば、二本鎖は、相補的核酸の領域、次いで非相補的核酸の領域、次いで相補的核酸の第2の領域を含むことができる。相補的核酸の領域は互いに結合するが、中央の非相補的領域は結合せず、それによって「バルジ」を形成する。いくつかの態様において、2つの相補的領域の間に位置する核酸の2本鎖は、異なる長さであり、それによって「バルジ」を形成する。

【0062】

本開示の人工二本鎖RNAは、3'フランキング配列とも呼ばれる3'トレーラーを含む。3'トレーラー配列は、野生型マイクロRNA配列に由来するか、または野生型マイクロRNA配列から全体的もしくは部分的に得られるか、または全体的もしくは部分的に人工的であってもよい。いくつかの態様において、3'トレーラー配列は、野生型pre-miRNA足場またはpri-miRNA足場のフランキング配列に由来するか、または野生型pre-miRNA足場またはpri-miRNA足場のフランキング配列から全体的もしくは部分的に得られる。

【0063】

3'トレーラー配列は、ガイド配列またはパッセンジャー配列を含むか、または実質的に含む3'ステムに隣接して連結されている。3'トレーラー配列は、任意の長さであってもよい。いくつかの実施形態において、3'トレーラー配列は、長さが約1ヌクレオチド～約1,000ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約900ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約800ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約700ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約600ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、1ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約75ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約25ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または長さが約1

ヌクレオチド～約10ヌクレオチドである。いくつかの実施態様において、3'トレーラーは、3'バルジ配列を含む。

【0064】

いくつかの実施態様において、3'トレーラーは、ポリU(ポリウリジン)テールを含む。ある態様において、3'トレーラーは、3～6個のウリジン、例えば、3個のウリジン、4個のウリジン、5個のウリジンまたは6個のウリジンを含む。ある態様において、ポリUテールは、3'ステムにおけるガイド配列またはパッセンジャー配列にすぐ隣接する。ある態様において、ポリUテールを含む3'トレーラーを有する人工二本鎖RNAは、Pol IIIプロモーターを用いて発現される。

【0065】

ある態様において、3'トレーラーは、ポリアデニル化(pA)シグナル配列を含む。適切なポリアデニル化シグナルには、SV40後期pAシグナル、BGH pAシグナルなどが含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、pAシグナル配列を含む3'トレーラーを有する人工二本鎖RNAは、Pol IIプロモーターを用いて発現される。

【0066】

ある態様において、5'リーダー配列および3'トレーラー配列は、同じ数のヌクレオチドを有する。ある態様において、5'リーダー配列および3'トレーラー配列は、異なる長さを有する。

【0067】

ある態様において、5'リーダー配列および3'トレーラー配列は、同じmiRNA足場、例えば、同じ野生型pre-miRNA足場または同じpri-miRNA足場から、全体的にまたは部分的に得られるか、または由来する。ある態様において、5'リーダー配列および3'トレーラー配列は、両方とも、miR-33足場から、全体的にまたは部分的に得られるか、または由来する。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列および3'トレーラー配列は両方とも、pri-miR-33足場の全体または一部から得られるか、または由来する。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列および3'トレーラー配列は両方とも、pri-miR-33足場の全体または一部から得られるか、または由来する。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列および3'トレーラー配列は表Eから選択される。

【0068】

いくつかの実施形態において、5'リーダー配列は3'トレーラー配列と相補的ではない。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列は3'トレーラー配列と部分的に相補的である。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列は、3'トレーラー配列中のポリUテール中のウリジンに対する1つ、2つ、またはそれ以上のCミスマッチ(または二本鎖RNAをコードするDNA配列についてのC-Tミスマッチ)を含む。

【0069】

いくつかの実施形態において、5'リーダーおよび3'トレーラー配列は、Droshaによる認識および切断を可能にする配列を含む。哺乳類におけるmiRNA生合成の標準的経路は、Drosha-DGCR8 (DiGeorge症候群臨界領域遺伝子8)複合体(マイクロプロセッサ)によって開始され、これは、長い一次miRNA (pri-miRNA)をプロセッシングして～60 ntのpre-miRNAにし、Dicerによってさらにプロセッシングされて～22 ntの長さの二本鎖にする。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列および/または3'トレーラー配列として、またはその一部として使用される一次miRNA配列は、二本鎖RNAのDrosha切断を指示することができる。ガイド:パッセンジャー二本鎖の選択された発現のための足場として前駆miRNAを使用する方法は、米国特許公開第2008/0226553号およびLiu et al.(2008)Nucleic Acids Res.36:2811～24に提供されており、これらの各々は、その全体が参照により組み込まれる。

【0070】

いくつかの実施形態において、人工二本鎖RNAは、Drosha非依存性/Dicer依存性経路によってプロセッシングされる。いくつかの実施形態において、スプライシング、3'-5'エキソリボヌクレアーゼ、またはpol III終結は、Drosha切断の代わりとなり得る。

10

20

30

40

50

【0071】

いくつかの実施形態において、人工二本鎖RNAは、Drosha依存性/Dicer非依存性経路によってプロセッシングされる。Drosha依存性/Dicer非依存性経路プロセッシングの例は、pri-miR-451によって提供され、これは、Droshaによってプロセッシングされ、pre-miR-451を生じ、次いで、Ago2 (argonaute 2)、ac-pre-miR-451によって切断され、これは、成熟miR-451を生成するために、未知のメカニズムによってさらに切除される。

【0072】

いくつかの実施形態において、5'リーダー配列および/または3'トレーラー配列は、表Aに示されるヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、人工二本鎖RNAは、CCGGを含むか、またはそれからなる5'リーダー配列およびUUUGを含むか、またはそれからなる3'トレーラー配列を含む。いくつかの実施形態において、人工二本鎖RNAは、CCを含むか、またはそれからなる5'リーダー配列およびUUUGを含むか、またはそれからなる3'トレーラー配列を含む。いくつかの実施形態において、人工二本鎖RNAは、GCUGを含むか、またはそれからなる5'リーダー配列およびga uuuuugを含むか、またはそれからなる3'トレーラー配列を含む。いくつかの実施形態において、人工二本鎖RNAは、配列番号7を含むか、またはそれからなる5'リーダー配列および配列番号13を含むか、またはそれからなる3'トレーラー配列を含む。

【0073】

表A：5'リーダー配列および3'トレーラー配列の例

5'リーダー配列 説明	配列	配列番号:
	CCGG	NA
	CC	NA
	CACC	NA
miR-33 partial(DNA)	GCTG	NA
miR-33 partial(RNA)	GCUG	NA
miR-33 full(DNA)	tgcacacctctggcgggcagct ctg	738
miR-33 full(RNA)	ugcacaccuccuggcgggcagcu cug	7
3'トレーラー配列 説明	配列	配列番号:
	TTTTTG	NA
	UUUUUG	NA
miR-33 partial(DNA)	ga ttttg	NA
miR-33 partial(RNA)	ga uuuuug	NA
miR-33 full(DNA)	gg aggccctgccctgactgccac ttttg	12
miR-33 full(RNA)	gg aggccugcccugacugcccac uuuuug	13

【0074】

いくつかの実施形態において、二本鎖RNAの5'ステム（または5'アーム）はパッセンジャー配列を含み、センス配列とも呼ばれる。パッセンジャー配列は、標的mRNA転写物と同一性を有する。パッセンジャー配列は、約15～30ヌクレオチドの長さ、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチドの長さであり得る。いくつかの実施形態において、パッセンジャー配列は、約19～24ヌクレオチドの長さであり得る。

【0075】

いくつかの実施形態において、二本鎖RNAの3'ステム（または3'アーム）は、アンチセンス配列とも呼ばれるガイド配列を含む。ガイド配列は、標的mRNA転写物に対して相

補性を有する。ガイド鎖は、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチドの長さであり得る。ある態様において、ガイド配列は、約19～24ヌクレオチド長であり得る。

【0076】

ある態様において、5'ステムは、ガイド配列を含み、3'ステムは、二本鎖RNAのパッセンジャー配列を含む。

【0077】

ガイド配列およびパッセンジャー配列は、宿主細胞におけるプロセッシングにおいて二本鎖siRNA分子を形成するのに十分な相補性を有し、これは、3'ステム(または5'ステム)由来のガイド配列がRISC複合体によって認識され、その特異的mRNA転写物を標的とするように、RNA干渉装置のための適切な基質として作用する。ある態様において、ガイド配列およびパッセンジャー配列は、100%の相補性を有する。ある態様において、ガイド配列およびパッセンジャー配列は、互いに実質的に相補的であり、例えば、約70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%相補的である。ある態様において、パッセンジャー配列は、1～10個または1～5個の塩基のミスマッチまたはバルジを含むことができる。

【0078】

ガイド配列は、標的mRNA配列に対して完全またはほぼ完全なワトソン-クリック相補性を有し、ガイド鎖の最初の5'ヌクレオチドに対してガイド配列の位置1～7、2～7、1～8、または2～8に位置するシード配列を含むことができる。シード領域は、二本鎖RNAによる効率的な遺伝子サイレンシングにとって重要である。

【0079】

ガイド配列は、CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域を標的とし、CAGリピート領域に対して一から5個のミスマッチを含み、ここで、塩基のミスマッチは、ガイド配列の位置8～16に位置する。ミスマッチには、自己対合ヌクレオチド(A-A、U-U、T-T、C-C、およびG-G)、AとCの対合、CとUの対合、CとTの対合、およびAとGの対合が含まれる。いくつかの実施形態において、ミスマッチは、ガイド鎖にアデノシン塩基を導入するなどのプリンのミスマッチを含む。

【0080】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域を標的とするガイド配列は、CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域に対して約1～5塩基のミスマッチを含む。いくつかの実施形態において、CAGリピート領域を標的とするガイド配列は、CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域に対して約1～4個の塩基のミスマッチ、約1～3個の塩基のミスマッチ、約1～2個の塩基のミスマッチ、約2～5個の塩基のミスマッチ、約3～4個の塩基のミスマッチ、約3～5個の塩基のミスマッチ、または約4～5個の塩基のミスマッチを含む。いくつかの実施形態において、CAGリピート領域を標的とするガイド配列は、CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域に対して約一個のミスマッチ、約二個のミスマッチ、約三個のミスマッチ、約四個のミスマッチ、または約五個のミスマッチを含む。

【0081】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対する少なくとも一個のミスマッチ(1、2、3、4、または5)は、ガイド配列の位置8～12に位置し得る。いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対する少なくとも一個のミスマッチ(1、2、または3)は、ガイド配列の位置9～11に位置し得る。いくつかの実施形態において、ガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対する二個以上のミスマッチは、互いに連続または隣接している。いくつかの実施形態において、位置8～16に位置するCAGリピート領域に対する少なくとも1つのミスマッチは、位置8～16に位置する別のミスマッチに隣接していない。

【0082】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチは、ガイド

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

いくつかの実施形態において、CAGレジスタ内のCAGリピート領域を標的とするガイド配列において、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置9に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置10に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置11に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置15に位置し、CAGリピート領域に対

する1つのミスマッチはガイド配列の位置16に位置する。いくつかの実施形態において、位置9、10および11におけるミスマッチはそれぞれA、AおよびAであり、位置15および16におけるミスマッチはAA、AU、UA、またはUUである。

【0087】

いくつかの実施形態において、UGCレジスタ内のCAGリピート領域を標的とするガイド配列は、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置9に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置10に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置12に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置15に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチはガイド配列の位置16に位置する。いくつかの実施形態において、位置9、10および12におけるミスマッチはそれぞれA、CおよびAであり、位置15および16におけるミスマッチはAA、UA、またはUUである。

10

【0088】

いくつかの実施形態において、GCUレジスタ内のCAGリピート領域を標的とするガイド配列は、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチがガイド配列の位置9に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチがガイド配列の位置10に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチがガイド配列の位置11に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチがガイド配列の位置15に位置し、CAGリピート領域に対する1つのミスマッチがガイド配列の位置16に位置することを含む。いくつかの実施形態において、位置9、10および11におけるミスマッチはそれぞれA、UおよびAであり、位置15および16におけるミスマッチはAAまたはAUである。

20

【0089】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域を標的とするガイド配列は、表B1～B2から選択されるいずれかの配列を含み、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAは、表B1～B2から選択されるガイド配列、およびガイド配列に完全に相補的であるか、または選択されたガイド配列と比較して1から10個または1から5個のミスマッチまたはバルジを有する対応するパッセンジャー配列を含む。

【0090】

表 B1 : CAG リピート標的オリゴヌクレオチド

30

# ミスマッチ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
1	CUGCUGCU <u>U</u> CUGCUGCUGCUG	配列番号:35
	UGCUGCUG <u>U</u> UGCUGCUGCUGC	配列番号:36
	GCUGCUGC <u>A</u> GCUGCUGCUGCU	配列番号:37
2	CUGCUGCU <u>U</u> AUGCUGCUGCUG	配列番号:38
	UGCUGCUG <u>U</u> AUGCUGCUGCUGC	配列番号:39
	CUGCUGCU <u>U</u> CUG <u>A</u> UGCUGCUG	配列番号:41
	CUGCUGCU <u>U</u> CUGC <u>G</u> GCUGCUG	配列番号:42
3	CUGCUGCU <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> CUGCUGCUG	配列番号:43
	GCUGCUGC <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> UGCUGCUGCU	配列番号:40
	CUGCUGCU <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> CUGCUGCUG	配列番号:326
	CUGCUGCU <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> CUGCUGCUG	配列番号:45
	CUGCUGCU <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> CUGCUGCUG	配列番号:46
4	CUGCUGCU <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> CUGCUGCUG	配列番号:347
	CUGCUGCU <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> CUGCUGCUG	配列番号:48
	CUGCUGCU <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> CUGCUGCUG	配列番号:49
	CUGCUGCU <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> CUGCUGCUG	配列番号:50

40

50

CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域に対するガイド配列中のヌクレオチドのミスマッチを太字および下線で示す。

【0091】

表 B2 : CAG リピート標的オリゴヌクレオチド

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
9:G>U	CUGCUGCUUCUGCUGCUG CUG	配列番号:35
9:G>A	CUGCUGCUACUGCUGCUG CUG	配列番号:295
9:G>C	CUGCUGCUCCUGCUGCUG CUG	配列番号:220
9:C>A	UGCUGCUGAUGCUGCUG CUGC	配列番号:221
9:C>G	UGCUGCUGGUGCUGCUG CUGC	配列番号:222
9:U>A	GCUGCUGCAGCUGCUGCU GCU	配列番号:37
9:U>C	GCUGCUGCCGCUGCUGCU GCU	配列番号:224
9:U>G	GCUGCUGCGGCUGCUGCU GCU	配列番号:225
9:G>U_10:C>A	CAGCAGCAGCAUAAGCA GCAG	配列番号:75
9:G>U_11:U>G	CUGCUGCUUCGGCUGCUG CUG	配列番号:76
9:G>U_12:G>A	CAGCAGCAUCAACAGCAG CGA	配列番号:77
9:G>C_12:G>A	CUGCUGCUCCUACUGCUG CUG	配列番号:78
9:G>A_13:C>G	CUGCUGCUACUGGUGCU GCUG	配列番号:40
9:G>U_13:C>A	CUGCUGCUUCUGAUGCU GCUG	配列番号:80
9:G>A_14:U>G	CUGCUGCUACUGCGGCUG CUG	配列番号:81
9:G>C_14:U>C	CUGCUGCUCCUGCCGCUG CUG	配列番号:82
9:G>U_14:U>C	CUGCUGCUUCUGCCGCUG CUG	配列番号:83

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
9:G>U_14:U>G	CUGCUGCUUCUGCGGCUG CUG	配列番 号:41
9:G>C_15:G>A	CUGCUGCUCCUGCUACUG CUG	配列番 号:85
9:G>C_16:C>A	CUGCUGCUCCUGCUGAUG CUG	配列番 号:86
9:G>U_16:C>G	CUGCUGCUUCUGCUGGU GCUG	配列番 号:87
10:U>C_15:C>A	UGCUGCUGCCGCUGAUGC UGC	配列番 号:88
10:U>G_11:G>U	UGCUGCUGCGUCUGCUGC UGC	配列番 号:89
10:U>G_12:C>A	UGCUGCUGCGGAUGCUG CUGC	配列番 号:90
10:U>G_15:C>A	UGCUGCUGCGGCUGAUG CUGC	配列番 号:91
11:G>A_13:U>G	UGCUGCUGCUACGGCUGC UGC	配列番 号:92
11:G>A_15:C>A	UGCUGCUGCUACUGAUG CUGC	配列番 号:93
11:G>C_12:C>G	UGCUGCUGCUCGUGCUGC UGC	配列番 号:94
11:G>C_14:G>A	UGCUGCUGCUCCUACUGC UGC	配列番 号:95
11:G>U_12:C>A	UGCUGCUGCUUAUGCUG CUGC	配列番 号:96
11:G>U_13:U>G	UGCUGCUGCUUCGGCUGC UGC	配列番 号:97
11:G>U_14:G>A	UGCUGCUGCUUCUACUGC UGC	配列番 号:98
11:G>U_16:U>G	UGCUGCUGCUUCUGCGGC UGC	配列番 号:99
8:G>C_14:G>A	UGCUGCUCCUGCUACUGC UGC	配列番 号:100
8:G>C_9:C>G	UGCUGCUCGUGCUGCUGC UGC	配列番 号:101
8:G>U_10:U>G	UGCUGCUUCGGCUGCUGC UGC	配列番 号:102

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
8:G>U_12:C>A	UGCUGCUUCUGAUGCUGCUGC	配列番号:103
8:G>U_13:U>C	UGCUGCUUCUGCCGCUGCUGC	配列番号:104
8:G>U_13:U>G	UGCUGCUUCUGCGGCUGCUGC	配列番号:105
8:G>U_9:C>A	UGCUGCUUAUGCUGCUGCUGC	配列番号:106
9:C>A_11:G>U	UGCUGCUGAUUCUGCUGCUGC	配列番号:107
9:C>A_16:U>C	UGCUGCUGAUGCUGCCGCUGC	配列番号:108
9:C>A_10:U>C	UGCUGCUGACGCUGCUGCUGC	配列番号:109
10:G>A_14:C>A	GCUGCUGCUACUGAUGCUGCU	配列番号:110
10:G>A_14:C>G	GCUGCUGCUACUGGUGCUGCU	配列番号:111
10:G>C_11:C>G	GCUGCUGCUCGUGCUGCUGCU	配列番号:112
10:G>C_13:G>A	GCUGCUGCUCCUACUGCUGCU	配列番号:113
10:G>U_11:C>A	GCUGCUGCUUAUGCUGCUGCU	配列番号:114
10:G>U_12:U>G	GCUGCUGCUUCGGCUGCUGCU	配列番号:115
10:G>U_14:C>A	GCUGCUGCUUCUGAUGCUGCU	配列番号:116
10:G>U_15:U>G	GCUGCUGCUUCUGCGGCU	配列番号:117
11:C>A_13:G>A	GCUGCUGCUGAUACUGCUGCU	配列番号:118
11:C>A_13:G>C	GCUGCUGCUGAUCCUGCUGCU	配列番号:119
11:C>A_13:G>U	GCUGCUGCUGAUUCUGCUGCU	配列番号:120
11:C>A_15:U>A	GCUGCUGCUGAUGCAGCUGCU	配列番号:121

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
11:C>A_15:U>C	GCUGCUGCUGAUGCCGCU GCU	配列番号:122
11:C>U_14:C>A	GCUGCUGCUGUUGAUGC UGCU	配列番号:123
8:C>A_11:C>G	GCUGCUGAUGGUGCUGC UGCU	配列番号:124
8:C>A_12:U>G	GCUGCUGAUGCGGCUGC UGCU	配列番号:125
8:C>A_15:U>C	GCUGCUGAUGCUGCCGCU GCU	配列番号:126
8:C>A_16:G>C	GCUGCUGAUGCUGCUCU GCU	配列番号:127
1_2~8:C>G_16:G>U	GCUGCUGGUGCUGCUCU UGCU	配列番号:128
2~9:U>C_14:C>A	GCUGCUGCCGCGUGAUGC GCU	配列番号:129
2~9:U>G_11:C>A	GCUGCUGCGGAUGCUGC UGCU	配列番号:130
9:U>G_14:C>A	GCUGCUGCGGCUGAUGC UGCU	配列番号:131
9:G>U_10:C>A_12:G>U	CUGCUGCUUAUUCUGC GCUG	配列番号:132
9:G>C_10:C>A_13:C>A	CUGCUGCUCAUGAUGC GCUG	配列番号:133
9:G>C_10:C>G_13:C>A	CUGCUGCUCGUGAUGC GCUG	配列番号:134
9:G>C_10:C>G_13:C>G	CUGCUGCUCGUGGUGC GCUG	配列番号:135
9:G>U_10:C>A_13:C>G	CUGCUGCUUAUGGUGC GCUG	配列番号:136
9:G>U_10:C>G_13:C>A	CUGCUGCUUGUGAUGC GCUG	配列番号:137
9:G>U_10:C>G_13:C>G	CUGCUGCUUGUGGUGC GCUG	配列番号:138
9:G>A_10:C>G_14:U>G	CUGCUGCUAGUGCGGCU GCUG	配列番号:139
9:G>C_10:C>G_14:U>A	CUGCUGCUCGUGCAGCUG CUG	配列番号:140

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
9:G>C 10:C>G 14:U>G	CUGCUGCUCGUGCGGCUG CUG	配列番号:141
9:G>U 10:C>A 14:U>C	CUGCUGC UUAUGCCGCUG CUG	配列番号:142
9:G>U 10:C>A 14:U>G	CUGCUGC UUAUGCGGCU GCUG	配列番号:143
9:G>C 10:C>A 15:G>U	CUGCUGCUCAUGCUUCUG CUG	配列番号:144
9:G>U 10:C>A 15:G>A	CUGCUGC UUAUGCUACU GCUG	配列番号:145
9:G>U 10:C>A 15:G>C	CUGCUGC UUAUGCUCCUG CUG	配列番号:146
9:G>C 10:C>G 16:C>A	CUGCUGCUCGUGCUGAU GCUG	配列番号:147
9:G>C 10:C>G 16:C>G	CUGCUGCUCGUGCUGGU GCUG	配列番号:148
9:G>U 10:C>A 16:C>G	CUGCUGC UUAUGCUGGU GCUG	配列番号:149
9:G>U 10:C>G 16:C>A	CUGCUGC UUGUGCUGAU GCUG	配列番号:150
9:G>A 10:C>A 11:U>A	CUGCUGC UAAAGCUGCU GCUG	配列番号:325
9:G>A 10:C>A 11:U>C	CUGCUGC UAACGCUGCUG CUG	配列番号:152
9:G>A 10:C>G 11:U>G	CUGCUGC UAGGGCUGCU GCUG	配列番号:46
9:G>C 10:C>A 11:U>C	CUGCUGCUCACGCUGCUG CUG	配列番号:154
9:G>C 10:C>G 11:U>C	CUGCUGCUCGCGCUGCUG CUG	配列番号:155
9:G>U 10:C>A 11:U>C	CUGCUGC UACGCUGCUG CUG	配列番号:156
9:G>U 10:C>A 11:U>G	CUGCUGC UAGGCUGCU GCUG	配列番号:157
9:G>U 10:C>G 11:U>C	CUGCUGC UUGCGCUGCUG CUG	配列番号:45
9:C>A 10:U>A 14:G>U	UGCUGCUGAAGCUUCUG CUGC	配列番号:159

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
9:C>A 10:U>C 12:C>A	UGCUGCUGACGAUGCUGCUGC	配列番号:160
9:C>A 10:U>C 12:C>G	UGCUGCUGACGGUGCUGCUGC	配列番号:161
9:C>A 10:U>C 13:U>G	UGCUGCUGACGCGGCUGCUGC	配列番号:162
9:C>A 10:U>C 14:G>U	UGCUGCUGACGCUUCUGCUGC	配列番号:163
9:C>G 10:U>C 14:G>C	UGCUGCUGGCGCUCCUGCUGC	配列番号:164
9:U>A 10:G>C 14:C>G	GCUGCUGCACCUGGUGCUGCU	配列番号:165
9:U>G 10:G>A 14:C>A	GCUGCUGCGACUGAUGCUGCU	配列番号:166
9:U>G 10:G>A 16:G>U	GCUGCUGCGACUGCUUCUGCU	配列番号:167
9:U>G 10:G>C 11:C>A	GCUGCUGCGCAUGCUGCUGCU	配列番号:168
9:U>G 10:G>C 11:C>G	GCUGCUGCGCGUGCUGCUGCU	配列番号:169
9:U>G 10:G>C 14:C>A	GCUGCUGCGCCUGAUGCUGCU	配列番号:170
9:U>G 10:G>C 14:C>G	GCUGCUGCGCCUGGUGCUGCU	配列番号:171
9:U>G 10:G>U 11:C>A	GCUGCUGCGUAUGCUGCUGCU	配列番号:172
9:U>G 10:G>U 13:G>U	GCUGCUGCGUCUUCUGCUGCU	配列番号:173
9:U>G 10:G>U 14:C>A	GCUGCUGCGUCUGAUGCUGCU	配列番号:174
9:U>G 10:G>U 14:C>G	GCUGCUGCGUCUGGUGCUGCU	配列番号:175
9:U>G 10:G>U 15:U>A	GCUGCUGCGUCUGCAGCUGCU	配列番号:176
9:U>A 10:G>U 11:C>A	GCUGCUGCAUAUGCUGCUGCU	配列番号:43
9:G>A 10:C>G 12:G>C 15:G>U	CUGCUGCUGAGUCCUUCUGCUG	配列番号:178

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
9:G>C_10:C>A_12:G>U_15:G>A	CUGCUGCUCUACUACUG CUG	配列番号:179
9:G>C_10:C>G_12:G>A_16:C>A	CUGCUGCUCGUACUGAU GCUG	配列番号:180
9:G>C_10:C>G_12:G>U_16:C>G	CUGCUGCUCGUUCUGGU GCUG	配列番号:181
9:G>A_10:C>G_13:C>A_15:G>C	CUGCUGCUCUAGUGAUCCU GCUG	配列番号:182
9:G>A_10:C>G_13:C>G_15:G>U	CUGCUGCUCUAGUGGUUCU GCUG	配列番号:183
9:G>A_10:C>A_14:U>G_15:G>U	CUGCUGCUCUAAUGCGUCU GCUG	配列番号:184
9:G>C_10:C>A_14:U>G_15:G>U	CUGCUGCUCUAGCGUCUG CUG	配列番号:185
9:G>C_10:C>G_14:U>G_15:G>C	CUGCUGCUCGUGCGCCUG CUG	配列番号:186
9:G>C_10:C>G_14:U>G_15:G>U	CUGCUGCUCGUGCGUCUG CUG	配列番号:187
9:G>U_10:C>A_14:U>G_15:G>U	CUGCUGCUCUAAUGCGUCU GCUG	配列番号:188
9:G>A_10:C>A_14:U>G_16:C>U	CUGCUGCUCUAAUGCGGUU GCUG	配列番号:189
9:G>C_10:C>G_14:U>A_16:C>A	CUGCUGCUCGUGCAGAU GCUG	配列番号:190
9:G>C_10:C>G_14:U>G_16:C>A	CUGCUGCUCGUGCGGAU GCUG	配列番号:191
9:G>A_10:C>G_15:G>U_16:C>A	CUGCUGCUCUAGUGCUUAU GCUG	配列番号:192
9:G>C_10:C>G_15:G>C_16:C>A	CUGCUGCUCGUGCUCAUG CUG	配列番号:193
9:G>C_10:C>G_15:G>U_16:C>A	CUGCUGCUCGUGCUUAU GCUG	配列番号:194
9:G>A_10:C>A_11:U>G_15:G>C	CUGCUGCUCUAGGCUCCUG CUG	配列番号:195
9:G>U_10:C>A_11:U>G_15:G>C	CUGCUGCUCUAGGCUCCUG CUG	配列番号:196
9:G>A_10:C>A_11:U>C_16:C>U	CUGCUGCUCUACGCUGUU GCUG	配列番号:197

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
9:G>A_10:C>G_11:U>C_16:C>U	CUGCUGCUAGCGCUGUU GCUG	配列番号:198
9:G>U_10:C>A_11:U>G_16:C>U	CUGCUGCUUAGGCUGUU GCUG	配列番号:199
9:C>A_10:U>C_14:G>U_15:C>U	UGCUGCUGACGCUUUUG CUGC	配列番号:200
9:C>A_10:U>C_14:G>U_16:U>G	UGCUGCUGACGCUUCGGC UGC	配列番号:201
9:C>G_10:U>C_14:G>U_15:C>U	UGCUGCUGGCGCUUUUG CUGC	配列番号:202
9:C>U_10:U>C_14:G>U_16:U>G	UGCUGCUGUCGCUUCGGC UGC	配列番号:203
9:U>A_10:G>U_11:C>A_13:G>A	GCUGCUGCAUAUACUGC UGCU	配列番号:204
9:U>G_10:G>C_11:C>A_16:G>U	GCUGCUGCGCAUGCUCU GCU	配列番号:205
9:U>G_10:G>C_11:C>G_14:C>A	GCUGCUGCGCGUGAUGC UGCU	配列番号:206
9:U>G_10:G>C_11:C>G_16:G>U	GCUGCUGCGCGUGCUUCU GCU	配列番号:207
9:U>G_10:G>U_11:C>A_15:U>C	GCUGCUGCGUAUGCCGCU GCU	配列番号:208
9:U>G_10:G>U_11:C>A_16:G>U	GCUGCUGCGUAUGCUUC UGCU	配列番号:209
9:G>A_10:C>A_11:U>A_15:G>A_16:C>A	CUGCUGCUAAAGCUAAU GCUG	配列番号:210
9:G>A_10:C>A_11:U>A_15:G>A_16:C>U	CUGCUGCUAAAGCUAUU GCUG	配列番号:211
9:G>A_10:C>A_11:U>A_15:G>U_16:C>A	CUGCUGCUAAAGCUUAU GCUG	配列番号:212
9:G>A_10:C>A_11:U>A_15:G>U_16:C>U	CUGCUGCUAAAGCUUUU GCUG	配列番号:213
9:C>A_10:U>C_12:C>A_15:C>A_16:U>A	UGCUGCUGACGAUGAAG CUGC	配列番号:214
9:C>A_10:U>C_12:C>A_15:C>U_16:U>A	UGCUGCUGACGAUGUAG CUGC	配列番号:215
9:U>A_10:G>U_11:C>A_15:U>A_16:G>A	GCUGCUGCAUAUGCAAC UGCU	配列番号:216

ミスマッチの位置およびタイプ	ガイド配列(RNA)	配列番号:#
9:U>A_10:G>U_11:C>A_15:U>A_16:G>U	GCUGCUGCAUAUGCAUC UGCU	配列番号:217

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態において、CAGリピート含有mRNAまたはプレmRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列の特異性または選択性は、CAGリピート領域に対す

10

20

30

40

50

る塩基ミスマッチの数とともに増加し、ここで、塩基ミスマッチはガイド配列の位置8～16に位置する。ガイド配列の特異性(またはオフターゲット活性)は、ヒトのサプライズされていないトランスクリプトーム(Ensemblデータベース、リリース100)における潜在的なオフターゲット適合を検出することによって決定することができる。例えば、シード配列(5'末端からのヌクレオチド1～7)におけるCAGリピート(または異なるレジスタ内のリピートを標的とするガイド配列を用いる場合はAGCまたはGCA)と完全な相補性を有し、かつガイド配列の位置8、9、10、または11におけるミスマッチを有するCAGリピートを標的とする21merのガイド配列について;以下のステップを用いて、オフターゲット活性を測定することができる:ガイド配列と完全に一致するオフターゲット遺伝子の頻度を測定する;位置1～21内のガイド配列と完全に17merマッチするオフターゲット遺伝子の頻度を測定する;位置8～21の間に0、1、2、3、または4個のミスマッチを有するガイド配列と一致するオフターゲット遺伝子の頻度を測定する。完全な一致、位置1～21にわたる完全な17merマッチ、0個のミスマッチを有するガイドとのマッチ、1個のミスマッチを有するガイドとのマッチ、2個のミスマッチを有するガイドとのオフターゲットマッチ、3個のミスマッチを有するガイドとのオフターゲットマッチ、4個のミスマッチを有するガイドとのオフターゲットマッチのオフターゲット頻度を集計することができる。

10

【0093】

いくつかの実施形態において、CAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列の特異性は、CAGリピート領域に対して2～5個の塩基ミスマッチで増加し、塩基ミスマッチはガイド配列の位置8～16に位置する。いくつかの実施形態において、CAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列の特異性は、CAGリピート領域に対して3～5個の塩基ミスマッチで増加し、塩基ミスマッチはガイド配列の位置8～16に位置する。

20

【0094】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対して1、2、3、4、または5個の塩基ミスマッチを有するCAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列は、予測される完全に一致するオフターゲット転写物を0個有する。

【0095】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対して1、2、3、4、または5個の塩基ミスマッチを有するCAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列は、CAGリピート領域に対して1、2、3、4、または5個の塩基ミスマッチを有し、塩基ミスマッチはガイド配列の位置8～16に位置し、予測されるオフターゲット転写物を0～1個有する。予測されるオフターゲット転写物は、位置1～21内で完全に17merマッチを有する。

30

【0096】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対して1、2、3、4、または5塩基のミスマッチを有するCAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列であって、ここで、塩基のミスマッチはガイド配列の位置8～16に位置し、1つのミスマッチを有する0～2の予測されたオフターゲット転写物である。

40

【0097】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対して1、2、3、4、または5塩基のミスマッチを有するCAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列であって、ここで、塩基のミスマッチはガイド配列の位置8～16に位置し、0～2の予測されたオフターゲット転写物は位置1～21内で完全な17merマッチを有する。

【0098】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対して1、2、3、4、または5塩基のミスマッチを有するCAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域

50

を標的とするガイド配列であって、ここで、塩基のミスマッチはガイド配列の位置8～16に位置し、1つのミスマッチを有する0～66の予測されたオフターゲット転写物である。

【 0 0 9 9 】

表 B3 : CAG リピートを標的とするオリゴヌクレオチドの予測されたオフターゲットプロファイル									
ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1~21 の位置内での完全な 17mer マッチの頻度	0 mm のオフターゲット伝子	1 mm のオフターゲット伝子	2 mm のオフターゲット伝子	3 mm のオフターゲット伝子	4 mm のオフターゲット伝子	
9:G>U_10:C>A	CAGCAGCAGCAUA AGCAGCAG	75	0	0	4	219	490	1233	
9:G>U_11:U>G	CUGCUGCUUCGGC UGCUGCUG	76	0	0	5	229	512	1300	
9:G>U_12:G>A	CAGCAGCAGUAGA AGCAGCAG	741	1	0	14	224	500	1316	
9:G>C_12:G>A	CUGCUGCUCCUAC UGCUGCUG	78	1	0	16	219	540	1353	
9:G>A_13:C>G	CUGCUGCUACUGG UGCUGCUG	79	1	0	15	217	517	1272	
9:G>U_13:C>A	CUGCUGCUUCUGA UGCUGCUG	40	0	0	3	221	523	1367	
9:G>A_14:U>G	CUGCUGCUACUGC GGCUGCUG	81	1	0	16	214	504	1197	
9:G>C_14:U>C	CUGCUGCUCCUGCC GCUGCUG	82	1	0	19	233	621	1585	
9:G>U_14:U>C	CUGCUGCUUCUGC CGCUGCUG	83	1	0	17	228	589	1447	
9:G>U_14:U>G	CUGCUGCUUCUGC GGCUGCUG	41	0	0	4	221	507	1301	
9:G>C_15:G>A	CUGCUGCUCCUGC UACUGCUG	85	0	0	18	211	557	1471	

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mm のオフターゲット遺伝子	1 mm のオフターゲット遺伝子	2 mm のオフターゲット遺伝子	3 mm のオフターゲット遺伝子	4 mm のオフターゲット遺伝子
9:G>C_16:C>A	CUGCUGCUCUCCUGC UGAUGCUG	86	1	0	5	210	525	1333
9:G>U_16:C>G	CUGCUGCUCUUCUGC UGGUGCUG	87	1	0	3	221	552	1531
9:G>U_10:C>A_12:G>U	CUGCUGCUCUUAUUC UGCUGCUG	132	0	0	0	11	280	875
9:G>C_10:C>A_13:C>A	CUGCUGCUCUCAUGA UGCUGCUG	133	0	0	0	10	266	928
9:G>C_10:C>G_13:C>A	CUGCUGCUCUCGUGA UGCUGCUG	134	0	0	0	11	256	832
9:G>C_10:C>G_13:C>G	CUGCUGCUCUCGUGG UGCUGCUG	135	0	0	0	11	274	869
9:G>U_10:C>A_13:C>G	CUGCUGCUCUUAUGG UGCUGCUG	136	0	0	0	8	295	792
9:G>U_10:C>G_13:C>A	CUGCUGCUCUUGUGA UGCUGCUG	137	0	0	0	13	286	970
9:G>U_10:C>G_13:C>G	CUGCUGCUCUUGUGG UGCUGCUG	138	0	0	0	14	314	929
9:G>A_10:C>G_14:U>G	CUGCUGCUCUAGUGC GGCUGCUG	139	0	0	1	20	273	752
9:G>C_10:C>G_14:U>A	CUGCUGCUCUCGUGC AGCUGCUG	140	0	0	0	13	317	967
9:G>C_10:C>G_14:U>G	CUGCUGCUCUCGUGC GGCUGCUG	141	0	0	0	15	260	809

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'→3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mmのオフターゲット遺伝子	1 mmのオフターゲット遺伝子	2 mmのオフターゲット遺伝子	3 mmのオフターゲット遺伝子	4 mmのオフターゲット遺伝子
9:G>U_10:C>A_14:U>C	CUGCUGCUUAUGC CGCUGCUG	142	0	0	0	20	280	807
9:G>U_10:C>A_14:U>G	CUGCUGCUUAUGC GGCUGCUG	143	0	0	0	8	265	712
9:G>C_10:C>A_15:G>U	CUGCUGCUCAUGC UUCUGCUG	144	0	0	0	14	283	961
9:G>U_10:C>A_15:G>A	CUGCUGCUUAUGC UACUGCUG	145	0	0	2	20	265	781
9:G>U_10:C>A_15:G>C	CUGCUGCUUAUGC UCCUGCUG	146	0	0	1	14	279	843
9:G>C_10:C>G_16:C>A	CUGCUGCUCGUGC UGAUGCUG	147	0	0	0	11	271	803
9:G>C_10:C>G_16:C>G	CUGCUGCUCGUGC UGGUGCUG	148	0	0	0	16	290	879
9:G>U_10:C>A_16:C>G	CUGCUGCUUAUGC UGGUGCUG	149	0	0	0	10	299	864
9:G>U_10:C>G_16:C>A	CUGCUGCUUUGUGC UGAUGCUG	150	0	0	0	13	295	884
9:G>A_10:C>A_11:U>A	CUGCUGCUAAAGC UGCUGCUG	325	1	0	0	32	303	996
9:G>A_10:C>A_11:U>C	CUGCUGCUAACGC UGCUGCUG	152	1	0	1	34	315	845
9:G>A_10:C>G_11:U>G	CUGCUGCUAGGGC UGCUGCUG	46	0	0	2	31	339	1005

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mm のオフ ターゲット シフト遺 伝子	1 mm のオフ ターゲット シフト遺 伝子	2 mm のオフ ターゲット シフト遺 伝子	3 mm のオフ ターゲット シフト遺 伝子	4 mm のオフ ターゲット シフト遺 伝子
9:G>C_10:C>A_11:U >C	CUGCUGCUCACGC UGCUGCUG	154	1	0	0	37	332	1043
9:G>C_10:C>G_11:U >C	CUGCUGCUCGCGC UGCUGCUG	155	1	0	1	39	319	983
9:G>U_10:C>A_11:U >C	CUGCUGCUCUACGC UGCUGCUG	156	0	0	1	21	310	883
9:G>U_10:C>A_11:U >G	CUGCUGCUCUAGGC UGCUGCUG	157	1	0	0	21	326	999
9:G>U_10:C>G_11:U >C	CUGCUGCUCUGCUG UGCUGCUG	45	0	0	3	32	325	1007
9:G>A_10:C>G_12:G >C_15:G>U	CUGCUGCUCAGUCC UUCUGCUG	178	0	0	0	0	62	582
9:G>C_10:C>A_12:G >U_15:G>A	CUGCUGCUCAUUC UACUGCUG	179	0	0	0	0	63	600
9:G>C_10:C>G_12:G >A_16:C>A	CUGCUGCUCGUAC UGAUGCUG	180	0	0	0	0	47	456
9:G>C_10:C>G_12:G >U_16:C>G	CUGCUGCUCGUUC UGGUGCUG	181	0	0	0	0	51	519
9:G>A_10:C>G_13:C >A_15:G>C	CUGCUGCUCAGUGA UCCUGCUG	182	0	0	0	0	47	544
9:G>A_10:C>G_13:C >G_15:G>U	CUGCUGCUCAGUGG UUCUGCUG	183	0	0	0	0	58	547
9:G>A_10:C>A_14:U >G_15:G>U	CUGCUGCUCAAUGC GUCUGCUG	184	0	0	0	0	39	429

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mm のオフ ターゲット ヌクレオ チド誤 り	1 mm のオフ ターゲット ヌクレオ チド誤 り	2 mm のオフ ターゲット ヌクレオ チド誤 り	3 mm のオフ ターゲット ヌクレオ チド誤 り	4 mm のオフ ターゲット ヌクレオ チド誤 り
9:G>C_10:C>A_14:U >G_15:G>U	CUGCUGCUCAUGC GUCUGCUG	185	0	0	0	0	32	506
9:G>C_10:C>G_14:U >G_15:G>C	CUGCUGCUCGUGC GCCUGCUG	186	0	0	0	0	50	504
9:G>C_10:C>G_14:U >G_15:G>U	CUGCUGCUCGUGC GUCUGCUG	187	0	0	0	0	28	464
9:G>U_10:C>A_14:U >G_15:G>U	CUGCUGCUUAUGC GUCUGCUG	188	0	0	0	0	27	464
9:G>A_10:C>A_14:U >G_16:C>U	CUGCUGCUAAUGC GGUUGCUG	189	0	0	0	0	79	446
9:G>C_10:C>G_14:U >A_16:C>A	CUGCUGCUCGUGC AGAUGCUG	190	0	0	0	0	50	662
9:G>C_10:C>G_14:U >G_16:C>A	CUGCUGCUCGUGC GGAUGCUG	191	0	0	0	0	27	408
9:G>A_10:C>G_15:G >U_16:C>A	CUGCUGCUAGUGC UUAUGCUG	192	0	0	0	0	40	447
9:G>C_10:C>G_15:G >C_16:C>A	CUGCUGCUCGUGC UCAUGCUG	193	0	0	0	0	47	516
9:G>C_10:C>G_15:G >U_16:C>A	CUGCUGCUCGUGC UUAUGCUG	194	0	0	0	0	27	429
9:G>A_10:C>A_11:U >G_15:G>C	CUGCUGCUAAGGC UCCUGCUG	195	0	0	1	0	77	616
9:G>U_10:C>A_11:U >G_15:G>C	CUGCUGCUUAGGC UCCUGCUG	196	0	0	1	0	68	664

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマツチの頻度	0 mm のオフターゲット遺伝子	1 mm のオフターゲット遺伝子	2 mm のオフターゲット遺伝子	3 mm のオフターゲット遺伝子	4 mm のオフターゲット遺伝子
9:G>A_10:C>A_11:U >C_16:C>U	CUGCUGCUAACGC UGUUGCUG	197	0	0	0	1	101	511
9:G>A_10:C>G_11:U >C_16:C>U	CUGCUGCUAGCGC UGUUGCUG	198	0	0	0	1	109	501
9:G>U_10:C>A_11:U >G_16:C>U	CUGCUGCUUAGGC UGUUGCUG	199	0	0	0	1	103	642
9:G>A_10:C>A_11:U >A_15:G>A_16:C>A	CUGCUGCUAAAGC UAAUGCUG	210	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9:G>A_10:C>A_11:U >A_15:G>A_16:C>U	CUGCUGCUAAAGC UAUUGCUG	211	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9:G>A_10:C>A_11:U >A_15:G>U_16:C>A	CUGCUGCUAAAGC UUAUGCUG	212	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9:G>A_10:C>A_11:U >A_15:G>U_16:C>U	CUGCUGCUAAAGC UUUUGCUG	213	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10:U>C_15:C>A	UGCUGCUGCCGCU GAUGCUGC	88	0	0	11	237	520	1235
10:U>G_11:G>U	UGCUGCUGCGUCU GCUGCUGC	89	0	0	2	239	509	1339
10:U>G_12:C>A	UGCUGCUGCGGAU GCUGCUGC	90	0	0	4	232	502	1188
10:U>G_15:C>A	UGCUGCUGCGGCU GAUGCUGC	91	0	0	1	240	475	1131
11:G>A_13:U>G	UGCUGCUGCUACG GCUGCUGC	92	0	0	14	226	519	1150

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mmのオフターゲット伝子	1 mmのオフターゲット伝子	2 mmのオフターゲット伝子	3 mmのオフターゲット伝子	4 mmのオフターゲット伝子
11:G>A_15:C>A	UGCUGCUGCACU GAUGCUGC	93	0	0	11	229	485	1132
11:G>C_12:C>G	UGCUGCUGCUGU GCUGCUGC	94	0	0	6	224	487	1171
11:G>C_14:G>A	UGCUGCUGCUCU ACUGCUGC	95	0	0	22	218	519	1349
11:G>U_12:C>A	UGCUGCUGCUGU GCUGCUGC	96	0	0	4	215	474	1122
11:G>U_13:U>G	UGCUGCUGCUCG GCUGCUGC	97	0	0	4	223	501	1269
11:G>U_14:G>A	UGCUGCUGCUCU ACUGCUGC	98	0	0	20	215	505	1346
11:G>U_16:U>G	UGCUGCUGCUCU GCGGCUGC	99	0	0	2	211	519	1293
8:G>C_14:G>A	UGCUGCUGCUCU ACUGCUGC	100	0	0	19	216	545	1387
8:G>C_9:C>G	UGCUGCUGCUCU GCUGCUGC	101	0	0	3	224	485	1241
8:G>U_10:U>G	UGCUGCUCGGCU GCUGCUGC	102	0	0	4	228	500	1231
8:G>U_12:C>A	UGCUGCUCUGAU GCUGCUGC	103	0	0	5	218	498	1204
8:G>U_13:U>C	UGCUGCUCUGCC GCUGCUGC	104	0	0	20	232	557	1405

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mmのオフターゲット遺伝子	1 mmのオフターゲット遺伝子	2 mmのオフターゲット遺伝子	3 mmのオフターゲット遺伝子	4 mmのオフターゲット遺伝子
8:G>U_13:U>G	UGCUGCUCUGCG GCUGCUC	105	0	0	7	218	508	1244
8:G>U_9:C>A	UGCUGCUCUAGCU GCUGCUC	106	0	0	9	215	473	1216
9:C>A_11:G>U	UGCUGCUGAUUCU GCUGCUC	107	0	0	7	228	476	1256
9:C>A_16:U>C	UGCUGCUGAUGCU GCCGCUC	108	0	0	20	241	573	1318
9:C>A_10:U>C	UGCUGCUGACGCU GCUGCUC	109	3	0	14	241	543	1441
9:C>A_10:U>A_14:G>U	UGCUGCUGAAGCU UCUGCUC	159	0	0	0	25	301	1043
9:C>A_10:U>C_12:C>A	UGCUGCUGACGAU GCUGCUC	160	0	0	0	16	287	812
9:C>A_10:U>C_12:C>G	UGCUGCUGACGGU GCUGCUC	161	0	0	0	25	291	854
9:C>A_10:U>C_13:U>G	UGCUGCUGACGCG GCUGCUC	162	0	0	0	27	301	854
9:C>A_10:U>C_14:G>U	UGCUGCUGACGCU UCUGCUC	163	0	0	0	20	280	845
9:C>G_10:U>C_14:G>C	UGCUGCUGGCGCU CCUGCUC	164	0	0	0	24	322	972
9:C>A_10:U>C_14:G>U_15:C>U	UGCUGCUGACGCU UUUGCUC	200	0	0	0	0	102	504

