

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7248658号

(P7248658)

(45)発行日 令和5年3月29日(2023.3.29)

(24)登録日 令和5年3月20日(2023.3.20)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/861(2006.01)

C 1 2 N 15/861

Z

C 1 2 N 15/864(2006.01)

C 1 2 N 15/864

1 0 0 Z

C 1 2 N 15/867(2006.01)

C 1 2 N 15/867

Z

請求項の数 21 (全64頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-516666(P2020-516666)

(86)(22)出願日 平成30年9月21日(2018.9.21)

(65)公表番号 特表2020-535803(P2020-535803
A)

(43)公表日 令和2年12月10日(2020.12.10)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/052221

(87)国際公開番号 WO2019/060726

(87)国際公開日 平成31年3月28日(2019.3.28)

審査請求日 令和3年9月17日(2021.9.17)

(31)優先権主張番号 62/561,843

(32)優先日 平成29年9月22日(2017.9.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 500034653

ジェンザイム・コーポレーション

アメリカ合衆国 0 2 1 4 1 マサチューセ

ッツ州ケンブリッジ・ウォーター・スト

リート 4 5 0

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72)発明者 キャサリン・アール・オリオーダン

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8

8 0 7 .ブリッジウォーター・メイルコ

ード: 5 5 エー - 5 2 5 .コーポレート

ドライブ 5 5 .サノフィ

(72)発明者 アダム・パレーモ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 バリエントRNA i

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の鎖および第2の鎖を含むRNA分子であって、前記RNA分子は低分子阻害性RNA(s iRNA)、マイクロRNA(m iRNA)、または小ヘアピンRNA(s hRNA)であり、

a) 該第1の鎖および該第2の鎖は、二重鎖を形成し；

b) 該第1の鎖は、ガイド領域であって、該ガイド領域は、核酸配列5' - U G G C C G U C C A U C U U G G A C C C G - 3' (配列番号1)、もしくは配列番号1に対して90%以上の同一性を有する核酸配列；または核酸配列5' - A G U C G G U G U G G U U G A C A A G C A - 3' (配列番号7)、もしくは配列番号7に対して90%以上の同一性を有する核酸配列であり；ならびに

c) 該第2の鎖は、非ガイド領域である、
前記RNA分子。

【請求項2】

(i) ガイド領域の核酸は、核酸配列5' - U G G C C G U C C A U C U U G G A C C C G - 3' (配列番号1)、もしくは配列番号1に対して約90%以上の同一性を有する核酸配列であり；非ガイド領域は、配列5' - C G G G U C C A A G A U G G A C G G C C A - 3' (配列番号2)、もしくは配列番号2に対して約90%以上の同一性を有する核酸配列であり；または

(i i) ガイド領域の核酸は、核酸配列5' - A G U C G G U G U G G U U G A C A A G

10

20

C A - 3 ' (配列番号 7)、もしくは配列番号 7 に対して 9 0 % 以上の同一性を有する核酸配列であり；非ガイド領域は、配列 5 ' - U G C U U G U C A A C C A C A C C G A C U - 3 ' (配列番号 8)、もしくは配列番号 8 に対して 9 0 % 以上の同一性を有する核酸配列である、

請求項 1 に記載の R N A 分子。

【請求項 3】

第 1 の鎖および第 2 の鎖は、ループ構造を形成することが可能な R N A リンカーによって連結されており、場合により、ここで：

(i) 該 R N A リンカーは、4 ~ 5 0 ヌクレオチドを含む；および / または

(i i) 該ループ構造は、4 ~ 2 0 ヌクレオチドを含む；および / または

(i i i) 5 ' から 3 ' へ、該第 2 の鎖、該 R N A リンカー、および該第 1 の鎖を含む；または

(i v) 5 ' から 3 ' へ、該第 1 の鎖、該 R N A リンカー、および該第 2 の鎖を含む、請求項 1 または 2 に記載の R N A 分子。

【請求項 4】

R N A 分子は、5 ' から 3 ' へ、第 1 の鎖、R N A リンカー、および第 2 の鎖を含み、該 R N A 分子は、配列番号 4 もしくは配列番号 1 0 の核酸配列、または配列番号 4 もしくは配列番号 1 0 のヌクレオチド配列と 9 0 % 以上同一なヌクレオチド配列である、請求項 3 に記載の R N A 分子。

【請求項 5】

低分子阻害性 R N A (s i R N A)、マイクロ R N A (m i R N A)、または小ヘアピン R N A (s h R N A) である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の R N A 分子。

【請求項 6】

ハンチントン病に関連するポリペプチドをコードする R N A を標的化し、場合により、該ポリペプチドは、ハンチンチンであり、そして場合により、該ハンチンチンは、ハンチントン病に関連する突然変異を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の R N A 分子。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の R N A 分子をコードする核酸を含む発現コンストラクト。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の発現コンストラクトであって、以下の：

(i) R N A 分子をコードする核酸は、m i R N A 足場を含む；および / または

(i i) R N A 分子をコードする核酸は、プロモーターに機能するように連結されており、場合により、該プロモーターは、サイトメガロウイルス (C M V) 前初期プロモーター、R S V L T R、M o M L V L T R、ホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 (P G K) プロモーター、シミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) プロモーター、C K 6 プロモーター、トランスチレチンプロモーター (T T R)、T K プロモーター、テトラサイクリン応答プロモーター (T R E)、H B V プロモーター、h A A T プロモーター、L S P プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター (L S P)、E 2 F プロモーター、テロメラーゼ (h T E R T) プロモーター；サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリベータ - アクチン / ウサギ - グロビンプロモーター (C A G) プロモーター、延長因子 1 - アルファプロモーター (E F 1 - アルファ) プロモーター、ヒト - グルクロニダーゼプロモーター、ニワトリ - アクチン (C B A) プロモーター、レトロウイルス性のラウス肉腫ウイルス (R S V) L T R プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、および 1 3 - アクチンプロモーターから選択される；および / または

(i i i) 該発現コンストラクトは、イントロンをさらに含み、場合により、該イントロンは、キメライントロンであり、そして場合により、発現ベクターは、自己相補的なベクターであり、該イントロンは、デルタキメライントロンである；および / または

(i v) 発現コンストラクトは、ポリアデニル化シグナルをさらに含み、場合により、該ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル、S V 4 0 の

10

20

30

40

50

ポリアデニル化シグナル、またはHSV TK pAである、
上記発現コンストラクト。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の発現コンストラクトを含むベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターであって、以下の：

(i) 該ベクターは、組換えアデノウイルスベクターであり、場合により、該組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型 2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、またはブタAd3型から誘導される；または

10

(i i) 該ベクターは、組換えレンチウイルスベクターであり、場合により、該組換えレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、ロスリバーウイルス (RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114またはそれらのバリエーションで偽型化したレンチウイルスから誘導される；または

(i i i) 該ベクターは、組換え単純疱疹ウイルス (rHSV) ベクターであり、場合により、該rHSVベクターは、rHSV-1またはrHSV-2から誘導される、
上記ベクター。

20

【請求項 11】

rAAVベクターである、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 12】

発現コンストラクトに、1つまたはそれ以上のAAVの逆方向末端反復 (ITR) 配列が隣接し、場合により、ここで：

(i) 該発現コンストラクトに、2つのAAVのITRが隣接する；および/または
(i i) 該AAVのITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型のITRであり、場合により、該AAVのITRは、AAV2のITRである、
請求項 11 に記載のrAAVベクター。

30

【請求項 13】

スタッパー核酸をさらに含み、場合により、該スタッパー核酸が、RNA分子をコードする核酸の上流または下流に配置されている、請求項 11 または 12 に記載のrAAVベクター。

【請求項 14】

ベクターは、自己相補的なrAAVベクターであり、場合により、該ベクターは、RNA分子をコードする第1の核酸配列およびRNA分子の相補物をコードする第2の核酸配列を含み、該第1の核酸配列は、その長さのほとんどまたは全てにわたり、該第2の核酸配列と鎖内の塩基対を形成することができ、かつ場合により、該第1の核酸配列および該第2の核酸配列は、突然変異したAAVのITRによって連結されており、該突然変異したAAVのITRは、D領域の欠失を含み、そして末端分解配列の突然変異を含む、請求項 11～13のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

40

【請求項 15】

請求項 9 もしくは 10 に記載のベクター、または請求項 11～14のいずれか1項に記載のrAAVベクター、を含む細胞。

【請求項 16】

50

請求項 9 に記載のベクターを含むウイルス粒子であって、ここで：

(i) 該ウイルス粒子は、組み換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス分子であり、場合により、該アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型 2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、もしくはブタAd3型由来のキャプシドを含む；または

(i i) 該ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子であり、場合により、該アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型 2 のキャプシドもしくはアデノウイルス血清型 5 のキャプシドを含む；または

(i i i) 該ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子であり、場合により、該レンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス (V S V)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (L C M V)、ロスリバーウイルス (R R V)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、狂犬病ウイルス、R D 1 1 4 もしくはそれらのバリエーションで偽型化したキャプシドを含む；または

(i v) 該ウイルス粒子は、組換え H S V ベクターをキャプシド化する H S V 粒子であり、場合により、該 H S V 粒子は、r H S V - 1 粒子または r H S V - 2 粒子である、上記ウイルス粒子。

【請求項 17】

請求項 11～14 のいずれか 1 項に記載の r A A V ベクターを含む組換え A A V 粒子であって、場合により、ここで：

(i) A A V ウイルス粒子は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、A A V 12、A A V 2 R 4 7 1 A、A A V 2 / 2 - 7 m 8、A A V D J、A A V 2 N 5 8 7 A、A A V 2 E 5 4 8 A、A A V 2 N 7 0 8 A、A A V V 7 0 8 K、A A V 2 - H B K O、A A V D J 8、A A V P H P . B、A A V P H P . e B、A A V B R 1、A A V H S C 1 5、A A V H S C 1 7、ヤギ A A V、A A V 1 / A A V 2 キメラ、ウシ A A V、またはマウス A A V キャプシド r A A V 2 / H B o V 1 血清型キャプシドを含む；および/または

(i i) I T R および r A A V ウイルス粒子のキャプシドは、同じ A A V 血清型から誘導される；または

(i i i) I T R および r A A V ウイルス粒子のキャプシドは、異なる A A V 血清型から誘導され、場合により、該 I T R は、A A V 2 から誘導され、該 r A A V 粒子のキャプシドは、A A V 1 から誘導される、上記組換え A A V 粒子。

【請求項 18】

請求項 16 に記載のウイルス粒子または請求項 17 に記載の r A A V 粒子を含む組成物であって、場合により、該組成物は、医薬的に許容される担体をさらに含む、上記組成物。

【請求項 19】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の R N A 分子、請求項 16 に記載のウイルス粒子、請求項 17 に記載の r A A V 粒子、または請求項 18 に記載の組成物を含むキットであって、場合により、使用説明書をさらに含む、上記キット。

【請求項 20】

哺乳動物におけるハンチントン病を処置するための、請求項 2～6 のいずれか 1 項に記載の R N A 分子、請求項 16 に記載のウイルス粒子、請求項 17 に記載の r A A V 粒子、または請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

ハンチントン病を有する哺乳動物における、h t t の発現を阻害するための、または h

10

20

30

40

50

t t の細胞における蓄積を阻害するための、請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の R N A 分子、請求項 1 6 に記載のウイルス粒子、請求項 1 7 に記載の r A A V 粒子、または請求項 1 8 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年9月22日付けで出願された米国仮出願第62/561,843号の優先権の利益を主張し、その内容は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

