

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2023-534037  
(P2023-534037A)

(43)公表日 令和5年8月7日(2023.8.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	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 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02		4 C 0 8 7
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14		4 C 2 0 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全91頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-502675(P2023-502675)		(71)出願人	502409813	
(86)(22)出願日	令和3年7月13日(2021.7.13)			ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバ	
(85)翻訳文提出日	令和5年3月2日(2023.3.2)			ーシテイ・オブ・ペンシルベニア	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/041406			アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1	
(87)国際公開番号	WO2022/015715			0 4 フィラデルフィア・ナインスフロア	
(87)国際公開日	令和4年1月20日(2022.1.20)			ー・シビックセンターブルバード 3 6	
(31)優先権主張番号	63/173,045			0 0	
(32)優先日	令和3年4月9日(2021.4.9)		(74)代理人	110000741	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士法人小田島特許事務所	
(31)優先権主張番号	63/051,336		(72)発明者	ウイルソン, ジェームス・エム	
(32)優先日	令和2年7月13日(2020.7.13)			アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			0 3 フィラデルフィア・デランシースト	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(72)発明者	ヒンデラー, クリスチャン	
		最終頁に続く		アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 2 1	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 シャルコー・マリー・トゥース病の治療に有用な組成物

(57)【要約】

本明細書で提供されるのは、( a ) ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン 2 コード配列をコードする組換え核酸配列を含む、C M T 2 を有する患者を治療するのに有用な r A A V 及び他のベクター及び組成物である。更に提供されるのは、( b ) ヒト C M T 2 A 対象における内因性ヒトマイトフュージン 2 配列と特異的な少なくとも 1 つの m i R N A をコードする核酸配列であって、m i R N A コード配列が、対象中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される、核酸配列を含む、C M T 2 を有する患者を治療するのに有用な r A A V 及び他のベクター及び組成物である。更に提供されるのは、操作 h M f n 2 コード配列及び少なくとも 1 つの m i R N A コード配列の両方を含む組成物であって、操作ヒトマイトフュージン 2 コード配列が、コードされた m i R N A の標的部位中の C M T 2 A 患者の内因性ヒトマイトフュージン 2 とは異なる配列を有する、組成物である。

【選択図】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) であって、AAVカプシドと、その中にパッケージングされたベクターゲノムと、を含み、前記ベクターゲノムが、

(a) ヒトマイトフュージン 2 (hMfn2) をコードする操作核酸配列と、

(b) (a) と (c) との間に位置するスペーサー配列と、

(c) CMT2 患者における内因性ヒトマイトフュージン 2 核酸配列の標的部位と特異的である、少なくとも 1 つの miRNA コード配列であって、

(a) の前記操作核酸配列が、(c) の前記少なくとも 1 つの miRNA の前記標的部位を欠き、それによって前記少なくとも 1 つの miRNA が、操作 hMfn2 コード配列を標的とすることから妨げる、少なくとも 1 つの miRNA コード配列と、

(d) (a) 及び (c) と作動可能に連結され、細胞中でのその発現を指示する制御性配列と、を含む、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV)。

## 【請求項 2】

前記 AAVカプシドが、AAVrh91、AAV9、AAV9.PHP.eB、AAVhu68、又は AAV1 カプシドから選択される、請求項 1 に記載の rAAV。

## 【請求項 3】

前記操作 hMfn2 コード配列が、配列番号 11 の核酸配列又はそれと少なくとも 90 % 同一の配列を有する、請求項 1 又は 2 に記載の rAAV。

## 【請求項 4】

前記操作 hMfn2 コード配列が、配列番号 11 の核酸配列又はそれと少なくとも約 80 % 同一の配列を有し、前記操作 hMfn2 コード配列の nt216 ~ 236 及び / 又は nt1371 ~ 1391 が保存される、請求項 1 ~ 3 に記載の rAAV。

## 【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの miRNA が、配列番号 89 (miR538、59nt) 若しくは配列番号 89 と少なくとも 99 % 同一の配列を含む 1 つ以上の miRNA 標的配列の配列、又は AGAACAGGTTCTGGACGTC AA、配列番号 27 の 1 つ以上のアンチセンス配列を含む miRNA を含み、前記少なくとも 1 つの miRNA が、(a) の前記操作 hMfn2 コード配列又はそのコードされたメッセンジャー RNA (mRNA) と結合しない、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の rAAV。

## 【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの miRNA コード配列が、配列番号 15 (miR1693、64nt) を含む 1 つ以上の miRNA 標的配列の配列、AAACCTTGAGGACTACTGGAG、配列番号 32 の 1 つ以上のアンチセンス配列を含む miRNA、又は配列番号 16 (miR1518、59nt) 若しくは配列番号 16 と少なくとも 99 % 同一の配列を含む miRNA 標的配列を含み、前記少なくとも 1 つの miRNA が、(a) の前記操作 hMfn2 コード配列又はそのコードされた mRNA と結合しない、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の rAAV。

## 【請求項 7】

前記スペーサーが、75ヌクレオチド ~ 約 250ヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の rAAV。

## 【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの miRNA コード配列が、前記操作 hMfn2 コード配列に対して 3' である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の rAAV。

## 【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの miRNA コード配列が、イントロン配列内に位置する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の rAAV。

## 【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの miRNA コード配列が、1 つを超える miRNA コード配列を更に含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の rAAV。

10

20

30

40

50

## 【請求項 11】

前記ベクターゲノムが、構成的プロモーター、任意に C B 7 プロモーター又は C A G プロモーターを更に含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の r A A V。

## 【請求項 12】

前記ベクターゲノムが、ヒトシナプシン ( h S y n ) プロモーターである組織特異的プロモーターを更に含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の r A A V。

## 【請求項 13】

ベクターであって、

( a ) ヒト標的細胞中で操作核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結されるヒトマイトフュージン 2 ( h M f n 2 ) をコードする操作核酸配列、及び / 又は

( b ) 操作 h M f n 2 コード配列中に存在しない、内因性ヒトマイトフュージン 2 コード配列の m R N A 上の部位を特異的に標的とすることによって、内因性ヒトマイトフュージン 2 の発現を阻害する、少なくとも 1 つのヘアピン形成 m i R N A をコードする核酸配列であって、前記少なくとも 1 つのヘアピン m i R N A コード配列が、前記ヒト標的細胞中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結され、それによって前記少なくとも 1 つのヘアピン m i R N A が、前記操作 h M f n 2 コード配列から発現を低減することから妨げる、核酸配列と、を含み、

( a ) の前記操作 h M f n 2 コード配列が、( b ) によってコードされる前記少なくとも 1 つのヘアピン m i R N A の標的部位を欠く、ベクター。

## 【請求項 14】

前記ベクターが、前記操作 h M f n 2 コード配列を含む複製欠損ウイルスベクターであり、前記少なくとも 1 つのヘアピン m i R N A コード配列が、1 つ以上の m i R N A コード配列又は 1 つ以上の人工 m i R N A ( A m i R N A ) コード配列、及び前記制御性配列である、請求項 13 に記載のベクター。

## 【請求項 15】

前記ウイルスベクターが、前記操作 h M f n 2 コード配列、少なくとも 1 つのヘアピン m i R N A コード配列、及び前記制御性配列を含む、A A V カプシド中にパッケージングされたベクターゲノムを有する A A V カプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) 粒子である、請求項 14 に記載のベクター。

## 【請求項 16】

前記 A A V カプシドが、A A V r h 9 1 カプシド、A A V 9、A A V 9 . P H B . e B、A A V h u 6 8、又は A A V 1 から選択される、請求項 15 に記載のベクター。

## 【請求項 17】

前記操作 h M f n 2 コード配列が、配列番号 11 の核酸配列又は配列番号 11 と少なくとも 90 % 同一の配列を有する、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載のベクター。

## 【請求項 18】

前記操作 h M f n 2 コード配列が、配列番号 11 の核酸配列又は配列番号 11 と少なくとも 80 % 同一の配列を有し、前記操作 h M f n 2 コード配列の n t 216 ~ 236 及び / 又は n t 1371 ~ 1391 が保存される、請求項 13 ~ 17 に記載のベクター。

## 【請求項 19】

前記少なくとも 1 つのヘアピン m i R N A が、m i R 538 であり、コード配列が、配列番号 89 の配列の核酸配列又は配列番号 89 と少なくとも 99 % 同一の配列を含み、前記少なくとも 1 つのヘアピン m i R N A が、( a ) の前記操作 h M f n 2 コード配列又はそのコードされた m R N A と結合しない、請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載のベクター。

## 【請求項 20】

前記少なくとも 1 つのヘアピン m i R N A コード配列が、

( a ) 配列番号 15 ( m i R 1693、64 n t )、

( b ) 配列番号 15 の少なくとも 60 個の連続したヌクレオチド、

( c ) 配列番号 15 ( 又は配列番号 68 ) の約ヌクレオチド 6 ~ 約ヌクレオチド 26 と

10

20

30

40

50

100%の同一性を有する配列を含む、配列番号15と少なくとも99%の同一性、

(d)(i) TTGACGTCCAGAACCTGTCT、配列番号27、

(ii) AGAAGTGGGCACCTTAGAGTTG、配列番号28、

(iii) TTCAGAAAGTGGGCACCTTAGAG、配列番号29、

(iv) TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC、配列番号30、

(v) CAAACTTTGGTCTTCACTGCAG、配列番号31、

(vi) AAACCTTGAGGACTACTGGAG、配列番号32、

(vii) TAACCATGGAAACCATGAACCT、配列番号33、

(viii) ACAACAAGAAATGCCCATGGAG、配列番号34、

(ix) AAAGGTCCAGACAGTTCTCTG、配列番号35、

(x) TGTTCATGGCGGCAATTTCTCT、配列番号36、

(xi) TGAAGTTTGGCTATTGATTGAC、配列番号37、

(xii) TTCCTCACACAGTCAACACCTT、配列番号38、

(xiii) TTTCTCTCGCAGTAAACCTGCT、配列番号39、

(xiv) AGAAATGGAACTCAATGTCTT、配列番号40、

(xv) TGAACAGGACATCACCTGTGA、配列番号41、

(xvi) AATACAAGCAGGTATGTGAAC、配列番号42、

(xvii) TAAACCTGCTGCTCCCCGAGCC、配列番号43、

(xviii) TAGAGGAGGCCATAGAGCCCCA、配列番号44、

(xix) TCTACCCGCGAGGAAGCAATTG、配列番号45、若しくは

(xx) CTCCTTAGCAGACACAAGAA、配列番号46のうちの1つ

以上のシード配列、又は(i)~(xx)のいずれかの組み合わせを含むヘアピンmiRNAコード配列のうちの1つ以上の配列を含み、

前記ヘアピンmiRNAが、前記操作hMfn2コード配列又はそのコード化されたmRNAと結合しない、請求項13~18のいずれか一項に記載のベクター。

#### 【請求項21】

前記操作hMfn2コード配列及び前記少なくとも1つのmiRNAコード配列を単一の核酸分子とともに含み、前記操作hMfn2コード配列と前記少なくとも1つのmiRNAコード配列との間に少なくとも75ヌクレオチドのスペーサーを更に含む、請求項13~20のいずれか一項に記載のベクター。

#### 【請求項22】

前記miRNAコード配列が、前記操作hMfn2コード配列に対して3'である、請求項13~21のいずれか一項に記載のベクター。

#### 【請求項23】

前記miRNAコード配列が、イントロン配列内に位置する、請求項13~21のいずれか一項に記載のベクター。

#### 【請求項24】

1つを超えるmiRNAコード配列を更に含む、請求項13~23のいずれか一項に記載のベクター。

#### 【請求項25】

前記制御性配列が、構成的プロモーター、任意にCB7プロモーター又はCAGプロモーターを含む、請求項13~24のいずれか一項に記載のベクター。

#### 【請求項26】

前記制御性配列が、ニューロン特異的プロモーター、任意にヒトシナプシンプロモーターを含む、請求項13~24のいずれか一項に記載のベクター。

#### 【請求項27】

前記ベクターが、非ウイルスベクターである、請求項13に記載のベクター。

#### 【請求項28】

少なくとも1つの前記非ウイルスベクターが、リボソームである、請求項27に記載のベクター。

10

20

30

40

50

## 【請求項 29】

前記ベクターが、組換えパルボウイルス、組換えレンチウイルス、又は組換え単純ヘルペスウイルスから選択される、複製不全組換えウイルスベクターである、請求項 13、14、又は 17～26 のいずれか一項に記載のベクター。

## 【請求項 30】

ベクターであって、配列番号 11 の核酸配列又は配列番号 11 と少なくとも 90% 同一の配列を有する操作ヒトマイトフュージン 2 (hMfn2) コード配列を含み、ヒト標的細胞中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される、ベクター。

## 【請求項 31】

組換えアデノ随伴ウイルス、組換えレンチウイルス、又は組換え単純ヘルペスウイルスから選択される、複製欠損ウイルスベクターである、請求項 30 に記載のベクター。 10

## 【請求項 32】

前記ウイルスベクターが、前記操作 hMfn2 コード配列、及び前記制御性配列を含む、AAV カプシド中にパッケージングされたベクターゲノムを有する AAV カプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子である、請求項 31 に記載のベクター。

## 【請求項 33】

前記 AAV カプシドが、AAVrh91、AAV9、AAV9.PHP.eB、AAVhu68、又は AAV1 カプシドから選択される、請求項 32 に記載のベクター。

## 【請求項 34】

前記操作 hMfn2 コード配列が、配列番号 11 の核酸配列を有し、CB7 プロモーターを更に含む、請求項 13～17 に記載のベクター。 20

## 【請求項 35】

前記操作 hMfn2 コード配列が、配列番号 11 の核酸配列を有し、ヒトシナプシン (hSyn) プロモーターを更に含む、請求項 13～17 に記載のベクター。

## 【請求項 36】

前記操作 hMfn2 コード配列が、配列番号 11 の核酸配列を有し、CAG プロモーターを更に含む、請求項 13～17 に記載のベクター。

## 【請求項 37】

組成物であって、ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン 2 (hMfn2) コード配列を含む組換え核酸配列と、対象中で少なくとも 1 つの miRNA の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結されるシャルコー・マリー・トゥース 2A (CMT2A) 患者における内因性ヒトマイトフュージン 2 核酸配列中の標的部位と特異的な少なくとも 1 つの miRNA と、を含み、前記操作 hMfn2 コード配列が、前記少なくとも 1 つの miRNA の前記標的部位を欠き、それによって前記 miRNA が、前記操作 Mfn2 コード配列を標的とすることから妨げる、組成物。 30

## 【請求項 38】

薬学的組成物であって、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の rAAV、請求項 13～36 のいずれか一項に記載のベクター、又は請求項 37 に記載の組成物と、薬学的に許容される水性懸濁液体、賦形剤、及び / 又は希釈剤と、を含む、薬学的組成物。 40

## 【請求項 39】

シャルコー・マリー・トゥース 2A (CMT2A) 神経障害を有する患者を治療するための方法であって、有効量の請求項 1～12 のいずれか一項に記載の組換え AAV、請求項 13～36 のいずれか一項に記載のベクター、又は請求項 37 に記載の組成物を、それを必要とする患者に送達することを含む、方法。

## 【請求項 40】

シャルコー・マリー・トゥース 2A (CMT2A) 神経障害を有する患者における神経障害を低減するための方法であって、有効量の請求項 1～12 のいずれか一項に記載の組換え AAV、請求項 13～36 のいずれか一項に記載のベクター、又は請求項 37 に記載の組成物を、それを必要とする患者に送達することを含む、方法。 50

## 【請求項 4 1】

シャルコー・マリー・トゥース 2 A ( C M T 2 A ) 疾患又は神経障害を有する患者の治療に好適な、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組換え A A V、請求項 1 3 ~ 3 6 のいずれか一項に記載のベクター、又は請求項 3 7 に記載の組成物。

## 【請求項 4 2】

シャルコー・マリー・トゥース 2 A ( C M T 2 A ) 疾患又は神経障害を有する患者の治療のための薬物を調製するのに使用するための、請求項 1 ~ 1 2 に記載の組換え A A V、請求項 1 3 ~ 3 6 のいずれか一項に記載のベクター、又は請求項 3 7 に記載の組成物。

## 【請求項 4 3】

アセトアミノフェン、非ステロイド系抗炎症薬 ( N S A I D )、三環系抗うつ薬、又は抗てんかん薬、例えば、カルバマゼピン又はガバペンチンから選択される 1 つ以上の併用療法と組み合わせた、請求項 3 9 若しくは 4 0 に記載の患者を治療するための方法、又は請求項 4 1 若しくは 4 2 に記載のベクターの使用。

## 【請求項 4 4】

C M T 2 A を有する患者を治療するための併用レジメンであって、

( a ) ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン 2 ( h M f n 2 ) コード配列を含む組換え核酸配列であって、前記操作 h M f n 2 コード配列が、配列番号 1 1 の配列又はそれと少なくとも 9 5 % 同一の配列を有し、( b ) の m i R N A 標的部位中にミスマッチを有することによって、前記 C M T 2 A 患者における内因性ヒトマイトフュージン 2 コード配列とは異なる、組換え核酸配列、

( b ) ヒト C M T 2 A 対象における前記内因性 h M f n 2 コード配列と特異的な m i R N A の少なくとも 1 つのコード配列を含む核酸であって、前記 m i R N A コード配列が、前記対象中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結され、前記 m i R N A が、( a ) の前記操作 h M f n 2 コード配列又はそのコードされた m R N A と結合しない、核酸、を共投与することを含む、併用レジメン。

## 【請求項 4 5】

前記 m i R N A コード配列が、配列番号 8 9 を含むか、又は配列番号 8 9 と少なくとも 9 9 % 同一である、請求項 4 4 に記載の併用レジメン。

## 【請求項 4 6】

C M T 2 A を有する患者を治療するための併用レジメンであって、

( a ) ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン 2 ( h M f n 2 ) コード配列を含む組換え核酸配列であって、前記操作 h M f n 2 コード配列が、( b ) の配列の m i R N A 標的部位中にミスマッチを有することによって、前記 C M T 2 A 患者における内因性ヒトマイトフュージン 2 とは異なるように操作される、組換え核酸配列、

( b ) ヒト C M T 2 A 対象における前記内因性ヒトマイトフュージン 2 コード配列と特異的な m i R N A を含む少なくとも 1 つの核酸配列であって、m i R N A コード配列が、前記対象におけるその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結され、少なくとも 1 つの m i R N A が、配列番号 1 5 ( m i R 1 6 9 3、6 4 n t ) を含む m i R N A コード配列、配列番号 1 5 の少なくとも 6 0 個の連続するヌクレオチドを含む m i R N A コード配列、配列番号 1 5 ( 又は配列番号 6 8 ) の約ヌクレオチド 6 ~ 約ヌクレオチド 2 6 と 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む、配列番号 1 5 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する m i R N A コード配列、又は

( i ) T T G A C G T C C A G A A C C T G T T C T、配列番号 2 7、

( i i ) A G A A G T G G G C A C T T A G A G T T G、配列番号 2 8、

( i i i ) T T C A G A A G T G G G C A C T T A G A G、配列番号 2 9、

( i v ) T T G T C A A T C C A G C T G T C C A G C、配列番号 3 0、

( v ) C A A A C T T G G T C T T C A C T G C A G、配列番号 3 1、

( v i ) A A A C C T T G A G G A C T A C T G G A G、配列番号 3 2、

(v i i) T A A C C A T G G A A A C C A T G A A C T、配列番号 33、  
 (v i i i) A C A A C A A G A A T G C C C A T G G A G、配列番号 34、  
 (i x) A A A G G T C C C A G A C A G T T C C T G、配列番号 35、  
 (x) T G T T C A T G G C G G C A A T T T C C T、配列番号 36、  
 (x i) T G A G G T T G G C T A T T G A T T G A C、配列番号 37、  
 (x i i) T T C T C A C A C A G T C A A C A C C T T、配列番号 38、  
 (x i i i) T T T C C T C G C A G T A A A C C T G C T、配列番号 39、  
 (x i v) A G A A A T G G A A C T C A A T G T C T T、配列番号 40、  
 (x i v) T G A A C A G G A C A T C A C C T G T G A、配列番号 41、  
 (x v i) A A T A C A A G C A G G T A T G T G A A C、配列番号 42、  
 (x v i i) T A A A C C T G C T G C T C C C G A G C C、配列番号 43、  
 (x v i i i) T A G A G G A G G C C A T A G A G C C C A、配列番号 44、  
 (x i x) T C T A C C C G C A G G A A G C A A T T G、配列番号 45、若しくは  
 (x x) C T C C T T A G C A G A C A C A A G A A、配列番号 46、又は (i)  
 ~ (x x) のいずれかの組み合わせのうちの 1 つ以上を含む m i R N A コード配列のうちの  
 1 つ以上の配列を有する、少なくとも 1 つの核酸配列、を共投与することを含む、併用  
 レジメン。

#### 【請求項 47】

第 1 のベクターが、核酸 (a) を含み、第 2 の異なるベクターが、少なくとも 1 つの m  
 i R N A (b) を含む、請求項 44 ~ 46 のいずれか一項に記載の併用レジメン。

#### 【請求項 48】

前記第 1 のベクターが、ウイルスベクターであり、並びに / 又は前記第 2 のベクターが  
 、ウイルスベクターであり、並びに前記第 1 及び前記第 2 のウイルスベクターが、同じウ  
 イルス源由来であり得るか、又は異なり得る、請求項 47 に記載の併用レジメン。

#### 【請求項 49】

前記第 1 のベクターが、非ウイルスベクターであり、前記第 2 のベクターが、非ウイル  
 スベクターであり、並びに前記第 1 及び前記第 2 のベクターが、同じ組成物であり得るか  
 、又は異なり得る、請求項 47 又は 48 に記載の併用レジメン。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【背景技術】

#### 【0001】

シャルコー・マリー・トゥース (CMT) 神経障害は、末梢神経に見られる遺伝性疾患  
 の不均一なグループである。CMT は、子供及び大人の両方に影響を与える一般的な障害  
 である。シャルコー・マリー・トゥース病 (CMT) 又は遺伝性運動感覚神経障害 (HM  
 SN) は、症候群の一部ではない遺伝性神経障害の最も一般的に使用される名称である (K  
 le i n , C . J . , D u a n , X . , S h y , M . E . , 2 0 1 3 . I n h e r i t  
 e d n e u r o p a t h i e s : C l i n i c a l o v e r v i e w a n d u p  
 d a t e . M u s c l e N e r v e , B a s s a m , B . , 2 0 1 4 . C h a r c o t  
 - M a r i e - T o o t h D i s e a s e V a r i a n t s - C l a s s i f i c a  
 t i o n , C l i n i c a l , a n d G e n e t i c F e a t u r e s a n d R  
 a t i o n a l D i a g n o s t i c E v a l u a t i o n . J . C l i n . N e u  
 r o m u s c . D i s . 1 5 , 1 1 7 - 1 2 8 , S c h e r e r , S . S . , S h y , M  
 . E . , 2 0 1 5 . C M T S u b t y p e s a n d D i s e a s e B u r d e n  
 i n P a t i e n t s E n r o l l e d i n t h e I N C N a t u r a l  
 H i s t o r y S t u d y ( 6 6 0 1 ) f r o m 2 0 0 9 - 2 0 1 3 . J . N e u  
 r o l . N e u r o s u r g . P s y c h i a t . 8 6 , 8 7 3 - 8 7 8 ) 。

#### 【0002】

CMT ニューロパシー (2 型 CMT 障害) の優性遺伝性軸索形態は、減少した運動及び  
 感覚複合活動電位振幅を伴う正常又はわずかに減少した速度を有し、軸索損失が生検神経  
 における主要な所見である。ミトコンドリア融合及び軸索に沿った輸送に必要なタンパク

10

20

30

40

50

質である、マイトフュージン2 (MFN2) 遺伝子における優性変異は、CMT2Aを引き起こす (Zuchner, S., et al., 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. Nat Genet 36, 449-451)。CMT2Aは、全CMTの最大7%を引き起こすと推定され、2型CMTの最も一般的な形態である (Freidman, V., et al., 2015. CMT Subtypes and Disease Burden in Patients Enrolled in the INC Natural History Study (6601) from 2009-2013. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. 86, 873-878) 10

。異なるMFN2変異は、異なる程度の神経障害を引き起こす。

#### 【0003】

大部分のMFN2変異は、重度の早期発症、軸索神経障害を引き起こし、デノボ変異である。他のMFN2優性変異は、より遅れた発症を伴う軽度の軸索神経障害を引き起こす (Lawson, V.H., et al., 2005. Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. Neurology 65, 197-204、Chung, K.W., et al., 2006. Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. Brain 129, 2103-2118、Verhoeven, K., et al., 2006. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. Brain 129, 2093-2102、Feely, S.M.E., et al., 2011, MFN2 mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. Neurology 76, 1690-1696)。よりまれに、劣性MFN2変異が、重度の早期発症性軸索神経障害を引き起こし得る。Mfn2変異は、後根神経節 (DRG) の下位運動ニューロン及び一次感覚ニューロンに対して選択的に毒性を示す。 20 30

#### 【0004】

MFN2におけるいくつかの優性変異は、骨髄症又は視神経萎縮を生じさせ、これらの複雑な形態のCMT2は、それぞれHMSN-V及びHMSN-VIと称されることがあるが、MFN2変異のみが原因ではない (Scherer, S.S., et al., 2015. Peripheral neuropathies in Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease, 5th ed. Elsevier, Philadelphia, pp. 1051-1074)。

#### 【0005】

哺乳動物は、異なるが重複する分布を有する2つのマイトフュージン遺伝子、Mfn1及びMfn2を有し、両方ともトランス相互作用を通じてミトコンドリア融合を促進することができる (Chen, H., Chan, D.C., 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. Hum. Mol. Genet. 14, R283-R289)。MFN2遺伝子におけるほぼ全ての変異は、GTPaseドメインを含むが、これらに限定されない、単一の点変異としてアミノ酸置換を引き起こす (Cartoni, R., Martinou, J.C., 2009. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. Exp. Neurol. 218, 268-273)。MFN2の機能喪失変異はまた、軸索神経障害を 40 50

引き起こし (Nicholson, G. A., et al, 2008. Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology* 70, 1678 - 1681)、ミトコンドリア融合の減少をもたらすため (Chen, H., Chan, D. C., 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* 14, R283 - R289)、それは優性MFN2変異がミトコンドリア融合に優性阻害効果を有する可能性がある (Detmer, S. A., Chan, D. C., 2007. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J. Cell Biol.* 176, 405 - 414、Baloh, R. H., et al., 2007. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 27, 422 - 430、Misko, A., et al., 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 30, 4232 - 4240、Misko, A. L., et al., 2012. Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J Neurosci* 32, 4145 - 4155)。

#### 【0006】

必要とされているものは、CMT2A及び関連疾患の症状、重症度及び/又は進行を軽減するために有用な治療である。

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

ヒトミトフュージン2発現の欠陥に関連する症状を有する患者及び/又はCMT2Aを有する患者を治療するために有用なウイルス及び非ウイルスベクター及び組成物が本明細書で提供される。

#### 【0008】

特定の実施形態では、AAVカプシド及びベクターゲノムを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)が提供される。rAAVは、(a)ヒトミトフュージン2をコードする操作核酸配列と、(b)(a)と(c)との間に位置するスパーサー配列と、(c)(a)及び(b)の配列に対して3'に位置するCMT2患者における内因性ヒトミトフュージン2と特異的である、少なくとも1つのmiRNAをコードする核酸配列であって、(a)の操作核酸配列が、コードされた少なくとも1つのmiRNAの標的部位を欠き、それによってコードされたmiRNAが、操作ヒトミトフュージン2コード配列を標的とすることから妨げる、核酸配列と、(c)(a)及び(c)と作動可能に連結される制御性配列と、を含む。特定の実施形態では、AAVカプシドは、AAV9、AAVhu68、AAV1又はAAVrh91から選択される。特定の実施形態では、75ヌクレオチド~約250ヌクレオチドの長さである。一態様では、ヒト標的細胞中でベクターの発現を指示する制御性配列と作動可能に連結されるヒトミトフュージン2コード配列を含むベクターが提供される。特定の実施形態では、少なくとも1つのヘアピンmiRNAをコードする核酸配列を含むベクターが提供され、コードされたmiRNAが、対象中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結されるヒト対象における内因性ヒトミトフュージン2と特異的である。特定の実施形態では、ベクター又は他の組成物は、操作ヒトミトフュージン2のコード配列及び少なくとも1つのmiRNAのコード配列の両方

を含む。かかる実施形態では、操作ヒトマイトフュージン2コード配列は、少なくとも1つのmiRNAの標的部位を欠き、それによってmiRNAが、操作ヒトマイトフュージン2コード配列を標的とすることから妨げる。

#### 【0009】

特定の実施形態では、ベクターは、ヒトマイトフュージン2のコード配列、少なくとも1つのmiRNAのコード配列、及び制御性配列を含む、ベクターゲノムを含む、複製欠損ウイルスベクターである。特定の実施形態では、ウイルスベクターは、AAVカプシド中にパッケージングされたベクターゲノムを有する組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子である。特定の実施形態では、AAVカプシドは、AAVhu68、AAV1、又はAAVrh91である。

10

#### 【0010】

特定の実施形態では、配列番号11の核酸配列又はそれと少なくとも90%同一の配列を有する操作マイトフュージン2コード配列を含むベクターが提供され、但し、コードされたmiRNAにより標的とされる核酸配列が、内因性ヒトマイトフュージン2配列とは異なる。

#### 【0011】

特定の実施形態では、(a)配列番号15(miR1693、64nt)を含むmiRNAコード配列、(b)配列番号15の少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むmiRNAコード配列、(c)配列番号15(又は配列番号68)の約ヌクレオチド6~約ヌクレオチド26と100%の同一性を有する配列を含む、配列番号15と少なくとも99%の同一性を有するmiRNAコード配列、(d)(i)TTGACGTCCAGAACCTGTTCT、配列番号27、(ii)AGAAAGTGGGCACCTTAGAGTTG、配列番号28、(iii)TTCAGAAAGTGGGCACCTTAGAG、配列番号29、(iv)TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC、配列番号30、(v)CAAACTTGCTCTTCACTGCAAG、配列番号31、(vi)AAACCTTGAGGACTACTGGAG、配列番号32、(vii)TAACCATGGAAACCATGAACCT、配列番号33、(viii)ACAACAAGAAATGCCCATGGAG、配列番号34、(ix)AAAGGTCCCAAGACAGTTTCCCTG、配列番号35、(x)TGTTTCATGGCGGCAATTTCTCT、配列番号36、(xi)TGAGGTGTGGCTATTGATTGAC、配列番号37、(xii)TTCCTCACACAGTCAACACCTT、配列番号38、(xiii)TTTCTCTCGCAGTAAACCTGCT、配列番号39、(xiv)AGAAATGGAACTCAATGTCTT、配列番号40、(xv)TGAAACAGGACATCACCTGTGA、配列番号41、(xvi)AATACAAGCAGGTATGTGAAC、配列番号42、(xvii)TAAACCTGCTGCTCCCGAGCC、配列番号43、(xviii)TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA、配列番号44、(xix)TCTACCCGCAAGGAAGCAATTG、配列番号45、若しくは(xx)CTCCTTAGCAGACACAAGAAGA、配列番号46のうちの1つ以上、又は(i)~(xx)のいずれかの組み合わせのうちの1つ以上を含む少なくとも1つのmiRNAコード配列を含む核酸配列を含むベクターが提供される。特定の実施形態では、単一の核酸分子は、ヒトマイトフュージン2コード配列及びmiRNAコード配列の両方を含み、核酸分子は、hMfn2コード配列と少なくとも1つのmiRNAコード配列との間に少なくとも75ヌクレオチドのスペーサーを更に含む。特定の実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。