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'→3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mm のオフターゲット遺伝子	1 mm のオフターゲット遺伝子	2 mm のオフターゲット遺伝子	3 mm のオフターゲット遺伝子	4 mm のオフターゲット遺伝子
9:C>A_10:U>C_14:G>U_16:U>G	UGCUGCUGACGCU UCGGCUGC	201	0	0	0	0	46	476
9:C>G_10:U>C_14:G>U_15:C>U	UGCUGCUGGGCGCU UUUGCUGC	202	0	0	0	0	98	519
9:C>U_10:U>C_14:G>U_16:U>G	UGCUGCUGUCGCU UCGGCUGC	203	0	0	0	0	97	524
9:C>A_10:U>C_12:C>A_15:C>A_16:U>A	UGCUGCUGACGAU GAAGCUGC	214	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9:C>A_10:U>C_12:C>A_15:C>U_16:U>A	UGCUGCUGACGAU GUAGCUGC	215	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10:G>A_14:C>A	GCUGCUGCUACUG AUGCUGCU	110	0	0	13	230	484	1137
10:G>A_14:C>G	GCUGCUGCUACUG GUGCUGCU	111	0	0	15	228	505	1190
10:G>C_11:C>G	GCUGCUGCUUCGUG CUGCUGCU	112	0	0	2	237	515	1207
10:G>C_13:G>A	GCUGCUGCUCCUA CUGCUGCU	113	0	0	17	236	543	1307
10:G>U_11:C>A	GCUGCUGCUUAUG CUGCUGCU	114	0	0	5	226	483	1239
10:G>U_12:U>G	GCUGCUGCUUCGG CUGCUGCU	115	0	0	7	236	505	1267
10:G>U_14:C>A	GCUGCUGCUUCUG AUGCUGCU	116	0	0	3	227	474	1228

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1～21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mmのオフターゲットト遺伝子	1 mmのオフターゲットト遺伝子	2 mmのオフターゲットト遺伝子	3 mmのオフターゲットト遺伝子	4 mmのオフターゲットト遺伝子
10:G>U_15:U>G	GCUGCUGCUUCUG CGGCUGCU	117	0	0	4	225	503	1250
11:C>A_13:G>A	GCUGCUGCUGAUA CUGCUGCU	118	0	0	17	236	541	1362
11:C>A_13:G>C	GCUGCUGCUGAUC CUGCUGCU	119	0	0	3	234	495	1358
11:C>A_13:G>U	GCUGCUGCUGAUU CUGCUGCU	120	0	0	4	232	513	1308
11:C>A_15:U>A	GCUGCUGCUGAUG CAGCUGCU	121	0	0	5	235	542	1418
11:C>A_15:U>C	GCUGCUGCUGAUG CCGCUGCU	122	0	0	13	247	540	1356
11:C>U_14:C>A	GCUGCUGCUGUUG AUGCUGCU	123	0	0	44	253	528	1283
8:C>A_11:C>G	GCUGCUGAUGGUG CUGCUGCU	124	0	0	6	227	507	1219
8:C>A_12:U>G	GCUGCUGAUGCGG CUGCUGCU	125	0	0	8	241	478	1215
8:C>A_15:U>C	GCUGCUGAUGCUG CCGCUGCU	126	0	0	16	255	537	1260
8:C>A_16:G>C	GCUGCUGAUGCUG CUGCUGCU	127	0	0	6	238	500	1260
8:C>G_16:G>U	GCUGCUGGUGCUG CUUCUGCU	128	0	0	8	232	507	1335

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1~21の位置内での完全な17merマッチの頻度	0 mmのオフターゲット伝子	1 mmのオフターゲット伝子	2 mmのオフターゲット伝子	3 mmのオフターゲット伝子	4 mmのオフターゲット伝子
9:U>C_14:C>A	GCUGCUGCCGCUG AUGCUGCU	<u>129</u>	0	0	11	246	504	1182
9:U>G_11:C>A	GCUGCUGCGGAUG CUGCUGCU	<u>130</u>	0	0	6	235	517	1267
9:U>G_14:C>A	GCUGCUGCGGCUG AUGCUGCU	131	0	0	4	236	488	1132
9:U>A_10:G>C_14:C >G	GCUGCUGCACCCUG GUGCUGCU	165	0	0	0	15	317	976
9:U>G_10:G>A_14:C >A	GCUGCUGCGACUG AUGCUGCU	166	0	0	0	20	306	801
9:U>G_10:G>A_16:G >U	GCUGCUGCGACUG CUUCUGCU	167	0	0	0	20	308	844
9:U>G_10:G>C_11:C >A	GCUGCUGCGCAUG CUGCUGCU	168	0	0	0	13	298	869
9:U>G_10:G>C_11:C >G	GCUGCUGCGCGUG CUGCUGCU	169	0	0	0	16	307	815
9:U>G_10:G>C_14:C >A	GCUGCUGCGCCUG AUGCUGCU	170	0	0	0	11	293	755
9:U>G_10:G>C_14:C >G	GCUGCUGCGCCUG GUGCUGCU	171	0	0	0	17	310	909
9:U>G_10:G>U_11:C >A	GCUGCUGCGUAUG CUGCUGCU	172	0	0	0	13	282	784
9:U>G_10:G>U_13:G >U	GCUGCUGCGUCUU CUGCUGCU	173	0	0	1	13	293	864

10

20

30

40

50

ミスマッチの位置およびタイプ	配列(5'-3')	配列番号:	1~21の位置内での完全な17merマットの頻度	0 mm のオフターゲット遺伝子	1 mm のオフターゲット遺伝子	2 mm のオフターゲット遺伝子	3 mm のオフターゲット遺伝子	4 mm のオフターゲット遺伝子
9:U>G_10:G>U_14:C>A	GCUGCUGCGUCUGAUGCUGCU	174	0	0	0	8	276	743
9:U>G_10:G>U_14:C>G	GCUGCUGCGUCUGGUGCUGCU	175	0	0	12	12	288	825
9:U>G_10:G>U_15:U>A	GCUGCUGCGUCUGCAGCUGCU	176	0	0	19	19	326	1045
9:U>A_10:G>U_11:C>A	GCUGCUGCAUAUGCUGCUGCU	43	0	0	23	302	884	
9:U>A_10:G>U_11:C>A_13:G>A	GCUGCUGCAUAUACUGCUGCU	204	0	0	0	69	576	
9:U>G_10:G>C_11:C>A_16:G>U	GCUGCUGCGCAUGCUCUGCU	205	0	0	0	37	507	
9:U>G_10:G>C_11:C>G_14:C>A	GCUGCUGCGCGUGAUGCUGCU	206	0	0	0	33	437	
9:U>G_10:G>C_11:C>G_16:G>U	GCUGCUGCGCGUGCUUCUGCU	207	0	0	0	33	490	
9:U>G_10:G>U_11:C>A_15:U>C	GCUGCUGCGUAUGCCGCUGCU	208	0	0	0	45	458	
9:U>G_10:G>U_11:C>A_16:G>U	GCUGCUGCGUAUGCUUCUGCU	209	0	0	0	30	482	
9:U>A_10:G>U_11:C>A_15:U>A_16:G>A	GCUGCUGCAUAUGCAACUGCU	216	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9:U>A_10:G>U_11:C>A_15:U>A_16:G>U	GCUGCUGCAUAUGCAUCUGCU	217	NA	NA	NA	NA	NA	NA

mm=ミスマッチ

10

20

30

40

【0100】

表B4は、表B3からのCAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列のオフターゲット活性に関する例示的なフィルタリング基準を示す。いくつかの実施形態において、CAGリピート含有mRNAまたはpre-mRNAの、CAGリピート領域を標的とするガイド配列の特異性は、表B4に設定された閾値のいずれか1つ、またはそれらの組み合わせに従う。

【0101】

50

表 B4 : オフターゲット活性に関するガイド配列のフィルタリング方法

#ミスマッチ	CAG レジストリ	UGC レジストリ	GCU レジストリ
1	完全一致が 0 の配列なし	ゼロ完全一致(mm0)の配列が 1、だが位置 1～21 内の 17 mer 完全一致が 27 のため除外	完全一致が 0 の配列なし
2	完全一致が 0	完全一致が 0	完全一致が 0
	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0～1	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0～1	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0～1
	位置 9 のミスマッチは静的に維持され、2 番目の突然変異は位置 10 から 16 までの任意の場所に導入される	位置 9 のミスマッチは静的に維持され、2 番目の突然変異は位置 10 から 16 までの任意の場所に導入される	位置 9 のミスマッチは静的に維持され、2 番目の突然変異は位置 10 から 16 までの任意の場所に導入される
	脳内および Q4 内で発現している場合にのみチェックされる遺伝子	脳内および Q4 内で発現している場合にのみチェックされる遺伝子	脳内および Q4 内で発現している場合にのみチェックされる遺伝子
3	完全一致が 0	完全一致が 0	完全一致が 0
	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0～1	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0～1	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0～1
	1 つのミスマッチで最大 2 つのオフターゲット	1 つのミスマッチで最大 2 つのオフターゲット	1 つのミスマッチで最大 2 つのオフターゲット
	2 つのミスマッチでオフターゲットが 20 未満	2 つのミスマッチでオフターゲットが 40 未満(20 フィルターを通過する配列がないことによる緩和フィルター)	2 つのミスマッチでオフターゲットが 20 未満

10

20

30

40

50

	位置 9 および 10 のミスマッチは静的に維持され、位置 11 から 16 までの任意の場所に 3 番目の突然変異が導入される	位置 9 および 10 のミスマッチは静的に維持され、位置 11 から 16 までの任意の場所に 3 番目の突然変異が導入される	位置 9 および 10 のミスマッチは静的に維持され、位置 11 から 16 までの任意の場所に 3 番目の突然変異が導入される	
	9 番、10 番、11 番の位置に変異を持つ配列を強制するために、位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットは 1 に緩和され、ミスマッチが 2 つあるオフターゲットは 40 に緩和される	9 番、10 番、11 番の位置に変異を持つ配列を強制するために、位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットは 1 に緩和され、ミスマッチが 2 つあるオフターゲットは 40 に緩和される	9 番、10 番、11 番の位置に変異を持つ配列を強制するために、位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットは 1 に緩和され、ミスマッチが 2 つあるオフターゲットは 40 に緩和される	10
	脳内および Q4 内で発現している場合にのみチェックされる遺伝子	脳内および Q4 内で発現している場合にのみチェックされる遺伝子	脳内および Q4 内で発現している場合にのみチェックされる遺伝子	20
4	完全一致が 0	完全一致が 0	完全一致が 0	
	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0	位置 1～21 内で 17 mer が完全に一致するオフターゲットが 0	
	ミスマッチが 1 つのオフターゲットが 0	ミスマッチが 1 つのオフターゲットが 0	ミスマッチが 1 つのオフターゲットが 0	30
	ミスマッチが 2 つのオフターゲットが 0～1	ミスマッチが 2 つのオフターゲットが 0～1	ミスマッチが 2 つのオフターゲットが 0～1	
	位置 9～10 のミスマッチは静的に維持され、3 番目の突然変異は 11～16 の間の任意の場所に追加され、4 番目の突然変	位置 9～10 のミスマッチは静的に維持され、3 番目の突然変異は 11～16 の間の任意の場所に追加され、4 番目の突然変	位置 9～10 のミスマッチは静的に維持され、3 番目の突然変異は 11～16 の間の任意の場所に追加され、4 番目の突然変異は 15 また	40

10

20

30

40

50

	異は 15 または 16 の位置に追加される	異は 15 または 16 の位置に追加される	は 16 の位置に追加される
	9、10、11t を静的に維持し、15 または 16 の位置に 4 番目の突然変異を導入するために、2 つのミスマッチのオフターゲットは 0～1 に緩和される	9、10、11 の突然変異は静的に維持できない	9、10、11t を静的に維持し、15 または 16 の位置に 4 番目の突然変異を導入するために、2 つのミスマッチのオフターゲットは 0～1 に緩和される
	発現が脳内および Q4 内にある場合のみチェックされる遺伝子	発現が脳内および Q4 内にある場合のみチェックされる遺伝子	発現が脳内および Q4 内にある場合のみチェックされる遺伝子

10

【0102】

いくつかの実施形態において、リンカーは人工二本鎖 RNA 中に存在し、人工二本鎖 RNA のステムおよびループを結合する。いくつかの実施形態において、5' リンカーは人工二本鎖 RNA の 5' ステムおよびループを結合する。いくつかの実施形態において、3' リンカーは人工二本鎖 RNA の 3' ステムおよびループを結合する。いくつかの実施形態において、5' リンカーは人工二本鎖 RNA の 5' ステムおよびループを結合し、3' リンカーは人工二本鎖 RNA の 3' ステムおよびループを結合する。いくつかの実施形態において、5' リンカーおよび/または 3' リンカーは、約 1～6 個のヌクレオチド、1～5 個のヌクレオチド、1～4 個のヌクレオチド、1～3 個のヌクレオチド、1～2 個のヌクレオチド、2～6 個のヌクレオチド、3～6 個のヌクレオチド、4～6 個のヌクレオチド、5～6 個のヌクレオチド、2～5 個のヌクレオチド、または 2～4 個のヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態において、5' リンカーおよび/または 3' リンカーは、約 1 ヌクレオチド、2 ヌクレオチド、3 ヌクレオチド、4 ヌクレオチド、5 ヌクレオチド、または 6 ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態において、5' リンカーは、3' リンカーと同じ数のヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態において、5' リンカーは、3' リンカーに対して 100% 相補的である。いくつかの実施形態において、5' リンカーは、ヌクレオチド配列 CAGC を含むかまたはそれからなり、および/または 3' リンカーは、GCUG のヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。いくつかの場合において、本開示の sbRNA は、リンカーを含まない。

20

30

【0103】

いくつかの実施形態において、5' リンカーおよび 3' リンカーはそれぞれ少なくとも 4 つのヌクレオチドを含み、任意に、5' リンカーヌクレオチドの少なくとも 75% が 3' リンカーヌクレオチドに対して相補的である。

40

【0104】

5' および 3' リンカーの例は、表 C に提供される。いくつかの実施形態において、二本鎖 RNA は、配列番号 15 の 5' リンカーおよび配列番号 23 の 3' リンカーを有する。

【0105】

50

表 C：5' リンカーおよび3' リンカー

5' リンカー配列
T
CAGC
CTGC
CUGC
3' リンカー配列
GCA
GNN
GTG(DNA)
GUG(RNA)
GCTG(DNA)
GCUG(RNA)
GCT(DNA)
GCU(RNA)
GCA(DNA)

10

20

【 0 1 0 6 】

ある態様において、末端ループは、人工二本鎖RNAの5' リンカー及び3' リンカーを分離する。末端ループ配列は、任意の長さであってもよく、並びに約4ヌクレオチド～約1,000ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約900ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約800ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約700ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約600ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約90ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約80ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約70ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約40ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約30ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約4ヌクレオチド～約10ヌクレオチドを有してもよい。ある態様において、末端ループ配列は、約4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチドまたは15ヌクレオチドを有する。ある態様において、末端ループは回文配列を含む。ある態様において、末端ループは非対称配列を含む。ある態様において、末端ループは、ACCUGCのヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。ループ配列の例は、表Dに提供される。

30

40

【 0 1 0 7 】

50

表 D：末端ループ配列

説明	配列	配列番号:
回文ループ(DNA)	CTCGAG	NA
回文ループ(RNA)	CUCGAG	NA
非対称ループ(DNA)	ACCTGC	NA
非対称ループ(RNA)	ACCUGC	NA
miR-30 ループ(DNA)	Gtgaagccacagatg	配列番号:31
miR-30 ループ(RNA)	Gugaagccacagaug	配列番号:32
miR-33 ループ(DNA)	gttctggcaatacct	配列番号:33
miR-33 ループ(RNA)	guucuggcaauaccu	配列番号:34

10

【 0 1 0 8 】

5'リーダー配列、3'トレーラー配列、および末端ループ配列のさらなる実施形態は、表Eに提供される。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAは、5'～3':5'リーダー配列、パッセンジャー配列またはガイド配列、末端ループ、ガイド配列またはパッセンジャー配列、および3'トレーラー配列を含む人工miRNAであり、ここで、ガイド配列は、CAGリピート含有RNAのCAGリピート領域を標的とし、CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含み、ここで、塩基のミスマッチは、ガイド配列の位置8～16に位置する。いくつかの実施形態において、人工miRNAの5'リーダー配列、3'トレーラー配列、および末端ループは、表Eから選択される。いくつかの実施形態において、ガイド配列は、表B1～B2から選択される。

20

【 0 1 0 9 】

30

40

50

表 E：例示的な 5' リーダー、3' トレーラー、および末端ループ配列

説明	5'リーダー配列	3'トレーラー配列	ループ配列
hsa-mir-26a-1	GUGGCCUCG	GGGACGC	GUGCAGGUCCC AAUGGG [配列番号:274]
hsa-mir-26a-2	GGCUGUGGCUGG A [配列番号:227]	UGGAGGCAGCU [配列番号:251]	GUUCCAUUCUG UGAGG [配列番号:275]
hsa-mir-33a	CUGUG	AG	UGUUCUGGUGG UACCCAUG [配列番号:276]
hsa-mir-451a	CUUGGGAAUGGC AAGG [配列番号:229]	UCUUGCUAUACCC AGA [配列番号:253]	N/A
hsa-mir-22	GGCUGAGCCGCAG U [配列番号:230]	UGCCCUUCUGCC [配列番号:254]	UGUCCUGACCC AGCUA [配列番号:277]
hsa-mir-375	CCCC	GGC	GGACCUGAGCG U [配列番号:278]
hsa-mir-21	UGUCGGG	CUGACA	CUGUUGAAUCU CAUGG [配列番号:279]
hsa-mir-99a	CCCAUUGGCAUA [配列番号:233]	UGUCAGUGUG [配列番号:257]	GUGAAGUGGAC CGCA [配列番号:280]

10

20

30

40

50

説明	5'リーダー配列	3'トレーラー配列	ループ配列
hsa-mir-199a-1	GCCAA	GGC	AGGAGGCUCUC AAUGUGU [配列番号:281]
hsa-mir-199a-2	AGGAAGCUUCUG GAGAUCCUGCUCC GUCGC [配列番号:235]	GACUGGGCAAGGG AGAGCA [配列番号:259]	AGGACAAUGCC GUUGU [配列番号:282]
hsa-mir-30a	GCGAC	UGC	CUGUGAAGCCA CAGAUGGG [配列番号:283]
mmu-mir-26a-1	AAGGCCGUGGCCU CG [配列番号:237]	GGGACGCGGGCCU G [配列番号:261]	GUGCAGGUCCC AAGGGG [配列番号:284]
mmu-mir-26a-2	GGCUGCGGCUGGA [配列番号:238]	UGGAGGCAGCG [配列番号:262]	GUGUCCGUCCA UGAGG [配列番号:285]
mmu-mir-33	CUGUG	GG	UGUUCUGGCAA UACCUGUG [配列番号:286]
mmu-mir-451a	CUUGGGAAUGGC GAGG [配列番号:240]	UCUUGCUGCUCCC ACA [配列番号:264]	N/A
mmu-mir-22	ACCUGGCUGAGCC GCAGU [配列番号:241]	UGCCUCUGCCCC UGGC [配列番号:265]	UGUCCUGACCC AGCUA [配列番 号:277]
mmu-mir-375	CCCC	GGC	CGGACCUGAGC GU [配列番号:287]
mmu-mir-21a	UGUACCACCUUGU CGGA [配列番号:243]	UGACAUUUUGGUA UC [配列番号:267]	CUGUUGAAUCU CAUGG [配列番号:279]
mmu-mir-99a	CAUA	GUG	GUGAAGUGGAC CGC [配列番号:289]
mmu-mir-99b	GGCACC	UGUC	GGGCCUUCGCC GCACA [配列番号:290]
mmu-mir-199a-1	GCCAU	GGC	AGGAGGCUGGG ACAUGU [配列番号:291]

10

20

30

40

50

説明	5'リーダー配列	3'トレーラー配列	ループ配列
mmu-mir-199a-2	UGGAAGCUUCAG GAGAUCCUGCUCC GUCGC [配列番号:247]	GACUGGGCAAGGG CCAG [配列番号:271]	AGGACAAUGCC GUUGU [配列番号:292]
mmu-mir-30a	GCGAC	UGC	CUGUGAAGCCA CAAAUGGG [配列番号:282]
eSIBR(miR155-based)	CTGGAGGCTTGCT TTGGGCTGTATUG CUG [配列番号:249]	CAGGAAGGACACA AGGCCCTTTATCAG CACTCACATGGAA CAAATGGCCACCG TGGGAGGATGACA A [配列番号:273]	UUUUGGCCUCU GACUGA [配列番号:294]
hsa-min-pri-miR101-2	ACUGUCCUUUU [配列番号:885]	GAAUGGUGGU [配 列番号:886]	UGUAUAUCUGA AAGG [配列番 号:887]
hsa-min-pri-miR203a	GUGUUGGGGACU CGCGCGCUGGGUC C [配列番号:888]	ACCCGGCGGGCGC GGCGACAGCGA [配 列番号:889]	CUGUAGCGCAA UU [配列番号:890]
hsa-min-pri-miR335	UGUUUUGAGCGG GGG [配列番号:891]	UCCUCUCAUUUGC UAUAUUCA [配列番 号:892]	UUGUCAUAAAC CG [配列番号:893]
hsa-min-pri-miR324	CUGACUAUGCCUC CC [配列番号:894]	GGGUUGUAGUC [配 列番号:895]	UAAAGCUGGAG A [配列番号:896]
hsa-min-pri-miR135a-1	AGGCCUCGCUGUU CUC [配列番号:897]	CACGGCGGGGACA [配列番号:898]	UUCUACUGCUC ACUCA [配列番 号:899]

10

20

30

40

50

【0110】

いくつかの実施形態において、表Eの5'リーダーは、改良されたプロセッシングのために、対応する5'リーダー配列の5'末端の4つのヌクレオチドに対して非相補的である4つのヌクレオチドを用いて5'末端で伸長され、および/または表Eの対応する3'トレーラーは、3'末端で伸長される。いくつかの実施形態において、表Eの5'リーダーは、改良されたプロセッシングのために、4つのUを用いて5'末端で伸長され、および/または表Eの対応する3'トレーラーは、4つのUを用いて3'末端で伸長される。

【0111】

CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域を標的とするガイド配列を含む本開示の二本鎖RNAは、CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域の、レジスタとも呼ばれる異なるフレームを標的とするガイド配列を含む二本鎖RNAも含むことを理解されたい。したがって、CAGリピートを標的とすることは、AGCリピートを標的とするためのフレームの+1シフト、またはGCAリピートを標的とし、かつ同じCAGリピート含有mRNA転

写物を標的とするためのフレームの+2シフトを有する、ガイド配列を含む。

【0112】

いくつかの実施形態において、Droshaおよび/またはDicerによる切断は、二本鎖RNAから産生されるsiRNAの配列および機能を規定する。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAは、5'リーダー配列および/または3'トレーラー配列内でDroshaによって切断され、ガイド配列およびパッセンジャー配列を含むshRNAが産生される。いくつかの実施形態において、shRNAは、Dicerによって切断され、siRNAが産生される。siRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)上にロードされる。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAは、Droshaによって切断され、pre-miRNAを産生するpri-miRNA様分子である。pre-miRNA分子は、その後Dicerによって処理され、siRNA様二本鎖を生じることができるshRNA様分子である。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAの切断は、Dicer非依存性である(例えばAgo2によって切断される)。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAから産生されたshRNAは、5'突出部および/または3'突出部、例えば、1~6ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAから産生されたshRNAは、5'末端および/または3'末端において2~3ヌクレオチドオーバーハングを有する。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAから産生されたshRNAは、5'末端および/または3'末端においてジヌクレオチドオーバーハングを有する。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAから産生されたshRNAは、約38~300ヌクレオチド、38~250ヌクレオチド、38~200ヌクレオチド、38~150ヌクレオチド、38~100ヌクレオチド、38~75ヌクレオチドまたは38~50ヌクレオチドを有する。

10

20

【0113】

いくつかの実施形態において、哺乳動物細胞中の二本鎖RNAから産生されたまたは加工されたsiRNAは、ガイド配列の位置8~16内のそれらの予測された位置において、CAGリピート領域に対して-1~5塩基のミスマッチを含む。ガイド配列の位置8~16内のそれらの予測された位置におけるCAGリピート領域に対して1~5塩基のミスマッチの存在は、ガイド鎖の正しい5'プロセッシングを反映し得る。いくつかの実施形態において、哺乳動物細胞中の二本鎖RNAから産生されたまたは加工された、ガイド配列の位置8~16内のそれらの予測された位置においてCAGリピート領域に対して1~5塩基のミスマッチを有するsiRNAは、同じ二本鎖RNAから産生されたまたは加工された他のsiRNAと比較して、哺乳動物細胞(インビトロまたはインビボ)において少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%以上の存在量である。

30

【0114】

ガイド鎖は、RISCを配列特異的に同種の標的mRNAへと導く。いくつかの実施形態において、ガイド鎖は、標的mRNA転写物の切断を誘導する。いくつかの実施形態において、ガイド鎖は、mRNAの崩壊を通じて翻訳抑制および/または後方抑制を誘導する。

【0115】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域にハイブリダイズする第1の鎖、およびb)第1の鎖にハイブリダイズする第2の鎖を含み、ここで、第1の鎖は、i)標的CAGリピート領域に対する第1のミスマッチを含む；およびii)標的CAGリピート領域に対する少なくとも第2のミスマッチを含み、ここで、1)第1のミスマッチが配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745))、配列番号866(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866))、または配列番号867(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にある場合、第2のミスマッチは、第1のミスマッチの1から8塩基3'側である；2)第1のミスマッチが配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、または配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745))、第2のミスマッチは第1の番号付けに基づいて位置9にある場合、ミスマッチの1

40

50

から7塩基3'側である;3)第1のミスマッチが配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、または(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))の番号付けに基づいて位置10にある場合、第2のミスマッチは、第1のミスマッチの1から6塩基3'側である。および4)第1のミスマッチが配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745))の番号付けに基づいて位置11にある場合、第2のミスマッチは、第1のミスマッチの1から5塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は標的CAGリピート領域との2個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第一の鎖は標的CAGリピート領域との3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第一の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖と100%相補的である。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との1~10個のミスマッチ(例えば、1~4、3~5、5~7、または5~10個のミスマッチ)を含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との1~4個のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との1個、2個、3個、または4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との1個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との2個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。場合によっては、二本鎖RNAは18ヌクレオチドから25ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、ガイド配列は、配列番号298~375(表6参照;図22)のいずれかを含み、21ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、各ミスマッチは、ヌクレオチド(例えば、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)中に存在するヌクレオチド、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)中に存在するヌクレオチド、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)中に存在するヌクレオチド)を異なるヌクレオチドで置換することによって生成される。場合によっては、各ミスマッチは、以下から独立して選択される置換によって生成される:a)GのA、U、またはCへの置換;b)UのA、G、またはCへの置換;およびc)CのA、U、またはGへの置換。

【0116】

位置8における第1のミスマッチ;2つのミスマッチ

【0117】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域とハイブリダイズする第一の鎖を含む;およびb)第一の鎖にハイブリダイズする第二の鎖であって、第一の鎖は以下を含む:i)標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、第一のミスマッチは、配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、または配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745));およびii)の番号に基づく位置8にあり、標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであって、第二のミスマッチは、第一のミスマッチの1から8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列:CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の少なくとも第1および第2の置換を含む改変体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の番号付けに基づいて8位にあり、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第1のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列:GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の少なくとも第1および第2の置換を含む改変体であり、ここで、第1の置換は第

1のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の番号付けに基づいて8位にあり、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第1のミスマッチの1～8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第1および第2の置換を含む改変体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて8位にあり、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第1のミスマッチの1～8塩基3'側である。場合によっては、最初の鎖は標的CAGリピート領域との2つ以下のミスマッチを含む。場合によっては、最初の鎖は標的CAGリピート領域との3つ以下のミスマッチを含む。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して100%相補的である。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1～10個のミスマッチ(例えば、1～4、3～5、5～7、または5～10個のミスマッチ)を含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1～4個のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1個、2個、3個、または4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して2個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。ある場合には、二本鎖RNAは18ヌクレオチドから25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、各ミスマッチは、以下から独立して選択される置換によって生成される:a)GのA、U、またはCへの置換;b)UのA、G、またはCへの置換;およびc)CのA、U、またはGへの置換ある場合には、第一の鎖は配列番号317～324から選択されるヌクレオチド配列を含む。ある場合には、第一の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCAACUGCUGCUGCUGC(配列番号317;表6の「CUG_NA_B」のRNAガイド鎖配列)を含む。ある場合には、第一の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCAGCAGCUGCUGCUGC(配列番号318;表6の「CUG_NA_C」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCAGCAGCUGCUGCUGC(配列番号319;表6の「CUG_NA_D」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCAGCUACUGCUGCUGC(配列番号320;表6の「CUG_NA_E」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCAGCUGAUGCUGCUGC(配列番号321;表6の「CUG_NA_F」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCAGCUGCAGCUGCUGCUGC(配列番号322;表6の「CUG_NA_G」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCAGCUGCUCUGCUGCUGC(配列番号323;表6の「CUG_NA_H」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCAGCUGCUGAUGCUGCUGC(配列番号324;表6の「CUG_NA_I」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、配列番号804～819(表8に示すように;図24)から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0118】

位置8における第1のミスマッチ;3つのミスマッチ

【0119】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域とハイブリダイズする第1の鎖を含み、ここで、第1の鎖は、標的CAGリピート領域に対する第1のミスマッチを含み、ここで、第1のミスマッチは、配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号866(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866))、または配列番号867(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867))を含む。

号867))の番号に基づいて位置8にある;およびb)第1の鎖とハイブリダイズする第2の鎖であって、ここで、第1の鎖は、標的CAGリピート領域に対する第2のミスマッチおよび第3のミスマッチを含み、ここで、第2および第3のミスマッチは、第1のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の少なくとも第1、第2、および第3の置換を含む変異体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の番号付けに基づいて8位にあり、ここで、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、ここで、第2の置換および第3の置換は第1のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号866)の少なくとも第1の置換、第2の置換、および第3の置換を含む変異体であり、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号866)の番号付けに基づいて8位にあり、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第2の置換および第3の置換は第1のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第1の置換、第2の置換、および第3の置換を含む変異体であり、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて8位にあり、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第2の置換および第3の置換は第1のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は標的CAGリピート領域との3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第一の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖と100%相補的である。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との1~10個のミスマッチ(例えば、1~4、3~5、5~7、または5~10個のミスマッチ)を含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との1~4個のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との1個、2個、3個、または4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との1個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖との2個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。場合によっては、二本鎖RNAは18ヌクレオチドから25ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、各ミスマッチは、以下から独立して選択される置換によって生成される。a)GのA、U、またはCへの置換;b)UのA、G、またはCへの置換;およびc)CのA、U、またはGへの置換。

【0120】

位置8における第1のミスマッチ;4つのミスマッチ

【0121】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域にハイブリダイズする第一の鎖を含み、第一の鎖は標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、第一のミスマッチは配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743))、配列番号867(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号867))、または配列番号866(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866))の番号に基づいて位置8にある;およびb)第一の鎖にハイブリダイズする第二の鎖であって、第一の鎖は標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチ、および第四のミスマッチを含み、第二、第三、および第四のミスマッチは第一のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の少なくとも第1、第2、第3、および第4の置換を含む変異

体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて8位にあり、ここで、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第4の置換は第4のミスマッチを生じ、ここで、第2、第3、および第4の置換は第1のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第1、第2、第3、および第4の置換を含む変異体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて8位にあり、ここで、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第4の置換は第4のミスマッチを生じ、ここで、第2、第3、および第4の置換は第1のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第1、第2、第3、および第4の置換を含む変異体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて8位にあり、ここで、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第4の置換は第4のミスマッチを生じ、ここで、第2、第3、および第4の置換は第1のミスマッチの1~8塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して100%相補的である。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して1個~10個のミスマッチ(例えば、1~4、3~5、5~7、または5~10のミスマッチ)を含む。場合によっては、第二の鎖は第一の鎖に対して1個~4個のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1、2、3、または4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して2以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して3以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して5以下のミスマッチを含む。場合によっては、二本鎖RNAは18ヌクレオチド~25ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、各ミスマッチは、以下から独立に選択される置換によって生成される。a)GのA、U、またはCへの置換;b)UのA、G、またはCへの置換;およびc)CのA、U、またはGへの置換。

【0122】

位置9における第1のミスマッチ;2つのミスマッチ

【0123】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域とハイブリダイズする第一の鎖を含む;およびb)第一の鎖とハイブリダイズする第二の鎖であって、第一の鎖は、i)標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号744))、配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号745))、配列番号866(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU(配列番号866))、または配列番号867(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867));およびii)は、標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであり、ここで、第二のミスマッチは、第一のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の少なくとも第1および第2の置換を含む改変体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の番号付けに基づいて位置9にあり、第2の置換は第2のミスマッチを生成し、第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。ある場合には、第1の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU(配列番号866)の

少なくとも第1および第2の置換を含む改変体であり、ここで、第1の置換は、第1のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の番号付けに基づいて9位にあり、第2の置換は、第2のミスマッチを生じ、第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第1および第2の置換を含む改変体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて9位にあり、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との2つ以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して100%相補的である。ある場合には、第二の鎖は、第一の鎖に対する1~10のミスマッチ(例えば、1~4、3~5、5~7、または5~10のミスマッチ)を含む。ある場合には、第2の鎖は、第1の鎖に対する1~4のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1、2、3、または4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第2の鎖は第1の鎖に対して2つ以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。ある場合には、二本鎖RNAは18ヌクレオチド~25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、各ミスマッチは、以下から独立に選択される置換によって生成される。a)GのA、U、またはCへの置換;b)UのA、G、またはCへの置換;およびc)CのA、U、またはGへの置換。ある場合には、第一の鎖は、配列番号298~304から選択されるヌクレオチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0124】

位置9における第1のミスマッチ;3つのミスマッチ

【0125】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域にハイブリダイズする第一の鎖、およびb)第一の鎖にハイブリダイズする第二の鎖を含む。ここで、第一のミスマッチは、配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745))、(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866))又は配列番号867(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867))、ここで、第1の鎖は標的CAGリピート領域に対する第2のミスマッチおよび第3のミスマッチを含み、第2および第3のミスマッチは第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の少なくとも第1の置換、第2の置換、および第3の置換を含む改変体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の番号付けに基づいて位置9にあり、ここで、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、ここで、第2の置換および第3の置換は第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の少なくとも第1の置換、第2の置換、および第3の置換を含む変異体であり、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の番号付けに基づいて位置9にあり、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第2の置換および第3の置換は第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第1の置換、第2の置換、および第3の置換を含む変異体であり、第1の置換は第1のミスマッチを

生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて9番目に位置し、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第2の置換および第3の置換は第1のミスマッチの1～7塩基3'側である。ある場合には、第1の鎖は、標的CAGリピート領域との3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して100%相補的である。ある場合には、第二の鎖は、第一の鎖に対する1～10のミスマッチ(例えば、1～4、3～5、5～7、または5～10のミスマッチ)を含む。ある場合には、第2の鎖は、第1の鎖に対する1～4のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1、2、3、または4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第2の鎖は第1の鎖に対して2つ以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。ある場合には、二本鎖RNAは18ヌクレオチド～25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、各ミスマッチは、以下から独立に選択される置換によって生成される。a)GのA、U、またはCへの置換;b)UのA、G、またはCへの置換;およびc)CのA、U、またはGへの置換。場合によっては、第一の鎖は、配列番号325～332および336～338から選択されるヌクレオチド配列を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGUAAGCUGCUGCUG(配列番号325;表6の「CUG_307」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGUAUACUGCUGCUG(配列番号326;表6の「CUG_334」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUAAUGAUGCUGCUG(配列番号327;表6の「CUG_361」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUGUAAGCAGCUGCUG(配列番号328;表6の「CUG_388」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUGUAAGCUACUGCUG(配列番号329;表6の「CUG_415」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUGUACAGAUAGCUGCUG(配列番号330;表6の「CUG_631」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUGUACAGCAGCUGCUG(配列番号331;表6の「CUG_658」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUGUACAGCUGAUGCUG(配列番号332;表6の「CUG_712」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUGUAAGCUGAUGCUG(配列番号336;表6の「CUG_442」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUGUACAACUGCUGCUG(配列番号337;表6の「CUG_604」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、次のヌクレオチド配列を含む: CUGCUGCUGUACAGCUACUGCUG(配列番号338;表6の「CUG_685」のRNAガイド鎖配列)。

【0126】

位置9における第1のミスマッチ;4つのミスマッチ

【0127】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域にハイブリダイズする第一の鎖、およびb)第一の鎖にハイブリダイズする第二の鎖を含む。ここで、第一のミスマッチは配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号744))、配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号745))、(GCUGCUGCUG

10

20

30

40

50

CUGCUGCUGCU(配列番号866))又は配列番号867 UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)、ここで第1の鎖は、標的CAGリピート領域に対する第2のミスマッチ、第3のミスマッチ、および第4のミスマッチを含み、第2、第3、および第4のミスマッチは、第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。ある場合には、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の少なくとも第1、第2、第3、および第4の置換を含む変異体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の番号付けに基づいて位置9にあり、ここで、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第4の置換は第4のミスマッチを生じ、ここで、第2、第3、および第4の置換は第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の少なくとも第1、第2、第3、および第4の置換を含む変異体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の番号付けに基づいて位置9にあり、ここで、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第4の置換は第4のミスマッチを生じ、ここで、第2、第3、および第4の置換は第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第1、第2、第3、および第4の置換を含む変異体であり、ここで、第1の置換は第1のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて9位にあり、ここで、第2の置換は第2のミスマッチを生じ、第3の置換は第3のミスマッチを生じ、第4の置換は第4のミスマッチを生じ、ここで、第2、第3、および第4の置換は第1のミスマッチの1~7塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して100%相補的である。ある場合には、第二の鎖は、第一の鎖に対する1~10のミスマッチ(例えば、1~4、3~5、5~7、または5~10のミスマッチ)を含む。ある場合には、第2の鎖は、第1の鎖に対する1~4のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1、2、3、または4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第2の鎖は第1の鎖に対して2つ以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。ある場合には、二本鎖RNAは18ヌクレオチド~25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、各不整合は、以下から独立して選択される置換によって生成される。a)GのA、U、またはCへの置換;b)UのA、G、またはCへの置換;およびc)CのA、U、またはGへの置換;場合によっては、第一の鎖は配列番号341~344および347~367から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0128】

位置10における第1のミスマッチ;2つのミスマッチ

【0129】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域とハイブリダイズする第一の鎖を含む。およびb)第一の鎖とハイブリダイズする第二の鎖であって、第一の鎖は、i)標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745))、(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866))、または配列番号867(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867));およびii)は、標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであり、第二のミスマッチは、第一

のミスマッチの1から6塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含む改変体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の番号付けに基づいて位置10にあり、ここで、第二の置換は第二のミスマッチを生成し、第一のミスマッチの1から6塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含む改変体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の番号付けに基づいて位置10にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第一のミスマッチの1から6塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含む改変体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第一のミスマッチの1から6塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との2つ以下のミスマッチを含む。ある場合には、第1の鎖は、標的CAGリピート領域との3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して100%相補的である。ある場合には、第二の鎖は、第一の鎖に対する1~10のミスマッチ(例えば、1~4、3~5、5~7、または5~10のミスマッチ)を含む。ある場合には、第2の鎖は、第1の鎖に対する1~4のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1、2、3、または4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第2の鎖は第1の鎖に対して2つ以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。ある場合には、二本鎖RNAは18ヌクレオチド~25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、各不整合は、以下から独立して選択される置換によって生成される：a)GのA、U、またはCへの置換；b)UのA、G、またはCへの置換；およびc)CのA、U、またはGへの置換。ある場合には、第一の鎖は、配列番号305~310から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0130】

位置10における第1のミスマッチ；3つのミスマッチ

【0131】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域にハイブリダイズする第一の鎖；およびb)第一の鎖にハイブリダイズする第二の鎖であって、第一のミスマッチが配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、または(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745))の番号付けに基づいて位置10にあり、第一の鎖が標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、第二および第三のミスマッチが第一のミスマッチの1~6塩基3'側である、第一の鎖は以下を含む。：場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含む改変体であって、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の番号付けに基づいて位置10にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、第二の置換および第三の置換は第一のミスマッチの1~6塩基3'側である、改変体である。場合によっては、第一の鎖

は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含む改変体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の番号付けに基づいて位置10にあり、ここで、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、ここで、第二の置換および第三の置換は第一のミスマッチの1～6塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含む改変体であり、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、第二の置換および第三の置換は第一のミスマッチの1～6塩基3'側である。場合によっては、最初の鎖は標的CAGリピート領域との3つ以下のミスマッチを含む。場合によっては、最初の鎖は標的CAGリピート領域との4つ以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して100%相補的である。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1～10のミスマッチ(例えば、1～4、3～5、5～7、または5～10のミスマッチ)を含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1～4のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1、2、3、または4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して2以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して3以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して5以下のミスマッチを含む。場合によっては、二本鎖RNAは18ヌクレオチド～25ヌクレオチドの長さを有する。二本鎖RNAの長さが20ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが21ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが22ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが23ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが24ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが25ヌクレオチドの場合もある。場合によっては、各ミスマッチは以下から独立して選択される置換によって生成される:a)GのA、U、またはCでの置換;b)UのA、G、またはCでの置換;およびc)CのA、U、またはGでの置換。場合によっては、第一の鎖は配列番号333～335、339、および340から選択されるヌクレオチド配列を含む。場合によっては、第一の鎖は以下のヌクレオチド配列を含む:CUGCUGCUGAAGAUGCUGCUGC(配列番号333;表6の「CUG_2116」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第一の鎖は以下のヌクレオチド配列を含む:CUGCUGCUGAAGCAGCUGCUGC(配列番号334;表6の「CUG_2143」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第一の鎖は以下のヌクレオチド配列を含む:CUGCUGCUGAAGCUACUGCUGC(配列番号335;表6の「CUG_2170」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第一の鎖は、以下のヌクレオチド配列:CUGCUGCUGAACUGCUGCUGC(配列番号339;表6の「CUG_2089」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第一の鎖は、以下のヌクレオチド配列:CUGCUGCUGAAGCUGAUGCUG(配列番号340;表6の「CUG_2197」のRNAガイド鎖配列)を含む。

【0132】

位置10における第1のミスマッチ;4つのミスマッチ

【0133】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域とハイブリダイズする第一の鎖、およびb)第一の鎖とハイブリダイズする第二の鎖を含む。ここで、第一のミスマッチは、配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、配列番号745(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745))、(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866))又は配列番号867(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867))、第1の鎖は、標的CAGリピート領域に対する第2のミスマッチ、第3のミスマッチ、および第4のミスマッチを含み、第2、第3、および第4のミスマッチは、第1のミスマッチの1～6塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配

30

40

50

UGCUG(配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第一のミスマッチの1～5塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含む改変体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCの番号(配列番号866)に基づいて位置11にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第一のミスマッチの1～5塩基3'側である。第一の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含む改変体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第一のミスマッチの1～5塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との2つ以下のミスマッチを含む。ある場合には、第1の鎖は、標的CAGリピート領域との3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して100%相補的である。ある場合には、第二の鎖は、第一の鎖に対する1～10のミスマッチ(例えば、1～4、3～5、5～7、または5～10のミスマッチ)を含む。ある場合には、第2の鎖は、第1の鎖に対する1～4のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1、2、3、または4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1個以下のミスマッチを含む。ある場合には、第2の鎖は第1の鎖に対して2つ以下のミスマッチを含む。ある場合には、第二の鎖は第一の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。ある場合には、二本鎖RNAは18ヌクレオチド～25ヌクレオチドの長さを有する。ある場合には、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さをもつ。ある場合には、各不整合は、以下から独立して選択される置換によって生成される：a)GのA、U、またはCでの置換；b)UのA、G、またはCでの置換；およびc)CのA、U、またはGでの置換。場合によっては、第一の鎖は、配列番号311～315から選択されるヌクレオチド配列を含む。場合によっては、第1の鎖は、配列番号793から803(表8に示すように；図24)から選択されるヌクレオチド配列を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCAACUGCUGCUGC(配列番号311)を含む。表6の「CUG_217」のRNAガイド鎖配列)。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCAGCAGCUGCUGCUGC(配列番号312；表6の「CUG_226」のRNAガイド鎖配列)を含む。場合によっては、第1の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCAGCAGCUGCUGCUGC(配列番号313；表6の「CUG_235」のRNAガイド鎖配列)を含む。ある場合には、第一の鎖は、以下のヌクレオチド配列：CUGCUGCUGCAGCUACUGCUGC(配列番号314；表6の「CUG_244」のRNAガイド鎖配列)を含む。ある場合には、第一の鎖は、以下のヌクレオチド配列：CUGCUGCUGCAGCUGAUGCUG(配列番号315；表6の「CUG_253」のRNAガイド鎖配列)を含む。

10

20

30

40

【0136】

位置11における第1のミスマッチ；3つのミスマッチ

【0137】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a)CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域にハイブリダイズする第一の鎖；およびb)第一の鎖にハイブリダイズする第二の鎖であって、第一のミスマッチが配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号744))、または(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号745))の番号付けに基づいて位置11にあり、第一の鎖が標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、第二および第三のミスマッチが第一のミスマッチの1～5塩基3'側である、第

50

一の鎖は以下を含む:。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含む改変体であって、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、第二の置換および第三の置換は第一のミスマッチの1~5塩基3'側である、改変体である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含む改変体であって、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号866)の番号付けに基づいて位置11にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、第二の置換および第三の置換は第一のミスマッチの1~5塩基3'側である、改変体である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含む改変体であって、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にあり、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、第二の置換および第三の置換は第一のミスマッチの1~5塩基3'側である、改変体である。場合によっては、第1鎖は標的CAGリピート領域とのミスマッチが3個以下である。場合によっては、第1鎖は標的CAGリピート領域とのミスマッチが4個以下である。場合によっては、第2鎖は第1鎖と100%相補的である。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1~10のミスマッチ(例えば、1~4、3~5、5~7、または5~10のミスマッチ)を含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1~4のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1、2、3、または4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して1以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して2以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して3以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して4以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は、第1の鎖に対して5以下のミスマッチを含む。場合によっては、二本鎖RNAは、18ヌクレオチド~25ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは、20ヌクレオチドの長さを有する。二本鎖RNAの長さが21ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが22ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが23ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが24ヌクレオチドの場合もある。二本鎖RNAの長さが25ヌクレオチドの場合もある。場合によっては、各ミスマッチは以下から独立して選択される置換によって生じる: a) GのA、U、またはCへの置換; b) UのA、G、またはCへの置換; および c) CのA、U、またはGへの置換。

【0138】

位置11における第1のミスマッチ; 4つのミスマッチ

【0139】

場合によっては、本開示の二本鎖RNAは、a) CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域にハイブリダイズする第一の鎖; および b) 第一の鎖にハイブリダイズする第二の鎖であって、ここで、第一のミスマッチは、配列番号743(CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743))、配列番号744(GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号744))、または(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号745))の番号に基づく位置11にあり、ここで、第一の鎖は、標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチ、および第四のミスマッチを含み、ここで、第二、第三、および第四のミスマッチは、第一のミスマッチの1~5塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含む改変体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG(配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、ここで、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、第四の置換は第四のミスマッチを生じ、ここで、第二、第三、および第四の置換