【 0 0 0 2 】

A S C I I テキストファイルでの配列リストの提出

A S C I I テキストファイルでの以下の提出物の内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる：配列リストのコンピューター読み取り可能な形態（C R F）（ファイル名：159792014740SeqList.txt、記録された日付：2018年9月20日、サイズ：19KB）。

【 0 0 0 3 】

本発明は、バリエーション R N A i 分子に関する。一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を処置するためのバリエーション R N A i に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 4 】

R N A 干渉（R N A i）は、遺伝子の機能の基礎的な調査における遺伝子サイレンシングのための有用なツールであることが示されており、数々の疾患の発症と関連する遺伝子を抑制するための治療剤として大きな将来性を示す。本来、R N A i による遺伝子の制御は、マイクロ R N A（m i R N A）として公知の小型 R N A を介して起こる（非特許文献 1；非特許文献 2）。マイクロ R N A は、多様な細胞プロセスの強力な制御因子として出現したものであり、ウイルスベクターによって送達されると、人工 m i R N A が継続的に発現され、結果として標的遺伝子のロバストで持続的な抑制が起こる。m i R N A プロセシングに参与するメカニズムの解明により、科学者は、内因性細胞 R N A i の機構を取り入れて、人工 m i R N A の使用により標的遺伝子産物の分解を方向付けることが可能になった（例えば、特許文献 1 および非特許文献 3 を参照）。

【 0 0 0 5 】

R N A i の臨床開発の障害は、オフターゲットのサイレンシングの可能性であり、その場合、R N A i のシード領域（典型的にはヌクレオチド 1 ~ 7 または 1 ~ 8）が、非標的 m R N A の 3' 非翻訳領域（U T R）中の配列と対合して、転写の不安定化を引き起こす。オフターゲットのサイレンシングを低減する試みとしては、起こり得るオフターゲットが最小である標的 m R N A に高い特異性を有する候補シード配列を同定するためのアルゴリズムの使用（非特許文献 4）、および R N A i のガイド領域中に内部のバルジを設置すること（非特許文献 5）が挙げられる。

【 0 0 0 6 】

R N A i は、ハンチントン病（H D）を処置するための治療物質として調査されてきた。H D は、ハンチンチン遺伝子（H T T）のエクソン 1 における C A G リピートの拡大によって引き起こされる遺伝性神経変性疾患である。結果生じた N 末端領域中のポリグルタミン鎖の伸長は、突然変異ハンチンチンタンパク質（m H t t）に毒性の機能獲得をもたらす。H D の治療戦略として m H t t 発現をサイレンシングする可能性は、最初に、条件付きのマウス疾患モデルで実証された（非特許文献 6）。これらのマウスにおいて m H t t の発現が誘導されたら、病理学的および行動に関する異常が出現した。それに続くテトラサイクリン媒介による m H t t 導入遺伝子の抑制が、これらの異常を元に戻したことから、m H t t レベルを低減することで、ニューロン内のタンパク質のクリアランスメカニズムが m H t t によって誘発された変化を正常化することを可能にしたことが示される。

10

20

30

40

50

したがって、mHttレベルを低減する治療戦略は、疾患の進行を止めて、HDの症状を軽減する可能性がある。本明細書にその全体が組み入れられる特許文献2では、Httを標的化するmiRNAが提供される。

【0007】

本明細書において引用された特許出願および公報を包含する全ての参考文献は、参照によってそれら全体が開示に組み入れられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】米国付与前公報第2014/0163214号

10

WO2016/130589

【非特許文献】

【0009】

【文献】Ambros、(2004)Nature 431:350~355

Krolら、(2010)Nat. Rev. Genet. 11:597~610

Davidsonら、(2012)Cell 150:873~875

Boudreau RLら、(2012)Nucl. Acids Res. 41(1):e9

Terasawaら、(2011)Journal of nucleic acids

2011:131579

Yamamotoら、(2000)Cell 101:57~66

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

一部の態様において、本発明は、第1の鎖および第2の鎖を含むRNAiであって、a)第1の鎖および第2の鎖は、二重鎖を形成し；b)第1の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、核酸配列5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）または5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAAGCA-3'（配列番号7）を含み；c)第2の鎖は、非ガイド領域を含む、前記RNAiを提供する。一部の実施形態において、ガイド領域の核酸は、核酸配列5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）を含み、非ガイド領域は、配列5'-CGGGUGCCAAGAU

GGACGGCCCA-3'（配列番号2）を含む。一部の実施形態において、第1の鎖は、配列番号1に対して約90%の同一性または配列番号2に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含む。他の実施形態において、ガイド領域の核酸は、核酸配列5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAAGCA-3'（配列番号7）を含み、非ガイド領域は、配列5'-UGCUCUGUCAACCAACACCGACU-3'（配列番号8）を含む。一部の

実施形態において、第2の鎖は、配列番号7に対して約90%の同一性または配列番号8に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含む。上記の実施形態の一部の実施形態において、第1の鎖および第2の鎖は、ループ構造を形成することが可能なRNAリンカーによって連結されている。一部の実施形態において、RNAリンカーは、4~50ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ループ構造は、4~20ヌクレオチドを含む。

一部の実施形態において、RNAiは、5'から3'へ、第2の鎖、RNAリンカー、および第1の鎖を含む。一部の実施形態において、RNAiは、5'から3'へ、第1の鎖、RNAリンカー、および第2の鎖を含む。一部の実施形態において、RNAiは、配列番号4または配列番号10の核酸配列を含む。一部の実施形態において、RNAiは、配列番号4または配列番号10のヌクレオチド配列と約90%同一なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態において、RNAiは、阻害的低分子RNA(sRNA)、マイクロRNA(miRNA)、または小ヘアピンRNA(shRNA)である。一部の実施形態において、RNAiは、ハンチントン病に関連するポリペプチドをコードするRNAを標的化する。一部の実施形態において、ポリペプチドは、ハンチンチンである。一部の実施形態において、ハンチンチンは、ハンチントン病に関連する突然変異を含む。

30

40

50

【 0 0 1 1 】

上記の態様および実施形態の一部の実施形態において、本発明は、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の RNA i をコードする核酸を含む発現コンストラクトを提供する。一部の実施形態において、RNA i をコードする核酸は、miRNA 足場を含む。一部の実施形態において、RNA i をコードする核酸は、プロモーターに機能するように連結されている。一部の実施形態において、プロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) 前初期プロモーター、RSV LTR、MoMLV LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 (PGK) プロモーター、シミアンウイルス 40 (SV40) プロモーター、CK6 プロモーター、トランスチレチンプロモーター (TTR)、TK プロモーター、テトラサイクリン応答プロモーター (TRE)、HBV プロモーター、hAAT プロモーター、LSP プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター (LSP)、E2F プロモーター、テロメラゼ (hTERT) プロモーター；サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベータ - アクチン/ウサギ - グロビンプロモーター (CAG) プロモーター、延長因子 1 - アルファプロモーター (EF1 - アルファ) プロモーター、ヒト - グルクロニダーゼプロモーター、ニワトリ - アクチン (CBA) プロモーター、レトロウイルス性のラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、および 13 - アクチンプロモーターから選択される。一部の実施形態において、発現コンストラクトは、ポリアデニル化シグナルをさらに含む。一部の実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル、SV40 のポリアデニル化シグナル、または HSV TK pA である。

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の実施形態のいずれか 1 つに記載の発現コンストラクトを含むベクターを提供する。一部の実施形態において、ベクターは、組換えアデノ関連ウイルス (rAAV) ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純疱疹ウイルス (HSV) ベクターである。一部の実施形態において、ベクターは、組換えアデノウイルスベクターである。一部の実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型 2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24 ~ 30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシ Ad3 型、イヌ Ad2 型、ヒツジ Ad、またはブタ Ad3 型から誘導される。一部の実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型 2 またはアデノウイルス血清型 5 のバリエーションから誘導される。一部の実施形態において、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。一部の実施形態において、組換えレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、ロスリバーウイルス (RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス (Mokala virus)、狂犬病ウイルス、RD114 またはそれらのバリエーションで偽型化したレンチウイルスから誘導される。一部の実施形態において、ベクターは、rHSV ベクターである。一部の実施形態において、rHSV ベクターは、rHSV - 1 または rHSV - 2 から誘導される。

【 0 0 1 3 】

上記の態様および実施形態の一部の実施形態において、ベクターは、rAAV ベクターである。一部の実施形態において、発現コンストラクトに、1 つまたはそれ以上の AAV の逆方向末端反復 (ITR) 配列が隣接する。一部の実施形態において、発現コンストラクトに、2 つの AAV の ITR が隣接する。一部の実施形態において、AAV の ITR は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギ AAV、ウシ AAV、またはマウス AAV 血清型の ITR である。一部の実施形態において、AAV の ITR は、AAV

2のITRである。一部の実施形態において、ベクターは、スタッファー核酸(stuffer nucleic acid)をさらに含む。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、RNAiをコードする核酸の上流または下流に配置されている。一部の実施形態において、ベクターは、自己相補的なrAAVベクターである。一部の実施形態において、ベクターは、RNAiをコードする第1の核酸配列およびRNAiの相補物をコードする第2の核酸配列を含み、第1の核酸配列は、その長さのほとんどまたは全てにわたり、第2の核酸配列と鎖内の塩基対を形成することができる。一部の実施形態において、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、突然変異したAAVのITRによって連結されており、突然変異したAAVのITRは、D領域の欠失を含み、末端分解配列(terminal resolution sequence)の突然変異を含む。一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のベクターのいずれか(例えば、rAAVベクター)を含む細胞を提供する。

10

【0014】

上記の態様および実施形態の一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のベクターのいずれかを含むウイルス粒子であって、ウイルス粒子は、rAAVベクターをキャプシド化するAAV粒子、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子、または組換えHSVベクターをキャプシド化するHSV粒子である、ウイルス粒子を提供する。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子である。一部の実施形態において、アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、またはブタAd3型由来のキャプシドを含む。一部の実施形態において、アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2のキャプシドまたはアデノウイルス血清型5のキャプシドのバリエーションを含む。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子である。一部の実施形態において、レンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114またはそれらのバリエーションで偽型化したキャプシドを含む。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、HSV粒子である。一部の実施形態において、HSV粒子は、rHSV-1粒子またはrHSV-2粒子である。

20

30

【0015】

一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のrAAVベクターのいずれかを含む組換えAAV粒子を提供する。一部の実施形態において、AAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAV V708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV、またはマウスAAVキャプシド、rAAV2-HBKOキャプシド(参照により本明細書に組み入れられるWO2015/168666を参照)を含む。一部の実施形態において、ITRおよびrAAVウイルス粒子のキャプシドは、同じAAV血清型から誘導される。一部の実施形態において、ITRおよびrAAVウイルス粒子のキャプシドは、異なるAAV血清型から誘導される。一部の実施形態において、ITRは、AAV2から誘導され、rAAV粒子のキャプシドは、AAV1から誘導される。一部の実施形態において、rAAVベクターは、5'から3'へ、AAV2のITR、プロモーター、RNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル、およびA

40

50

AAV2のITRを含む。一部の実施形態において、プロモーターは、CBAプロモーターである。一部の実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルである。一部の実施形態において、rAAVベクターは、5'から3'へ、AAV2のITRの全部または一部（例えば、機能的な部分）、CBAプロモーター、イントロン（例えば、キメライントロン）、RNAiをコードする核酸、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル、およびAAV2のITRを含む。一部の実施形態において、ベクターは、スタッファー核酸をさらに含む。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、レポーターポリペプチド（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP））をコードする核酸をさらに含む。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、RNAiをコードする核酸の上流または下流に配置されている。