20

30

40

#### 【0012】

特定の実施形態では、組成物は、ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン2コード配列をコードする組換え核酸配列と、対象中で核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結されるCMT2A患者における内因性ヒトマイトフュージン2と特異的な少なくとも1つのmiRNAをコードする核酸配列と、を含み、操作マイトフュージン2コード配列が、コード

50

された少なくとも1つのmiRNAの標的部位を欠き、それによってmiRNAが操作マイトフュージン2コード配列を標的とすることから妨げる。

【0013】

特定の実施形態では、薬学的組成物は、ベクター、rAAV、又は組成物と、薬学的に許容される水性懸濁液体、賦形剤、及び/又は希釈剤と、を含む。

【0014】

特定の実施形態では、有効量のベクター、組換えAAV、又は組成物を、それを必要とする患者に送達することを含む、シャルコー・マリー・トゥース(CMT)神経障害を有する患者を治療するための方法が提供される。特定の実施形態では、有効量のベクター、組換えAAV、又は組成物を、それを必要とする患者に送達することを含む、シャルコー・マリー・トゥース(CMT)神経障害を有する患者における神経障害を低減するための方法が提供される。特定の実施形態では、患者を治療するための方法が提供され、方法は、アセトアミノフェン、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、三環系抗うつ薬、又は抗てんかん薬、例えば、カルバマゼピン又はガバペンチンから選択される1つ以上の併用療法との組み合わせを更に含む。

10

【0015】

特定の実施形態では、CMT2Aを有する患者を治療するための併用レジメンが提供され、(a)ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン2コード配列をコードする組換え核酸配列であって、ヒトマイトフュージン2コード配列が、配列番号11の配列又はそれと少なくとも95%同一の配列を有し、(b)のmiRNA標的配列中にミスマッチを有することによって、CMT2A患者における内因性ヒトマイトフュージン2コード配列とは異なる、組換え核酸配列、(b)ヒトCMT2A対象における内因性ヒトマイトフュージン2配列と特異的な少なくとも1つのmiRNAをコードする核酸配列であって、miRNAが、対象中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される、核酸配列を共投与することを含む。

20

【0016】

特定の実施形態では、CMT2Aを有する患者を治療するための併用レジメンが提供され、(a)ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン2コード配列をコードする組換え核酸配列であって、ヒトマイトフュージン2コード配列が、(b)のmiRNA標的配列中にミスマッチを有することによって、CMT2A患者における内因性ヒトマイトフュージン2コード配列とは異なるように操作される、組換え核酸配列、(b)ヒトCMT2A対象における内因性ヒトマイトフュージン2配列と特異的な少なくとも1つのmiRNAをコードする核酸配列であって、miRNAが、対象中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される、核酸配列を共投与することを含む。特定の実施形態では、第1のベクターが、核酸(a)を含み、第2の異なるベクターが、少なくとも1つのmiRNA(b)を含む。特定の実施形態では、第1のベクター及び/又は第2のベクターは、各々、同じ又は異なり得るウイルスベクターである。特定の実施形態では、第1及び/又は第2のベクターは、非ウイルスベクターである。

30

40

【0017】

これら及び他の態様は、以下の発明の詳細な説明から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A-1B】マイトフュージン2(Mfn2)miRNA選択(種々のmiRNAによる内因性Mfn2のノックダウン)を示す。図1Aは、miRNAのAAV媒介送達の静脈内送達後のB6マウスのマウス脳における、qPCRによって測定した内因性Mfn2RNAのノックダウンを示す。図1Bは、miRNAのAAV媒介送達の静脈内送達後のB6マウスのマウス脊髄における、qPCRによって測定した内因性mfn2RNAのノックダウンを示す。

50

【図 2 A - 2 C】M f n 2 c D N A 導入遺伝子（すなわち、M f n 2 をコードする操作核酸配列）及び m i R 1 5 1 8 を含む A A V ベクターの送達後の M f n 2 R N A 倍率発現を示し、A A V ベクターは、 $3 \times 10^{11}$  G C の用量でマウスに静脈内投与した。図 2 A は、脊髄におけるマウス M f n ( m M f n 2 ) R N A 倍率発現を示す。図 2 B は、脊髄におけるラット M f n 操作 ( r M f n 2 c o ) R N A 倍率発現を示す。図 2 C は、脊髄における m i R 1 5 1 8 R N A 倍率発現を示す。

【図 3】B 1 0 4 ラット細胞の m i R N A 処理後のマイトフュージン 2 タンパク質の発現パーセントを測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量を示す。マイトフュージン 2 発現は、ベータアクチンの負荷対照にわたる全パーセントの計算値からプロットされる。

【図 4】m i R 1 5 1 8 を含む操作 r M f n 2 c D N A 導入遺伝子の A A V ベクター送達後の処理マウスの脊髄におけるラット M f n 2 ( r M f n 2 ) c D N A 発現の倍率発現のプロット定量化を示す。

【図 5】m i R 1 6 9 3 を含む操作 h M f n 2 c D N A 導入遺伝子の A A V ベクター送達後の処理マウスの脊髄におけるヒト M f n 2 ( h M f n 2 ) c D N A 発現の倍率発現のプロット定量化を示す。

【図 6 A - 6 B】マウスにおける静脈内送達後の A A V ベクターからプロセシングされた成熟 m i R N A の総量を示す。図 6 A は、m i R 1 5 1 8 プライマーを用いた q P C R によって測定された、m i R 1 5 1 8 及び m i R 1 6 9 3 の倍率発現を示す。図 6 B は、m i R 1 6 9 3 プライマーを用いた q P C R によって測定された、m i R 1 5 1 8 及び m i R 1 6 9 3 の倍率発現を示す。

【図 7】C B 7 プロモーターを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の M f n 2 欠損 M E F 細胞株における M f n 2 ( ベクターから発現された M f n 2 ) の発現レベルを示し、発現レベルは、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . R B G、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . R B G、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . R B G でトランスフェクションした後のマイトフュージン 2 ( M f n 2 ) の発現を測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量として示される。

【図 8】C A G プロモーターを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の M f n 2 欠損 M E F 細胞株における M f n 2 ( ベクターから発現された M f n 2 ) の発現レベルを示し、発現レベルは、C A G . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . S V 4 0、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . W P R E . S V 4 0、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . W P R E . S V 4 0 でトランスフェクションした後のマイトフュージン 2 ( M f n 2 ) の発現を測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量として示される。図

【図 9 A - 9 B】C B 7 又は C A G プロモーターのいずれかを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の H E K 2 9 3 細胞株における M f n 2 の発現レベルを示す。図 9 A は、C B 7 プロモーターを含む様々なベクター ( C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . R B G、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . R B G、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . R B G でトランスフェクションした後の、q P C R によって測定され、倍率発現としてプロットされた、H E K 2 9 3 細胞における内因性 M f n 2 ノックダウンを示す。図 9 B は、C A G プロモーターを含む様々なベクター C A G . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . S V 4 0、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . W P R E . S V 4 0、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . W P R E . S V 4 0 でトランスフェクションした後の、q P C R によって測定され、倍率発現としてプロットされた、H E K 2 9 3 細胞における内因性 M f n 2 ノックダウンを示す。

【図 1 0】C B 7 プロモーターを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の H E K 2 9 3 細胞株における M f n 2 ( 内因性 M f n 2 及びベクターから発現された M f n 2 ) の発現レベルを示し、発現レベルは、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . W P R E .

10

20

30

40

50

R B G、C B 7、C I、h M f n 2、G A、L I N K、m i R 1 5 1 8、R B G、C B 7、C I、h M f n 2、G A、L I N K、m i R 5 3 8、R B Gでトランスフェクションした後のマイトフュージン2 ( M f n 2 ) の発現を測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量として示される。定量は、パーセント発現としてプロットされ、トランスフェクション効率は、約95%であると決定された。

【図11】CAGプロモーターを含む様々なベクターでトランスフェクションした後のH E K 2 9 3細胞株におけるM f n 2 ( 内因性M f n 2 及びベクターから発現されたM f n 2 ) の発現レベルを示し、発現レベルは、C A G、C I、h M f n 2、G A、W P R E、S V 4 0 ( p 6 1 6 8 )、C A G、C I、h M f n 2、G A、L I N K、m i R 1 5 1 8、W P R E、S V 4 0 ( p 6 1 6 9 )、C A G、C I、h M f n 2、G A、L I N K、m i R 5 3 8、W P R E、S V 4 0 ( p 6 1 7 0 ) でトランスフェクションした後のマイトフュージン2 ( M f n 2 ) の発現を測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量として示される。定量は、パーセント発現としてプロットされ、トランスフェクション効率は、約95%であると決定された。

【図12A - 12C】C B 7又はC A Gプロモーターのいずれかを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の、M f n 2欠損M E F細胞株 ( A T C C ; C R L - 2 9 3 3 ) における成熟m i R N A ( m i R 1 5 1 8 又はm i R 5 3 8 ) をq P C Rによって測定された発現レベルを示す。図12Aは、C B 7又はC A Gプロモーターのいずれかを含むベクターでトランスフェクションした後の、M f n 2欠損M E F細胞株における成熟m i R 1 5 1 8の、q P C Rによって測定され、倍率発現としてプロットされた発現レベルの比較を示す。図12Bは、C B 7又はC A Gプロモーターのいずれかを含むベクターでトランスフェクションした後の、M f n 2欠損M E F細胞株における成熟m i R 5 3 8の、q P C Rによって測定され、倍率発現としてプロットされた発現レベルの比較を示す。図12Cは、C B 7又はC A Gプロモーターのいずれかを含むベクターでトランスフェクションした後の、M f n 2欠損M E F細胞株における成熟m i R 1 5 1 8及びm i R 5 3 8の、q P C Rによって測定され、倍率発現としてプロットされた発現レベルの比較を示す。

【図13A - 13F】マウスモデルの特徴付けを示す。図13Aは、マウス遺伝子型の模式図を示す。図13Bは、ウエスタンブロットティングによって測定された、脳における内因性及びF L A Gタグ付きM F N 2の相対発現レベルによって特徴付けられる、マウスの表現型特徴付けを示す。図13Cは、ウエスタンブロットティングによって測定された、脊髄における内因性M F N 2及びF L A Gタグ付きM F N 2の相対発現レベルによって特徴付けられる、マウスの表現型特徴付けを示す。図13Dは、C M T 2 Aマウスモデル ( n T g、M F N 2<sup>WT</sup>、及びM F N 2<sup>R 9 4 Q</sup> ) におけるマウスの測定された体重を ( g ) で示す。図13Eは、落下までの時間 ( 秒 ) によって測定されたマウス表現型の特徴付けを示す。図13Fは、握力 ( g ) によって測定されたマウス表現型の特徴付けを示す。

【図14A - 14B】M F N 2<sup>R 9 4 Q</sup>マウスにおける薬理学試験の結果を示す ( 試験群 : G 1 - 野生型 ( W T ) マウス、P B S ; G 2 - M F N 2<sup>R 9 4 Q</sup>マウス、P B S ; G 3 - M F N 2<sup>R 9 4 Q</sup>マウス、C B 7、M F N 2 ; G 4 - M F N 2<sup>R 9 4 Q</sup>マウス、C B 7、M F N 2、m i R 1 5 1 8 ; G 5 - M F N 2<sup>R 9 4 Q</sup>マウス、C B 7、M F N 2、m i R 5 3 8 ; G 6 - M F N 2<sup>R 9 4 Q</sup>マウス、C A G、M F N 2、m i R 1 5 1 8 ; G 7 - M F N 2<sup>R 9 4 Q</sup>マウス、C A G、M F N 2、m i R 5 3 8 ) 。図14Aは、マウス群G 1 ~ G 7において測定された体重の結果 ( ( g ) としてプロットされる ) を示す。図14Bは、マウス群G 1 ~ G 7において測定された生存の結果 ( 0 ~ 5 0日にわたる生存確率としてプロットされる ) を示す。

【図15】M F N 2<sup>R 9 4 Q</sup>マウスにおける薬理学試験の握力の結果 ( ( k g ) としてプロットされる ) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

ヒトマイトフュージン2 ( 又はh M f n 2 ) タンパク質を発現する核酸配列と、標的部

位がヒトマイトフュージン2操作コード配列上に存在しない、患者の内因性ヒトマイトフュージン2遺伝子内の部位を特異的に標的とする少なくとも1つのmiRNAをコードする核酸配列とを、患者に共投与するための配列、ベクター、及び組成物が本明細書に提供される。好適には、ヒトマイトフュージン2コード配列は、コードされたmiRNAの特定の標的部位を除去するように操作される。新規の操作ヒトマイトフュージン2コード配列及び新規のmiRNA配列が本明細書に提供される。これらは、CMT2Aの治療のために、単独で、又は互いに及び/又は他の療法と組み合わせて使用することができる。

#### 【0020】

本明細書で使用される場合、「内因性マイトフュージン2」という用語は、CMT2Aを有するヒトにおいてマイトフュージン2タンパク質をコードするマイトフュージン2遺伝子を指す。CMT2Aを有する患者は、いくつかのミスセンス変異又は対立遺伝子変異を有し得る。また、様々な対立遺伝子バリエーションを記載する、[omim.org/allelicVariants/608507](http://omim.org/allelicVariants/608507)も参照されたい。常染色体優性シャルコー・マリー・トゥース(CMT)病2A2A型(CMT2A2A)は、染色体1p36.2上のMFN2遺伝子(608507)のヘテロ接合変異によって引き起こされる。MFN2遺伝子のホモ接合性又は複合ヘテロ接合性変異は、常染色体劣性CMT2A2B(617087)を引き起こす。染色体1p36.2にマッピングされるCMT2Aの別の形態、CMT2A1(118210)は、KIF1B遺伝子(605995)の変異によって引き起こされる。遺伝性運動感覚神経障害VI(HMSN6;601152)、重複する特徴を有する対立遺伝子障害も参照されたい。

#### 【0021】

CMT2Aを有しない患者に内因的に見出されるような天然の機能的ヒトMfn2a遺伝子は配列番号18で再現され、天然の機能的ヒトMfn2Aタンパク質は配列番号19で再現される。マイトフュージン2は、筋肉、脊髄、並びに脳及び脊髄を、触覚、疼痛、熱、及び音などの感覚を検出する感覚細胞(末梢神経)に接続する神経を含む、多くの種類の細胞及び組織で作製される。この遺伝子は、代替的に、CMT2A2、CRPP1、KIAA0214、MARF、MFN2\_\_Human、又はミトコンドリア集合制御性因子と称され得る。2020年7月12日にアクセスしたOMIM.ORG/entry/609260を参照されたい。特定の実施形態では、配列番号19のアミノ酸配列と100%未満の同一性を有する機能的Mfn2タンパク質は、本明細書で提供される組成物によって送達され得る(例えば、配列番号19と97%~100%の同一性を有するMfn2)。かかる実施形態では、天然の機能的ヒトMfn2の酵素機能及び結合機能は、好ましくは保持される。また、UniProtKB-09140も参照されたい(例えば、305位及び307位での結合部位が保存されており、及び/又はヌクレオチド106~111及び/又は258~261でのヌクレオチド結合部位が保存されている)。

#### 【0022】

一実施形態では、配列番号11の核酸配列、又は配列番号11と約90%、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、若しくは99%~100%同一の配列を有し、非CMT2A患者に見られるヒトミトフシン2タンパク質を発現する、操作マイトフュージン2コード配列が提供される。例えば、配列番号19を参照されたい。配列番号2及び配列番号4も参照されたい。

#### 【0023】

特定の実施形態では、例えば、操作コード配列がmiR538コード配列と共投与される場合、配列番号11の核酸配列、又は配列番号11のnt216~236が保存される(例えば、100%同一、又は少なくとも99%同一)ことを条件として、少なくとも80%同一の配列を有する操作マイトフュージン2コード配列が提供される。

#### 【0024】

特定の実施形態では、例えば、操作コード配列がmiR1518コード配列と共投与される場合、配列番号11の核酸配列、又は配列番号11のnt1371~1391が保存される(例えば、100%同一、又は少なくとも99%同一)ことを条件として、少なく

とも 80 % 同一の配列を有する操作マイトフュージン 2 コード配列が提供される。好適には、配列番号 11 と同一性を有する配列は、同じタンパク質を発現する。例えば、配列番号 19、配列番号 2、及び配列番号 4 を参照されたい。

#### 【0025】

一実施形態では、配列番号 28 の核酸配列、又は配列番号 24 と少なくとも 90 %、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 97 % 同一、少なくとも 98 % 同一、少なくとも 99 % 同一、及び / 又は少なくとも 99 % ~ 100 % 同一の配列を有する、操作マイトフュージン 2 コード配列が提供される。

#### 【0026】

「5' UTR」は、遺伝子産物のコード配列の開始コドンの上流にある。5' UTR は、一般に、3' UTR よりも短い。一般に、5' UTR は、約 3 ヌクレオチド長 ~ 約 200 ヌクレオチド長であるが、任意に、より長くてもよい。

#### 【0027】

「3' UTR」は、遺伝子産物のコード配列の下流にあり、一般に、5' UTR よりも長い。特定の実施形態では、3' UTR は、約 200 ヌクレオチド長 ~ 約 800 ヌクレオチド長であるが、任意に、より長くても、又はより短くてもよい。

#### 【0028】

本明細書で使用される場合、「miRNA」は、マイクロRNAを指し、それは、mRNAを調節し、タンパク質への翻訳を停止させる小さな非コードRNA分子である。一般に、ヘアピン形成RNAは、ループ配列によってアンチセンス鎖（例えば、ガイド鎖）と接続されたセンス鎖（例えば、パッセンジャー鎖）を含む二本鎖を有するステム部分をコードする単一の核酸を含む自己相補的な「ステムループ」構造を有する。パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、相補性を共有する。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、100 % の相補性を共有する。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、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 %、又は少なくとも 99 % の相補性を共有する。パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、塩基対のミスマッチにより相補性を欠き得る。いくつかの実施形態では、ヘアピン形成RNAのパッセンジャー鎖及びガイド鎖は、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、又は少なくとも 10 のミスマッチを有する。一般に、ステムの最初の 2 ~ 8 ヌクレオチド（ループに対して）は「シード」残基と称され、標的認識及び結合において重要な役割を果たす。ステムの最初の残基（ループに対して）は、「アンカー」残基と称される。いくつかの実施形態では、ヘアピン形成RNAは、アンカー残基でミスマッチを有する。本明細書で使用される場合、miRNAは、mRNAの破壊又はサイレンシングをもたらす、相補的塩基対形成によってmRNA（例えば、内因性hMfn2内）と特異的に結合するヌクレオチドの領域である「シード配列」を含む。かかるサイレンシングは、内因性hMfn2の完全な消滅ではなく、下方制御をもたらし得る。特に明記しない限り、「miRNA」という用語は、人工的に設計された人工マイクロRNA（amiRNA）を包含する。

#### 【0029】

「自己相補的核酸」とは、核酸鎖内のヌクレオチドの相補性（例えば、塩基対合）により、それ自体とハイブリダイズ（すなわち、それ自体を折り返す）して、一本鎖二重構造を形成することができる核酸を指す。自己相補的核酸は、ヘアピンループ、ループ、バルジ、接合部、及び内部バルジなどの様々な二次構造を形成することができる。特定の自己相補的核酸（例えば、miRNA又はAmiRNA）は、遺伝子サイレンシングなどの制御性機能を実施する。

#### 【0030】

本明細書で提供されるコードされたmiRNAは、CMT2Aを有する患者の内因性ヒトマイトフュージン 2 遺伝子の特異的に標的とするように設計されている。特定の実施形態では、miRNAコード配列は、以下の表 1、配列番号 27 ~ 46、68、及び 89 の

アンチセンス配列を含む。

【表 1 - 1】

表 1.

miR番号	標的hMfn2配列	配列番号	miRNAアンチセンス配列	配列番号
538	AGAACAGGTTCTGGACG TCAA	47	TTGACGTCCAG AACCTGTTCT	27
874	CAACTCTAAGTGCCAC TTCT	48	AGAAGTGGGCA CTTAGAGTTG	28
877	CTCTAAGTGCCCACTTCT GAA	49	TTCAGAAGTGG GCACTTAGAG	29
946	GCTGGACAGCTGGATTG ACAA	50	TTGTCAATCCA GCTGTCCAGC	30
1377	CTGCAGTGAAGACCAAG TTTG	51	CAAAGTTGGTC TTCAGTGCAG	31
1686	CTCCAGTAGTCCTCAAG GTTT	52	AAACCTTGAGG ACTACTGGAG	32
2115	AGTTCATGGTTTCCATG GTTA	53	TAACCATGGAA ACCATGAACT	33
2164	CTCCATGGGCATTCTTGT TGT	54	ACAACAAGAAT GCCCATGGAG	34
2390	CAGGAACTGTCTGGGAC CTTT	55	AAAGGTCCCAG ACAGTTCCTG	35
2457	AGGAAATTGCCGCCATG AACA	56	TGTTTCATGGCG GCAATTCCT	36
1693	AGTCCTCAAGGTTTATA AGAA	57	TTCTTATAAACC TTGAGGACT	68
	GTCAATCAATAGCCAAC CTCA	58	TGAGGTTGGCT ATTGATTGAC	37
	AAGGTGTTGACTGTGTG AGAA	59	TTCTCACACAGT CAACACCTT	38
	AGCAGGTTTACTGCGAG GAAA	60	TTTCCTCGCAGT AAACCTGCT	39
	AAGACATTGAGTTCCAT TTCT	61	AGAAATGGAAC TCAATGTCTT	40

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

miR番号	標的hMfn2配列	配列番号	miRNAアンチセンス配列	配列番号
	TCACAGGTGATGTCCTG TTCA	62	TGAACAGGACA TCACCTGTGA	41
	G TTCACATACCTGCTTGT ATT	63	AATACAAGCAG GTATGTGAAC	42
	GGCTCGGGAGCAGCAGG TTTA	64	TAAACCTGCTG CTCCCGAGCC	43
	TGGGCTCTATGGCCTCC TCTA	65	TAGAGGAGGCC ATAGAGCCCA	44
	CAATTGCTTCCTGCGGG TAGA	66	TCTACCCGCAG GAAGCAATTG	45
	TTCTTTGTGTCTGCTAAG GAG	67	CTCCTTAGCAG ACACAAAGAA	46

10

20

## 【0031】

特定の実施形態では、シード配列は、表に記載のアンチセンス配列と100%同一である。特定の実施形態では、シード配列は、成熟miRNAに位置し(5'から3'へ)、一般に、miRNAのmiRNAセンス鎖の5'末端から2~7、2~8、又は約6ヌクレオチド(センス(+))鎖の5'末端からの位置から始まるが、それはより長い長さであり得る。特定の実施形態では、シード配列の長さは、miRNA配列の長さの約30%以上であり、少なくとも7ヌクレオチド~約28ヌクレオチド長、少なくとも8ヌクレオチド~約28ヌクレオチド長、7ヌクレオチド~28ヌクレオチド長、8ヌクレオチド~18ヌクレオチド長、12ヌクレオチド~28ヌクレオチド長、約20~約26ヌクレオチド、約21ヌクレオチド、約24ヌクレオチド、又は約26ヌクレオチドであり得る。本明細書に提供される実施例では、miRNAは、例えば、約50~約80ヌクレオチドの長さ、又は約55ヌクレオチド~約70ヌクレオチド、又は60~65ヌクレオチドの長さのステムループmiRNA前駆体配列の形態で送達される。特定の実施形態では、このmiRNA前駆体は、約5ヌクレオチド、約21ヌクレオチドのシード配列、約19ヌクレオチドのステムループ、及び約19ヌクレオチドのセンス配列を含み、センス配列は、1つ又は2つのヌクレオチドがミスマッチであるアンチセンス配列に対応する。好適なmiRNAコード配列の例は、配列番号15のmiR1693配列である。特定の実施形態では、miRNAコード配列は、配列番号15(miR1693、64nt)、配列番号15の少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むmiRNAコード配列、又は配列番号15(又は配列番号68)の約ヌクレオチド6~約ヌクレオチド26と100%の同一性を有する配列を含む、配列番号15と少なくとも99%の同一性を含むmiRNAコード配列を含む。特定の実施形態では、上の表の別の配列は、配列番号15(又は配列番号68)の6位~26位で置換され得る。更に別の実施形態では、配列番号15の6位~26位が保持され、代替配列が、ステムループ配列に対して選択される。特定の実施形態では、miRNAコード配列は、配列番号16(miR1518、59nt)、配列番号16と少なくとも99%の同一性を含む配列を含む。特定の実施形態では、miRNAコード配列は、配列番号89(miR538、59nt)、又は配列番号89と少なくとも

30

40

50

99%の同一性を含む配列を含む。特定の実施形態では、代替ステムループ配列が選択され、ステムのアンチセンス鎖は、配列番号16のnt6~26、又は配列番号89のnt1~21であり、ループ配列は、配列番号41のnt27~45又は配列番号89のnt22~40である。

#### 【0032】

特定の実施形態では、核酸分子（例えば、発現カセット又はベクターゲノム）は、1つを超えるmiRNAコード配列を含み得る。これは、(a)配列番号15(miR1693、64nt)を含むmiRNAコード配列、(b)配列番号15の少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むmiRNAコード配列、(c)配列番号15(又は配列番号68)の約ヌクレオチド6~約ヌクレオチド26と100%の同一性を有する配列を含む、配列番号15と少なくとも99%の同一性を含むmiRNAコード配列、及び/又は(d)(i)TTGACGTCCAGAACCTGTCT、配列番号27、(ii)AGAAAGTGGGCACCTTAGAGTTG、配列番号28、(iii)TTCAGAAAGTGGGCACCTTAGAG、配列番号29、(iv)TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC、配列番号30、(v)CAAACTTTGGTCTTCACTGCAG、配列番号31、(vi)AAACCTTGAGGACTACTGGAG、配列番号32、(vii)TAACCATGGAAACCATGAACCT、配列番号33、(viii)CAACAAGAAATGCCCATGGAG、配列番号34、(ix)AAAGGTCCCAGACAGTTCTCTG、配列番号35、(x)TGTTTCATGGCGGCAATTTCTCT、配列番号36、(xi)TGAGGTGTGGCTATTGATTGAC、配列番号37、(xii)TTCCTCACACAGTCAACACCTT、配列番号38、(xiii)TTTCTCTCGCAGTAACCTGTCT、配列番号39、(xiv)AGAAAATGGAACTCAATGTCTT、配列番号40、(xv)TGAACAGGACATCACCTGTGA、配列番号41、(xvi)AATACAAGCAGGTATGTGAAC、配列番号42、(xvii)TAAACCTGTCTGTCTCCCGAGCC、配列番号43、(xviii)TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA、配列番号44、(xix)TCTACCCGCGAGGAAGCAATTG、配列番号45、若しくは(xx)CTCCTTAGCAGACACAAGAA、配列番号46のうちの1つ以上、又は(i)~(xx)のいずれかの組み合わせのうちの1つ以上を含むmiRNAコード配列のうちの1つ、2つ、又はそれ以上の配列を有するmiRNAコード配列を含み得る。特定の実施形態では、核酸分子（例えば、発現カセット又はベクターゲノム）は、配列番号16(miR1518)の1つ、2つ、又はそれ以上のmiRNAコード配列を含み得る。特定の実施形態では、核酸分子（例えば、発現カセット又はベクターゲノム）は、配列番号89(miR538)の1つ、2つ、又はそれ以上のmiRNAコード配列を含み得る。

#### 【0033】

本明細書で使用される場合、「miRNA標的配列」は、DNAプラス鎖(5'から3')（例えば、hMfn2の）上に位置する配列であり、miRNAシード配列を含むmiRNA配列と少なくとも部分的に相補的である。miRNA標的配列は、コードされた導入遺伝子産物の非翻訳領域に対して外因性であり、導入遺伝子発現の抑制が所望される細胞で、miRNAによって特異的に標的化されるように設計される。理論に拘束されることは望まないが、hMfn2は普遍的なタンパク質であり、過剰な発現は毒性及び/又は他の負の副作用と関連付けられ得るため、miRNAは、CMT2A患者に送達される操作hMfn2遺伝子を標的とすることを避けながら、内因性hMfn2遺伝子を優先的に標的とする。より詳細には、ベクターを介して送達されるhMfn2をコードする配列は、標的部位で改変されたコドン配列を含むように設計される。

#### 【0034】

典型的には、miRNA標的配列は、少なくとも7ヌクレオチド~約28ヌクレオチド長、少なくとも8ヌクレオチド~約28ヌクレオチド長、7ヌクレオチド~28ヌクレオチド、8ヌクレオチド~18ヌクレオチド長、約12~約28ヌクレオチド長、約20~

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

10

#### 【0035】

したがって、配列番号11及び24のMfn2コード配列と95%～99.9%同一である本明細書に提供される配列は、構築物中の選択されたmiRNAが標的とされる天然ヒト配列へ戻ることを回避するように設計される。