は第一のミスマッチの1~5塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU(配列番号866)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含む変異体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU(配列番号866)の番号付けに基づいて位置11にあり、ここで、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、第四の置換は第四のミスマッチを生じ、ここで、第二、第三、および第四の置換は第一のミスマッチの1~5塩基3'側である。場合によっては、第一の鎖は、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含む改変体であり、ここで、第一の置換は第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC(配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にあり、ここで、第二の置換は第二のミスマッチを生じ、第三の置換は第三のミスマッチを生じ、第四の置換は第四のミスマッチを生じ、ここで、第二、第三、および第四の置換は第一のミスマッチの1~5塩基3'側である。場合によっては、第1の鎖は標的CAGリピート領域との4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して100%相補的である。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1個~10個のミスマッチ(例えば、1~4、3~5、5~7、または5~10のミスマッチ)を含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1個~4個のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1個、2個、3個、または4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して1個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して2個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して3個以下のミスマッチを含む。場合によっては、第2の鎖は第1の鎖に対して4個以下のミスマッチを含む。場合によっては、2番目の鎖は最初の鎖に対して5個以下のミスマッチを含む。場合によっては、二本鎖RNAは18ヌクレオチド~25ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは20ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは21ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは22ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは23ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは24ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、二本鎖RNAは25ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、各ミスマッチは、以下から独立して選択される置換によって生成される：a) GのA、U、またはCへの置換；b) UのA、G、またはCへの置換；およびc) CのA、U、またはGへの置換。

10

20

30

【0140】

A. 標的核酸

【0141】

本開示の二本鎖RNAは、標的反復領域を含む任意の遺伝子または核酸構築物を標的とすることができる。ある態様において、ヒトまたは霊長類のタンパク質をコードする遺伝子(DNAまたはmRNA)が標的とされる。ある態様において、非コード遺伝子が標的とされる。ある態様において、遺伝子のコード領域が標的とされる。ある態様において、遺伝子の非コード領域が標的とされる。

【0142】

ある態様において、本開示の二本鎖RNAは、CAGリピート含有(ポリグルタミン)遺伝子を標的とする。ある態様において、CAGリピート含有遺伝子は、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、Atrophin、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFH3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、およびMAB21L1から選択される。CAGリピートの伸長は、ポリグルタミン(polyQ)病と呼ばれる多数の優性遺伝性疾患と関連している。CAGリピート含有タンパク質は全身に遍在的に発現しているが、ポリグルタミン病の病理は主に神経組織に現れるが、これに限定されない。したがって、本明細書で使用する場合、ポリグルタミン病という用語は、CAGリピートの伸長と関連する任意の疾患または障害を指し、神経変性疾患を含むが、これに限定されない。

40

50

【0143】

interesting transcript 15 (IT15)としても知られるハンチンチン(HTT)は、ハンチンチン蛋白質をコードする遺伝子である。ハンチンチンの正確な機能は不明であるが、軸索輸送に関与している。ハンチンチンの転写産物の配列の例は、NCBI Reference Sequence NM_002111.8(配列番号820)に示されている。典型的には、ハンチンチンのポリグルタミン区域(tract)は、CAGリピート数が10~35である。ポリグルタミン区域のCAGリピート数が36~120以上に伸長すると、ハンチントン病が生じる。初期の徴候と症状には、易刺激性、抑うつ、小さな不随意運動、協調運動障害、新しい情報を学習したり意思決定をしたりする際の障害などがある。ハンチントン病の患者の多くは、舞踏病として知られる不随意のピクピクと動く運動を起こす。病気が進行するにつれて、これらの運動はより顕著になる。患者は、歩行、発話、嚥下に問題が生じることがある。ハンチントン病の患者は、人格の変化や思考力や推論能力の低下も経験する。

10

【0144】

脊髄小脳失調症1型(SCA1)としても知られるアタキシン1(ATXN1)は、主に核で発現し、クロマチンと結合し、転写リプレッサーとして機能するポリグルタミン含有タンパク質をコードする遺伝子を指す。ATXN1転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_001128164.2(配列番号821)に記載されている。ポリグルタミン区域の典型的に約40~83反復への拡張を含むアタキシン1の変異型は、小脳における毒性機能獲得機構を介して運動障害脊髄小脳失調症1型(SCA1)を引き起こす。小脳機能障害は進行性で永続的である。この疾患の患者は、最初に協調運動およびバランスの問題(運動失調)を経験する。SCA1の他の徴候および症状には、発話困難および嚥下困難、筋肉の硬直(痙性)、眼球運動を制御する筋肉の筋力低下(眼筋麻痺)がある。眼筋の筋力低下は、速い不随意の眼球運動(眼振)を引き起こす。SCA1の患者は、情報の処理、学習、記憶が困難になることがある(認知障害)。SCA1の患者は、時間の経過とともに、腕および脚にしびれ、チクチク感、または痛み(感覚神経障害)を発症することがある。制御不能な筋肉の緊張(ジストニア);筋肉の消耗(萎縮);および筋肉の攣縮(線維束性収縮)。まれに、長年にわたって罹患している人で、硬直、振戦、不随意のびくびく動く運動(舞踏病)が報告されている。

20

【0145】

2型脊髄小脳失調症(SCA2)としても知られるアタキシン2(ATXN2)は、mRNAのサブセットを安定化し、タンパク質発現を増加させるために3'UTRのシス調節エレメントを標的とするポリグルタミン含有RNA結合タンパク質をコードする遺伝子を指す。ATXN2転写産物の配列の例は、NCBI参照配列:NM_001372574.1(配列番号822)によって提供される。ATXN2におけるポリグルタミン反復伸長(例えば、典型的には約33またはそれ以上の反復)は、2型脊髄小脳失調症(SCA2)の徴候および症状を引き起こす可能性がある。SCA2の患者は、最初に協調運動およびバランスの問題を経験する(運動失調)。SCA2のその他の初期の徴候および症状には、さらなる運動障害、発話および嚥下困難、眼球運動を制御する筋肉の筋力低下(眼筋麻痺)が含まれる。眼筋の筋力低下は、不随意の眼球の前後運動(眼振)および急速な眼球運動を行う能力の低下(衝動性眼球運動低下)を引き起こす。SCA2の患者は、時間の経過とともに、四肢の感覚消失および筋力低下(末梢神経障害)、筋萎縮(萎縮)、制御不能な筋緊張(ジストニア)、および不随意の痙攣運動(舞踏病)を発症する可能性がある。SCA2の患者の一部は、パーキンソニズムとして知られる一連の運動異常を発症する。これには、異常に遅い運動(動作緩慢)、不随意の振戦(振戦)、および筋肉の硬直(硬直)が含まれる。SCA2の患者は、短期記憶、計画、および問題解決の問題を抱えたり、知的機能の全般的な低下(認知症)を経験したりする可能性がある。ATXN2の中間ポリグルタミン伸長(27~33 CAGリピート)も筋萎縮性側索硬化症(ALS)のリスクを増加させる。ALSは、随意筋を制御する運動ニューロンが徐々に失われる神経変性神経筋疾患である。ALSの初期症状には、筋肉の硬直、筋肉のけいれん、徐々に進行する筋力低下と筋肉の萎縮などがある。四肢発症型ALSは腕や脚の筋力低下から始まり、球発症型ALSは発話困難や嚥下困難から始まる。ALS患者の半数は、思考や行動に少なくとも軽度の障害が生じ、約15%は前頭側頭型認知症を発症する。ほとんどの人が痛みを

30

40

50

経験する。運動ニューロンの喪失は、食べたり、話したり、動いたりする能力が失われるまで続き、最終的には呼吸する能力が失われる。ALSは最終的に麻痺を引き起こし、通常は呼吸不全により早期に死亡する。

【0146】

脊髄小脳失調症3型(SCA3)としても知られるアタキシン3(ATXN3)は、ポリグルタミン含有脱ユビキチン化酵素をコードする遺伝子を指す。ATXN3転写物配列の例は、NCBI参照配列NM_004993.6(配列番号823)によって提供されている。正常な13~36の反復から50以上へのポリグルタミン反復の拡張は、Machado-Joseph病(MJD)を引き起こす。これは、Machado-Joseph Azorean病、Machado病、Joseph病または脊髄小脳失調症3型(SCA3)としても知られている。この状態の人は、最初は協調運動やバランスの問題(運動失調)を経験する。その他のSCA3の初期の徴候や症状には、言語障害、制御不能な筋肉の緊張(ジストニア)、筋肉の硬直(痙性)、硬直、振戦、眼球の突出、複視などがある。この状態の人は、レストレスレッグス症候群やレム睡眠行動障害などの睡眠障害を経験することがある。SCA3の人は、時間の経過とともに、手足の感覚消失や筋力低下(末梢神経障害)、筋肉の痙攣、筋肉の攣縮(線維束性収縮)、嚥下障害を発症することがある。SCA3の人は、記憶、計画、問題解決に問題を抱えることがある。

10

【0147】

カルシウム電位依存性チャネルサブユニット $\alpha 1A$ (CACNA1A)は、脊髄小脳失調症6型(SCA6)としても知られており、ニューロンのカルシウムチャネルP/Qの $\alpha 1A$ 孔形成サブユニットをコードしている。CACNA1Aの転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_000068.4(配列番号824)によって提供されている。CACNA1A遺伝子のポリグルタミン区域の典型的な19~33反復への拡張は、脊髄小脳失調症6型(SCA6)を引き起こす。この状態の人は、最初は協調運動とバランスの問題(運動失調)を経験する。SCA6の他の初期の徴候と症状には、発話困難、不随意的な眼球運動(眼振)、複視などがある。SCA6の人は、時間の経過とともに、腕の協調運動障害、振戦、制御不能な筋肉の緊張(ジストニア)を発症する可能性がある。

20

【0148】

7型脊髄小脳失調症(SCA7)としても知られるアタキシン7(ATXN7)は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)複合体のGCN5(general control of amino acid synthesis-5;KAT2A)含有SAGAファミリーの不可欠なサブユニットであるポリグルタミン含有タンパク質をコードする。ATXN7転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_001377405.1(配列番号825)によって提供される。ATXN7のポリグルタミン拡張は、進行性小脳失調、錐体桿体ジストロフィーによる網膜変性または失明、および感覚または反射の軽度の変化を特徴とする7型脊髄小脳失調症(SCA7)を引き起こす。その後の症状には、運動制御の喪失、不明瞭な発語(構音障害)、嚥下困難(嚥下困難)などがある。

30

【0149】

12型脊髄小脳失調症(SCA12)としても知られるプロテインホスファターゼ2調節サブユニットB β (PPP2R2B)は、セリン/トレオニンホスファターゼであるプロテインホスファターゼ2のB調節サブユニットをコードする。PPP2R2B転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_181674.3(配列番号826)によって提供されている。典型的な正常範囲である約7~28から、約55~78へのポリグルタミン反復の拡張は、12型脊髄小脳失調症を引き起こす。発症年齢は8歳から55歳であるが、最も一般的には40代で発症する。症状は典型的には振戦で始まり、小脳性運動失調に進行する。認知症の徴候もSCAに関連して報告されている。

40

【0150】

脊髄小脳失調症17型(SCA17)としても知られるTATAボックス結合蛋白質(TBP)は、転写因子IID(TFIID)の成分であるTATA結合蛋白質をコードする。TBPの転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_003194.5(配列番号827)によって提供される。TBPは典型的には25~42のポリグルタミン反復を有し、45~66反復への伸長は脊髄小脳失調17型(SCA)と関連している。この病態の患者は典型的に、運動失調、認知症、舞踏病や

50

ジストニアなどの不随意運動、固縮、痙縮、脱力、速い交互運動の鈍化、反射亢進などの錐体路徴候などの症状を経験する。

【0151】

アンドロゲン受容体(AR)は、ステロイドホルモン活性化転写因子をコードしている。AR転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_000044.6(配列番号828)によって提供されている。典型的な9~34リピートから、38~62リピートへのポリグルタミン反復の拡張は、ケネディ病としても知られる球脊髄性筋萎縮症(SBMA)を引き起こす。SBMAは、経時的に悪化する筋力低下および筋萎縮を特徴とし、痙攣および歩行、嚥下、発話困難を引き起こす。SBMAはまた、女性化乳房および不妊を引き起こす可能性がある。

【0152】

Atrophin 1(ATN1)は、核内受容体サブファミリー2グループEメンバー1(NR2E1)を動員して転写を抑制する転写コリプレッサーであると仮定されるタンパク質をコードしている。ATN1転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_001007026.2(配列番号829)によって提供されている。歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)は、ATN1のポリグルタミン反復配列の典型的な7~35コピーから、49~93コピーへの伸長に関連するまれな神経変性疾患である。DRPLAが約20歳未満で発現する場合、典型的にはミオクロヌス、運動失調、発作、行動変化、知的障害を伴う。約20歳を超えて発現する場合、運動失調、舞踏病アテトーゼ、妄想、認知症を伴う。

【0153】

AF-9としても知られるMyeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia Translocated To Chromosome 3 (MLLT3)は、RNAポリメラーゼII転写の触媒速度を増加させるのに必要なスーパー伸長複合体(SEC)の成分をコードしている。MLLT3転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_004529.4(配列番号830)に記載されている。MLLT3は不安定なポリグルタミン反復配列を含み、MLLT3が関与する遺伝子異常は、白血病、神経運動発達遅延、小脳性運動失調、てんかんと関連している。

【0154】

Bone Morphogenic Protein 2 Inducible Kinase(BMP2K)は、骨格の発達およびパターン形成に関連するタンパク質をコードしている。BMP2K転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_198892.2(配列番号831)に記載されている。BMP2Kは、ポリグルタミン反復配列を含み、近視およびがん、特にがんに関連する遺伝子調節異常と関連している。

【0155】

THAPドメイン含有11(THAP)は胚発生に関連する転写リプレッサーをコードする。THAP11転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_020457.3(配列番号832)によって提供される。THAP11は、典型的には約29コピーのポリグルタミン反復を含むが、20コピーから40コピーを超える幅がある。例えば、38コピーのポリグルタミン反復数の増加は、神経変性疾患と関連する。THAP11におけるポリグルタミンの伸長は、THAP11の細胞内凝集、細胞毒性、増殖阻害、G0/G1停止、および転写活性の阻害とも関連する。

【0156】

Zinc Finger Homeobox 3(ZFHX3)は、筋形成およびニューロン分化を調節する転写因子をコードする。それはまた、いくつかの癌において腫瘍抑制因子として機能し、心房細動と関連する。ZFHX3転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_006885.4(配列番号833)によって提供される。ZFHX3は、ポリグルタミン反復配列を含む。伸長したポリグルタミン反復配列、例えば19コピーを有する個人は、より少ない反復配列、例えば17コピーを有する個人と比較して、冠動脈性心疾患、高血圧症、糖尿病または脂質異常症と関連する。

【0157】

POUクラス3ホメオボックス2(POU3F2)は、ニューロン分化に関連する転写因子をコードする。POU3F2転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_005604.4(配列番号834)によって提供される。POU3F2はポリグルタミン区域を含み、双極性障害、肥満、

10

20

30

40

50

発達遅滞および知的障害と関連する。

【0158】

マスターマインド様転写コアクチベーター2(MAML2)は、NOTCHタンパク質の転写コアクチベーターをコードし、 β -カテニンのターンオーバーを促進する。MAML2転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_032427.4(配列番号835)によって提供される。MAML2は、観察された可変性を有するポリグルタミン区域を含み、粘表皮がん、汗腺腫、B細胞由来リンパ腫および慢性リンパ性白血病などのがんに関連する。

【0159】

マスターマインド様転写コアクチベーター3(MAML3)は、NOTCHタンパク質の転写コアクチベーターをコードする。MAML3転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_018717.5(配列番号836)によって提供される。MAML3は、ポリグルタミン区域を含み、シュナイダーがんおよび骨化性線維粘液性腫瘍などのがんに関連する。

【0160】

SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 2 (SMARCA2)は、クロマチンリモデリングによる転写調節に関与するSWI/SNF複合体の成分をコードする。SMARCA2は神経発生にも関与する。SMARCA2転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_003070.5(配列番号837)によって提供される。SMARCA2は多型ポリグルタミン区域を含み、Nicolaides-Baraitser症候群および眼瞼包茎知的発達障害症候群などの疾患に関連する。SMARCA2遺伝子はまた、統合失調症および双極性障害に関連する染色体領域に位置する。

【0161】

複製起点認識複合体サブユニット4(ORC4)は、DNA複製の開始に必要な6つのサブユニット複製起点認識複合体(ORC)の構成要素をコードする。ORC4転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_001190879.3(配列番号838)によって提供される。ORC4は、コード配列の上流に位置する多型トリヌクレオチドCAGリピートの領域を含み、Meier-Gorlin症候群1およびMeier-Gorlin症候群2と関連する。

【0162】

RUNXファミリー転写因子2(RUNX2)は、骨芽細胞分化および骨格形態形成に関与する核タンパク質をコードする。RUNX2転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_001024630.4(配列番号839)によって提供される。RUNX2は、ポリグルタミン区域およびポリアラニン区域を含む。典型的な23残基から、例えば27~30残基へのポリグルタミン区域の拡大は、鎖骨頭蓋異形成、骨密度の減少、およびRUNX2トランス活性化能の低下を引き起こす。鎖骨頭蓋異形成(CCD)は、頭蓋骨、骨および歯に影響を及ぼす疾患である。徴候および症状には、鎖骨の欠如または未発達、頭蓋骨の泉門閉鎖遅延、歯の異常、低身長、骨密度の減少、難聴、およびその他の骨の異常が含まれる。

【0163】

メディエーター複合体サブユニット12(MED12)は、転写開始の制御に関与する開始前複合体の成分をコードしている。MED12転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_005120.3(配列番号840)によって提供される。MED12はポリグルタミン区域を有し、Opitz-Kaveggia症候群、Lujan-Fryns症候群、Ohdo症候群、X連鎖、および子宮平滑筋腫などの腫瘍形成と関連している。

【0164】

E1A結合タンパク質P400(EP400)は、転写活性化に関与するNuA4ヒストンアセチルトランスフェラーゼ複合体の成分をコードする。EP400転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_015409.5(配列番号841)によって提供される。EP400は、通常、約32のCAGリピートを含む。EP400は、骨化性線維粘液性腫瘍およびてんかん、家族性側頭葉1に関与する。

【0165】

膜関連グアニル酸キナーゼ、WWおよびPDZドメイン含有1(MAGI1)は、細胞間接触領域における複数タンパク質複合体の集合に関与するタンパク質をコードする。MAGI1

10

20

30

40

50

の転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_015520.2(配列番号842)によって提供される。MAGI1は、多型ポリグルタミン区域を含み、頸部大細胞神経内分泌がんおよび顕微鏡的大腸炎などの状態と関連する。

【0166】

UBAP1-MVB12-関連(UMA)ドメイン含有1(UMAD1)は、タンパク質をコードする遺伝子である。UMAD1の転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_001302348.2(配列番号843)によって提供される。UMAD1は、開始コドンの上流に多型トリヌクレオチドCAGリピート領域を含み、網膜色素変性に関連する。

【0167】

DM1 Locus Antisense RNA(DM1-AS)は、RNA遺伝子である。DM1-ASのRNA配列の例は、NCBI参照配列NR_147193.1(配列番号844)によって提供される。DM1-ASは、イントロン内に多型トリヌクレオチドCAGリピート領域を含み、筋強直性ジストロフィー1および鰓耳腎症候群2と関連する。

【0168】

ENSG 00000283549としても知られるAC007161.3はRNA遺伝子であり、CAGリピートを含む。

【0169】

インターフェロン制御因子2結合タンパク質様(IRF2BPL)は、中枢神経系の発達、ニューロンの維持、および女性の生殖機能の調節に関連する転写因子をコードする。IRF2BPLの転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_024496.4(配列番号845)によって提供される。IRF2BPLは、ポリグルタミン区域を含み、退行、異常運動、言語喪失、および発作を伴う神経発達障害、およびIrf2bpl関連退行性神経発達障害-ジストニア-発作症候群などの神経学的問題と関連する。

【0170】

Mab-21Like 1(MAB21L1)は、眼および小脳の発達に関連するタンパク質をコードする。MAB21L1転写産物の配列の例は、NCBI参照配列NM_005584.5(配列番号846)によって提供される。MAB21L1は、小脳症候群、眼症候群、頭蓋顔面症候群、および生殖器症候群および眼球水症と関連する。MAB21L1は、双極性障害などの精神状態と関連する遺伝子の5'非翻訳部分における多型トリヌクレオチドCAGリピートを含む。

【0171】

いくつかの実施形態において、CAGリピート含有遺伝子またはCAGリピート含有遺伝子によってコードされるRNAの病原性または病理的アレルは、少なくとも約30個の連続するCAGリピートを含む。

【0172】

C.発現カセットおよびベクター

【0173】

ある態様において、本開示の二本鎖RNAは、核酸分子、例えばDNA配列によってコードされる。本明細書に提供される二本鎖RNA配列は、各ウラシル塩基「U」をチミン「T」塩基で置き換えることによってDNA形式に変換することができる。

【0174】

ある態様において、二本鎖RNAをコードする核酸分子(例えばDNA)は、発現カセット内に含まれる。

【0175】

ある態様において、発現カセットは、導入遺伝子と作動可能に連結された1つ以上の発現制御配列(調節配列)をさらに含む。「作動可能に連結された」配列は、導入遺伝子と隣接しているか、または導入遺伝子からトランスもしくは離れた位置で作用してその発現を制御する発現制御配列を含む。発現制御配列の例としては、転写開始配列、終結配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、リプレッサー配列、スプライス部位配列、ポリアデニル化(polyA)シグナル配列、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0176】

10

20

30

40

50

ある態様において、プロモーターは、内因性プロモーター、合成プロモーター、ハイブリッドプロモーター、構成プロモーター、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーター(例えば、CNS特異的)、または細胞特異的プロモーター(ニューロン、グリア細胞、アストロサイト)である。構成プロモーターの例としては、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター(任意にRSVエンハンサーと共に)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(任意にCMVエンハンサーと共に)、SV40プロモーター、およびジヒドロ葉酸還元酵素プロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターの例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン(MT)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導性マウス乳がんウイルス(MMTV)プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制可能系、テトラサイクリン誘導可能系、RU486誘導可能系、およびラパマイシン誘導可能系が挙げられる。使用できるプロモーターのさらなる例としては、例えば、ニワトリ β アクチンプロモーター(CBAプロモーター)、CAGプロモーター、H1プロモーター、CD68プロモーター、JeTプロモーター、シナプシンプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター、またはRNAポリメラーゼIIIプロモーター(例:U6、H1など)が挙げられる。

10

【0177】

ある態様において、プロモーターは、RNA pol IIプロモーターである。pol IIプロモーターの例としては、PGK、CBA、U1、CMV、EIF1 α 、EF1 α 、CAG、またはシナプトフィシンプロモーターが挙げられる。ある態様において、プロモーターは、組織特異的RNA pol IIプロモーターである。ある態様において、組織特異的RNA pol IIプロモーターは、ニューロン特異的発現を示す遺伝子に由来する。ある態様において、発現カセットは、pol IIプロモーターおよびポリ(A)テールを含み、例えば、5'末端にpol IIプロモーターが隣接し、3'末端にポリ(A)テールが隣接する二本鎖RNAをコードするDNA配列を有する。

20

【0178】

ある態様において、プロモーターは、ニューロン特異的プロモーターである。ニューロン特異的プロモーターの例としては、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、ヒトシナプシン1、ヒトシナプシン2プロモーター、caMKキナーゼ、およびチューブリンからのものが挙げられる。

30

【0179】

ある態様において、プロモーターは、RNA pol IIIプロモーターである。pol IIIプロモーターの例としては、U6、H1、7SK、Y、RPR、MRP、およびセレノシステインtRNAが挙げられる。ある態様において、発現カセットは、例えば、5'末端にpol IIIプロモーターが隣接し、3'末端にポリ(T)テールが隣接する二本鎖RNAをコードするDNA配列を伴う、pol IIIプロモーターおよびポリ(T)テールを含む。

【0180】

ある態様において、プロモーターは、RNA pol Iプロモーターである。いくつかの態様において、発現カセットは、pol Iプロモーターおよび3'ボックスを含み、例えば、5'末端にpol Iプロモーターが隣接し、3'末端に3'ボックスが隣接する二本鎖RNAをコードするDNA配列を含む。

40

【0181】

二本鎖RNAの発現カセットは、当該分野において公知であり、例えば、ter Brake et al. Mol. Ther.(2008)16:557; Maczuga et al., BMC Biotechnol.(2012)12:42; and Bofill-De Ros and Gu(2016)103:157.を参照されたい。

【0182】

いくつかの実施形態において、本開示の二本鎖RNAをコードするDNA配列は、発現カセットの非翻訳領域に位置する。いくつかの実施形態において、本開示の阻害核酸をコードする配列は、発現カセットのイントロン、5'非翻訳領域(5'UTR)、または3'非翻訳領域(3'UTR)に位置する。いくつかの実施形態において、本開示の阻害核酸をコードする配列は、プロモーターの下流および発現遺伝子上流のイントロンに位置する。

50

【0183】

いくつかの実施形態において、本開示の二本鎖RNAをコードするDNA配列は、発現カセット内の2つのAAV逆方向末端反復(ITR)(例:5' ITRおよび3' ITR)によって隣接される。いくつかの実施形態において、各AAV ITRは全長ITR(例えば、約145 bpの長さで、機能的Rep結合部位(RBS)と末端分解部位(trs)を含む)である。ある態様において、ITRの1つは、切断されている(例えば、短縮された、または全長でない)。ある態様において、切断されたITRは、機能的な末端分解部位(trs)を欠き、自己相補的AAVベクター(scAAVベクター)の産生に使用される。

【0184】

ある態様において、本明細書に記載される二本鎖RNAは、プラスミド、非ウイルスベクター、またはウイルスベクターなどのベクターによってコードされ得る。本開示の二本鎖RNAを発現するためのベクターの使用は、二本鎖RNAを被験体に複数回投与するよりも、被験体における二本鎖RNAの連続的または制御された発現を可能にし得る。本開示は、本明細書に記載される二本鎖RNAをコードする発現カセットを含む単離された核酸を含むベクターを提供する。

【0185】

ウイルスベクターとしては、ヘルペスウイルス(HSV)ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0186】

ある態様において、本開示の二本鎖RNAをコードするベクターは、レトロウイルスベクターである。ある態様において、レトロウイルスベクターは、マウス幹細胞ウイルス、マウス白血病ウイルス(例えば、モロニーマウス白血病ウイルスベクター)、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、またはトリ細網内皮症ウイルスベクターである。ある態様において、本開示の二本鎖RNAをコードするベクターは、レンチウイルスまたはレンチウイルスをベースとするベクターである。ある態様において、レンチウイルスベクターは、HIV 1型およびHIV 2型を含むヒト免疫不全ウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)、およびサル免疫不全ウイルス(SIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス、またはマエディ・ビスナウイルスベクターである。レンチウイルス操作細胞を用いてshRNAを発現させる方法は、当該分野において公知である。例えば、Stegmeier et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2005)102:13212~13217; Klinghoffer et al. RNA(2010)16:879~884。複製不能組換えレンチウイルスの産生は、例えば、TLA-HEK293TMなどの市販のパッケージング細胞株およびパッケージングプラスミドを用いて、発現ベクターおよびパッケージングプラスミドの共トランスフェクションによって達成することができる(Thermo Scientific/Open Biosystems(Huntsville, AL))。

【0187】

ある態様において、本開示の二本鎖RNAをコードするベクターは、組換え方法によって産生される組換えrAAVベクターなどのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。AAVは、複製のためのタンパク質(rep)およびキャプシド(Cap)をコードするゲノムを有する一本鎖の非エンベロープDNAウイルスであり、ウイルスゲノムの複製起点として機能する2つのITRに挟まれている。AAVはまた、AAVキャプシドへのウイルスゲノムのパッケージングを可能にするパッケージング配列を含む。ある態様において、AAVベクターは、2つのシス作用性AAV ITR(5' ITRおよび3' ITR)に挟まれた本開示の二本鎖RNAをコードする発現カセットを含む。機能性ITR配列は、AAVウイルス粒子のレスキュー、複製およびパッケージングのために使用される。したがって、AAVベクターは、ウイルスの複製およびパッケージング(例えば、1つまたは2つの機能的ITRおよびパッケージング順序)のためにシスにおいて必要とされる配列を少なくとも含むように本明細書において定義される。ある態様において、各AAV ITRは、全長ITR(例えば、約145 bpの長さで、機能的Rep結合部位(RBS)と末端分解部位(trs)を含む)である。ある態様において

、ITRが機能性レスキュー、複製およびパッケージングを提供する場合、ITRの一方または両方が、例えば、挿入、欠失、または置換によって改変される。ある態様において、改変されたITRは、機能的末端解決部位(trs)を欠き、自己相補的AAVベクター(scAAVベクター)の産生のために使用される。いくつかの実施形態において、ITRは、血清型AAV 1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV.Rh10、AAV11およびそれらの変異体のいずれか1つから選択される。場合によっては、ITRはAAV2由来である。

【0188】

その他の発現制御配列は、転写開始配列、終結配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、リプレッサー配列、スプライス部位配列、ポリアデニル化(polyA)シグナル配列、またはそれらの任意の組み合わせのうちの1つ以上を含む、二本鎖RNAをコードするDNA配列に作動可能に連結されたrAAVベクター中に存在してもよい。

【0189】

rAAVベクターは、全体的または部分的に欠失した1つ以上のAAV野生型遺伝子を有してもよい。ある実施形態では、rAAVベクターは複製欠損である。ある実施形態では、rAAVベクターは機能的Repタンパク質および/またはキャプシドタンパク質を欠いている。

【0190】

宿主細胞培養を用いて組換えAAVベクターをAAVキャプシドにパッケージングする方法は、当該分野において公知である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターをパッケージングするために必要な1つ以上の成分(例えば、Rep配列、キャップ配列、および/またはアクセサリ機能)は、1つ以上の必要な成分(例えばベクトルによって)を含有するように操作された安定な宿主細胞によって提供され得る。AAVパッケージングに必要な成分の発現は、宿主パッケージング細胞における誘導性プロモーターまたは構成プロモーターの制御下にあり得る。AAVヘルパーベクターは、AAV複製に必要なAAV機能の欠落を補完するために、トランスで機能するAAV repおよび/またはcap遺伝子の一時的な発現を提供するために一般的に使用される。いくつかの実施形態において、AAVヘルパーベクターはAAV ITRを欠き、自身を複製することもパッケージングすることもできない。AAVヘルパーベクターは、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルス、またはビリオンの形態であり得る。

【0191】

本開示の組換えAAVベクターは、AAVカプシドによってカプセル化されてrAAV粒子を形成することができる。「rAAV粒子」または「rAAVビリオン」とは、AAVタンパク質シェルを含み、AAV ITRによって両側に隣接された目的の導入遺伝子をカプセル化する感染性複製欠損ウイルスを指す。rAAV粒子は、rAAVベクターを特定する配列、AAVヘルパー機能、およびアクセサリ機能を導入した適切な宿主細胞内で産生され、その後の標的細胞への遺伝子送達のためにrAAVベクターを感染性rAAV粒子にパッケージングするために必要なAAVポリペプチドを宿主細胞がコードできるようにする。

【0192】

ある態様において、rAAV粒子は、トリプルトランスフェクション法(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6,001,650号を参照されたい)を用いて産生され得る。このアプローチにおいて、rAAV粒子は、rAAV粒子にパッケージングされるrAAVベクター(導入遺伝子を含む)、AAVヘルパーベクター、およびアクセサリ機能ベクターを宿主細胞にトランスフェクトすることによって産生される。ある態様において、AAVヘルパー機能ベクターは、検出可能な野生型AAVビリオン(例えば、機能的repおよびcap遺伝子を含むAAVビリオン)を生成することなく、効率的なAAVベクター産生を支援する。アクセサリ機能ベクターは、AAVが複製のために依存する非AAV由来のウイルスおよび/または細胞機能のヌクレオチド配列をコードする(例えば、「付属機能」)。アクセサリ機能は、AAV遺伝子転写の活性化、ステージ特異的AAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、キャップ発現産物の合成、およびAAVキャプシドアセンブリに関与する部分を含むが、これらに限定されない、AAV複製に必要な機能を含

10

20

30

40

50

む。ウイルススペースのアクセサリ機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス1型以外)、およびワクシニアウイルスなどの既知のヘルパーウイルスのいずれかに由来し得る。いくつかの態様において、AAVヘルパー機能およびアクセサリ機能が単一のベクター上にクローニングされるダブルトランスフェクション法を使用して、rAAV粒子を生成する。

【0193】

AAVキャプシドは、rAAV粒子の組織特異性を決定する際の重要な要素である。したがって、特定のキャプシド組織特異性を有するrAAV粒子を選択することができる。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV.Rh10、AAV11、およびそれらの変異体から選択されるAAV血清型から選択されるキャプシドを含む。ある態様において、AAVキャプシドは、血液脳関門を通過し得る血清型、例えば、AAV9、AAVrh.10、またはそのバリエーションから選択される。ある態様において、AAVキャプシドは、キメラAAVキャプシドである。

【0194】

ある態様において、rAAVベクターは、霊長類血清型AAVベクターまたはヒト血清型AAVベクターを含む哺乳類血清型AAVベクター(例えば、AAVゲノムおよび哺乳動物血清型AAV由来のITR)である。いくつかの実施形態において、AAVベクターは、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV.Rh10、AAV11、およびそれらの変異体のいずれか1つに由来する。ある態様において、AAVベクターはキメラAAVベクターである。ある態様において、rAAVベクターは、同じAAV血清型に由来するAAVゲノムおよびAAVキャプシドを含むベクターであり得る。ある態様において、rAAVベクターは偽型であり、これは、rAAVベクターが1つのAAV血清型に由来するAAVゲノムおよび少なくとも部分的に異なるAAV血清型に由来するAAVキャプシドを含むことを意味する。

【0195】

ある態様において、rAAVベクターはAAV9血清型である。ある態様において、rAAVは、AAV9キャプシドタンパク質(例えば、米国特許第7,198,951号の配列番号2)、AAV9 repタンパク質(例えば、米国特許第7,198,951号の配列番号3)、またはその両方を含む。ある態様において、rAAVは、(i)AAV9キャプシドタンパク質(例えば、米国特許第7,198,951号の配列番号2)、および(ii)AAV2 ITRを含む。

【0196】

ある態様において、rAAV粒子は、中枢神経系(CNS)の細胞を形質導入することができる。ある態様において、rAAV粒子は、CNSの非神経細胞または神経細胞を形質導入することができる。ある態様において、CNS細胞は、ニューロン、グリア細胞、星状細胞、またはミクログリア細胞である。

【0197】

ある態様において、rAAVベクターは、自己相補的AAV(scAAV)ベクターである。scAAVベクターは、二量体逆方向反復ゲノムの形態の二つの相補的DNA鎖を含む。二量体逆方向反復ゲノム内の二つの相補的鎖は、一緒にアニールして、即時複製および転写の準備ができている一本の二本鎖DNAを形成し、したがって宿主細胞DNA合成の必要性をバイパスする。自己相補的AAVベクターは、米国特許第7,465,583号;7,790,154号;8,361,457号;および8,784,799号に記載されている。

【0198】

本開示はまた、本明細書に記載の二本鎖RNAをコードするDNA配列を含むrAAVでトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。ある態様において、宿主細胞は、原核細胞または真核細胞である。ある態様において、宿主細胞は、哺乳類細胞(例えば、HEK293T、COS細胞、HeLa細胞、KB細胞)、細菌細胞(大腸菌)、酵母細胞、昆虫細胞(Sf9、Sf21、ショウジョウバエ、蚊)などである。ある態様において、宿主細胞は、ヒト被験体から得られるかまたは由来する。ある態様において、宿主細胞は、線維芽細胞である。

【0199】

二本鎖RNAの一方または両方の鎖をコードするDNA分子

【0200】

本開示は、本開示の二本鎖RNAの第1の鎖をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子を提供する。場合によっては、第1の鎖をコードするヌクレオチド配列は、プロモーターに機能的に連結されている。場合によっては、第1の鎖をコードするヌクレオチド配列は、真核細胞において機能的であるプロモーターに機能的に連結されている。本開示は、以下をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子を提供する:i)本開示の二本鎖RNAの第1の鎖;およびii)本開示の二本鎖RNAの第2の鎖。場合によっては、第1の鎖および第2の鎖をコードするヌクレオチド配列は、プロモーターに機能的に連結されている。場合によっては、プロモーターは、PolIIプロモーターである。場合によっては、プロモーターは、U6プロモーターである。場合によっては、プロモーターは、CAGプロモーターである。場合によっては、プロモーターは、CBAプロモーターである。場合によっては、プロモーターは、CMVプロモーターである。場合によっては、プロモーターは、EF1 α プロモーターである。場合によっては、プロモーターはH1プロモーターである。場合によっては、本開示のDNA分子は、配列番号295~375のいずれか1つをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【0201】

組換えRNA分子

【0202】

20

本開示は、以下を含む組換え核酸(例えば組換えRNA;「人工マイクロRNA」または「低分子結合RNA」(sbRNA)と称され得る)を提供する:a)本開示の二本鎖RNA;およびb)5'フランキングポリヌクレオチド(本明細書において「5'リーダー」とも称する)、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチド(本明細書において「3'トレーラー」とも称する)を含むマイクロRNA足場であって、組換え核酸は、i)5'フランキングポリヌクレオチド;ii)二本鎖RNAの第一の鎖;iii)ループポリヌクレオチド;(iv)二本鎖RNAの第二の鎖;iii)3'トレーラーポリヌクレオチド;5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、二本鎖RNAの第1の鎖および/または第2の鎖に対して異種性である。本開示は、以下を含む組換え核酸(例えば組換えRNA)を提供する:a)本開示の二本鎖RNA;およびb)5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNA足場であって、組換え核酸が以下を含む:i)5'フランキングポリヌクレオチド;ii)二本鎖RNAの第2の鎖;iii)ループポリヌクレオチド;(iv)二本鎖RNAの第1の鎖;iii)3'フランキングポリヌクレオチド;5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、二本鎖RNAの第1の鎖および/または第2の鎖に対して異種性である。場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドはmiR33に由来する。

30

【0203】

本開示は、以下を含む組換え核酸(例えば組換えRNA;「人工マイクロRNA」または「低分子結合RNA」(sbRNA)と称され得る)を提供する:a)本開示の二本鎖RNA;およびb)5'フランキングポリヌクレオチド(本明細書において「5'リーダー」とも称する)および3'フランキングポリヌクレオチド(本明細書において「3'トレーラー」とも称する)を含むマイクロRNA足場であって、組換え核酸は、i)5'フランキングポリヌクレオチド;ii)二本鎖RNAの第一の鎖;iii)二本鎖RNAの第二の鎖;およびiv)3'トレーラーポリヌクレオチド;5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、二本鎖RNAの第一の鎖および/または第二の鎖に対して異種性である。本開示は、以下を含む組換え核酸(例えば組換えRNA)を提供する:a)本開示の二本鎖RNA;およびb)5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNA足場であって、組換え核酸が以下を含む:i)5'フランキングポリヌクレオチド;ii)二

40

50

本鎖RNAの第二の鎖;iii)二本鎖RNAの第一の鎖;およびiv)3'フランキングポリヌクレオチド;5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、二本鎖RNAの第一の鎖および/または第二の鎖に対して異種性である。場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドはmiR451に由来する。

【0204】

組換えRNA分子をコードするカセット

【0205】

本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子(例えば、発現ベクターに挿入して組換え発現ベクターを生成することができる「カセット」)を提供する。ここで、組換えRNA分子は、a)本開示の二本鎖RNA;並びにb)5'フランキングポリヌクレオチド(本明細書において「5'リーダー」とも称する)、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチド(本明細書において「3'トレーラー」とも称する)を含むマイクロRNA足場であって、組換え核酸は、i)5'フランキングポリヌクレオチド;ii)二本鎖RNAの第一の鎖;iii)ループポリヌクレオチド;(iv)二本鎖RNAの第二の鎖;iii)3'トレーラーポリヌクレオチド;5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、二本鎖RNAの第一の鎖および/または第二の鎖に対して異種性である、を含む。本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子(例えば、発現ベクターに挿入して組換え発現ベクターを生成することができる「カセット」)を提供し、組換えRNA分子は、a)本開示の二本鎖RNA;並びにb)5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNA足場であって、組換え核酸は、i)5'フランキングポリヌクレオチド;ii)二本鎖RNAの第二の鎖;iii)ループポリヌクレオチド;(iv)二本鎖RNAの第一の鎖;iii)3'フランキングポリヌクレオチド;5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、二本鎖RNAの第一の鎖および/または第二の鎖に対して異種性である、を含む。場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドはmiR33由来である。場合によっては、カセットはPol3転写配列を含む。例えば、場合によっては、カセットは、3'トレーラーポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド配列TTTTTG 3'を含む。ある場合には、カセットは、ヌクレオチド配列Tn(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)を10含む。ある場合には、カセットは約110ヌクレオチド~約150ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、カセットはPol II転写配列を含む。例えば、場合によっては、カセットは3'フランキングポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列の3'のポリアデニル化配列を含む。

【0206】

本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子(例えば、発現ベクターに挿入して組換え発現ベクターを生成することができる「カセット」)を提供し、組換えRNA分子は、a)本開示の二本鎖RNA;並びにb)5'フランキングポリヌクレオチド(本明細書では「5'リーダー」とも称する)および3'フランキングポリヌクレオチド(本明細書では「3'トレーラー」とも称する)を含むマイクロRNA足場であって、組換え核酸は、i)5'フランキングポリヌクレオチド;ii)二本鎖RNAの第一の鎖;iii)二本鎖RNAの第二の鎖;およびiv)3'トレーラーポリヌクレオチド;5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、二本鎖RNAの第一の鎖および/または第二の鎖に対して異種性である、を含む。本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子(例えば、発現ベクターに挿入して組換え発現ベクターを生成することができる「カセット」)を提供し、ここで、組換えRNA分子は、a)本開示の二本鎖RNA;並びにb)5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNA足場であって、組換え核酸は、i)5'フランキングポリヌクレオチド;ii)二本鎖RNAの第二の鎖;iii)二本鎖RNAの第一の鎖;お

よびiv)3'フランキングポリヌクレオチド;5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、二本鎖RNAの第一の鎖および/または第二の鎖に対して異種性である、を含む。場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドはmiR451に由来する。場合によっては、カセットはPol3転写配列を含む。例えば、場合によっては、カセットは3'トレーラーポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド配列TTTTTG 3'を含む。ある場合には、カセットは、ヌクレオチド配列Tn(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)を10含む。場合によっては、カセットは約110ヌクレオチド~約650ヌクレオチド(例えば、110ヌクレオチド(nt)~115 nt、115 nt~120 nt、500 nt~600 nt、または600 nt~610 nt)の長さを有する。場合によっては、カセットはPol II

10

【0207】

場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggggcagctg(配列番号738)を含む。場合によっては、ループポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列tgtctggcaatcctg(配列番号739)を含む。場合によっては、3'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列ggggaggcctgccctgactgcccac(配列番号740)を含む。場合によっては、カセットはPol3転写配列を含む。例えば、場合によっては、カセットは、3'トレーラーポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド配列TTTTTG 3'を含む。場合によっては、カセットは約110ヌクレオチド~約150ヌクレオチドの長さを有する。場合によっては、カセットはPol II転写配列を含む。例えば、場合によっては、カセットは3'フランキングポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列のポリアデニル化配列3'を含む。

20

【0208】

場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列acctactgactgccagggcacttgggaatggcaagg(配列番号854)を含む。場合によっては、3'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列tcttgctatacccagaaaacgtgccaggaagagaac(配列番号855)を含む。場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列acctactgactgccagggcacttgggaatggcaagg(配列番号854)を含む。また、3'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列tcttgctatacccagaaaacgtgccaggaagagaac(配列番号855)を含む。

30

【0209】

場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列gctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattaaggcggaattcgagctcggtacctcgcgaaatgcatctagatatcggcgctatgcttcctgtgccccagtggggccctggctgggatTtcatcatatactgtaagtttgcgatgagacactacagtatagatgatgtactagtccggggcacccccagctctggagcctgacaaggaggagagagatgctgcaagcccaagaa gctctctgctcagcctgtcacacactactgactgccagggcacttgggaatggcaagg(配列番号856)を含む。場合によっては、3'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列tcttgctatacccagaaaacgtgccaggaagagaactcaggaccctgaagcagactactggaaggagactccagctcaaacaaggcaggggtggggcgctgggattgggggt aggggaggggaatagatacattttctctttcctgttgtaaagaaataaagataagccaggcacagtggc tcacgcctgtaatcccaccactttcagaggccaaggcgctggatccagatctcgagcggccgcccg(配列番号857)を含む。場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、ヌクレオチド配列gctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcat tttggcaaagaattaaggcggaattcgagctcggtacctcgcgaaatgcatctagatatcggcgctatg cttcctgtgccccagtggggccctggctgggatTtcatcatatactgtaagtttgcgatgagacacta cagtatagatgatgtactagtccggggcacccccagctctggagcctgacaaggaggagagagat

40

50

gctgcaagcccaagaagctctctgctcagcctgtcacaacctactgactgccagggcacttgaggatg
gcaagg(配列番号856)を含む;および3'フランキングポリヌクレオチドをコードするカ
セットの部分は、ヌクレオチド配列tcttgctatacccagaaaacgtgccaggaagagaactcag
gacctgaagcagactactggaaggagactccagctcaaacaaggcaggggtgggggctgggat
tgggggtaggggaggggaatagatacattttctctttcctgttgtaaagaaataaagataagccaggca
cagtggtcagcctgtaatcccaccactttcagaggccaaggcgctggatccagatctcgagcgccg
gccc(配列番号857)を含む。

【0210】

場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部分は、
ヌクレオチド配列gctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattaa
ggggaattcgagctcggtacctcgcaatgcatctagatatcggcgctatgcttctgtgccccagtg
ggggccctggctgggatAtcatcatatactgtaagtttgcgatgagacactacagtatagatgatgta
ctagtccgggcacccccagctctggagcctgacaaggaggacaggagagatgctgcaagcccaaga
agctctctgctcagcctgtcacaacctactgactgccagggcacttgaggatggcaagg(配列番号8
58)を含む。場合によっては、3'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの
部分は、ヌクレオチド配列tcttgctatacccagaaaacgtgccaggaagagaactcaggacctg
aagcagactactggaaggagactccagctcaaacaaggcaggggtgggggctgggattgggggt
aggggaggggaatagatacattttctctttcctgttgtaaagaaataaagataagccaggcacagtggc
tcacgcctgtaatcccaccactttcagaggccaaggcgctggatccagatctcgagcgccgccc(配
列番号859)を含む。場合によっては、5'フランキングポリヌクレオチドをコードするカ
セットの部分は、ヌクレオチド配列gctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattt
tgcaaagaattaaaggcgcaattcgagctcggtacctcgcaatgcatctagatatcggcgctatgct
tcctgtgccccagtggggacctggctgggatAtcatcatatactgtaagtttgcgatgagacactaca
gtatagatgatgtactagtccgggcacccccagctctggagcctgacaaggaggacaggagagatgc
tgcaagcccaagaagctctctgctcagcctgtcacaacctactgactgccagggcacttgaggatggc
aagg(配列番号858)を含む;3'フランキングポリヌクレオチドをコードするカセットの部
分は、ヌクレオチド配列tcttgctatacccagaaaacgtgccaggaagagaactcaggacctgaa
gcagactactggaaggagactccagctcaaacaaggcaggggtgggggctgggattgggggtag
gggaggggaatagatacattttctctttcctgttgtaaagaaataaagataagccaggcacagtggctca
cgctgtaatcccaccactttcagaggccaaggcgctggatccagatctcgagcgccgccc(配列番
号859)を含む。

【0211】

以下は、カセットの非限定的な例である。以下のカセットにおいて:(i)tgcacacctcct
ggcgggcagctctg(配列番号738)は、5'リーダーポリヌクレオチドをコードする;(ii)第
1の大文字配列は、二本鎖RNAの第1の鎖をコードする;(iii)tgttctggcaatacctg(配列
番号739)は、ループポリヌクレオチドをコードする;(iv)第2の大文字配列は、二本鎖R
NAの第2の鎖をコードする;(v)gggaggcctgccctgactgcccac(配列番号740)は、3'ト
レーラーポリヌクレオチドをコードする;および(vi)TTTTTGは、Pol3転写終結配列であ
る。場合によっては、カセットは、3'TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセ
ットは、3'TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列Tn(例えば、nは、5、6、7、8
、9または10である)を含む。場合によっては、カセットは3'TTTTTG配列の代わりにヌ
クレオチド配列TTTTTを含む。