10

【0016】

一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のいずれかを含む組成物（例えば、医薬組成物）を提供する。一部の実施形態において、組成物は、医薬的に許容される担体をさらに含む。

【0017】

一部の態様において、本発明は、本明細書に記載のRNAiのいずれかを含むキットを提供する。一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載のウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のいずれかを含む。一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載の組成物のいずれかを含む。一部の実施形態において、キットは、使用説明書をさらに含む。

20

【0018】

一部の態様において、本発明は、哺乳動物におけるハンチントン病を処置するための方法であって、配列5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5'-CGGGUCCAAGAUUGGACGGCCG-3'（配列番号2）を含む第2の核酸を含む第2の鎖、または配列5'-AGUCGGUGUGUGACAAGCA-3'（配列番号7）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5'-UGCUCUGUCAACCAACCCGACU-3'（配列番号8）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiを哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物におけるhttの発現を阻害するための方法であって、配列5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5'-CGGGUCCAAGAUUGGACGGCCG-3'（配列番号2）を含む第2の核酸を含む第2の鎖、または配列5'-AGUCGGUGUGUGACAAGCA-3'（配列番号7）を含む第1の核酸を含む第1の鎖、および配列5'-UGCUCUGUCAACCAACCAACCCGACU-3'（配列番号10）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiを哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物の細胞におけるhttの蓄積を阻害するための方法であって、配列5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5'-CGGGUCCAAGAUUGGACGGCCG-3'（配列番号2）を含む第2の核酸を含む第2の鎖、または配列5'-AGUCGGUGUGUGUGUGACAAGCA-3'（配列番号7）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5'-UGCUCUGUCAACCAACCAACCCGACU-3'（配列番号8）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiを哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。

30

40

【0019】

上記の方法の一部の実施形態において、第1の鎖は、配列番号1に対して約90%の同一性または配列番号7に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態において、第2の鎖は、配列番号2に対して約90%の同一性または配列番号8に対して約90%の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態において、第1の鎖および第2の鎖は、ループ構造を形成することが可能なRNAリンカーによって連結されている。一部の実施形態において、RNAリンカーは、4～50ヌクレオチドを含む。一部の実

50

施形態において、ループ構造は、4 ~ 20ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、RNA iは、5'から3'へ、第2の鎖、RNAリンカー、および第1の鎖を含む。一部の実施形態において、RNA iは、5'から3'へ、第1の鎖、RNAリンカー、および第2の鎖を含む。一部の実施形態において、RNA iは、配列番号4または配列番号10の核酸配列を含む。一部の実施形態において、RNA iは、配列番号4または配列番号10のヌクレオチド配列と約90%同一なヌクレオチド配列を含む。

【0020】

上記の方法の一部の実施形態において、RNA iは、発現コンストラクトにコードされている。一部の実施形態において、RNA iをコードする核酸は、miRNA足場を含む。一部の実施形態において、RNA iをコードする核酸は、プロモーターに機能するように連結されている。一部の実施形態において、プロモーターは、哺乳動物の脳でRNA iを発現させることが可能である。一部の実施形態において、プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーター、RSV LTR、MoMLV LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、CK6プロモーター、トランスチレチンプロモーター(TTR)、TKプロモーター、テトラサイクリン応答プロモーター(TRE)、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター(LSP)、E2Fプロモーター、テロメラーゼ(hTERT)プロモーター；サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベータ-アクチン/ウサギ-グロビン(CAG)プロモーター、延長因子1-アルファプロモーター(EF1-アルファ)プロモーター、およびヒト-グルクロニダーゼプロモーターから選択される。一部の実施形態において、プロモーターは、ハイブリッドニワトリ-アクチンプロモーターである。一部の実施形態において、核酸は、イントロンおよびポリアデニル化シグナルの全部または一部(例えば、機能的な部分)をさらに含む。一部の実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルであり、イントロンは、キメライントロンである。

【0021】

上記の方法の一部の実施形態において、RNA iは、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つに記載の発現コンストラクトを含むベクターにコードされている。一部の実施形態において、ベクターは、組換えアデノ関連ウイルス(rAAV)ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純疱疹ウイルス(HSV)ベクターである。一部の実施形態において、ベクターは、組換えアデノウイルスベクターである。一部の実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、またはブタAd3型から誘導される。一部の実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2またはアデノウイルス血清型5のバリエーションから誘導される。一部の実施形態において、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。一部の実施形態において、組換えレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114またはそれらのバリエーションで偽型化したレンチウイルスから誘導される。一部の実施形態において、ベクターは、rHSVベクターである。一部の実施形態において、rHSVベクターは、rHSV-1またはrHSV-2から誘導される。

【0022】

上記の方法の一部の実施形態において、ベクターは、rAAVベクターである。一部の実施形態において、発現コンストラクトに、1つまたはそれ以上のAAVの逆方向末端反復(ITR)配列が隣接する。一部の実施形態において、発現コンストラクトに、2つの

AAVのITRが隣接する。一部の実施形態において、AAVのITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型のITRである。一部の実施形態において、AAVのITRは、AAV2のITRである。一部の実施形態において、ベクターは、スタッファー核酸をさらに含む。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、プロモーターとRNAiをコードする核酸との間に配置されている。一部の実施形態において、ベクターは、自己相補的なrAAVベクターである。一部の実施形態において、ベクターは、RNAiをコードする第1の核酸配列およびRNAiの相補物をコードする第2の核酸配列を含み、第1の核酸配列は、その長さのほとんどまたは全てにわたり、第2の核酸配列と鎖内の塩基対を形成することができる。一部の実施形態において、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、突然変異したAAVのITRによって連結されており、突然変異したAAVのITRは、D領域の欠失を含み、末端分解配列の突然変異を含む。一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のベクター（例えば、rAAVベクター）のいずれかを含む細胞を提供する。

【0023】

上記の方法の一部の実施形態において、RNAiをコードするベクターは、ウイルス粒子中にあり、この場合、ウイルス粒子は、rAAVベクターをキャプシド化するAAV粒子、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子、または組換えHSVベクターをキャプシド化するHSV粒子である。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子である。一部の実施形態において、アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、またはブタAd3型由来のキャプシドを含む。一部の実施形態において、アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2のキャプシドまたはアデノウイルス血清型5のキャプシドのバリエーションを含む。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子である。一部の実施形態において、レンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114またはそれらのバリエーションで偽型化したキャプシドを含む。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、HSV粒子である。一部の実施形態において、HSV粒子は、rHSV-1粒子またはrHSV-2粒子である。

【0024】

上記の方法の一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のrAAVベクターのいずれかを含む組換えAAV粒子を提供する。一部の実施形態において、AAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAVV708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV、またはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドを含む。一部の実施形態において、ITRおよびrAAVウイルス粒子のキャプシドは、同じAAV血清型から誘導される。一部の実施形態において、ITRおよびrAAVウイルス粒子のキャプシドは、異なるAAV血清型から誘導される。一部の実施形態において、ITRは、AAV2から誘導され、rAAV粒子のキャプシドは、AAV1から誘導される。本発明は、本明細書に記載の実施形態の

10

20

30

40

50

いずれか1つに記載の発現コンストラクトを含むベクターを提供する。一部の実施形態において、ベクターは、組換えアデノ関連ウイルス(rAAV)ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純疱疹ウイルス(HSV)ベクターである。一部の実施形態において、ベクターは、組換えアデノウイルスベクターである。一部の実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、またはブタAd3型から誘導される。一部の実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2またはアデノウイルス血清型5のバリエーションから誘導される。一部の実施形態において、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。一部の実施形態において、組換えレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114またはそれらのバリエーションで偽型化したレンチウイルスから誘導される。一部の実施形態において、ベクターは、rHSVベクターである。一部の実施形態において、rHSVベクターは、rHSV-1またはrHSV-2から誘導される。

【0025】

上記の態様および実施形態の一部の実施形態において、ベクターは、rAAVベクターである。一部の実施形態において、発現コンストラクトに、1つまたはそれ以上のAAVの逆方向末端反復(ITR)配列が隣接する。一部の実施形態において、発現コンストラクトに、2つのAAVのITRが隣接する。一部の実施形態において、AAVのITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型のITRである。一部の実施形態において、AAVのITRは、AAV2のITRである。一部の実施形態において、ベクターは、スタッパー核酸をさらに含む。一部の実施形態において、スタッパー核酸は、プロモーターとRNAiをコードする核酸との間に配置されている。一部の実施形態において、ベクターは、自己相補的なrAAVベクターである。一部の実施形態において、ベクターは、RNAiをコードする第1の核酸配列およびRNAiの相補物をコードする第2の核酸配列を含み、第1の核酸配列は、その長さのほとんどまたは全てにわたり、第2の核酸配列と鎖内の塩基対を形成することができる。一部の実施形態において、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、突然変異したAAVのITRによって連結されており、突然変異したAAVのITRは、D領域の欠失を含み、末端分解配列の突然変異を含む。一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のベクター(例えば、rAAVベクター)のいずれかを含む細胞を提供する。

【0026】

上記の態様および実施形態の一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のベクターのいずれかを含むウイルス粒子であって、ウイルス粒子は、rAAVベクターをキャプシド化するAAV粒子、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子、または組換えHSVベクターをキャプシド化するHSV粒子である、ウイルス粒子を提供する。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子である。一部の実施形態において、アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu2

6、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、またはブタAd3型由来のキャプシドを含む。一部の実施形態において、アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2のキャプシドまたはアデノウイルス血清型5のキャプシドのバリエーションを含む。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子である。一部の実施形態において、レンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114またはそれらのバリエーションで偽型化したキャプシドを含む。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、HSV粒子である。一部の実施形態において、HSV粒子は、rHSV-1粒子またはrHSV-2粒子である。

10

【0027】

一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のrAAVベクターのいずれかを含む組換えAAV粒子を提供する。一部の実施形態において、AAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAVV708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV、またはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドを含む。一部の実施形態において、ITRおよびrAAVウイルス粒子のキャプシドは、同じAAV血清型から誘導される。一部の実施形態において、ITRおよびrAAVウイルス粒子のキャプシドは、異なるAAV血清型から誘導される。一部の実施形態において、ITRは、AAV2から誘導され、rAAV粒子のキャプシドは、AAV1から誘導される。一部の実施形態において、rAAVベクターは、5'から3'へ、AAV2のITR、プロモーター、RNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル、およびAAV2のITRを含む。一部の実施形態において、プロモーターは、CBAプロモーターである。一部の実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルである。一部の実施形態において、rAAVベクターは、5'から3'へ、AAV2のITR、CBAプロモーター、イントロン、RNAiをコードする核酸、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル、およびAAV2のITRを含む。一部の実施形態において、ベクターは、スタッファー核酸をさらに含む。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、プロモーターとRNAiをコードする核酸との間に配置されている。

20

30

【0028】

上記の方法の一部の実施形態において、ウイルス粒子(例えば、rAAV粒子)は、組成物(例えば、医薬組成物)中にある。一部の実施形態において、組成物は、医薬的に許容される担体をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

40

【0029】

【図1A】HttのmiRNA206(配列番号22)およびHttのmiRNA207(配列番号9)のDNA配列を示す図である。

【図1B】ssAAV2/1miRHtt.deのマップを示す図である。

【図1C-1】ssAAV2/1miRHtt.deのコード鎖の配列(配列番号16)およびssAAV2/1miRHtt.deの非コード鎖の配列(配列番号19)を示す図である。