#### 【0036】

特定の実施形態では、miRNAは、操作hMfn2遺伝子を標的とすることを回避しながら、内因性hMfn2遺伝子を優先的に標的とし、内因性hMfn2核酸配列は、配列番号18のものである。特定の実施形態では、miRNAコード配列は、(i)配列番号18のnt216～236を標的とする、TTGACGTCCAGAACCTGTCTT、配列番号27；(ii)配列番号18のnt552～572を標的とする、AGAA GTGGGCACCTTAGAGTTG、配列番号28；(iii)配列番号18のnt555～575を標的とする、TTCAGAAAGTGGGCACCTTAGAG、配列番号29；(iv)配列番号18のnt624～644を標的とする、TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC、配列番号30；(v)配列番号18のnt1055～1075を標的とする、CAAACTTGGTCTTCACTGCAG、配列番号31；(vi)配列番号18のnt1364～1384を標的とする、AAACCTTGAGGACTACTTGAG、配列番号32；(vii)配列番号18のnt1793～1813を標的とする、TAACCATGGA AACCATGAACCT、配列番号33；(viii)配列番号18のnt1842～1862を標的とする、ACAACAAGAAATGCCCATGGAG、配列番号34；(ix)配列番号181のnt2068～2088を標的とする、AAGGTCCCAAGACAGTTCTCTG、配列番号35；(x)配列番号18のnt2135～2155を標的とする、TGTTTCATGGCGGCAATTTCTCT、配列番号36；(xi)5'UTRを標的とする、TGAGGTGTGGCTAATTGATTTGAC、配列番号37；(xii)3'UTRを標的とする、TCTTCACACA GTCAACACCTT、配列番号38；(xiii)配列番号18のnt1157～1177を標的とする、TTTCTCTCGCAGTA AACCTGCT、配列番号39；(xiv)配列番号18のnt1616～1636を標的とする、AGAAATGGAACTCAATGTCTT、配列番号40；(xv)3'UTRを標的とする、TGAACAAGGACATCACCTGTGA、配列番号41；(xvi)3'UTRを標的とする、AATACAAGCAGGTATGTGAAC、配列番号42；(xvii)配列番号18のnt1146～1166を標的とする、TAAACCTGCTGCTCCCCGAGCC、配列番号43；(xviii)配列番号18のnt1914～1934を標的とする、TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA、配列番号44；(xix)配列番号18のnt390～410を標的とする、TCTACCCGCAAGGAAGCAATTG、配列番号45；又は(xx)配列番号18のnt904～924を標的とする、CTCCTTAGCAGACACAAAGAA、配列番号46のうち1つ以上を含む。

20

30

40

#### 【0037】

50

特定の実施形態では、操作 h M f n 2 核酸配列は、配列番号 1 1 又は 2 4 のものである。特定の実施形態では、操作 h M f n 2 核酸配列は、配列番号 1 8 のものであり、1、2、3、又は 4 個のヌクレオチドミスマッチが、ヌクレオチドの領域：( i ) 配列番号 1 8 の n t 2 1 6 ~ 2 3 6 ; ( i i ) 配列番号 1 8 の n t 5 5 2 ~ 5 7 2 ; ( i i i ) 配列番号 1 8 の n t 5 5 5 ~ 5 7 5 ; ( i v ) 配列番号 1 8 の n t 6 2 4 ~ 6 4 4 ; ( v ) 配列番号 1 8 の n t 1 0 5 5 ~ 1 0 7 5 ; ( v i ) 配列番号 1 8 の n t 1 3 6 4 ~ 1 3 8 4 ; ( v i i ) 配列番号 1 8 の n t 1 7 9 3 ~ 1 8 1 3 ; ( v i i i ) 配列番号 1 8 の n t 1 8 4 2 ~ 1 8 6 2 ; ( i x ) 配列番号 1 8 の n t 2 0 6 8 ~ 2 0 8 8 ; ( x ) 配列番号 1 8 の n t 2 1 3 5 ~ 2 1 5 5 ; ( x i ) 配列番号 1 8 の n t 1 1 5 7 ~ 1 1 7 7 ; ( x i i ) 配列番号 1 8 の n t 1 6 1 6 ~ 1 6 3 6 ; ( x i i i ) 配列番号 1 8 の n t 1 1 4 6 ~ 1 1 6 6 ; ( x i v ) 配列番号 1 8 の n t 1 9 1 4 ~ 1 9 3 4 ; ( x v ) 配列番号 1 8 の n t 3 9 0 ~ 4 1 0 ; 又は ( x v i ) 配列番号 1 8 の n t 9 0 4 ~ 9 2 4 中に存在する。

10

### 【 0 0 3 8 】

特定の実施形態では、単一の核酸（例えば、それを含む発現カセット又はベクターゲノム）は、操作 h M f n 2 コード配列及び少なくとも 1 つの m i R N A コード配列の両方を含み、m i R N A は、操作 h M f n 2 配列には存在しない内因性ヒト M f n 2 配列の領域を特異的に標的とする。特定の実施形態では、ヒトマイトフュージン 2 コード配列は、少なくとも 1 つの m i R N A の上流（5'）にあり、これらの 2 つの要素は、スパーサー又はリンカー配列によって分離される。特定の実施形態では、h M f n 2 コード配列の終止コドンと最も 5' m i R N A コード配列の開始との間に少なくとも 7 5 ヌクレオチドが存在する。特定の実施形態では、スパーサーは、約 7 5 ヌクレオチド ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、又は約 7 5 ヌクレオチド ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、又は約 7 5 ヌクレオチド ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、又は約 7 5 ヌクレオチド ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、又は約 7 5 ヌクレオチド ~ 約 1 0 0 ヌクレオチド、又は約 8 0 ヌクレオチド ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、又は約 8 0 ヌクレオチド ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、又は約 8 0 ヌクレオチド ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、又は約 8 0 ヌクレオチド ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、又は約 8 0 ヌクレオチド ~ 約 1 0 0 ヌクレオチドである。任意に、操作 h M f n 2 コード配列及び少なくとも 1 つの m i R N A コード配列は、約 7 5 ヌクレオチドによって分離される。好適には、スパーサー配列は、任意の制限酵素部位を欠く非コード配列である。任意に、スパーサーは、1 つ以上のイントロン配列を含み得る。特定の実施形態では、m i R N A 配列の 1 つ以上は、イントロン内に位置し得る。特定の実施形態では、リンカー配列は、配列番号 1 7 である。特定の実施形態では、リンカー配列は、配列番号 9 0 である。

20

30

### 【 0 0 3 9 】

特定の実施形態では、操作 h M f n 2 コード配列及び m i R N A コード配列は、異なる核酸配列、例えば、2 つ以上の異なるベクター、ベクター及び L N P を含む組み合わせなどを介して送達される。特定の実施形態では、2 つの異なるベクターは、A A V ベクターである。特定の実施形態では、これらのベクターは、異なる発現カセットを有する。他の実施形態では、これらのベクターは、同じカプシドを有する。他の実施形態では、ベクターは、異なる実施形態を有する。特定の実施形態では、m i R N A コード配列は、L N P 又は別の非ウイルス送達系を介して送達される。特定の実施形態では、操作 h M f n 2 配列は、L N P 又は別の非ウイルス送達系を介して送達される。特定の実施形態では、2 つ以上の異なる送達系（例えば、ウイルス及び非ウイルス、2 つの異なる非ウイルス）の組み合わせが使用される。これら及び他の実施形態では、2 つ以上の異なるベクター又は他の送達系が実質的に同時に投与され得るか、又はこれらの系のうちの 1 つ以上が他の系の前に送達され得る。特定の実施形態では、操作 h M f n 2 配列は、配列番号 1 1、又はそれと 9 0 % ~ 1 0 0 % 同一の配列であり、それは共投与される m i R によって結合されず、かつ h M f n 2 をコードする m R N A をコードする。特定の実施形態では、操作 h M f n 2 配列は、配列番号 2 4、又はそれと 9 0 % ~ 1 0 0 % 同一の配列であり、それは共投与される m i R によって結合されず、かつ h M f n 2 をコードする m R N A をコードする。

40

50

。特定の実施形態では、miRは、配列番号89の配列を有するmiR538であり、対象の内因性hMfn2を標的とするが、修飾hMfn2 cDNA配列又は修飾コードされたmRNA配列を標的としない。

#### 【0040】

本明細書で使用される場合、「AAV.hMfn2」又は「rAAV.hMfn2」という用語は、制御性配列の制御下でヒトマイトフュージン2コード配列（例えば、cDNA）を含むベクターゲノムをその中に有するAAVカプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルスを指すために使用される。本明細書で使用される場合、「AAV.hMfn2 miRXXXX」又は「rAAV.hMfn2.miRXXXX」という用語は、制御性配列の制御下で内因性ヒトマイトフュージン2コード配列を標的とするmiRを含むベクターゲノムをその中に有するAAVカプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルスを指すために使用される。

10

#### 【0041】

特定のカプシドの種類が指定され得、例えば、AAV1.hMfn2又はrAAV1.hMfn2は、AAV1カプシドを有する組換えAAVを指し、AAVhu68.hMfn2又はAAVhu68.Mfn2は、AAVhu68カプシドを有する組換えAAVを指す。AAVrh91.hMfn2又はAAVrh91.Mfn2は、AAVrh91カプシドを有する組換えAAVを指す。

#### 【0042】

「組換えAAV」又は「rAAV」は、2つの要素、AAVカプシド、及びAAVカプシド内にパッケージングされた少なくとも非AAVコード配列を含むベクターゲノムを含むDNAse耐性ウイルス粒子である。特に明記しない限り、この用語は「rAAVベクター」という句と互換的に使用され得る。rAAVは、任意の機能的AAV rep遺伝子又は機能的AAV cap遺伝子を欠き、後代を生成することができないため、「複製欠損ウイルス」又は「ウイルスベクター」である。特定の実施形態では、唯一のAAV配列は、AAV逆位末端反復配列（ITR）であり、ITR間に位置する遺伝子及び制御性配列がAAVカプシド内にパッケージングされることを可能にするために、典型的にはベクターゲノムの5'及び3'最末端に位置する。一般に、AAVカプシドは、60カプシド（cap）タンパク質サブユニットであるVP1、VP2、及びVP3で構成され、選択されるAAVに応じて、およそ1:1:10~1:1:20の比で二十面体対称に配置される。上で特定されるAAVウイルスベクターのカプシドの源として、様々なAAVが選択されてもよい。一実施形態では、AAVカプシドは、AAV9カプシド又はその操作バリエーションである。特定の実施形態では、バリエーションAAV9カプシドは、AAV9.Php.eBカプシド（配列番号84の核酸配列；配列番号85のアミノ酸配列）である。特定の実施形態では、Php.eBカプシドは、マウス研究での使用のために選択され、ヒトにおけるクレードFベクター（例えば、AAVhu68）に好適なモデルである。特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、rAAVベクターの名称で「AAV」という用語の後の数値又は数値と文字の組み合わせによって指定される。特に明記しない限り、本明細書に記載のAAVカプシド、ITR、及び他の選択されるAAV成分は、限定されないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVhu37、AAVrh32.33、AAV8bp、AAV7M8、及びAAVanc80、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh74、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAVhu68、及びAAV9バリエーション（例えば、2020年12月1日に出願された米国仮出願第63/119,863号）として特定されているAAVを含むがこれに限定されない任意のAAVの中から容易に選択され得る。例えば、低減したカプシド脱アミド化を有する新規AAVベクター及びその用途の両方については、WO2019/168961及びWO2019/169004；米国特許出願公開第2007/0036760-A1号、米国特許出願公開第2009/0197338-A1号、EP1

20

30

40

50

310571を参照されたい。WO2003/042397(AAV7及び他のサルAAV)、米国特許第7790449号及び米国特許第7282199号(AAV8)、WO2005/033321及びUS7,906,111(AAV9)、並びにWO2006/110689、及びWO2003/042397(rh.10)、WO2005/033321、WO2018/160582(AAVhu68)も参照されたく、これらは参照により本明細書に組み込まれる。これら及び他のAAVカプシドの脱アミド化プロファイルに記載する、WO2019/168961及びWO2019/169004も参照されたい。他の好適なAAVには、AAVrh90[2020年4月28日に出願された、PCT/US20/30273、]、AAVrh91[2020年4月28日に出願された、PCT/US20/30266、及び2020年11月4日に出願された、米国仮特許出願第63/109,734号、及び2020年8月14日に出願された、米国仮特許出願第63/065,616号]、AAVrh92、AAVrh93、AAVrh91.93[2020年4月28日に出願された、PCT/US20/30281]が含まれるが、これらに限定されず、これらは参照により本明細書に組み込まれる。他の好適なAAVには、2020年10月20日に出願された、PCT/US20/56511に記載されるAAV3Bバリエーションが含まれ、これは、AAV3B.AR2.01、AAV3B.AR2.02、AAV3B.AR2.03、AAV3B.AR2.04、AAV3B.AR2.05、AAV3B.AR2.06、AAV3B.AR2.07、AAV3B.AR2.08、AAV3B.AR2.10、AAV3B.AR2.11、AAV3B.AR2.12、AAV3B.AR2.13、AAV3B.AR2.14、AAV3B.AR2.15、AAV3B.AR2.16、又はAAV3B.AR2.17を説明する、2019年10月21日に出願された、米国仮特許出願第62/924,112号、及び2020年5月15日に出願された、米国仮特許出願第63/025,753号の利益を主張し、これらは参照により本明細書に組み込まれる。これらの文書はまた、rAAVを生成するために選択され得る他のAAVカプシドについても記載されており、参照により組み込まれる。ヒト又は非ヒト霊長類(NHP)から単離され、又は操作され、十分に特性評価されたAAVのうち、ヒトAAV2が、遺伝子導入ベクターとして開発された最初のAAVであり、それは、異なる標的組織及び動物モデルにおいて、効率的な遺伝子導入実験に広く使用されている。

10

20

30

40

50

#### 【0043】

本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」は、ウイルス粒子を形成するパルボウイルス(例えば、rAAV)カプシドの内側にパッケージングされる核酸配列を指す。かかる核酸配列は、AAV逆位末端反復配列(ITR)を含む。本明細書の例では、ベクターゲノムは、少なくとも5'から3'に、AAV5'ITR、コード配列(すなわち、導入遺伝子)、及びAAV3'ITRを含む。AAV2からのITR、カプシドとは異なる供給源AAV、又は完全長ITR以外が選択され得る。特定の実施形態では、ITRは、産生中のrep機能又はトランス相補性AAVを提供するAAVと同じAAV供給源由来である。更に、他のITR、例えば、自己相補的(scAAV)ITRが使用され得る。一本鎖AAV及び自己相補的(sc)AAVの両方がrAAVに含まれる。導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質、機能性RNA分子(例えば、miRNA、miRNA阻害剤)、又は他の遺伝子産物をコードするベクター配列とは異種の核酸コード配列である。核酸コード配列は、標的組織の細胞中で導入遺伝子の転写、翻訳、及び/又は発現を可能にする様式で調節構成要素に作動可能に連結される。ベクターゲノムの好適な成分が本明細書でより詳細に考察される。

#### 【0044】

一例では、「ベクターゲノム」は、最低限、5'から3'へ、ベクター特異的配列、操作ヒトMfn2コード配列を含む核酸配列及び任意に、調節制御配列(標的細胞におけるそれらの発現を指示する)と作動可能に連結される内因性Mfn2を標的とするmiRNA配列を含み、ベクター特異的配列は、ベクターゲノムをウイルスベクターカプシド又はエンベロープタンパク質に特異的にパッケージングする末端反復配列であり得る。例えば、

A A V 逆位末端反復は、A A V 及び特定の他のパルボウイルスカプシドにパッケージングするために利用される。

#### 【 0 0 4 5 】

特定の実施形態では、髄腔内注入に好適な水性液体及びベクターのストック（例えば、中枢神経系及び／又は後根神経節（例えば、神経細胞（錐体細胞、プルキンエ細胞、顆粒細胞、紡錘体細胞、及び介在細胞など）及びグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、及び上衣細胞など）を含む CNS の細胞を優先的に標的とする A A V カプシドを有する r A A V を含む組成物が提供され、ベクターは、中枢神経系（CNS）への送達のための操作 h M f n 2 コード配列及び／又は少なくとも 1 つの m i R N A 特異的内因性 h M f n 2 を有する。特定の実施形態では、本明細書に記載の 1 つ以上のベクターを含む組成物は、大槽（大槽内）への後頭下注入用に製剤化される。特定の実施形態では、組成物は、コンピュータ断層撮影（CT）r A A V 注入を介して投与される。特定の実施形態では、組成物は、オマヤレザバーを使用して投与される。特定の実施形態では、患者に、単回用量の組成物を投与する。

#### 【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」とは、生物学的に有用な核酸配列と、核酸配列（例えば、タンパク質、酵素、又は他の有用な遺伝子産物、mRNAなどをコードする遺伝子 cDNA）及びその遺伝子産物の転写、翻訳、並びに／若しくは発現を指示又は調節する、それと作動可能に連結される制御性配列と、を含む、核酸分子を指す。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結される」配列は、核酸配列と連続又は非連続である制御性配列及びトランス又はシス核酸配列で作用する制御性配列の両方を含む。かかる制御性配列は、典型的には、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、Kozak配列、ポリアデニル化配列、及びTATAシグナルのうちの1つ以上を含む。発現カセットは、他の要素の中で、遺伝子配列の上流（5'～）の制御性配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンなどのうちの1つ以上、及びエンハンサー、又は遺伝子配列の下流（3'～）の制御性配列、例えば、ポリアデニル化部位を含む3'非翻訳領域（3'UTR）のうちの1つ以上を含み得る。特定の実施形態では、制御性配列は、遺伝子産物の核酸配列と作動可能に連結され、制御性配列は、介在する核酸配列、すなわち、5'非翻訳領域（5'UTR）によって、遺伝子産物の核酸配列から分離される。特定の実施形態では、発現カセットは、1つ以上の遺伝子産物の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、モノシストロン性又はバイシストロン性発現カセットであり得る。他の実施形態では、「導入遺伝子」という用語は、標的細胞に挿入される外因性供給源からの1つ以上のDNA配列を指す。

#### 【 0 0 4 7 】

典型的には、かかる発現カセットは、ウイルスベクターを生成するために使用することができ、ウイルスゲノムのパッケージングシグナルに隣接する本明細書に記載される遺伝子産物のコード配列、及び本明細書に記載のものなどの他の発現制御配列を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、2つ以上の発現カセットを含み得る。

#### 【 0 0 4 8 】

特定の実施形態では、発現カセットは、h M f n 2 コード配列（及び／又は内因性 M f n 2 を標的とする m i R N A 配列）、プロモーターを含み、かつそれらのための他の制御性配列を含み得、そのカセットは、ベクター（例えば、r A A V、レンチウイルス、レトロウイルスなど）にパッケージングされ得る。

#### 【 0 0 4 9 】

#### A A V

組換えパルボウイルスは、特に、CMT2Aの治療のためのベクターとして好適である。本明細書に記載されるように、組換えパルボウイルスは、A A V カプシド（又はボカウイルスカプシド）を含み得る。特定の実施形態では、カプシドは、後根神経節内の細胞並びに／又は下位運動ニューロン及び／若しくは一次感覚ニューロン内の細胞を標的とする。特定の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、内因性 h M f n 2 レベルを下方

制御し、h M f n 2 の過剰発現に関連する毒性を低減するために、操作 h M f n 2 及び内因性 h M f n 2 を特異的に標的とする m i R N A を含む r A A V を含む単一の r A A V ストックを有し得る。他の実施形態では、r A A V は、h M f n 2 を含み得、内因性 h M f n 2 を下方制御する m i R N A を含む異なるベクターと共投与され得る。他の実施形態では、r A A V は、内因性 h M f n 2 を下方調節する少なくとも 1 つの m i R N A と、h M f n 2 を送達する第 2 のベクター（又は他の組成物）と、を含み得る。

#### 【 0 0 5 0 】

例えば、クレード F 由来の A A V カプシド（例えば、A A V h u 6 8 又は A A V 9 ）を使用して生成されたベクターを使用して、C N S において h M f n 2 を標的にして発現するベクターを生成することができる。代替的に、クレード A 由来の A A V カプシド（例えば、A A V 1、A A V r h 9 1 ）を使用して生成されたベクターが選択され得る。更に他の実施形態では、他のパルボウイルス又は他の A A V ウイルスが、A A V カプシドの好適な供給源であり得る。

10

#### 【 0 0 5 1 】

A A V 1 カプシドは、A A V v p 1 タンパク質、A A V v p 2 タンパク質、及び A A V v p 3 タンパク質を有するカプシドを指す。特定の実施形態では、A A V 1 カプシドは、約 1 : 1 : 1 0 の所定の比率の A A V v p 1 タンパク質、A A V v p 2 タンパク質、及び A A V v p 3 タンパク質で構成され、6 0 個の総 v p タンパク質の T 1 正二十面体カプシドに組み立てられる。A A V 1 カプシドは、ゲノム配列をパッケージングして、A A V 粒子（例えば、ゲノムがベクターゲノムである組換え A A V ）を形成することができる。典型的には、最も長い v p タンパク質（すなわち、V P 1 ）をコードするカプシド核酸配列は、A A V 1 カプシドを有する r A A V の産生中にトランスで発現される。例えば、米国特許第 6 , 7 5 9 , 2 3 7 号、米国特許第 7 , 1 0 5 , 3 4 5 号、米国特許第 7 , 1 8 6 , 5 5 2 号、米国特許第 8 , 6 3 7 , 2 5 5 号、及び米国特許第 9 , 5 6 7 , 6 0 7 号に記載されている（これらは、参照により本明細書に援用される）。例えば、W O 2 0 1 8 / 1 6 8 9 6 1 も参照されたく、これは参照により組み込まれる。特定の実施形態では、A A V 1 は、質量分析を使用して決定されたカプシド中の V P タンパク質の総量に基づいて、その全体が参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 8 / 1 6 0 5 8 2 で定義されるように脱アミド化された V P アイソフォームの異種集団のカプシド組成によって特徴付けられる。特定の実施形態では、A A V カプシドは、質量分析を使用して決定される、以下に提供される範囲で、以下の位置のうちの 1 つ以上で修飾される。好適な修飾には、脱アミド化標識された上記段落に記載の修飾が含まれ、本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、以下の位置、又は N に続くグリシンのうちの 1 つ以上は、本明細書に記載されるように修飾される。特定の実施形態では、5 7 位、3 8 3 位、5 1 2 位、及び / 又は 7 1 8 位の N に続くグリシンが保存されている（すなわち、未修飾のままである）A A V 1 変異が構築される。特定の実施形態では、前文で示した 4 つの位置の N G は、天然配列で保存される。特定の実施形態では、人工 N G は、参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 8 / 1 6 0 5 8 2 で定義及び特定される位置のうちの 1 つとは異なる位置に導入される。

20

30

#### 【 0 0 5 2 】

本明細書で使用される場合、A A V h u 6 8 カプシドは、W O 2 0 1 8 / 1 6 0 5 8 2 で定義されるカプシドを指す（参照により本明細書に援用される）。本明細書に記載されるように、r A A V h u 6 8 は、A A V h u 6 8 核酸からカプシドを発現する産生系において産生される r A A V h u 6 8 カプシドを有する。特定の実施形態では、A A V h u 6 8 核酸配列は、配列番号 8 2 のアミノ酸配列をコードする配列番号 8 1 である。特定の実施形態では、A A V h u 6 8 核酸配列は、配列番号 8 2 のアミノ酸配列をコードする配列番号 8 3 である。単一の核酸配列 v p 1 を使用した産生から得られた r A A V h u 6 8 は、v p 1 タンパク質、v p 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質の異種集団を産生する。これらの亜集団は、少なくとも脱アミド化アスパラギン（N 又は A s n ）残基を含む。例えば、アスパラギン - グリシン対中のアスパラギンは、高度に脱アミド化されている。特

40

50

定の実施形態では、vp2及び/又はvp3タンパク質は、追加的に、又は代替的に、例えば、選択された発現系においてvpタンパク質の比率を変化させるために、vp1とは異なる核酸配列から発現され得る。

#### 【0053】

AAVカプシド中にパッケージングされ宿主細胞に送達されるゲノム配列は、典型的には、最低でもトランス遺伝子、及びその制御性配列、及びAAV逆位末端反復( ITR )から構成される。一本鎖AAV及び自己相補的( sc ) AAVの両方がrAAVに含まれる。導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質、機能性RNA分子(例えば、miRNA、miRNA阻害剤)、又は他の遺伝子産物をコードするベクター配列とは異種の核酸コード配列である。核酸コード配列は、標的組織の細胞中で導入遺伝子の転写、翻訳、及び/又は発現を可能にする様式で調節構成要素に作動可能に連結される。

#### 【0054】

ベクターのAAV配列は、典型的には、シス作用性5'及び3'逆位末端反復配列を含む(例えば、B. J. Carter, "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990)を参照されたい)。ITR配列は、約145bpの長さである。好ましくは、実質的にITRをコードする全体配列が分子内で使用されるが、これらの配列のある程度の軽微な修飾が許容される。これらのITR配列を修飾する能力は、当該技術分野の範囲内である。(例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)、及びK. Fisher et al., J. Virol., 70: 5205-532 (1996)を参照されたい)。本発明で利用されるかかる分子の一例は、選択された導入遺伝子配列及び関連する調節要素が5'及び3'AAV ITR配列に隣接する、導入遺伝子を含む「シス作用性」プラスミドである。

#### 【0055】

ITRは、ベクター産生の際のゲノムの複製及びパッケージングに関与する遺伝要素であり、rAAVを生成するために必要とされる唯一のウイルス性シス要素である。一実施形態では、ITRは、カプシドを供給するものとは異なるAAV由来である。好ましい実施形態では、AAV2由来のITR配列、又はその欠失バージョン( ITR )が、利便性のため、及び規制当局の承認を加速させるために使用され得る。しかしながら、他のAAV起源由来のITRが選択され得る。ITRの起源がAAV2からであり、AAVカプシドが別のAAV起源からのものである場合、得られたベクターは、シュードタイプであると称され得る。典型的には、AAVベクターゲノムは、AAVの5' ITRと、遺伝子産物をコードする核酸配列と、任意の制御性配列と、AAVの3' ITRと、を含む。しかしながら、これらの要素の他の構成も好適であり得る。一実施形態では、自己相補性AAVが使用される。D配列及び末端分離部位( trs )が欠失している、 ITRと称される5' ITRの短縮バージョンが記載されている。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、130塩基対の短縮されたAAV2 ITRを含み、ここで、外部「a」要素は欠失している。短縮されたITRは、内部A要素をテンプレートとして使用して、ベクターDNA増幅中に145塩基対の野生型長に戻される。他の実施形態では、全長AAV5'及び3' ITRが使用される。

#### 【0056】

ベクター(例えば、rAAV)について上記で特定された主要な要素に加えて、ベクターはまた、細胞内でのその転写、翻訳、及び/又は発現を可能にする様式で導入遺伝子と作動可能に連結される、必要な従来の調節要素を含む。本明細書で使用される場合、「発現」又は「遺伝子発現」という用語は、遺伝子からの情報が、機能的な遺伝子産物の合成に使用されるプロセスを指す。遺伝子産物は、タンパク質、ペプチド、又は核酸ポリマー(RNA、DNA、又はPNAなど)であり得る。

#### 【0057】

本明細書で使用される場合、「制御性配列」又は「発現制御配列」という用語は、イニシエーター配列、エンハンサー配列、及びプロモーター配列などの核酸配列を指し、それらが操作可能に連結されるタンパク質コード核酸配列の転写を誘導するか、抑制するか、さもなければ制御する。制御性調節要素は、典型的には、発現制御配列の一部として、例えば、選択される 5' I T R 配列とコード配列との間に位置するプロモーター配列を含む。特に望ましい実施形態では、中枢神経系に特異的な組織プロモーターが選択される。例えば、プロモーターは神経細胞プロモーター、例えば、g f a A B C ( 1 ) D プロモーター ( A d d g e n e # 5 0 4 7 3 ) 、又はヒト S y n プロモーター ( 配列は A d d g e n e から入手可能、参照 # 5 0 4 6 5 ) であり得る。

【 0 0 5 8 】

10

他の好適なプロモーターには、例えば、構成的プロモーター、制御可能なプロモーター [ 例えば、W O 2 0 1 1 / 1 2 6 8 0 8 及び W O 2 0 1 3 / 0 4 9 4 3 を参照されたい ] 、組織特異的プロモーター、又は生理学的ヒントに応答するプロモーターが、本明細書に記載されるベクターに使用され得る。プロモーターは、異なる供給源、例えば、ヒトサイトメガロウイルス ( C M V ) 最初期エンハンサー / プロモーター、S V 4 0 最初期エンハンサー / プロモーター、J C ポリマウイルスプロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 ( M B P ) 又は神経膠原線維酸性タンパク質 ( G F A P ) プロモーター、単純ヘルペスウイルス ( H S V - 1 ) 潜伏関連プロモーター ( L A P ) 、ラウス肉腫ウイルス ( R S V ) 長末端反復 ( L T R ) プロモーター、ニューロン特異的プロモーター ( N S E ) 、血小板由来成長因子 ( P D G F ) プロモーター、h S Y N 、メラニン凝集ホルモン ( M C H ) プロモーター、C B A 、マトリックス金属タンパク質プロモーター ( M P P ) 、及びニワトリアクチンプロモーターから選択され得る。プロモーターに加えて、ベクターは、1つ以上の他の適切な転写開始、終結、エンハンサー配列、スプライシング及びポリアダニル化 ( ポリ A ) シグナルなどの効率的な R N A プロセッシングシグナル、細胞質 m R N A を安定化させる配列、例えば W P R E 、翻訳効率を高める配列 ( すなわち、コザックコンセンサス配列 ) 、タンパク質の安定性を増強する配列、及び必要に応じて、コードされた産物の分泌を増強する配列を含み得る。好適なエンハンサーの一例は、C M V エンハンサーである。他の好適なエンハンサーには、所望の標的組織適応症に適切なものが含まれる。一実施形態では、発現カセットは、1つ以上の発現エンハンサーを含む。一実施形態では、発現カセットは、2つ以上の発現エンハンサーを含む。これらのエンハンサーは同じであっても、互いに異なってもよい。例えば、エンハンサーは、C M V 前初期エンハンサーを含み得る。このエンハンサーは、互いに隣接して位置する2つのコピーに存在し得る。代替的に、エンハンサーの二重コピーは、1つ以上の配列により分離される。更に別の実施形態では、発現カセットは、イントロン、例えば、ニワトリベータ - アクチンイントロンを更に含有する。他の好適なイントロンには、当該技術分野で既知のものが含まれ、例えば、W O 2 0 1 1 / 1 2 6 8 0 8 号などに記載されている。好適なポリ A 配列の例には、例えば、S V 4 0 、S V 5 0 、ウシ成長ホルモン ( b G H ) 、ヒト成長ホルモン、及び合成ポリ A が含まれる。特定の実施形態では、ポリ A は、S V 4 0 ポリ A である。特定の実施形態では、ポリ A は、ウサギグロビンポリ A ( R B G ) である。任意に、1つ以上の配列を選択して、m R N A を安定させてもよい。かかる配列の一例は、修飾 W P R E 配列であり、これは、ポリ A 配列の上流及びコード配列の下流で操作され得る ( 例えば、M A Z a n t a - B o u s s i f , e t a l , G e n e T h e r a p y ( 2 0 0 9 ) 1 6 : 6 0 5 - 6 1 9 を参照されたい ) 。

20

30

40

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態では、ベクターゲノムは、組織特異的プロモーターを含み、いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターは、ヒトシナプシンプロモーターである。特定の実施形態では、ヒトシナプシンプロモーターは、配列番号 6 の核酸配列を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは構成的プロモーターを含み、プロモーターは、C B 7 プロモーター又は C A G プロモーターである。特定の実施形態では、C B 7 プロモーターは、配列番号 8 6 の核酸配列を含む。特定の実施形態では、C A G プロモーターは、配列番号

50

87の核酸配列を含む。

【0060】

一実施形態では、ベクターゲノムは、AAV 5' ITR、プロモーター、任意のエンハンサー、任意のイントロン、それらを含むヒトMfn2 (hMfn2又はhUMfn2) のコード配列、ポリA、及びAAV 3' ITRを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV 5' ITR、プロモーター、任意のエンハンサー、任意のイントロン、それらを含むヒトMfn2のコード配列、ポリA、及びAAV 3' ITRを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV 5' ITR、プロモーター、任意のエンハンサー、任意のイントロン、hUMfn2コード配列、ポリA、及びAAV 3' ITRを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5' ITR、EF1aプロモーター、任意のエンハンサー、任意のプロモーター、hUMfn2、SV40ポリA、及びAAV2 3' ITRを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5' ITR、Ubcプロモーター、任意のエンハンサー、任意のイントロン、hUMfn2、SV40ポリA、及びAAV2 3' ITRである。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5' ITR、CB7プロモーター、イントロン、hUMfn2、SV40ポリA、及びAAV2 3' ITRである。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5' ITR、CB7プロモーター、イントロン、hUMfn2、ウサギベータグロビンポリA、及びAAV2 3' ITRである。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5' ITR、CB7プロモーター、イントロン、操作hUMfn2、リンカー、内因性hUMfn2配列を標的とするmiR、ウサギベータグロビンポリA、及びAAV2 3' ITRである。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5' ITR、CB7プロモーター、イントロン、操作hUMfn2、リンカー、miR1518配列、ウサギベータグロビンポリA、及びAAV2 3' ITRである。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5' ITR、CB7プロモーター、イントロン、操作hUMfn2、リンカー、miR538、ウサギベータグロビンポリA、及びAAV2 3' ITRである。例えば、配列番号1、3、69、71、73、75、77、及び79を参照されたい。hUMfn2コード配列は、本明細書で定義される配列から選択される。例えば、配列番号11若しくはそれと95%~99.9%同一の配列、又は配列番号11若しくはそれと95%~99.9%同一の配列、あるいは本明細書に定義されるその断片を参照されたい。ベクターゲノムの他の要素又はこれらの配列上のバリエーションは、本発明の特定の実施形態について、ベクターゲノムに対して選択され得る。

【0061】

ベクター産生

AAVウイルスベクター(例えば、組換え(r)AAV)の産生における使用のために、発現カセットは、パッケージング宿主細胞に送達される任意の好適なベクター、例えば、プラスミド上に担持され得る。本発明において有用なプラスミドは、とりわけ、原核細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞におけるインビトロでの複製及びパッケージングに適しているように操作され得る。好適なトランスフェクション技術及びパッケージング宿主細胞は、既知であり、かつ/又は当業者によって容易に設計することができる。

10

20

30

40

【表 2】

表 2.