【0212】

1)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctg
CTGCTGCTAATGCTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号579;表7の「CUG-10」;図23)を含
む。場合によっては、カセットは3'TTTTTG配列を含まない。

2)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctg
CTGCTGCTACAGCTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGAAGCAGCAG
CAgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号580;表7の「CUG_19」;図23)を

含む。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

3)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTACTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAGAAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号581;表7の「CUG_28」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

4)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTGATGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAACAGAAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号582;表7の「CUG_37」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

5)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGAAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号583;表7の「CUG_46」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

6)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTGCTACTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAGAAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号584;表7の「CUG_55」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

7)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTGCTGATGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAACAGCAGAAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号585;表7の「CUG_64」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

8)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGCTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号586;表7の「CUG_118」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

9)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGATACTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAACAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号587;表7の「CUG_127」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

10)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGATGATGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAACAACAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号588;表7の「CUG_136」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

11)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGATGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号589;表7の「CUG_145」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

12)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGATGCTACTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAACAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号590;表7の「CUG_154」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

13)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGATGCTGATGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAACAGCAACAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号591;表7の「CUG_163」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

14)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGCAACTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAGCAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号592;表7の「CUG_217」;図23)。場合によっては、カセットは3' TTTTGTG配列を含まない;

15)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgC

10

20

30

40

50

TGCTGCTGCAGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号593;表7の「CUG_226」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
16)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTGCAGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号594;表7の「CUG_235」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
17)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTGCAGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号595;表7の「CUG_244」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
18)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTGCAGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号596;表7の「CUG_253」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
19)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAGCTGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号597;表7の「CUG_NA-A」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
20)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAACTGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGCAGAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号598;表7の「CUG_NA_B」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
21)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAGATGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号599;表7の「CUG_NA_C」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセット
は3' TTTTTG配列を含まない;
22)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAGCAGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号600;表7の「CUG_NA_D」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
23)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAGCTACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号601;表7の「CUG_NA_E」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
24)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAGCTGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号602;表7の「CUG_NA_F」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
25)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAGCTGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号603;表7の「CUG_NA_G」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
26)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAGCTGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAGCAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号604;表7の「CUG_NA_H」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
27)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCAGCTGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGC

10

20

30

40

50

AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号605;表7の「CUG_NA_I」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

28)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAAAGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号606;表7の「CUG_307」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

29)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号607;表7の「CUG_334」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

30)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号608;表7の「CUG_361」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

31)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号609;表7の「CUG_388」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

32)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号610;表7の「CUG_415」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

33)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTACAGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAGAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号611;表7の「CUG_631」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

34)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTACAGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号612;表7の「CUG_658」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

35)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTACAGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAGAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号613;表7の「CUG_712」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

36)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTGAAGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAACAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号614;表7の「CUG_2116」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

37)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTGAAGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号615;表7の「CUG_2143」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

38)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTGAAGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAACAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号616;表7の「CUG_2170」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

39)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG 配列番号617;表7の「CUG_442」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

10

20

30

40

50

- 40) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号618;表7の「CUG_604」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 41) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号619;表7の「CUG_685」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 42) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号620;表7の「CUG_2089」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 43) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号621;表7の「CUG_2197」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 44) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTAAAGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAAAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号622;表7の「CUG_4870」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 45) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAGAAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号623;表7の「CUG_9973」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 46) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAGATGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAACAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号624;表7の「CUG_1013」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 47) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAGCAGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号625;表7の「CUG_1070」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 48) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAGATACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAACAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号626;表7の「CUG_2341」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 49) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAGCAACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号627;表7の「CUG_2398」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 50) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTAAAAGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAAAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号628;表7の「CUG_4789」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 51) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTAAAGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAAAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号629;表7の「CUG_4951」;図23)。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;
- 52) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTAAAGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAAAAGCAGCAGC`

10

20

30

40

50

AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号630;表7の「CUG_5032」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

53)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAAAGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号631;表7の「CUG_5113」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

54)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATAATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAAAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号632;表7の「CUG_5599」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

55)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATACAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号633;表7の「CUG_5680」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

56)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATACTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGAAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号634;表7の「CUG_5761」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

57)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATACTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGAAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号635;表7の「CUG_5842」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

58)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGAAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号636;表7の「CUG_6328」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

59)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGATACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAACAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号637;表7の「CUG_6409」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

60)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGATGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAACAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号638;表7の「CUG_6490」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

61)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGCAACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号639;表7の「CUG_6976」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

62)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGCAGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号640;表7の「CUG_7057」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

63)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTAATGCTAATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAAAAGCAAAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号641;表7の「CUG_7543」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

64)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTACAAATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAAAAGAAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号642;表7の「CUG_9244」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

10

20

30

40

50

65) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAACAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号643;表7の「CUG_9325」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

66) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAACACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGAAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号644;表7の「CUG_9406」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

67) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAACAGTATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGAAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号645;表7の「CUG_9487」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

68) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAGATACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAACAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号646;表7の「CUG_10054」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

69) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAGCAACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号647;表7の「CUG_10621」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

70) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTACAGCTAATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAAAAGCAGAAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号648;表7の「CUG_11188」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

71) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAAATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAAAAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号649;表7の「CUG_222609」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

72) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAACAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号650;表7の「CUG_22690」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

73) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAACTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGAAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号651;表7の「CUG_22771」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

74) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAACTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGAAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号652;表7の「CUG_22852」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

75) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAGAAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号653;表7の「CUG_233338」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

76) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAGATGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAACAACAGCAGCAGC`
`AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG`(配列番号654;表7の「CUG_23500」;図23)
。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

77) 場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列 `tgacacacctcctggcgggcagctctgC`
`TGCTGCTGAAGCAGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAACAGCAGCAGC`

10

20

30

40

50

AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号655;表7の「CUG_24067」;図23)
)。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない;

78)場合によっては、カセットは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctggcgggcagctctgC
TGCTGCTGAAGCTAATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAAAAGCAACAGCAGCAGC
AgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG(配列番号656;表7の「CUG_24553」;図23)
)。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。

【0213】

以下は、カセットの非限定的な例である。以下のカセットにおいて、5' 隣接ポリヌクレオチドおよび3' 隣接ポリヌクレオチドの対は、i) 配列番号854および配列番号855; ii) 配列番号856および配列番号857;およびiii) 配列番号858および配列番号859を含む。
場合によっては、カセットは3' TTTTTG転写終結配列を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは3' 末端にヌクレオチド配列T_nを含み、ここで、nは5~10までの整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは3' 末端にヌクレオチド配列TTTTTを含む。
非限定的な例としては、図25に示すカセットが挙げられる。

【0214】

1) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号379; iii) 配列番号379に相補的な配列であって、配列番号379に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号379; iii) 配列番号379に相補的な配列であって、配列番号379に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号379; iii) 配列番号379に相補的な配列であって、配列番号379に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号859を含む。

【0215】

2) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号380; iii) 配列番号380に相補的な配列であって、配列番号380に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号380; iii) 配列番号380に相補的な配列であって、配列番号380に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号380; iii) 配列番号380に相補的な配列であって、配列番号380に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号859を含む。

【0216】

3) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号381; iii) 配列番号381に相補的な配列であって、配列番号381に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号381; iii) 配列番号381に相補的な配列であって、配列番号381に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号381; iii) 配列番号381に相補的な配列であって、配列番号381に対する0から10のミスマッチ(非相補的ヌクレオチド)を含むことができる配列;およびiv) 配列番号859を含む。

【0217】

4) ある場合には、カセットは、5' から3' の順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号3

10

20

30

40

50

50

50

50

8) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号386 ; iii) 配列番号386に相補的な配列であって、配列番号386に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号386 ; iii) 配列番号386に相補的な配列であって、配列番号386に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii)

【 0 2 2 2 】

10

【 0 2 2 3 】

20

【 0 2 2 4 】

30

【 0 2 2 5 】

40

【 0 2 2 6 】

50

【 0 2 2 7 】

【 0 2 2 8 】

【 0 2 2 9 】

【 0 2 3 0 】

17) 場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号393; iii) 配列番号393に相補的な配列であって、配列番号393に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。ある場合には、カセットは、5'から3'の順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号393; iii) 配列番号393に相補的な配列であって、配列番号393に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号393; iii) 配列番号393に相補的な配列であって、配列番号393に対する0か

【 0 2 3 1 】

【 0 2 3 2 】

【 0 2 3 3 】

【 0 2 3 4 】

【 0 2 3 5 】

22) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号398 ; iii) 配列番号398に相補的な配列であって、配列番号398に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号8

【 0 2 3 6 】

10

20

30

40

【 0 2 4 0 】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

35) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号411 ; iii) 配列番号411に相補的な配列であって、配列番号411に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号411 ; iii) 配列番号411に相補的な配列であって、配列番号411に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号411 ; iii) 配列番号411に相補的な配列であって、配列番号411に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。

10

20

30

40

50

50

50

50

40) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号416 ; iii) 配列番号416に相補的な配列であって、配列番号416に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号416 ; iii) 配列番号416に相補的な配列であって、配列番号416に対する0か

【 0 2 5 4 】

【 0 2 5 5 】

【 0 2 5 6 】

【 0 2 5 7 】

【 0 2 5 8 】

【 0 2 6 3 】

10

【 0 2 6 4 】

20

【 0 2 6 5 】

30

【 0 2 6 6 】

40

【 0 2 6 7 】

50

10

20

30

40

50

50

50

50

58) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号434 ; iii) 配列番号434に相補的な配列であって、配列番号434に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号434 ; iii) 配列番号434に相補的な配列であって、配列番号434に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858

【 0 2 7 2 】

10

【 0 2 7 3 】

20

【 0 2 7 4 】

30

【 0 2 7 5 】

40

【 0 2 7 6 】

50

【 0 2 7 7 】

【 0 2 7 8 】

【 0 2 7 9 】

【 0 2 8 0 】

配列番号443 ; iii) 配列番号443に相補的な配列であって、配列番号443に対する0か 50

【 0 2 8 1 】

【 0 2 8 2 】

【 0 2 8 3 】

【 0 2 8 4 】

【 0 2 8 5 】

72) 場合によっては、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号448 ; iii) 配列番号448に相補的な配列であって、配列番号448に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号8

【 0 2 8 6 】

10

20

30

40

配列番号859を含む。

【0290】

77) 場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号453; iii) 配列番号453に相補的な配列であって、配列番号453に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。ある場合には、カセットは、5'から3'の順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号453; iii) 配列番号453に相補的な配列であって、配列番号453に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号453; iii) 配列番号453に相補的な配列であって、配列番号453に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。

10

【0291】

78) 場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号454; iii) 配列番号454に相補的な配列であって、配列番号454に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号454; iii) 配列番号454に相補的な配列であって、配列番号454に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号454; iii) 配列番号454に相補的な配列であって、配列番号454に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。

20

【0292】

79) 場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号455; iii) 配列番号455に相補的な配列であって、配列番号455に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号455; iii) 配列番号455に相補的な配列であって、配列番号455に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号455; iii) 配列番号455に相補的な配列であって、配列番号455に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。

30

【0293】

80) 場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号456; iii) 配列番号456に相補的な配列であって、配列番号456に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。場合によっては、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号456; iii) 配列番号456に相補的な配列であって、配列番号456に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。ある場合には、カセットは、5'から3'の順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号456; iii) 配列番号456に相補的な配列であって、配列番号456に対する0から10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。

40

【0294】

[sbRNAをコードする組換え発現ベクター]

本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを提供する（ここで、組換えRNA分子は、「人工マイクロRNA」または「sbRNA」と称され得る）。ある場合には、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、

50

真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、CMVプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、CAGプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、U6プロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。場合によっては、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、H1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' アデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR) 配列および3' AAV ITR配列を含む。

10

20

30

40

50

【0295】

本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを提供し、ここで、組換えRNA分子は、a) 本開示の二本鎖RNAと；b) 5' フランキングポリヌクレオチド (本明細書において「5' リーダー」とも称する)、ループポリヌクレオチド、および3' フランキングポリヌクレオチド (本明細書において「3' トレーラー」とも称する) を含むマイクロRNAスキュフォールド (足場) とを含み、組換え核酸は、i) 5' フランキングポリヌクレオチド；ii) 二本鎖RNAの第一の鎖；iii) ループポリヌクレオチド；iv) 二本鎖RNAの第二の鎖；およびiii) 3' トレーラーポリヌクレオチドを含み、5' フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3' フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性 (heterologous) である。本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを提供し、ここで、組換えRNA分子は、a) 本開示の二本鎖RNAと；b) 5' フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3' フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドとを含み、組換え核酸は、i) 5' フランキングポリヌクレオチド；ii) 二本鎖RNAの第二の鎖；iii) ループポリヌクレオチド；iv) 二本鎖RNAの第一の鎖；iii) 3' フランキングポリヌクレオチドを含み、5' フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3' フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性である。場合によっては、5' フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3' フランキングポリヌクレオチドはmiR33に由来するものである。

【0296】

本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを提供し、ここで、組換えRNA分子は、a) 本開示の二本鎖RNAと、b) 5' フランキングポリヌクレオチド (本明細書において「5' リーダー」とも称する) および3' フランキングポリヌクレオチド (本明細書において「3' トレーラー」とも称する) を含むマイクロRNAスキュフォールドとを含み、組換え核酸は、i) 5' フランキングポリヌクレオチド；ii) 二本鎖RNAの第一の鎖；iii) 二本鎖RNAの第二の鎖；およびiv) 3' トレーラーポリヌクレオチドを含み、5' フランキングポリヌクレオチドおよび3' フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性である。本開示は、本開示の組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを提供し、ここで、組換えRNA分子は、a) 本開示の二本鎖RNAと；b) 5' フランキングポリヌクレオチドおよび3' フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドとを含み、組換え核酸は、i) 5' フランキングポリヌクレオチド；ii) 二本鎖RNAの第二の鎖；iii) 二本鎖RNAの第一の鎖；およびiv) 3' フランキングポリヌクレオチドを含み、5' フランキングポリヌクレオチドおよび3' フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、二本鎖RNAの第一の鎖および／または第

二の鎖に対して異種性である。場合によっては、5' フランキングポリヌクレオチドおよび3' フランキングポリヌクレオチドはmiR451に由来するものである。

【0297】

〔カセットを含む組換え発現ベクター〕

本開示は、本開示のカセット（「DNA分子」）を含む組換え発現ベクターを提供し、ここで、カセットは、本開示の組換えRNA分子（ここで、組換えRNA分子は、「人工マイクロRNA」または「sbRNA」と称され得る）をコードするヌクレオチド配列を含む。場合によっては、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。場合によっては、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。場合によっては、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。場合によっては、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、CMVプロモーターに作動可能に連結される。場合によっては、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、U6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、EF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換えRNA分子をコードするヌクレオチド配列は、H1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' アデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復（ITR）配列および3' AAV ITR配列を含む。

【0298】

以下は、本開示のカセットを含む組換え発現ベクターの非限定的な例である。

【0299】

1) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTAATGCTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAAAGCAGCAGCAGgggagggcctgcccctgactgcccacTTTTTG（配列番号579；表7の「CUG-10」；図23）を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 N を含み、ここで n は5~10の整数である（例えば、 n は、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0300】

2) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACAGCTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAAGCAGCAGCAGgggagggcctgcccctgactgcccacTTTTTG（配列番号580；表7の「CUG_19」；図23）を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 N を含み、ここで n は5~10の整数である（例えば、 n は、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されて

いる。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0301】

3) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTACTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAG AAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号581; 表7の「CUG_28」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0302】

4) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTGATGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAACAG AAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号582; 表7の「CUG_37」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0303】

5) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTGCAGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA GAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号583; 表7の「CUG_46」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場

合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITR 10 Rである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0304】

6) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAGAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号584; 表7の「CUG_55」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITR 20 である。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0305】

7) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACTGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAGAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号585; 表7の「CUG_64」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITR 30 である。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0306】

8) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA 40

ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号586; 表7の「CUG_118」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0307】

9) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGATACTGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAGAA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号587; 表7の「CUG_127」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0308】

10) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGATGATGCTGCTGtgttctggcaatacctgCAGCAGCAACA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号588; 表7の「CUG_136」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9

40

50

ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0309】

11) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGATGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号589; 表7の「C UG_145」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0310】

12) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGATGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号590; 表7の「C UG_154」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0311】

13) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGATGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号591; 表7の「C UG_163」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によ

っては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0312】

14) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGCAACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAA GCAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号592; 表7の「CUG_217」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0313】

15) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGCAGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号593; 表7の「CUG_226」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0314】

16) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTGCAGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号594; 表7の「CUG_235」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結さ

れている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0315】

17) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggagcgtctgCTGCTGCTGCAGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCA GCAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号595; 表7の「CUG_244」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 A_n を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0316】

18) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggagcgtctgCTGCTGCTGCAGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCA GCAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号596; 表7の「CUG_253」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 A_n を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0317】

19) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggagcgtctgCTGCTGCAGCTGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号597; 表7の「CUG_NA-A」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない

10

20

30

40

50

。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0318】

20) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCAACTGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA GAAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG（配列番号598；表7の「CUG_NA_B」；図23）を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0319】

21) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCAGATGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA ACAGCAGCAGCAGggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG（配列番号599；表7の「CUG_NA_C」；図23）を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

40

50

【0320】

22) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCAGCAGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号600; 表7の「C UG_NA_D」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0321】

23) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCAGCTACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAA GCAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号601; 表7の「C UG_NA_E」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0322】

24) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCAGCTGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACA GCAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号602; 表7の「C UG_NA_F」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カ

40

50

セットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0323】

25) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCAGCTGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号603; 表7の「CUG_NA_G」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 J を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0324】

26) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCAGCTGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAGCAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号604; 表7の「CUG_NA_H」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 J を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0325】

27) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCAGCTGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号605; 表7の「CUG_NA_I」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 J を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に

連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0326】

28) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAAAGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号606; 表7の「CUG_307」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0327】

29) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAATACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号607; 表7の「CUG_334」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0328】

30) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAATGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号608; 表7の「CUG_361」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含

み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0329】

31) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTAATGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCAAAGCAGCAGCAGgggagggcctgcccctgactgcccacTTTTTG（配列番号609；表7の「CUG_388」；図23）を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0330】

32) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTAATGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAAAGCAGCAGCAGgggagggcctgcccctgactgcccacTTTTTG（配列番号610；表7の「CUG_415」；図23）を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

40

【0331】

33) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg

50

gcggggcagctctgCTGCTGCTACAGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACA
GAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号611; 表7の「C
UG_631」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。
場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\mathbb{N}$ を含
み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。
場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されてい
る。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結さ
れている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に
連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結され
ている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。
場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によ
っては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カ
セットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットは
H1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは
、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9
ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0332】

34) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg
gcggggcagctctgCTGCTGCTACAGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA
GAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号612; 表7の「C
UG_658」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。
場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\mathbb{N}$ を含
み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。
場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されてい
る。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結さ
れている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に
連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結され
ている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。
場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によ
っては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カ
セットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットは
H1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは
、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9
ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0333】

35) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg
gcggggcagctctgCTGCTGCTACAGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCA
GAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号613; 表7の「C
UG_712」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。
場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\mathbb{N}$ を含
み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。
場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されてい
る。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結さ
れている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に
連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結され
ている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。
場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によ
っては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カ
セットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットは
H1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは

40

50

、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0334】

36) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号614; 表7の「CUG_2116」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0335】

37) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号615; 表7の「CUG_2143」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0336】

38) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号616; 表7の「CUG_2170」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。

場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0337】

39) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTAATGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCAAAGCAGCAGCAGgggagggcctggccctgactgcccacTTTTTG (配列番号617; 表7の「CUG_442」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0338】

40) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACAAGCTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAAGCAGCAGCAGgggagggcctggccctgactgcccacTTTTTG (配列番号618; 表7の「CUG_604」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0339】

41) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACAGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCAAGCAGCAGCAGgggagggcctggccctgactgcccacTTTTTG (配列番号619; 表7の「CUG_685」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されてい

る。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0340】

42) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号620; 表7の「CUG_2089」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

【0341】

43) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号621; 表7の「CUG_2197」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

【0342】

44) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAAAGATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACA AAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号622; 表7の「C

50

UG_4870」；図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0343】

45) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTACAGAAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACA GAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号623；表7の「CUG_9973」；図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0344】

46) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTACAGATGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAACA GAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号624；表7の「CUG_1013」；図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

40

50

【0345】

47) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTACAGCAGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCA GAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号625; 表7の「CUG_1070」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0346】

48) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGATACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAACA ACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号626; 表7の「CUG_2341」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0347】

49) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGCAACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGC AACAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号627; 表7の「CUG_2398」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、

40

50

カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0348】

50) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAAACTGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号628; 表7の「CUG_4789」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 J を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0349】

51) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAAAGCAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGCA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号629; 表7の「CUG_4951」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 J を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0350】

52) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAAAGCTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号630; 表7の「CUG_5032」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 J を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に

連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0351】

53) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAAAGCTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCA AAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号631; 表7の「CUG_5113」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0352】

54) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAATAATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAAAA AAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号632; 表7の「CUG_5599」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0353】

55) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAATACAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAA AAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号633; 表7の「CUG_5680」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含

み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0354】

56) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTAATACTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGAA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG（配列番号634；表7の「CUG_5761」；図23）を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0355】

57) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTAATACTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGAA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG（配列番号635；表7の「CUG_5842」；図23）を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5～10の整数である（例えば、nは、5、6、7、8、9または10である）。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

40

【0356】

58) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg

50

gcggggcagctctgCTGCTGCTAATGAAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAACA
AAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号636; 表7の「C
UG_6328」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。
場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\mathbb{N}$ を含
み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。
場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されてい
る。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結さ
れている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に
連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結され
ている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。
場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によ
っては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カ
セットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットは
H1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは
、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9
ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0357】

59) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg
gcggggcagctctgCTGCTGCTAATGATACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAACA
AAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号637; 表7の「C
UG_6409」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。
場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\mathbb{N}$ を含
み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。
場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されてい
る。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結さ
れている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に
連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結され
ている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。
場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によ
っては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カ
セットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットは
H1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは
、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9
ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0358】

60) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg
gcggggcagctctgCTGCTGCTAATGATGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAACA
AAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号638; 表7の「C
UG_6490」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。
場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\mathbb{N}$ を含
み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。
場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されてい
る。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結さ
れている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に
連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結され
ている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。
場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によ
っては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カ
セットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットは
H1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは

40

50

、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0359】

61) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAATGCAACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号639; 表7の「CUG_6976」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0360】

62) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAATGCAGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGCA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号640; 表7の「CUG_7057」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0361】

63) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgacacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTAATGCTAATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAAAAGCA AAAGCAGCAGCAGgggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号641; 表7の「CUG_7543」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{A}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。

場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0362】

64) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACAAATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAAGAAAGCAGCAGCAGgggagggcctggccctgactgcccacTTTTTG (配列番号642; 表7の「CUG_9244」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0363】

65) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACAACAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAAGCAGCAGCAGgggagggcctggccctgactgcccacTTTTTG (配列番号643; 表7の「CUG_9325」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0364】

66) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctggcgggcagctctgCTGCTGCTACAACACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAAGAAAGCAGCAGCAGgggagggcctggccctgactgcccacTTTTTG (配列番号644; 表7の「CUG_9406」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されてい

る。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0365】

67) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTACAACTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGAA GAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号645; 表7の「CUG_9487」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

【0366】

68) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTACAGATACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAACA GAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号646; 表7の「CUG_10054」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 I_n を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

【0367】

69) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTACAGCAACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGCA GAAGCAGCAGCAGgggaggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号647; 表7の「C

50

UG_10621」；図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。
【0368】

10

20

30

70) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTACAGCTAATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAAAAGCA GAAGCAGCAGCAGgggagggcctgcccctgactgcccacTTTTTG (配列番号648；表7の「CUG_11188」；図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。
【0369】

40

50

71) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAAATGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAAAA ACAGCAGCAGCAGgggagggcctgcccctgactgcccacTTTTTG (配列番号649；表7の「CUG_222609」；図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である(例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0370】

72) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAACAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAGAAACAGCAGCAGCAGggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号650; 表7の「CUG_22690」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0371】

73) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAACTACTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGAAGAAACAGCAGCAGCAGCAGggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号651; 表7の「CUG_22771」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0372】

74) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列 tgcacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAACTGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGAAACAGCAGCAGCAGCAGggagggcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号652; 表7の「CUG_22852」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{N}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、

40

50

カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0373】

75) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGAAGCTGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAGCAAC AACAGCAGCAGCAGggaggagcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号653; 表7の「CUG_233338」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{TTTTTTG}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0374】

76) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGATGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAACA ACAGCAGCAGCAGggaggagcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号654; 表7の「CUG_23500」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{TTTTTTG}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV 9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0375】

77) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGCAGATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAACAGC AACAGCAGCAGCAGggaggagcctgccctgactgcccacTTTTTG (配列番号655; 表7の「CUG_24067」; 図23)を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{\text{TTTTTTG}}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動

可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0376】

78) いくつかの場合では、組換え発現ベクターは、ヌクレオチド配列tgccacacctcctg gcgggcagctctgCTGCTGCTGAAGCTAATGCTGtggttctggcaatacctgCAGCAAAAGCA ACAGCAGCAGCAGgggagggcctgcccctgactgcccacTTTTTG (配列番号656; 表7の「CUG_24553」; 図23) を含む。場合によっては、カセットは3' TTTTTG配列を含まない。場合によっては、カセットは、3' TTTTTG配列の代わりに、ヌクレオチド配列 $\overline{n}$ を含み、ここでnは5~10の整数である (例えば、nは、5、6、7、8、9または10である)。場合によっては、カセットは真核細胞で機能するプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはRNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCAGプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCBAプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはCMVプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはU6プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはEF1 α プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、カセットはH1プロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。場合によっては、AAV ITRはAAV9 ITRである。場合によっては、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0377】

以下は、本開示のカセットを含む組換え発現ベクターのさらなる非限定的な例である。

【0378】

1) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854; i) 配列番号379; iii) 配列番号379に相補的な配列であって、配列番号379に対して0~10のミスマッチ (非相補的ヌクレオチド) を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号379; iii) 配列番号379に相補的な配列であって、配列番号379に対する0~10のミスマッチ (非相補的ヌクレオチド) を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号379; iii) 配列番号379に相補的な配列であって、配列番号379に対する0~10のミスマッチ (非相補的ヌクレオチド) を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合に

において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0379】

2) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; i) 配列番号380; iii) 配列番号380に相補的な配列であって、配列番号380に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号380; iii) 配列番号380に相補的な配列であって、配列番号380に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号380; iii) 配列番号380に相補的な配列であって、配列番号380に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0380】

3) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; i) 配列番号381; iii) 配列番号381に相補的な配列であって、配列番号381に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号381; iii) 配列番号381に相補的な配列であって、配列番号381に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号381; iii) 配列番号381に相補的な配列であって、配列番号381に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

30

40

50

【0381】

4) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854 ; i) 配列番号382 ; iii) 配列番号382に相補的な配列であって、配列番号382に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号382 ; iii) 配列番号382に相補的な配列であって、配列番号382に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号382 ; iii) 配列番号382に相補的な配列であって、配列番号382に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0382】

5) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854 ; i) 配列番号383 ; iii) 配列番号383に相補的な配列であって、配列番号383に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号383 ; iii) 配列番号383に相補的な配列であって、配列番号383に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号383 ; iii) 配列番号383に相補的な配列であって、配列番号383に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0383】

6) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを

含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; i) 配列番号384 ; iii) 配列番号384に相補的な配列であって、配列番号384に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号384 ; iii) 配列番号384に相補的な配列であって、配列番号384に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号384 ; iii) 配列番号384に相補的な配列であって、配列番号384に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

30

40

50

【0384】

7) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; i) 配列番号385 ; iii) 配列番号385に相補的な配列であって、配列番号385に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号385 ; iii) 配列番号385に相補的な配列であって、配列番号385に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号385 ; iii) 配列番号385に相補的な配列であって、配列番号385に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0385】

8) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; i) 配列番号386 ; iii) 配列番号386に相補的な配列であって、配列番号386に対して0

～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号856；ii）配列番号386；iii）配列番号386に相補的な配列であって、配列番号386に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号858；ii）配列番号386；iii）配列番号386に相補的な配列であって、配列番号386に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

【0386】

9) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号854；ii）配列番号387；iii）配列番号387に相補的な配列であって、配列番号387に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号856；ii）配列番号387；iii）配列番号387に相補的な配列であって、配列番号387に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号858；ii）配列番号387；iii）配列番号387に相補的な配列であって、配列番号387に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

【0387】

10) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号854；ii）配列番号388；iii）配列番号388に相補的な配列であって、配列番号388に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配

50

列番号856；ii) 配列番号388；iii) 配列番号388に相補的な配列であって、配列番号388に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号388；iii) 配列番号388に相補的な配列であって、配列番号388に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0388】

11) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号389；iii) 配列番号389に相補的な配列であって、配列番号389に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号389；iii) 配列番号389に相補的な配列であって、配列番号389に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号389；iii) 配列番号389に相補的な配列であって、配列番号389に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

40

【0389】

12) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号390；iii) 配列番号390に相補的な配列であって、配列番号390に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号390；iii) 配列番号390に相補的な配列であって、配列番号390に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；お

50

よびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号390；iii) 配列番号309に相補的な配列であって、配列番号390に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0390】

13) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号391；iii) 配列番号391に相補的な配列であって、配列番号391に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号391；iii) 配列番号391に相補的な配列であって、配列番号391に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号391；iii) 配列番号391に相補的な配列であって、配列番号391に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

40

【0391】

14) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号390；iii) 配列番号390に相補的な配列であって、配列番号390に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号390；iii) 配列番号390に相補的な配列であって、配列番号390に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号390；iii) 配列番号390に相補的な配列であって

50

、配列番号390に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0392】

15) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号391；iii) 配列番号391に相補的な配列であって、配列番号391に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号391；iii) 配列番号391に相補的な配列であって、配列番号391に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号391；iii) 配列番号391に相補的な配列であって、配列番号391に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0393】

16) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号392；iii) 配列番号392に相補的な配列であって、配列番号392に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号392；iii) 配列番号392に相補的な配列であって、配列番号392に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号392；iii) 配列番号392に相補的な配列であって、配列番号392に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核

40

50

細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0394】

17) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号393 ; iii) 配列番号393に相補的な配列であって、配列番号393に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号393 ; iii) 配列番号393に相補的な配列であって、配列番号393に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号393 ; iii) 配列番号393に相補的な配列であって、配列番号393に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0395】

18) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号394 ; iii) 配列番号394に相補的な配列であって、配列番号394に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号394 ; iii) 配列番号394に相補的な配列であって、配列番号394に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号394 ; iii) 配列番号394に相補的な配列であって、配列番号394に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、

40

50

合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0396】

19) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号395 ; iii) 配列番号395に相補的な配列であって、配列番号395に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号395 ; iii) 配列番号395に相補的な配列であって、配列番号395に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号395 ; iii) 配列番号395に相補的な配列であって、配列番号395に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0397】

20) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号396 ; iii) 配列番号396に相補的な配列であって、配列番号396に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号396 ; iii) 配列番号396に相補的な配列であって、配列番号396に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号396 ; iii) 配列番号396に相補的な配列であって、配列番号396に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。い

40

50

くつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0398】

21) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号397 ; iii) 配列番号397に相補的な配列であって、配列番号397に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号397 ; iii) 配列番号397に相補的な配列であって、配列番号397に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号397 ; iii) 配列番号397に相補的な配列であって、配列番号397に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0399】

22) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号398 ; iii) 配列番号398に相補的な配列であって、配列番号398に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号398 ; iii) 配列番号398に相補的な配列であって、配列番号398に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号398 ; iii) 配列番号398に相補的な配列であって、配列番号398に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合に

において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0400】

23) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号399 ; iii) 配列番号399に相補的な配列であって、配列番号399に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号399 ; iii) 配列番号399に相補的な配列であって、配列番号399に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号399 ; iii) 配列番号399に相補的な配列であって、配列番号399に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0401】

24) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号400 ; iii) 配列番号400に相補的な配列であって、配列番号400に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号400 ; iii) 配列番号400に相補的な配列であって、配列番号400に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号400 ; iii) 配列番号400に相補的な配列であって、配列番号400に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において

、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0402】

25) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号401 ; iii) 配列番号401に相補的な配列であって、配列番号401に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号401 ; iii) 配列番号401に相補的な配列であって、配列番号401に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号401 ; iii) 配列番号401に相補的な配列であって、配列番号401に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0403】

26) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号402 ; iii) 配列番号402に相補的な配列であって、配列番号402に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号402 ; iii) 配列番号402に相補的な配列であって、配列番号402に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号402 ; iii) 配列番号402に相補的な配列であって、配列番号402に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合

において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0404】

27) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号403; iii) 配列番号403に相補的な配列であって、配列番号403に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号403; iii) 配列番号403に相補的な配列であって、配列番号403に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号403; iii) 配列番号403に相補的な配列であって、配列番号403に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

【0405】

28) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号404; iii) 配列番号404に相補的な配列であって、配列番号404に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号404; iii) 配列番号404に相補的な配列であって、配列番号404に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号404; iii) 配列番号404に相補的な配列であって、配列番号404に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

50

【0406】

29) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号405; iii) 配列番号405に相補的な配列であって、配列番号405に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号405; iii) 配列番号405に相補的な配列であって、配列番号405に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号405; iii) 配列番号405に相補的な配列であって、配列番号405に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0407】

30) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号406; iii) 配列番号406に相補的な配列であって、配列番号406に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号406; iii) 配列番号406に相補的な配列であって、配列番号406に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号406; iii) 配列番号406に相補的な配列であって、配列番号406に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0408】

31) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つ

を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号407 ; iii) 配列番号407に相補的な配列であって、配列番号407に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号407 ; iii) 配列番号407に相補的な配列であって、配列番号407に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号407 ; iii) 配列番号407に相補的な配列であって、配列番号407に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

【0409】

32) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号408 ; iii) 配列番号408に相補的な配列であって、配列番号408に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号408 ; iii) 配列番号408に相補的な配列であって、配列番号408に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号408 ; iii) 配列番号408に相補的な配列であって、配列番号408に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

【0410】

33) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号409 ; iii) 配列番号409に相補的な配列であって、配列番号409に対し

50

て0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号856；ii）配列番号409；iii）配列番号409に相補的な配列であって、配列番号409に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号858；ii）配列番号409；iii）配列番号409に相補的な配列であって、配列番号409に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

【0411】

34) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号854；ii）配列番号410；iii）配列番号410に相補的な配列であって、配列番号410に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号856；ii）配列番号410；iii）配列番号410に相補的な配列であって、配列番号410に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号858；ii）配列番号410；iii）配列番号410に相補的な配列であって、配列番号410に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

【0412】

35) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号854；ii）配列番号411；iii）配列番号411に相補的な配列であって、配列番号411に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配

50

列番号856；ii) 配列番号411；iii) 配列番号411に相補的な配列であって、配列番号411に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号411；iii) 配列番号411に相補的な配列であって、配列番号411に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0413】

36) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号412；iii) 配列番号412に相補的な配列であって、配列番号412に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号412；iii) 配列番号412に相補的な配列であって、配列番号412に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号412；iii) 配列番号412に相補的な配列であって、配列番号412に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

40

【0414】

37) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号413；iii) 配列番号413に相補的な配列であって、配列番号413に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号413；iii) 配列番号413に相補的な配列であって、配列番号413に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；お

50

よびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号413；iii) 配列番号413に相補的な配列であって、配列番号413に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0415】

38) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号414；iii) 配列番号414に相補的な配列であって、配列番号414に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号414；iii) 配列番号414に相補的な配列であって、配列番号414に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号414；iii) 配列番号414に相補的な配列であって、配列番号414に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

40

【0416】

39) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号415；iii) 配列番号415に相補的な配列であって、配列番号415に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号415；iii) 配列番号415に相補的な配列であって、配列番号415に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号415；iii) 配列番号415に相補的な配列であって

50

、配列番号415に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

30

40

50

【0417】

40) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号416；iii) 配列番号416に相補的な配列であって、配列番号416に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号416；iii) 配列番号416に相補的な配列であって、配列番号416に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号416；iii) 配列番号416に相補的な配列であって、配列番号416に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0418】

41) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号417；iii) 配列番号417に相補的な配列であって、配列番号417に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号417；iii) 配列番号417に相補的な配列であって、配列番号417に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号417；iii) 配列番号417に相補的な配列であって、配列番号417に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核

細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0419】

42) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号418 ; iii) 配列番号418に相補的な配列であって、配列番号418に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号418 ; iii) 配列番号418に相補的な配列であって、配列番号418に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号418 ; iii) 配列番号418に相補的な配列であって、配列番号418に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0420】

43) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号419 ; iii) 配列番号419に相補的な配列であって、配列番号419に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号419 ; iii) 配列番号419に相補的な配列であって、配列番号419に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号419 ; iii) 配列番号419に相補的な配列であって、配列番号419に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、

40

50

合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0421】

44) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号420 ; iii) 配列番号420に相補的な配列であって、配列番号420に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号420 ; iii) 配列番号420に相補的な配列であって、配列番号420に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号420 ; iii) 配列番号420に相補的な配列であって、配列番号420に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0422】

45) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号421 ; iii) 配列番号421に相補的な配列であって、配列番号421に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号421 ; iii) 配列番号421に相補的な配列であって、配列番号421に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号421 ; iii) 配列番号421に相補的な配列であって、配列番号421に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。い

40

50

くつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0423】

46) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号422 ; iii) 配列番号422に相補的な配列であって、配列番号422に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号422 ; iii) 配列番号422に相補的な配列であって、配列番号422に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号422 ; iii) 配列番号422に相補的な配列であって、配列番号422に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0424】

47) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号423 ; iii) 配列番号423に相補的な配列であって、配列番号423に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号423 ; iii) 配列番号423に相補的な配列であって、配列番号423に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号423 ; iii) 配列番号423に相補的な配列であって、配列番号423に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合に

において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0425】

48) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号424 ; iii) 配列番号424に相補的な配列であって、配列番号424に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号424 ; iii) 配列番号424に相補的な配列であって、配列番号424に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号424 ; iii) 配列番号424に相補的な配列であって、配列番号424に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0426】

49) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号425 ; iii) 配列番号425に相補的な配列であって、配列番号425に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号425 ; iii) 配列番号425に相補的な配列であって、配列番号425に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号425 ; iii) 配列番号425に相補的な配列であって、配列番号425に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において

、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0427】

50) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号426 ; iii) 配列番号426に相補的な配列であって、配列番号426に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号426 ; iii) 配列番号426に相補的な配列であって、配列番号426に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号426 ; iii) 配列番号426に相補的な配列であって、配列番号426に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0428】

51) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号427 ; iii) 配列番号427に相補的な配列であって、配列番号427に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号427 ; iii) 配列番号427に相補的な配列であって、配列番号427に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号427 ; iii) 配列番号427に相補的な配列であって、配列番号427に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合

において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0429】

52) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号428; iii) 配列番号428に相補的な配列であって、配列番号428に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号428; iii) 配列番号428に相補的な配列であって、配列番号428に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号428; iii) 配列番号428に相補的な配列であって、配列番号428に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

【0430】

53) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号429; iii) 配列番号429に相補的な配列であって、配列番号429に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号429; iii) 配列番号429に相補的な配列であって、配列番号429に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号429; iii) 配列番号429に相補的な配列であって、配列番号429に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

50

【0431】

54) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号430; iii) 配列番号430に相補的な配列であって、配列番号430に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号430; iii) 配列番号430に相補的な配列であって、配列番号430に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号430; iii) 配列番号430に相補的な配列であって、配列番号430に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0432】

55) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号431; iii) 配列番号431に相補的な配列であって、配列番号431に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号431; iii) 配列番号431に相補的な配列であって、配列番号431に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号431; iii) 配列番号431に相補的な配列であって、配列番号431に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0433】

56) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つ

50

を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号432 ; iii) 配列番号432に相補的な配列であって、配列番号432に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号432 ; iii) 配列番号432に相補的な配列であって、配列番号432に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号432 ; iii) 配列番号432に相補的な配列であって、配列番号432に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

30

40

50

【0434】

57) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号433 ; iii) 配列番号433に相補的な配列であって、配列番号433に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号433 ; iii) 配列番号433に相補的な配列であって、配列番号433に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号433 ; iii) 配列番号433に相補的な配列であって、配列番号433に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0435】

58) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号434 ; iii) 配列番号434に相補的な配列であって、配列番号434に対し

て0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号856；ii）配列番号434；iii）配列番号434に相補的な配列であって、配列番号434に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号858；ii）配列番号434；iii）配列番号434に相補的な配列であって、配列番号434に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

【0436】

59) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号854；ii）配列番号435；iii）配列番号435に相補的な配列であって、配列番号435に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号856；ii）配列番号435；iii）配列番号435に相補的な配列であって、配列番号435に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号858；ii）配列番号435；iii）配列番号435に相補的な配列であって、配列番号435に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

【0437】

60) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配列番号854；ii）配列番号436；iii）配列番号436に相補的な配列であって、配列番号436に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i）配

50

列番号856；ii) 配列番号436；iii) 配列番号436に相補的な配列であって、配列番号436に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号436；iii) 配列番号436に相補的な配列であって、配列番号436に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0438】

61) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号437；iii) 配列番号437に相補的な配列であって、配列番号437に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号437；iii) 配列番号437に相補的な配列であって、配列番号437に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号437；iii) 配列番号437に相補的な配列であって、配列番号437に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

40

【0439】

62) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号438；iii) 配列番号438に相補的な配列であって、配列番号438に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号438；iii) 配列番号438に相補的な配列であって、配列番号438に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；お

50

よびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号438；iii) 配列番号438に相補的な配列であって、配列番号438に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0440】

63) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号439；iii) 配列番号439に相補的な配列であって、配列番号439に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号439；iii) 配列番号439に相補的な配列であって、配列番号439に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号439；iii) 配列番号439に相補的な配列であって、配列番号439に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

40

【0441】

64) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号440；iii) 配列番号440に相補的な配列であって、配列番号440に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号440；iii) 配列番号440に相補的な配列であって、配列番号440に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号440；iii) 配列番号440に相補的な配列であって

50

、配列番号440に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv）配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0442】

65) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号441；iii) 配列番号441に相補的な配列であって、配列番号441に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号441；iii) 配列番号441に相補的な配列であって、配列番号441に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号441；iii) 配列番号441に相補的な配列であって、配列番号441に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0443】

66) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854；ii) 配列番号442；iii) 配列番号442に相補的な配列であって、配列番号442に対して0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856；ii) 配列番号442；iii) 配列番号442に相補的な配列であって、配列番号442に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858；ii) 配列番号442；iii) 配列番号442に相補的な配列であって、配列番号442に対する0～10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核

40

50

細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0444】

67) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号443 ; iii) 配列番号443に相補的な配列であって、配列番号443に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号443 ; iii) 配列番号443に相補的な配列であって、配列番号443に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号443 ; iii) 配列番号443に相補的な配列であって、配列番号443に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0445】

68) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号444 ; iii) 配列番号444に相補的な配列であって、配列番号444に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号444 ; iii) 配列番号444に相補的な配列であって、配列番号444に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号444 ; iii) 配列番号444に相補的な配列であって、配列番号444に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、

40

50

合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

【0446】

69) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号445 ; iii) 配列番号445に相補的な配列であって、配列番号445に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号445 ; iii) 配列番号445に相補的な配列であって、配列番号445に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号445 ; iii) 配列番号445に相補的な配列であって、配列番号445に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

20

30

【0447】

70) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号446 ; iii) 配列番号446に相補的な配列であって、配列番号446に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号446 ; iii) 配列番号446に相補的な配列であって、配列番号446に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号446 ; iii) 配列番号446に相補的な配列であって、配列番号446に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。い

40

50

くつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0448】

71) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号447 ; iii) 配列番号447に相補的な配列であって、配列番号447に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号447 ; iii) 配列番号447に相補的な配列であって、配列番号447に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号447 ; iii) 配列番号447に相補的な配列であって、配列番号447に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0449】

72) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号448 ; iii) 配列番号448に相補的な配列であって、配列番号448に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号448 ; iii) 配列番号448に相補的な配列であって、配列番号448に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号448 ; iii) 配列番号448に相補的な配列であって、配列番号448に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合に

において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0450】

73) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号449 ; iii) 配列番号449に相補的な配列であって、配列番号449に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号449 ; iii) 配列番号449に相補的な配列であって、配列番号449に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号449 ; iii) 配列番号449に相補的な配列であって、配列番号449に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0451】

74) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号450 ; iii) 配列番号450に相補的な配列であって、配列番号450に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号450 ; iii) 配列番号450に相補的な配列であって、配列番号450に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号450 ; iii) 配列番号450に相補的な配列であって、配列番号450に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列；およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において

、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0452】

75) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号451 ; iii) 配列番号451に相補的な配列であって、配列番号451に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号451 ; iii) 配列番号451に相補的な配列であって、配列番号451に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号451 ; iii) 配列番号451に相補的な配列であって、配列番号451に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0453】

76) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号854 ; ii) 配列番号452 ; iii) 配列番号452に相補的な配列であって、配列番号452に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号856 ; ii) 配列番号452 ; iii) 配列番号452に相補的な配列であって、配列番号452に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5' から3' への順序で、i) 配列番号858 ; ii) 配列番号452 ; iii) 配列番号452に相補的な配列であって、配列番号452に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列 ; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合

において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0454】

77) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号453; iii) 配列番号453に相補的な配列であって、配列番号453に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号453; iii) 配列番号453に相補的な配列であって、配列番号453に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号453; iii) 配列番号453に相補的な配列であって、配列番号453に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

10

20

【0455】

78) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号454; iii) 配列番号454に相補的な配列であって、配列番号454に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号454; iii) 配列番号454に相補的な配列であって、配列番号454に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号454; iii) 配列番号454に相補的な配列であって、配列番号454に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

30

40

50

【0456】

79) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号455; iii) 配列番号455に相補的な配列であって、配列番号455に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号455; iii) 配列番号455に相補的な配列であって、配列番号455に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号455; iii) 配列番号455に相補的な配列であって、配列番号455に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0457】

80) いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、以下のカセットのうちの1つを含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号854; ii) 配列番号456; iii) 配列番号456に相補的な配列であって、配列番号456に対して0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号855を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号856; ii) 配列番号456; iii) 配列番号456に相補的な配列であって、配列番号456に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号857を含む。いくつかの場合において、カセットは、5'から3'への順序で、i) 配列番号858; ii) 配列番号456; iii) 配列番号456に相補的な配列であって、配列番号456に対する0~10のミスマッチ（非相補的ヌクレオチド）を含むことができる配列; およびiv) 配列番号859を含む。いくつかの場合において、カセットは、真核細胞において機能するプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CAGプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、CBAプロモーターに作動可能に連結される。ある場合には、カセットは、CMVプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、U6プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、EF1 α プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、カセットは、H1プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの場合において、組換え発現ベクターは、5' AAV ITR配列および3' AAV ITR配列を含む。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV9 ITRである。いくつかの場合において、AAV ITRはAAV2 ITRである。

【0458】

[送達媒体]

本開示の組換え発現ベクターは、送達媒体中に存在し得る。したがって、本開示は、本開示の組換え発現ベクターを含む送達媒体を提供する。場合によっては、送達媒体は非ウイルス送達媒体である。場合によっては、送達媒体は脂質ナノ粒子である。場合によっては、送達媒体はウイルス送達媒体である。場合によっては、ウイルス送達媒体は組換えAAVビリオンである。適切なAAVビリオンには、AAV2キャプシド、AAV9キャプシド等を有するものが含まれる。