【図1C-2】図1C-1の続き。

【図1C-3】図1C-2の続き。

【図1C-4】図1C-3の続き。

50

【図2】インビトロでのHtt低減を媒介するHttのmiRNA170XA、HttのmiRNA206およびHttのmiRNA207の能力を示す図である。値は、平均±SEMとして示される。

【図3】図3A～Bは、タンパク質（図3A）またはmRNA（図3B）によって測定した場合の、AAV2/1-HttのmiRNA206およびAAV2/1-HttのmiRNA207のHtt低減を媒介する能力を示す図である。CTL-3は、非コードmiRNA対照である。値は、平均±SEMとして示される。*は、CTL3マウスと有意に異なることを示す、 $p < 0.05$ ；ANOVA、続いてテューキーの事後検定。

【図4】図4A～Bは、AAV2/1-HttのmiRNA206およびAAV2/1-HttのmiRNA207の投与の1カ月後における体重（図4A）および脳の重量（図4B）を示す図である。CTL-3は、非コードmiRNA対照である。*CTL3対照マウスと有意に異なる、 $p < 0.05$ ；ANOVA、続いてテューキーの事後検定。

【図5-1】図5A～Dは、ヒトHttが、AAV2/1-miRNA-Htt-207が注射されたYAC128およびFVB野生型同腹子マウスの線条体を有意に低下させたことを示す図である。図5Aに、ヒトHTTタンパク質レベルを示す。図5Bに、マウスHTTタンパク質レベルを示す。図5Cに、ヒトHTTのmRNAレベルを示す。図5Dに、マウスHTTのmRNAレベルを示す。

【図5-2】図5-1の続き。

【図6】図6A～Bは、AAV2/1-miRNA-Htt-207での処置が、ロータロッド試験によって決定した場合のYAC128マウスにおける運動協調性の欠陥（図6A）およびポーソルト水泳試験を使用して決定した場合のYAC128マウスにおけるうつ状態の表現型（図6B）を修正できることを示す図である。マウスは、非コードRNA対照（CTL3）またはAAV2/1-miRNA-Htt-207（207）で処置した野生型（WT、またFVBとも称される）またはYAC128（YAC）のいずれかであった。図6の*は、野生型マウス、AAV2/1-miRNA-Htt-207で処置した野生型マウス、およびAAV2/1-miRNA-Htt-207で処置したYAC128マウスと比較した、CTL3非コードmiRNA対照マウスにおける有意な欠如を示す、 $p < 0.05$ ；ANOVA、続いてテューキーの事後検定。

【図7】図7A～Bは、感染後3カ月の体重（図7A）および脳の重量（図7B）を示す図である。マウスは、非コードRNA対照（CTL3）またはAAV2/1-miRNA-Htt-207（207）で処置した野生型（WT）またはYAC128（YAC）のいずれかであった。

【図8】自己相補的なmiRHtt207ベクターゲノムのマップを示す図である。CMV enh/ CBAプロモーターは、CMVエンハンサー/ニワトリベータアクチンプロモーターである。キメライントロンは、略記されたキメライントロンである。BGHは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。ITRは、末端分解配列（terminal resolution sequence）が欠失したAAVのITRである。

【図9】代替の自己相補的なmiRHtt207ベクターゲノムのマップを示す図である。CBAプロモーターは、ニワトリベータアクチンプロモーターである。キメライントロンは、短縮化されたキメライントロンである。BGHは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。

【発明を実施するための形態】

【0030】

一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を処置するためのRNAiであって、RNAiは、配列5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3'（配列番号2）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含み、第1の鎖および第2の鎖は、二重鎖を形成する、RNAiを提供する。一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を処置するためのRNAiであって、RNAiは、配列5'-AGUCGGUGUGGUUGACCAAGCA-3'（配列番号7）を含む第1の核酸を含む第1の鎖およ

10

20

30

40

50

び配列 5' - U G C U U G U C A A C C A C A C C G A C U - 3' (配列番号 8) を含む第 2 の核酸を含む第 2 の鎖を含み、第 1 の鎖および第 2 の鎖は、二重鎖を形成する、RNA i を提供する。一部の態様において、本発明は、本発明の開示の RNA i を含む、発現カセット、ベクター (例えば、組換え AAV、アデノウイルス、レンチウイルス、または HSV ベクター)、細胞、ウイルス粒子 (例えば、AAV、アデノウイルス、レンチウイルス、または HSV ウイルス粒子)、および医薬組成物を提供する。さらなる態様において、本発明は、哺乳動物において、ハンチントン病を処置するため、細胞における htt の発現を阻害するため、および htt の蓄積を阻害するための方法であって、本発明の開示の RNA i を含む医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。よりさらなる態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物において、ハンチントン病を処置するため (例えば、ハンチントン病の症状を緩和するため)、htt の発現を阻害するため、または細胞における htt の蓄積を阻害するための、本発明の開示の RNA i を含む医薬組成物の使用を提供する。さらなる追加の態様において、本発明は、本発明の開示の RNA i を含む、哺乳動物におけるハンチントン病を処置するためのキットを提供する。

10

【0031】

I. 一般的な技術

本明細書で記載または言及される技術および手順は、一般的によく認識され、当業者により従来の手法を使用して一般的に採用されており、このような手法は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook ら、第 4 版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel ら編、2003); Methods in Enzymology のシリーズ (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames および G.R. Taylor 編、1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow および Lane 編、1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney、第 6 版、J. Wiley and Sons、2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait 編、1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis 編、Academic Press、1998); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather および P.E. Roberts、Plenum Press、1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths、および D.G. Newell 編、J. Wiley and Sons、1993~8); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir および C.C. Blackwell 編、1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller および M.P. Calos 編、1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction、(Mullis ら編、1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan ら編、1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel ら編、J. Wiley and Sons、2002); Immunobiology (C.A. Janeway ら、2004); Antibodies (P. Finch、1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty、編、IRL Press、1988~1989); Monoclonal Antibodies: A P

20

30

40

50

ractical Approach (P. ShepherdおよびC. Dean編、Oxford University Press、2000) ; Using Antibodies : A Laboratory Manual (E. HarlowおよびD. Lane、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999) ; The Antibodies (M. ZanettiおよびJ. D. Capra編、Harwood Academic Publishers、1995) ; およびCancer : Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVitaら編、J. B. Lippincott Company、2011) に記載の広く利用されている手法である。

【0032】

10

II. 定義

「ベクター」は、本明細書で使用される場合、インビトロまたはインビボのいずれかで宿主細胞に送達しようとする核酸を含む組換えプラスミドまたはウイルスを指す。

【0033】

用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、本明細書で使用される場合、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかのあらゆる長さのヌクレオチドの多量体型を指す。したがって、この用語は、これらに限定されないが、一本鎖、二本鎖もしくは多重鎖のDNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、またはプリンおよびピリミジン塩基を含むポリマー、または他の天然の、化学的もしくは生化学的に修飾された、非天然の、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を包含する。ポリヌクレオチドの骨格は、糖およびリン酸基を含んでいてもよいし（典型的にRNAまたはDNAで見出されるように）、または修飾または置換された糖またはリン酸基を含んでいてもよい。代替として、ポリヌクレオチドの骨格は、ホスホロアミデートなどの合成サブユニットのポリマーを含んでいてもよく、したがってオリゴデオキシヌクレオシドホスホロアミデート ($P-NH_2$) または混成のホスホロアミデート-リン酸ジエステルオリゴマーであってもよい。加えて、二本鎖ポリヌクレオチドは、相補鎖を合成して適切な条件下で鎖をアニーリングすること、または適切なプライマーでのDNAポリメラーゼを使用して相補鎖をデノボ合成することのいずれかによる、化学合成の一本鎖ポリヌクレオチド産物から得ることができる。

20

【0034】

30

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、同義的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指し、最小の長さに限定されない。このようなアミノ酸残基のポリマーは、天然または非天然のアミノ酸残基を含有していてもよく、そのようなものとしては、これらに限定されないが、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量体、三量体、および多量体が挙げられる。全長タンパク質およびそれらのフラグメントはどちらも、この定義に含まれる。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアル化、アセチル化、リン酸化なども包含する。さらに、本発明の目的に関して、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持しさえすれば、ネイティブの配列に対する修飾、例えば欠失、付加、および置換（一般的に保存的な性質を有するもの）を包含するタンパク質も指す。これらの修飾は、例えば部位特異的変異誘発を介して計画的であってもよいし、または例えばPCR増幅によりタンパク質またはエラーを生じる宿主の突然変異を介して偶発的であってもよい。

40

【0035】

「組換えウイルスベクター」は、1つまたはそれ以上の異種配列（すなわち、ウイルス由来ではない核酸配列）を含む組換えポリヌクレオチドベクターを指す。組換えAAVベクターのケースにおいて、組換え核酸に、少なくとも1つの、一部の実施形態においては2つの逆方向末端反復配列 (ITR) が隣接する。

【0036】

「組換えAAVベクター (rAAVベクター)」は、少なくとも1つの、一部の実施形態においては2つのAAV逆方向末端反復配列 (ITR) が隣接する1つまたはそれ以上

50

の異種配列（すなわち、A A V由来ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。このようなr A A Vベクターは、好適なヘルパーウイルスに感染した（または好適なヘルパー機能を発現している）宿主細胞、ならびにA A Vのr e pおよびc a p遺伝子産物（すなわちA A VのR e pおよびC a pタンパク質）を発現している宿主細胞中に存在する場合、複製して感染性のウイルス粒子にパッケージ化することができる。r A A Vベクターが、より大きいポリヌクレオチドに（例えば、染色体中、またはクローニングまたはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター中に）取り込まれる場合、r A A Vベクターは、A A Vパッケージ化機能および好適なヘルパー機能の存在下で複製およびキャプシド化により「レスキュー」することができる「プロベクター」と称される場合もある。r A A Vベクターは、これらに限定されないが、脂質と複合体化した、リポソーム内にカプセル封入された、およびウイルス粒子、特にA A V粒子中にキャプシド化された、プラスミド、直鎖状人工染色体などの多数の形態のいずれかの形態であってもよい。r A A Vベクターは、「組換えアデノ関連ウイルス粒子（r A A V粒子）」を生成するために、A A Vウイルスのキャプシドにパッケージ化することができる。

【0037】

「組換えアデノウイルスベクター」は、少なくとも1つのアデノウイルス逆方向末端反復配列（I T R）が隣接する1つまたはそれ以上の異種配列（すなわち、アデノウイルス由来ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。一部の実施形態において、組換え核酸に、2つの逆方向末端反復配列（I T R）が隣接する。このような組換えウイルスベクターは、組換えウイルスゲノムから欠失した必須のアデノウイルス遺伝子（例えば、E 1遺伝子、E 2遺伝子、E 4遺伝子など）を発現している宿主細胞中に存在する場合、複製して感染性のウイルス粒子にパッケージ化することができる。組換えウイルスベクターが、より大きいポリヌクレオチドに（例えば、染色体中、またはクローニングまたはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター中に）取り込まれる場合、組換えウイルスベクターは、アデノウイルスパッケージ化機能の存在下で複製およびキャプシド化により「レスキュー」することができる「プロベクター」と称される場合もある。組換えウイルスベクターは、これらに限定されないが、脂質と複合体化した、リポソーム内にカプセル封入された、およびウイルス粒子、例えばアデノウイルス粒子中にキャプシド化された、プラスミド、直鎖状人工染色体などの多数の形態のいずれかの形態であってもよい。組換えウイルスベクターは、「組換えアデノウイルス粒子」を生成するために、アデノウイルスウイルスのキャプシドにパッケージ化することができる。