AAVベクター	配列番号 (ベクターゲノム)
Syn.PI.hMfn2eng.link.hMfn2.miR1693.WPRE.bGH	1
Syn.PI.rMfn2eng.link.rMfn2 miR1518 WPRE.BGH	3
CB7.CI.hMfn2.GA.RBG	79
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG	77
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG	75
CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40	73
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40	71
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40	69

10

## 【0062】

特定の実施形態では、産生プラスミドは、(a) ヒトマイトフュージン2をコードする操作核酸配列と、(b) (a) と (c) との間に位置するスパーサー配列と、(c) (a) 及び (b) の配列に対して3'に位置するCMT2患者における内因性ヒトマイトフュージン2と特異的である、少なくとも1つのmiRNAであって、(a) の操作核酸配列が、少なくとも1つのmiRNAの標的部位を欠き、それによってmiRNAが、操作ヒトマイトフュージン2コード配列を標的とすることから妨げる、少なくとも1つのmiRNAと、(c) (a) 及び (c) と作動可能に連結される制御性配列と、を含む、カプシドにパッケージングするためのベクターゲノムを含む。特定の実施形態では、産生プラスミドは、配列番号1、3、69、71、73、75、77、又は79の核酸配列を含むベクターゲノムを含む。

20

## 【0063】

ベクターとしての使用に好適なAAVを生成及び単離するための方法は、当該技術分野において既知である。一般に、例えば、Griegger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin / Biotechnol. 99: 119-145、Buning et al., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," J. Gene Med. 10: 717-733、及び以下に引用される参考文献を参照されたい(これらの各々全体が参照により本明細書に援用される)。導入遺伝子をビリオンにパッケージングするために、ITRは、発現カセットを含む核酸分子と同じ構築物中でシスに必要とされる唯一のAAV成分である。cap及びrep遺伝子は、トランスで供給され得る。

30

40

## 【0064】

一実施形態では、本明細書に記載される発現カセットは、ウイルスベクターを産生するために、その上に運ばれる免疫グロブリン構築物配列をパッケージング宿主細胞に導入する遺伝要素(例えば、シャトルプラスミド)に操作される。一実施形態では、選択される遺伝子要素は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングベレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合を含む任意の好適な方法によってAAVパッケージ細胞に送達され得る。安定したAAVパッケージ細胞も作製することができる。代替的に、発現カセットは、AAV以外のウイルス

50

ベクターを生成するために、又はインビトロでの抗体の混合物の産生のために使用され得る。かかる構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作における当業者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技法を含む。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) を参照されたい。

#### 【0065】

「AAV中間体」又は「AAVベクター中間体」という用語は、それにパッケージングされた所望のゲノム配列を欠失している組み立てられたrAAVカプシドを指す。これらは、「空の」カプシドと称され得る。そのようなカプシドは、発現カセットの検出可能なゲノム配列をまったく含まないか、又は遺伝子産物の発現を達成するには不十分な部分的にパッケージされたゲノム配列のみを含み得る。これらの空のカプシドは、宿主細胞に目的の遺伝子を導入するために非機能的である。

10

#### 【0066】

本明細書に記載の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)は、既知の技法を使用して産生されてもよい。例えば、WO2003/042397、WO2005/033321、WO2006/110689、US7588772B2を参照されたい。かかる方法は、AAVカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、機能的rep遺伝子と、AAV逆位末端反復(ITR)及び導入遺伝子と隣接する本明細書に記載の発現カセットと、発現カセットをAAVカプシドタンパク質にパッケージングすることを可能にするのに十分なヘルパー機能と、を含有する宿主細胞を培養することを伴う。また、AAVカプシドをコードする核酸配列と、機能的rep遺伝子と、記載のベクターゲノムと、ベクターゲノムをAAVカプシドタンパク質にパッケージングすることを可能にするのに十分なヘルパー機能と、を含有する宿主細胞も本明細書で提供される。一実施形態では、宿主細胞は、HEK293細胞である。これらの方法は、参照により本明細書に組み込まれるWO2017/160360A2に更に詳細に記載されている。カプシドを産生する方法、そのためのコード配列、及びrAAVウイルスベクターを産生するための方法が記載されている。例えば、Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100(10), 6081-6086(2003)及びUS2013/0045186A1を参照されたい。

20

30

#### 【0067】

一実施形態では、組換えAAVを産生するために有用な産生細胞培養物が提供される。かかる細胞培養物は、宿主細胞中でAAVカプシドタンパク質を発現する核酸、AAVカプシドへのパッケージングに好適な核酸分子、例えば、AAV ITR及び宿主細胞中の産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される遺伝子産物をコードする非AAV核酸配列を含有するベクターゲノム、並びに組換えAAVカプシドへの核酸分子のパッケージングを可能にするのに十分なAAV rep機能及びアデノウイルスヘルパー機能を含有する。一実施形態では、細胞培養物は、哺乳動物細胞(例えば、とりわけヒト胎児腎臓293細胞)又は昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス)から構成される。

#### 【0068】

典型的には、rep機能は、ベクターゲノムに隣接するITRを提供するAAVと同じAAV源に由来する。本明細書の実施例では、AAV2 ITRを選択し、AAV2 repを使用する。任意に、他のREP配列又は別のREP源(及び任意に別のITR源)が選択され得る。例えば、repは、これらに限定されないが、AAV1 repタンパク質、AAV2 repタンパク質、又はrep78、rep68、rep52、rep40、rep68/78、及びrep40/52、若しくはそれらの断片であり得る。任意に、rep及びcap配列は、細胞培養物中の同じ遺伝子要素上にある。rep配列とcap遺伝子との間にスペーサーが存在し得る。これらのAAV又は変異体AAVカプシド配列のいずれかは、宿主細胞中でそれらの発現を指示する外因性調節制御配列の制御下にあり得る。

40

50

## 【 0 0 6 9 】

一実施形態では、細胞は、好適な細胞培養（例えば、H E K 2 9 3）細胞において製造される。本明細書に記載される遺伝子療法ベクターを製造するための方法は、当該技術分野においてよく知られている方法、例えば、遺伝子療法ベクターの産生のために使用されるプラスミドDNAの産生、ベクターの産生、及びベクターの精製を含む。一部の実施形態では、遺伝子療法ベクターは、A A Vベクターであり、生成されたプラスミドは、A A Vゲノム及び目的の遺伝子をコードするA A Vシス - プラスミド、A A Vの r e p 及び c a p 遺伝子を含むA A Vトランス - プラスミド、及びアデノウイルスヘルパープラスミドである。ベクター生成プロセスは、細胞培養の開始、細胞の継代、細胞の播種、プラスミドDNAによる細胞のトランスフェクション、トランスフェクション後の無血清培地への培地交換、並びにベクター含有細胞及び培養培地の収集などの方法ステップを含み得る。

10

## 【 0 0 7 0 】

特定の実施形態では、r A A V、h M f n 2の製造プロセスは、プラスミドDNAによるH E K 2 9 3細胞の一過性トランスフェクションを伴う。単一バッチ又は複数バッチは、P A L L i C E L L i s バイオリアクターで、H E K 2 9 3細胞のP E I 媒介性三重トランスフェクションによって産生される。収集したA A V材料は、可能な場合、使い捨ての閉鎖型バイオペロッシングシステムにおいて、清澄化、T F F、アフィニティクロマトグラフィ、及びアニオン交換クロマトグラフィによって順次精製される。

## 【 0 0 7 1 】

収集されたベクター含有細胞及び培養培地は、本明細書では粗細胞収集物と称される。更に別の系では、遺伝子療法ベクターは、バキュロウイルスベクターによる感染によって昆虫細胞に導入される。これらの産生システムに関するレビューについては、概して、例えば、Z h a n g e t a l . , 2 0 0 9 , “ A d e n o v i r u s - a d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s h y b r i d f o r l a r g e - s c a l e r e c o m b i n a n t a d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s p r o d u c t i o n , ” H u m a n G e n e T h e r a p y 2 0 : 9 2 2 - 9 2 9 を参照されたい（その各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に援用される）。これら及び他のA A V産生系を作製及び使用する方法はまた、以下の米国特許に記載されており、これらの各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：5, 139, 941、5, 741、683、6, 057、152、6, 204、059、6, 268、213、6, 491、907、6, 660、514、6, 951、753、7, 094、604、7, 172、893、7, 201、898、7, 229、823、及び7, 439、065、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

## 【 0 0 7 2 】

粗細胞収集物は、その後、ベクター収集物の濃縮、ベクター収集物の透析濾過、ベクター収集物の顕微溶液化、ベクター収集物のヌクレアーゼ消化、顕微溶液化された中間体の濾過、クロマトグラフィによる粗精製、超遠心分離による粗精製、接線流濾過による緩衝液交換、及び/又はバルクベクターを調製するための製剤化及び濾過などの、追加の方法ステップに供される。

## 【 0 0 7 3 】

2工程の高塩濃度でのアフィニティクロマトグラフィ精製、続いて、アニオン交換樹脂クロマトグラフィを用いて、ベクター薬物製品を精製し、空のカプシドを除去する。これらの方法は、2016年12月9日に出願された国際特許出願第P C T / U S 2 0 1 6 / 0 6 5 9 7 0 号に更に詳細に記載されている（これは、参照により本明細書に援用される）。A A V 8の精製方法：2016年12月9日に出願された国際特許出願第P C T / U S 2 0 1 6 / 0 6 5 9 7 6 号、及びr h 1 0の精製方法：2016年12月9日に出願され、「S c a l a b l e P u r i f i c a t i o n M e t h o d f o r A A V r h 1 0」と題する国際特許出願第P C T / U S 1 6 / 6 6 0 1 3 号（2015年12月11日にも出願されている）、並びにA A V 1の精製方法：2016年12月9日に出願された国際特許出願第P C T / U S 2 0 1 6 / 0 6 5 9 7 4 号、2015年12月11日に

40

50

出願された「Scalable Purification Method for AAV1」は、全て参照により本明細書に援用される。

#### 【0074】

空及び充填粒子の含有量を算出するために、選択された試料（例えば、本明細書の実施例では、イオジキサノール勾配で精製された調製物、ここで、GCの数＝粒子の数）についてのVP3バンド体積が、ロードされたGC粒子に対してプロットされる。得られた線形方程式（ $y = mx + c$ ）を用いて、試験物品ピークのバンド体積中の粒子の数を算出する。次いで、ロードされた20  $\mu$ L当たりの粒子の数（pt）に50を掛け、粒子（pt）/mLを得る。Pt/mLをGC/mLで割って、ゲノムコピーに対する粒子の比（pt/GC）を得る。Pt/mL～GC/mLは、空pt/mLを与える。空pt/mLをpt/mLで割って、次いで100を掛けることによって、空粒子のパーセンテージを得る。

10

#### 【0075】

一般に、空のカプシド及びパッケージされたゲノムを含むAAVベクター粒子をアッセイするための方法は、当該技術分野において既知である。例えば、Grimm et al., Gene Therapy (1999) 6:1322-1330、Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7:122-128を参照されたい。変性したカプシドについて試験するために、本方法は、3つのカプシドタンパク質を分離することができる任意のゲル（例えば、緩衝液中に3～8%のTris-アセテートを含む勾配ゲル）からなるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に処理済みAAVストックを供し、次いで、試料材料が分離するまでゲルを泳動し、ナイロン又はニトロセルロースの膜（好ましくは、ナイロン）にゲルをプロットすることを含む。抗-AAVカプシド抗体は、次いで、変性したカプシドタンパク質、好ましくは、抗-AAVカプシドモノクローナル抗体、最も好ましくは、B1抗-AAV-2モノクローナル抗体に結合する主要な抗体として使用される（Wobus et al., J. Virol. (2000) 74:9281-9293）。次いで、一次抗体に結合し、一次抗体、より好ましくは、抗体に共有結合した検出分子を含有する抗-IgG抗体、最も好ましくは、西洋ワサビペルオキシダーゼに共有結合したヒツジ抗-マウスIgG抗体との結合を検出するための手段を含む、二次抗体が使用される。一次抗体と二次抗体との間の結合を半定量的に決定するために、結合を検出するための方法が使用され、好ましくは、放射性アイソトープ放射、電磁放射、又は比色変化を検出することができる検出方法、最も好ましくは、化学発光検出キットが使用される。例えば、SDS-PAGEでは、カラムフラクションからの試料を取って、還元剤（例えば、DTT）を含有するSDS-PAGE充填緩衝液中で加熱することができ、カプシドタンパク質は、プレキャスト勾配ポリアクリルアミドゲル（例えば、Novex）中で分解された。Silver Express (Invitrogen、CA)を製造元の指示に従って使用して、銀染色を実施してもよく、又は他の好適な染色方法、すなわち、SYPROールビー若しくはクーマシー染色を実施してもよい。一実施形態では、カラム画分中のAAVベクターゲノム（vg）の濃度は、定量的リアルタイムPCR（Q-PCR）によって測定することができる。試料は希釈され、DNase I（又は別の適切なヌクレアーゼ）で消化されて、外因性DNAが除去される。ヌクレアーゼの不活化後、試料は更に希釈され、プライマー及びプライマー間のDNA配列に特異的なTaqMan（商標）蛍光発生プローブを用いて増幅される。規定レベルの蛍光（閾値サイクル、Ct）に到達するのに必要とされるサイクル数は、Applied Biosystems Prism 7700配列検出システム上で各試料について測定される。AAVベクター中に含有されるものと同一の配列を含有するプラスミドDNAを利用して、Q-PCR反応における標準曲線を作成する。試料から得られたサイクル閾値（Ct）値を用いて、プラスミド標準曲線のCt値に対してそれを正規化することにより、ベクターゲノム力価を決定した。デジタルPCRに基づくエンドポイントアッセイも使用されることができる。

20

30

40

#### 【0076】

50

一態様では、広域スペクトルのセリンプロテアーゼ、例えば、プロテイナーゼ K（例えば、Q i a g e n から商業的に入手可能なもの）を利用する最適化された q - P C R 方法が使用される。より具体的には、最適化された q P C R ゲノム力価アッセイは、D N a s e I 消化の後に、試料をプロテイナーゼ K 緩衝液で希釈し、プロテイナーゼ K で処理し、続いて、熱失活させることを除き、標準的なアッセイと同様である。適切には、試料は、試料サイズと等しい量のプロテイナーゼ K 緩衝液で希釈される。プロテアーゼ K 緩衝液は、2 倍以上に濃縮され得る。典型的には、プロテイナーゼ K 処理は、約 0 . 2 m g / m L であるが、0 . 1 m g / m L ~ 約 1 m g / m L で変動し得る。処理ステップは、一般に、約 55 で約 15 分間実施されるが、より低い温度で（例えば、約 37 ~ 約 50 ）より長い時間にわたって（例えば、約 20 分間 ~ 約 30 分間）、又はより高い温度で（例えば、最高約 60 ）より短い時間にわたって（例えば、約 5 ~ 10 分間）実施されてもよい。同様に、熱失活は、一般に、約 95 で約 15 分間であるが、温度を下げててもよく（例えば、約 70 ~ 約 90 ）、時間を延ばしてもよい（例えば、約 20 分間 ~ 約 30 分間）。次いで、試料は希釈され（例えば、1000 倍）、標準的なアッセイで記載されるように、T a q M a n 分析に供される。

10

#### 【0077】

追加的に、又は代替的に、ドロップレットデジタル P C R（d d P C R）が使用されてもよい。例えば、d d P C R による一本鎖及び自己相補的な A A V ベクターゲノム力価を測定するための方法が記載されている。例えば、M . L o c k e t a l , H u G e n e T h e r a p y M e t h o d s , H u m G e n e T h e r M e t h o d s . 2014 Apr ; 25 ( 2 ) : 115 - 25 . d o i : 10 . 1089 / h g t b . 2013 . 131 . E p u b 2014 Feb 14 を参照されたい。

20

#### 【0078】

簡潔に言うと、パッケージングされたゲノム配列を有する r A A V 粒子をゲノム欠損 A A V 中間体から分離するための方法は、組換え A A V ウイルス粒子及び A A V カプシド中間体を含む懸濁液を高性能液体クロマトグラフィに供することを含み、A A V ウイルス粒子及び A A V 中間体は、高 p H で平衡化された強力アニオン交換樹脂に結合され、約 260 及び約 280 で紫外吸光度のために溶出液をモニタリングしながら、塩勾配に供される。p H は、選択された A A V に応じて調節され得る。例えば、W O 2017 / 160360 ( A A V 9 )、W O 2017 / 100704 ( A A V r h 10 )、W O 2017 / 100676（例えば、A A V 8）、及び W O 2017 / 100674 ( A A V 1 ) を参照されたい（これらは、参照により本明細書に援用される）。この方法では、A A V 完全カプシドは、A 260 / A 280 の比が変曲点に到達すると溶出される画分から収集される。一実施例では、アフィニティクロマトグラフィステップのために、ダイアフィルトレーションされた産物を、A A V 2 血清型を効率的に捕らえる C a p t u r e S e l e c t（商標）P o r o s - A A V 2 / 9 アフィニティ樹脂（L i f e T e c h n o l o g i e s）に適用してもよい。これらのイオン性条件下、残留細胞 D N A 及びタンパク質の著しいパーセンテージは、カラムの中を流れ、A A V 粒子は、効率的に捕捉される。

30

#### 【0079】

非 A A V 及び非ウイルスベクター

40

本明細書で使用される「ベクター」は、核酸配列を含む生物学的又は化学的部分であり、該核酸配列の複製又は発現のために適切な標的細胞に導入され得る。ベクターの例には、組換えウイルス、プラスミド、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、デンドリマー、細胞透過性ペプチド（C P P）コンジュゲート、磁性粒子、又はナノ粒子が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、ベクターは、外因性又は異種又は操作 h M f n 2 コード配列（及び / 又は少なくとも 1 つの m i R N A）を挿入することができ、次いで適切な標的細胞に導入することができる核酸分子である。かかるベクターは、好ましくは、1 つ以上の複製起点と、組換え D N A が挿入され得る 1 つ以上の部位とを有する。ベクターは、しばしば、ベクターを有する細胞を、有さない細胞から選択することができる手段を有しており、例えば、それらは薬剤耐性遺伝子をコードしている。一般

50

的なベクターには、プラスミド、ウイルスゲノム、及び「人工染色体」が含まれる。ベクターの生成、産生、特徴付け、又は定量化の従来の方法は、当業者に利用可能である。

#### 【0080】

一実施形態では、ベクターは、それについて記載された発現カセットを含む非ウイルスプラスミド、例えば、「ネイキッドDNA」、「ネイキッドプラスミドDNA」、RNA、mRNA、shRNA、RNAiなどである。任意に、プラスミド又は他の核酸配列は、好適なデバイス、例えば、エレクトロスプレー、エレクトロポレーションを介して送達される。他の実施形態では、核酸分子は、例えば、ミセル、リポソーム、カチオン性脂質-核酸組成物、ポリグリカン組成物、及び他のポリマー、脂質及び/又はコレステロール系-核酸コンジュゲート、並びに本明細書に記載されるような他の構築物を含む様々な組成物及びナノ粒子と結合される。例えば、WO2014/089486、US2018/035361A1、US2013/0037977A1、WO2015/074085A1、US9670152B2、及びUS8,853,377B2、X. Suet al, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8(3), pp774-787; ウェブ公開: 2011年3月21日、WO2013/182683、WO2010/053572、及びWO2012/170930を参照されたく、これらは全て参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0081】

特定の実施形態では、非ウイルスベクターは、共投与される操作hMfn2配列に存在しない部位で内因性hMfn2を標的とするmiRNA転写産物の送達に使用される。いくつかの実施形態では、miRNAは、用量当たり約0.5mg/kg(例えば、約1.0mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、3.0mg/kg、4.0mg/kg、5.0mg/kg、6.0mg/kg、7.0mg/kg、8.0mg/kg、9.0mg/kg、又は10.0mg/kgを超える)体重を超えるmiRNAの量で送達される。いくつかの実施形態では、miRNAは、用量当たり約0.1~100mg/kg(例えば、約0.1~90mg/kg、0.1~80mg/kg、0.1~70mg/kg、0.1~60mg/kg、0.1~50mg/kg、0.1~40mg/kg、0.1~30mg/kg、0.1~20mg/kg、0.1~10mg/kg)体重のmiRNAの範囲の量で送達される。いくつかの実施形態では、miRNAは、用量当たり約1mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、55mg、60mg、65mg、70mg、75mg、80mg、85mg、90mg、95mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、又は500mgを超える量で送達される。

20

30

#### 【0082】

特定の実施形態では、miRNA転写物は、脂質ナノ粒子(LNP)にカプセル化される。本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子」という語句は、1つ以上の脂質(例えば、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及びPEG修飾脂質)を含む移送ビヒクルを指す。好ましくは、脂質ナノ粒子は、1つ以上のmiRNAを1つ以上の標的細胞(例えば、後根神経節、下位運動ニューロン及び/又は上位運動ニューロン、又はCNSにおいて上記で特定された細胞型)に送達するように製剤化される。好適な脂質の例には、例えば、ホスファチジル化合物(例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、及びガングリオシド)が含まれる。また、単独で、又は他の移送ビヒクルと組み合わせての、移送ビヒクルとしてのポリマーの使用も企図される。好適なポリマーには、例えば、ポリアクリレート、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリラクチド、ポリラクチド-ポリグリコリドコポリマー、ポリカプロラクトン、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルギネート、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン、デンドリマー、及びポリエチレンイミンが含まれ得る。一実施形態では、移送ビヒクルは、標的細胞へのmiRNAのトランスフェクションを促進するその能力に基づいて選択される。miRNAに

40

50

有用な脂質ナノ粒子は、タンパク質産生のためのデポーとして機能する標的細胞への *miRNA* の送達をカプセル化及び / 又は増強するための陽イオン性脂質を含む。本明細書で使用される場合、「カチオン性脂質」という語句は、選択された *pH*、例えば、生理的 *pH* で正味の正電荷を担持するいくつかの脂質種のいずれかを指す。企図される脂質ナノ粒子は、1つ以上のカチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び *PEG* 修飾脂質を用いる、様々な比率の多成分脂質混合物を含むことにより調製され得る。いくつかのカチオン性脂質が文献に記載されており、その多くは市販されている。例えば、*WO 2014/089486*、*US 2018/0353616 A1*、及び *US 8,853,377 B2* を参照されたく、これらは参照により組み込まれる。特定の実施形態では、*LNP* 製剤は、コレステロール、イオン化性脂質、ヘルパー脂質、*PEG* 脂質、及びカプセル化 *mRNA* の周囲に脂質二重層を形成するポリマーを含む慣例的な手順を使用して実施される (*Kowalski et al.*, 2019, *Mol. Ther.* 27(4): 710-728)。いくつかの実施形態では、*LNP* は、ヘルパー脂質 *DOPC* を有するカチオン性脂質 (すなわち、*N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)*、又は *1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン (DOTAP)*) を含む。いくつかの実施形態では、*LNP* は、イオン化脂質 *Dlin-MC3-DMA* イオン化脂質、又はジケトピペラジン系イオン化脂質 (*ckk-E12*) を含む。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリエチレンイミン (*PEI*) 又はポリ ( - アミノ ) エステル (*PBAE*) を含む。例えば、*WO 2014/089486*、*US 2018/0353616 A1*、*US 2013/0037977 A1*、*WO 2015/074085 A1*、*US 9670152 B2*、及び *US 8,853,377 B2* を参照されたく、これらは参照により組み込まれる。

#### 【0083】

特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターは、操作 *hMfn2* をコードする核酸配列、及び / 又は操作 *hMfn2* の配列上に存在しない部位で内因性 *hMfn2* を標的とする少なくとも1つの *miRNA* を含む発現カセットが含まれる合成又は人工のウイルス粒子を指す「複製欠損ウイルス」又は「ウイルスベクター」である。複製欠損ウイルスは、後代ビリオンを生成することができないが、標的細胞に感染する能力を保持する。一実施形態では、ウイルスベクターのゲノムは、複製に必要とされる酵素をコードする遺伝子を含まない (ゲノムは、人工ゲノムの増幅及びパッケージングに必要とされるシグナルに隣接する *E2* をコードする核酸配列のみを含有する「ガットレス (*gutless*)」であるように操作されることができる) が、これらの遺伝子は、産生中に供給され得る。したがって、それは、後代ビリオンによる複製及び感染が、複製に必要とされるウイルス酵素の存在下以外で生じることができないために、遺伝子療法における使用のために安全であると考えられる。

#### 【0084】

本明細書で使用される場合、組換えウイルスベクターは、例えば、組換えアデノ随伴ウイルス (*AAV*)、アデノウイルス、ポカウイルス、ハイブリッド *AAV* / ポカウイルス、単純ヘルペスウイルス、又はレンチウイルスを含む、任意の好適な複製欠損ウイルスベクターであり得る。

#### 【0085】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、ベクター (例えば、組換え *AAV*) が産生されるパッケージング細胞株を指し得る。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞 (例えば、ヒト、昆虫、又は酵母) であり得、任意の手段、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、形質転換、ウイルス感染、トランスフェクション、リボソーム送達、膜融合技術、高速 *DNA* コーティングベレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合によって細胞に導入される、外因性 *DNA* 又は異種 *DNA* を含有する。宿主細胞の例としては、限定されないが、単離された細胞、細胞培養物、*Escherichia coli* 細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳類細胞、非哺乳類細胞、昆虫細胞、*HEK-293* 細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、中枢神

経系の細胞、ニューロン、グリア細胞、又は幹細胞が挙げられ得る。

【0086】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」という用語は、hMfn2及び/又はmiRNAの発現が所望される任意の標的細胞を指す。特定の実施形態では、「標的細胞」という用語は、CMT2Aの治療を受けている対象の細胞を指すことが意図される。標的細胞の例には、中枢神経系内の細胞が含まれるが、これに限定されない。

【0087】

組成物

本明細書では、hMfn2・miRを含む少なくとも1つのベクター（例えば、rAAV・hMfn2・miRストック）、及び/又はmiRを含む少なくとも1つのベクター、及び/又はストックを含む少なくとも1つのベクター、並びに任意の担体、賦形剤、及び/又は保存剤を含む組成物が提供される。

【0088】

本明細書で使用される場合、rAAVの「ストック」は、rAAVの集団を指す。脱アミド化に起因するカプシドタンパク質の不均一性にもかかわらず、ストック内のrAAVは、同一のベクターゲノムを5つ共有することが予想される。ストックは、例えば、選択されたAAVカプシドタンパク質及び選択された産生系に特徴的な不均一な脱アミド化パターンを有するカプシドを有するrAAVを含み得る。ストックは、単一の産生系から産生されてもよく、又は産生系の複数の実行からプールされてもよい。本明細書に記載されるものを含むが、これらに限定されない、様々な産生系を選択することができる。

【0089】

特定の実施形態では、組成物は、単独で、又は他のベクターストック若しくは組成物と組み合わせて、CMT2Aを治療するのに使用するのに好適な組換えAAV（rAAV）であるウイルスストックを少なくとも含む。特定の実施形態では、組成物は、CMT2Aを治療するための薬物を調製する際の使用に好適である。特定の実施形態では、組成物は、CMT2Aを治療する際の使用に好適な組換えAAV（rAAV）であるウイルスストックを含み、該rAAVは、（a）アデノ随伴ウイルスカプシドと、（b）AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、該ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復、操作ヒトマイトフュージン2のコード配列、スパーサー配列、操作されたヒトマイトフュージンコード配列中に存在しない部位で内因性ヒトマイトフュージンを特異的に標的とする少なくとも1つのmiRNAのコード配列、及びコードされた遺伝子産物の発現を指示する制御性配列を含む、ベクターゲノムと、を含む。特定の実施形態では、組成物は、（a）アデノ随伴ウイルスカプシドと、（b）AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、該ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復、操作ヒトマイトフュージン2のコード配列、及びコードされた遺伝子産物の発現を指示する制御性配列を含む、ベクターゲノムと、を含む、rAAVを含む別個のベクターストックを含み、並びに/又は別個のベクターストックが、（a）アデノ随伴ウイルスカプシドと、（b）AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、該ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復、操作ヒトマイトフュージン2コード配列には存在しない部位で内因性ヒトマイトフュージン2を特異的に標的とする少なくとも1つのmiRNAのコード配列、及びコードされた遺伝子産物の発現を指示する制御性配列を含む、ベクターゲノムと、を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、プロモーター、エンハンサー、イントロン、ヒトMfn2コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含む。特定の実施形態では、イントロンは、ニワトリベータアクチンスプライスドナー及びウサギ スプライスアクセプターの要素からなる。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5' ITR及びAAV2 3' ITRを更に含み、これらは、ベクターゲノムの全ての要素に隣接する。