【0459】

適切な脂質ナノ粒子には、例えば、1つ以上のカチオン性脂質、ポリ(エチレングリコール)で修飾された脂質(「PEG化脂質」)などが含まれ得る。適切なカチオン性脂質には、XTC(2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン)、MC3((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタン酸)、ALNY-100((3aR,5s,6aS)-N,N-ジメチル-2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1,3]ジオキソール-5-アミン)、NC98-5(4,7,13-トリス(3-オキソ-3-(ウンデシルアミノ)プロピル)-N1,N16-ジウンデシル-4,7,10,13-テトラアザヘキサデカン-1,16-ジアミド)、DODAP(1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン)、HGT4003、ICE、HGT5000、シスまたはトランスHGT5001、DOTAP(1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)、DOTMA(1,2-ジ-O-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)、DLinDMA、DLin-KC2-DMA、およびC12-200が含まれるが、これらに限定されない。脂質ナノ粒子に含めることができる他の適切な脂質には、DSPC(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DPPC(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DPPE(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DMPE(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DOPG(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール))、およびコレステロールが含まれるが、これらに限定されない。適切なPEG化脂質には、例えば、PEG-DSG(例えばPEG-1000、PEG-2000、PEG-5000等とコンジュゲート化した1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール)、PEG-DMG(PEGとコンジュゲート化した1,2-ジミリストイル-rac-グリセロール)、およびPEG-セラミドが含まれる。

【0460】

【D. 医薬組成物】

本開示は、本明細書に記載の二本鎖RNAをコードする核酸(例えばDNA)、発現カセット、またはベクターと、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に許容される」とは、妥当な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わず合理的な利益/リスク比に見合った、細胞および/または組織と接触して使用するのに適した化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。

【0461】

本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」は、本発明において有用な化合物を、その意図された機能を果たすことができるように、患者へまたは患者の体内で運搬または輸送することに関与する薬学的に許容される材料、組成物または担体、例えば液体もしくは固体の充填剤、安定剤、分散剤、懸濁剤、希釈剤、賦形剤、増粘剤、溶媒またはカプセル化材料を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、接触している細胞または組織に有害でないという意味において「許容可能」でなければならない。本発明の実施に使用される医薬組成物に含まれ得るさらなる成分は、当技術分野において公知であり、例えば、参照により本明細書に組み入れられるRemington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA)に記述されている。

【0462】

医学分野において周知のように、任意の一患者に対する投与量は、患者のサイズ、体重

、体表面積、年齢、治療効果を達成するために必要な阻害RNA発現の発現レベル、阻害核酸の安定性、治療される特定の疾患、疾患のステージ、性別、投与の時間とルート、一般的な健康状態、および同時に投与される他の薬物を含む多くの因子に依存する。

【0463】

いくつかの実施形態において、本明細書に記述されるrAAVは、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 2.1×10^{11} 、 2.2×10^{11} 、 2.3×10^{11} 、 2.4×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 2.6×10^{11} 、 2.7×10^{11} 、 2.8×10^{11} 、 2.9×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 7.1×10^{11} 、 7.2×10^{11} 、 7.3×10^{11} 、 7.4×10^{11} 、 7.5×10^{11} 、 7.6×10^{11} 、 7.7×10^{11} 、 7.8×10^{11} 、 7.9×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.1×10^{12} 、 1.2×10^{12} 、 1.3×10^{12} 、 1.4×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 1.6×10^{12} 、 1.7×10^{12} 、 1.8×10^{12} 、 1.9×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 8.1×10^{12} 、 8.2×10^{12} 、 8.3×10^{12} 、 8.4×10^{12} 、 8.5×10^{12} 、 8.6×10^{12} 、 8.7×10^{12} 、 8.8×10^{12} 、 8.9×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 6.7×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 、または 1×10^{16} VG／対象の量で対象に投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記述されるrAAV粒子は、約 1×10^6 VG/kgから約 1×10^{16} VG/kgの量、あるいは約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 2.1×10^{11} 、 2.2×10^{11} 、 2.3×10^{11} 、 2.4×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 2.6×10^{11} 、 2.7×10^{11} 、 2.8×10^{11} 、 2.9×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 7.1×10^{11} 、 7.2×10^{11} 、 7.3×10^{11} 、 7.4×10^{11} 、 7.5×10^{11} 、 7.6×10^{11} 、 7.7×10^{11} 、 7.8×10^{11} 、 7.9×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.1×10^{12} 、 1.2×10^{12} 、 1.3×10^{12} 、 1.4×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 1.6×10^{12} 、 1.7×10^{12} 、 1.8×10^{12} 、 1.9×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 8.1×10^{12} 、 8.2×10^{12} 、 8.3×10^{12} 、 8.4×10^{12} 、 8.5×10^{12} 、 8.6×10^{12} 、 8.7×10^{12} 、 8.8×10^{12} 、 8.9×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 6.7×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 、または 1×10^{16} VG/kgの量で対象に投与される。

【0464】

医薬組成物は、医学分野の当業者によって決定されるように、治療される（または予防される）疾患または状態に適した態様で投与することができる。組成物の適切な投与量ならびに適切な投与期間および投与頻度は、患者の健康状態、患者のサイズ（すなわち、体

10

20

30

40

50

重、体積または体面積)、患者の疾患のタイプおよび重篤度、活性成分の特定の形態、および投与方法のような因子によって決定される。一般に、適切な用量および治療レジメンは、治療的および／または予防的利益(本明細書に記載されているような、改善された臨床転帰、例えば、より頻繁な完全または部分寛解、より長い無病生存および／または全生存、または症状の重症度の軽減などを含む)を提供するのに十分な量で組成物(複数可)を提供する。予防的使用の場合、用量は、疾患または障害に関連して、疾患を予防する、疾患の発症を遅延させる、または疾患の重症度を軽減するのに十分なものであるべきである。本明細書に記載される方法に従って投与される組成物の予防的利益は、前臨床試験(インビトロおよびインビボ動物試験を含む)および臨床試験を実施し、適切な統計的、生物学的、および臨床的方法および技術によって得られたデータを分析することによって決定することができ、そのすべては当業者によって容易に実施することができる。

10

【0465】

組成物(例えば、医薬組成物)は、経腸(例えば経口)、非経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、軟膜下、実質内、線条体内、頭蓋内、脳槽内、脳内、脳内脳室内、眼内、脳室内、腰椎内、皮下、経皮、皮内、直腸、腔内、腹腔内、局所(パウダー、軟膏、クリーム、および／またはドロップによるもの等)、粘膜、鼻、頬、舌下を含む任意のルートによって；気管内注入、気管支注入、および／または吸入によって；および／または経口スプレー、鼻腔スプレー、および／またはエアロゾルとして、投与され得る。一般に、最も適切な投与経路は、作用物質の性質(例えば、消化管環境における安定性)、および／または被験体の状態を含む様々な因子に依存する。いくつかの態様において、組成物は、被験体のCNSに直接注入される。いくつかの態様において、CNSへの直接注射は、脳内注射、脳室内注射、実質内注射、髄腔内注射、線条体内注射、軟膜下注射、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、CNSへの直接注射は、被験体の脳脊髄液(CSF)への直接注射であり、場合により、直接注射は、脳槽内注射、脳室内注射、および／または腰椎内注射である。いくつかの態様において、組成物は、CNSへの直接注射と、CNSに直接注射されない経路(例えば、静脈内)との組み合わせによって投与される。

20

【0466】

いくつかの態様において、rAAV粒子を含む医薬組成物は、特に高rAAV粒子濃度が存在する場合(例えば、約 10^{13} VG/mlまたはそれ以上)には、rAAV粒子の凝集を低減するように製剤化される。rAAV粒子の凝集を減少させる方法は、当該分野において周知であり、例えば、界面活性剤の添加、pH調整、塩濃度調整などが挙げられる(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれているWright F Rら、Molecular Therapy (2005) 12:171-178を参照されたい。)

30

【0467】

[D. キット]

ある態様において、本明細書で提供される組成物は、治療または研究用途におけるそれらの使用を促進させるために、薬学的または研究用キットにアセンブルされ得る。キットは、以下のものを含む1つ以上の容器を含むことができる：(a) 本明細書に記載の二本鎖RNAをコードする発現カセットまたはベクター；(b) 使用説明書；および任意で(c) キット成分(a)を宿主細胞に形質導入するための試薬。いくつかの態様において、キット成分(a)は、特定の使用および投与様式に適した薬学的処方および用量であり得る。例えば、キット成分(a)は、密封されたアンプルまたはバイアルなどの単位用量または複数用量容器で提供され得る。キットの成分は、使用前に1つ以上の成分を混合することを必要とし得、あるいは予め混合された状態で調製され得る。キットの成分は、液体または固体の形態であり得、溶媒の添加またはさらなる希釈を必要とし得る。キットの成分は、無菌であり得る。説明書は、書面または電子形態であり得、キットに付随する(例えば、付属文書、CD、DVD)か、もしくはインターネットもしくはウェブベースの通信を介して提供され得る。キットは、冷蔵または冷凍温度で出荷および保管され得る。

40

【0468】

50

[E. 使用方法]

本開示は、治療方法で使用するための、本明細書に記載の核酸(例えばDNA)、発現カセット、カセットを含む組換え発現ベクター、二本鎖RNAをコードする組換え発現ベクター、または医薬組成物を提供する。

【0469】

本開示は、CAGリピート伸長障害を有する個体における疾患関連CAGリピート含有RNAの翻訳を選択的に減少させる方法を提供し、この方法は、有効量の本開示の組換え発現ベクター、本開示の送達媒体、本開示のウイルス粒子、または本開示の医薬組成物を個体に投与することを含む。いくつかの場合では、リピート伸長障害は、ハンチントン病、脊髄小脳失調症1型、脊髄小脳失調症2型、脊髄小脳失調症3型、脊髄小脳失調症6型、脊髄小脳失調症7型、脊髄小脳失調症12型、脊髄小脳失調症17型、脊髄および球筋萎縮症、齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、または鎖骨頭蓋異形成症である、場合によっては、前記投与は、個体の中枢神経系への直接注射を含む。場合によっては、直接注射は、脳内注射、脳室内注射、実質内注射、髄腔内注射、線条体内注射、視床内注射、大槽内注射、軟膜下注射、またはそれらの任意の組合せである。場合によっては、前記投与は、疾患関連CAGリピート含有RNAによってコードされるポリペプチドに対する、非疾患関連CAGリピート含有RNAによってコードされるポリペプチドの比を、1.0超にする。場合によっては、前記投与により、疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドに対する、非疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドの比を、1.1~1.8(例えば、1.1~1.4、1.4~1.6、または1.6~1.8)にする。場合によっては、前記投与により、疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドに対する、非疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドの比を、1.8超(例えば、2.0、2.0~2.2、2.2~2.4、2.4~2.6、2.6~2.8、2.8~3.0)。

【0470】

本開示は、哺乳動物細胞におけるCAGリピート含有RNA(例えばmRNAまたはプレmRNA)の発現を低減または阻害する方法であって、5'から3'へ、

- (a) 5'リーダー配列；
- (b) パッセンジャー配列を含むまたは実質的に含む5'ステム；
- (c) 5'リンカー；
- (d) 末端ループ；
- (e) 3'リンカー；
- (f) ガイド配列を含むまたは実質的に含む3'ステム；および
- (g) 3'トレーラー配列；

を含む二本鎖RNAを哺乳動物細胞に導入することを含み、

ここで前記ガイド配列は、CAGリピート含有RNA(例えばmRNAまたはプレmRNA)のCAGリピート領域を標的とし；前記二本鎖RNAが前記哺乳動物細胞によって切断されてガイド配列およびパッセンジャー配列を含むsiRNAが産生され、前記siRNAのガイド配列は、CAGリピート領域に対する1~5塩基のミスマッチを、前記siRNAのガイド配列の位置8~16に含む、方法を提供する。

【0471】

いくつかの実施形態において、CAGリピート含有mRNAの発現を阻害することは、例えば、CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域に結合し、CAGリピート含有mRNAの分解によるのではなくCAGリピート含有タンパク質の翻訳をブロックすることによって、当該CAGリピート含有mRNAによってコードされるポリグルタミン含有タンパク質の発現を阻害することを含む。

【0472】

いくつかの実施形態において、本方法は、CAGリピート含有RNAの病理的または病原的アリの発現を減少または阻害する。いくつかの実施形態において、本方法は、CAGリピート含有RNAの正常アリの発現と比較して、CAGリピート含有RNAの病理的または病原的アリの発現を選択的に減少または阻害する。

【0473】

いくつかの実施形態において、二本鎖RNAは、pre-miRNAスキヤフォールド、pri-miRNAスキヤフォールド、またはshRNA内に含まれる。いくつかの実施形態において、二本鎖RNAは、哺乳動物細胞においてDROSHAおよび／またはDICERによって切断されてsiRNAを生じる。

【0474】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対する少なくとも1つのミスマッチは、siRNAのガイド配列の位置8～12に位置する。いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対する少なくとも1つのミスマッチは、siRNAのガイド配列の位置9～11に位置する。いくつかの実施形態において、siRNAのガイド配列の位置8～16に位置する、CAGリピート領域に対する2つ以上のミスマッチは連続している。いくつかの実施形態において、siRNAのガイド配列の位置8～16に位置する、CAGリピート領域に対する少なくとも1つのミスマッチは、siRNAのガイド配列の位置8～16に位置する別のミスマッチに隣接していない。

【0475】

いくつかの実施形態において、5'リーダー配列は3'トレーラー配列と相補的ではない。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列は3'トレーラー配列と部分的に相補的である。いくつかの実施形態において、3'トレーラー配列はポリUテールを含む。いくつかの実施形態において、ポリUテールは3～6個のウリジンを有する。

【0476】

いくつかの実施形態において、5'リーダー配列および／または3'トレーラー配列は、長さが約1ヌクレオチド～約500ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、5'リーダー配列および／または3'トレーラー配列は、長さが約1ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約75ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約25ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約1ヌクレオチド～約10ヌクレオチドである。

【0477】

ある態様において、ガイド配列は、約15～約30ヌクレオチドを有する。ある態様において、ガイド配列は、約19～約24ヌクレオチドを有する。ある態様において、ガイド配列は、表B1～B2に示されるヌクレオチド配列を有する。ある態様において、パッセンジャー配列は、ガイド配列に対して100%相補的である。ある態様において、パッセンジャー配列は、ガイド配列に対して部分的に相補的である。ある態様において、パッセンジャー配列は、ガイド配列に対して1～10塩基または1～5塩基のミスマッチまたはバルジを含む。

【0478】

ある態様において、5'リンカーは、3'リンカーに対して100%相補的である。

【0479】

いくつかの実施形態において、末端ループは、約4ヌクレオチド～約1,000ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約900ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約800ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約700ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約600ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約90ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約80ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約70ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約40ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約30ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約4ヌクレオチド～約10ヌクレオチドを有する。二本鎖RNAのさらなる特徴は、本明細書中に記述されている。

【0480】

いくつかの態様において、本方法は、二本鎖RNAをコードする核酸を含むベクターを哺乳動物細胞に導入することを含む。いくつかの態様において、二本鎖RNAをコードする核酸は、プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの態様において、プロモーターは、RNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターである。

【0481】

いくつかの態様において、哺乳動物細胞中で二本鎖RNAから産生され、ガイド配列の位置8~16内のそれらの予測位置にCAGリピート領域に対する1~5塩基のミスマッチを有するsiRNAは、その哺乳動物細胞によって二本鎖RNAから産生されるsiRNAの少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の量である。二本鎖RNAから正確にプロセシングされたsiRNAの存在量は、正確にプロセシングされた5'末端を有しかつ参照CAGリピート領域含有参照転写物にアラインメントするRNA配列リードの数を取得し、参照CAGリピート領域含有参照転写物にアラインメントするsiRNAのRNA配列リードの総数で割ることによって測定することができる。

10

【0482】

いくつかの態様において、CAGリピート含有mRNAは、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFH3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1である。いくつかの態様において、CAGリピート含有mRNAは、拡大された数の反復を含む。

20

【0483】

いくつかの態様において、哺乳動物細胞は、CNS細胞である。いくつかの態様において、哺乳動物細胞は、CNSの非神経細胞または神経細胞である。いくつかの態様において、CNSの非神経細胞は、グリア細胞、星状細胞、またはミクログリア細胞である。ある態様において、哺乳動物細胞は、インビトロである。ある態様において、哺乳動物細胞は、非CNS細胞である。ある態様において、哺乳動物細胞は、線維芽細胞である。ある態様において、哺乳動物細胞は、ポリグルタミン疾患の1以上の症状を有するか、ポリグルタミン疾患を有することが疑われるか、またはポリグルタミン疾患の素因を有する対象に由来するものである。

30

【0484】

本開示は、それを必要とする被験体においてCAGリピート含有mRNAの発現を減少または阻害する方法を提供し、この方法は、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子(例えばDNA)、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子を含む発現カセット、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子を含むベクター、またはその医薬組成物を、被験体に投与することを含む。

【0485】

ある態様において、CAGリピート含有mRNAの発現を阻害することは、例えば、CAGリピート含有mRNAのCAGリピート領域に結合し、CAGリピート含有mRNAの分解によるのではなくCAGリピート含有タンパク質の翻訳をブロックまたは抑制することによって、当該CAGリピート含有mRNAによってコードされるポリグルタミン含有タンパク質の発現を阻害することを含む。

40

【0486】

ある態様において、CAGリピート含有mRNAまたはプレmRNAは、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFH3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1である。

50

【0487】

ある態様において、CAGリピート含有mRNAまたはプレmRNAは、反復数の増加を含む。ある態様において、対象は、ポリグルタミン疾患を有し、これはポリグルタミン疾患の症状を示すことを意味する。ある態様において、対象は、ポリグルタミン疾患を発症するリスクがあり、まだポリグルタミン疾患の徴候を示していない。いくつかの実施形態において、ポリグルタミン疾患は、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1に関連している。いくつかの実施形態において、ポリグルタミン疾患は神経変性疾患である。いくつかの実施形態において、被験体は、ハンチントン病、脊髄小脳失調症1型、脊髄小脳失調症2型、脊髄小脳失調症3型、脊髄小脳失調症6型、脊髄小脳失調症7型、脊髄小脳失調症12型、脊髄小脳失調症17型、筋萎縮性側索硬化症、脊髄球筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、鎖骨頭蓋異形成症、網膜色素変性症、筋緊張性ジストロフィー1、もしくは鯉耳腎症候群2を有するか、または、ハンチントン病、脊髄小脳失調症1型、脊髄小脳失調症2型、脊髄小脳失調症3型、脊髄小脳失調症6型、脊髄小脳失調症7型、脊髄小脳失調症12型、脊髄小脳失調症17型、筋萎縮性側索硬化症、脊髄球筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、鎖骨頭蓋異形成症、網膜色素変性症、筋緊張性ジストロフィー1、もしくは鯉耳腎症候群2を発症するリスクを有し、まだ疾患の徴候を示していない。

10

20

【0488】

本開示はまた、ポリグルタミン疾患を有する、またはポリグルタミン疾患を発症するリスクを有する対象を治療する方法を提供し、この方法は、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子(例えばDNA)、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子を含む発現カセット、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子を含むベクター、またはその医薬組成物を対象に投与することを含む。

【0489】

本明細書中で使用する場合、用語「治療する」とは、ポリグルタミン疾患の発症を予防または遅延させること、ポリグルタミン疾患の重症度を軽減させること、ポリグルタミン疾患に特徴的な症状の発生を軽減または予防すること、ポリグルタミン疾患に特徴的な症状の悪化を予防すること、またはそれらのいずれかの組み合わせを表す。いくつかの態様において、対象の治療は、ポリグルタミン疾患を有する、またはポリグルタミン疾患を発症するリスクがありポリグルタミン疾患の徴候をまだ示さない対象に関わる。

30

【0490】

いくつかの態様において、本開示の治療方法は、ポリグルタミン疾患の治療のための単剤療法として、または1つ以上の追加療法と組み合わせでの投与を含む。併用療法は、1つ以上の追加療法と同時に、その前に、またはその後に、本開示の組成物(例えば、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子(例えばDNA)、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子を含む発現カセット、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子を含むベクター、またはその医薬組成物)を対象に投与することを意味し得る。併用療法の同時投与は、本開示の組成物(例えば、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子(例えばDNA)、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子を含む発現カセット、本開示の二本鎖RNAをコードする核酸分子を含むベクター、またはその医薬組成物)と追加療法とが、同じ剤形中での投与のために製剤化されること、または別々の剤形で投与されることを意味し得る。

40

【0491】

本開示はまた、細胞においてCAGリピート含有RNAを標的とするプロセッシングされた人工miRNAの存在量を増加させる方法を提供し、ここで、人工miRNAはウイルスベクターによってコードされ、該方法は、(a) 本明細書に記載のいずれかの実施形態による二本鎖RNAをコードするウイルスベクター；または(b) 本明細書に記載のいずれかの実施形

50

態による人工miRNAをコードするウイルスベクターを細胞に投与することを含み、ここで前記人工miRNAは、ガイド配列、パッセンジャー配列、および任意で末端ループを含み、前記ガイド配列は、CAGリピート含有RNAのCAGリピート領域を標的とし、前記CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含み、前記塩基のミスマッチはガイド配列の位置8～16に位置する。

【0492】

いくつかの実施形態において、前記CAGリピート領域に対する少なくとも1つのミスマッチは、ガイド配列の位置8～12に位置する。いくつかの実施形態において、前記CAGリピート領域に対する少なくとも1つのミスマッチは、ガイド配列の位置9～11に位置する。いくつかの実施形態において、前記ガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対する2つ以上のミスマッチは、連続している。

10

【0493】

いくつかの実施形態において、前記ガイド配列は、表B1～B2から選択される配列を含むか、またはそれからなる。

【0494】

いくつかの実施形態において、前記人工miRNAは、5'リーダー配列および3'トレーラー配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記人工miRNAは、表Eから選択される5'リーダー配列、3'トレーラー配列、およびループ配列を含む。

【0495】

いくつかの実施形態において、CAGリピート含有RNAは、mRNAまたはpre-mRNA転写物である。いくつかの実施形態において、CAGリピート含有RNAは、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFXH3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1である。

20

【0496】

いくつかの実施形態において、プロセシングされた人工miRNAの存在量は、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%またはそれ以上である。正確にプロセシングされた人工miRNAの存在量%は、正確にプロセシングされた5'末端を有しかつ参照CAGリピート領域含有参照転写物にアラインメントする人工miRNAのRNA配列リードの数を取得し、参照CAGリピート領域含有得参照転写物にアラインメントする人工miRNAのRNA配列リードの総数で割ることによって測定することができる。

30

【0497】

いくつかの実施形態において、プロセシングされた人工miRNAは、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アレルを標的とする。いくつかの実施形態において、プロセシングされた人工miRNAは、CAGリピート含有RNAの正常なアレルと比較して、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アレルを選択的に標的とする。いくつかの実施形態において、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アレルは、少なくとも30個の連続するCAGリピートを含む。

40

【0498】

いくつかの実施形態において、細胞は対象内にある。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、CAGリピート伸長障害を有するか、または有することが疑われる対象である。

【0499】

本開示はまた、細胞におけるCAGリピート含有RNAの発現を阻害する方法であって、(a) 本明細書に記載のいずれかの実施形態に従う二本鎖RNAをコードするウイルスベクター；または (b) 人工miRNAをコードするウイルスベクターを細胞に投与することを含む方法を提供し、ここで、人工miRNAは、ガイド配列、パッセンジャー配列、および任意で末端ループを含み、ここで、ガイド配列は、CAGリピート含有RNAのCAGリピート領

50

域を標的とし、CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含み、ここで、塩基のミスマッチは、ガイド配列の位置8～16に位置する。

【0500】

いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対する少なくとも1つのミスマッチは、ガイド配列の位置8～12に位置する。いくつかの実施形態において、CAGリピート領域に対する少なくとも1つのミスマッチは、ガイド配列の位置9～11に位置する。いくつかの実施形態において、ガイド配列の位置8～16に位置する、CAGリピート領域に対する2つ以上のミスマッチは、連続している。いくつかの実施形態において、ガイド配列は、CAGリピート領域に対する3、4、または5塩基のミスマッチを含む。

【0501】

いくつかの実施形態において、ガイド配列は、表B1～B2から選択される配列を含むかまたはそれからなる。

【0502】

いくつかの実施形態において、C1 (b) の人工miRNAは、5'リーダー配列および3'トレイラー配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、人工miRNAは、表Eから選択される5'リーダー配列、3'トレイラー配列、およびループ配列を含む。

【0503】

いくつかの実施形態において、加工された人工miRNAは、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリルを標的とする。いくつかの実施形態において、プロセッシングされた人工miRNAは、CAGリピート含有RNAの正常アリルと比較して、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリルを選択的に標的とする。いくつかの実施形態において、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリルは、少なくとも30の連続するCAGリピートを含む。

【0504】

いくつかの実施形態において、CAGリピート含有RNAは、mRNAまたはpre-mRNA転写物である。いくつかの実施形態において、CAGリピート含有RNAは、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1である。

【0505】

いくつかの実施形態において、人工miRNAのガイド配列は、予測された完全にマッチするオフターゲット転写物が0個である。いくつかの実施形態において、人工miRNAのガイド配列は、ガイド配列の位置1～21内に完全な17merマッチを有する予測オフターゲット転写物が0～1個である。いくつかの実施形態において、人工miRNAのガイド配列は、予測された完全にマッチするオフターゲット転写物が0個である。いくつかの実施形態において、人工miRNAのガイド配列は、ガイド配列の位置1～21内に完全な17merマッチを有する予測オフターゲット転写物が0～4個である。いくつかの実施形態において、1つの置換を伴う人工miRNAのガイド配列は、予測されたオフターゲット転写物が0～2個である。いくつかの実施形態において、人工miRNAのガイド配列は、表B4に示される予測オフターゲット転写物プロファイルを有する。

【0506】

いくつかの実施形態において、細胞は対象内にある。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、対象はCAGリピート伸長障害を有するか、または有することが疑われる対象である。

【0507】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかで治療される対象は、哺乳類（例えばマウス、ラット）、好ましくは霊長類（例えばサル、チンパンジー）、またはヒトである。

【0508】

10

20

30

40

50

本明細書に記載される治療方法のいずれかにおいて、本開示の組成物（例えば、本開示による二本鎖RNAをコードする核酸もしくは発現カセット、ベクター、または医薬組成物）は、髄腔内、軟膜下、実質内、線条体内、頭蓋内、脳槽内、脳内、脳室内、眼内、脳室内、脳室内、腰椎内、眼内、非経口、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、経皮、皮膚間、直腸、腔内、腹腔内、粘膜投与、またはそれらの任意の組み合わせによって、対象に投与され得る。

【0509】

いくつかの実施形態において、本開示の組成物（例えば、阻害性核酸、阻害性核酸をコードする発現カセットを含む単離核酸、ベクター、rAAV粒子、医薬組成物）は、対象のCNSに直接注射される。いくつかの実施形態において、CNSへの直接注射は、脳内注射、実質内注射、髄腔内注射、軟膜下注射、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態において、CNSへの直接注射は、脳室内注射である。いくつかの実施形態において、CNSへの直接注射は、対象の脳脊髄液（CSF）への直接注射であり、場合により、直接注射は、槽内注射、脳室内注射、腰椎内注射、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態において、対象への投与は、CNSへの直接注射と、CNSに直接注射されないルート（例えば静脈内）との組み合わせによって達成される。

10

【0510】

いくつかの実施形態において、本開示の方法は、当該二本鎖RNAと接触されていない細胞におけるCAGリピート含有mRNAの発現レベルと比較して、細胞におけるCAGリピート含有RNAの発現または活性を少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれ以上減少させる。いくつかの実施形態において、本開示の方法は、細胞におけるCAGリピート含有mRNAの発現または活性を、当該二本鎖RNAと接触されていない細胞におけるCAGリピート含有mRNAの発現レベルと比較して10~20%、10~30%、10~40%、10~50%、10~60%、10~70%、10~80%、10~90%、10~95%、20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、50~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100%減少させる。いくつかの実施形態において、本開示の方法は、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アレルの発現または活性を減少させる。いくつかの実施形態において、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アレルは、少なくとも30個の連続するCAGリピートを含む。

20

30

【0511】

いくつかの実施形態において、本開示の方法は、未処置の対象のCNSにおけるCAGリピート含有mRNAの発現レベルと比較して、対象のCNSにおけるCAGリピート含有RNAの発現または活性を、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%以上減少させる。いくつかの実施形態において、本開示の方法は、対象のCNSにおけるCAGリピート含有mRNAの発現または活性を、未処置対象のCNSにおけるCAGリピート含有mRNAの発現レベルと比較して10~20%、10~30%、10~40%、10~50%、10~60%、10~70%、10~80%、10~90%、10~95%、20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%

40

50

0%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100%減少させる。ある態様において、本開示の方法は、対象のCNSにおけるCAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリの発現または活性を減少させる。ある態様において、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリは、少なくとも30個の連続するCAGリピートを含む。

【0512】

ある態様において、本開示の方法は、(細胞内で伸長されたCAGリピートを有する) CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリの発現または活性の選択的減少のために使用される。ある態様において、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリは、少なくとも30個の連続するCAGリピートを含む。ある態様において、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリの選択的減少は、CAGリピート含有RNAの正常な(野生型)アリの発現の減少と比較して、少なくとも1.1X、1.2X、1.3X、1.4X、1.5X、1.6X、1.7X、1.8X、1.9X、2X、3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、10X、20X、30X、40X、50X、60X、70X、80X、90X、100X、200Xまたはそれ以上である。ある態様において、CAGリピート含有RNAは、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、およびMAB21L1から選択される。

10

20

【0513】

ある態様において、本開示の方法は、対象のCNSにおけるCAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリの発現または活性の選択的減少のために使用される。ある態様において、CAGリピート含有RNAの病原性または病理学的アリは、少なくとも30個の連続するCAGリピートを含む。ある態様において、伸長したCAGリピートを有するCAGリピート含有RNAの選択的減少は、CAGリピート含有RNAについての正常な(野生型)アリと比較して、少なくとも1.1X、1.2X、1.3X、1.4X、1.5X、1.6X、1.7X、1.8X、1.9X、2Xまたはそれ以上である。ある態様において、対象は、CAGリピート伸長疾患または障害を有するか、または有することが疑われる対象である。ある態様において、CAGリピート含有RNAは、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、およびMAB21L1から選択される。

30

【0514】

開示の非限定的態様の例

【0515】

[態様セットA]

上記の本主題の態様(実施形態を含む)は、単独で、または1つ以上の他の態様または実施形態と組み合わせて有益となり得る。前述の説明を限定することなく、開示の特定の非限定的態様が以下に提供される。本開示を読めば当業者には明らかなように、個別に番号付けされた態様のそれぞれは、先行するまたは後続する個別に番号付けされた態様のいずれかと使用または組み合わせられてもよい。これは、このような態様のすべての組み合わせのサポートを提供することを意図しており、以下に明示的に提供される態様の組み合わせに限定されない。

40

【0516】

態様1

5'から3'へ、

(a) 5'リーダー配列；

50

- (b) パッセンジャー配列またはガイド配列を含む5' ステム；
- (c) 1～6塩基の5' リンカー；
- (d) 末端ループ；
- (e) 1～6塩基の3' リンカー；
- (f) 以下を含む3' ステム
 - (i) 5' ステムがパッセンジャー配列を含む場合はガイド配列；または
 - (ii) 5' ステムがガイド配列を含む場合はパッセンジャー配列；および
- (g) 3' トレーラー配列；

を含む二本鎖RNAであって、

前記ガイド配列は、CAGリピート含有RNAのCAGリピート領域を標的とし、前記CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含み、前記塩基のミスマッチは、前記ガイド配列の位置8～16に位置する、二本鎖RNA。

10

態様 2

前記二本鎖RNAが、pre-miRNAスキヤフォールド、pri-miRNAスキヤフォールド、またはshRNA内に含まれており、場合により、前記pre-miRNAスキヤフォールドまたはpri-miRNAスキヤフォールドは、mir-155スキヤフォールド、mir-33スキヤフォールド、mir-Eスキヤフォールド、または表Eに記載のスキヤフォールドのいずれかである、態様1に記載の二本鎖RNA。

態様 3

5' リーダー配列が、3' トレーラー配列と相補的でない態様1または2に記載の二本鎖RNA。

20

態様 4

5' リーダー配列が、3' トレーラー配列と部分的に相補的である態様1または2に記載の二本鎖RNA。

態様 5

3' トレーラー配列がポリUテールを含む、態様1～4のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 6

ポリUテールが3～6個のUを有する、態様5記載の二本鎖RNA。

態様 7

5' リーダー配列および／または3' トレーラー配列が、約1ヌクレオチド～約500ヌクレオチドの長さである、態様1～6のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

30

態様 8

5' リーダー配列および／または3' トレーラー配列が、長さが約1ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約75ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約25ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約1ヌクレオチド～約10ヌクレオチドである、態様7に記載の二本鎖RNA。

態様 9

(i) 5' ステムはパッセンジャー配列を含み、5' リーダー配列はパッセンジャー配列の5' 末端の一部を含み、および／または3' ステムはガイド配列を含み3' トレーラー配列はガイド配列の3' 末端の一部を含み；または

40

(ii) 5' ステムはガイド配列を含み、5' リーダー配列はガイド配列の5' 末端の一部を含み、および／または3' ステムはパッセンジャー配列を含み3' トレーラー配列はパッセンジャー配列の3' 末端の一部を含む、

態様1～8のいずれか1項記載の二本鎖RNA。

態様 10

ガイド配列が約15～約30個のヌクレオチドを有する、態様1～9のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

50

態様 1 1

ガイド配列が約19～約24個のヌクレオチドを有する、態様 1 0 記載の二本鎖RNA。

態様 1 2

ガイド配列が表B1～B2から選択されるヌクレオチド配列を有する、態様 1 ～ 1 1 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

態様 1 3

パッセンジャー配列がガイド配列に対して100%相補的である、態様 1 ～ 1 2 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

態様 1 4

パッセンジャー配列がガイド配列に対して部分的に相補的である、態様 1 ～ 1 2 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。 10

態様 1 5

パッセンジャー配列が、ガイド配列に対して1から5塩基のミスマッチまたはバルジを含む、態様 1 4 に記載の二本鎖RNA。

態様 1 6

5'リンカーが、3'リンカーに対して100%相補的である、態様 1 ～ 1 5 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

態様 1 7

末端ループが約4ヌクレオチド～約1,000ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約900ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約800ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約700ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約600ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約90ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約80ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約70ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約40ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約30ヌクレオチド、または約4ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約4ヌクレオチド～約10ヌクレオチドを有する、態様 1 ～ 1 6 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。 20

態様 1 8

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチがガイド配列の位置8～12に位置する、態様 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。 30

態様 1 9

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチがガイド配列の位置9～11に位置する、態様 1 7 に記載の二本鎖RNA。

態様 2 0

ガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対するミスマッチのうちの2つ以上が連続している、態様 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 2 1

位置8～16に位置するCAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、位置8～16に位置する別のミスマッチに隣接していない、態様 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。 40

態様 2 2

ガイド配列における1～5塩基のミスマッチが、ワトソン-クリック塩基対形成またはゆらぎ(wobble)塩基対形成によるCAGリピート含有mRNAの標的CAGリピート領域の対応するヌクレオチド(複数可)との塩基対を形成しない、態様 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 2 3

二本鎖RNAが切断されて、ガイド配列およびパッセンジャー配列を含むshRNAを生成する、態様 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 2 4

二本鎖RNAがDROSHAによって切断されてshRNAを生成する、態様23に記載の二本鎖RNA。

態様25

二本鎖RNAが切断されて、ガイド配列およびパッセンジャー配列を含む低分子干渉RNA (siRNA) を生成する、態様1～24のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様26

二本鎖RNAがDROSHAおよびDICERによって切断されてsiRNAを生成する、態様25に記載の二本鎖RNA。

態様27

siRNAのガイド配列が、ガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含む、態様25または26に記載の二本鎖RNA。

態様28

shRNAがその5'末端またはその3'末端にオーバーハングを有する、態様23または24に記載の二本鎖RNA。

態様29

5'オーバーハングまたは3'オーバーハングが約1～6ヌクレオチドである、態様23または24に記載の二本鎖RNA。

態様30

shRNAが5'オーバーハングまたは3'オーバーハングを有さない、態様23または24に記載の二本鎖RNA。

態様31

shRNAが約38～約50ヌクレオチドを有する、態様23または24に記載の二本鎖RNA。

態様32

CAGリピート含有RNAがmRNAまたはpre-mRNA転写物である、態様1～31のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様33

CAGリピート含有RNAが、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1である、態様1～32のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【0517】

態様34

(A) 5'から3'へ、

(a) 5'リーダー配列；

(b) パッセンジャー配列またはガイド配列を含む5'ステム；

(c) 5'リンカー；

(d) 末端ループ；

(e) 3'リンカー；

(f) 以下を含む3'ステム

(i) 5'ステムがパッセンジャー配列を含む場合はガイド配列；または

(ii) 5'ステムがガイド配列を含む場合はパッセンジャー配列；および

(g) 3'トレーラー配列；

を含む二本鎖RNAであって、

(i) 前記ガイド配列は、CAGリピート含有RNAのCAGリピート領域を標的とし、前記CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含み、

(ii) 前記二本鎖RNAは切断されて、ガイド配列およびパッセンジャー配列を含む低分子干渉RNA (siRNA) を生成し、前記siRNAのガイド配列は、前記siRNAのガイド配列の位置8～16に前記CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含むか；また

10

20

30

40

50

は

(B) 5' から 3' へ、

(i) CAGリピート含有RNAのCAGリピート領域を標的とし、前記CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含むガイド配列；および

(ii) 前記ガイド配列に実質的に相補的なパッセンジャー配列

を含む二本鎖RNAであって、前記二本鎖RNAは切断されて、ガイド配列およびパッセンジャー配列を含むsiRNAを生成し、前記siRNAのガイド配列は、前記siRNAのガイド配列の位置8～16に前記CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含む、二本鎖RNA。

態様 3 5

10

前記二本鎖RNAが、pre-miRNAスキヤフォールド、pri-miRNAスキヤフォールド、またはshRNA中に含まれており、場合により、前記pre-miRNAスキヤフォールドまたはpri-miRNAスキヤフォールドは、mir-155スキヤフォールド、mir-33スキヤフォールド、mir-Eスキヤフォールド、または表Eに記載のスキヤフォールドのいずれかである、態様 3 4 に記載の二本鎖RNA。

態様 3 6

前記二本鎖RNAがDROSHAおよびDICERによって切断されてsiRNAを生成する、態様 3 4 に記載の二本鎖RNA。

態様 3 7

5' リーダー配列が3' トレーラー配列と相補的でない、態様 3 4 または 3 5 に記載の二本鎖RNA。

20

態様 3 8

5' リーダー配列が、3' トレーラー配列と部分的に相補的である態様 3 4 または 3 5 に記載の二本鎖RNA。

態様 3 9

3' トレーラー配列がポリTテールを含む、態様 3 4 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 4 0

ポリTテールが3～6個のTを有する、態様 3 9 記載の二本鎖RNA。

態様 4 1

30

5' リーダー配列および／または3' トレーラー配列が、約1ヌクレオチド～約500ヌクレオチドの長さである、態様 3 4 ～ 4 0 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

態様 4 2

5' リーダー配列および／または3' トレーラー配列が、長さが約1ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約75ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約25ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約1ヌクレオチド～約10ヌクレオチドである、態様 4 1 に記載の二本鎖RNA。

態様 4 3

40

(i) 5' ステムはパッセンジャー配列を含み、5' リーダー配列はパッセンジャー配列の5' 末端の一部を含み、および／または3' ステムはガイド配列を含み3' トレーラー配列はガイド配列の3' 末端の一部を含み；または

(ii) 5' ステムはガイド配列を含み、5' リーダー配列はガイド配列の5' 末端の一部を含み、および／または3' ステムはパッセンジャー配列を含み3' トレーラー配列はパッセンジャー配列の3' 末端の一部を含む、

態様 3 4 ～ 4 2 のいずれか1項記載の二本鎖RNA。

態様 4 4

ガイド配列が約15～約30個のヌクレオチドを有する、態様 3 4 ～ 4 3 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

50

態様 4 5

ガイド配列が約19～約24個のヌクレオチドを有する、態様 4 4 記載の二本鎖RNA。

態様 4 6

ガイド配列が表B1～B2から選択されるヌクレオチド配列を有する、態様 3 4～4 5 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

態様 4 7

パッセンジャー配列がガイド配列に対して100%相補的である、態様 3 4～4 6 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。

態様 4 8

パッセンジャー配列がガイド配列に対して部分的に相補的である、態様 3 4～4 6 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。 10

態様 4 9

パッセンジャー配列が、ガイド配列に対して1から5塩基のミスマッチまたはバルジを含む、態様 4 8 に記載の二本鎖RNA。

態様 5 0

5'リンカーが1～6塩基を有し、および／または3'リンカーが1～6塩基を有する、態様 3 4～4 9 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 5 1

5'リンカーが、3'リンカーに対して100%相補的である、態様 3 4～5 0 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。 20

態様 5 2

末端ループが約4ヌクレオチド～約1,000ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約900ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約800ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約700ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約600ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約90ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約80ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約70ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約40ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約30ヌクレオチド、または約4ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約4ヌクレオチド～約10ヌクレオチドを有する、態様 3 4～5 1 のいずれか一項記載の二本鎖RNA。 30

態様 5 3

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが前記siRNAのガイド配列の位置8～12に位置する、態様 3 4～5 2 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 5 4

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが前記siRNAのガイド配列の位置9～11に位置する、態様 5 3 に記載の二本鎖RNA。

態様 5 5

前記siRNAのガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対するミスマッチのうちの2つ以上が連続している、態様 3 4～5 4 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。 40

態様 5 6

前記siRNAのガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、前記siRNAのガイド配列の位置8～16に位置する別のミスマッチに隣接していない、態様 3 4～5 4 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 5 7

前記siRNAのガイド配列における1～5塩基のミスマッチが、ワトソン-クリック塩基対形成またはゆらぎ(wobble)塩基対形成によるCAGリピート含有mRNAの標的CAGリピート領域の対応するヌクレオチド(複数可)との塩基対を形成しない、態様 3 4～5 6 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。 50

態様 5 8

CAGリピート含有RNAがmRNAまたはpre-mRNA転写物である、態様 3 4 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 5 9

CAGリピート含有mRNAが、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1である、態様 3 4 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。
【0518】

10

態様 6 0

態様 1 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の二本鎖RNAをコードする核酸。

態様 6 1

プロモーターに作動可能に連結された態様 6 0 の核酸を含む発現カセット。

態様 6 2

プロモーターがRNAポリメラーゼプロモーターである態様 6 1 に記載の発現カセット。

態様 6 3

RNAポリメラーゼプロモーターがRNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターである態様 6 2 に記載の発現カセット。

態様 6 4

RNAポリメラーゼIIIプロモーターがU6、H1、または7SKプロモーターである態様 6 3 に記載の発現カセット。

20

態様 6 5

RNAポリメラーゼIIプロモーターが、U1、CMV、PGK、CAG、EIF1 α 、またはシナプトフィシンプロモーターである、態様 6 3 に記載の発現カセット。

態様 6 6

発現カセットが、5' アデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR) 配列および3' AAV ITR配列、またはそれらのバリエーションに隣接している、態様 6 1 ~ 6 5 のいずれか一項に記載の発現カセット。

態様 6 7

ITR配列の一方が機能的な末端解離部位 (terminal resolution site) を欠いている、態様 6 6 に記載の発現カセット。

30

態様 6 8

5' および3' ITRが、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAVRh10、AAV11、およびそれらのバリエーションからなる群より選択されるAAV血清型に由来するものである、態様 6 6 または6 7 に記載の発現カセット。

態様 6 9

態様 6 0 の核酸分子、または態様 6 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の発現カセットを含むベクター。

態様 7 0

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、態様 7 9 に記載のベクター。

40

態様 7 1

キャプシドタンパク質をさらに含み、場合により、該キャプシドタンパク質がAAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAVRh10またはAAV11キャプシドタンパク質である、態様 7 0 に記載のAAVベクター。

態様 7 2

AAVベクターが自己相補的AAVベクターである、態様 7 0 または7 1 に記載のAAVベクター。

態様 7 3

態様 6 0 の核酸、態様 6 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の発現カセット、または態様 6

50

9～72のいずれか一項に記載のベクターと、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物または単位剤形。

【0519】

態様74

CAGリピート含有RNAの発現を、それを必要とする対象において低下させるための方法であって、態様60に記載の核酸、態様61～68のいずれか一項に記載の発現カセット、態様69～72のいずれか一項に記載のベクター、または態様73に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、方法。

態様75

CAGリピート含有RNAの発現を阻害することが、CAGリピート含有RNAによってコードされるポリグルタミン含有タンパク質の発現を阻害することを含む、態様74に記載の方法。

態様76

CAGリピート含有RNAがmRNAまたはpre-mRNA転写物である、態様74または75に記載の方法。

態様77

対象がポリグルタミン疾患を有しているかまたは有している疑いがあり、場合により、該ポリグルタミン疾患が、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1に関連するものである、態様74～76のいずれか一項に記載の方法。

態様78

前記ポリグルタミン疾患が、ハンチントン病、脊髄小脳失調症1型、脊髄小脳失調症2型、脊髄小脳失調症3型、脊髄小脳失調症6型、脊髄小脳失調症7型、脊髄小脳失調症12型、脊髄小脳失調症17型、筋萎縮性側索硬化症、脊髄球筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、鎖骨頭蓋異形成症、網膜色素変性症、筋緊張性ジストロフィー1、または鰓耳腎症候群2である、態様77に記載の方法。

態様79

投与が、対象の中枢神経系（CNS）への直接注射を含む、態様74～78のいずれか一項に記載の方法。

態様80

直接注射が、脳内注射、実質内注射、髄腔内注射、線条体内注射、軟膜下注射、またはそれらのいずれかの組合せである、態様79記載の方法。

態様81

投与が、眼内、非経口、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、経皮、皮間、直腸、膣内、腹腔内、または粘膜投与を含む、態様74～78のいずれか一項に記載の方法。

【0520】

態様82

哺乳動物細胞におけるCAGリピート含有RNAの発現を阻害する方法であって、

5'から3'へ、

- (a) 5'リーダー配列；
- (b) パッセンジャー配列を含む5'ステム；
- (c) 5'リンカー；
- (d) 末端ループ；
- (e) 3'リンカー；
- (f) ガイド配列を含む3'ステム；および
- (g) 3'トレーラー配列

を含む二本鎖RNAを前記哺乳動物細胞に導入することを含み、

10

20

30

40

50

前記ガイド配列は、CAGリピート含有RNAのCAGリピート領域を標的とし、

前記二本鎖RNAは前記哺乳動物細胞によって切断されて、ガイド配列とパッセンジャー配列とを含むsiRNAを産生し、前記siRNAのガイド配列は、前記siRNAのガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含む、方法。

態様 8 3

CAGリピート含有mRNAの発現を阻害することが、前記CAGリピート含有mRNAによってコードされるポリグルタミン含有タンパク質の発現を阻害することを含む、態様 8 2 に記載の方法。

態様 8 4

前記二本鎖RNAがpre-miRNAスキヤフォールド、pri-miRNAスキヤフォールド、またはshRNAに含まれる、態様 8 2 に記載の方法。

態様 8 5

前記二本鎖RNAが、前記哺乳動物細胞においてDROSHAおよびDICERによって切断されてsiRNAを生じる、態様 8 2 ～ 8 4 に記載の方法。

態様 8 6

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、siRNAのガイド配列の位置8～12に位置する、態様 8 2 ～ 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

態様 8 7

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、siRNAのガイド配列の位置9～11に位置する、態様 8 6 に記載の方法。

態様 8 8

siRNAのガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対するミスマッチのうちの2つ以上が連続している、態様 8 2 ～ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

態様 8 9

siRNAのガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、前記siRNAのガイド配列の位置8～16に位置する別のミスマッチに隣接していない、態様 8 2 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

態様 9 0

前記5'リーダー配列が前記3'トレーラー配列に対して相補的でない、態様 8 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