【0038】

「組換えレンチウイルスベクター」は、少なくとも1つのレンチウイルス末端反復配列（L T R）が隣接する1つまたはそれ以上の異種配列（すなわち、レンチウイルス由来ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。一部の実施形態において、組換え核酸に、2つのレンチウイルスの末端反復配列（L T R）が隣接する。このような組換えウイルスベクターは、好適なヘルパー機能の影響を受けた宿主細胞中に存在する場合、複製して感染性のウイルス粒子にパッケージ化することができる。組換えレンチウイルスベクターは、「組換えレンチウイルス粒子」を生成するために、レンチウイルスのキャプシドにパッケージ化することができる。

【0039】

「組換え単純ヘルペスベクター（組換えH S Vベクター）」は、H S V末端反復配列が隣接する1つまたはそれ以上の異種配列（すなわち、H S V由来ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。このような組換えウイルスベクターは、好適なヘルパー機能の影響を受けた宿主細胞中に存在する場合、複製して感染性のウイルス粒子にパッケージ化することができる。組換えウイルスベクターが、より大きいポリヌクレオチドに（例えば、染色体中、またはクローニングまたはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター中に）取り込まれる場合、組換えウイルスベクターは、H S Vパッケージ化機能の存在下で複製およびキャプシド化により「レスキュー」することができる「プロベクター」と称される場合もある。組換えウイルスベクターは、これらに限

10

20

30

40

50

定されないが、脂質と複合体化した、リポソーム内にカプセル封入された、およびウイルス粒子、例えばH S V粒子中にキャプシド化されたプラスミド、直鎖状人工染色体などの多数の形態のいずれかの形態であってもよい。組換えウイルスベクターは、「組換え単純ヘルペスウイルス粒子」を生成するために、H S Vキャプシドにパッケージ化することができる。

【0040】

「異種」は、比較されるかまたは導入されるかまたは取り込まれる物体の残部の遺伝子型と別個の遺伝子型を有する物体から誘導されたことを意味する。例えば、遺伝子工学技術によって異なる細胞型に導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（発現される場合、異種ポリペプチドをコードすることができる）。同様に、ウイルスベクターに取り入れられる細胞性の配列（例えば、遺伝子またはそれらの一部）は、そのベクターに関して異種ヌクレオチド配列である。

10

【0041】

用語「導入遺伝子」は、細胞に導入されて、RNAに転写させることができ、場合により適切な条件下で翻訳および/または発現させることができるポリヌクレオチドを指す。態様において、導入遺伝子は、それが導入される細胞に所望の特性を付与するか、またはそれ以外の方法で所望の治療または診断結果をもたらす。別の態様において、導入遺伝子は、miRNA、siRNA、またはshRNAなどのRNA干渉を媒介する分子に転写することができる。

【0042】

「ニワトリ - アクチン(CBA)プロモーター」は、ニワトリ - アクチン遺伝子(例えば、GenBankのEntrez遺伝子番号396526で示されるニワトリ(Gallus gallus)ベータアクチン)から誘導されたポリヌクレオチド配列を指す。「ニワトリ - アクチンプロモーター」は、本明細書で使用される場合、サイトメガロウイルス(CMV)初期エンハンサーエレメントを含有するプロモーター、ニワトリ - アクチン遺伝子のプロモーターならびに第1のエクソンおよびイントロン、ならびにウサギベータ - グロビン遺伝子のスプライスアクセプター、例えばMiyazaki, J.ら(1989)Gene 79(2):269~77に記載の配列を指す場合がある。用語「CAGプロモーター」は、本明細書で使用される場合、同義的に使用される場合がある。用語「CMV初期エンハンサー/ニワトリベータアクチン(CAG)プロモーター」は、本明細書で使用される場合、同義的に使用される場合がある。

20

30

【0043】

用語「ゲノム粒子(gp)」、「ゲノム等価体」、または「ゲノムコピー」は、ウイルス力価への言及で使用される場合、感染力または機能性に関係なく、組換えAAVのDNAゲノムを含有するピリオンの数を指す。特定のベクター調製物中のゲノム粒子の数は、本明細書の実施例、または例えばClarkら(1999)Hum. Gene Ther.、10:1031~1039; Veldwijkら(2002)Mol. Ther.、6:272~278に記載されるような手順によって測定することができる。

【0044】

用語「ベクターゲノム(vg)」は、本明細書で使用される場合、ベクター、例えばウイルスベクターの一連のポリヌクレオチド配列を含む1つまたはそれ以上のポリヌクレオチドを指す場合がある。ベクターゲノムは、ウイルス粒子中にキャプシド化されていてもよい。特定のウイルスベクターに応じて、ベクターゲノムは、一本鎖DNA、二本鎖DNA、または一本鎖RNA、もしくは二本鎖RNAを含んでいてもよい。ベクターゲノムは、特定のウイルスベクターに関連する内因性配列、および/または組換え技術を介して特定のウイルスベクターに挿入されたあらゆる異種配列を包含していてもよい。例えば、組換えAAVベクターゲノムは、プロモーターの端にある少なくとも1つのITR配列、スタッファー、目的の配列(例えば、RNAi)、およびポリアデニル化配列を包含していてもよい。完全なベクターゲノムは、ベクターのポリヌクレオチド配列の完全なセットを包含していてもよい。一部の実施形態において、ウイルスベクターの核酸の力価は、vg

40

50

/mLを単位として測定することができる。この力価を測定するのに好適な方法は、当業界において公知である（例えば、定量PCR）。

【0045】

用語「阻害する」は、本明細書で使用される場合、特定の標的の存在または活性をブロックする、低減する、消去する、またはそれ以外の方法で拮抗する作用を指す場合がある。阻害は、部分的な阻害または完全な阻害を指す場合がある。例えば、遺伝子の発現を阻害するとは、その遺伝子の発現の遮断、低減、消去、または他のあらゆる拮抗作用、例えばmRNA量の低減（例えば、mRNA転写のサイレンシング）、mRNAの分解、mRNA翻訳の阻害などを引き起こすあらゆる作用を指す場合がある。一部の実施形態において、HTTの発現を阻害するとは、HTTの発現の遮断、低減、消去、または他のあらゆる拮抗作用、例えばHTTのmRNA量の低減（例えば、HTTのmRNA転写のサイレンシング）、HTTのmRNAの分解、HTTのmRNA翻訳の阻害などを指す場合がある。別の例として、細胞中のタンパク質の蓄積を阻害するとは、そのタンパク質の発現の遮断、低減、消去、または他の拮抗作用、例えばmRNA量の低減（例えば、mRNA転写のサイレンシング）、mRNAの分解、mRNA翻訳の阻害、タンパク質の分解などを引き起こすあらゆる作用を指す場合がある。一部の実施形態において、細胞中のHTTタンパク質の蓄積を阻害するとは、細胞中のHTTタンパク質の発現の遮断、低減、消去、または他の拮抗作用、例えばHTTのmRNA量の低減（例えば、HTTのmRNA転写のサイレンシング）、HTTのmRNAの分解、HTTのmRNA翻訳の阻害、HTTタンパク質の分解などを指す。

10

20

【0046】

用語「感染単位（i.u.）」、「感染性粒子」、または「複製単位」は、ウイルス力価への言及で使用される場合、例えばMcLaughlinら（1988）J. Virol.、62：1963～1973に記載されるような、複製中心のアッセイとしても公知の感染中心のアッセイによって測定した場合、感染性および複製能を有する組換えAAVベクター粒子の数を指す。

【0047】

用語「形質導入単位（t.u.）」は、ウイルス力価への言及で使用される場合、本明細書の実施例、または例えばXiaoら（1997）Exp. Neurobiol.、144：113～124；またはFisherら（1996）J. Virol.、70：520～532（LFUアッセイ）に記載されるような機能アッセイで測定した場合、機能的な導入遺伝子産物の生産を引き起こす感染性の組換えAAVベクター粒子の数を指す。

30

【0048】

「逆方向末端反復」または「ITR」配列は、当業界でよく理解されている用語であり、逆方向でウイルスゲノムの末端で見出される相対的に短い配列を指す。

【0049】

「AAV逆方向末端反復（ITR）」配列は、当業界でよく理解されている用語であり、ネイティブの一本鎖AAVゲノムの両方の末端に存在するおよそ145ヌクレオチドの配列である。ITRの最も外側の125ヌクレオチドは、異なるAAVゲノム間および単一のAAVゲノムの2つの末端の間に不均質性をもたらす2つの択一的な方向のいずれかに存在していてもよい。最も外側の125ヌクレオチドはまた、自己相補性を有する数種のより短い領域（A、A'、B、B'、C、C'およびD領域と指定される）も含有し、それによりITRのこの部分内で鎖内の塩基対形成を起こすことが可能になる。

40

【0050】

「末端分解配列」または「trs」は、ウイルスDNAの複製中にAAVのrepタンパク質によって切断されるAAVのITRのD領域における配列である。突然変異末端分解配列は、AAVのrepタンパク質による切断に対して耐性を有する。

【0051】

「AAVのヘルパー機能」は、AAVを宿主細胞により複製してパッケージ化することを可能にする機能を指す。AAVのヘルパー機能は、これらに限定されないが、AAV複

50

製およびパッケージ化に役立つヘルパーウイルスまたはヘルパーウイルス遺伝子などの多数の形態のいずれかで提供することができる。他の A A V のヘルパー機能は、遺伝毒性物質などの分野において公知である。

【 0 0 5 2 】

A A V のための「ヘルパーウイルス」は、A A V（これは、欠陥パルボウイルスである）を宿主細胞により複製してパッケージ化することを可能にするウイルスを指す。ヘルパーウイルスは、A A V の複製を可能にする「ヘルパー機能」を提供する。このようなヘルパーウイルスが多数同定されており、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、およびボックスウイルス、例えばワクシニアおよびバキュロウイルスなどが挙げられる。アデノウイルスは、多数の異なるサブグループを包含するが、サブグループ C のアデノウイルス 5 型（A d 5）が最も一般的に使用される。ヒト、ヒト以外の哺乳類および鳥類由来の数多くのアデノウイルスが公知であり、A T C C などの受託機関より入手可能である。A T C C などの受託機関より同様に入手可能なヘルペス科のウイルスとしては、例えば、単純疱疹ウイルス（H S V）、エプスタイン・バーウイルス（E B V）、サイトメガロウイルス（C M V）および仮性狂犬病ウイルス（P R V）が挙げられる。A A V 複製に関するアデノウイルスのヘルパー機能の例としては、E 1 A 機能、E 1 B 機能、E 2 A 機能、V A 機能および E 4 o r f 6 機能が挙げられる。受託機関より入手可能なバキュロウイルスとしては、アウトグラフィ・カリフォルニカ（A u t o g r a p h a c a l i f o r n i c a）の核多角体病ウイルスが挙げられる。

【 0 0 5 3 】

r A A V の調製は、感染性の A A V 粒子と感染性のヘルパーウイルス粒子との比率が、少なくとも約 $10^2 : 1$ ；少なくとも約 $10^4 : 1$ 、少なくとも約 $10^6 : 1$ ；または少なくとも約 $10^8 : 1$ であるかまたはそれより高い場合、ヘルパーウイルスを「実質的に含まない」と述べられる。一部の実施形態において、調製物も、それに相当する量のヘルパーウイルスタンパク質（すなわち、上記のヘルパーウイルス粒子の不純物が崩壊した形態で存在する場合、このようなレベルのヘルパーウイルスの結果として存在すると予想されるようなタンパク質）を含まない。ウイルスおよび/または細胞タンパク質の汚染は、S D S ゲルにおけるクーマシー染色バンドの存在（例えば、A A V キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2 および V P 3 に対応するバンド以外のバンドの出現）として一般的に観察することができる。