【0090】

rAAV・hMfn2・miR（rAAV・hMfn2又は別のベクター）は、ヒトCMT2A患者に投与するために生理学的に適合性のある担体に懸濁され得る。特定の実施

形態では、ヒト患者への投与のために、ベクターは、食塩水、界面活性剤、及び生理学的に適合性のある塩、又は塩の混合物を含有する水性溶液中に好適に懸濁される。好適には、製剤は、生理学的に許容されるpH、例えば、pH 6～9、又はpH 6.5～7.5、pH 7.0～7.7、又はpH 7.2～7.8の範囲に調整される。脳脊髄液のpHは、約7.28～約7.32、又は髄腔内送達の場合、約7.2～約7.4であるので、この範囲内のpHが望ましいが、静脈内送達の場合、約6.8～約7.2のpHが望ましい場合がある。しかしながら、最も広範囲内の他のpH、及びこれらの下位範囲が、他の送達経路のために選択され得る。

#### 【0091】

特定の実施形態では、製剤は、重炭酸ナトリウムを含まない緩衝生理食塩水溶液を含有し得る。かかる製剤は、ハーバード緩衝液などの緩衝生理食塩水溶液を含有してもよく、水中に、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、及びそれらの混合物のうちの1つ以上を含む。水溶液は、ポロキサマーであるKolliphor（登録商標）P188を更に含んでもよく、これは、BASFから市販され、以前、Lutrol（登録商標）F68という商品名で販売されていた。水溶液は、7.2のpH又は7.4のpHを有し得る。

10

#### 【0092】

別の実施形態では、製剤は、緩衝生理食塩水溶液を含み得、1mMのリン酸ナトリウム（ $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ）、150mMの塩化ナトリウム（ $\text{NaCl}$ ）、3mMの塩化カリウム（ $\text{KCl}$ ）、1.4mMの塩化カルシウム（ $\text{CaCl}_2$ ）、0.8mMの塩化マグネシウム（ $\text{MgCl}_2$ ）、及び0.001%のKolliphor（登録商標）188が含まれる。例えば、[harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html](http://harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html)を参照されたい。特定の実施形態では、ハーバード緩衝液が好ましい。

20

#### 【0093】

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

30

#### 【0094】

別の実施形態では、組成物は、担体、希釈剤、賦形剤及び/又はアジュバントを含む。好適な担体は、導入ウイルスが向けられる適応症を考慮して、当業者により容易に選択され得る。例えば、1つの好適な担体は、生理食塩水を含み、様々な緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝食塩水）とともに製剤化され得る。他の例示的な担体としては、滅菌生理食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油、及び水が挙げられる。緩衝液/担体は、rAAVが注入チューブに付着するのを防ぐが、インビボでrAAV結合活性を妨げない成分を含むべきである。

#### 【0095】

任意に、組成物は、ベクター（例えば、rAAV）及び担体に加えて、防腐剤又は化学安定剤などの他の従来の医薬成分を含み得る。好適な例示的な防腐剤としては、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、及びパラクロロフェノールが含まれる。好適な化学安定剤としては、ゼラチン及びアルブミンが含まれる。

40

#### 【0096】

本明細書で使用される場合、「担体」は、任意の及び全ての溶媒、分散媒体、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイドなどを含む。薬学的活性物質に対するかかる媒体及び薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。補足有効成分を組成物中に組み込むこともできる。

50

「薬学的に許容される」という語句は、宿主に投与されるときにアレルギー又は類似の有害反応を生じない分子実体及び組成物を指す。リポソーム、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞などの送達ビヒクルが、本発明の組成物を好適な宿主細胞に導入するために使用され得る。詳細には、rAAVベクター送達導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフィア、又はナノ粒子などに封入化された送達のいずれかのために製剤化され得る。

#### 【0097】

一実施形態では、組成物は、対象への送達に適した最終製剤を含み、例えば、生理的に適合するpH及び塩濃度に緩衝される水性液体懸濁液である。任意に、1つ以上の界面活性剤が製剤中に存在する。別の実施形態では、組成物は、対象への投与のために希釈される濃縮物として輸送され得る。他の実施形態では、組成物は、投与時に凍結乾燥され、再構成され得る。

#### 【0098】

好適な界面活性剤、又は界面活性剤の組み合わせは、非毒性である非イオン性界面活性剤の中から選択されてもよい。一実施形態では、例えば、中性pHを有し、平均分子量8400を有するポロキサマー188としても知られているPluronic（登録商標）F68[BASF]などの、一級ヒドロキシル基末端の二機能的ブロックコポリマー界面活性剤が選択される。他の界面活性剤及び他のポロキサマー、すなわち、ポリオキシエチレン（ポリ（エチレンオキシド））の2つの親水性鎖に隣接するポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中心疎水性鎖からなる非イオン性トリブロックコポリマー、SOLUTOL HS15（マクロゴール-15ヒドロキシステアレート）、LABRASOL（ポリオキシカプリル酸グリセリド）、ポリオキシ10オレイルエーテル、TWEEN（ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル）、エタノール、及びポリエチレングリコールが選択され得る。一実施形態では、製剤は、ポロキサマーを含有する。これらのコポリマーは、一般的に、文字「P」（ポロキサマーの場合）の後に3桁の数字で命名され、最初の2桁×100は、ポリオキシプロピレンコアのおおよその分子質量を与え、最後の1桁×10は、ポリオキシエチレン含有量のパーセンテージを与える。一実施形態では、ポロキサマー188が選択される。界面活性剤は、懸濁液の最高約0.0005%～約0.001%の量で存在してもよい。

#### 【0099】

ベクターは、細胞をトランスフェクトするのに十分な量で投与され、十分なレベルの遺伝子導入及び発現を提供して、過度の悪影響なしに、又は医学的に許容される生理学的効果を伴う治療効果を提供し、これは当業者によって決定され得る。任意に、髄腔内投与以外の経路、例えば、所望の臓器（例えば、肝臓（任意に肝動脈を介して）、肺、心臓、眼、腎臓）への直接送達、経口、吸入、鼻腔内、気管内、動脈内、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、及び他の親の投与経路などを使用することができる。投与経路は、所望される場合、組み合わせられてもよい。

#### 【0100】

ベクターの用量は、主に、治療される状態、患者の年齢、体重、及び健康状態などの要因に依存し、したがって、患者間で異なり得る。例えば、ウイルスベクターの治療上有効なヒト投薬量は、概して、約25～約1000マイクロリットル～約100mLの範囲の、（体重が70kgの平均的な対象を治療するために）約 $1 \times 10^9$ ～ $1 \times 10^{16}$ ゲノムウイルスベクターの濃度（その範囲内の全ての整数又は分数量を含み、好ましくは、ヒト患者に対して、 $1.0 \times 10^{12}$  GC～ $1.0 \times 10^{14}$  GC）を含む溶液である。一実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、又は $9 \times 10^9$  GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、又は $9 \times 10^{10}$  GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物

は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも  $1 \times 10^{11}$ 、 $2 \times 10^{11}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 、 $4 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$ 、 $7 \times 10^{11}$ 、 $8 \times 10^{11}$ 、又は  $9 \times 10^{11}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも  $1 \times 10^{12}$ 、 $2 \times 10^{12}$ 、 $3 \times 10^{12}$ 、 $4 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、又は  $9 \times 10^{12}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも  $1 \times 10^{13}$ 、 $2 \times 10^{13}$ 、 $3 \times 10^{13}$ 、 $4 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{13}$ 、 $6 \times 10^{13}$ 、 $7 \times 10^{13}$ 、 $8 \times 10^{13}$ 、又は  $9 \times 10^{13}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも  $1 \times 10^{14}$ 、 $2 \times 10^{14}$ 、 $3 \times 10^{14}$ 、 $4 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^{14}$ 、 $6 \times 10^{14}$ 、 $7 \times 10^{14}$ 、 $8 \times 10^{14}$ 、又は  $9 \times 10^{14}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内の全ての整数又は小数を含む、用量当たり少なくとも  $1 \times 10^{15}$ 、 $2 \times 10^{15}$ 、 $3 \times 10^{15}$ 、 $4 \times 10^{15}$ 、 $5 \times 10^{15}$ 、 $6 \times 10^{15}$ 、 $7 \times 10^{15}$ 、 $8 \times 10^{15}$ 、又は  $9 \times 10^{15}$  GC を含むように製剤化される。一実施形態では、ヒトへの適用のために、用量は、範囲内の全ての整数又は少数を含む、用量当たり  $1 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{12}$  GC の範囲で当り得る。

10

#### 【0101】

特定の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^9$  GC / g 脳質量 ~ 約  $1 \times 10^{12}$  GC / g 脳質量の範囲である。特定の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量 ~ 約  $3.33 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量の範囲である。特定の実施形態では、用量は、約  $3.33 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量 ~ 約  $1.1 \times 10^{12}$  GC / g 脳質量の範囲である。特定の実施形態では、用量は、約  $1.1 \times 10^{12}$  GC / g 脳質量 ~ 約  $3.33 \times 10^{13}$  GC / g 脳質量の範囲である。特定の実施形態では、用量は、 $3.33 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量よりも低い。特定の実施形態では、用量は、 $1.1 \times 10^{12}$  GC / g 脳質量よりも低い。特定の実施形態では、用量は、 $3.33 \times 10^{13}$  GC / g 脳質量よりも低い。特定の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $2 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $2 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $3 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $4 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $5 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $6 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $7 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $8 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $9 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $2 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $3 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約  $4 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、 $rAAV$  の約  $1.44 \times 10^{13}$  ~  $4.33 \times 10^{14}$  GC の範囲の均一用量として、ヒトに投与される。特定の実施形態では、用量は、 $rAAV$  の約  $1.44 \times 10^{13}$  ~  $2 \times 10^{14}$  GC の範囲の均一用量として、ヒトに投与される。特定の実施形態では、用量は、 $rAAV$  の約  $3 \times 10^{13}$  ~  $1 \times 10^{14}$  GC の範囲の均一用量として、ヒトに投与される。特定の実施形態では、用量は、 $rAAV$  の約  $5 \times 10^{13}$  ~  $1 \times 10^{14}$  GC の範囲の均一用量として、ヒトに投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、 $rAAV$  の約  $1 \times 10^{13}$  ~  $8 \times 10^{14}$  GC の範囲にある量の  $AAV$  を含有するような投薬単位で製剤化され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、 $rAAV$  の約  $1.44 \times 10^{13}$  ~  $4.33 \times 10^{14}$  GC の範囲にある量の  $rAAV$  を含有するような投薬単位で製剤化され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、 $rAAV$  の約  $3 \times 10^{13}$  ~  $1 \times 10^{14}$  GC の範囲にある量の  $rAAV$  を含有するような投薬単位で製剤化され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、 $rAAV$  の約  $5 \times 10^{13}$  ~  $1 \times 10^{14}$  GC の範囲にある量の  $rAAV$  を含有するような投薬単

20

30

40

50

位で製剤化され得る。

【0102】

特定の実施形態では、ベクターは、単回用量で対象に投与される。特定の実施形態では、複数回の注入（例えば、2用量）によってベクターを送達することが所望される。

【0103】

任意の副作用に対する治療的利益のバランスをとるために、投薬量を調整してもよく、そのような投薬量は、組換えベクターが利用されるための治療用途に応じて変化し得る。導入遺伝子の発現レベルをモニタリングして、ウイルスベクター、好ましくはミニ遺伝子を含む AAV ベクターをもたらし投薬頻度を決定することができる。任意に、治療目的で記載されているものと同様の投薬レジメンは、本明細書で提供される組成物を使用した免疫に利用され得る。

10

【0104】

本明細書で使用される場合、「髄腔内送達」又は「髄腔内投与」という用語は、脊柱管への、より詳細には、脳脊髄液（CSF）へ到達するようにクモ膜下腔空間内への注入を介した、投与経路を指す。髄腔内送達は、腰椎穿刺、脳室内（側脳室内（ICV）を含む）、後頭下/槽内、及び/又は C1 - 2 穿刺を含み得る。例えば、材料は、腰部穿刺により、クモ膜下腔空間にわたって拡散させるために導入され得る。別の実施例では、注入は、大槽内であり得る。

【0105】

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

20

【0106】

内因性 hMfn2（例えば、CMT2A 患者）を抑制するための本明細書に記載の miR 標的配列を含む組成物は、概して、ニューロン（例えば、これらに限定されないが、下位運動ニューロン及び/又は一次感覚ニューロンを含む、中枢神経系内の 1 つ以上の異なる細胞型を標的とする。これらは、例えば、錐体細胞、プルキンエ細胞、顆粒細胞、紡錘細胞、及び介在神経細胞を含み得る）。

【0107】

使用

30

本明細書で提供されるベクター及び組成物は、シャルコー・マリー・トゥース（CMT）障害、神経障害、又はそれに関連する様々な症状を有する患者を治療するのに有用である。CMT2A を有する患者を治療するための併用レジメン又は併用療法が提供される。特定の実施形態では、このレジメン又は併用療法は、（a）ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン 2 コード配列をコードする組換え核酸配列であって、ヒトマイトフュージン 2 コード配列が、配列番号 15 の配列又はそれと少なくとも 95 % 同一の配列を有し、（b）の miRNA 標的配列中にミスマッチを有することによって、CMT2A 患者における内因性ヒトマイトフュージン 2 とは異なる、組換え核酸配列、及び（b）ヒト CMT2A 対象における内因性ヒトマイトフュージン 2 配列と特異的な少なくとも 1 つの miRNA のコード配列であって、miRNA が、対象中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される、コード配列を共投与することを含む。

40

【0108】

特定の実施形態では、このレジメン又は併用療法は、（a）ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン 2 コード配列をコードする組換え核酸配列であって、操作ヒトマイトフュージン 2 コード配列が、配列番号 11 の配列又はそれと少なくとも 95 % 同一の配列を有し、（b）の miRNA 標的配列中にミスマッチを有することによって、CMT2A 患者における内因性ヒトマイトフュージン 2 コード配列とは異なる、組換え核酸配列、及び（b）ヒト CMT2

50

A 対象における内因性ヒトマイトフュージン 2 配列と特異的な少なくとも 1 つの m i R N A のコード配列であって、少なくとも 1 つの m i R N A コード配列が、対象中でその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結され、少なくとも 1 つの m i R N A コード配列が、配列番号 89 ( m i R 538、59 nt ) を含む 1 つ以上の m i R N A 標的配列の配列、又は配列番号 27 の 1 つ以上のアンチセンス配列を含む m i R N A を含む、コード配列を共投与することを含む。

#### 【 0 1 0 9 】

特定の実施形態では、C M T 2 A を有する患者を治療するためのこのレジメン又は併用療法は、( a ) ヒト標的細胞中で組換え核酸配列の発現を指示する制御性配列と作動可能に連結される操作ヒトマイトフュージン 2 コード配列をコードする組換え核酸配列であって、ヒトマイトフュージン 2 コード配列が、( b ) の m i R N A 標的配列中にミスマッチを有することによって、C M T 2 A 患者における内因性ヒトマイトフュージン 2 コード配列とは異なるように操作される、組換え核酸配列、及び ( b ) ヒト C M T 2 A 対象における内因性ヒトマイトフュージン 2 配列と特異的な少なくとも 1 つの m i R N A のコード配列であって、m i R N A コード配列が、対象におけるその発現を指示する制御性配列と作動可能に連結され、少なくとも 1 つの m i R N A のコード配列が、配列番号 15 ( m i R 1693、64 nt ) を含む m i R N A コード配列、配列番号 15 の少なくとも 60 個の連続するヌクレオチドを含む m i R N A コード配列、配列番号 15 ( 又は配列番号 68 ) の約ヌクレオチド 6 ~ 約ヌクレオチド 26 と 100 % の同一性を有する配列を含む、配列番号 15 と少なくとも 99 % の同一性を有する m i R N A コード配列、又は、

( i ) T T G A C G T C C A G A A C C T G T T C T、配列番号 27、( i i ) A G A A G T G G G C A C T T A G A G T T G、配列番号 28、( i i i ) T T C A G A A G T G G G C A C T T A G A G、配列番号 29、( i v ) T T G T C A A T C C A G C T G T C C A G C、配列番号 30、( v ) C A A A C T T G G T C T T C A C T G C A G、配列番号 31、( v i ) A A A C C T T G A G G A C T A C T G G A G、配列番号 32、( v i i ) T A A C C A T G G A A A C C A T G A A C T、配列番号 33、( v i i i ) A C A A C A A G A A T G C C C A T G G A G、配列番号 34、( i x ) A A A G G T C C C A G A C A G T T C C T G、配列番号 35、( x ) T G T T C A T G G C G G C A A T T T C C T、配列番号 36、( x i ) T G A G G T T G G C T A T T G A T T G A C、配列番号 37、( x i i ) T T C T C A C A C A G T C A A C A C C T T、配列番号 38、( x i i i ) T T T C C T C G C A G T A A A C C T G C T、配列番号 39、( x i v ) A G A A A T G G A A C T C A A T G T C T T、配列番号 40、( x v ) T G A A C A G G A C A T C A C C T G T G A、配列番号 41、( x v i ) A A T A C A A G C A G G T A T G T G A A C、配列番号 42、( x v i i ) T A A A C C T G C T G C T C C C G A G C C、配列番号 43、( x v i i i ) T A G A G G A G G C C A T A G A G C C C A、配列番号 44、( x i x ) T C T A C C C G C A G G A A G C A A T T G、配列番号 45、若しくは ( x x ) C T C C T T A G C A G A C A C A A A G A A、配列番号 46 のうちの 1 つ以上、又は ( i ) ~ ( x x ) のいずれかの組み合わせのうちの 1 つ以上の配列を有する、コード配列を共投与することを含む。特定の実施形態では、第 1 のベクターが、核酸 ( a ) を含み、第 2 の異なるベクターが、少なくとも 1 つの m i R N A ( b ) を含む。特定の実施形態では、第 1 のベクターが、ウイルスベクターであり、並びに / 又は第 2 のベクターが、ウイルスベクターであり、並びに第 1 及び第 2 のウイルスベクターが、同じウイルス源由来であり得るか、又は異なり得る。特定の実施形態では、第 1 のベクターが、非ウイルスベクターであり、第 2 のベクターが、非ウイルスベクターであり、並びに第 1 及び第 2 のベクターが、同じ組成物であり得るか、又は異なり得る。

#### 【 0 1 1 0 】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクター及び組成物は、M f n 2 誘導性脂肪腫症を有する患者を治療するのに有用である。特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクター及び組成物は、多発性対称性脂肪腫症を有する患者を治療するのに有用である。多重対称性脂肪腫症は、M f n 2 遺伝子における希少な遺伝子変異と関連しており、

上半身に脂肪組織が大量に沈着して蓄積し、腕及び脚の脂肪組織が徐々に失われることを特徴とする (Rocha, N., et al., Human biallelic MFN2 mutations induce mitochondrial dysfunction, upper body adipose hyperplasia, and suppression of leptin expression, eLife, 2017, 6: 1 - 27, April 19, 2017)。特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクター及び組成物は、MFN2 欠乏による重度の早期発症神経障害を有する患者を治療するのに有用である。特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクター及び組成物は、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、心筋症、及び様々ながんにおける MFN2 関連病因を有する患者を治療するのに有用である。MFN2 調節解除と AD 及び PD との間に示唆される関連性、例えば、MFN2 遺伝子における単一ヌクレオチド多型と AD リスクとの間に関連があることが証明されている (Filadi, R., et al., Cell Death and Disease, 2018, 9: 330)。

10

#### 【0111】

任意に、本明細書で提供されるベクター及び組成物は、アセトアミノフェン、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID)、三環系抗うつ薬、又は抗てんかん薬、例えば、カルバマゼピン又はガバペンチンから選択される 1 つ以上の併用療法と組み合わせて使用され得る。更に他の実施形態では、ベクターは、1 つ以上のステロイド、例えば、プレドニゾンを含む免疫調節レジメンと組み合わせて送達され得る。

20

#### 【0112】

本明細書で使用される場合、コンピュータ断層撮影 (CT) という用語は、軸に沿って作成された一連の平面断面画像から、コンピュータによって身体構造の三次元画像が構築される放射線撮影を指す。

#### 【0113】

「実質的相同性」又は「実質的類似性」という用語は、核酸、又はその断片を参照する場合、別の核酸 (又はその相補的鎖) と適切なヌクレオチド挿入又は欠失によって最適に整列されるとき、整列される配列の少なくとも約 95 ~ 99 % のヌクレオチド配列同一性を有することを示す。好ましくは、相同性は、全長配列、又はそのオープンリーディングフレーム、又は少なくとも 15 ヌクレオチド長である別の好適な断片にわたる。好適な断片の例は、本明細書に記載されている。

30

#### 【0114】

核酸配列の文脈で「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、又は「同一パーセント」という用語は、最大限対応するように整列させたときに同じである 2 つの配列中の残基を指す。配列同一性の比較の長さは、ゲノムの全長、遺伝子コード配列の全長、又は少なくとも約 500 ~ 5000 個のヌクレオチドの断片にわたってもよく、これが望ましい。しかしながら、例えば、少なくとも約 9 個のヌクレオチド、通常は少なくとも約 20 ~ 24 個のヌクレオチド、少なくとも約 28 ~ 32 個のヌクレオチド、少なくとも約 36 個以上のヌクレオチドの、より小さい断片間の同一性も望まれ得る。同様に、「配列同一性パーセント」は、タンパク質の全長にわたるアミノ酸配列又はその断片について容易に決定することができる。好適には、断片は、少なくとも約 8 アミノ酸長であり、最大で約 700 アミノ酸長であり得る。好適な断片の例は、本明細書に記載されている。

40

#### 【0115】

「高度に保存された」という用語は、少なくとも 80 % の同一性、好ましくは少なくとも 90 % の同一性、より好ましくは 97 % を超える同一性を意味する。同一性は、当業者に既知のアルゴリズム及びコンピュータプログラムを用いることによって、当業者によって容易に決定される。

#### 【0116】

上限範囲で特に明記しない限り、同一性のパーセンテージは、同一性の最小レベルであり、参照配列に対して最大 100 % の同一性までの全てのより高いレベルを包含すること

50

が理解されるであろう。特に明記しない限り、同一性のパーセンテージは、同一性の最小レベルであり、参照配列に対して最大100%の同一性までの全てのより高いレベルを包含することが理解されるであろう。例えば、「95%の同一性」及び「少なくとも95%の同一性」は、互換的に使用され得、参照配列に対する95、96、97、98、99、最大100%までの同一性、及びそれらの間の全ての画分を含む。

#### 【0117】

特に明記しない限り、数値は、従来の数学的ラウンディング規則に従うものと理解されるであろう。

#### 【0118】

一般的に、2つの異なるアデノ随伴ウイルス間の「同一性」、「相同性」、又は「類似性」について言及する場合、「同一性」、「相同性」、又は「類似性」は、「整列された」配列を参照して決定される。「整列された」配列又は「整列」とは、複数の核酸配列又はタンパク質（アミノ酸）配列を指し、参照配列と比較して、多くの場合、欠損又は追加の塩基又はアミノ酸についての補正を含む。実施例では、公開されたAAV9配列を参照点として使用してAAV整列を行う。整列は、公共の又は市販のいずれかの様々な多重配列整列プログラムを用いて行われる。かかるプログラムの例としては、インターネット上のウェブサーバを通してアクセス可能な「Clustal Omega」、「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「MAP」、及び「MEME」が挙げられる。かかるプログラムの他の源は、当業者に既知である。代替的に、Vector NTIユーティリティもまた使用される。また、当該技術分野で既知のいくつかのアルゴリズムが存在し、上に記載のプログラムに含まれるものを含め、ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用することができる。別の例として、ポリヌクレオチド配列は、GCGバージョン6.1のプログラムであるFasta（商標）を用いて比較することができる。Fasta（商標）は、照会配列（query sequence）及び検索配列（search sequence）の間の最良の重複領域の整列及びパーセント配列同一性を提供する。例えば、核酸配列間のパーセント配列同一性は、GCGバージョン6.1（参照により本明細書に組み込まれる）に提供されるように、Fasta（商標）をそのデフォルトパラメータ（ワードサイズ6及びスコアリングマトリックスのためのNOPAM因子）とともに使用して決定することができる。「Clustal Omega」、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、及び「Match-Box」プログラムなどの多重配列整列プログラムもまた、アミノ酸配列に対して利用可能である。一般的に、これらのプログラムのうちのいずれかをデフォルト設定で使用するが、当業者は、これらの設定を必要に応じて変更することができる。代替的に、当業者は、別のアルゴリズム又はコンピュータプログラムを利用することができ、参照のアルゴリズム及びプログラムによって提供されるように、少なくとも同一性のレベル又は整列が提供される。例えば、J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13): 2682-2690 (1999)を参照されたい。

#### 【0119】

「a」又は「an」という用語は、1つ以上を指すことに留意されたい。したがって、「a」（又は「an」）、「1つ以上（one or more）」、及び「少なくとも1つ（at least one）」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

#### 【0120】

「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、及び「含んでいる（comprising）」という用語は、排他的ではなく包括的に解釈されるべきである。「なる（consist）」、「なっている（consisting）」という用語、及びその変形は、包括的ではなく排他的に解釈されるべきである。本明細書の様々な実施形態は、「含む（comprising）」という言葉を用いて示されているが、他の状況では、関連する実施形態は、「からなる（consisting of）」又は「本

10

20

30

40

50

質的にからなる ( c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f ) 」という言葉を用いて解釈及び記載されるべきことも意図される。

【 0 1 2 1 】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特に明記しない限り、与えられた参照から 10 % ( ± 10 %、例えば、± 1、± 2、± 3、± 4、± 5、± 6、± 7、± 8、± 9、± 10、又はそれらの間の値 ) の可変性を意味する。

【 0 1 2 2 】

本明細書で使用される場合、「疾患」、「障害」、及び「状態」は、対象における異常な状態を示すために互換的に使用される。

【 0 1 2 3 】

本明細書で使用される場合、「CMT2A 関連症状」又は「症状」という用語は、CMT2A 患者及び CMT2A 動物モデルで見られる症状を指す。CMT の初期症状には、ぎこちなさ、足の拾い上げの問題による歩行のわずかな困難、足の筋肉の弱さ、疲労、反射の欠如のうちの 1 つ以上が含まれ得る。CMT2A の一般的な症状には、足の変形 ( 非常に高いアーチ型の足 ( f o o t ) / 足 ( f e e t ) )、足首で足を持ち上げることが困難 ( 足の降下 )、つま先の丸まり ( ハンマートゥとして知られている )、ふくらはぎの痩せにつながる下肢の筋肉の喪失、足若しくは手の痺れ又は灼熱感、歩くときの「スラッピング」 ( 歩くときに足が床に激しく当たる )、腰、脚、又は足の衰弱、脚及び手の痙攣、バランスの喪失、つまずき、転倒、物体をつかみ、保持することが困難、ピン及びボトルを開けるのが困難、疼痛 ( 神経痛及び関節痛の両方 ) が含まれる。CMT2A の後期症状には、例えば、腕及び手における類似の症状、脊椎の湾曲 ( 脊柱側弯症 ) が含まれ得る。CMT2A の他の報告された / 既知の症状には、例えば、発話及び嚥下困難、呼吸困難、特に横たわっているときの呼吸困難、難聴、視力低下、声帯麻痺が含まれ得る。

【 0 1 2 4 】

本明細書で使用される「患者」又は「対象」は、臨床研究に使用される男性又は女性のヒト、及び動物モデル ( 例えば、イヌ、非ヒト霊長類、齧歯類、又は他の好適なモデルを含む ) を意味する。一実施形態では、これらの方法及び組成物の対象は、CMT2A と診断されたヒトである。特定の実施形態では、これらの方法及び組成物のヒト対象は、出生前、新生児、乳児、幼児、未就学児、小学生、十代、若年成人、又は成人である。更なる実施形態では、これらの方法及び組成物の対象は、小児 CMT2A 患者である。

【 0 1 2 5 】

本明細書で使用される場合、「治療レベル」という用語は、健康な対照の少なくとも約 5 %、約 8 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 100 %、100 % 超、約 2 倍、約 3 倍、又は約 5 倍の M f n 2 活性を意味する。h M f n 2 の活性を測定するための好適なアッセイは、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、1 つ以上のサブユニットタンパク質のかかる治療レベルは、CMT2A 関連症状の緩和、特定の CMT2A 関連症状の逆転、及び / 若しくは CMT2A 関連症状の進行の予防、又はそれらの任意の組み合わせをもたらし得る。特定の実施形態では、本明細書で提供する組成物及びレジメンによって送達されるヒト M f n 2 は、機能的内因性野生型タンパク質のアミノ酸配列を有する。特定の実施形態では、配列は、配列番号 19 のアミノ酸配列、又は機能的ヒト M f n 2 タンパク質と約 95 ~ 100 % 同一である機能的タンパク質である。

【 0 1 2 6 】

「発現」という用語は、本明細書で最も広い意味で使用され、RNA 又は RNA 及びタンパク質の産生を含む。RNA に関して、「発現」又は「翻訳」という用語は、特に、ペプチド又はタンパク質の産生に関する。発現は、一過性又は安定であり得る。

【 0 1 2 7 】

加えて、任意に、発現カセット ( 及びベクターゲノム ) は、例えば、d r g 毒性及び / 又は軸索障害を低減するために、UTR 内に 1 つ以上の後根神経節 ( d r g ) - m i R N

10

20

30

40

50

A 標的配列を含み得る。例えば、2019年12月20日に出願され、現在WO2020/132455として公開されている、PCT/US2019/67872、2020年5月12日に出願された、米国仮特許出願第63/023593号、及び2020年6月12日に出願された、米国仮特許出願第63/038488号を参照されたく、全てが「Compositions for Drg-Specific Reduction of Transgene Expression」と題され、その全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、発現カセットは、遺伝要素（例えば、プラスミド）を介してパッケージング宿主細胞に送達され、ウイルスベクター（例えば、ウイルス粒子）のカプシドへパッケージングされ得る。

#### 【0128】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、目的の遺伝子に連続している発現制御配列、及びトランスで又は離れて作用して目的の遺伝子を制御する発現制御配列の両方を指す。

#### 【0129】

タンパク質又は核酸を参照して使用される場合、「異種性」という用語は、タンパク質又は核酸が、天然では互いに同じ関係で見出されない、2つ以上の配列又は部分配列を含むことを示す。例えば、新規の機能的核酸を作製するために配置された関連のない遺伝子からの2つ以上の配列を有する核酸は、典型的に、組換えにより産生される。例えば、一実施形態では、核酸は、ある遺伝子由来のプロモーターを有し、異なる遺伝子由来のコード配列の発現を指示するように配置される。故に、コーディング配列に関しては、プロモーターは、異種性である。