態様 9 1

前記5'リーダー配列が前記3'トレーラー配列に部分的に相補的である、態様 8 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

態様 9 2

前記3'トレーラー配列がポリUテールを含む、態様 8 2 ～ 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

態様 9 3

前記ポリUテールが3～6個のウリジンを有する、態様 9 2 に記載の方法。

態様 9 4

前記5'リーダー配列および／または前記3'トレーラー配列の長さが約1ヌクレオチド～約500ヌクレオチドである、態様 8 2 ～ 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

態様 9 5

前記5'リーダー配列および／または前記3'トレーラー配列が、約1ヌクレオチド～約400ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約75ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約25ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約1ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約1ヌクレオチド～約10ヌクレオチドの長さである、態様 9 4 に記載の方法。

態様 9 6

10

20

30

40

50

ガイド配列が約15～約30ヌクレオチドを有する、態様82～95のいずれか一項に記載の方法。

態様97

ガイド配列が約19～約24個のヌクレオチドを有する、態様82～95のいずれか一項に記載の方法。

態様98

ガイド配列が、表B1～B2から選択されるヌクレオチド配列のセットを有する、態様82～97のいずれか一項に記載の方法。

態様99

パッセンジャー配列がガイド配列に対して100%相補的である、態様82～98のいずれか一項に記載の方法。

態様100

パッセンジャー配列がガイド配列に対して部分的に相補的である、態様82～98のいずれか一項に記載の方法。

態様101

パッセンジャー配列が、ガイド配列に対して1塩基から5塩基のミスマッチまたはバルジを含む、態様100に記載の方法。

態様102

5'リンカーが3'リンカーに対して100%相補的である、態様82～101のいずれか一項に記載の方法。

態様103

末端ループが、約4個のヌクレオチド～約1,000個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約900個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約800個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約700個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約600個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約500個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約400個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約300個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約200個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約100個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約90個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約80個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約70個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約50個のヌクレオチド、約4個のヌクレオチド～約40個のヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約30ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、約4ヌクレオチド～約15ヌクレオチド、または約4ヌクレオチド～約10ヌクレオチドを有する、態様82～102のいずれか一項に記載の方法。

態様104

前記二本鎖RNAをコードする核酸を含むベクターを哺乳動物細胞に導入することを含む、態様82～103のいずれか一項に記載の方法。

態様105

前記二本鎖RNAをコードする核酸がプロモーターに作動可能に連結されている、態様104に記載の方法。

態様106

プロモーターがRNAポリメラーゼIIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIプロモーターである、態様105に記載の方法。

態様107

前記哺乳動物細胞中の前記二本鎖RNAから産生され、前記ガイド配列の位置8～16内に、それらの予測される位置に位置するCAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを有する、siRNAが、前記哺乳動物細胞によって二本鎖RNAから産生されるsiRNAの少なくとも10%の存在量である、態様82～106のいずれか一項に記載の方法。

態様108

前記CAGリピート含有RNAがmRNAまたはpre-mRNA転写物である、態様82～107のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

態様 1 0 9

前記CAGリピート含有RNAが、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1である、態様 8 2 ～ 1 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 5 2 1 】

態様 1 1 0

細胞内のCAGリピート含有RNAを標的とする、プロセシングされた人工miRNAの存在量を増加させる方法であって、前記人工miRNAはウイルスベクターによってコードされ、前記方法は、

10

(a) 態様 1 ～ 5 9 のいずれか一項に記載の二本鎖RNAをコードするウイルスベクター；または

(b) 前記人工miRNAをコードするウイルスベクターであって、前記人工miRNAは、ガイド配列、パッセンジャー配列、および任意で末端ループを含み、前記ガイド配列は、CAGリピート含有RNAのCAGリピート領域を標的とし、前記CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含み、前記塩基のミスマッチは、前記ガイド配列の位置8～16に位置する、ウイルスベクター

を前記細胞に投与する工程を含む、方法。

20

態様 1 1 1

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、前記ガイド配列の位置8～12に位置する、態様 1 1 0 に記載の方法。

態様 1 1 2

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、前記ガイド配列の位置9～11に位置する、態様 1 1 0 に記載の方法。

態様 1 1 3

前記ガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対する二つ以上のミスマッチが、連続している、態様 1 1 0 ～ 1 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 1 4

ガイド配列が、表B1～B2から選択される配列を含むかまたはそれからなる、態様 1 1 0 ～ 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

態様 1 1 5

態様 1 1 0 (b) の人工miRNAが、5'リーダー配列および3'トレーラー配列をさらに含む、態様 1 1 0 ～ 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 1 6

人工miRNAが、表Eから選択される5'リーダー配列、3'トレーラー配列、およびループ配列を含む、態様 1 1 0 ～ 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 1 7

CAGリピート含有RNAが、mRNAまたはpre-mRNA転写物である、態様 1 1 0 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

態様 1 1 8

CAGリピート含有RNAが、CAGリピート含有遺伝子の病理的アリルである、態様 1 1 0 ～ 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 1 9

CAGリピート含有遺伝子の前記病理的アリルが、少なくとも30個の連続するCAGリピートを含む、態様 1 1 8 に記載の方法。

態様 1 2 0

CAGリピート含有RNAが、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4

50

、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2 BPL、またはMAB21L1である、態様110～119のいずれか一項に記載の方法。

態様121

プロセシングされた人工miRNAの存在量が少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、またはそれ以上である、態様110～120のいずれか一項に記載の方法。

態様122

前記細胞が被験体中にある、態様110～121のいずれか一項に記載の方法。

態様123

被験体がヒトである、態様122に記載の方法。

態様124

被験体がCAGリピート伸長障害を有する、態様123に記載の方法。

【0522】

態様125

細胞内のCAGリピート含有RNAの発現を阻害する方法であって、

(a) 態様1～59のいずれか一項に記載の二本鎖RNAをコードするウイルスベクター；または

(b) 人工miRNAをコードするウイルスベクターであって、前記人工miRNAは、ガイド配列、パッセンジャー配列、および任意で末端ループを含み、前記ガイド配列は、CAGリピート含有RNAのCAGリピート領域を標的とし、前記CAGリピート領域に対して1～5塩基のミスマッチを含み、前記塩基のミスマッチは、前記ガイド配列の位置8～16に位置する、ウイルスベクター

を前記細胞に投与する工程を含む、方法。

態様126

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、前記ガイド配列の位置8～12に位置する、態様125に記載の方法。

態様127

CAGリピート領域に対する少なくとも一つのミスマッチが、前記ガイド配列の位置9～11に位置する、態様125に記載の方法。

態様128

前記ガイド配列の位置8～16に位置するCAGリピート領域に対する二つ以上のミスマッチが、連続している、態様125～127のいずれか一項に記載の方法。

態様129

前記ガイド配列が、前記CAGリピート領域に対して3、4、または5塩基のミスマッチを含む、態様125～128のいずれか一項に記載の方法。

態様130

ガイド配列が、表B1～B2から選択される配列を含むかまたはそれからなる、態様125～129のいずれか一項に記載の方法。

態様131

C1(b)の人工miRNAが、5'リーダー配列および3'トレーラー配列をさらに含む、態様125～130のいずれか一項に記載の方法。

態様132

人工miRNAが、表Eから選択される5'リーダー配列、3'トレーラー配列、およびループ配列を含む、態様125～131のいずれか一項に記載の方法。

態様133

CAGリピート含有RNAが、mRNAまたはpre-mRNA転写物である、態様125～132のいずれか一項に記載の方法。

態様134

CAGリピート含有RNAが、CAGリピート含有遺伝子の病理的アレルである、態様125～133のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

態様 1 3 5

CAGリピート含有遺伝子の前記病的アレルが、少なくとも30個の連続するCAGリピートを含む、態様 1 3 4 に記載の方法。

態様 1 3 6

CAGリピート含有RNAが、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロフィン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1である、態様 1 2 5 ~ 1 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 3 7

人工miRNAのガイド配列は、完全にマッチすると予測されるオフターゲット転写物の個数が0である、態様 1 2 5 ~ 1 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 3 8

人工miRNAのガイド配列は、位置1~21内に完全な17merマッチを有すると予測されるオフターゲット転写物の個数が0~1である、態様 1 2 5 ~ 1 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 3 9

人工miRNAのガイド配列は、1個のミスマッチを伴ってマッチすると予測されるオフターゲット転写物の個数が0~2である、態様 1 2 5 ~ 1 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 4 0

人工miRNAのガイド配列が、表B4に記載される予測されたオフターゲット転写物プロフィールを有する、態様 1 2 5 ~ 1 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 4 1

細胞が被験体中にある、態様 1 2 5 ~ 1 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 4 2

被験体がヒトである、態様 1 4 1 に記載の方法。

態様 1 4 3

被験体がCAGリピート伸長障害を有する、態様 1 4 2 に記載の方法。

態様 1 4 4

対象に、態様 6 0 に記載の核酸、態様 6 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の発現カセット、態様 6 9 ~ 7 2 のいずれか一項に記載のベクター、または態様 7 3 に記載の医薬組成物を投与することを含む、必要とする対象においてポリグルタミン伸長疾患を治療する方法。

態様 1 4 5

前記ポリグルタミン伸長疾患が、HTT、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、CACNA1A、アタキシン7、PPP2R2B、TBP、アンドロゲン受容体、アトロピン、MLLT3、BMP2K、THAP11、ZFHX3、POU3F2、MAML2、SMARCA2、MAML3、ORC4、RUNX2、MED12、EP400、MAGI1、UMAD1、DM1-AS、AC007161.3、IRF2BPL、またはMAB21L1に関連するものである、態様 1 4 4 に記載の方法。

態様 1 4 6

前記ポリグルタミン伸長疾患が、ハンチントン病、脊髄小脳失調症1型、脊髄小脳失調症2型、脊髄小脳失調症3型、脊髄小脳失調症6型、脊髄小脳失調症7型、脊髄小脳失調症12型、脊髄小脳失調症17型、筋萎縮性側索硬化症、脊髄球筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、鎖骨頭蓋異形成症、網膜色素変性症、筋緊張性ジストロフィー1、または鰓耳腎症候群2である、態様 1 4 4 に記載の方法。

態様 1 4 7

投与が、対象の中枢神経系 (CNS) への直接注射を含む、態様 1 4 4 ~ 1 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 4 8

10

20

30

40

50

前記直接注射が、脳内注射、実質内注射、髄腔内注射、線条体内注射、軟膜下注射、またはそれらのいずれかの組合せである、態様 1 4 7 に記載の方法。

態様 1 4 9

投与が、眼内、非経口、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、経皮、皮間、直腸、膣内、腹腔内、または粘膜投与を含む、態様 1 4 4 ~ 1 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 5 2 3 】

[態様セット B]

上記の本主題の態様（実施形態を含む）は、単独で、または一以上の他の態様もしくは実施形態と組み合わせて有益となり得る。前述の説明を制限することなく、本開示の特定の非限定的な態様が以下に提供される。本開示を読めば当業者には明らかなように、個々に番号が付された態様のそれぞれは、先行するまたは後続する個々に番号が付された態様のいずれかと使用または組み合わせられてもよい。これは、このような態様のすべての組み合わせのサポートを提供することを意図しており、以下に明示的に提供される態様の組み合わせに限定されない。

【 0 5 2 4 】

態様 1

a) CAGリピート含有RNAの標的CAGリピート領域とハイブリダイズする第一の鎖；および

b) 前記第一の鎖とハイブリダイズする第二の鎖

を含む二本鎖RNAであって、

前記第一の鎖は、

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチ；および

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する少なくとも第二のミスマッチを含み、ここで、

i) 前記第一のミスマッチが配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にある場合、前記第二のミスマッチは前記第一のミスマッチの1~8塩基3'側にあり；

ii) 前記第一のミスマッチが配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置9にある場合、前記第二のミスマッチは前記第一のミスマッチの1~7塩基3'側にあり；

iii) 前記第一のミスマッチが配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置10にある場合、前記第二のミスマッチは前記第一のミスマッチの1~6塩基3'側にあり；

iv) 前記第一のミスマッチが配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置11にある場合、前記第二のミスマッチは前記第一のミスマッチの1~5塩基3'側にあり、

二本鎖RNA。

態様 2

各ミスマッチが、

a) GのA、U、またはCへの置換；

b) UのA、G、またはCへの置換；

c) CのA、U、またはGへの置換

から独立して選択される置換によって生成される、態様 1 に記載の二本鎖RNA。

態様 3

前記第1の鎖が、

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にある、第一のミスマッチ；および

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであって、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、第二のミスマッチを含む、態様1または2に記載の二本鎖RNA。

態様4

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであって、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1～3のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様5

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであって、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1～3のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様6

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであって、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号に基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1～3のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様7

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、2個を超えない、態様3～6のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様8

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、態様3～6のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様9

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様3～6のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様10

前記第一の鎖が、

- i) CUGCUGCAACUGCUGCUGCUG (配列番号317) (CUG_NA_B);
- ii) CUGCUGCAGAUGCUGCUGCUG (配列番号318) (CUG_NA_C);
- iii) CUGCUGCAGCAGCUGCUGCUG (配列番号319) (CUG_NA_D);
- iv) CUGCUGCAGCUACUGCUGCUG (配列番号320) (CUG_NA_E);
- v) CUGCUGCAGCUGAUGCUGCUG (配列番号321) (CUG_NA_F);
- vi) CUGCUGCAGCUGCAGCUGCUG (配列番号322) (CUG_NA_G);
- vii) CUGCUGCAGCUGCUACUGCUG (配列番号323) (CUG_NA_H); および
- viii) CUGCUGCAGCUGCUGAUGCUG (配列番号324) (CUG_NA_I)

から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様3または態様4に記載の二本鎖RNA。

態様11

前記第一の鎖が配列番号804～819から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様3または態様4に記載の二本鎖RNA。

【0525】

10

20

30

40

50

態様 1 2

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、前記第二および第三のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1または態様2に記載の二本鎖RNA。

態様 1 3

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一、第二、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第三の置換が第三のミスマッチを生成し、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1、2、および12のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

10

態様 1 4

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第三の置換が第三のミスマッチを生成し、前記第二の置換および前記第三の置換が前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1、2、および12のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

20

態様 1 5

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生成し、前記第三の置換が第三のミスマッチを生成し、前記第二の置換および前記第三の置換が前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1、2、および12のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

30

態様 1 6

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、態様12～15のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 1 7

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様12～15のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 1 8

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第一の鎖は、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチおよび第四のミスマッチを含み、前記第二、第三および第四のミスマッチは、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1または態様2に記載の二本鎖RNA。

40

態様 1 9

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号74

50

3)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1、2、および18のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様20

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1、2、および18のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

10

態様21

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置8にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～8塩基3'側にある、態様1、2、および18のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

20

態様22

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様18～21のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【0526】

態様23

前記第一の鎖が、

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置9にある、第一のミスマッチと；

30

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであって、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、第二のミスマッチとを含む、態様1または態様2に記載の二本鎖RNA。

態様24

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様1、2、および23のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

40

態様25

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様1、2、および23のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様26

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一

50

のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様1、2、および23のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様27

前記第一の鎖が、配列番号298～304から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様23に記載の二本鎖RNA。

態様28

前記第一の鎖を含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、2個を超えない、態様23～27のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様29

前記第一の鎖を含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、態様23～27のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様30

前記第一の鎖を含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様23～27のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様31

前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の号付けに基づいて位置9にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対して第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、前記第二および第三のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様1または2に記載の二本鎖RNA。

態様32

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様1、2、および31のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様33

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様1、2、および31のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様34

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様1、2、および31のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様35

前記第一の鎖を含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、態様31～34のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 3 6

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様 3 1～3 4のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 3 7

前記第一の鎖が、

- i) CUGCUGCUAAAGCUGCUGCUG (配列番号325) (CUG_307);
- ii) CUGCUGCUAAUACUGCUGCUG (配列番号326) (CUG_334);
- iii) CUGCUGCUAAUGAUGCUGCUG (配列番号327) (CUG_361);
- iv) CUGCUGCUAAUGCAGCUGCUG (配列番号328) (CUG_388);
- v) CUGCUGCUAAUGCACUGCUG (配列番号329) (CUG_415);
- vi) CUGCUGCUACAGAUGCUGCUG (配列番号330) (CUG_631);
- vii) CUGCUGCUACAGCAGCUGCUG (配列番号331) (CUG_658);
- viii) CUGCUGCUACAGCUGAUGCUG (配列番号332) (CUG_712);
- ix) CUGCUGCUAAUGCUGAUGCUG (配列番号336) (CUG_442);
- x) CUGCUGCUACAACUGCUGCUG (配列番号337) (CUG_604); および
- xi) CUGCUGCUACAGCUACUGCUG (配列番号338) (CUG_685)

10

から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様 3 1に記載の二本鎖RNA。

態様 3 8

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、または配列番号867 (UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチ、および第四のミスマッチを含み、前記第二、第三、および第四のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様 1または態様 2に記載の二本鎖RNA。

20

態様 3 9

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様 1、2、および3 8のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

30

態様 4 0

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様 1、2、および3 8のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

40

態様 4 1

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置9にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～7塩基3'側にある、態様 1、2、および3 8のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

50

態様 4 2

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様38～41のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 4 3

前記第一の鎖が、配列番号341～344から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様38に記載の二本鎖RNA。

態様 4 4

前記第一の鎖が、配列番号347～367から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様38に記載の二本鎖RNA。

【0527】

態様 4 5

前記第1の鎖が、

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号866))、または(UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867))の番号付けに基づいて位置10にある、第一のミスマッチ；および

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであって、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、第二のミスマッチを含む、態様1または態様2に記載の二本鎖RNA。

態様 4 6

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または45のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 4 7

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または45のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 4 8

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または45のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 4 9

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、2個を超えない、態様45～48のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 5 0

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、態様45～48のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 5 1

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様45～48のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様 5 2

10

20

30

40

50

前記第一の鎖が、配列番号305～310から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様45に記載の二本鎖RNA。

態様53

前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の号付けに基づいて位置10にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対して第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、前記第二および第三のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1または2に記載の二本鎖RNA。

態様54

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または53のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様55

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU (配列番号866)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または53のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様56

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または53のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様57

前記第一の鎖を含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、態様53～56のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様58

前記第一の鎖を含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様53～56のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様59

前記第一の鎖が、

- i) CUGCUGCUGAAGAUGCUGCUG (配列番号333) (CUG_2116);
 - ii) CUGCUGCUGAAGCAGCUGCUG (配列番号334) (CUG_2143);
 - iii) CUGCUGCUGAAGCUACUGCUG (配列番号335) (CUG_2170);
 - iv) CUGCUGCUGAAACUGCUGCUG (配列番号339) (CUG_2089); および
 - v) CUGCUGCUGAAGCUGAUGCUG (配列番号340) (CUG_2197).
- から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様53に記載の二本鎖RNA。

態様60

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号743)

10

20

30

40

50

)、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチ、および第四のミスマッチを含み、前記第二、第三、および第四のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1または態様2に記載の二本鎖RNA。

態様6 1

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または60のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

10

態様6 2

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または60のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

20

態様6 3

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置10にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～6塩基3'側にある、態様1、2、または60のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

30

態様6 4

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様60～63のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様6 5

前記第一の鎖が、配列番号345、346および配列番号368～375から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様60に記載の二本鎖RNA。

【0528】

態様6 6

前記第1の鎖が、

i) 前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチであって、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にある、第一のミスマッチ；および

40

ii) 前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチであって、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、第二のミスマッチを含む、態様1または2に記載の二本鎖RNA。

態様6 7

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチ

50

マッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および66のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様68

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および66のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様69

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一および第二の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および66のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様70

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、2個を超えない、態様66～69のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様71

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、態様66～69のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様72

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様66～69のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様73

前記第一の鎖が、

- i) CUGCUGCUGCACAUGCUGCUGC (配列番号311) (CUG_217);
- ii) CUGCUGCUGCAGAUGCUGCUGC (配列番号312) (CUG_226);
- iii) CUGCUGCUGCAGCAGCUGCUGC (配列番号313) (CUG_235);
- iv) CUGCUGCUGCAGCUACUGCUGC (配列番号314) (CUG_244); および
- v) CUGCUGCUGCAGCUGAUGCUGC (配列番号315) (CUG_253)

から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様66に記載の二本鎖RNA。

態様74

前記第一の鎖が配列番号793～803から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様66に記載の二本鎖RNA。

態様75

前記第一の鎖が前記標的CAGリピート領域に対して第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対して第二のミスマッチおよび第三のミスマッチを含み、前記第二および第三のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1または2に記載の二本鎖RNA。

態様76

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換

は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および75のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様77

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および75のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

10

態様78

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の少なくとも第一の置換、第二の置換、および第三の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生じ、UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第二の置換および前記第三の置換は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および75のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様79

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、3個を超えない、態様75～78のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

20

態様80

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様75～78のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様81

前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第一のミスマッチを含み、前記第一のミスマッチが、配列番号743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743))、配列番号866 (GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866))、またはUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の位置11にあり、前記第一の鎖が、前記標的CAGリピート領域に対する第二のミスマッチ、第三のミスマッチ、および第四のミスマッチを含み、前記第二、第三、および第四のミスマッチが、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1または態様2に記載の二本鎖RNA。

30

態様82

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号743)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および81のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

40

態様83

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号866)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および81のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様84

前記第一の鎖が、ヌクレオチド配列UGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)

50

の少なくとも第一、第二、第三、および第四の置換を含むバリエーションであり、前記第一の置換が前記第一のミスマッチを生成し、UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号867)の番号付けに基づいて位置11にあり、前記第二の置換が前記第二のミスマッチを生じ、前記第三の置換が第三のミスマッチを生じ、前記第四の置換が第四のミスマッチを生じ、前記第二、第三、および前記第四の置換は、前記第一のミスマッチの1～5塩基3'側にある、態様1、2、および81のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様85

前記第一の鎖が含む、前記標的CAGリピート領域に対するミスマッチが、4個を超えない、態様81～84のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

【0529】

態様86

前記第二の鎖が、前記第一の鎖に対して100%相補的である、態様1～85のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様87

前記第二の鎖が、前記第一の鎖に対して、1～10個のミスマッチ、3～5個のミスマッチ、4～7個のミスマッチ、または5～10個のミスマッチを含む、態様1～85のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様88

前記二本鎖RNAが、18塩基～25ヌクレオチド、19～25ヌクレオチド、19～23ヌクレオチド、または19～21ヌクレオチドの長さを有する、態様1～85のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様89

前記二本鎖RNAが、21ヌクレオチド～25ヌクレオチドの長さを有する、態様1～85のいずれか一項に記載の二本鎖RNA。

態様90

態様1～89のいずれか一項に記載の第一の鎖をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子であって、前記ヌクレオチド配列が、真核細胞において機能的であるプロモーターに作動可能に連結されている、DNA分子。

【0530】

態様91

組換え核酸であって、

a1) 態様1～89のいずれか一項に記載の二本鎖RNAと；

b1) 5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドと

を含み、前記組換え核酸は、

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

ii) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；

iii) 前記ループポリヌクレオチド；

iv) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；および

iv) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含み、前記5'フランキングポリヌクレオチド、前記ループポリヌクレオチド、および前記3'フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、前記二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性であるか；または

a2) 態様1～89のいずれか一項に記載の二本鎖RNAと；

b2) 5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドと

を含み、前記組換え核酸は、

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

ii) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；

iii) 前記ループポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

iv) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；および

v) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含み、前記5'フランキングポリヌクレオチド、前記ループポリヌクレオチド、および前記3'フランキングポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、前記二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性であるか；または

a3) 態様1～89のいずれか一項に記載の二本鎖RNAと；

b3) 5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドと

を含み、前記組換え核酸は、

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

ii) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；

iii) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；および

iv) 前記3'フランキングポリヌクレオチド；

を含み、前記5'フランキングポリヌクレオチドおよび前記3'フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、前記二本鎖RNAの第一の鎖および／または第二の鎖に対して異種性であるか；または

a4) 態様1～89のいずれか一項に記載の二本鎖RNAと；

b4) 5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドを含むマイクロRNAスキュフォールドと

を含み、前記組換え核酸が、

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

ii) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；

iii) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；および

iv) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含み、前記5'フランキングポリヌクレオチドおよび前記3'フランキングポリヌクレオチドの一方または両方が、前記二本鎖RNAの第一および／または第二の鎖に対して異種性である、

組換え核酸。

態様92

組換え核酸が、

a) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

b) 前記二本鎖RNAの第一の鎖；

c) 前記ループポリヌクレオチド；

d) 前記二本鎖RNAの第二の鎖；および

e) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含む、態様91に記載の組換え核酸。

態様93

前記5'フランキングポリヌクレオチド、ループポリヌクレオチド、および3'フランキングポリヌクレオチドがmiR33に由来するものである、態様91または態様92に記載の組換え核酸。

態様94

前記組換え核酸が、

a) 前記5'フランキングポリヌクレオチド；

b) 前記二本鎖RNAの前記第一の鎖；

c) 前記二本鎖RNAの前記第二の鎖；および

d) 前記3'フランキングポリヌクレオチド

を含む、態様91に記載の組換え核酸。

態様95

前記5'フランキングポリヌクレオチドおよび3'フランキングポリヌクレオチドがmiR451に由来するものである、態様91または態様94に記載の組換え核酸。

10

20

30

40

50

【 0 5 3 1 】

態様 9 6

態様 9 1 ～ 9 5 のいずれか一項に記載の組換え核酸をコードするヌクレオチド配列を含む DNA 分子。

態様 9 7

前記 5' フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列 `tgcacacctcctggcgggcagctctg` (配列番号 738) によってコードされる、態様 9 6 に記載の DNA 分子。

態様 9 8

前記ルーブポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列 `tggtctggcaatacctg` (配列番号 739) によってコードされる、態様 9 6 または態様 9 7 に記載の DNA 分子。

態様 9 9

前記 3' フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列 `gggagggcctgccctgactgccac` (配列番号 740) によってコードされる、態様 9 6 ～ 9 8 のいずれか一項に記載の DNA 分子。

態様 1 0 0

配列番号 5 7 9 ～ 6 5 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を含む、態様 9 6 ～ 9 9 のいずれか一項に記載の DNA 分子。

態様 1 0 1

前記 5' フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列 `acctactgactgccaggcgcacttggaatggcaagg` (配列番号 854) によってコードされる、態様 9 6 に記載の DNA 分子。

態様 1 0 2

前記 3' フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列 `tcttgctatacccagaaaaacgtgccaggaagagaac` (配列番号 855) によってコードされる、態様 9 6 または態様 1 0 1 に記載の DNA 分子。

態様 1 0 3

i) 前記 5' フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列 `acctactgactgccagggcacttggaatggcaagg` (配列番号 854) によってコードされる；

ii) 前記 3' フランキングポリヌクレオチドが、ヌクレオチド配列 `tcttgctatacccagaaacgtgccaggaagagaac` (配列番号 855) によってコードされる；および

iii) 前記第一の鎖または前記第二の鎖が、配列番号 3 7 9 ～ 4 5 6 のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によってコードされる、

態様 9 6 に記載の DNA 分子。

態様 1 0 4

前記 5' フランキングポリヌクレオチドが、配列番号 8 5 6 に記載のヌクレオチド配列によってコードされている、態様 9 6 に記載の DNA 分子。

態様 1 0 5

前記 3' フランキングポリヌクレオチドが、配列番号 8 5 7 に記載のヌクレオチド配列によってコードされている、態様 9 6 または態様 1 0 4 に記載の DNA 分子。

態様 1 0 6

i) 前記 5' フランキングポリヌクレオチドが、配列番号 8 5 6 に記載のヌクレオチド配列によってコードされている；

ii) 前記 3' フランキングポリヌクレオチドが、配列番号 8 5 7 に記載のヌクレオチド配列によってコードされている；および

iii) 前記第一の鎖または前記第二の鎖が、配列番号 3 7 9 ～ 4 5 6 のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によってコードされている、

態様 9 6 に記載の DNA 分子。

態様 1 0 7

前記 5' フランキングポリヌクレオチドが、配列番号 8 5 8 に記載のヌクレオチド配列によってコードされている、態様 9 6 に記載の DNA 分子。

10

20

30

40

50

態様 108

前記3'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号859に記載のヌクレオチド配列によってコードされている、態様96または態様107に記載のDNA分子。

態様 109

i) 前記5'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号858に記載のヌクレオチド配列によってコードされている；

ii) 前記3'フランキングポリヌクレオチドが、配列番号859に記載のヌクレオチド配列によってコードされている；および

iii) 前記第一の鎖または前記第二の鎖が、配列番号379～456のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によってコードされている、

態様96に記載のDNA分子。

【0532】

態様 110

態様96～109のいずれか一項に記載のDNA分子を含む、組換え発現ベクター。

態様 111

ヌクレオチド配列が、真核細胞において機能的であるプロモーターに作動可能に連結されている、態様110に記載の組換え発現ベクター。

態様 112

前記プロモーターが、RNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターである、態様111に記載の組換え発現ベクター。

態様 113

前記プロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、U6プロモーター、EF1 α プロモーターまたはH1プロモーターである、態様111または態様112に記載の組換え発現ベクター。

態様 114

5'アデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)配列および3'AAV ITR配列を含む、態様110～113のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター。

態様 115

態様91～95のいずれか一項に記載の組換え核酸をコードするヌクレオチド配列を含む、組換え発現ベクター。

態様 116

ヌクレオチド配列が、真核細胞において機能的であるプロモーターに作動可能に連結されている、態様115に記載の組換え発現ベクター。

態様 117

前記プロモーターが、RNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターである、態様116に記載の組換え発現ベクター。

態様 118

前記プロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、U6プロモーター、EF1 α プロモーターまたはH1プロモーターである、態様116または態様117に記載の組換え発現ベクター。

態様 119

5'アデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)配列および3'AAV ITR配列を含む、態様115～118のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター。

【0533】

態様 120

態様110～119のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターを含む送達媒体。

態様 121

非ウイルス性送達媒体である、態様120記載の送達媒体。

態様 122

脂質ナノ粒子である、態様121に記載の送達媒体。

10

20

30

40

50

態様 1 2 3

ウイルス粒子である、態様 1 2 0 に記載の送達媒体。

態様 1 2 4

態様 1 1 0 ～ 1 1 9 のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターを含むウイルス粒子。

態様 1 2 5

アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子である、態様 1 2 6 に記載のウイルス粒子。

態様 1 2 6

前記 AAV 粒子が AAV9 キャプシドを含む、態様 1 2 5 に記載のウイルス粒子。

態様 1 2 7

前記 AAV 粒子が AAV2 キャプシドを含む、態様 1 2 5 に記載のウイルス粒子。

態様 1 2 8

a) 態様 1 1 0 ～ 1 1 9 のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター；および

b) 薬学的に許容される賦形剤

を含む組成物。

態様 1 2 9

a) 態様 1 2 0 ～ 1 2 3 のいずれか一項に記載の送達媒体；および

b) 薬学的に許容される賦形剤

を含む組成物。

態様 1 3 0

a) 態様 1 2 4 ～ 1 2 7 のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターを含むウイルス粒子；および

b) 薬学的に許容される賦形剤

を含む組成物。

【 0 5 3 4 】**態様 1 3 1**

CAG リピート伸長障害を有する個体において疾患関連 CAG リピート含有 RNA の翻訳を選択的に減少させる方法であって、有効量の態様 1 1 0 ～ 1 1 9 のいずれか一項記載の発現ベクター、態様 1 2 0 ～ 1 2 3 のいずれか一項記載の送達媒体、態様 1 2 4 ～ 1 2 7 のいずれか一項記載のウイルス粒子、または態様 1 2 8 ～ 1 3 0 のいずれか一項記載の医薬組成物を前記個体に投与する工程を含む、方法。

態様 1 3 2

前記リピート伸長障害が、ハンチントン病、脊髄小脳失調症 1 型、脊髄小脳失調症 2 型、脊髄小脳失調症 3 型、脊髄小脳失調症 6 型、脊髄小脳失調症 7 型、脊髄小脳失調症 12 型、脊髄小脳失調症 17 型、脊髄および球筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、または鎖骨頭蓋異形成症である、態様 1 3 1 に記載の方法。

態様 1 3 3

前記投与が、前記個体の中枢神経系への直接注射を含む、態様 1 3 1 または態様 1 3 2 に記載の方法。

態様 1 3 4

前記直接注射が、脳室内注射、実質内注射、髄腔内注射、線条体内注射、視床内注射、大槽内注射、軟膜下注射、またはそれらのいずれかの組合せである、態様 1 3 3 に記載の方法。

態様 1 3 5

前記投与により、疾患関連 CAG リピート含有 RNA によりコードされるポリペプチドに対する非疾患関連 CAG リピート含有 RNA によりコードされるポリペプチドの比を 1.0 超にする、態様 1 3 1 ～ 1 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

態様 1 3 6

前記投与により、疾患関連 CAG リピート含有 RNA によりコードされるポリペプチドに対する非疾患関連 CAG リピート含有 RNA によりコードされるポリペプチドの比を 1.1 ～ 1.8 にする、態様 1 3 1 ～ 1 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

態様 137

前記投与により、疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドに対する非疾患関連CAGリピート含有RNAによりコードされるポリペプチドの比を1.8超にする、態様131～134のいずれか一項に記載の方法。

【実施例】

【0535】

材料および方法：

〔CAGリピート標的shRNA発現ベクターのクローニング〕

レンチウイルスpLKO.1-TRC shRNA発現ベクターをAddgene (10878) から入手し、T2Aポリペプチドリンカーで分離されたピューロマイシン耐性遺伝子上流にEGFPを挿入した。さらに、shRNAクローニング部位の下流のXhoI制限部位を変異させた。次いでこのカスタムベクターpxTRC-EGFP-puroをEcoRIおよびAgeIで消化して1.9 kbのスタッファー配列を放出し、FastAP (Thermo Fisher) で処理して脱リン酸化し、ゲル精製した。次に、直線化および精製されたベクターを用いてshRNAインサートを追加したが、これはIntegrated DNA Technologies (IDT) から一本鎖として購入して二本鎖にアニールしたものであった。二本鎖は、In-Fusion (タカラバイオ) を用いた組換えベースのクローニングを可能にするために、pxTRC-EGFP-puroベクターのAgeIおよびEcoRI制限酵素切断部位のすぐ上流および下流とマッチする追加の16 bpsを各末端に有するように設計した。

【0536】

ライゲーションされたプラスミドをNEB Stable化学コンピテント細胞 (New England Biolabs) に形質転換し、30℃にてLB-寒天-カルベニシリンプレート上で増殖させた。個々のコロニーを30℃にてLB-カルベニシリン液体培養液中で増殖させ、標準的なmini-prepまたはmidi-prep手順で抽出し、陽性クローンをSangerシーケンシングで確認した。

【0537】

〔発現したshRNAの次世代シーケンシング〕

shRNA発現ベクター (500 ng) を、ネオントランスフェクションシステム (Invitrogen) を用いて30,000～40,000細胞にエレクトロポレーションし、5% CO₂中37℃で84時間増殖させた。ヒト胚腎臓 (HEK) 293T細胞 (ATCC) は、1x非必須アミノ酸 (NEAA) (Thermo Fisher)、5% ウシ胎児血清 (FBS)、および5% cosmic calf血清 (CCS) を補充したEagleの最小必須培地 (EMEM) 中で増殖させた一方、患者由来線維芽細胞 (Coriell Cell Repository, GM04281) は、20% FBS、1 mMピルビン酸ナトリウム、および1x NEAAを補充したEMEMで増殖させた。細胞をトリプシン処理によって収穫し、メーカー推奨のプロトコルに従ってmirVana miRNA分離キット (Invitrogen) を用いた低分子RNA (small RNA) 抽出のために処理した。RNAは、Nanodrop装置を用いたUV分光光度法によって定量化され、コア施設での配列決定のために送られた。低分子RNAは、TruSeq低分子RNAライブラリーキットで調製した後、Illuminaによって配列決定した。低分子RNA配列決定の結果は、カスタムバイオインフォマティクスワークフローによって分析した。簡単に説明すると、データは最初にfastqファイルに変換され、以下のコマンドラインを使用してTrimmomaticに通した：

```
java -jar trimmomatic-0.39.jar SE -threads 12 -trimlog shC9-2_trimlog.txt /.fastq ILLUMINACLIP:QIAseq.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:15
```

【0538】

A鎖 (5'アーム) およびB鎖 (3'アーム) と呼ばれる、設計したshRNAの前半および後半について、参照FASTAファイルを作成した。各shRNAアーム配列についてのこれらの参照配列には、隣接配列の追加ヌクレオチドが10個までが含まれていた。参照FASTAファイルをそれぞれの鎖ディレクトリに割り当て、トリミングされたfastqを各鎖フォルダーに挿入した。各参照フォルダーにおいてコマンドbowtie-build -r reference_list.

fasta reference_listを使用して、各鎖について3つの参照FASTAファイルを作成した。各鎖ディレクトリにおいてコマンドラインbowtie -S -p 12 -v 1 -a --best ref trim_fastq > sam_trim_fastq.samを使用して、.samファイルを作成した。タブレットソフトウェアを使用して、新しいアセンブリを開き.samファイルと参照FASTAファイルをアラインメントすることによって、各鎖からタブレットファイルを作成した。タブレット.txtファイルを、各サンプルのA鎖およびB鎖の両方について得た。

【0539】

カスタムExcelファイルを作成して各タブレットファイルを分析した。各鎖は、Excelの別々のタブで分析された。タブレットファイルはExcelに貼り付けられ、そこで、報告された各shRNAの開始位置、終了位置、および長さが読み取られた。リード長と合計リード数の表がタブレットファイルから作成された。報告されたリード合計数中、リストされた各リード長のリードパーセンテージを報告するために棒グラフを作成した。次に、参照配列の開始位置1から始まり、参照鎖長に対して可能な最終開始位置で終わる、可能性のあるshRNAリードを構築するための表を作成した。タブレットファイルからの終了位置を使用して、可能性のあるshRNAリードをリストする同様の表を作成した。次に、正確な開始位置と終了位置で特定のshRNAリードを分析するための表を作成した。

【0540】

〔CAGリピート含有遺伝子発現のためのルシフェラーゼベースのモデル細胞の生成〕

ハンチンチン (HTT) 野生型 (wt) および変異型 (mut) タンパク質発現の相対的ノックダウンを測定するための迅速な代理 (surrogate) アッセイを創出するために、wtおよびmut mRNAのHTTエキソン1断片を、患者由来線維芽細胞 (GM04281) のcDNAからクローニングした。これらは、CAGリピートの上流のエキソン1配列と、CAGリピート自体と、それに続くリピート下流のエキソン1配列の短い断片とを含んでいた。これらのクローンは、PCRを介して、wtおよびmutバリエーションに異なるペプチドタグ (HAおよびFLAGタグ) を含むように設計し、pINC3Gベクター中のmCherryレポータータンパク質の上流かつインフレームにクローニングした。誘導可能Tet-onプロモーターをCMVαプロモーターで置き換え、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を、T2Aリンカーを介してmCherry遺伝子の下流かつインフレームに挿入した。すべてのベクターはサンガー配列決定によって確認された。

【0541】

〔shRNA活性についてのルシフェラーゼ活性アッセイ〕

50.0 ngのHTT wtまたはmutルシフェラーゼ、5.0 ngのRSV-Renilla (Promega)、および12.5 ngの示されたshRNA発現構築物を用いて、24ウェルプレート上でHEK293T細胞を共トランスフェクトすることによって、ルシフェラーゼアッセイを確立し実施した。トランスフェクションの48時間後、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを実施し、設計されたshRNAのノックダウン効率を決定した。ホタルルシフェラーゼ値を最初にRenillaルシフェラーゼ値に対して正規化し、次いでスクランブルshRNA対照と比較した。ルシフェラーゼ実験を少なくとも3回実施し、二元配置ANOVAとそれに続くTukeyの事後検定を用いて統計解析を実施した。

【0542】

〔患者由来細胞における突然変異型および野生型ハンチンチンのノックダウンについてのウェスタンブロット分析〕

ウェスタンブロット分析は本質的に以前に報告されたように実施した (Hu et al., 2009; Gagnon et al., 2010)。簡単に述べると、細胞をトリプシン処理によって回収し、タンパク質を細胞溶解緩衝液および遠心分離で抽出し、タンパク質をBCAまたはブラッドフォードアッセイによって定量した。Novexトリス酢酸SDSランニングバッファー (Invitrogen) を用いて5% (50:1アクリルアミド:ビスアクリルアミド) トリス酢酸ゲル上のSDS-PAGEによってタンパク質試料 (12~15 ug) を分離した。ゲルは典型的には4~10℃において100~120ボルトで6~8時間分離した。HTTタンパク質をHybond-C Extra (Amersham Biosciences) ニトロセルロースに2.5~3時間かけて移した。

HTTタンパク質バンドは、1:5000希釈での抗HTT一次抗体（MAB2166、Chemicon）および1:5000希釈での抗マウスHRP共役抗体（Jackson Immunoresearch）を用いて検出した。チューブリンローディングコントロールを、標準的な手順により別のゲル上で実施した。タンパク質は、iBrightイメージャー（Thermo Fisher）上での化学発光、またはフィルムへの曝露によって可視化した。総HTTタンパク質レベルは、まずチューブリンローディングコントロールレベルに対して正規化し、次に処理コントロールに対して正規化した後にプロットした。定量化はImageJで実施し、データはHillプロット方程式を用いてPrismソフトウェアでプロットした。

【0543】

〔shRNAレンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子のパッケージング〕

10

レンチウイルス粒子を作製するために、100 mmプレート上のHEK293T細胞（～60%コンフルエント）を、CMV-VSV-G（Addgene #8454）、CMV-dR dvpr（Addgene #8454）、およびpLKO1 shRNAレンチウイルス構築物でトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後、レンチウイルス粒子含有培地を細胞から除去し、濾過して細胞残屑を除去し、70,000×gで2時間遠心分離してレンチウイルス粒子を濃縮した。レンチウイルス粒子をPBSに懸濁し、-80℃で保存した。AAV粒子を生成するために、PCRを用いて、U6プロモーター駆動shRNAをpAAV-CAG-Emeraldプラスミド（プラスミド骨格pAAV-MCS、タカラ）中のbGHポリAシグナルの下流にサブクローンした。HEK293T細胞をpHelper（タカラ）、pAAV-DJ（Cell Biolabs Inc.）でトランスフェクトし、shRNA発現pAAV CAG-Emeraldプラスミドを示した。トランスフェクションの72時間後、AAV粒子を、AAVpro抽出液（タカラ）を用いて細胞から抽出した。ITRを有する領域を増幅するプライマーを用いたqPCRによりウイルスゲノム含量を測定した。

20

【0544】

〔実施例1：CAGリピート標的化shRNAの発現およびプロセシングの最適化〕

shRNAは、以前に報告されたプロトコール（Moffat et al., 2006）の修正に従って、U6プロモーター駆動発現ベクターにクローニングした。発現ベクターは、蛍光によってトランスフェクション効率をモニターするのを助けるためにピューロマイシン耐性遺伝子の upstream にEGFP遺伝子を含めることによってカスタマイズされ、ベクターpxTRC-EGFP-puroが得られた（図1A）。2つのshRNAが、元のpxTRC-EGFP-puroベクターの発現およびプロセシングスキャフォールドを使用してクローニングされた（Moffat et al., 2006）。これらはshHD1およびshHD1-Lであり、それぞれ標的に対して完全にマッチするか、または3つの中央ミスマッチ（mismatches）（位置10～12）を含むように設計された。内因性PARP1（shPARP）、HTTタンパク質のCAGリピートの外側の（shHD2.4）を標的とする対照shRNA、およびmCherryに対する非標的化shRNA（shMChry）もクローニングされた（表1）。

30

【0545】

40

50

表1：CAG リピート標的化 shRNA クローニングインサート

shRNA 名称	shRNA クローニングインサート配列 (5'-3')	スキマフォ ールド
shHD1	GTGGAAAGGACGAAACA ccgg CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG ctcgag CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG tttttg AATTCTCGACCTCGAGACAA [SEQ ID NO:51]	pTRC Pol III
shHD1L	GTGGAAAGGACGAAACA ccgg CAGCAGCAGTTTCAGCAGCAG ctcgag CTGCTGCTGAAACTGCTGCTG tttttg AATTCTCGACCTCGAGACAA [SEQ ID NO:52]	pTRC Pol III
shPARP	GTGGAAAGGACGAAACA ccgg CCGAGAAATCTCTTACCTCAA ctcgag TTGAGGTAAGAGATTTCTCGG tttttg AATTCTCGACCTCGAGACAA [SEQ ID NO:53]	pTRC Pol III
shHD2.4	GTGGAAAGGACGAAACA ccgg GACCGTGTGAATCATTGTCTA ctcgag TAGACAATGATTCACACGGTC tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:54]	pTRC Pol III
shMChry	GTGGAAAGGACGAAACA ccgg GAGGATAACTCGGCCATAATA ctcgag TATTATGGCCGAGTTATCCTC tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:55]	pTRC Pol III
shHD1-1	GTGGAAAGGACGAAACA cc GCAGCAGCAGCAGCAGCAG CAGC acctgc GCTG CTGCTGCTGCTGCTGCTGC tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:56]	改変 pTRC Pol III
shHD1L-1	GTGGAAAGGACGAAACA cc GCAGCAGCTCTAGCAGCAG CAGC acctgc GCTG CTGCTGCTAGAGCTGCTGC tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:57]	改変 pTRC Pol III
shHD1L-1a	GTGGAAAGGACGAAACA cc CAGCAGCAACAAGCAGCAG CAGC ctcgag GCT GCTGCTGCAAA TGCTGCTG tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:58]	改変 pTRC Pol III

shRNA 名称	shRNA クローニングインサート配列 (5'-3')	スキヤフォ ールド
shHD1L-1b	GTGGAAAGGACGAAACA cc GCAGCAGCCAAAGCAGCAG CAGC gtaagccacagatg GCTG CTGCTGCTAAAGCTGCTGC tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:59]	改変 pTRC Pol III
shHD1L-1c	GTGGAAAGGACGAAACA cc GCAGCAGCCAAAGCAGCAG CAGC gttctggaataacct GCTG CTGCTGCTAAAGCTGCTGC tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:60]	改変 pTRC Pol III
shHD1L-1d	GTGGAAAGGACGAAACA cc CTGCTGCTAAAGCTGCTG CTGC ctcgag GCA GCAGCAGCCAAAGCAGCAG tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:61]	改変 pTRC Pol III
shMCHR-1	GTGGAAAGGACGAAACA ccgg GAGGATAACTCGGCCATAATA CG acctgc GCta TTATGGCCGAGTTATCCTC tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:62]	改変 pTRC Pol III

10

20

太字・大文字の配列は、組換えベースのクローニングのための標的クローニングベクターと一致する。イタリック体の配列は、成熟二本鎖RNAの予測される成熟ガイド (guide) 鎖およびパッセンジャー (passenger) 鎖を示す。下線付きの配列は、潜在的な標的と比較したミスマッチ配列または反復配列からの逸脱を示す。小文字の配列は、shRNAヘアピンの内部ループ (loop) を示す。二本鎖DNAインサートのセンス鎖のみを示す。
【0546】

実験的な標的ノックダウン研究を進める前に、shPARP、shHD1、およびshHD1Lを患者由来のハンチントン病 (HD) 線維芽細胞にトランスフェクションした後、次世代低分子RNAシーケンシングを実施した。シーケンシングにより、3つのshRNAすべてについて、ガイド鎖 (3'shRNAヘアピンアーム) の予想される5'末端を、3'末端に向かってシード領域 (seed region) 中に3ヌクレオチドだけシフトさせる、shRNAの不完全なプロセシングが明らかになった (図1B)。これはPARP-1のような完全にマッチした標的に対して機能的なshRNAをもたらす可能性が高いが、shHD1-Lについては10-12位ではなく7-9位にミスマッチを生じさせた。Argonaute酵素にロードされる低分子RNAのシード領域は1-8位の範囲であるため、これはシード対合と標的CAGリピートへの効率的な結合を部分的に混乱させる。さらに、完全にマッチするshHD1は、成熟ガイド鎖の存在量が非常に低いことが明らかになった (表2)。Droshaプロセシング中のshHD1ヘアピンの反復性と高いGC含量は、ヘアピン構造の曖昧なシフトひいてはプロセシングレジスターのために正確なプロセシングを妨げる可能性がある。これらの結果は、shHD1-Lの標的結合の際にミスマッチを創出するために追加された3つのタンデムアデニンなど、ヘアピンにユニークな非反復配列を導入することが、予測可能なRNAヘアピンフォールドとプロセシングレジスターを創出することによって有益となることを示唆した。