【 0 0 5 4 】

参照ポリペプチドまたは核酸配列に対する「パーセント（％）配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性が達成されるように配列を並べ、必要に応じてギャップを導入した後の、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮しない、参照ポリペプチドまたは核酸配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドと同一な候補配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージと定義される。アミノ酸または核酸配列同一性のパーセントを決定する目的のためのアライメントは、当業界における能力の範囲内の様々な方法で、例えば、公共的に利用可能なコンピューターソフトウェアプログラム、例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y（A u s u b e l ら編、1987）、増刊 30、セクション 7.7.18、表 7.7.1 に記載されるもの、および B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N または M e g a l i g n（D N A S T A R）ソフトウェアなどを使用して達成することができる。好ましいアライメントプログラムは、A L I G N P l u s（S c i e n t i f i c a n d E d u c a t i o n a l S o f t w a r e、P e n n s y l v a n i a）である。当業者は、比較される配列の全長にわたり最大のアライメントを達成するのに必要なあらゆるアルゴリズムなど、アライメントを測定するための適切なパラメーターを決定することができる。本明細書に記載の目的のために、所与のアミノ酸配列 B への、それとの、またはそれに対する所与のアミノ酸配列 A の % アミノ酸配列同一性（代替として、所与のアミノ酸配列 B への、それとの、またはそれに対する特定の % アミノ酸配列同一性を有するかまたは含む所与のアミノ酸配列 A と表すこともできる）は、以下のように計算される： $100 \times \text{分数 } X / Y$ （

式中Xは、そのプログラムのAおよびBのアライメントにおいて、配列アライメントプログラムによって同一なマッチとスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である）。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さに等しくない場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性と等しくないと予想されることが理解される。本明細書に記載の目的のために、所与の核酸配列Dへの、それとの、またはそれに対する所与の核酸配列Cの%核酸配列同一性（代替として、所与の核酸配列Dへの、それとの、またはそれに対する特定の%核酸配列同一性を有するかまたは含む所与の核酸配列Cと表すこともできる）は、以下のように計算される： $100 \times \text{分数} W / Z$ （式中Wは、そのプログラムのCおよびDのアライメントにおいて、配列アライメントプログラムによって同一なマッチとスコア付けされたヌクレオチドの数であり、Zは、D中のヌクレオチドの総数である）。核酸配列の長さCが核酸配列Dの長さに等しくない場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性と等しくないと予想されることが理解される。

10

【0055】

「単離された」分子（例えば、核酸またはタンパク質）または細胞は、それが、その天然の環境の要素から同定され分離および/または回収されていることを意味する。

【0056】

「有効量」は、臨床結果などの（例えば、症状の緩和、臨床評価項目の達成などの）有益な、または所望の結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1回またはそれ以上の投与で投与することができる。病状の観点から、有効量は、疾患を緩和する、安定化する、またはその発症を遅延させるのに十分な量である。

20

【0057】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、これらに限定されないが、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒトおよびサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）が挙げられる。ある特定の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

【0058】

「処置」は、本明細書で使用される場合、有益な、または所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目的に関して、有益な、または所望の臨床結果としては、これらに限定されないが、検出可能かまたは検出不可能かにかかわらず、症状の軽減、疾患の程度の低減、疾患の安定化された（例えば、悪化しない）状況、疾患の拡大（例えば、転移）の予防、疾患進行の遅延または減速、病状の緩和または一時的緩和、および寛解（部分的かまたは完全化かどうかにかかわらず）が挙げられる。「処置」はまた、処置を受けない場合に予測される生存と比較した生存の延長を意味する場合もある。

30

【0059】

用語「予防的処置」は、本明細書で使用される場合、個体が、障害を有するかまたは障害を有するリスクを有することがわかっているかまたはその疑いがあるが、障害の症状がないかまたは最小の症状を示す場合の処置を指す。予防的処置を受けている個体は、症状の発病の前に処置される。

【0060】

40

「ハンチントン病（HD）」は、典型的にはHTT遺伝子（akaハンチンチン、HDまたはIT15）の突然変異によって引き起こされる進行性の脳障害を指す。ハンチントン病は、異常な動き（舞蹈病と呼ばれる）、運動機能の段階的な損失、情緒的または精神医学的な疾患、および次第に損なわれていく認知力などの症状によって特徴付けることができる。ほとんどの症状は30代および40代で出現するが、疾患の若年型も観察されている。HDのさらなる説明に関しては、OMIM登録番号143100号を参照されたい。

【0061】

「ハンチンチン（HTT）」は、ハンチントン病のほとんどのケースと関連する遺伝子またはそれらのポリペプチド産物のどちらを指すこともできる。ハンチンチンの正常な機能は、十分に理解されていない。しかしながら、ハンチンチン遺伝子の突然変異は、HD

50

を引き起こすことが公知である。これらの突然変異は、典型的には常染色体優性に遺伝し、H T T遺伝子におけるトリヌクレオチドC A Gリピートの拡大をもたらし、H t tタンパク質においてポリグルタミン（ポリQ）鎖を生じさせる。

【0062】

「RNAi」は、本明細書で使用される場合、細胞においてRNA干渉を誘導するあらゆるRNA分子を指す場合がある。RNAiの例としては、これらに限定されないが、低分子阻害性RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、および小ヘアピンRNA（shRNA）が挙げられる。

【0063】

「miRNA足場」は、（i）RNAiによるノックダウンのための目的の遺伝子を標的化する二本鎖配列、および（ii）内因性miRNAのものと類似したステム-ループ構造を形成する追加の配列を含有するポリヌクレオチドを指す場合がある。RNAiのための目的の遺伝子を標的化する配列（例えば、短い、約20ntの配列）は、miRNA様のステム-ループを作り出す配列、およびポリヌクレオチドがmiRNA様の二次構造に組み立てられたときに、目的の配列と塩基対を形成して、二重鎖を形成する配列にライゲートすることができる。この二重鎖は、本明細書に記載される場合、不完全にハイブリダイズする、例えば、二重鎖は、1つまたはそれ以上の対合していないまたは誤って対合した塩基を含有していてもよい。このポリヌクレオチドがダイサーによって切断されると、この目的の遺伝子を標的化する配列を含有する二重鎖は、巻き戻されて、RISC複合体に取り込まれる可能性がある。miRNA足場は、miRNAそれ自体を指す場合もあるし、またはmiRNAをコードするDNAポリヌクレオチドを指す場合もある。miRNA足場の例は、miR-155配列である（Lagos-Quintana, M.ら（2002）Curr. Biol. 12:735~9）。miRNA足場に配列をクローニングするための市販のキットが当業界において公知である（例えば、Life Technologies、Thermo Fisher Scientific；Waltham、MAからのInvitrogen（商標）BLOCK-iT（商標）Pol II miRNAi発現ベクターキット）。

【0064】

「バルジ」は、本明細書で使用される場合、二重鎖核酸中のそれと反対側の核酸に非相補的な核酸の領域を指す。例えば、バルジは、二重鎖核酸中の反対側の核酸に非相補的な核酸配列であって、バルジに、二重鎖核酸中の反対側の核酸に相補的な核酸の領域が隣接するものを指す場合がある。一部の例において、バルジは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10塩基または10塩基より長い長さのいずれかであり得る。一部の例において、バルジは、誤った対合の結果であってもよい（例えば、反対側の鎖が非相補的な塩基を含有する）、またはバルジは、対合しないことの結果であってもよい（例えば、反対側の鎖は、バルジに隣接する核酸に相補的な核酸を含むが、反対側の鎖は、バルジと反対側の核酸を含有しない）。

【0065】

本明細書で使用される場合、用語「センス」核酸は、導入遺伝子の全部または一部をコードする配列を含む核酸である。一部の例において、導入遺伝子の場合のmRNAは、センス核酸である。

【0066】

「アンチセンス」核酸は、本明細書で使用される場合、「センス」核酸に相補的な核酸の配列である。例えば、アンチセンス核酸は、導入遺伝子をコードするmRNAに相補的であってもよい。

【0067】

RNAiの「ガイド領域」は、本明細書で使用される場合、典型的には相補性に基づいて、標的mRNAと結合するRNAiの鎖である。相補性を有する領域は、ガイド領域の全部または一部を包含し得る。典型的には、相補性を有する領域は、少なくともシード領域を包含する。多くの場合において、RNAiのアンチセンス領域は、ガイド領域である。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される場合、RNAiの「パッセンジャー領域」、または「非ガイド領域」は、本明細書では同義的に使用されており、ガイド領域に相補的なRNAiの領域である。多くの場合において、RNAiのセンス領域は、パッセンジャー領域である。

【 0 0 6 9 】

RNAi（例えば、miRNA）の「シード領域」は、本明細書で使用される場合、マイクロRNAの長さが約1～8ヌクレオチドの領域である。一部の例において、その標的mRNAのシード領域および3'-UTRは、RNAi認識における主要な決定要素であり得る。

【 0 0 7 0 】

「オフターゲットの遺伝子サイレンシング」は、本明細書で使用される場合、RNAiのシード領域と意図されないmRNAの3'-UTR中の配列との対合を指し、それらの転写物の翻訳の抑制および不安定化を指示する（例えば、意図されないmRNAの発現を低減する）。

【 0 0 7 1 】

本明細書における値またはパラメーターに「関して」という言及は、その値またはパラメーターそれ自体を対象とした実施形態を包含する（説明する）。例えば、「Xに関して」と言及されている説明は、「X」の説明を包含する。

【 0 0 7 2 】

単数形の冠詞「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、複数形の指示対象も包含する。

【 0 0 7 3 】

本明細書に記載の発明の態様および実施形態は、態様および実施形態を「含む」、「からなる」、および/または「本質的にからなる」ことを包含することが理解される。

【 0 0 7 4 】

III. RNAi

一部の態様において、本発明は、ハンチントン病の処置のための、huntingtin RNAを標的化する改善されたRNAiを提供する。一部の実施形態において、RNAiは、低分子阻害性RNA(sRNA)、マイクロRNA(miRNA)、または小ヘアピンRNA(shRNA)である。低分子阻害性または干渉RNA(siRNA)は、長さがおおよそ19～25（例えば、19～23）塩基対の、細胞中でRNAiを誘導する二本鎖RNA分子として当業界で公知である。小ヘアピンRNA(shRNA)は、短いループ（例えば、約4～11ヌクレオチド）によって連結された二本鎖RNAのおおよそ19～25（例えば、19～23）塩基対を含む、細胞中でRNAiを誘導するRNA分子として当業界で公知である。一部の実施形態において、RNAiは、第1の鎖および第2の鎖を含み、a)第1の鎖および第2の鎖は、二重鎖を形成し；b)第1の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、核酸配列5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）または5'-AGUCGGUGUGGUUGACCAAGCA-3'（配列番号7）を含み；c)第2の鎖は、非ガイド領域を含む。一部の実施形態において、ガイド領域の核酸は、核酸配列5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）を含み、非ガイド領域は、配列5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCCA-3'（配列番号2）を含む。他の実施形態において、ガイド領域の核酸は、核酸配列5'-AGUCGGUGUGGUUGACCAAGCA-3'（配列番号7）を含み、非ガイド領域は、配列5'-UGCUCUGUCAACCAACACCGACU-3'（配列番号8）を含む。