#### 【0130】

本明細書に記載される場合、調節要素は、限定されないが、プロモーター、エンハンサー、転写因子、転写終結因子、スプライシング及びポリアデニル化シグナル（ポリA）などの効率的なRNAプロセッシングシグナル、細胞質mRNAを安定化させる配列、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHP）転写後調節因子（WP RE）、翻訳効率を向上させる配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）を含む。

#### 【0131】

本発明の文脈における「翻訳」という用語は、リボソームでのプロセスに関し、mRNA鎖は、アミノ酸配列の集合を制御して、タンパク質又はペプチドを生成する。

#### 【0132】

操作hMfn2コード配列を含む発現カセット、例えば、Syn.PI.hMfn2eng.link.hMfn2.miR1693.WPRE.BGH（配列番号1のnt223~4455）；CB7.CI.hMfn2.GA.RBG（配列番号79のnt259~4370）；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG（配列番号77のnt259~4710）；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG（配列番号75のnt259~4626）；CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40（配列番号73のnt192~4262）；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40（配列番号71のnt192~4474）；及びCAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40（配列番号69のnt192~4474）が本明細書に提供される。

#### 【0133】

操作rMfn2コード配列を含む発現カセット、例えば、Syn.PI.rMfn2eng.link.rMfn2.miR1518.WPRE.BGH（配列番号3のnt223~4430）が本明細書に提供される。

#### 【0134】

本明細書で別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、当業者によって、及び本明細書で使用されている多数の用語に対して当業者に一般的な手引きを提供する公開された文書を参照することによって、一般的に理解されているものと

10

20

30

40

50

じ意味を有する。

【 0 1 3 5 】

以下の実施例は、例示的なものに過ぎず、本発明を限定することを意図するものではない。

【 実施例 】

【 0 1 3 6 】

以下の実施例は、例示的なものに過ぎず、本発明を限定することを意図するものではない。

【 0 1 3 7 】

シャルコー・マリー・トゥース神経障害 2 A 型 ( C M T 2 A ) は、ミトコンドリア融合及び軸索に沿った輸送に必要なタンパク質であるマイトフュージン 2 ( M f n 2 ) をコードする遺伝子の変異によって引き起こされる。ほとんどの場合、C M T 2 A は、優性阻害様式で作用する常染色体優性ミスセンス変異によって引き起こされる。稀に、C M T 2 A は、劣性機能喪失変異によって引き起こされる。M f n 2 変異は、後根神経節 ( D R G ) の下位運動ニューロン及び一次感覚ニューロンに対して選択的に毒性である。

【 0 1 3 8 】

遺伝子療法は、M f n 2 の過剰発現によってマイトフュージン 2 発現を回復し、変異体 M f n 2 の優性阻害活性を克服するために開発された。A A V 遺伝子療法技術は、M f n 2 発現カセットをニューロンに移送するために使用される。いくつかの実施形態では、M f n 2 発現カセットは、リンカーを介して連結される m i R N A を含み、m i R N A は、変異体 ( 欠損 ) M f n 2 をロックダウンして、変異体 M f n 2 を排除し、正常なマイトフュージン 2 タンパク質を供給することを標的とする。治療物の注入は、大槽内 ( I C M ) を介して、又は静脈内に送達される。A A V の I C M 送達は、下位運動ニューロン及び一次感覚ニューロンを効率的に標的とする。操作 M f n 2 遺伝子を含む、M f n 2 発現カセットは、ヒトでの発現用に高度に最適化され、高度に改善された中枢神経系 ( C N S ) 形質導入を伴う A A V カプシドと組み合わせて使用された。

【 0 1 3 9 】

実施例 1 : C M T 2 A ベクター戦略

A A V 導入遺伝子カセット戦略 1 では、プロモーター、イントロン、操作 M f n 2 c D N A 、及びポリ A を含む M f n 発現カセットを作製した。A A V 導入遺伝子カセット戦略 2 では、プロモーター、イントロン、操作 M f n 2 c D N A を含む M f n 2 発現カセットを作製し、これは、m i R N A 、内因性変異体 M f n 2 及びポリ A を標的とする m i R N A に対する発現及び耐性を最適化するように操作した。加えて、A A V 導入遺伝子戦略 2 では、構築物を、インビボでの m i R N A 及び c D N A の効率的な発現のために特定し、構築物は、シナプシンプロモーター、c D N A ( 操作 M f n 2 ) 、リンカー、m i R N A ( m i R N A は、c D N A の 3 ' 末端に位置する ) 、W R P E エンハンサー、及びポリ A ( データは示さず ) を含む。

【 0 1 4 0 】

内因性 M f n 2 遺伝子をロックダウンするために、様々な m i R N A 配列、様々な m i R N A 配列を調査し、データは示されないが、とりわけ、m i R 2 3 8 、m i R 1 2 0 2 、m i R 1 5 1 8 、及び m i R 2 2 8 2 を調査した。ウエスタンブロット分析のために、ラット B 1 0 4 細胞を、C M V プロモーターを含むインビトロ B l o c k - i T プラスミド ( T h e r m o F i s h e r ) でトランスフェクトした。e m G F P 導入遺伝子、m i R N A 及び T K ポリ A のクローニングサイト、m i R N A を、B l o c k - i T オンラインソフトウェアを使用して設計した。細胞をトランスフェクトし、プラスチジンでの発現のために選択した。生存細胞は、G F P に対して大部分が陽性であり、トランスフェクション全体の効率が決定され得る。B 1 0 4 細胞を 7 2 時間後に収集し、ウエスタンブロット分析のために調製した。ウエスタンブロットは、負荷対照として、M f n 2 及び b - アクチンに対する抗体でプローブした。図 1 A 及び図 1 B は、m i R N A の A A V 媒介送達の静脈内投与後の B 6 マウスのマウス脳 ( 図 1 A ) 及び脊髄 ( 図 1 B ) における、q P C

10

20

30

40

50

Rによって測定した内因性Mfn2 RNAのノックダウンを示す。投与後14日目にマウスを剖検し、その後、脳及び脊髄組織を採取し、均質化した。RNAを試料から抽出し、Mfn2に対するTaqManプライマーでのqPCRに使用した。4つの治療群を調査した(群当たりN=5): PBS、AAV9-PHP.eB.CB7.mir-NT(3×10<sup>11</sup> GCの用量での非標的)、AAV9-PHP.eB.CB7.mir-1518(3×10<sup>11</sup> GCの用量で)、及びAAV9-PHP.eB.CB7.mir-1202(3×10<sup>11</sup> GCの用量で)。調査した配列のうち、mir1518が、内因性Mfn2の最良のノックダウンを示した。

#### 【0141】

図2A~図2Cは、ラットMfn2(rMfn2)cDNA導入遺伝子及びmir1518を含むAAVベクターの送達後のMfn2 RNA倍率発現を示し、AAVベクターは、3×10<sup>11</sup> GCの用量でマウスに静脈内投与した。投与後14日目にマウスを剖検し、その後、脳及び脊髄組織を採取し、均質化した。RNAを試料から抽出し、Mfn2に対するTaqManプライマーでのqPCRに使用した。2つの治療群を調査した(群当たりN=5): PBS及びAAV9-PHP.eB.CB7.mir-1518+rMfn2。 10

#### 【0142】

実施例2: miRNAを含む操作Mfn2導入遺伝子の発現カセットを含むAAVベクターのマウス研究

最初の研究では、野生型マウスに、操作ラットMfn2(rMfn2)cDNA核酸配列(配列番号12)及びmiRNA1518(配列番号16)を含む3×10<sup>11</sup> GCのAAVベクターを静脈内注入した。4つの治療群を調査した(群当たりN=5): PBS、AAV9-PHP.eB.CAG.rMfn2.opt.link.rMfn2.mir1518.WPRE.SV40、AAV9-PHP.eB.CB7.CI.rMfn2.opt.link.rMfn2.mir1518.rBG、及びAAV9-PHP.eB.hSyn.PI.rMfn2.opt.link.rMfn2.mir1518.WPRE.bGH(ベクターゲノムは配列番号3のものである)。マウスを注入から14日後に安楽死させた。脳及び脊髄を採取し、均質化した。RNAを試料から抽出し、ラットMfn2操作cDNAに対するTaqManプライマーでのqPCRに使用した。図4は、mir1518を用いた操作rMfn2 cDNA導入遺伝子のAAVベクター送達後の処理マウスの脊髄におけるラットMfn2(rMfn2)cDNA発現の倍率発現のプロット定量化を示す。 20 30

#### 【0143】

更なる試験では、野生型マウスに、操作ヒトMfn2(hMfn2)cDNA核酸配列(配列番号11)及びmiRNA1693(配列番号15)を含む3×10<sup>11</sup> GCのAAVベクターを静脈内注入した。4つの治療群を調査した(群当たりN=5): PBS、AAV9-PHP.eB.CAG.hMfn2.opt.link.hMfn2.mir1693.WPRE.SV40、AAV9-PHP.eB.CB7.CI.hMfn2.opt.link.hMfn2.mir1693.rBG、AAV9-PHP.eB.hSyn.PI.hMfn2.opt.link.hMfn2.mir1693.WPRE.SV40(ベクターゲノムは配列番号1のものである)。マウスを注入から14日後に安楽死させた。脳及び脊髄を採取し、均質化した。RNAを試料から抽出し、ヒトMfn2操作cDNAに対するTaqManプライマーでのqPCRに使用した。図5は、mir1693を用いた操作hMfn2 cDNA導入遺伝子のAAVベクター送達後の処理マウスの脊髄におけるヒトMfn2(hMfn2)cDNA発現の倍率発現のプロット定量化を示す。 40

#### 【0144】

ヒト及びラットMfn2の発現を調査する研究の両方において、送達されたAAVベクターの中で、CB7、CAG、及びニューロン特異的ヒトシナプシン(hSyn)などの様々なプロモーターを調査した。hSynプロモーターを含むAAVベクターは、脊髄組織においてMfn2 cDNAの最も高い倍率発現を示した。

## 【0145】

更に、AAVベクターからプロセシングされた成熟miRNAの総量を、Chen et al., Real-time quantification of micro-RNAs by stem-loop RT-PCR, Nucleic Acid Research, 2005, 33(20)に開示される確立された手順を使用して調査した。野生型マウスに、 $3 \times 10^{11}$  GCのAAVベクター又は対照群のPBSを静脈内注入した。治療群1のAAVゲノムベクターは、リンカー（配列番号17）を介してmiRNA1693（配列番号15）と連結される操作ヒトMfn2（hMfn2）cDNA核酸配列（配列番号11）を更に含む、miR1693（配列番号1）を含むhMfn2の発現カセットを含む。リンカー（配列番号17）を介してmiRNA1518（配列番号16）と連結される操作ラットMfn2（rMfn2）cDNA核酸配列（配列番号12）を更に含む、miR1518（配列番号3）を含むrMfn2の発現カセットを含む治療群2のAAVベクター。治療後、マウスを注入から14日後に安楽死させた。脳及び脊髄を採取し、均質化した。RNAを試料から抽出し、カスタムmiRNAアッセイに使用した。カスタムmiRNAアッセイは、cDNAを作製するためのカスタムステムループRTプライマー、次いでmiRNAを増幅するためのカスタムスモールRNA：ステムループTaqManプライマーからなる。このアッセイは、ベクターから処理される成熟miRNAの総量を測定する。図6A及び図6Bは、マウスにおける静脈内送達後のAAVベクターからプロセシングされた成熟miRNAの総量を示す。

10

## 【0146】

20

要約すると、hSynプロモーター（配列番号6）は、最大の脊髄発現のための最良のプロモーターであるようである。「連結」（「リンカー」の場合）を含むAAVベクターは、適切なmiRNA切除及びRNAiのプロセシングに必要な、cDNAとmiRNAとの間の重要なスペーサーである。クローニングが容易であるため、より小さなリンカーを試したが、機能的ではなかった。qPCR分析は、内因性変異体Mfn2を標的とするmiRNAと共送達した場合に、ラットMfn2及びヒトMfn2の適切な発現を示唆する。

## 【0147】

実施例3．HEK293及びMfn2欠損細胞におけるAAVベクターのトランスフェクション効率

30

この研究では、以下の表3に列挙されるように、ヒトMfn2操作配列の導入遺伝子を含む様々なAAVベクターを生成して調査した。

## 【表3】

表3.

AAVベクター	配列番号 (AAVベクター)
CB7.CI.hMfn2.GA.RBG	79
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG	77
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG	75
CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40	73
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40	71
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40	69

40

## 【0148】

Mfn2欠損MEFは、ベクターにおけるMfn2 cDNAの発現を検出するために

50

使用した、M f n 2 を欠くマウス細胞株である。加えて、M f n 2 を発現するヒト細胞株である H E K 2 9 3 細胞を、上記で特定したベクターを用いたトランスフェクションで使用した。トランスフェクション後の細胞溶解物を、ウエスタンブロットを介した全体的な M f n タンパク質発現、q P C R を介した内因性 M f n 2 ノックダウン、及び q P C R を介した m i R N A の存在について分析した。ウエスタンブロット定量を、W E S プラットフォームを用いて実施した。M f n 2 欠損 M E F 細胞における M f n 発現の分析は、細胞株が M f n 2 発現を欠くため、ベクターによって産生される M f n 2 タンパク質のみを定量化した。q P C R m i R N A 検出アッセイでは、ステムループプライマーを成熟 m i R N A の逆転写 ( R T ) に使用し、T a q M a n プローブセットを成熟 m i R N A の増幅に使用して、m i R N A の発現及び / 又はプロセッシングを示した。内因性ヒト M f n 2 ノックダウンを測定するための q P C R では、H E K 2 9 3 内因性 M f n 2 とベクター M f n 2 とを識別する T a q M a n プライマー / プローブセットを使用した。W e s 系 M f n 2 タンパク質の定量化及び M f n 2 に対する抗体は、内因性及びベクター産生 M f n 2 と交差反応するため、全体的な M f n 2 過剰発現を調査するために使用した。

10

#### 【 0 1 4 9 】

図 7 は、C B 7 プロモーターを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の M f n 2 欠損 M E F 細胞株における M f n 2 の発現レベルを示す。更に、図 7 は、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . R B G ( p 6 1 6 5 )、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . R B G ( p 6 1 6 6 )、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . R B G ( p 6 1 6 7 ) でトランスフェクションした後のマイトフュージン 2 ( M f n 2 ) の発現を測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量を示す。定量は、発現パーセントとしてプロットし、トランスフェクション効率は、フローサイトメトリーによって測定し、目視観察によって近似されるように、約 4 0 % であると決定した。M f n 2 の発現レベルについて調査したウエスタンブロット ( データは示さず ) では、b - アクチンを負荷対照として使用した ( M f n 2 : 2  $\mu$  g 負荷 ; b - アクチン : 0 . 2 7  $\mu$  g 負荷 ; 定量に使用した曝露は 4 秒 )。

20

#### 【 0 1 5 0 】

図 8 は、C A G プロモーターを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の M f n 2 欠損 M E F 細胞株における M f n 2 の発現レベルを示す。更に、図 8 は、C A G . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 6 8 )、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 6 9 )、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 7 0 ) でトランスフェクションした後のマイトフュージン 2 ( M f n 2 ) の発現を測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量を示す。定量は、発現パーセントとしてプロットし、トランスフェクション効率は、フローサイトメトリーによって測定し、目視観察によって近似されるように、約 4 0 % であると決定した。M f n 2 の発現レベルについて調査したウエスタンブロットでは、b - アクチンを負荷対照として使用した ( M f n 2 : 2  $\mu$  g 負荷 ; b - アクチン : 0 . 2 7  $\mu$  g 負荷 ; 定量に使用した曝露は 4 秒 )。

30

#### 【 0 1 5 1 】

図 9 A 及び図 9 B は、C B 7 又は C A G プロモーターのいずれかを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の H E K 2 9 3 細胞株における M f n 2 の発現レベルを示す。高いトランスフェクション効率が観察された。図 9 A は、C B 7 プロモーターを含む様々なベクター ( C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . R B G ( p 6 1 6 5 )、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . R B G ( p 6 1 6 6 )、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . R B G ( p 6 1 6 7 ) ) でトランスフェクションした後の、q P C R によって測定され、倍率発現としてプロットされた、H E K 2 9 3 細胞における内因性 M f n 2 ノックダウンを示す。図 9 B は、C A G プロモーターを含む様々なベクター ( C A G . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 6 8 )、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 6 9 )、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R

40

50

538 . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 7 0 ) ) でトランスフェクションした後の、q P C Rによって測定され、倍率発現としてプロットされた、H E K 2 9 3細胞における内因性 M f n 2 ノックダウンを示す。

#### 【0152】

図10は、C B 7プロモーターを含む様々なベクターでトランスフェクションした後のH E K 2 9 3細胞株におけるM f n 2 (内因性M f n 2及びベクターから発現されたM f n 2)の発現レベルを示す。更に、図10は、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . R B G ( p 6 1 6 5 )、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . R B G ( p 6 1 6 6 )、C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . R B G ( p 6 1 6 7 )でトランスフェクションした後のマイトフュージン2 ( M f n 2 )の発現を測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量を示す。定量は、パーセント発現としてプロットされ、トランスフェクション効率は、約95%であると決定された。M f n 2の発現レベルについて調査したウエスタンブロットでは、b - アクチンを負荷対照として使用した ( M f n 2 : 0 . 7 8 μ g 負荷 ; b - アクチン : 0 . 7 8 μ g 負荷 ; 定量に使用した曝露は4秒 )。

10

#### 【0153】

図11は、C A Gプロモーターを含む様々なベクターでトランスフェクションした後のH E K 2 9 3細胞株におけるM f n 2 (内因性M f n 2及びベクターから発現されたM f n 2)の発現レベルを示す。更に、図11は、C A G . C I . h M f n 2 . G A . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 6 8 )、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 1 5 1 8 . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 6 9 )、C A G . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . W P R E . S V 4 0 ( p 6 1 7 0 )でトランスフェクションした後のマイトフュージン2 ( M f n 2 )の発現を測定するウエスタンブロットシグナルのプロット定量を示す。定量は、パーセント発現としてプロットされ、トランスフェクション効率は、約95%であると決定された。M f n 2の発現レベルについて調査したウエスタンブロットでは、b - アクチンを負荷対照として使用した ( M f n 2 : 0 . 7 8 μ g 負荷 ; b - アクチン : 0 . 7 8 μ g 負荷 ; 定量に使用した曝露は4秒 )。

20

#### 【0154】

図12A~図12Cは、C B 7又はC A Gプロモーターのいずれかを含む様々なベクターでトランスフェクションした後の、M f n 2欠損M E F細胞株における成熟m i R N A ( m i R 1 5 1 8又はM i R 5 3 8 )をq P C Rによって測定された発現レベルを示す。図12Aは、C B 7又はC A Gプロモーターのいずれかを含むベクターでトランスフェクションした後の、M f n 2欠損M E F細胞株における成熟m i R 1 5 1 8の、q P C Rによって測定され、倍率発現としてプロットされた発現レベルの比較を示す。図12Bは、C B 7又はC A Gプロモーターのいずれかを含むベクターでトランスフェクションした後の、M f n 2欠損M E F細胞株における成熟m i R 5 3 8の、q P C Rによって測定され、倍率発現としてプロットされた発現レベルの比較を示す。図12Cは、C B 7又はC A Gプロモーターのいずれかを含むベクターでトランスフェクションした後の、M f n 2欠損M E F細胞株における成熟m i R 1 5 1 8及びm i R 5 3 8の、q P C Rによって測定され、倍率発現としてプロットされた発現レベルの比較を示す。

30

40

#### 【0155】

実施例4 . M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup>マウス ( C 5 7 B L / 6 J - T g ( T h y 1 - M F N 2 \* )、シャルコー・マリー・トゥース病2A型のモデルにおける有効性についての遺伝子治療ベクター

7匹のヘミ接合性雄M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup>マウス ( C 5 7 B L / 6 J - T g ( T h y 1 - M F N 2 \* ) 4 4 B a l o / J、J A Xストック# 0 2 9 7 4 5 )、2匹の雄C 5 7 B L / 6 Jマウス ( J A Xストック# 0 0 0 6 6 4 )、及び18匹 ( 1 8 )の雌C 5 7 B L / 6 Jマウス ( J A Xストック# 0 0 0 6 6 4 )を、メイン州バーハーバーのインピボ研究実験室に移した。マウスは識別のために耳に切り込みを入れ、遺伝子型を確認し、ケージ当たり3匹のマウス ( 2匹の雌及び1匹の雄 )の密度で、H E P Aフィルター処理された空

50

気で個別に及び積極的に換気されたポリスルホネートケージに収容した。動物室は人工蛍光灯で全体を照らし、12時間の明暗サイクル（午前6時～午後6時までの照明）を制御した。動物室における正常温度及び相対湿度の範囲は、それぞれ  $22 \pm 4$  及び  $50 \pm 15\%$  であった。動物室は、1時間に15回の空気交換があるように設定した。2.5～3.0のpHに酸性化した、濾過した水道水、及び通常の齧歯類固形飼料は、自由摂食で提供された。マウスを繁殖動物として使用して、10匹の雄C57BL/6Jマウス及び60匹の雄ヘミ接合性MFN2<sup>R94Q</sup>マウスの研究コホートを2ラウンドの繁殖で育てた。P0～P1で、合計70（70）匹のマウスを研究に登録した。

#### 【表4】

10

表4.

群	マウス数	遺伝子型	化合物	投薬の週齢	投薬経路	投薬頻度	組織収集
1	10	WT	ビヒクル	P0~P1	ICV注入	単一用量	脊髄
2	10	HEMI	ビヒクル				
3	10	HEMI	ベクター1				脛骨神経
4	10	HEMI	ベクター2				
5	10	HEMI	ベクター3				
6	10	HEMI	ベクター4				
7	10	HEMI	ベクター5				
合計	70						

20

#### 【0156】

図13A～図13Fは、マウスモデルの特徴付けを示す。図13Aは、マウス遺伝子型の模式図を示す。図13Bは、ウエスタンブロッティングによって測定された、脳における内因性及びFLAGタグ付きMFN2の相対発現レベルによって特徴付けられる、マウスの表現型特徴付けを示す。図13Cは、ウエスタンブロッティングによって測定された、脊髄における内因性MFN2及びFLAGタグ付きMFN2の相対発現レベルによって特徴付けられる、マウスの表現型特徴付けを示す。図13Dは、CMT2Aマウスモデル（nTg、MFN2<sup>WT</sup>、及びMFN2<sup>R49Q</sup>）におけるマウスの測定された体重（g）を示す。図13Eは、落下までの時間（秒）によって測定されたマウス表現型の特徴付けを示す。図13Fは、握力（g）によって測定されたマウス表現型の特徴付けを示す。

30

#### 【0157】

この研究では、マウスは、上記の表4に従って、新生仔ICV注入によってP0～P1で投与した。マウスの体重を毎週測定した。15～17週齢で、以下の試験を各マウスで実施した：ロータロッド試験、握力試験、視力試験（視動性応答）、任意の手順。加えて、複合筋活動電位（CMAP）試験を実施した。17～19週齢で、マウスを剖検し、以下の組織を収集した：脊髄、脛骨神経。収集した組織をEM固定剤に固定し、エポキシ樹脂に包埋した。1つの切片を各組織から切断した。切片をトルイジンブルーで染色した。染色したスライドをスキャンした。スキャンした各切片について、以下のパラメータを決定した：軸索サイズ分布、軸索数、軸索領域。次いで、軸索面積分布を、各群についてプロットした。

40

#### 【0158】

薬理学的試験において、第1のコホートについて、1群当たり4～7匹のマウスを使用した。研究は盲検試験であった。簡潔に述べると、雄MFN2<sup>R94W</sup>マウスを、候補A

50

A V h u 6 8 ベクターが投与された治療群で使用した。新生仔 I C V 注入を投与経路として使用し、 $3 \mu\text{L}$  の  $7.5 \times 10^{10}$  G C A A V ベクターを両側投与した。体重は毎週測定した。握力は 6 週間で測定した。図 1 4 A 及び図 1 4 B は、M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup> マウスにおけるパイロット薬理学試験の結果を示す（試験群：G 1 - 野生型 (W T) マウス、P B S ; G 2 - M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup> マウス、P B S ; G 3 - M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup> マウス、C B 7 . M F N 2 ; G 4 - M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup> マウス、C B 7 . M F N 2 . m i R 1 5 1 8 ; G 5 - M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup> マウス、C B 7 . M F N 2 . m i R 5 3 8 ; G 6 - M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup> マウス、C A G . M F N 2 . m i R 1 5 1 8 ; G 7 - M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup> マウス、C A G . M F N 2 . m i R 5 3 8 )。図 1 4 A は、マウス群 G 1 ~ G 7 において測定された体重の結果 ( ( g ) ) としてプロットされる)を示す。図 1 4 B は、マウス群 G 1 ~ G 7 において測定された生存の結果 ( 0 ~ 5 0 日にわたる生存確率としてプロットされる)を示す。図 1 5 は、M F N 2 <sup>R 9 4 Q</sup> マウスにおけるパイロット薬理学試験の握力の結果 ( ( k g ) ) としてプロットされる)を示す。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 5 9 】

実施例 5 . h M f n 2 及び内因性 h M f n 2 を標的とする m i R を共投与する A A V ベクター

本試験では、A A V h u 6 8 . C B 7 . C I . h M f n 2 . m i R 5 3 8 . R B G ( A A V h u 6 8 . C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . R B G とも称される)ベクターは、単一の注入からの広範な分布を達成するために脳脊髄液 ( C S F ) を利用して、大槽内 ( I C M ) 注入を介して、アカゲザル ( M a c a c a m u l a t t a ) 又はカニクイザル ( 非ヒト霊長類 ( N H P ) ) に投与した。

#### 【 0 1 6 0 】

試験物質。A A V h u 6 8 . C B 7 . C I . h M f n 2 . G A . L I N K . m i R 5 3 8 . R B G を本試験で使用する。試験物質の品質及び純度を検証する分析証明書が最終試験報告に含まれるであろう。

#### 【 0 1 6 1 】

調製。試験物質希釈物の計算は、希釈を行う前に、訓練された G T P 担当者によって実施し、検証した。試験物質希釈物は、注入の日に指定された担当者によって実施した。試験物質希釈物は、追加の指定された担当者によって検証した。希釈した試験物質は、注入まで最大 8 時間、湿った氷上又は 2 ~ 8 °C で保たれる。

#### 【 0 1 6 2 】

保存記録試料。試験及び対照物質の保存記録試料は、指定された担当者によって保持され、 - 6 0 °C で保管した。

#### 【 0 1 6 3 】

試験物質分析。指定された担当者は、試験物質がリリース要件を満たしていることを保証する責任がある。分析証明書は、試験記録に含めるために V e c t o r C o r e によって提供される。全ての結果が記録される。データのコピーは、研究ノートに含めるために提供される。

#### 【 0 1 6 4 】

未使用試験物質。N P R P 担当者に提供された未使用試験物質は、保管するために返却される前に、湿った氷上に保管した。保存記録試料は、 - 6 0 °C で保管した。

#### 【 0 1 6 5 】

試験系。アカゲザル ( M a c a c a m u l a t t a ) 又はカニクイザルを本試験で使用する。

#### 【 0 1 6 6 】

試験系選択についての根拠。この研究は、C N S 疾患のための m i R N A 試験物質 (ベクター) の大槽内 ( I C M ) 送達を含む。N H P における C N S のディメンションは、臨床対象集団の代表的なモデルとして機能を果たす。本試験は、アカゲザルにおける I C M 注入後の用量及び投与経路に関連する薬物動態並びに試験物質の安全性に関する重要なデータを提供する。本研究では、2 匹の動物を使用した。N H P は、雄又は雌、4 ~ 5 歳、

及び約 3 ~ 10 kg から選択した。

#### 【0167】

順応期間及び管理。検疫及び環境順応、動物飼育及び管理は、標準操作 (SOP) 手順書に従って実施した。マカクは CTRB のステンレス鋼ケージに収容した。育及び管理は、DVR 担当者によって提供された。

#### 【0168】

認定霊長類食餌 5048 又は非ヒト霊長類に適切な類似の食事を、研究動物に供給した。水は自動給水システムから入手でき、全てのマカクが自由に利用できる。介入を必要とする任意の状態について、獣医スタッフによってマカクをモニタリングした。試験責任者は、可能な限り相談を受けて適切な行動を決定する。しかしながら、安楽死の可能性を含む緊急事態では、必要に応じて獣医スタッフが決定を下し、試験責任者にできるだけ早く通知した。食料報酬、同種の相互作用、及びマニピュランダの形態での充実度が提供された。動物は、ビルオートメーションによって制御される 12 時間の明/暗サイクルで維持した。所望の温度範囲は、64 ~ 84 °F (18 ~ 29 °C) である。温度は可能な限りこの範囲に維持された。所望の湿度範囲は、30 ~ 70 % である。湿度は可能な限りこの範囲に維持された。各マカクは、供給元によって胸に刺青された固有の識別番号で事前に識別されていた。両方の動物は、単一の治療群に含まれる。

#### 【0169】

試験設計手順。2 匹のアカゲザルを本研究に使用した。両方のマカクは、単一の治療群に含まれる。CSF、CBC、血清化学、及びベースラインバイオマーカー評価を含むベースライン血液試料を、投薬前の 0 日目に、全てのマカクから収集した。また、バイタルも各マカクから取得した。0 日目に、マカクを鎮静化し、試験物質の投与前に、体重測定及びバイタルサインを記録した。

#### 【0170】

試験物質投与 (AAVhu68、CB7、CI、hMfn2、GA、LINK、miR538、RBG) では、マカクを麻酔して、適切な鎮痛剤を SOP に従って投与した。マカクを麻酔して、大槽への後頭下穿刺を介して試験物質を投与した。大槽内 (ICM) 穿刺手順では、麻酔したマカクを、動物維持室から処置室に移し、CSF 収集及び大槽への投薬のために頭を前方に曲げた状態で、側臥位で X 線台上に配置した。注入部位は無菌的に調製した。無菌技法を用いて、21 ~ 27 ゲージ、1 ~ 1.5 インチの Quincke 脊椎ニードル (Becton Dickinson) を、CSF 流れが観察されるまで、後頭下空間へと前進させた。1 mL の CSF を、投与前に、ベースライン分析のために収集した。横切られる解剖構造は、皮膚、皮下脂肪、硬膜外腔、硬膜、及び環椎後頭筋膜を含む。ニードルを、血液の汚染及び潜在的な脳幹損傷を回避するために、より広範囲の大槽の上部空隙へ指向した。ニードル穿刺の正確な配置を、透視装置 (OEC9800 C-Arm、GE) を用いる脊椎造影法により確認した。CSF 収集の後、小口径 T 延長カテーテルを脊椎ニードルと接続して、イオヘキソール (商標名: Omnipaque 180 mg/mL, General Electric Healthcare) 造影剤及び試験物質の投薬を容易にする。最大 2 mL のイオヘキソールを、カテーテル及び脊椎ニードルを介して投与した。CSF リターンによるニードルの配置及び蛍光透視法によるニードルの可視化を確認した後、試験物質を含むシリンジを、試験物質を含む可撓性リンカーと接続し、約 2 mL / 分の速度で注入した。投与後、ニードルは除去され、直接的圧力が穿刺部位に適用される。マカクは、 $3 \times 10^{13}$  GC ( $3.33 \times 10^{11}$  GC/g 脳) の用量で試験物質 (AAVhu68、CB7、CI、hMfn2、GA、LINK、miR538、RBG) の ICM 投与を受ける。マカク当たりの総注入量は 1.0 mL である。用量及び体積を、研究記録に文書化した。