30

40

【0547】

50

【表 2】

表 2 : shRNA のプロセシング精度と効率

shRNA 名称 (標的となる CAG 反復)	ミスマッチ (パッセンジ ャー, ガイド)	設計	ガイド RNA 5'プロ セシング	相対的 存在量
shHD1	なし	XhoI ループ	20%	非常に低い
shHD1-1	なし	ACCTGC ループ	50%	低い
shHD1L-1	(9-11, 9-11)	中央バルジなし	97%	高い
shHD1L-1a	(9-11, 9-11)	中央バルジ	55%	低い
shHD1L-1b	(9-11, 9-11)	中央バルジ, miR30 ルー プ	95%	高い
shHD1L-1c	(9-11, 9-11)	中央バルジ, miR33 ルー プ	95%	高い
shHD1L-1d	(9-11, 9-11)	中央バルジ, アームスワ ップ	95%	非常に低い
shHD-33part	(9-11, 9-11)	中央バルジ, miR33 部分 スキヤフォールド	25%	非常に低い
shHD-33part-3'k	(9-11, 9-11)	3'アームアームねじれ, miR33 部分	3%	非常に低い
shHD-33full	(9-11, 9-11)	中央バルジ, miR33 完全 スキヤフォールド, アー ムスワップ	90%	高い
shHD-33full- mimic	(9-11, 7-11)	miR33 バルジ, miR33 完 全スキヤフォールド	85%	高い

【0548】

CAGリピート標的shRNAにおけるシフトしたガイドRNAプロセシングパターンを補正するために、2つの新しいshRNAであるshHD1-1とshHD1L-1を設計した。これらの設計は、DroshaとDicerの示唆された切断とプロセシングパターンに対応するように隣接配列を調整した。ヘアピンアームの上流と下流の最初の数ヌクレオチドは、対合しないように調整され(C-Tミスマッチ)、各アームと内部ループの間に短い4ヌクレオチドのリンカーを追加し、よく規定された6ヌクレオチドループを生成すると予測される非対称的配列にループを変更した(図1C)。また、shRNAをHEK 293T細胞にトランスフェクトしたところ、配列決定について低分子RNAの収率が高くなった。これらの変化は、プロセシングの欠陥を大幅に修正し、所望の切断パターンを有する比較的豊富な成熟shRNAを生成すると見られた。shHD1L-1 shRNAについては、ガイド鎖の約97%が、位置1-8で完全に相補的なシード領域を用いて正確にプロセシングされ、中央のミスマッチ(位置9-11になるように設計された)を適切に配置した(図1D、表2)。しかしshHD1-1については、プロセシングパターンを正しくシフトしたにもかかわらず、ガイド鎖の量は依然として少なかった(表2)。このように、GCに富む反復のshRNAは、その安定性と2つのヘアピンアーム間のペアリングレジスターをシフトする能力のために、DroshaまたはDicerプロセシングに課題をもたらし得る。

【0549】

この改変されたスキヤフォールド(足場)に基づく新しいデザインを探索するために、4つの追加のCAGリピート標的shRNAである、shHD1L-1aからshHD1L-1dまでをク

ローニングした（表1）。これらのデザインには、ループの変更とヘアピンアーム配列の交換に加えて、より自然なmiRNA様構造を生成するためにshRNAヘアピン自体の中心における意図的なミスマッチが含まれていた。shHD1L-1aのデザインは、非対称ループを元のデザインで使用されていた回文ループに置き換えた。配列決定により、このデザインはガイド鎖の5'末端に不均一性を生じ全体的な存在量を減少させたため、この元の非対称ループは低収率と不適切なプロセシングの潜在的な原因であることを明らかにした（表2）。次に、shHD1L-1bおよびshHD1L-1cについて、それぞれ内部ループを天然のmiR30およびmiR33ループに置き換えた。これらの設計は両方とも高い存在量と非常に高いプロセシング精度にプロセシングを回復させた（表2）。最後に、shHD1L-1dは、ガイド鎖がヘアピンの5'アームからプロセシングされるように設計された。このアームスワップは、プロセシングの予測可能性の低さ、存在量の減少、およびガイド鎖の3'末端へと向かう共通の1ヌクレオチドシフトなど、shHD1L-1aに見られたのと同様のプロセシング欠陥をもたらした。

10

【0550】

多くの治療用shRNAは、天然のmiRNAスキヤフォールド内に埋め込まれるように設計されている。したがって、miR33足場が中央ミスマッチCAGリピート標的shRNAのために選択された（Xie et al., 2020）（図2A-2B）。設計には、部分的なmiR33フランキングスキヤフォールド（shHD-33part）、ヘアピンねじれ（kink）を伴う部分的なスキヤフォールド（shHD-33part-3'k）、完全なmiR33フランキングスキヤフォールド（shHD-33full）、および、miR33のものを模倣するようにも設計されたヘアピン構造を持つ完全スキヤフォールド（shHD-33full-mimic）が含まれた（表3）。すべてのデザインは、shRNAヘアピン構造にバルジまたはねじれを生成するように作成され、ガイド鎖は3'アームではなく5'ヘアピンアームからプロセスされる。shHD-33partおよびshHD-33part-3'kデザインは部分的なmiR33スキヤフォールドであり、完全なmiR33 5'リーダー（leader）および3'トレーラー（trailer）フランキング配列を欠いていた。どちらのデザインも、非常に乏しい存在量と低いガイド鎖プロセシング予測可能性を示した（表2）。対照的に、shHD-33fullおよびshHD-33full-mimicは、ガイド鎖の5'末端で高い精度（85～90%）でプロセシングされ、比較的高い存在量に達した（表2）。これらのデザインはmiR33 miRNA構造を模倣し、shHD-33full-mimicはmiR33と非常によく似た中央バルジを創出した（図2C）。このように、miR33スキヤフォールド設計は、予測可能な5'末端プロセシング産物、中央のミスマッチの正確な配置、および成熟ガイド鎖の比較的高い存在量を生成することによって、堅牢なプロセシングを提供した。

20

30

【0551】

40

50

【表 3】

表 3 : CAG リピート標的 shRNA miR33 足場のクローニングインサート

shRNA 名称	shRNA クローニングインサート配列 (5'-3')	足場
shHD-33part	GTGGAAAGGACGAAACA g ctg CTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG t gttctggcaatacct g ca GCAGCAGCCAAAGCAGCAGCA ga tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:63]	miR33 pTRC Pol III
shHD-33part-3'k	GTGGAAAGGACGAAACA g ctg CTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG t gttctggcaatacct g ca GCAGCAGCTTAGCAGCAGCA ga tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:64]	miR33 pTRC Pol III
shHD-33full	GTGGAAAGGACGAAACA tgcacacctcctggcgggcagct ctg CTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG t gttctggcaatacct g ca GCAGCAGCCAAAGCAGCAGCAG gg aggcctgccctgactgcccac tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:65]	miR33 pTRC Pol III
shHD-33full-mimic	GTGGAAAGGACGAAACA tgcacacctcctggcgggcagct ctg CTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG t gttctggcaatacct g ca GCAGCACATCTAGCAGCAGCAG gg aggcctgccctgactgcccac tttttg AATTCTCGACCTGGTGACAA [SEQ ID NO:66]	miR33 pTRC Pol III

太字大文字の配列は、組換えベースのクローニングのためのターゲットクローニングベクターとマッチする。イタリック体の配列は、成熟二本鎖 RNA の予測される成熟したガイド鎖およびパッセンジャー鎖を表す。下線付きの配列は、潜在的な標的と比較したミスマッチ配列または反復配列からの逸脱を表す。小文字の配列は、shRNA ヘアピンの内部ループを表す。二本鎖 DNA インサートのセンス鎖のみを示している。

【 0 5 5 2 】

【実施例 2 : ルシフェラーゼベースのモデル系における CAG リピート標的 shRNA による CAG リピート伸長遺伝子発現の選択的低減】

CAG リピート標的 shRNA の効率とアリル選択性を評価するために、ルシフェラーゼベ

ースのレポーターアッセイをHEK 293T細胞で利用した。wt (17個のCAGリピートを含む) またはmut (68個のCAGリピートを含む) mRNA由来のHTTエクソン1のフラグメントを、ホタルルシフェラーゼのインフレームかつ上流にクローニングした。HEK293Tを、対照またはCAGリピート標的shRNAと共にwtまたはmutルシフェラーゼレポータープラスミドで共トランスフェクトした (図3A)。各shRNAについてのルシフェラーゼ活性 (Luciferase Activity) を対照スクランブル (Scramble) shRNAと比較して設定した。陽性対照shMchryおよびshHD1 shRNAは、wt (CAG17) およびmut (CAG68) の両方について、ルシフェラーゼ活性の50~60%の低下を示した。Wtをmutと比較した場合、HD1L-1、HD1L-1a、HD1L-1b、HD1L-d、またはHD-33part-3'kについてルシフェラーゼ活性の有意な低下は観察されなかった。wtと比較したmut活性の有意な低下が、HD1L-1c、HD-33part、HD-33fullおよびHD-33full-mimicで観察された。

10

【0553】

【実施例3：CAGリピート標的shRNAによるハンチンチン遺伝子発現のノックダウン】

CAGリピートを標的とし中央ミスマッチを有する低分子干渉RNA (siRNA) は、内因性変異型HTTアリルを選択的にノックダウンすることが以前に示されている (Hu et al., 2009)。我々のシステムがsiRNAと同様に応答していることを確認するために、患者由来線維芽細胞 (GM04281) における4つのコントロールsiRNAをトランスフェクトした (表4)。リピートの外側を標的とするコントロールsiRNA (siHD2.4) と、完全なペアリングでCAGリピートを直接標的とするコントロールsiRNA (siHD-3) は、ウェスタンブロット法で分析した場合いずれも、タンパク質発現 (expression) を同様にノックダウンした (図3B)。予想されたように、これらのsiRNAは強いアリル選択的阻害は示さず、特にsiHD2.4はそうであった。逆に、siHD-3-p9およびsiHD-3-p9-11の両方は、それぞれ位置9および9-11で標的に中央ミスマッチを導入するものだが、アリル選択的ノックダウンのウィンドウを提供した。HTT発現をウェスタンブロットによって分析した場合、それぞれは、特定の濃度範囲で、wt HTTアリルに対して変異型HTTアリルでより大きな減少をもたらした (図3B)。これらの結果は、siRNAを用いた以前の報告と相関している (Hu et al., 2009)。

20

【0554】

【表4】

30

表4：合成 CAG リピート標的化 siRNA

siRNA 名称	siRNA 配列 (5'-3')
siHD2.4_as	rUrArGrArCrArArUrGrArUrUrCrArCrArCrGrGtt (SEQ ID NO:67)
siHD-3_as	rGrCrUrGrCrUrGrCrUrGrCrUrGrCrUrGrCrUrGtt (SEQ ID NO:68)
siHD-3-p9_as	rGrCrUrGrCrUrGrCrArGrCrUrGrCrUrGrCrUrGtt (SEQ ID NO:69)
siHD-3-p9-11_as	rGrCrUrGrCrUrGrCrArArArUrGrCrUrGrCrUrGtt (SEQ ID NO:70)
siHD2.4_s	rCrCrGrUrGrUrGrArArUrCrArUrUrGrUrCrUrAtt (SEQ ID NO:71)
siHD-3_s	rCrArGrCrArGrCrArGrCrArGrCrArGrCrArGrCtt (SEQ ID NO:72)
siHD-3-p9_s	rCrArGrCrArGrCrArGrCrUrGrCrArGrCrArGrCtt (SEQ ID NO:73)
siHD-3-p9-11_s	rCrArGrCrArGrCrArUrUrUrGrCrArGrCrArGrCtt (SEQ ID NO:74)

40

"rN" は RNA スクレオチドを示す

【0555】

CAGリピート標的化shRNAsが内因性mut HTTのアリル選択的阻害を生じるかどうか

50

を決定するために、shScramble、shHD2.4、shHD 33fullおよびshHD 33full-mimicを含むmiR33スキファールドから発現されるshRNAsをレンチウイルス粒子にパッケージングし、患者由来線維芽細胞（patient-derived fibroblasts）を形質導入した。細胞は、GFPについての顕微鏡検査に基づいて90%超の効率で安定して感染された。7日後、細胞を回収し、ウェスタンブロットによってHTT発現をアッセイした。shScramble形質導入された患者由来線維芽細胞と比較して、HD2.4によってwtとmut HTTの両方が有意に減少した。shScramble形質導入された患者由来線維芽細胞と比較して、アリル選択的shRNAは、shHD-33fullおよびshHD33-fullmimicで形質導入された細胞におけるmut-HTTの発現を有意に減少させた（図5）。

【0556】

shRNA発現カセットをGM04281線維芽細胞に電気穿孔した。3.5日後、細胞をウェスタンブロットによりHTT発現についてアッセイした。ウェスタンブロット解析により、shHD1-1、shHD1L-1、およびshHD1L-1a~-1dを含むいくつかのshRNAがHTT発現の実質的な減少をもたらしていないことが見出された。EGFP発現を測定する顕微鏡検査およびフローサイトメトリーは、このトランスフェクションプロトコルを用いて典型的に30~40%の効率を明らかにした。低分子RNA配列決定に基づけば良好にプロセシングされていた、miR33スキファールドから発現されたshRNAのさらなる試験も、ロバスタなノックダウンを提供しなかった。これらの結果は、shRNA発現が患者由来の線維芽細胞において高レベルに達していない可能性があることを示唆した。

【0557】

【実施例4：ミスマッチしたガイド配列と完全マッチのガイド配列のshRNA量】

正しくプロセシングされた人工miRNAの存在量%は、正しくプロセシングされた5'末端を有しかつ参照転写物を含む参照CAGリピート領域にアラインメント（Alignments）される人工miRNAのRNA配列リードの数を取得し、参照転写物を含む参照CAGリピート領域にアラインメントされる人工miRNAのRNA配列リードの総数で割ることによって測定することができる

【0558】

表5および図4に示すように、HTT mRNAのCAGリピート領域を標的とするガイド配列の8~16位におけるミスマッチ（Mismatch）（複数可）の存在は、完全にマッチ（Perfect match）したガイド配列と比較して、存在量またはウイルスにコードされたshRNAを改善する。結果は、異なるヘアピンループ（hairpin loop）および細胞型にわたって一貫している。

【0559】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5：ミスマッチ shRNA と完全マッチの shRNA の存在量

構築物	細胞種	タイプ	鎖	アラインメント数	ループ	配列	ラウンド	最も豊富なりード	%
shHD_1_A	HD 線維芽	完全	A	434	ctc gag	CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA G (SEQ ID NO:746)	2	AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG (SEQ ID NO:747)	1 2 %
shHD_1_B	HD 線維芽	完全	B	627	ctc gag	CTGCTGCTGC TGCTGCTGCT G (SEQ ID NO:748)	2	CTGCTGCTGC TGCTGCTGtt t (SEQ ID NO:749)	1 1 %
shHD_1L_A	HD 線維芽	ミスマッチ	A	193	ctc gag	CAGCAGCAG t tt CAGCAGCA G (SEQ ID NO:501)	2	gCAGCAGCAG tttCAGCAG (SEQ ID NO:750)	3 2 %
shHD_1L_B	HD 線維芽	ミスマッチ	B	1351 7	ctc gag	CTGCTGCTG a aa CTGCTGCT G (SEQ ID NO:420)	2	CTGCTGaaaC TGCTGCTGtt ttt (SEQ ID NO:751)	4 4 %
shHD1_1_A	HEK293T	完全	A	4658	acc tgc	GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGC (SEQ ID NO:752)	3	CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GC (SEQ ID NO:753)	3 2 %
shHD1_1_B	HEK293T	完全	B	7543	acc tgc	GCTGCTGCTG CTGCTGCTGC TGC (SEQ ID NO:754)	3	CTGCTGCTGC TGCTGCTGct (SEQ ID NO:755)	2 0 %
shHD1_L_1_A	HEK293T	ミスマッチ	A	5434	acc tgc	GCAGCAGCT C T AGCAGCAGC AGC (SEQ ID NO:756)	3	cGCAGCAGCT CTAGCAGCAG (SEQ ID NO:757)	6 7 %
shHD1_L_1_B	HEK293T	ミスマッチ	B	1789 98	acc tgc	GCTGCTGCTG CT AG AGCTGC TGC (SEQ ID NO:758)	3	CTGCTGCTAG AGCTGCTGct tt (SEQ ID NO:759)	7 1 %

【0560】

【実施例 5：IN VIVOノックダウン】

発現コンストラクト U6-shHD33-Full-Mimic を AAV9 ベクターバックボーンにクローニングし、哺乳類細胞へのトリプルトランスフェクションを用いて AAV9 を作製し、二重 CsCl 密度勾配超遠心分離、脱塩、およびフィルター滅菌 (Signagen Laboratories) によって精製した。AAV ベクターは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) によって力価測定した。陰性対照として、スクランブル (Scramble) shRNA も、同じ製造プロセスを用いて AAV9 にパッケージングした (AAV9-shScr)。発現カセットはすべて、形質導入効率を評価するために緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする配列を含んでいた。

【0561】

ベクター調製物は、4 週齢で定位注射を用いて、麻酔した雄 zQ175 HET マウス (B6J.129S1-Htt^{m1Mfc}/190Chd1J) に両側線条体注射によって投与した。zQ175 マウスは、一方の対立遺伝子に約 190 の CAG リピート配列を有するヒト HTT エキソン 1 配列を発現し、他方の対立遺伝子に正常なマウス HTT を発現する。Menalled et al. (2012)

PLoS ONE 7:e49838。2.0 uL容量の試験物質を0.1 uL/分の速度でポンプ送達した。マウスにAAV9-shScr (8.0E9 vg/マウス) またはAAV9-shHD33-Full-Mimic (8.0E9 vg/マウス) を投与した。

【0562】

注射の6週間後に脳組織を採取し、GFP分布を組織学的に分析した。DARPP32とGFP染色の共局在は、zQ175線条体の形質導入を示した(図6)。野生型(WT)およびmut HTTタンパク質発現(Protein Expression)のウェスタンブロット解析は、AAV9-shScr処置群と比較して、AAV9-shHD33-Full-Mimic処理群におけるmut HTTの有意なノックダウンを示した(図7)。さらに、AAV9-shHD33-Full-Mimicは、WT HTTアリルと比較してmut HTTアリルの優先的なノックダウンを示した。

【0563】

【実施例6：ハンチントン病のZQ175マウスモデルにおけるアリル選択的ノックダウン】

材料および方法

発現コンストラクトU6-shHD33-Full-Mimic (Iris sbRNA) をAAV9ベクターバックボーンにクローニングし、哺乳類細胞へのトリプルトランスフェクションを用いてAAV9を産生し、二重CsCl密度勾配超遠心分離、脱塩、およびフィルター滅菌(Signagen Laboratories)によって精製した。ウイルスはPBS+0.005% Pluronic F-68中に製剤化した。発現カセットは、形質導入効率を評価するためにGFPを含有した。AAVベクターは、qPCRを介して力価測定した。陰性対照として、製剤溶媒を一群のトランスジェニックマウスおよび一群の野生型同腹仔に送達した。

【0564】

ベクター調製物を、麻酔した雄zQ175トランスジェニックマウス(B6J.129S1-Htt^{m1Mfc}/190Chd1J)および野生型同腹仔に、両側線条体注射により、4週齢時に定位注射を用いて投与した。2.0 μL容量の試験物質を、0.1 μL/分の速度でポンプ送達した。表9に概説する試験物質をマウスに投与した。

【0565】

【表9】

群	数	遺伝子型	試験物質	用量 vg/mouse
1	5	野生型(同腹仔)	溶媒	n/a
2	5	zQ175 トランスジェニック	溶媒	n/a
3	5	zQ175 トランスジェニック	スクランブル shRNA (対照)	8e9
4	5	zQ175 トランスジェニック	Iris sbRNA	8e8
5	5	zQ175 トランスジェニック	Iris sbRNA	4e9
6	5	zQ175 トランスジェニック	Iris sbRNA	8e9

【0566】

「Iris sbRNA」とは、配列番号606を含む組換えAAVをいい、これは、細胞内でプロセッシングされると、配列番号325である第一の鎖および配列番号555である第二の鎖を含む二本鎖RNAを生成するsbRNAをコードするヌクレオチド配列である（表6のCUG₋₃₀₇）。Iris sbRNAは、本明細書中で「shHDFull mimic」とも呼ばれる。

【0567】

ベースラインにおいて動物の体重を測定し、処置群間の均等な分布を確保した。その後、組織収集時まで週に一度体重を評価し、収集する前に動物の体重測定をした。

【0568】

注射の6週間後、脳組織を採取した。各群につき一匹の動物（合計6匹）をイソフルランで麻酔し、肝臓がクリアになるまでPBSを経心臓的に灌流し、続いて約50 mLの4% PFAを灌流した。全脳を採取し、4% PFAを含む25 mLのバイアルに入れ、4℃で24時間保存した。24時間後、脳をPBS中の30% ショ糖に移し、4℃で保存した。各群の残りの4匹（合計24匹）については、動物を急速断頭により安楽死させ、脳を頭蓋骨から切除し、冷却した0.9%滅菌生理食塩水で洗浄して過剰な血液を除去した。脳は、事前に湿らせた（0.9%生理食塩水）清潔な（DNAおよびRNAを含まない）濾紙を氷に詰めたガラス製ペトリ皿上に置いた上で、RNaseフリー条件下で部位ごとに顕微解剖した。線条体、皮質および小脳を解剖した。各組織サンプルを個別の1.5 mL Eppendorfチューブに入れ、液体窒素中で急速凍結した。

【0569】

線条体組織サンプルは、miRvana miRNA分離キット（Invitrogen）からの溶解緩衝液中でホモジナイズした。DNAは、All Prep DNA/RNAキット（Qiagen）を用いて抽出し、別々の低分子RNAおよび総RNA画分を、miRvana miRNA分離キットを用いて抽出した。qPCRは、TaqMan Universal PCR Master Mix II（Applied Biosystems）を用いて、反応ごとに100 ngのDNAをロードし、GFPを標的とするプライマー/プローブセットを用いて実施した（フォワード：GGAGCGCACCATCTTCTT（SEQ ID NO:（配列番号）860）、リバーサ：ATGTTGCCGTCCTCCTTG（SEQ ID NO:861）、プローブ：AAGGACGACGGCAACTACAAGACC（SEQ ID NO:862））および、マウスGAPDH（フォワード：TCACCTGGCCTACAGGATAAA（SEQ ID NO:863）、リバーサ：GCAAA CGGGAAGGAAATGAATG（SEQ ID NO:864）、プローブ：ACCCAGCCGAGAGGAAT GAGGTTA（SEQ ID NO:865））。反応はQuantstudio 7 Pro（Applied Biosystems）で行った。

【0570】

全脳をスライディングミクロトームに載せ、ドライアイスで凍結した。冠状切片（30 μm）を切り、8番目ごとの切片を免疫蛍光染色のために集めた。脳は12穴皿中で浮遊切片として染色した。組織切片をPBS中で5分間ずつ2回洗浄し、次に5%ロバ血清および0.3% Triton X-100を含むPBS溶液中で室温で2時間ブロッキングした。ブロッキング後、組織切片をウサギモノクローナル抗DARPP（1:100、Abcam、ab40801）一次抗体と共に4℃で一晩インキュベートした。0.3% Triton X-100を含むPBS中で組織切片を15分間ずつ3回再び洗浄した。組織切片をAlexa Fluor 594ヤギ抗ウサギ二次抗体（1:500、Life Technologies、A11012）と共に室温で2時間インキュベートした。0.3% Triton X-100を含むPBS中で組織切片を15分間ずつ3回再び洗浄し、続いて4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）核染色（Abcam）を室温で20分間行なった。組織切片をPBS中で2回洗浄し、次いでスライド上に載置し、カバーガラスを乗せた。Axiocan Z（Zeiss）顕微鏡を用いて切片の画像を撮影した。

【0571】

線条体組織試料は溶解緩衝液（150 mM NaCl、50 mM Tris pH 7.5、1 mM EDTA、1% Triton X-100、および1%プロテアーゼ阻害剤）中でホモジナイズした。Micro BCA Protein Assayキット（ThermoFisher）を用いて総タンパク質を定量した。ウエスタンブロット分析のために、35 μg/ウェルのタンパク質を5.5%トリス酢酸ポリアクリルアミドゲルにロードした。ゲルは、70 Vで15分間、次いで120 Vで3時間、ト

10

20

30

40

50

リス酢酸ランニング緩衝液中で泳動した。電気泳動後、タンパク質をNC膜 (Bio-Rad) に移した。膜を、PBST中の5%ミルクおよびTBST中で別々に室温で1時間ブロッキングした。膜を、マウスモノクローナル抗HTT (1:1,000シグマアルドリッチMAB2166) およびウサギモノクローナル抗ピンキュリン (1:10,000、Abcam、ab129002) に特異的な一次抗体と共に4°Cで一晩インキュベートした。膜を、PBST/TBST中でそれぞれ5分間ずつ3回洗浄し、次いで、対応するAffiniPure Peroxidaseコンジュゲート化二次抗体：ロバ抗マウスIgG (H+L) (1:4000、Jackson ImmunoResearch Laboratories、715-035-150)、ロバ抗ウサギIgG (H+L) (1:5000、Jackson Immuno Research Laboratories、711-035-152) と共に室温で1.5時間インキュベートした。膜を、PBST/TBST中でそれぞれ10分間さらに3回洗浄した。次いで、膜をSupersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) と共に室温で3分間インキュベートした。画像をiBright 1500 (Invitrogen) で取得し、ImageJを用いてバンド強度を定量した。

10

【0572】

[結果]

すべての動物は4週齢で手術を受け、用量投与後6週目の10週齢で組織を採取するまで生存した。試験期間を通じて異常は認められず、早期死亡も報告されなかった。8e9 vgでのスクランブルshRNA対照または8e9 vgでのIris sbRNAのいずれかで処置されたzQ175トランスジェニック動物の体重は、8週齢で開始して試験の残りの期間を通じて継続して溶媒 (vehicle) で処置されたzQ175トランスジェニック動物よりも有意に少なかった。

20

【0573】

ウイルスゲノム (viral genome) をqPCRによって定量し、線条体への用量依存的なsbRNAゲノム局在を示した (図8の右パネル)。GFP分布を免疫蛍光によって分析した。DARPP32およびGFP染色の共局在は、zQ175線条体の用量依存的な形質導入を示した (図8、左パネル)。WTおよびmut HTTタンパク質発現のウェスタンブロット分析は、8e8 vgおよび4e9 vgの用量で、溶媒 (vehicle) 処置群と比較して、Iris sbRNA処理群におけるmut HTTの有意なノックダウンを示した (図9)。さらに、Iris sbRNAは、WT HTTアリルと比較して、mut HTTアリルの優先的なノックダウンを示した。

30

【0574】

[実施例7：SCA2のATXN2マウスモデルにおけるアリル選択的ノックダウン]

材料および方法

発現構築物U6-shHD33-Full-MimicをAAV9ベクターバックボーンにクローニングし、哺乳類細胞へのトリプルトランスフェクションを用いてAAV9を産生し、二重CsCl密度勾配超遠心分離、脱塩、およびフィルター滅菌により精製した (Signagen Laboratories)。ウイルスはPBS+0.005% Pluronic F-68中に製剤化した。発現カセットは形質導入効率を評価するためにGFPを含有した。AAVベクターはqPCRによりタイター化した。陰性対照として、製剤溶媒をトランスジェニックマウスの一群と野生型同腹仔の一群に送達した。

40

【0575】

ベクター調製物は、麻酔した雄ATXN2-Q127トランスジェニックマウス (C57BL6/J×DBA/2Jハイブリッドバックグラウンド) および野生型同腹仔に、8週齢で定位注射を用いた片側 (右半球) 脳室内注射により投与した。ATXN2-Q127マウスは、Pcp2 (ブルキンエ細胞特異的) プロモーターの制御下で、127個グルタミン反復 (Q127) をコードする完全なヒトアタキシン-2 cDNAを含有している (Hansen et al. (2013) Hum Mol Genet. 22:271)。10.0 µL容量の試験物質を1 µL/分の速度でポンプ送達した。表10に概説した試験物質をマウスに投与した。

【0576】

50

【表 10】

群	数	遺伝子型	試験物質	用量 vg/mouse
1	5	野生型 (同腹仔)	溶媒	n/a
2	5	ATXN2-Q127 トランスジ ェニック	溶媒	n/a
3	5	ATXN2-Q127 トランスジ ェニック	スクランブル shRNA (対照)	2e11
4	5	ATXN2-Q127 トランスジ ェニック	Iris sbRNA	5e10
5	5	ATXN2-Q127 トランスジ ェニック	Iris sbRNA	2e11

10

【0577】

20

処置群間で均等に分布するように、ベースライン時に動物の体重を測定した。その後、組織採取時まで週に一度、体重を評価し、組織採取時には採取前の動物の体重を測定した。

【0578】

注射の6週間後、脳組織を採取した。各群につき一匹の動物（合計6匹）をイソフルランで麻酔し、肝臓がクリアになるまでPBSで経心臓的に灌流し、続いて約50 mLの4% PFAを灌流した。全脳を採取し、4% PFAを含む25 mLバイアルに入れ、4℃で24時間保存した。24時間後、脳をPBS中の30%ショ糖に移し、4℃で保存した。各群（合計19匹）の残りの4匹（野生型群では3匹）については、動物を急速断頭により安楽死させ、脳を頭蓋骨から切除し、冷却した0.9%滅菌生理食塩水で洗浄して過剰な血液を除去した。脳は、事前に湿らせた（0.9%生理食塩水）清潔な（DNAおよびRNAを含まない）濾紙を水氷に詰めたガラス製ペトリ皿上に置いた上で、RNaseフリー条件下で部位ごとに顕微解剖した。以下の構造を解剖した：線条体、皮質、小脳。各組織サンプルを個別の1.5 mL Eppendorfチューブに入れ、液体窒素中でスナップ凍結した。

30

【0579】

小脳組織サンプルを、miRvana miRNA分離キット (Invitrogen) からの溶解緩衝液中でホモジナイズした。All Prep DNA/RNAキット (Qiagen) を用いてDNAを抽出し、miRvana miRNA分離キットを用いて、低分子RNA画分および総RNA画分を別々に抽出した。qPCRは、TaqMan Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems) と共に反応当たり400 ngのDNAをロードし、GFPを標的とする以下のプライマー／プローブセットを用いて実施した：（フォワード： GGAGCGCACCATCTTCTT (SEQ ID NO:860)、リバーズ： ATGTTGCCGTCCTCCTTG (SEQ ID NO:861)、プローブ： AAGGACGACGGCAACTACAAGACC (SEQ ID NO:862))、およびマウス GAPDH (フォワード： TCACCTGGCCTACAGGATAAA (SEQ ID NO:863)、リバーズ： GCA AACGGGAAGGAAATGAATG (SEQ ID NO:864)、プローブ： ACCCAGCCGAGAGG AATGAGGTTA (SEQ ID NO:865))。反応はQuantstudio 7 Pro (Applied Biosystems) で行った。

40

【0580】

全脳をスライディングマイクロトームに載せ、ドライアイスで凍結した。矢状切片(60 μm)を切り、8番目ごとの切片を免疫蛍光染色のために集めた。12穴皿における浮遊切片

50

として脳を染色した。組織切片をPBSで5分間ずつ3回洗浄し、次に5%ロバ血清および0.3% Triton X-100を含む溶液中で室温で2時間ブロッキングした。ブロッキング後、組織切片をマウスモノクローナル抗カルビンジン (Calbindin) (1:100、Sigma Aldrich、SAB4200543) 一次抗体と共に4℃で一晩インキュベートした。組織切片をPBS中0.3% Triton X-100で15分間ずつ3回再び洗浄した。組織切片をAlexa Fluor 594ヤギ抗マウス二次抗体 (1:500、Life Technologies、A11005) と共に室温で2時間インキュベートした。組織切片をPBS中0.3% Triton X-100で15分間ずつ3回再び洗浄し、続いて4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) 核染色 (Abcam) を室温で20分間行った。組織切片をPBS中で2回洗浄し、それからスライド上に載置し、カバーガラスを乗せた。Axioscan Z (Zeiss) 顕微鏡を用いて切片の画像を撮影した。

10

【0581】

小脳組織試料を抽出緩衝液 (25 mM Tris-HCl pH 7.6、300 mM NaCl、0.5% Nonidet P-40、2 mM EDTA、2 mM MgCl₂、0.5 M 尿素およびプロテアーゼ阻害剤) 中でホモジナイズした。均質化した組織を遠心分離し、上清を採取した。ウエスタンブロット分析のために、等体積のタンパク質をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルにロードした。ゲルは、40 mAおよび最大電圧で2時間、ランニングバッファー (25 mM トリス、192 mM グリシン、0.1% SDS、pH 8.3) 中で泳動した。電気泳動後、セミドライ転写システム (Bio-Rad) を用いて、20 Vおよび最大アンペア数で1.5時間、トランスファーバッファー (25 mM トリス、192 mM グリシン、20% (v/v) メタノール、pH 8.3) 中でHybond PVDF膜にタンパク質を転写した。膜を0.1% Tween 20/PBS中の4%脱脂乳で4℃で2時間ブロッキングした。膜を以下の一次抗体と共に4℃で一晩インキュベートした：マウス抗アタキシン-2抗体 (1:4,000、BD Biosciences、611378)、マウスモノクローナル抗GFP抗体 (1:2,000、Santa Cruz、sc-9996)、マウスモノクローナル抗カルビンジン-D-28K抗体 (1:7,000、Sigma-Aldrich、C9848)、ウサギポリクローナル抗RGS8抗体 (1:5,000、Novus Biologicals社、NBP2-20153)、マウスモノクローナル抗PCP-2抗体 (1:2,000、Santa Cruz、sc-137064)、ウサギモノクローナル抗GAPDH (1:5,000、Cell Signaling Technology、2118)、マウスモノクローナル抗βアクチンペルオキシダーゼ抗体 (1:30,000、Sigma-Aldrich、A3854)、ウサギポリクローナル抗アタキシン-1抗体 (1:4,000、Cell Signaling Technology、2177)、ウサギポリクローナル抗AAK1抗体 (1:4,000、Cell Signaling Technology、79832)、ウサギモノクローナル抗Brn2/POU3F2 (1:4,000、Cell Signaling Technology、12137)、ウサギポリクローナル抗TBP抗体 (1:5,000、Cell Signaling Technology、8515)、ウサギポリクローナル抗AF9ポリクローナル抗体 (1:4,000、Proteintech、12825-1-AP)。膜を0.1% Tween 20/PBS中でそれぞれ10分間3回洗浄した後、0.1% Tween 20/PBS中の4%脱脂乳における対応する以下のペルオキシダーゼ共役二次抗体と4℃で2時間インキュベートした：ヤギ抗ウサギIgG (H+L) 抗体 (1:5000、Jackson ImmunoResearch Laboratories、111-035-144)、ロバ抗マウスIgG (H+L) 抗体 (1:5000、Jackson ImmunoResearch Laboratories、715-035-150)、およびウマ抗マウスIgG (H+L) 抗体 (1:5,000、Vector laboratories、PI-2000)。膜を0.1% Tween 20/PBS中でさらに3回、それぞれ10分間洗浄した。次に、製造業者のプロトコールに従って、膜をImmobilon Western Chemiluminescent HRP基質 (EMD Millipore) とインキュベートした。ChemiDoc MPイメージャー (Bio-Rad) で画像を取得し、ImageJを用いてバンド強度を定量した。

20

30

40

【0582】

[結果]

すべての動物は8週齢で手術を受け、14週齢での組織採取 (用量投与後6週) まで生存したが、例外として溶媒 (vehicle) で処置された一匹の野生型動物は14週齢での組織採取日に死亡していた。

【0583】

50

ウイルスゲノム (viral genome) をqPCRにより定量し、検出可能なsbRNAゲノムの小脳への局在が示された (図10の右パネル)。GFP分布を免疫蛍光により分析した。カルビンジンとGFP染色の共局在は、ATXN2-Q127小脳の用量依存的形質導入を示した (図10の左パネル)。WTとmutのATXN2タンパク質発現のウェスタンブロット分析は、 5×10^6 vgの用量において溶媒群に比べてIris sbRNA処理群でmut ATXN2の有意なノックダウンを示した (図11の左パネル)。さらに、Iris sbRNAはWT ATXN2アリルに比べてmut ATXN2アリルの優先的ノックダウンを示した。Iris sbRNAによる処置は主要な小脳遺伝子Calb1、Rgs8、およびPcp2の発現の部分的回復をもたらし、これはmut ATXN2ノックダウンの結果としての下流の改善の分子の実証である (図11の右パネル)。さらに、内因性CAGリピートを含む他の遺伝子 (ATXN1、AF-9、AAK-1、TBPおよびBrn2) の発現のウェスタンブロット (WB) 分析は、ATXN2遺伝子における伸長CAGリピートを標的とするsbRNAが同じリピートを含む健康な転写物の翻訳に影響しないことを実証した (図12)。

10

【0584】

[実施例8：レジスター (Register) はCAGリピートのノックダウン効率に影響しない]

上記「材料および方法」のセクションに記載されているように、レンチウイルスshRNA発現プラスミドおよびレンチウイルス粒子を作製した。HD線維芽細胞を、示されたshRNA/miRNA配列を発現するレンチウイルス粒子で感染させた。上記「材料および方法」のセクションに記載されているように、感染の5日後に抗HTTおよび抗ピンキュリンを用いてWBを実施した。mHTTのノックダウンは、評価したすべての配列で観察された (図13A~13C)。これらのデータは、1) 二本鎖RNAの第一および第二の鎖の間のミスマッチの異なる組み合わせ (例えば、「Iris sbRNA」の3つのミスマッチおよび「Iris sbRNA-nb」レンチウイルスサンプルの0のミスマッチ)、および、2) 二本鎖RNAの第一の鎖内の異なるミスマッチ (例えば、「Iris-sbRNA-UAC」のTACミスマッチおよび「Iris sbRNA」レンチウイルスサンプルのAAAミスマッチ) が、mHTTの効率的なノックダウンおよびアリル選択性を可能にすることを実証している。

20

【0585】

[図13A~C] 図13A。追加のガイド鎖 (Guide Strand)、ループ (loop)、およびパッセンジャー鎖 (Passenger strand) 配列の設計。30lp：miR-30ループ；30lp2：miR-30ループのバリエーション；cb：二本鎖RNAの第一および第二の鎖の間に3つのミスマッチ；nb：バルジなし (二本鎖RNAの第一および第二の鎖の間にミスマッチなし)；frm2：ループの3'末端に2つのミスマッチを伴うフレーム2 (レジスター2)；UAC：中央のミスマッチが (AAAではなく) TACである。図13B。HD患者由来の線維芽細胞を、2Dに記載されたmiRNAバリエーションをコードするレンチウイルスで形質導入した。図13C。図13Dにおけるウェスタンブロットデータの定量化。

30

【0586】

レンチウイルスshRNA発現プラスミドおよびレンチウイルス粒子を、上記の「材料および方法」のセクションに記載されたように作製した。これらの粒子は、第1レジストリー (HD33FMと示される)、第2レジストリー (「TGC」と示される)、または第3レジストリー (「GCT」と示される) を代表する第一鎖配列を含む同じmiRNAスキャフォールドの比較を可能にするサンプルを含んでいた。HD患者由来線維芽細胞を、10 MOIにおける示されたsbRNA発現レンチウイルス粒子で形質導入した。HTT発現レベルを、形質導入の7日後にウェスタンブロットにより評価し、Scramble33Full wtHTTまたはmHTTに対して正規化した。採取の前に、感染を確認するためにGFP蛍光を評価した。mHTTノックダウンのレベルおよびwtHTT発現のレベルは、HD33FM、TGCおよびGCTレンチウイルス試料間で類似していた (図13Dおよび図13E)。これらのデータは、リピート内の3つの可能なヌクレオチドのいずれかで開始される配列 (例えば、C (第1レジストリー)、U (第2レジストリー) またはG (第3レジストリー) で始まる第1鎖配列が、mHTTの効率的なノックダウンおよびアリル選択性の能力を有することを実証してい

40

50

る。

【0587】

〔実施例9：ルシフェラーゼベースのモデル系におけるCAGリピート標的化miRNAによるCAGリピート伸長タンパク質発現のアリル選択的減少〕

ガイド配列候補を生成して、ミスマッチの数と位置、およびリピート内のガイドの開始位置（すなわちC、U、またはG）の影響を系統的に評価した。位置8、9、10、および11に単一のミスマッチを含むガイド配列を生成した。少なくとも1つのミスマッチが位置8、9、10、または11に位置し、第2のミスマッチが位置8～16内に位置する、二重ミスマッチを含むガイド配列を生成した。少なくとも2つのミスマッチが位置8、9、10、または11に位置し、残りのミスマッチが位置8～16内に位置する、三重（Triple）および四重（Quadruple）のミスマッチも含めた。

【0588】

ガイドの開始位置を評価するために、少なくとも2つのミスマッチが位置8、9、10、または11に位置し、残りのミスマッチが位置8～16内に位置する、3つのミスマッチを含む配列を生成した。これらの配列は、リピート内の3つの可能なヌクレオチドのいずれか（すなわちC、U、またはG）で開始した。

【0589】

有害なオフターゲット効果の可能性があるガイド配列を除去するために、*in silico*解析を行った。オフターゲット遺伝子についての以下の基準が満たされた場合に、配列を合成した。

- ・ガイド配列位置1～21に完全に相補的な配列を含むオフターゲット遺伝子が0個
- ・ガイド配列位置1～21に完全に相補的な17マーを含むオフターゲット遺伝子が2個以下
- ・オフターゲット遺伝子（複数可）が完全に相補的な17マーを含む場合：
 - ・オフターゲット遺伝子（複数可）は腫瘍抑制遺伝子であってはならない
 - ・オフターゲット遺伝子（複数可）は、脳全体と比較して、または他のすべての組織と比較して、尾状核または被殻で高い発現を有してはいけいない
 - ・完全に相補的な17マーが完全に相補的なシード配列（ガイド配列の位置2～8）を含む場合：
 - ・オフターゲット遺伝子（複数可）は、他の遺伝子と比較して、尾状核または被殻で高く発現されてはいけいない

【0590】

*in silico*解析に合格した124のガイド配列候補をmir-33スキヤフォールド（配列番号(SEQ ID NO:)X）内に埋め込んで合成し、miRNAを駆動するU6プロモーターおよびGFP-T2A-ピューロマイシンを駆動するヒトPGKプロモーターを含むカスタム哺乳類発現プラスミドにクローニングした。

【0591】

CAGリピート標的化miRNAの効率およびアリル選択性を評価するために、野生型（17個のCAGリピートを含む）または変異体（68個のCAGリピートを含む）mRNAからのHTTエキソン1のフラグメントを、ホタルルシフェラーゼのフレーム内かつ上流にクローニングした（図14）。リン酸カルシウムトランスフェクション法を用いて、96ウェルプレート（4万細胞/ウェル）上のHEK293T細胞を、6.0 ngの野生型（wt）または変異体（mut）HTTルシフェラーゼプラスミド、0.9 ngのCMV-Renillaプラスミド（Promega）、および0.75 ngの示されたmiRNA発現プラスミドで共トランスフェクトすることによってルシフェラーゼアッセイを確立し、実施した。トランスフェクションの48時間後、細胞を25 μ Lの1x受動的（Passive）溶解バッファー（Promega）中で40分間溶解し、10 μ Lの溶解液を用いてデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ（Hampf and Gossen (2006) Anal. Biochem. 356:94-99）を実施して、設計したmiRNAのノックダウン効率を決定した。ホタルルシフェラーゼ値を最初にRenillaルシフェラーゼ値

に対して正規化し、次にスクランブルmiRNA対照に対して正規化した。ルシフェラーゼ実験を少なくとも3回行い、各miRNAについてwt対mutの正規化ルシフェラーゼ活性を比較する多重t検定を用いて統計分析を行った。陽性対照miRNA HD1-1構築物（ミスマッチのないCAGリピートを標的とする）は、wtおよびmut HTT構築物の両方についてルシフェラーゼ活性の約70%の低下をもたらした。50%を超えるmut HTT発現の低下が、評価した124のガイド配列のうち27について観察された。wt HTT発現の相対的保存（＜20%ノックダウン）が、評価した124のガイド配列のうち55について観察された（図16）。mut HTTについてのアリル選択性（wt HTT／mut HTT発現比＞1.4と定義される）は、評価した124のガイド配列のうち26について観察された。wt HTTと比較したmut HTT活性の有意な減少（ $p < 0.05$ ）が、評価した124のmiRNAのうち19について観察された。

10

【0592】

単一のミスマッチを含むガイド配列では、位置8または9に位置するミスマッチが、位置10または11に位置するミスマッチと比較して、mut HTTのノックダウンおよびmut HTTに対するアリル選択性の向上を示した（図18）。3つまたは4つのミスマッチを含むガイド配列では、開始ミスマッチ位置またはミスマッチ間の距離に関連した強い傾向は観察されなかった（図20）。同様に、3つのミスマッチを含むガイド配列では、リピート内のガイドの開始位置（すなわちC、U、またはG）に関連した強い傾向は観察されなかった（図21）。

【0593】

全体として、2つのミスマッチを含むガイド配列は、mut HTTのノックダウンおよびmut HTTに対するアリル選択性の最良の組み合わせを示した（図17）。2つのミスマッチを含むガイド配列のうち、mut HTTのノックダウンおよびmut HTTに対するアリル選択性は、位置8、9、10または11に最初のミスマッチを有するすべての配列で実証された。mut HTTのノックダウンのレベルとmut HTTに対するアリル選択性は、ミスマッチ間の距離(Distance between Mismatches)が増加するにつれて増加した（図19）。

20

【0594】

以下の基準に基づいて、9つのガイド配列がトップの候補として同定された：1) wt HTTと比較してmut HTTの活性における有意な減少（ $p < 0.05$ ）、2) mut HTTに対するアリル選択性（wt HTT／mut HTT発現の比＞1.4として定義される）、3) > 50%のmut HTT発現減少、および4) wt HTT発現の相対的保存（＜20%ノックダウン）。これら9つのガイド配列によるトランスフェクション後のmut HTTおよびwt HTTの発現レベルを図15に示している。

30

【0595】

上記の様々な実施形態は、さらなる実施形態を提供するために組み合わせることができる。本明細書および/または出願データシートに列挙されている米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許刊行物のすべては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。実施形態の態様は、必要であれば様々な特許、出願および刊行物の概念を採用するために修正して、さらなる実施形態を提供することができる。

40

【0596】

上記の詳細な説明に照らして、これらおよび他の変更を実施形態に加えることができる。一般に、以下の請求の範囲において、使用される用語は、明細書および請求の範囲に開示された特定の実施形態に請求の範囲を限定すると解釈されるべきではなく、すべての可能な実施形態を、かかる請求の範囲が権利を有する均等物の全範囲とともに含むと解釈されるべきである。したがって、請求の範囲は、開示によって限定されない。