【 0 0 7 5 】

一部の実施形態において、第1の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態において、第1の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、5'-UGGCCGUGCCAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）に対して、約

10

20

30

40

50

75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含むが、少なくとも1つのCpGモチーフを維持する。一部の実施形態において、第1の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAAGCA-3'（配列番号7）に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態において、第1の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAAGCA-3'（配列番号7）に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含むが、少なくとも1つのCpGモチーフを維持する。一部の実施形態において、第2の鎖は、非ガイド領域を含み、非ガイド領域は、5'-CGGGUCCAAAGAU
GGACGGCCA-3'（配列番号2）に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含む。一部の
実施形態において、第2の鎖は、非ガイド領域を含み、非ガイド領域は、5'-CGGGUCCAAAGAU
GGACGGCCA-3'（配列番号2）に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸
配列を含むが、少なくとも1つのCpGモチーフを維持する。一部の実施形態において、
第2の鎖は、非ガイド領域を含み、非ガイド領域は、5'-UGCUGUCAACCA
CACCGACU-3'（配列番号8）に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含む。一部の
実施形態において、第2の鎖は、非ガイド領域を含み、非ガイド領域は、5'-UGCUGU
UCAACCA
CACCGACU-3'（配列番号8）に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列
を含むが、少なくとも1つのCpGモチーフを維持する。

【0076】

一部の実施形態において、RNAiは、配列番号4の核酸配列を含む。一部の実施形態において、RNAiは、配列番号4に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含む。一部の
実施形態において、RNAiは、配列番号4に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含むが、
少なくとも1つの配列を維持する（例えば、シード配列中に）。一部の実施形態において、RNAiは、miRNA-207である。他の実施形態において、RNAiは、miRNA-206である。

【0077】

一部の実施形態において、RNAiは、配列番号10の核酸配列を含む。一部の実施形態において、RNAiは、配列番号10に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含む。一部の
実施形態において、RNAiは、配列番号10に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い同一性を有する核酸配列を含むが、
少なくとも1つのCpG配列を維持する（例えば、シード配列中に）。一部の実施形態において、RNAiは、miRNA-207である。一部の実施形態において、RNAiは、miRNA-206である。

【0078】

マイクロRNA(miRNA)は、ループによって連結された二本鎖RNAの短い（例えば、19~25塩基対の）配列を含み、1つまたはそれ以上のバルジ（例えば、誤って対合したまたは対合していない塩基対）を含む二本鎖RNAの1つまたはそれ以上の追加の配列を含有する、細胞中でRNAiを誘導するRNA分子として当業界で公知である。用語「miRNA」は、本明細書で使用される場合、内因性miRNAに加えて、外因性または異種miRNAも包含する。一部の実施形態において、「miRNA」は、プリmiRNAまたはプレmiRNAを指す場合がある。miRNAのプロセシング中に、プリmiRNAの転写が起こる。プリmiRNAは、ドロージャ-DGCR8によってプロセ

10

20

30

40

50

シングされて、5' フランキング領域、ガイド鎖、ループ領域、非ガイド鎖、および3' フランキング領域；または5' フランキング領域、非ガイド鎖、ループ領域、ガイド鎖、および3' フランキング領域を有するプレmiRNAが残るように1つまたはそれ以上の配列を切り出すことによってプレmiRNAが生産される。次いでプレmiRNAは細胞質に運び出され、ダイサーによってプロセシングされて、ガイド鎖および非ガイド（またはパッセンジャー）鎖を有するsiRNAが生じる。次いでガイド鎖は、RISC複合体によって使用され、例えばガイド鎖に相補的な標的RNA配列を認識することによって遺伝子サイレンシングを触媒する。miRNAのさらなる説明は、例えば、WO2008/150897で見出すことができる。miRNAによる標的配列の認識は、主として、標的と、miRNAのシード配列、例えばガイド鎖のヌクレオチド1～8（5' から3' ）との対合によって決定される（例えば、Boudreau, R. L. ら（2013）Nucleic Acids Res. 41: e9を参照）。

10

【0079】

プリ/プレmiRNA構造において、二重鎖中のガイド鎖：非ガイド鎖の境界は、部分的に相補的な塩基対形成（例えば、ワトソン-クリック塩基対形成）を介して形成される。しかしながら、一部の実施形態において、この相補的な塩基対形成は、二重鎖全体に及ばない。一部の実施形態において、境界中のバルジは、1つまたはそれ以上のヌクレオチド位置に存在し得る。用語「バルジ」は、本明細書で 사용되는場合、二重鎖中でそれと反対側の核酸に非相補的な核酸の領域を指す場合がある。一部の実施形態において、バルジは、中央の非相補的領域の領域は結合しないが、相補的核酸の領域が互いに結合するときに形成される。一部の実施形態において、バルジは、2つの相補的領域間に位置する核酸の2つの鎖が異なる長さを有する場合に形成される。後述するように、バルジは、1つまたはそれより多くのヌクレオチドを含み得る。

20

【0080】

miRNAのプロセシング中に、miRNAは、ガイド鎖：非ガイド鎖の境界に隣接する切断部位で切断されることにより、ガイドおよび非ガイド鎖のsiRNA二重鎖を放出する。一部の実施形態において、miRNAは、切断部位に隣接するセンスまたはアンチセンス鎖中にバルジを含む。言い換えれば、一部の実施形態において、miRNAは、シード配列に隣接するガイドまたは非ガイド鎖中にバルジを含む。図1Aを参照されたい。

【0081】

30

一部の実施形態において、miRNAは、成熟非ガイド鎖の5' 切断部位と反対側のガイド鎖中に、バルジを含む。一部の実施形態において、miRNAは、非ガイド鎖の5' ヌクレオチドと反対側に、バルジを含む。一部の実施形態において、miRNAは、成熟ガイド鎖の3' 切断部位と反対側のセンス鎖中に、バルジを含む。一部の実施形態において、miRNAは、ガイド鎖の3' ヌクレオチドと反対側に、バルジを含む。

【0082】

一部の実施形態において、RNAiは、第1の鎖および第2の鎖を含み、a) 第1の鎖および第2の鎖は、二重鎖を形成し；b) 第1の鎖は、少なくとも11塩基のガイド領域を含み、ガイド領域は、ガイド鎖の塩基1～Nを含むシード領域を含み、N=7またはN=8であり；c) 第2の鎖は、少なくとも11塩基の非ガイド領域を含み、非ガイド領域は、二重鎖中のガイド領域の塩基1～(N+2)のいずれか1つまたはそれ以上の反対側に、バルジ配列を含む。一部の実施形態において、N=7であり、バルジは、ガイド領域の塩基1、2、3、4、5、6、7、8、または9の反対側にある。他の実施形態において、N=8であり、バルジは、ガイド領域の塩基1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の反対側にある。

40

【0083】

一部の実施形態において、RNAiは、第1の鎖および第2の鎖を含み、a) 第1の鎖および第2の鎖は、二重鎖を形成し；b) 第1の鎖は、少なくとも10塩基のガイド領域を含み、ガイド領域は、ガイド鎖の塩基1～Nを含むシード領域を含み、N=7またはN=8であり；c) 第2の鎖は、少なくとも10塩基の非ガイド領域を含み、非ガイド領域

50

は、二重鎖中のガイド領域の塩基 1 ~ (N + 1) のいずれか 1 つまたはそれ以上の反対側に、バルジ配列を含む。一部の実施形態において、N = 7 であり、バルジは、ガイド領域の塩基 1、2、3、4、5、6、7、または 8 の反対側にある。他の実施形態において、N = 8 であり、バルジは、ガイド領域の塩基 1、2、3、4、5、6、7、8、または 9 の反対側にある。

【 0 0 8 4 】

一部の実施形態において、非ガイド領域は、二重鎖中のガイド領域の塩基 1 ~ N のいずれか 1 つまたはそれ以上の反対側に、バルジ配列を含む。一部の実施形態において、N = 7 であり、バルジは、ガイド領域の塩基 1、2、3、4、5、6 または 7 の反対側にある。他の実施形態において、N = 8 であり、バルジは、ガイド領域の塩基 1、2、3、4、5、6、7 または 8 の反対側にある。

10

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態において、RNA_i は、第 1 の鎖および第 2 の鎖を含み、a) 第 1 の鎖および第 2 の鎖は、二重鎖を形成し、b) 第 1 の鎖は、少なくとも 9 塩基のガイド領域を含み、ガイド領域は、ガイド鎖の塩基 2 ~ 7 または 2 ~ 8 を含むシード領域を含み、c) 第 2 の鎖は、少なくとも 9 塩基の非ガイド領域を含み、非ガイド領域は、二重鎖中のガイド領域の塩基 1 または塩基 9 の反対側に、バルジ配列を含む。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態において、RNA_i は、第 1 の鎖および第 2 の鎖を含み、a) 第 1 の鎖および第 2 の鎖は、二重鎖を形成し、b) 第 1 の鎖は、少なくとも 9 塩基のガイド領域を含み、ガイド領域は、ガイド鎖の塩基 2 ~ 7 または 2 ~ 8 を含むシード領域を含み、c) 第 2 の鎖は、少なくとも 9 塩基の非ガイド領域を含み、非ガイド領域は、二重鎖中のガイド領域の塩基 1 の反対側に、バルジ配列を含む。

20

【 0 0 8 7 】

一部の実施形態において、バルジは、ガイド領域における相補的な塩基が欠失した、二重鎖中の非ガイド鎖の 1 つまたはそれ以上の塩基によって形成され、バルジに、ガイド鎖と対合する塩基が隣接する。一部の実施形態において、バルジ配列は、約 1 ~ 1 0 ヌクレオチドを有する。一部の実施形態において、バルジ配列は、約 2 ~ 1 5 ヌクレオチドを有する。一部の実施形態において、バルジ配列は、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、または約 1 5 ヌクレオチドを有する。

30

【 0 0 8 8 】

RNA_i ベースの療法の安全性は、意図されない mRNA に結合してそれらの発現を低減する低分子阻害性 RNA (siRNA) の能力、すなわちオフターゲットの遺伝子サイレンシングとして公知的作用によって妨害される。オフターゲットイングは、主として、シード領域 (低分子 RNA のヌクレオチド 2 ~ 8) が意図されない mRNA の 3' - UTR 中の配列と対合して、それらの転写物の翻訳の抑制および不安定化を指示するときに起こる。オフターゲットイングが低減された RNA_i は、ガイドおよび非ガイド配列内の塩基を置換すること；例えば CpG モチーフを作り出すことによって、設計することができる。より有意に低いオフターゲットスコアをもたらす可能性がある置換は、SiSPOTR アルゴリズム、すなわちオフターゲットイングの可能性および有力なサイレンシング能力が最小の候補配列を同定する特異性に焦点を当てた siRNA 設計アルゴリズムを使用して評価することができる (Boudreau ら、Nucleic Acids Res. 2013 年 1 月；41 (1) e9。SiSPOTR スコアの低減は、親の RNA_i 分子と比較してより少数の可能性のあるヒトのオフターゲットを有する配列を予測する。本発明の一部の実施形態において、RNA_i は、オフターゲットの遺伝子サイレンシングを低減するように改善されている。一部の実施形態において、RNA_i は、1 つまたはそれ以上の CpG モチーフを含む。一部の実施形態において、RNA_i は、シード領域中に 1 つまたはそれ以上の CpG モチーフを含む。