#### 【0171】

観察のために、試験スケジュール (表 5) に列挙される選択された時点で、マカクは、バイタルサイン、臨床病理、血清及び CSF の収集を含むがこれらに限定されない、日常的な観察を超える追加のパラメータについてモニタリングした。

## 【 0 1 7 2 】

採血のために、A A V に対する中和抗体、血液学、臨床化学を含む一般的な安全パネルのために、動物の末梢静脈から採血した。採血の手順は、S O P に従って実施した。追加の血液試料を収集して、バイオマーカー（薬理学的マーカー）の変化を測定する。全血球数、血清化学、バイオマーカー、A A V に対する中和抗体のための採血の頻度は、試験プロトコルの試験スケジュール（表 5）に定義されているとおりである。

## 【 0 1 7 3 】

抗体アッセイ（A A V に対する中和抗体、血清）では、血液試料（最大 2 m L）を赤色上部チューブ（血清セパレータの有無にかかわらず）を介して収集し、凝固させ、遠心分離した。試験担当者は血清を分離する。血清を、抗体の各時点について、2 つの個別にマークしたマイクロ遠心チューブ（試験番号、動物 I D、群番号、時点、中和抗体、及び日付でラベル付けした）に分割し、- 6 0 で保存した。

10

## 【 0 1 7 4 】

細胞数及び分画については、分画及び血小板数を伴う全血球数の血液試料を、ラベル付けされたラベンダー色上部チューブ（試験番号、動物 I D、群番号、時点、C B C、及び収集日）に最大 2 m L まで収集し、4 で保存した。血液を、血小板数及び分画を含む血球数を測定するために、一晩かけて A n t e c h D i a g n o s t i c s , I n c .（ラベンダー色上部チューブ用のアイスパック付き）に送付した。赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、白血球数、白血球分画、平均赤血球容積（M C V）、平均赤血球ヘモグロビン（M C H）、赤血球形態について、以下のパラメータを分析した。

20

## 【 0 1 7 5 】

臨床化学については、（最大 2 m L まで）の血液試料をラベル付けされた赤色上部チューブに収集し、凝固させ、遠心分離した。血清を分離し、ラベル付けされたマイクロ遠心チューブ（試験番号、動物 I D、群番号、時点、化学、及び収集日）に入れ、分析のために氷パック上で一晩かけて A n t e c h D i a g n o s t i c s , I n c . に送付した。以下のパラメータを分析した：アルカリホスファターゼ、ビリルビン（合計）、クレアチニン、ガンマ - グルタミルトランスペプチダーゼ、グルコース、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルブミン、アルブミン / グロブリン比（計算値）、アルドラーゼ、血中尿素窒素、カルシウム、塩化物、クレアチニンキナーゼ及びアイソフォーム、グロブリン（総タンパク質からアルブミンを引いたもの = グロブリンとして計算）、乳酸脱水素酵素、リン、無機、カリウム、ナトリウム、総タンパク質。

30

## 【 0 1 7 6 】

バイオマーカー分析では、血液試料（最大 2 m L）を赤色上部チューブ（血清セパレータの有無にかかわらず）を介して収集し、凝固させ、遠心分離した。試験担当者は血清を分離する。次いで、血清を、2 つの個別にマークされたマイクロ遠心チューブ（研究番号、動物 I D、群番号、時点、血清バイオマーカー、及び収集日）に分割した。試料は、- 6 0 で保管した。

## 【 0 1 7 7 】

P B M C / 組織リンパ球単離及び E L I S P O T では、血液試料（6 ~ 1 0 m L）をヘパリンナトリウム（緑色上部チューブ）に収集し、S O P に従って P B M C を単離した。採血チューブには、試験番号、動物 I D、群番号、種、時点、P B M C、及び採血日がラベル付けした。リンパ球を、S O P に従って、脾臓、肝臓、及び骨髓から収集した。カプシド及び導入遺伝子 T 細胞応答の E L I S P O T を、S O P に従って実施した。

40

## 【 0 1 7 8 】

C S F 収集では、最大 1 m L の C S F を分析及びバイオマーカー評価のために収集した。試験 0 日目を含む全ての C S F 収集時点で、マカクを S O P に従って麻酔し、動物維持室から処置室に移し、C S F 収集のために頭を前方に曲げた状態で、側臥位で配置した。後頭部及び頸部にわたる毛を刈った。頭蓋骨及び環椎翼（C 1）の後ろにある後頭隆起を触診した。注入部位は無菌的に調製した。無菌技法を用いて、2 1 ~ 2 7 ゲージ、1 ~ 1

50

．5 インチの Q u i n c k e 脊椎ニードル（B D）又は 2 1 ～ 2 7 ゲージニードルを、C S F 流れが観察されるまで、大槽へと前進させた。横切られる解剖構造は、皮膚、皮下脂肪、硬膜外腔、硬膜、及び環椎後頭筋膜を含む。ニードルを、血液の汚染及び潜在的な脳幹損傷を回避するために、より広範囲の大槽の上部空隙へ指向した。C S F 収集後、ニードルは除去され、直接的圧力が穿刺部位に適用される。試料を、試験番号、動物 I D、群番号、時点、C S F、及び収集日がラベル付けされた滅菌済み 1 . 5 m L エッペンドルフチューブに収集した。試料を湿った氷上に置き、すぐに C S F 臨床病理学（血球数及び分画及び総タンパク質の定量化）及び C S F バイオマーカーのために分割した。C S F を、試験プロトコルの試験スケジュール（表 5）に概説された頻度で収集した。

【 0 1 7 9 】

10

C S F 臨床病理学では、C S F（0 . 5 m L）を、血液細胞数及び分画、及び全タンパク質定量のために、ラベンダー色上部チューブ（試験番号、動物 I D、群番号、時点、C S F 臨床病理学、及び日付でラベル付けした、氷パックを有する）に分割した。

【 0 1 8 0 】

C S F バイオマーカーでは、2 本の滅菌 1 . 5 m L のエッペンドルフチューブに収集した残りの C S F の全て（C S F 臨床病理学のために未使用 - 最大 1 m L）を、8 0 0 g で 5 分間遠心分離した。研究担当者は、上清及びアリコートをクライオバイアル（試験番号、動物 I D、群番号、時点、C S F バイオマーカー、及び収集日でラベル付けした）に単離する。試料は湿った氷上で出荷した。

【 0 1 8 1 】

20

加えて、モニタリングのために選択した全ての日に、任意の血液試料を採取する前に、各マカクを鎮静化させ、体重を測定し、呼吸数及び心拍数をモニタリングし、直腸体温計を介して体温を測定した。P B M C 単離のための血液試料は、室温で輸送した。他の試料は、湿った氷上で輸送した。

【 0 1 8 2 】

以下の表 5 に記載のスケジュールに従って試験を実施した。

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5.

試験の 時点	試料/手順	N
試験0日目	体重、体温、呼吸数、心拍数	2
	バイオマーカー(ベースライン)(RC)	2
	CSF(ベースライン)(CV+LT)	2
	神経学的モニタリング	2
	臨床病理学(ベースライン)(LT、RC)	2
	神経伝導速度検査	2
	抗体(ベースライン)(RC)	2
	免疫学(ベースライン)(PBMC)(GT)	2
	ICMペクター 3x10 <sup>13</sup> GC	2
試験7日目 (±2日)	体重、体温、呼吸数、心拍数	2
	バイオマーカー(RC)	2
	臨床病理学(LT、RC)	2
試験14日目 (±2日)	体重、体温、呼吸数、心拍数	2
	バイオマーカー(RC)	2
	CSF(CV+LT)	2
	臨床病理学(LT、RC)	2
試験21日目 (±2日)	体重、体温、呼吸数、心拍数	2
	バイオマーカー(RC)	2
	臨床病理学(LT、RC)	2
試験28日目 (±2日)	体重、体温、呼吸数、心拍数	2
	バイオマーカー(RC)	2
	臨床病理学(LT、RC)	2
	神経学的モニタリング	2
	神経伝導速度検査	2
終了日35日目 (±2日)	体重、体温、呼吸数、心拍数	2
	神経学的モニタリング	2
	バイオマーカー(RC)	2
	CSF(CV+LT)	2
	臨床病理学(LT、RC)	2

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

試験の 時点	試料/手順	N
	抗体(RC)	2
	免疫学(PBMC)(GT)	2
	神経伝導速度検査	2
	剖検	2
	採取した組織	2

10

【 0 1 8 3 】

マカクの剖検時に、以下の表 6 に記載の組織を収集した。

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 6 組織病理学及び生体内分布のための剖検時に収集される組織

臓器	組織病理学		生体内分布		リンパ球単離	
	Req.	Coll.	Req.	Coll.		
胸のタトゥー	√					
上行大動脈(近位)	√		√			
骨髄、肋骨	√					
骨髄、大腿骨			√		√	
脳右半球 <sup>A</sup>	√					
前頭皮質 <sup>A</sup>			√			
頭頂葉皮質 <sup>A</sup>			√			
側頭皮質 <sup>A</sup>			√			
後頭皮質 <sup>A</sup>			√			
海馬 <sup>A</sup>			√			
小脳 <sup>A</sup>			√			
髄質 <sup>A</sup>			√			
脳神経IX、X、XI	√右及び左					
後根神経節、頸部 <sup>B</sup>	√		√			
後根神経節、胸部 <sup>B</sup>	√		√			
後根神経節、腰部 <sup>B</sup>	√		√			
精巣上体	√右		√左			
眼	√右		√左			
胆嚢	√		√			
心臓 <sup>C</sup>	√		√左心室			
腎臓、右	√		√			
腎臓、左	√		√			
肝臓、左葉	√		√		√	
肝臓、右葉	√		√			
肺、左	√		√			
肺、右	√		√			
リンパ節、頸部深部			√			
リンパ節、下顎	√		√			
リンパ節、腸間膜	√		√			
筋肉、大腿四頭筋	√右		√左			

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

臓器	組織病理学		生体内分布		リンパ球単離	
	Req.	Coll.	Req.	Coll.		
神経、坐骨	√ 右及び左		√ 左			
神経、脛骨	√ 右及び左		√ 左			
神経、腓骨	√ 右及び左		√ 左			
神経、正中近位	√ 右及び左		√ 左			
神経、正中遠位	√ 右及び左					
神経、橈骨	√ 右及び左		√ 左			
神経、腓腹	√ 右及び左		√ 左			
神経、尺骨	√ 右及び左		√ 左			
視神経(CN II)	√ 右		√ 左			
卵巣	√ 右		√ 左			
膵臓	√		√			
下垂体	√		√			
乳房を伴う皮膚	√					
注入部位	√					
脊髄、頸部 <sup>D</sup>	√		√			
脊髄、胸部 <sup>D</sup>	√		√			
脊髄、腰部 <sup>D</sup>	√		√			
脾臓	√		√		√	
精巣	√ 右		√ 左			
胸腺	√		√			
甲状腺 (副甲状腺を伴う)	√ 右		√ 左			
三叉神経節	√ 右		√ 左 <sup>E</sup>			
肉眼的病変 (存在する場合) <sup>F</sup>	√		√			

√＝組織は指定されたアッセイで収集及び処理されるであろう、Req.＝プロトコルにより必要とされた、Coll.＝収集された、N/A＝該当なし

略語：L、左、R、右

## 【0184】

A. 脳全体を収集し、次いで、正中矢状面に沿って半分に分割した。脳の右半分全体を、組織病理学のために10%の中性緩衝ホルマリンに入れ、「Pardo et al., 2012, Technical Guide for Nervous System Sampling of the Cynomolgus Monkey for General Toxicity Studies, Toxicologic Pathology 40:624-636」に従って更にトリミング及び処理した。生体分布のための試料を左半球から収集し、-60℃で保存した。

## 【0185】

10

20

30

40

50

B．最低3つの頸部、3つの胸部、及び3つの腰部の後根神経節を採取し、組織病理学（頸部、胸部、腰部）のために3つの組織カセットに固定した。加えて、3つの対側頸部後根神経節、3つの対側胸部後根神経節、及び3つの対側3つの腰部後根神経節を採取し、生体内分布のために - 60 ° C で凍結した。

【0186】

C．心臓の切片には、右心室及び左心室（A V 弁を含む）並びに心室中隔（弁を含む）が含まれる必要がある。

【0187】

D．各脊髄を、それぞれC、T、又はLとラベル付けした頸部、胸部、及び腰部セグメントに分割した。各脊髄セグメントを、3つの切片に分割した。3つのC、T、又はL切片には、各々1～3の番号が付けられるであろう。各動物から、C1 - 3、T1 - 3、及びL1 - 3の番号が付けられた、合計9つの脊髄切片を生成した。各脊髄セグメントから、切片1（C1、T1、L1）を病理組織学的分析に使用した。各脊髄セグメントから、切片2（C2、T2、L2）を生体内分布分析（RNA及びタンパク質分析、2つのチューブ）に使用した。各脊髄セグメントから、セクション3（C3、T3、L3）をホルマリン固定し、LCMのためにパラフィン包埋した。

【0188】

E．三叉神経の一部を、労働衛生上健康曝露の可能性のために収集し、 - 60 ° C で保存した。

【0189】

F．組織病理学が適切でない剖検時に行われた全体的な観察物（例えば、流体、もつれた毛、欠落した解剖学的部位）を収集した。

【0190】

実験的評価：観察

生存確認（ケージ内）では、マカクを一般的な外観又は毒性の徴候について、毎日視覚的に観察することによってモニタリングし、これには、限定されないが、神経学的徴候又は無気力、苦痛、及び行動の変化が含まれる。これはSOPに従って担当者によって実施した。異常な状態がある場合は、獣医師及び試験責任者に通知する。処置は、臨床獣医師及び試験責任者が承認した後にのみ実施し、但し、マカクを危険にさらす緊急事態の場合、又はマカクを人道的に安楽死させるときは例外である。

【0191】

瀕死状態のために死亡又は安楽死させたマカクは、最終的に安楽死させたマカクと同じ方法で評価した。一連の組織を収集し、あらゆる全体的な病変を記録した。

【0192】

加えて、麻酔するたびに、全てのマカクを目視検査した。剖検時に、マカクに肉眼的異常がないかを調査した。全ての変化を記録した。マカクは、研究の開始時、剖検時、及び鎮静化した全ての時点で体重を測定した。

【0193】

食物消費はモニターしていない。水は自由に投与し、栄養強化食品を含む標準食をマカクに与えた。

【0194】

モニタリングのために選択した日に、感覚神経伝導試験を実施した。

【0195】

神経学的検査については、モニタリングのために選択した日に、非ヒト霊長類神経学的評価を実施した。神経学的評価は、精神状態、姿勢及び歩行、固有感覚、脳神経、及び脊髄反射の5つのセクションに分割した。

【0196】

死後分析では、瀕死状態で安楽死させた、又は死亡が確認されたマカクを含む、全てマカクに対して全体的な死後検査を実施した。全ての異常な観察結果を記録した。

【0197】

10

20

30

40

50

この研究は、動物の継続的な評価を必要とするため、剖検の時期は、後の時点で決定された。予期せず死亡した動物は、できるだけ早く剖検した。全ての予定外の死亡について、臨床病理学、広範な全体的病理学、及び組織病理学を、試験病理学者の裁量の下で収集した組織の完全なリストに対して実施した。考えられる死因を決定するために、必要に応じて他の分析（免疫応答など）が含まれる。組織は、表 6 に概説されるように、全ての動物で収集した。組織病理学が適切でない剖検時に行われた全体的な観察物（例えば、流体、もつれた毛、欠落した解剖学的部位）は収集していない。

#### 【 0 1 9 8 】

研究期間の終わりまで生き残ったマカクを安楽死させた。マカクを最初に鎮静化させ、その後安楽死させた。死亡は、心拍及び呼吸がないことによって確認した。マカクは、確

10

#### 【 0 1 9 9 】

表 6 に記載される全ての組織を保存した。組織を、パラフィン包埋のために 1 0 % 中性緩衝ホルマリンに入れることによって固定した。組織病理学的検査に使用される眼は、パラフィン包埋の前に修正されたデビッドソン溶液で固定した。

#### 【 0 2 0 0 】

生体内分布分析のために、表 6 の各組織の切片を可能な限り速やかに - 8 0 に凍結した。試験責任者の裁量で、DNA を組織から抽出し、ベクター生体内分布を定量的 PCR によって評価した。

#### 【 0 2 0 1 】

組織病理学的分析のために、表 6 のサブセット又は全ての組織を、ヘマトキシリン及びエオシン（H & E）で染色した。追加の手順及び / 又はその他の染色は、組織学的特徴を特定 / 明確にするために、試験病理学者の裁量で採用することができ、最終報告に文書化した。実験の詳細、試験手順、及び観察を文書化した全てデータを、試験バインダに記録し、維持した。試験が完了したら、全ての報告及び生データをアーカイブに保存した。保存された検体及び組織を、アーカイブし、保管した。試験責任者が、これらの資料の最終処分の必要性を決定する。実験の詳細及び試験手順及び観察結果を文書化した全てのデータを、GTP 担当者によって専用のノート及び試験バインダに記録し、維持した。

20

#### 【 0 2 0 2 】

剖検時に収集した組織で実施されるアッセイ

30

試験の結論後、マカクを、完全な病理学のために採取した組織を用いて剖検した（剖検時に採取した組織のリストについては表 6 を参照されたい）。

#### 【 0 2 0 3 】

組織病理学では、ヘマトキシリン及びエオシン（H & E）染色は、試験責任者の裁量で、組織病理学のために収集する、リストされる組織の全て又はサブセットに対して実施した。組織病理学的所見に基づき、更なる適切な染色が用いられ得る。M f n 2 c DNA 及び m i R N A 発現では、ホルマリン及びパラフィン包埋（F F P E）中に保存された組織切片を処理し、運動ニューロンをレーザー捕捉顕微解剖した。脊髄から単離された運動ニューロンを RNA 抽出し、q P C R を、特異的プライマーセットを使用して、M f n 2 ノックダウンのレベル、M f n 2 c DNA 発現のレベル、及び m i R N A 発現のレベルを決定するために実施した。M f n 2 のノックダウン及び M f n 2 c DNA の発現は、q P C R 及びウエスタンブロットによって組織試料溶解物中で評価され得る。M f n 2 の免疫組織化学は、脳及び脊髄組織で実施され得る。簡潔には、パラフィン切片を M f n 2 タンパク質に指向する抗体とインキュベートした。生体内分布のために、表 6 の各組織の切片の一部を、可能な限り速やかに - 6 0 以下に凍結した。DNA は組織から抽出し、ベクター生体内分布を定量的 PCR によって評価され得る。組織リンパ球単離及び E L I S P O T では、リンパ球は、脾臓及び骨髄から採取され得、カプシド及び導入遺伝子 T 細胞応答は E L I S P O T を実施した。

40

#### 【 0 2 0 4 】

（配列表フリーテキスト）

50

以下の情報は、数値識別子< 2 2 3 >の下でフリーテキストを含む配列を提供する。  
【表 7 - 1】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
1	<223> ベクターゲノムSyn.PI.hMfn2opt.link.hMfn2 miR1693.WPRE.bGH <220> <221> 反復領域 <222> (1)..(141) <223> 5'ITR

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<220> <221>プロモーター <222> (223)..(682) <223> hシナプシン <220> <221>イントロン <222> (694)..(826) <223> Promegaキメライントロン <220> <221>他のシグナル <222> (857)..(862) <223>コザック <220> <221> CDS <222> (863)..(3136) <223>操作されたヒトMfn2 <220> <221>他の特徴 <222> (3134)..(3139) <223> DbI終止コドン <220> <221>他の特徴 <222> (3140)..(3229) <223>リンカー <220> <221>他の結合 <222> (3230)..(3252) <223> 5'隣接 <220>

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

配列番号	<223>下のフリーテキスト	
	<221>その他の特徴 <222> (3253)..(3316) <223> hMfn2 miR1693 <220> <221>他の結合 <222> (3317)..(3360) <223> 3'隣接 <220> <221>他の特徴 <222> (3463)..(4045) <223> WRPE <220> <221>他の特徴 <222> (4410)..(4455) <223>追加のAAV配列 <220> <221>反復領域 <222> (4456)..(4585) <223> 3'ITR	10
2	<223>合成構築物	
3	<223> 5'ITR <220> <221>プロモーター <222> (223)..(682) <223> hシナプシン <220> <221>イントロン <222> (694)..(826) <223> Promegaキメライントロン <220>	30
		40

【表 7 - 4】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<221> CDS <222> (863)..(3133) <223> 操作されたrMfn2 <220> <221> 他の特徴 <222> (3134)..(3139) <223> Dbl終止コドン <220> <221> 他の特徴 <222> (3140)..(3229) <223> リンカー <220> <221> 他のシグナル <222> (3230)..(3252) <223> 5'隣接 <220> <221> 他の特徴 <222> (3253)..(3316) <223> rMfn2 miR1518 <220> <221> 他のシグナル <222> (3317)..(3360) <223> 3'隣接 <220> <221> エンハンサー <222> (3457)..(4044) <223> WRPE <220> <221> その他の特徴 <222> (4385)..(4430)

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<223>追加のAAV配列  <220> <221>反復領域 <222> (4431)..(4560) <223> 3'ITR
4	<223> 合成構築物
5	<223> 5'ITR
6	<223> hシナプシンプロモーター
7	<223> Promegaキメライントロン
8	<223> WPRE
9	<223>追加のAAV配列
10	<223> 3' ITR
11	<223>マイトフュージン2タンパク質をコードするヒトMfn2操作核酸配列
12	<223>マイトフュージン2タンパク質をコードするrMfn2操作核酸配列
13	<223> 5'隣接
14	<223> 3'隣接
15	<223> hMfn2 miR1693
16	<223> rMfn2 miR1518
17	<223> リンカー
18	<223> hMfn2内因性核酸配列
19	<223>合成構築物
20	<223> rMfn2内因性核酸配列
21	<223>合成構築物
22	<223> bGHポリA
23	<223> SV40ポリA
24	<223> hMfn2操作核酸配列V1
25~46	<223>合成構築物

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
47~67	<223>標的hMfn2配列
68	<223> miR1693(21-mer)
69	<223>ベクターゲノムCAG.CI.hMfn2.GA.link.miR538.WPRE.SV40 <220> <221>反復領域 <222> (1)..(188) <223> 5'ITR <220> <221>他の特徴 <222> (192)..(1032) <223> CAG(CBA) <220> <221>エンハンサー <222> (194)..(436) <223> CMVエンハンサー <220> <221>プロモーター <222> (439)..(720) <223> CBプロモーター <220> <221>イントロン <222> (720)..(1127) <223> CAGにおけるハイブリッドイントロン <220> <221>イントロン <222> (720)..(950) <223> b-アクチンイントロン <220> <221>他の特徴 <222> (1158)..(1163)

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<223>コザック <220> <221> CDS <222> (1164)..(3437) <223>操作されたヒトMfn2 <220> <221>他の特徴 <222> (1379)..(1399) <223> miR538変異 <220> <221>他の特徴 <222> (2534)..(2554) <223> miR1518変異 <220> <221>他の特徴 <222> (3438)..(3519) <223>リンカーp4271 <220> <221>他の特徴 <222> (3520)..(3547) <223> miR538 AS <220> <221>他の特徴 <222> (3569)..(3587) <223>ループ <220> <221>他の特徴 <222> (3588)..(3606) <223> miR538センス <220>

10

20

30

40

50

20

30

【表 7 - 9】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<221>プロモーター <222> (439)..(720) <223> CBプロモーター <220> <221>イントロン <222> (720)..(1127) <223> CAGにおけるハイブリッドイントロン <220> <221>イントロン <222> (720)..(950) <223> b-アクチンイントロン <220> <221>その他の特徴 <222> (1158)..(1163) <223>コザック <220> <221> CDS <222> (1164)..(3437) <223>最適化されたヒトMfn2 <220> <221>他の特徴 <222> (1379)..(1399) <223> miR538変異 <220> <221>その他の特徴 <222> (2534)..(2554) <223> miR 1518変異 <220> <221>他の特徴 <222> (3438)..(3519)

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 0】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<223>リンカーp4271 <220> <221>他の特徴 <222> (3520)..(3547) <223> 5'隣接 <220> <221>他の特徴 <222> (3569)..(3587) <223>ループ <220> <221>その他の特徴 <222> (3588)..(3606) <223>ラットmiR 1518センス <220> <221>その他の特徴 <222> (3607)..(3651) <223> 3'隣接 <220> <221>他の特徴 <222> (3678)..(4266) <223> WRPE <220> <221>他の特徴 <222> (4355)..(4474) <223>SV40 PAターミネータ <220> <221>反復領域 <222> (4584)..(4771) <223> ITR <220>

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<221>その他の特徴 <222> (35488)..(3568) <223>ラットmiR1518 AS
72	<223>合成構築物
73	<223>ベクターゲノムCAG.Cl.hMfn2.GA.WPRE.SV40 <220> <221>反復領域 <222> (1)..(188) <223> ITR <220> <221>他の特徴 <222> (192)..(1032) <223> CAG (CBA) <220> <221>エンハンサー <222> (194)..(1032) <223> CMVエンハンサー <220> <221>プロモーター <222> (439)..(720) <223> CBプロモーター <220> <221>イントロン <222> (720)..(1127) <223> CAGにおけるハイブリッドイントロン <220> <221>イントロン <222> (720)..(950) <223> b-アクチンイントロン <220>

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<221>その他の特徴 <222> (1158)..(1163) <223>コザック <220> <221> CDS <222> (1164)..(3437) <223>操作されたヒトMfn2 <220> <221>他の特徴 <222> (1379)..(1399) <223> miR538変異 <220> <221>他の特徴 <222> (2534)..(2554) <223> miR1518変異 <220> <221>他の特徴 <222> (3466)..(4054) <223> WRPE <220> <221>その他の特徴 <222> (4143)..(4262) <223> SV40 PAターミネータ <220> <221> rep_起点 <222> (4372)..(4559) <223> ITR
74	<223>合成構築物
75	<223>ベクターゲノムCB7.Cl.hMfn2.GA.link.miR538.rBG <220>

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 3】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<221>反復領域 <222> (1)..(130) <223> ITR <220> <221>エンハンサー <222> (259)..(562) <223> CMVエンハンサー <220> <221>プロモーター <222> (561)..(842) <223> CB7プロモーター <220> <221>イントロン <222> (935)..(1907) <223>ニワトリベータ-アクチンイントロン <220> <221>その他の特徴 <222> (1953)..(1958) <223>コザック <220> <221> CDS <222> (1959)..(4232) <223>操作されたヒトMfn2 <220> <221>他の特徴 <222> (2174)..(2194) <223> miR538変異 <220> <221>他の特徴 <222> (3329)..(3349)

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 4】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<223> miR1518 <220> <221>他の特徴 <222> (4233)..(4314) <223> リンカーp5271 <220> <221>他の特徴 <222> (4315)..(4342) <223> 5'隣接 <220> <221>他の特徴 <222> (4343)..(4363) <223> miR538 AS <220> <221>他の特徴 <222> (4364)..(4382) <223> ループ <220> <221>他の特徴 <222> (4383)..(4401) <223> miR538センス <220> <221>他の特徴 <222> (4402)..(4446) <223> 3'隣接 <220> <221>ポリA_シグナル <222> (4500)..(4626) <223> ウサギグロビンポリA

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 5】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<220> <221>反復領域 <222> (4692)..(4821) <223> ITR
76	<223>合成構築物
77	<223>ベクターゲノムCB7.Cl.hMfn2.GA.link.miR1518.rBG <220> <221>反復領域 <222> (1)..(130) <223> ITR <220> <221>エンハンサー <222> (259)..(562) <223> CMVエンハンサー <220> <221>プロモーター <222> (561)..(842) <223> CB7プロモーター <220> <221>イントロン <222> (935)..(1907) <223>ニワトリベータ-アクチンイントロン <220> <221>他の特徴 <222> (1953)..(1958) <223> コザック <220> <221> CDS <222> (1959)..(4232) <223>操作されたヒトMfn2

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 6】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<220> <221> 他の特徴 <222> (2174)..(2194) <223> miR538変異 <220> <221> その他の特徴 <222> (3329)..(3349) <223> miR 1518変異 <220> <221> その他の特徴 <222> (4233)..(4314) <223> リンカーp4271 <220> <221> 他の特徴 <222> (4315)..(4342) <223> 5'隣接 <220> <221> 他の特徴 <222> (4343)..(4363) <223> ラットmiR1518 AS <220> <221> 他の特徴 <222> (4364)..(4382) <223> ループ <220> <221> 他の特徴 <222> (4383)..(4401) <223> ラットmiR 1518センス <220> <221> 他の特徴

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 7】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<222> (4402)..(4446) <223> 3'隣接 <220> <221>ポリA_シグナル <222> (4584)..(4710) <223> ウサギグロビンポリA <220> <221> 反復領域 <222> (4776)..(4905) <223> ITR
78	<223> 合成構築物
79	<223> ベクターゲノムCB7.CI.hMfn2.GA.rBG <220> <221> rep_起点 <222> (1)..(130) <223> ITR <220> <221> エンハンサー <222> (259)..(562) <223> CMVエンハンサー <220> <221> プロモーター <222> (561)..(842) <223> CB7プロモーター <220> <221> TATAシグナル <222> (815)..(818) <223> TATAシグナル <220> <221> インترون

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 8】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
	<222> (935)..(1907) <223>ニワトリベータ-アクチンイントロン <220> <221>他の特徴 <222> (1940)..(1948) <223>コザック <220> <221> CDS <222> (1946)..(4219) <223>操作されたヒトMfn2 <220> <221>他の特徴 <222> (2161)..(2181) <223> miR538変異 <220> <221>他の特徴 <222> (3316)..(3336) <223> miR1518変異 <220> <221>ポリA_シグナル <222> (4244)..(4370) <223>ウサギグロビンポリA <220> <221>反復領域 <222> (4436)..(4565) <223> ITR
80	<223>合成構築物
81	<223> AAVhu68
84	<223> AAV-PHP.eB

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 9 】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
86	<223> CMV エンハンサーを含むCB7プロモーター
87	<223> CAGプロモーター
88	<223>ウサギベータグロビン
89	<223> miR1538
90	<223>リンカー