50

【図 2 A】

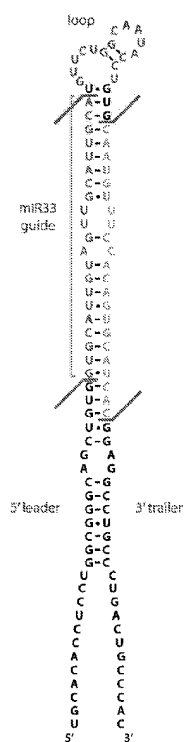


FIG. 2A

【図 2 B】

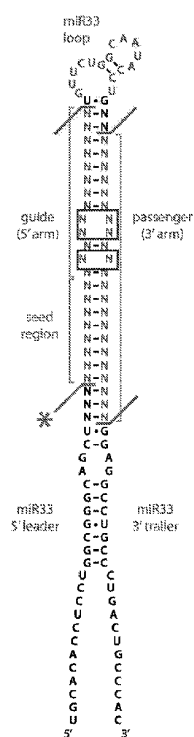


FIG. 2B

【図 2 C】

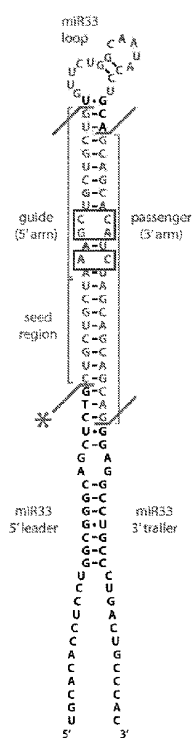


FIG. 2C

【図 3 A】

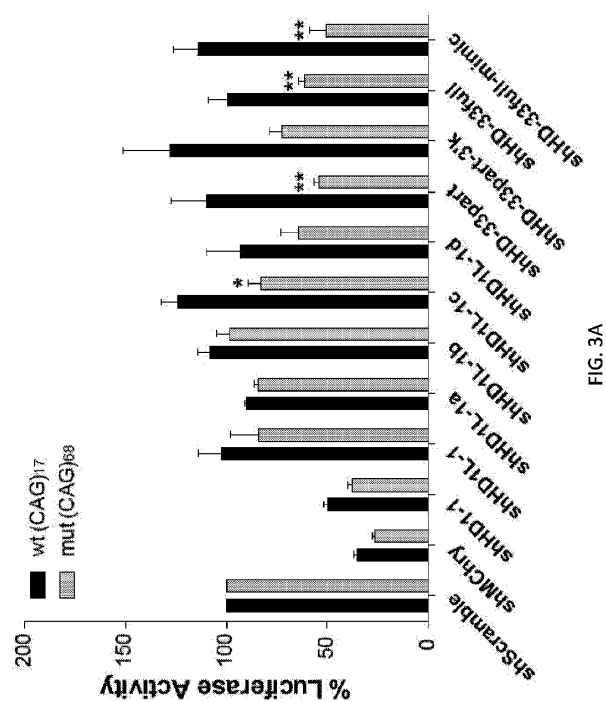


FIG. 3A

【 図 3 B 】

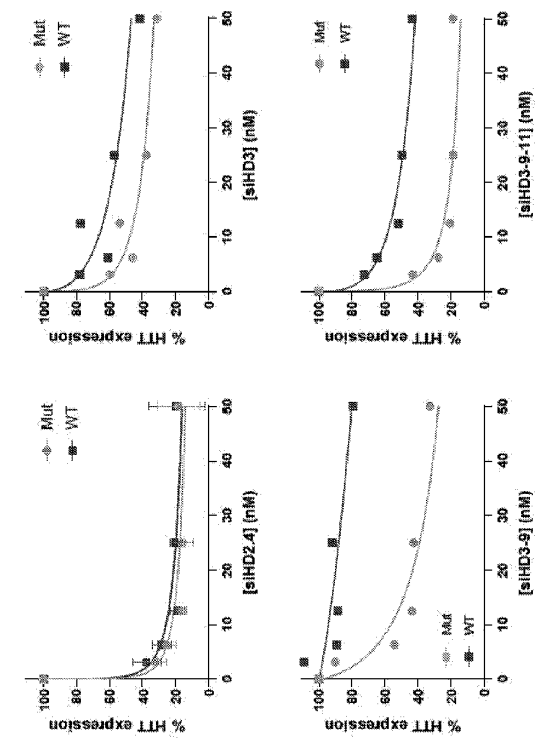


FIG. 3B

【 図 4 】

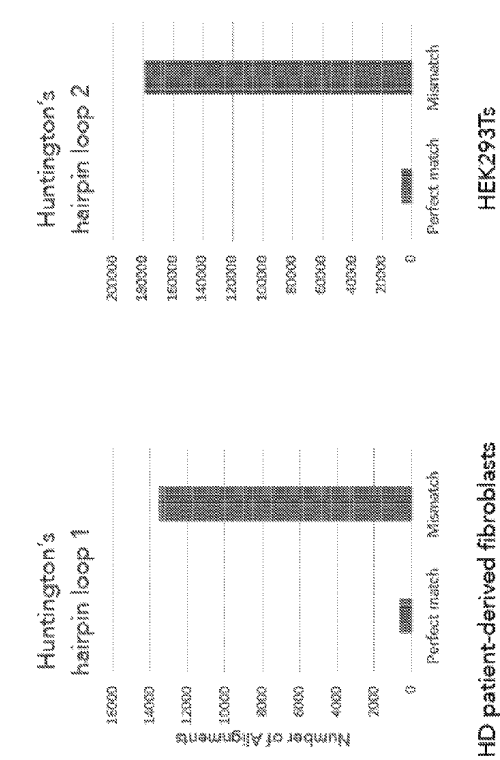


FIG. 4

【 図 5 】

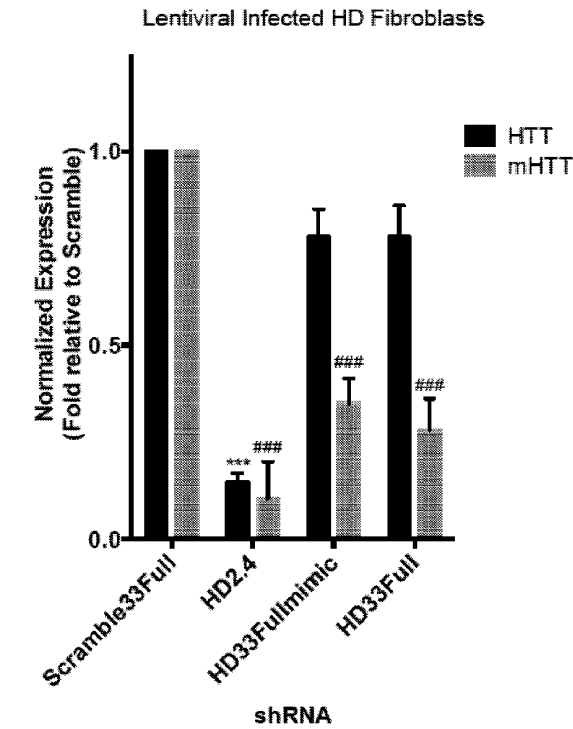


FIG. 5

【 図 6 】

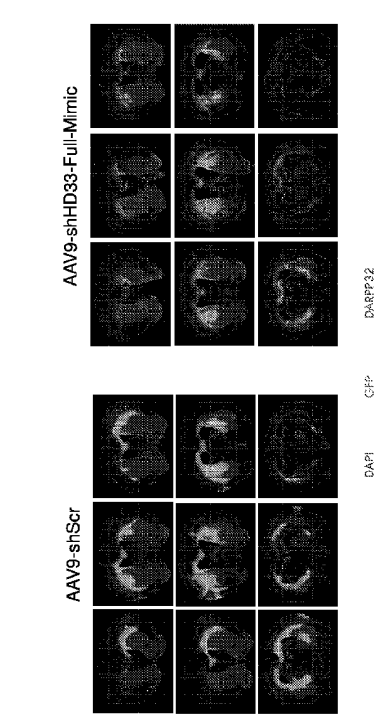


FIG. 6

10

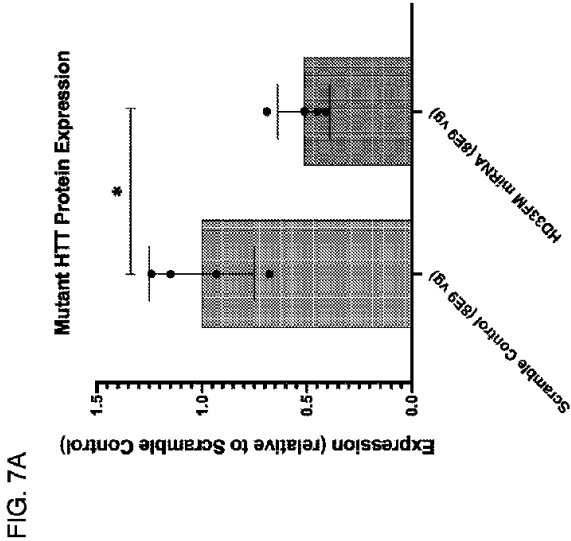
20

30

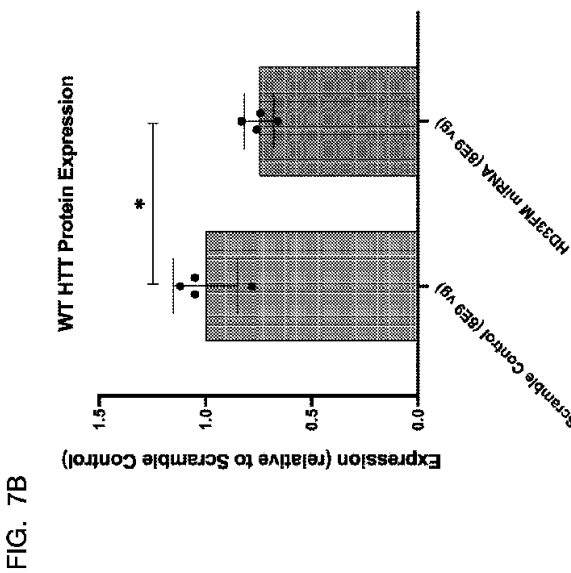
40

50

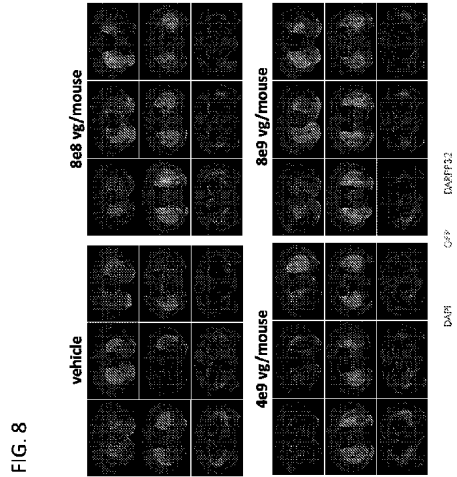
【 図 7 A 】



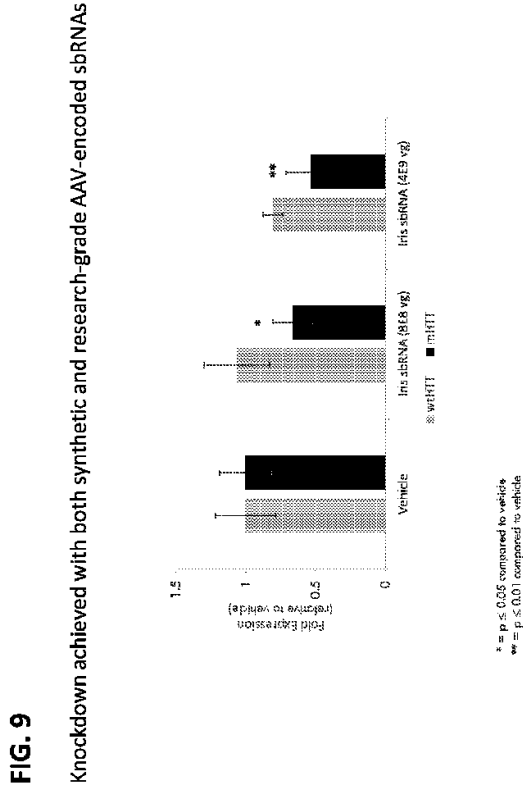
【 図 7 B 】



【 図 8 】



【 図 9 】



10

20

30

40

50

FIG. 10

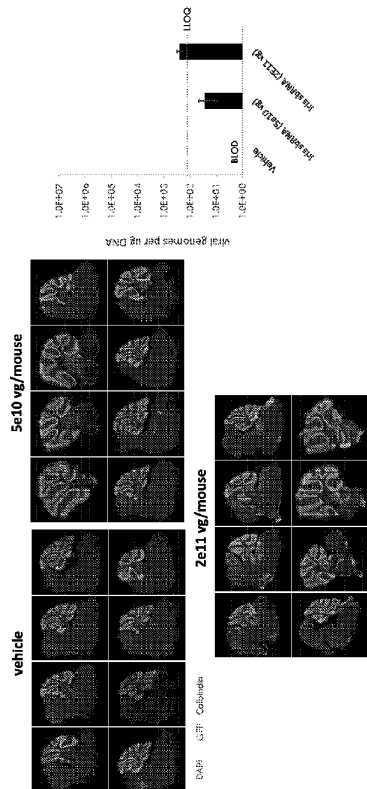


FIG. 12

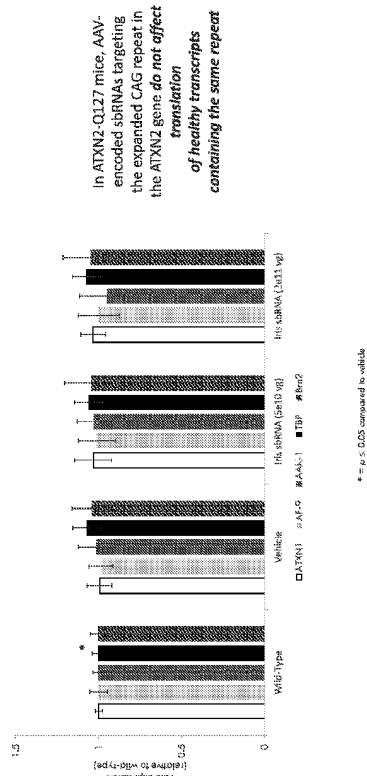


FIG. 11

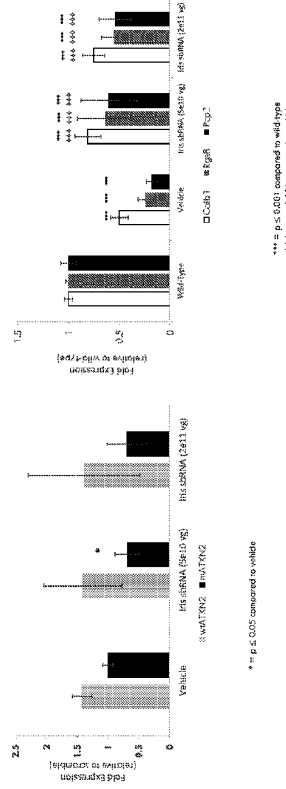
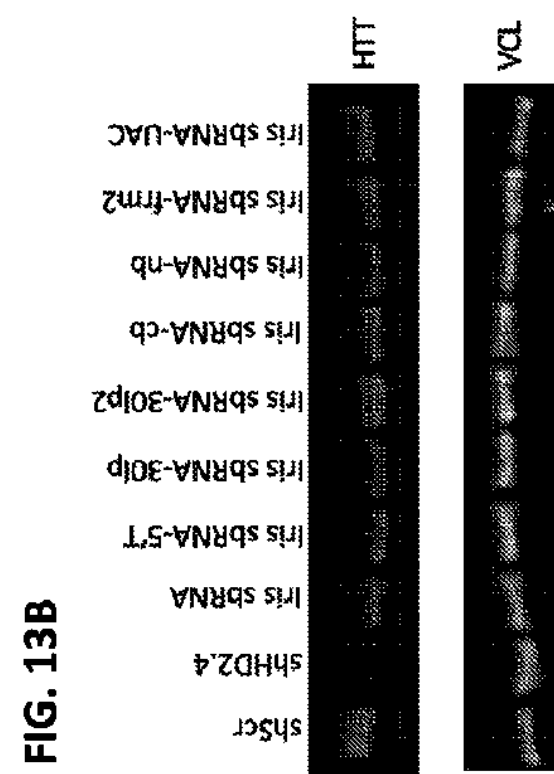


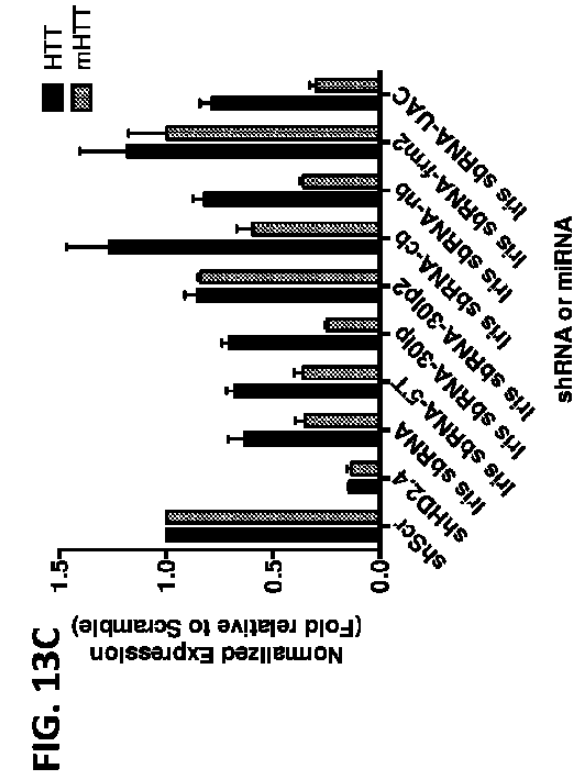
FIG. 13A

Name	Guide Strand	Loop	Passenger strand
Iris sRNA	CTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG	TGTTCTGGCAATACCTGCA	GCAGCAATCTAGCAGCAGCAG
Iris sRNA-S1	TGCTGCTAAAGCTGCTGCTG	TGTTCTGGCAATACCTGCA	GCAGCAGCCAAAGCAGCAGCAG
Iris sRNA-30lp2	CTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG	TGTTCTGGCAATACCTGCA	GCAGCAGCCAAAGCAGCAGCAG
Iris sRNA-cb	CTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG	TGTTCTGGCAATACCTGCA	GCAGCAGCCAAAGCAGCAGCAG
Iris sRNA-nb	CTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG	TGTTCTGGCAATACCTGCA	GCAGCAGCCAAAGCAGCAGCAG
Iris sRNA-fm2	TGCTGCTGCTAAAGCTGCTGCTG	TGTTCTGGCAATACCTGCA	GCAGCAGCCAAAGCAGCAGCAG
Iris sRNA-UAC	CTGCTGCTTACGCTGCTGCTG	TGTTCTGGCAATACCTGCA	GCAGCAGCCAAAGCAGCAGCAG

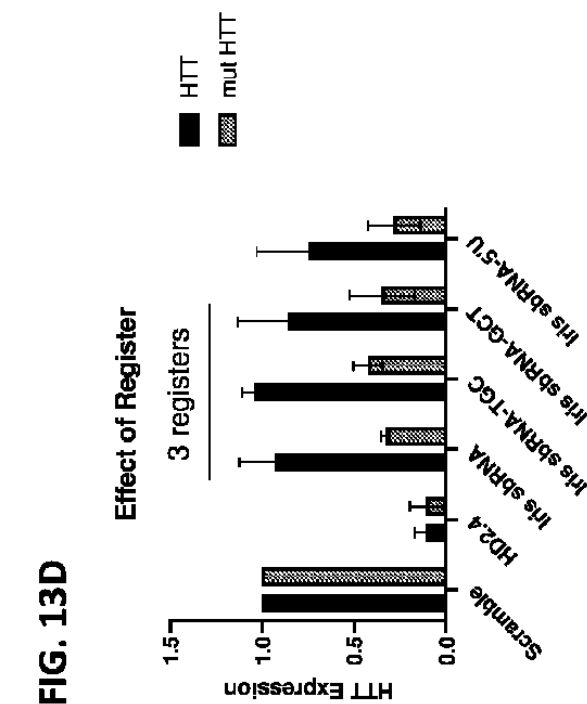
【 図 1 3 B 】



【 図 1 3 C 】



【 図 1 3 D 】



【 図 1 3 E 】

FIG. 13E

sbRNA	ガイド配列	説明
Iris sbRNA	cugCUGCUGCUAAAGCUGCUGCUG	リードガイド配列
Iris sbRNA-TGC	cugUGCUGCUGAAACUGCUGCUGC	第2レジスター
Iris sbRNA-GCT	cugGCUGCUGCAAAUGCUGCUGCU	第3レジスター
Iris sbRNA-5'U	cugUUGCUGCUAAAGCUGCUGCUG	U-G ゆらぎ

FIG. 13D

FIG. 13E

10

20

30

40

50

【図 18】

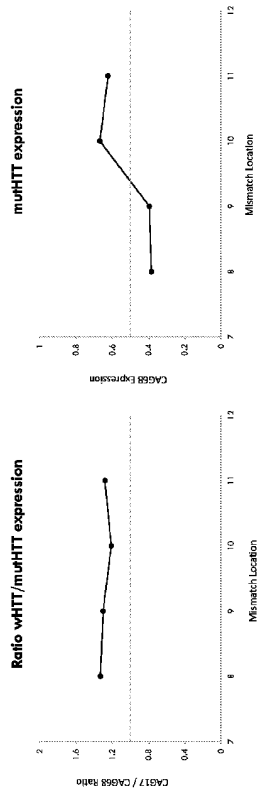


FIG. 18

【図 19】

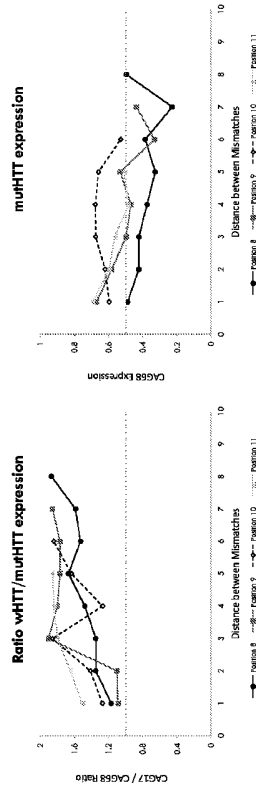


FIG. 19

【図 20】

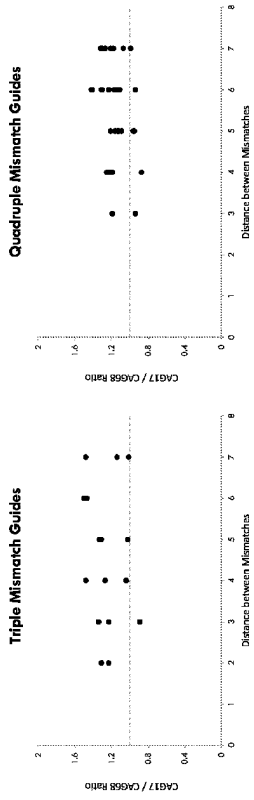


FIG. 20

【図 21】

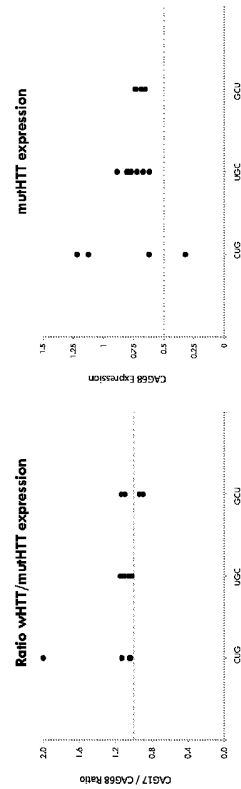


FIG. 21

Representative data from mismatch positions 8, 9, & 11

10

20

30

40

50

【図 22-1】

【図 22-2】

FIG. 22

表6	ID	RNAガイド領域		DNAガイド領域		配列番号	ミスマッチ数； ミスマッチの位置		ガイド領域の 変性相関値		配列番号	パッケンジャーコード 配列 5'-3'		配列番号	配列番号
		配列 5'-3'	配列 3'-5'	CTCTGCTACTCTG	CTCTGCTACTCTG		CTCTGCTACTCTG	CTCTGCTACTCTG				CTCTGCTACTCTG	CTCTGCTACTCTG		
	CUG_1	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CTCTGCTACTCTG CTCTGCTACTCTG CTCTGCTACTCTG	CTCTGCTACTCTG CTCTGCTACTCTG CTCTGCTACTCTG	295	1, 9, 5-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	457	GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA	538		
	CUG_4	CUGUCGUCUGAUG CUGUCGUCUGAUG CUGUCGUCUGAUG	CUGUCGUCUGAUG CUGUCGUCUGAUG CUGUCGUCUGAUG	CTCTGCTGATGTC CTCTGCTGATGTC CTCTGCTGATGTC	CTCTGCTGATGTC CTCTGCTGATGTC CTCTGCTGATGTC	296	1, 10-C-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	458	GAAGCAGAAACA GAAGCAGAAACA GAAGCAGAAACA	539		
	CUG_7	CUGUCGUCGACG CUGUCGUCGACG CUGUCGUCGACG	CUGUCGUCGACG CUGUCGUCGACG CUGUCGUCGACG	CTCTGCTGTCGAC CTCTGCTGTCGAC CTCTGCTGTCGAC	CTCTGCTGTCGAC CTCTGCTGTCGAC CTCTGCTGTCGAC	297	1, 11-U-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	459	GAAGCAGACGCA GAAGCAGACGCA GAAGCAGACGCA	540		
	CUG_10	CUGUCGUCUAUG CUGUCGUCUAUG CUGUCGUCUAUG	CUGUCGUCUAUG CUGUCGUCUAUG CUGUCGUCUAUG	CTCTGCTGATGTC CTCTGCTGATGTC CTCTGCTGATGTC	CTCTGCTGATGTC CTCTGCTGATGTC CTCTGCTGATGTC	298	2, 9-G-A, 10-C-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	460	GAAGCAGAAAA GAAGCAGAAAA GAAGCAGAAAA	555		
	CUG_19	CUGUCGUCUACG CUGUCGUCUACG CUGUCGUCUACG	CUGUCGUCUACG CUGUCGUCUACG CUGUCGUCUACG	CTCTGCTGTACAG CTCTGCTGTACAG CTCTGCTGTACAG	CTCTGCTGTACAG CTCTGCTGTACAG CTCTGCTGTACAG	299	2, 9-G-A, 11-U-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	461	GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA	538		
	CUG_28	CUGUCGUCUACU CUGUCGUCUACU CUGUCGUCUACU	CUGUCGUCUACU CUGUCGUCUACU CUGUCGUCUACU	CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT	CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT	300	2, 9-G-A, 12-G-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	462	GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA	541		
	CUG_37	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CTCTGCTGTACTGA CTCTGCTGTACTGA CTCTGCTGTACTGA	CTCTGCTGTACTGA CTCTGCTGTACTGA CTCTGCTGTACTGA	301	2, 9-G-A, 13-C-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	463	GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA	542		
	CUG_46	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT	CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT	302	2, 9-G-A, 14-U-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	464	GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA	538		
	CUG_55	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT	CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT	303	2, 9-G-A, 15-G-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	465	GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA	543		
	CUG_64	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG CUGUCGUCUACUG	CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT	CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT CTCTGCTGTACTCT	304	2, 9-G-A, 16-C-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	466	GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA GAAGCAGAGAA	544		
	CUG_118	CUGUCGUCUGAUG CUGUCGUCUGAUG CUGUCGUCUGAUG	CUGUCGUCUGAUG CUGUCGUCUGAUG CUGUCGUCUGAUG	CTCTGCTGTGAAGC CTCTGCTGTGAAGC CTCTGCTGTGAAGC	CTCTGCTGTGAAGC CTCTGCTGTGAAGC CTCTGCTGTGAAGC	305	2, 10-C-A, 11-U-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	467	GAAGCAGAAACA GAAGCAGAAACA GAAGCAGAAACA	539		
	CUG_127	CUGUCGUCUAGUA CUGUCGUCUAGUA CUGUCGUCUAGUA	CUGUCGUCUAGUA CUGUCGUCUAGUA CUGUCGUCUAGUA	CTCTGCTGTGATAC CTCTGCTGTGATAC CTCTGCTGTGATAC	CTCTGCTGTGATAC CTCTGCTGTGATAC CTCTGCTGTGATAC	306	2, 10-C-A, 12-G-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	468	GAAGCAGAAACA GAAGCAGAAACA GAAGCAGAAACA	545		
	CUG_136	CUGUCGUCUAGUG CUGUCGUCUAGUG CUGUCGUCUAGUG	CUGUCGUCUAGUG CUGUCGUCUAGUG CUGUCGUCUAGUG	CTCTGCTGTGATGA CTCTGCTGTGATGA CTCTGCTGTGATGA	CTCTGCTGTGATGA CTCTGCTGTGATGA CTCTGCTGTGATGA	307	2, 10-C-A, 13-C-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	469	GAAGCAGAAACA GAAGCAGAAACA GAAGCAGAAACA	546		
	CUG_145	CUGUCGUCUAGUG CUGUCGUCUAGUG CUGUCGUCUAGUG	CUGUCGUCUAGUG CUGUCGUCUAGUG CUGUCGUCUAGUG	CTCTGCTGTGATGC CTCTGCTGTGATGC CTCTGCTGTGATGC	CTCTGCTGTGATGC CTCTGCTGTGATGC CTCTGCTGTGATGC	308	2, 10-C-A, 14-U-A	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	TAGCAGCAG	470	GAAGCAGAGCA GAAGCAGAGCA GAAGCAGAGCA	539		

表 6

【図 22-3】

【図 22-4】

FIG. 22 (continued)

ID	RNA Guide strand Sequence 5'-3'	SEQ ID NO.	DNA Guide strand Sequence 5'-3'	SEQ ID NO.	# mismatches; location of mismatches	Reverse complement of guide strand	SEQ ID NO.	Passage strand Sequence 5'-3'	SEQ ID NO.
CUG ₅ _M_1	CUGGUCGACUG	324	CTCTGCTGTAC	405	2 8:10A, 16:CA	CATCATGACAG	486	GACGACGACGA	552
CUG ₅ _307	CUGGUCGUAAG	325	CTCTGCTGTAAAC	406	3 9:50A, 10:CA, 11 :UA	CTGCTGACAGT	487	GACGACGACAAA	555
CUG ₅ _334	CUGGUCGUAUA	326	CTCTGCTGTACT	407	3 9:50A, 10:CA, 12 :GA	CATGACAGTAT	488	GACGACGACAAA	553
CUG ₅ _361	CUGGUCGUAUG	327	CTCTGCTGTATGA	408	3 9:50A, 10:CA, 13 :CA	CAGCAGCATATT	489	GACGACGACAAA	554
CUG ₅ _388	CUGGUCGUAUG	328	CTCTGCTGTATGC	409	3 9:50A, 10:CA, 14 :UA	TAGCAGCATGAT	490	GACGACGACAAA	555
CUG ₅ _415	CUGGUCGUAAG	329	TACTGCTGT	410	3 9:50A, 10:CA, 15 :GA	CAGCAGTATGAT	491	GACGACGACAAA	556
CUG ₅ _631	AUGGUCGUAAG	330	TGCTGCTGT	411	3:CA	TAGCAGCATGT	492	GACGACGACAAA	542
CUG ₅ _658	CAGGUCGUAAG	331	CTGCTGCTGTACGC	412	4:UA	TAGCAGCATCTG	493	GACGACGACGAAA	538
CUG ₅ _712	CUGGUCGUAAG	332	CTCTGCTGTACGC	413	3 9:50A, 11:UA, 1 :CA	CATGACCATCTG	494	GACGACGACGAAA	544
CUG ₅ _2116	AUGGUCGUAAG	333	CTCTGCTGTGAAGA	414	3 10:CA, 11:UA, 1 :CA	CAGCAGCACTTC	495	GACGACGACGAAA	546
CUG ₅ _2143	CUGGUCGUAAG	334	CTCTGCTGTGAACG	415	3 10:CA, 11:UA, 1 :UA	CAGCAGCTGCTTC	496	GACGACGACGAAA	539
CUG ₅ _2170	CUGGUCGUAAG	335	CTCTGCTGTGAACG	416	3 10:CA, 11:UA, 1 :CA	CAGCAGTACGTT	497	GACGACGACGAAA	547
CUG ₅ _442	CUGGUCGUAUG	336	CTCTGCTGTATGC	417	3 9:50A, 10:CA, 16 :CA	CAGCATCAGCAT	498	GACGACGACGAAA	557
CUG ₅ _604	CUGGUCGUACAC	337	CTCTGCTGTACAC	418	3 9:50A, 11:UA, 1 :CA	CAGCAGCATGTT	499	GACGACGACGAAA	541
CUG ₅ _685	CUGGUCGUACAG	338	CTCTGCTGTACGC	419	3 9:50A, 11:UA, 1 :UA	TAGCAGCATG	500	GACGACGACGAAA	543

FIG. 22 (continued)

ID	RNA Guide strand Sequence 5'-3'	SEQ ID: NO	DNA Guide strand sequence 5'-3'	SEQ ID: NO	# mismatches; location of mismatches	Reverse complement of Guide strand	SEQ ID: NO	Passenger strand sequence 5'-3'	SEQ ID NO
CUG_2089	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	339	CTGCTGCTGAAC TGTCTGCTG TGCTGCTGAAC TGATGCTG	420 421 422 423	3_10C>A_11U>A_1 2_6S>A 3_10C>A_11U>A_1 6C>A	CACGACGATTT CAGCAGCAG CAGCATCTGCTC ACGACGAC	501 502 503 504	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCACACGACCA GCAGCAGCA	545 548 554 542
CUG_2197	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	340	CTGCTGCTGAAG TGTCTGCTG TGCTGCTGAAG TGATGCTG	424 425 426 427	4_9S>A_10C>A_11 3_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_15S>A	CACGATCTGCT ACGACGAC CAGCATCTGCTC ACGACGATCTTC	505 506 507 508	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	547 553 555 556
CUG_4870	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	341	CTGCTGCTGAAG TGTCTGCTG TGCTGCTGAAG TGATGCTG	428 429 430 431	4_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_15S>A 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11	CACGATCTGCT ACGACGAC CAGCATCTGCTC ACGACGATCTTC	509 510 511 512	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	557 560 561 562
CUG_4973	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	342	CTGCTGCTGAAG TGTCTGCTG TGCTGCTGAAG TGATGCTG	432 433 434 435	4_9S>A_10C>A_11 3_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_15S>A	CACGATCTGCT ACGACGAC CAGCATCTGCTC ACGACGATCTTC	513 514 515 516	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	563 564 565 566
CUG_10135	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	343	TGATGCTG CTGCTGCTAGC AAGATGCTG CTGCTGCTGAAG	424 425 426 427	4_9S>A_16S>A 4_9S>A_11U>A_1 4_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_15S>A	ACGACGAC CAGCATCTGCT ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC	505 506 507 508	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	558 544 559 547
CUG_10702	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	344	AAGATGCTG CTGCTGCTGAAG TGATGCTG CTGCTGCTG	428 429 430 431	4_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_15S>A 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11	ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC	509 510 511 512	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	553 555 556 557
CUG_23419	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	345	TGATGCTG CTGCTGCTAGC AAGATGCTG CTGCTGCTGAAG	428 429 430 431	4_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_15S>A 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11	ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC	507 508 509 510	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	559 547 553 555
CUG_23986	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	346	ACATGCTG CTGCTGCTAGC AAGATGCTG CTGCTGCTG	427 428 429 430	4_10C>A_11U>A_1 4_10C>A_15S>A 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11	ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC	508 509 510 511	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	547 553 555 556
CUG_4789	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	347	CTGCTGCTGAAG TGTCTGCTG TGCTGCTGAAG TGATGCTG	428 429 430 431	4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11	CACGACGATTT CAGCAGCAG CAGCATCTGCTC ACGACGAC	509 510 511 512	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	553 555 556 557
CUG_4951	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	348	ACATGCTG CTGCTGCTAGC AAGATGCTG CTGCTGCTGAAG	429 430 431 432	4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11	ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC ACGACGATCTTC	510 511 512 513	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	555 556 557 558
CUG_5032	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	349	TACTGCTG CTGCTGCTAGC AAGATGCTG CTGCTGCTGAAG	430 431 432 433	4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11 4_9S>A_10C>A_11	CACGATCTGCT CAGCAGCAG CAGCATCTGCTC ACGACGAC	511 512 513 514	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	556 557 560 553
CUG_5113	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	350	TGATGCTG CTGCTGCTAATC AAGATGCTG CTGCTGCTGAAG	431 432 433 434	4_9S>A_16C>A 4_9S>A_10C>A_12 4_9S>A_13C>A 4_9S>A_14U>A	CAGCAGATCT CAGCAGCAG CAGCATCTGCTC ACGACGAC	512 513 514 515	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	557 560 553 561
CUG_5599	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	351	CTGCTGCTAATC TGTCTGCTG TGCTGCTGAAG TGATGCTG	432 433 434 435	4_9S>A_10C>A_12 4_9S>A_13C>A 4_9S>A_14U>A 4_9S>A_15S>A	CAGCAGATCT CAGCAGCAG CAGCATCTGCTC ACGACGAC	513 514 515 516	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	560 553 561 562
CUG_5680	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	352	CTGCTGCTAATC AAGATGCTG CTGCTGCTGAAG TGATGCTG	433 434 435 436	4_9S>A_10C>A_12 4_9S>A_14U>A 4_9S>A_15S>A 4_9S>A_16S>A	CAGCAGATCT CAGCAGCAG CAGCATCTGCTC ACGACGAC	514 515 516 517	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	553 561 562 563
CUG_5761	CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG CUGCUGCUGAAG CUGCUGCUGCUG	353	CTGCTGCTAATC AAGATGCTG CTGCTGCTGAAG TGATGCTG	434 435 436 437	4_9S>A_10C>A_12 4_9S>A_14U>A 4_9S>A_15S>A 4_9S>A_16S>A	CAGCAGATCT CAGCAGCAG CAGCATCTGCTC ACGACGAC	515 516 517 518	GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA GCAGCAGAACCA	561 562 563 564

30

【図 22-5】

【図 22-6】

FIG. 22 (continued)

[illegible]

FIG. 22 (continued)

ID	RNA Guide strand Sequence 5'-3'	SEQ ID	DNA Guide strand sequence 5'-3'	SEQ ID	# mismatches; location of mismatches	Reverse Guide strand	SEQ ID	Passenger strand sequence 5'-3'	SEQ ID
CUG_27690	CUCUGUGGAAA CAGCUGUGC	369	CTGCTGCTGAAC AGCTGCTG	450	4-10C/A, 11U/A, 1 2-6C/A, 14U/A	CAGCAGCTGTTTC GACGAGCAGCA	531	GCAGCAGAACCA GCAGCAGCA	545
CUG_22771	CUCUGUGGAAA CUAUCUGUC	370	CTGCTGCTGAAC TACTGCTG	451	4-10C/A, 11U/A, 1 2-6C/A, 15G/A	CAGCAGTAGTTC AGCAGCAGCA	532	GCAGCAGAACCA GCAGCAGCA	572
CUG_22852	CUCUGUGGAAA CUAUGUGUC	371	CTGCTGCTGAAC TGATGCTG	452	4-10C/A, 11U/A, 1 2-6C/A, 16C/A	CAGCAGTAGTTC AGCAGCAGCA	533	GCAGCAGAACCA GCAGCAGCA	573
CUG_23338	CUCUGUGGAAA AAGCUGUGC	372	CTGCTGCTGAAC AGCTGCTG	453	4-10C/A, 11U/A, 1 3-6C/A, 14U/A	CAGCAGTAGTTC AGCAGCAGCA	534	GCAGCAGAACCA GCAGCAGCA	546
CUG_23500	AUGAUGUGC	373	CTGCTGCTGAAC TGATGCTG	454	4-10C/A, 11U/A, 1 3-6C/A, 16C/A	CAGCAGTAGTTC AGCAGCAGCA	535	GCAGCAGAACCA GCAGCAGCA	574
CUG_24067	CUCUGUGGAAA CAGAUUGUC	374	CTGCTGCTGAAC AGATGCTG	455	4-10C/A, 11U/A, 1 4-10C/A, 16C/A	CAGCAGTAGTTC AGCAGCAGCA	536	GCAGCAGAACCA GCAGCAGCA	548
CUG_24553	CUCUGUGGAAA CUAUCUGUC	375	CTGCTGCTGAAC TATGCTGCT	456	4-10C/A, 11U/A, 1 4-10C/A, 16C/A	CAGCAGTAGTTC AGCAGCAGCA	537	GCAGCAGAACCA GCAGCAGCA	575

10

20

【図 23-1】

【図 23-2】

FIG. 23

表 7

ID	組み合わせ方と配列 (117 nt for CAG)	配列番号
CUG 1	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctactgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	576
CUG 4	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgatgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagcaaacagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	577
CUG 7	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgacgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagcagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	578
CUG 10	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgaatgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagcaaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	579
CUG 19	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctacagctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	580
CUG 28	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctactgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	581
CUG 37	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	582
CUG 46	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	583
CUG 55	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctactgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	584
CUG 64	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	585
CUG 118	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	586
CUG 127	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	587
CUG 136	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	588
CUG 145	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	589
CUG 154	tgacactctctgggaaggaatctgctgctgctgctgctgctggaatctctgcagcagcagcagaaagcagcagcaggaagggcctgcctgctgctgcacaaatttttg	590

FIG. 23 (continued)

[illegible]

30

40

50

【配列表】
2024543782000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/77572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 15/113, A61K 31/7088 (2022.01)

ADD. A61P 25/00 (2022.01)

CPC - INV. C12N 15/113, A61K 31/7088, C12N 2310/11

ADD. C12N 2310/14, A61P 25/00

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)

See Search History document

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

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0376586 A1 (INSTYTUT CHEMII BIOORGANICNZEJ PAN) 29 December 2016 (29.12.2016) para [0022], [0023], SEQ ID NO: 14	1-3
A	US 2018/0251762 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 6 September 2018 (06.09.2018) para [0077], [0079], claims 1, 2, 5.	1-3
A	US 2018/0282724 A1 (PROQR THERAPEUTICS II BV) 4 October 2018 (04.10.2018) claims 1, 2	1-3

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

13 December 2022

Date of mailing of the international search report

FEB 15 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Karl Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/77572

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/77572

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: Claims 4-11, 13-17, 19-22, 24-26, 28-30, 32-36, 39-42, 46-51, 54-58, 61-64, 67-72, 76-80, 82-137
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—Go to Extra Sheet for continuation—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-3, limited to SEQ ID NO: 743, with mismatch substitutions "A" at positions 8 and 9, resulting in SEQ ID NO: 317

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/77572

Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking

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

Group I+: Claims 1-3, 12, 18, 23, 27, 31, 37, 38, 43-45, 52, 53, 59, 60, 65, 66, 73-75, 81, drawn to a double stranded RNA (dsRNA) comprising a first strand that hybridizes to a target CAG repeat region of a CAG repeat containing RNA and has at least two mismatches.

The dsRNA will be searched to the extent that the first strand first mismatch is at position 8 of SEQ ID NO: 743, (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG), [i.e., "U"] (claim 1), and the second mismatch is 1 base 3' of the first mismatch (claim 3), [i.e., "G"] where the first mismatch of the "U" is with an "A" (claim 2), and the second mismatch of "G" is with an "A" (claim 2), as depicted in sheet 26 fig 22 SEQ ID NO: 317 (CUGCUGCAACUGCUGCUGCUG). This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-3 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass the first strand first mismatch is at position 8 of SEQ ID NO: 743, "U" substituted with "A", the second mismatch is 1 base 3' of the first mismatch, "G", substituted with "A", variant sequence SEQ ID NO: 317.

Additional CAG repeat sequences and first strand mismatches will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional CAG repeat sequences and first strand mismatches. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: CAG repeat sequences SEQ ID NO: 743 (CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG), with first mismatch at position 10, "C", substituted by "A" and the second mismatch is 2 bases 3' to the first mismatch "G" substituted by "A", SEQ ID NO: 306 (CUGCUGCUGAUACUGCUGCUG) (claims 1, 2, 45, 52).

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

Special Technical Features:

Among the inventions listed as Groups I+ are the specific target CAG repeat regions and the position of the first and at least second mismatch recited therein. Each invention requires a specific target CAG repeat region and specific position of the first and at least second mismatch not required by any other inventions.

No technical features are shared between the polynucleotide sequences of Group I+ and, accordingly, this group lacks unity a priori.

Common Technical Feature:

Additionally, even if Groups I+ inventions were considered to share the technical features of:

Claim 1: A double-stranded RNA duplex comprising

- a) a first strand that hybridizes to a target CAG repeat region of a CAG repeat containing RNA; and
- b) a second strand that hybridizes to the first strand, wherein the first strand comprises:
 - i) a first mismatch to the target CAG repeat region; and
 - ii) at least a second mismatch to the target CAG repeat region

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is disclosed by US 2018/0251762 A1 to Northwestern University (hereinafter "Northwestern").

Northwestern discloses [claim 1] a double-stranded RNA duplex comprising

- a) a first strand that hybridizes to a target CAG repeat region of a CAG repeat containing RNA; and
- b) a second strand that hybridizes to the first strand (claims 1, 2, 5; "1. A double-stranded polynucleotide comprising a passenger strand and a guide strand, the double-stranded polynucleotide comprising: (i) a trinucleotide repeat sequence (X1X2X3)_n, wherein X1, X2, and X3 independently are selected from any ribonucleotide A, C, G, and U, and n is an integer from 3-10; and (ii) one or more modified nucleotides at the 5'-terminus of the passenger strand that prevents loading of the passenger strand into the RNA-Induced silencing complex (RISC). 2. The double-stranded polynucleotide of claim 1, wherein the RNA is an siRNA or an shRNA"; "5. The double-stranded polynucleotide of claim 1, wherein the trinucleotide repeat sequence is selected from (CUG)_n"; para [0079]; As used herein, the term "double-stranded RNA" ("dsRNA") refers to a complex of ribonucleic acid molecules having a duplex structure comprising two anti-parallel and substantially complementary nucleic acid strands", wherein the first strand comprises:

- i) a first mismatch to the target CAG repeat region (para [0077]; "As used herein, the term "complementarity" may refer to a sequence region on an anti-sense strand that is substantially complementary to a target sequence but not fully complementary to a target sequence. Where the anti-sense strand is not fully complementary to the target sequence, mismatches may be optionally present in the terminal regions of the anti-sense strand or elsewhere in the anti-sense strand"; and
- ii) at least a second mismatch to the target CAG repeat region (para [0077]).

—continued on next extra sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/77572

-----continued from previous extra sheet-----

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Group I+ Inventions lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued): Claims 4-11, 13-17, 19-22, 24-26, 28-30, 32-36, 38-42, 46-51, 54-58, 61-64, 67-72, 76-80, 82-137 are dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

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 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. PLURONIC

2. TRITON

3. NONIDET

4. TWEEN

弁理士 原 裕子

(74)代理人 100195257

弁理士 大淵 一志

(72)発明者 ジェンシク、 フィリップ、 ジェイ。

アメリカ合衆国 6 2 9 4 8 イリノイ州 ヘーリン ネイブルズ ドライブ 1 0 0 9

(72)発明者 ギャグノン、 キース、 ティー。

アメリカ合衆国 6 2 9 0 3 イリノイ州 カーボンデール マグノリア レーン 4

(72)発明者 コレイ、 デビッド

アメリカ合衆国 7 5 2 0 5 テキサス州 ダラス サウス ベルサイユ アベニュー 4 5 1 6

(72)発明者 デ クラーク、 エレオノラ

アメリカ合衆国 9 4 3 0 4 カリフォルニア州 パロアルト ヒルビュー アベニュー 3 3 4 0

(72)発明者 ブルウェット、 メーガン

アメリカ合衆国 9 4 3 0 4 カリフォルニア州 パロアルト ヒルビュー アベニュー 3 3 4 0

(72)発明者 コッターマン、 メリッサ エイ。

アメリカ合衆国 9 4 7 0 9 カリフォルニア州 バークレイ スブルース ストリート 1 3 1 4

F ターム (参考) 4B065 AA95X AB01 AC20 BA02 CA23 CA44

4C084 AA13 MA38 MA41 MA66 NA14 ZA021 ZA022

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA38 MA41 MA66 NA14
ZA02

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA14 ZA02