10

【 0 2 0 5 】

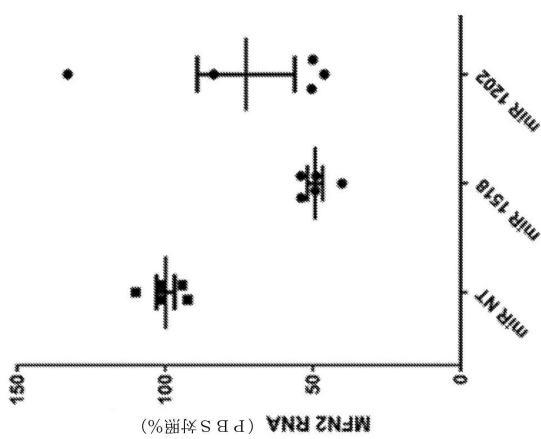
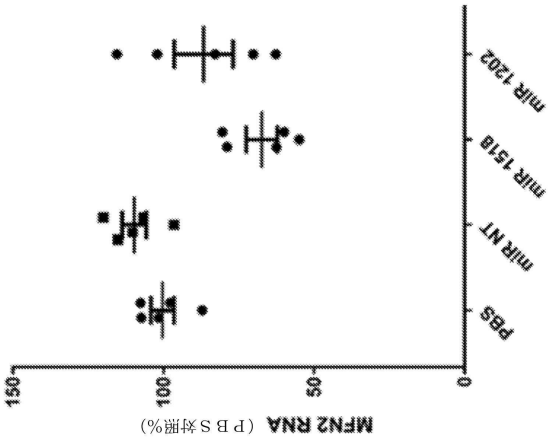
本明細書に列挙される全ての特許、特許刊行物、及び他の刊行物、並びに配列表ファイル「20-9141PCT\_\_SeqListing\_\_ST25」は、参照により本明細書に組み込まれる。2020年7月13日に出願された米国仮特許出願第63/051,336号、及び2021年4月9日に出願された米国仮特許出願第63/173,045号は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明は、特に好ましい実施形態を参照して記載されているが、本発明の趣旨から逸脱することなく修正を行うことができることが理解されるであろう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲内であることが意図される。

20

【 図 面 】

【 図 1 A 】

【 図 1 B 】

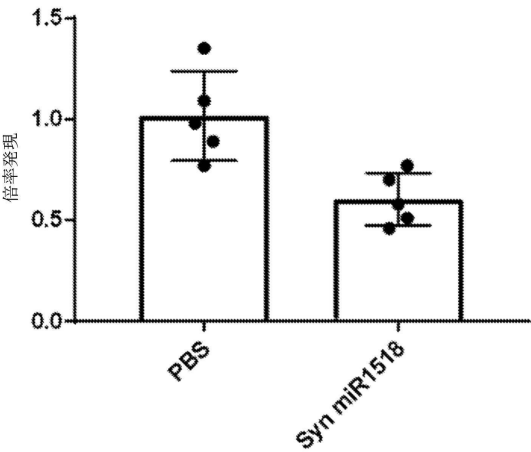


30

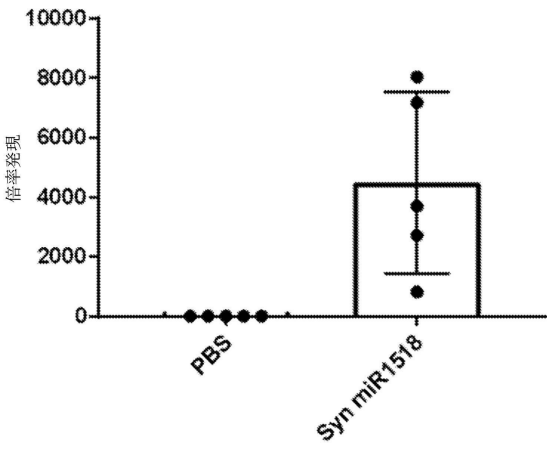
40

50

【 図 2 A 】

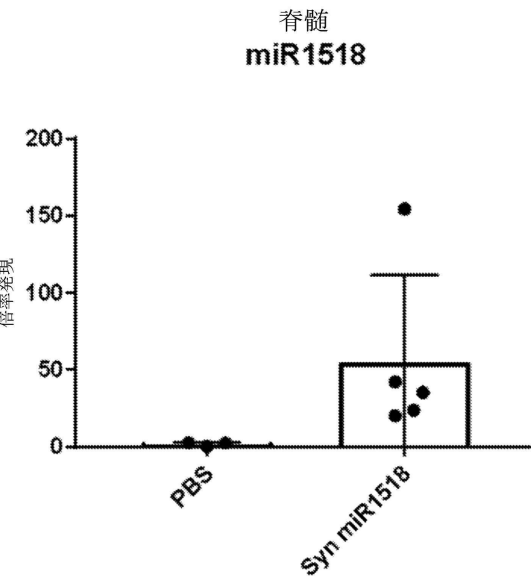


【 図 2 B 】

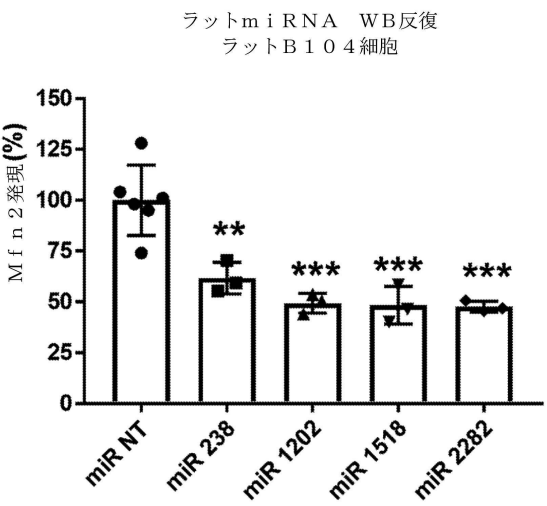


10

【 図 2 C 】



【 図 3 】



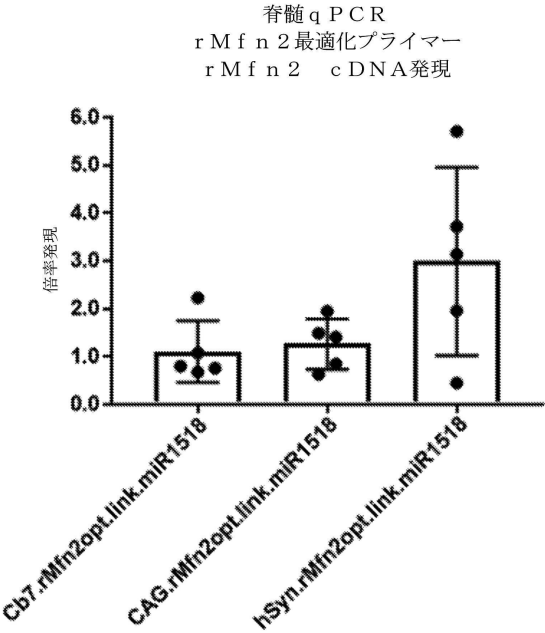
20

30

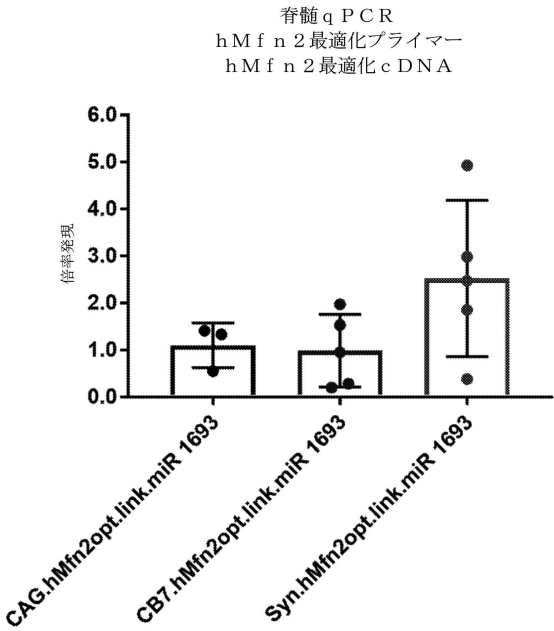
40

50

【 図 4 】



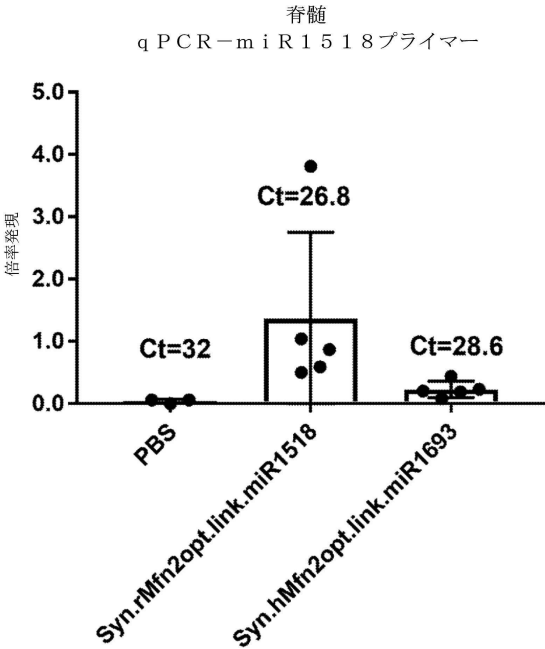
【 図 5 】



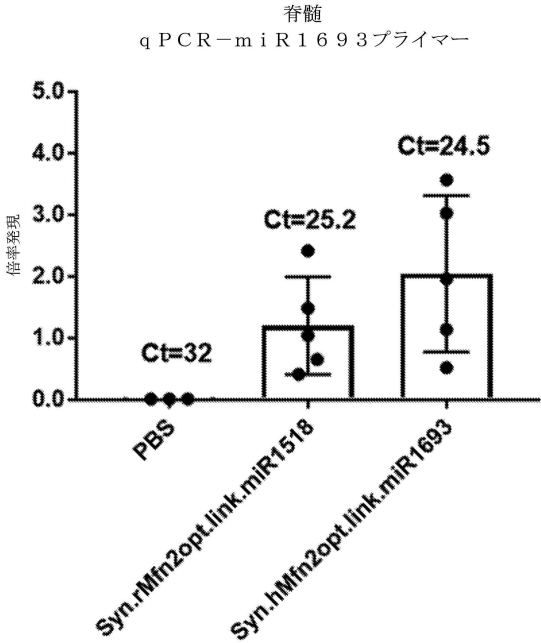
10

20

【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

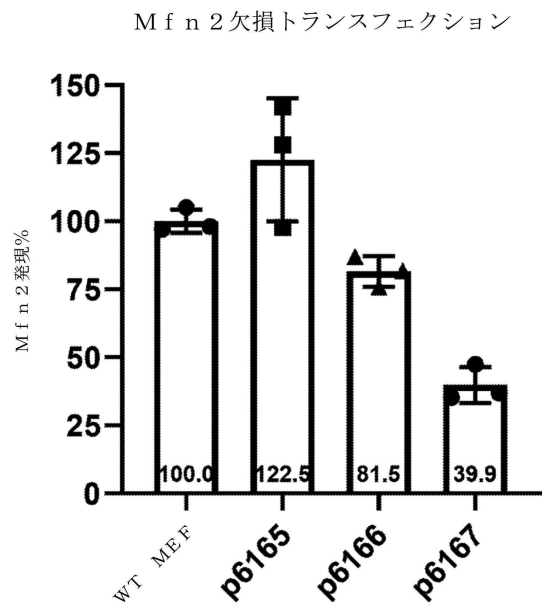


30

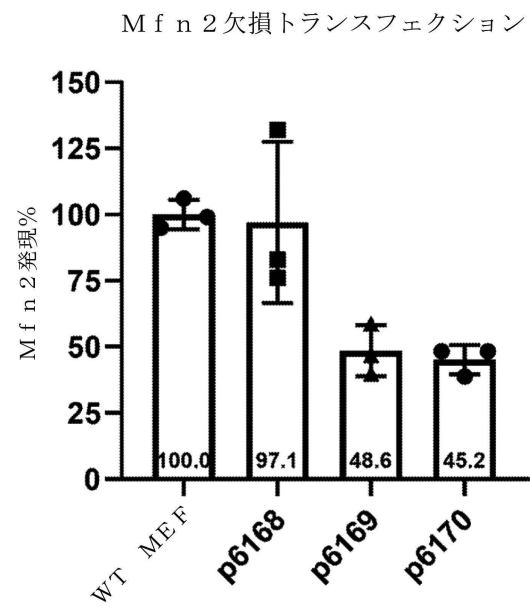
40

50

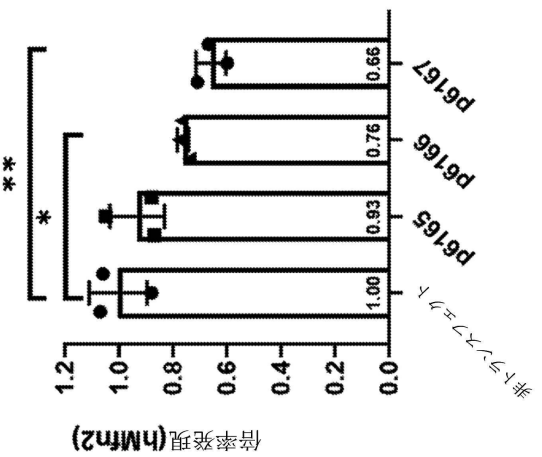
【 図 7 】



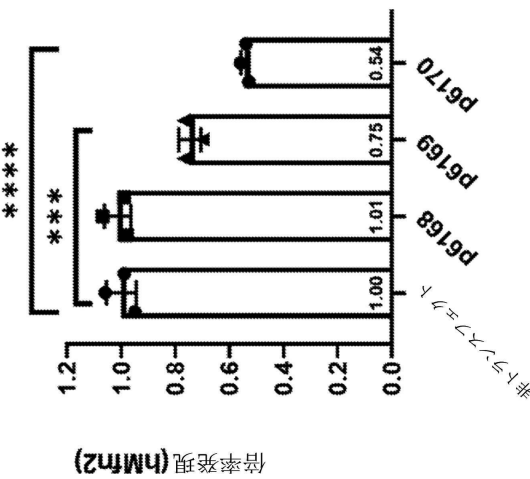
【 図 8 】



【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



10

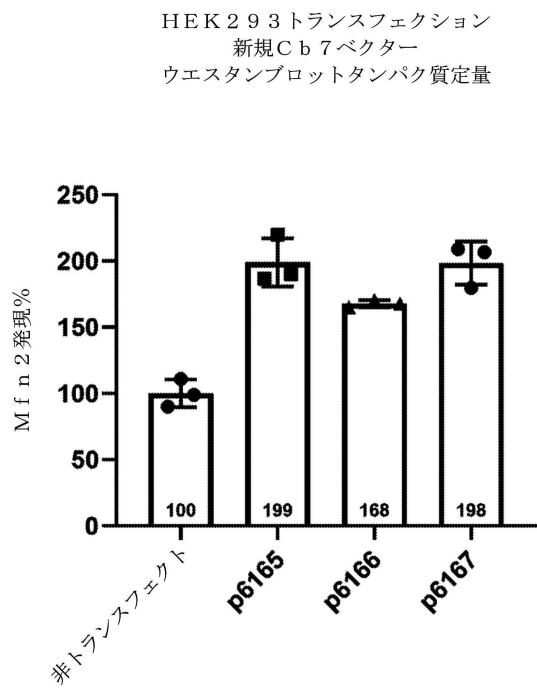
20

30

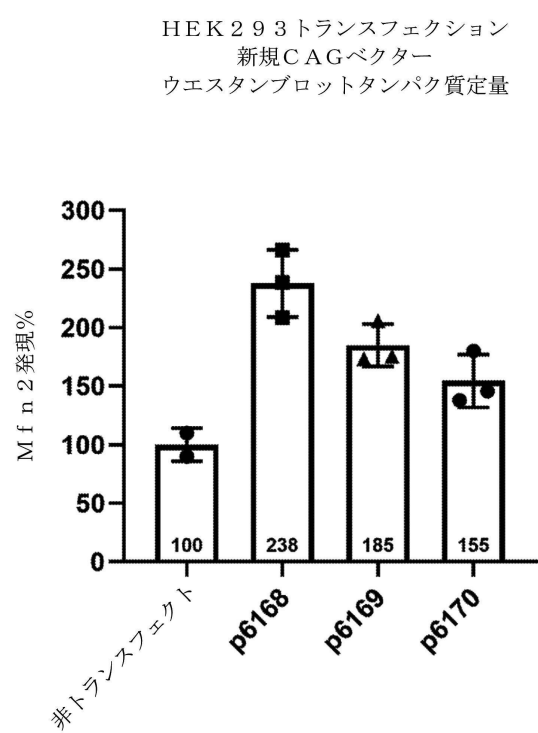
40

50

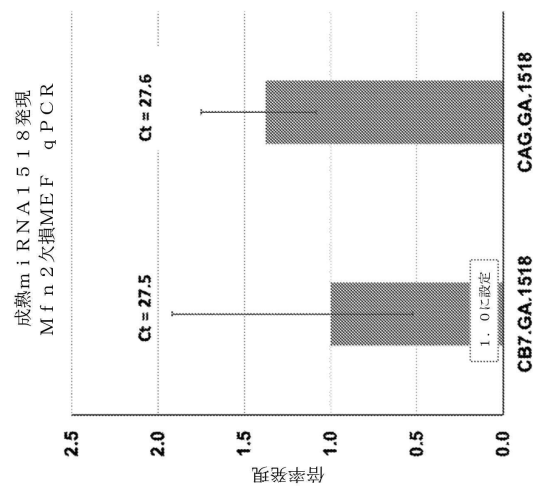
【図 1 0】



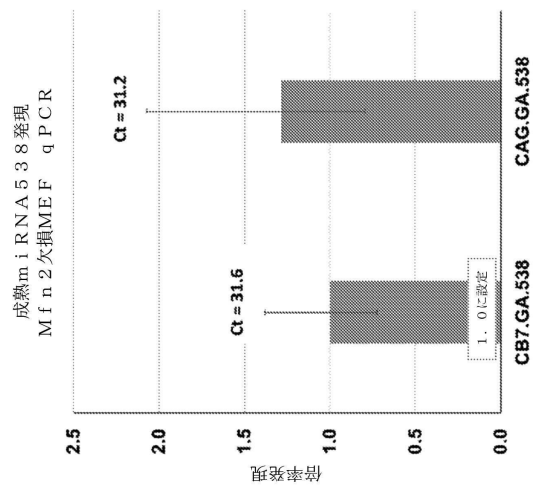
【図 1 1】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



10

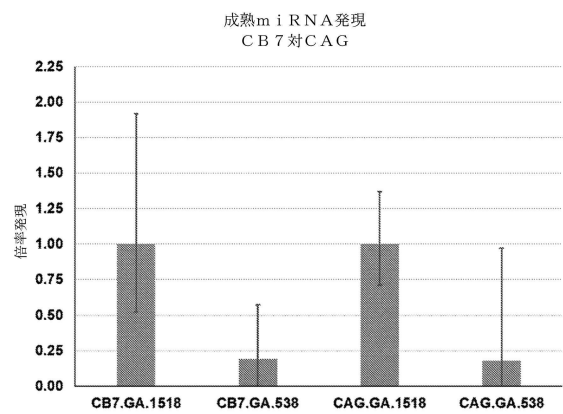
20

30

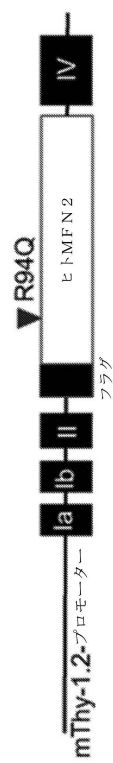
40

50

【 図 1 2 C 】



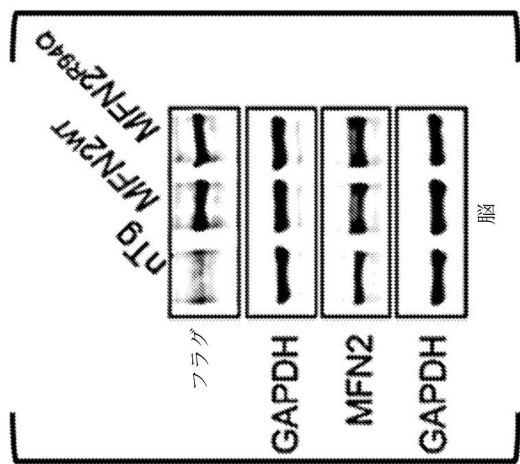
【 図 1 3 A 】



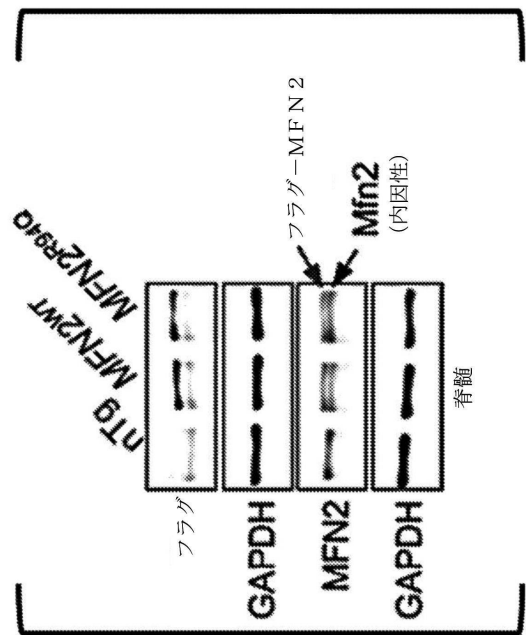
10

20

【 図 1 3 B 】



【 図 1 3 C 】

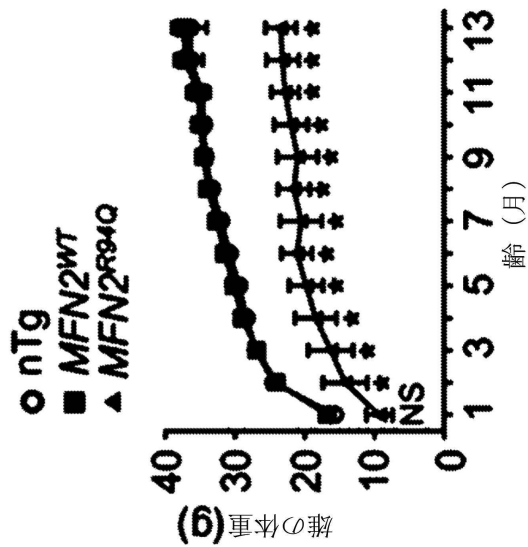


30

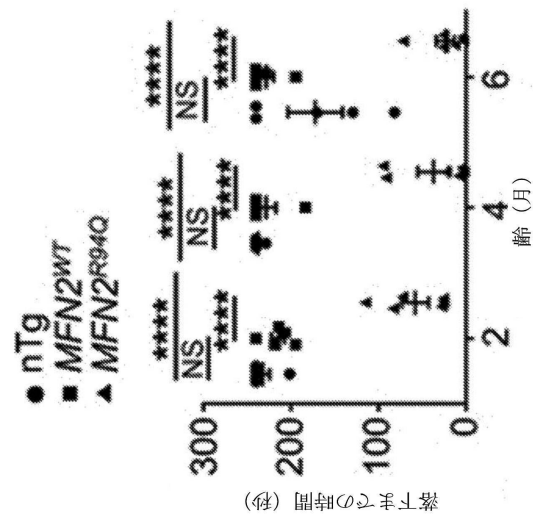
40

50

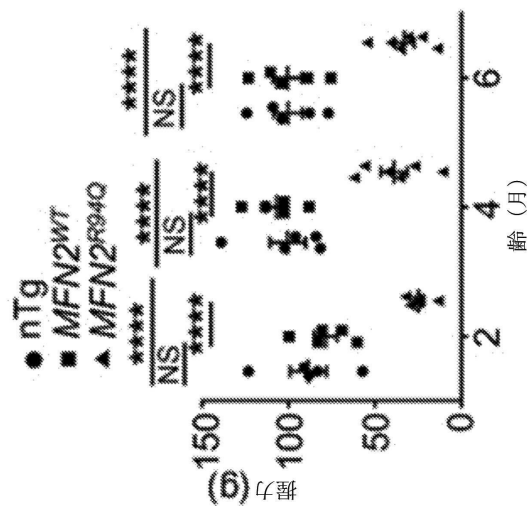
【図 1 3 D】



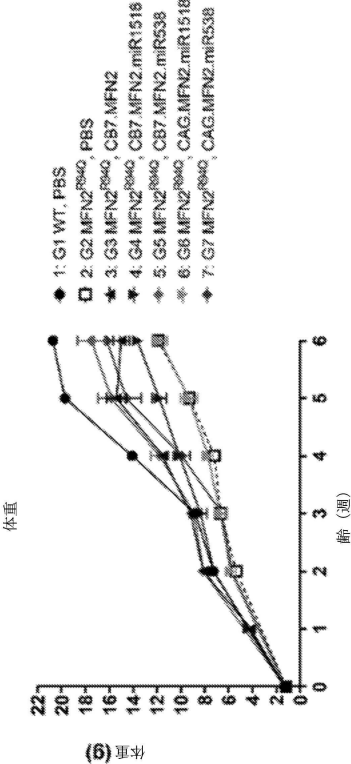
【図 1 3 E】



【図 1 3 F】



【図 1 4 A】



10

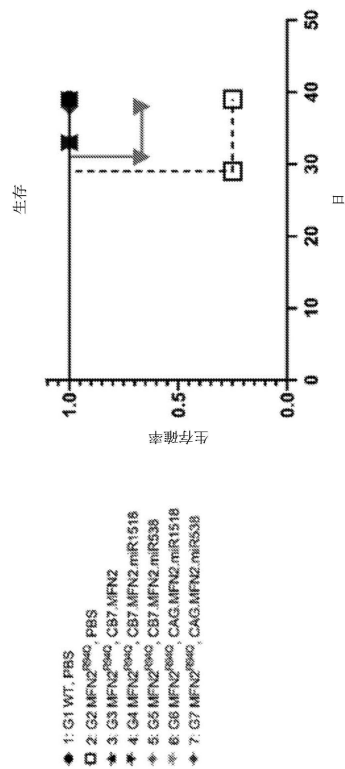
20

30

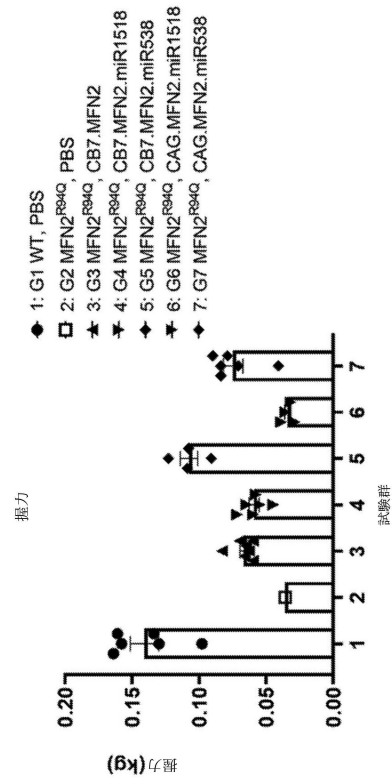
40

50

【図 1 4 B】



【図 1 5】



10

20

【配列表】

2023534037000001.app

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/041406

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/86 A61P25/00 C12N15/11 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BARBULLUSHI K ET AL: "Disease Modeling and Therapeutic Strategies in CMT2A: State of the Art", MOLECULAR NEUROBIOLOGY, HUMANA PRESS, US, vol. 56, no. 9, 4 March 2019 (2019-03-04), pages 6460-6471, XP036853072, ISSN: 0893-7648, DOI: 10.1007/S12035-019-1533-2 [retrieved on 2019-03-04] abstract, figure 1, page 6465, right-hand column, paragraph 4-5, page 6466, left-hand column, paragraph 5-6, page 6469, left-hand column, paragraph 2; ----- -/--	1,2, 7-16, 21-29, 37-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 October 2021		Date of mailing of the international search report 09/11/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommer, Birgit

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/041406

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>RIZZO F ET AL: "RNAi/gene therapy combined approach as therapeutic strategy for Charcot-Marie-Tooth 2A (S58.005)", NEUROLOGY, vol. 92 (15 Supplement) S58.005, 16 April 2019 (2019-04-16), XP055853988, Retrieved from the Internet: URL:https://n.neurology.org/content/92/15_Supplement/S58.005 [retrieved on 2021-10-22] the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1,2, 7-16, 21-29, 37-43</p>
Y	<p>MORELLI K H ET AL: "Gene therapies for axonal neuropathies: Available strategies, successes to date, and what to target next", BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1732, 27 January 2020 (2020-01-27), page 146683, XP086078118, ISSN: 0006-8993, DOI: 10.1016/J.BRAINRES.2020.146683 [retrieved on 2020-01-27] abstract, figure 1, items 3.5 and 4.1;</p> <p>-----</p>	<p>1,2, 7-16, 21-29, 37-43</p>
Y	<p>WO 2020/047268 A1 (RES INST NATIONWIDE CHILDRENS HOSPITAL [US]; JACKSON LAB [US]) 5 March 2020 (2020-03-05)</p> <p>claims; examples</p> <p>-----</p>	<p>1,2, 7-16, 21-29, 37-43</p>
A	<p>ZHOU Y ET AL: "Restoring mitofusin balance prevents axonal degeneration in a Charcot-Marie-Tooth type 2A model", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 129, no. 4, 18 March 2019 (2019-03-18), pages 1756-1771, XP055854330, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI124194 abstract, page 1764, right-hand column, paragraph 3;</p> <p>-----</p>	<p>1-49</p>

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

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/041406

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

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

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

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード ( 参考 )

A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/167 (2006.01)	A 6 1 K	31/167	
A 6 1 K	31/55 (2006.01)	A 6 1 K	31/55	
A 6 1 K	31/195 (2006.01)	A 6 1 K	31/195	
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	

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

( 特許庁注 : 以下のものは登録商標 )

1 . L A B R A S O L

2 . T W E E N

7 ボルチモア・ウエストラファイエットアベニュー 2 0 0

(72)発明者 ワークマン , アイリーン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 2 3 フィラデルフィア・アパートメント 6 1 1 ・ ノースデ  
ラウェアアベニュー 8 0 0

F ターム ( 参考 )

4B065 AA95X AB01 AC14 BA01 CA23 CA44  
4C084 AA02 AA03 AA13 AA19 BA44 CA53 DC50 MA02 NA05 NA14  
ZA062 ZA122 ZA201 ZA211 ZA221 ZB112 ZC751  
4C086 AA01 AA02 BC32 EA16 MA02 MA04 NA05 ZA20 ZA21 ZA22  
ZC75  
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 NA14 ZA20 ZA21 ZA22 ZC75  
4C206 AA01 FA01 GA02 GA31 KA01 MA02 MA04 NA05 ZA20 ZA21  
ZA22 ZC75