40

【 0 0 8 9 】

50

一部の実施形態において、第 1 の鎖および第 2 の鎖は、ループ構造を形成することが可能な RNA（例えば、RNA リンカー）によって連結されている。一般的に当業界で公知のように、RNA ループ構造（例えば、ステム - ループまたはヘアピン）は、RNA 分子が、一緒に塩基対を形成しない RNA 配列によって隔てられた一緒に塩基対形成する 2 つの RNA 配列を含む場合に形成される。例えば、配列 A および C が一緒に塩基対形成するようにそれらは相補的であるかまたは部分的に相補的であるが、配列 B 中の塩基は一緒に塩基対を形成しない場合、RNA 分子 A - B - C でループ構造が形成される可能性がある。

【0090】

一部の実施形態において、ループ構造を形成することが可能な RNA は、4 ~ 50 ヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態において、ループ構造を形成することが可能な RNA は、13 ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ループを形成することが可能な RNA 中のヌクレオチドの数は、4 ~ 50 ヌクレオチドまたはその間のあらゆる整数である。一部の実施形態において、ループの 0 ~ 50 % が、ループの別の部分に相補的であってもよい。本明細書で使用される場合、用語「ループ構造」は、核酸の 2 つの相補鎖をつなぐ配列である。一部の実施形態において、ループ構造の 1 ~ 3 ヌクレオチドは核酸の相補鎖に隣接しており、ループ構造の遠位部分の 1 ~ 3 ヌクレオチドに相補的であってもよい。例えば、ループ構造の 5' 末端における 3 つのヌクレオチドは、ループ構造の 3' 末端における 3 つのヌクレオチドに相補的であってもよい。

【0091】

一部の実施形態において、本発明の開示の RNAi をコードする核酸は、異種 miRNA 足場を含む。一部の実施形態において、異種 miRNA 足場の使用は、miRNA 発現を調節する；例えば、miRNA 発現を増加させる、または miRNA 発現を減少させるために使用される。当業界において公知のあらゆる miRNA 足場を使用することができる。一部の実施形態において、miRNA 足場は、miR-155 足場から誘導される（例えば、Lagos-Quintana, M. ら (2002) Curr. Biol. 12: 735 ~ 9 および Life Technologies、Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA からの Invitrogen (商標) BLOCK-iT (商標) Pol II miRNAi 発現ベクターキットを参照）。

【0092】

IV. ハンチントン病およびその実験モデル

ハンチントン病 (HD) は、ハンチンチン遺伝子 (HTT) のエクソン 1 における CAG リピートの拡大によって引き起こされる遺伝性神経変性疾患である。結果生じた N 末端領域中のポリグルタミン鎖の伸長は、突然変異ハンチンチンタンパク質 (mHtt) に毒性の機能獲得をもたらす。mHtt の毒性は、不溶性 mHtt を含有する凝集体の形成、転写調節異常、およびタンパク質ホメオスタシスにおける不安定さに起因する可能性があり、これらは全て、ニューロンの死によって引き起こされる可能性がある (Saudou ら (1998) Cell, 95: 55 ~ 66; Zuccato ら (2003) Nat. Genet. 35: 76 ~ 83; Schaffar ら (2004) Mol. Cell. 15: 95 ~ 105; Benn ら、(2008) J. Neurosci. 28: 10720 ~ 10733)。HD を有する患者における病理学的所見としては、皮質が薄くなること、および線条体ニューロンの著しい進行性消失が挙げられる (Rosas ら、(2002) Neurology 58: 695 ~ 701)。疾患の発病は、典型的には、人生の 30 代から 40 代の間に起こり、症状としては、舞蹈病に似た動き、協調の損失、進行性認知症、および他の精神医学的障害が挙げられる (Vonsattel ら、(1985) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 44: 559 ~ 577)。ほとんどの場合、症状は、30 歳から 40 歳の間に、運動技能、認知、および人格の潜行性の崩壊を伴って出現し始める。時間が経つにつれて、これらは、ぎくしゃくしたコントロール不可能な動きおよび筋肉のコントロールの損失、認知症、ならびにうつ病などの精神医学的な疾患、攻撃性、不安、ならびに強迫行動に進む。典型的には、症状発病から 10 ~ 15 年後に死に至る。HD のケースの 10 % 未満は、より速い疾患の進行を特徴とする疾患の若

10

20

30

40

50

年発症型を含む。米国人 10,000 人中およそ 1 人が、HD を有すると考えられる。

【0093】

ほぼ 20 年にわたり HD の遺伝学的基礎が認識されるようになってきたが、現行の療法は主として緩和的なものであり、疾患の根本的な原因に対処していない。これは、この疾患の原因論は複雑であり、多種多様の細胞プロセスで有害作用が観察されているという事実の一部起因する可能性が高い。したがって、医薬開発の焦点は、主要な厄介な誘因、すなわち突然変異 HTT 遺伝子それ自体に対処することに向けられてきた。

【0094】

HD のほとんどのケースは、HTT 遺伝子におけるトリヌクレオチド CAG リピートの拡大に関連している。HTT 遺伝子における CAG リピートの数は、HD の症状発現と強く相関する。例えば、35 個またはそれ未満のリピートを有する個体は、典型的には HD を発症しないが、27 ~ 35 個のリピートを有する個体は、子孫が HD を有するより高いリスクを有する。36 から 40 ~ 42 個のリピートを有する個体は、HD の不完全浸透を示し、それに対して 40 ~ 42 個より多くのリピートを有する個体は、完全浸透を示す。若年発症 HD のケースは、60 またはそれより多くの CAG リピートのサイズに関連する可能性がある。

【0095】

この CAG リピートの拡大の結果生じるポリ Q が拡大した Htt タンパク質は、細胞の凝集体または封入体、タンパク質ホメオスタシスにおける不安定さ、および転写調節異常と関連する。これらの毒性の表現型は体全体にわたって見られるが、最も典型的には、これらは CNS におけるニューロン性細胞の死と関連する。HD 患者は、皮質が薄くなること、および線条体ニューロンの著しい進行性消失を示すことが多い。線条体は、HD における脳中の最も弱い領域（特に線条体の中型有棘ニューロン）と考えられており、初期の作用は被殻および尾状核で見られる。HD 患者の脳では、線条体の有棘ニューロンにおける細胞死、星状細胞数の増加、および小グリア細胞の活性化が観察されている。また HD は、海馬、大脳皮質、視床、視床下部、および小脳の特定の領域に影響を与える可能性もある。

【0096】

Htt 発現をブロックするための提唱されているアプローチとしては、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) の使用に加えて、二重鎖 RNA (dsRNA) または化学修飾された一本鎖 RNA (ssRNA) のいずれかを使用する RNA 干渉 (RNAi) が挙げられる (Harper ら、(2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 5820 ~ 5825; DiFiglia ら、(2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 17204 ~ 17209; Boudreau ら、(2009b) Mol. Ther. 17: 1053 ~ 1063; Drouet ら、(2009) Ann. Neurol. 65: 276 ~ 285; Sah ら、(2011) J. Clin. Invest. 121: 500 ~ 507; Matsui ら、(2012) Drug Discov. Today 17: 443 ~ 450; Yu ら、(2012) Cell 150: 895 ~ 908)。しかしながら、ASO アプローチを診療施設に転用することへの障害としては、ASO の CNS への繰り返しの長期にわたる点滴を容易にするためのデバイスを取り入れる必要があること、および大脳中の標的領域に薬物を適切に分布させる必要があることを挙げることができる。

【0097】

これらの起こり得る ASO に関する問題を回避するために、安全性の増加、効率の増加、およびより長く続く効能をもたらす可能性がある RNAi (例えば、siRNA) の AAV 媒介発現を採用することが有利な場合がある。HD 患者は突然変異および野生型 Htt 対立遺伝子の両方を発現するため、siRNA 標的配列の大部分は、両方の対立遺伝子を分解させる可能性が高いと予想される。しかしながら、HD マウスにおける対立遺伝子特異的ではない Htt サイレンシングは、十分許容されることが示されており、突然変異 Htt 単独を低減するのと同じ利益をもたらすことができる (Boudreau ら、(2

10

20

30

40

50

009b) Mol. Ther. 17:1053~1063; Drouetら、(2009) Ann. Neurol. 65:276~285; Kordasiewiczら、(2012) Neuron 74(6):1031~1044)。さらに、AAV媒介RNAi後の非ヒト霊長類の被殻における野生型Httの部分的および持続的な抑制は、いかなる不都合な作用も有さなかったことが報告されており、これは、成体の脳は、低下したレベルの野生型Httを許容できることを示唆する(McBrideら、(2011) Mol. Ther. 19:2152~2162; Grondinら、(2012) Brain 135:1197~1209)。

【0098】

考えられる治療戦略、例えば本発明の開示の組成物および方法を試験するために、HDの動物モデルを使用することができる。HDのマウスモデルが当業界において公知である。そのようなものとしては、突然変異HTTのフラグメントを有するマウスモデル、例えばR6/1およびN171-82Q HDマウスが挙げられる(Harperら、(2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:5820~5825、Rodriguez-Lebronら、(2005) Mol. Ther. 12:618~633、Machidaら、(2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. 343:190~197)。本明細書に記載のマウスHDモデルの別の例は、YAC128マウスモデルである。このモデルは、128個のCAGリピートを有する突然変異ヒトHTT遺伝子を発現する酵母人工染色体(YAC)を有し、YAC128マウスは、12月齢までに線条体において顕著な広範にわたるHtt凝集体の蓄積を示す(Slowら、(2003) Hum. Mol. Genet. 12:1555~1567、Pouladiら、(2012) Hum. Mol. Genet. 21:2219~2232)。

【0099】

HDの他の動物モデルも使用することができる。例えば、トランスジェニックラット(von Horsten, S.ら(2003) Hum. Mol. Genet. 12:617~24)およびアカゲザル(Yang, S.H.ら(2008) Nature 453:921~4)モデルが説明されている。非遺伝的モデルも公知である。これらは、ほとんどの場合、げっ歯類または非ヒト霊長類において線条体ニューロンの細胞死を誘導するための、興奮毒性の化合物(例えばキノリン酸またはカイニン酸)またはミトコンドリアの毒素(例えば3-ニトロプロピオン酸およびマロン酸)の使用を含む(さらなる説明および参考文献については、Ramawamy, S.ら(2007) ILAR J. 48:356~73を参照)。

【0100】

V. ハンチントン病を処置するための方法

一部の態様において、本発明は、哺乳動物におけるハンチントン病を処置するための方法および組成物であって、本発明の開示の医薬組成物(例えば、本発明の開示のウイルス粒子を含む医薬組成物)を哺乳動物に投与することを含む、方法および組成物を提供する。一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物におけるh ttの発現を阻害するための方法および組成物であって、本発明の開示の医薬組成物(例えば、本発明の開示のウイルス粒子を含む医薬組成物)を哺乳動物に投与することを含む、方法および組成物を提供する。一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物の細胞におけるh ttの蓄積を阻害するための方法および組成物であって、本発明の開示の医薬組成物(例えば、本発明の開示のウイルス粒子を含む医薬組成物)を哺乳動物に投与することを含む、方法および組成物を提供する。

【0101】

一部の態様において、本発明は、HDの症状を緩和するための方法および組成物であって、本発明の開示のRNAiをコードするベクターを含む組換えウイルス粒子の有効量を哺乳動物の脳に投与することを含む、方法および組成物を提供する。一部の実施形態において、HDの症状としては、これらに限定されないが、舞蹈病、硬直、コントロール不可

10

20

30

40

50

能な体の動き、筋肉コントロールの損失、協調運動障害、情動不安、眼球運動の遅延、異常な身振り、不安定さ、失調歩行、異常な顔の表情、言語障害、咀嚼および/または嚥下の困難さ、睡眠障害、発作、認知症、認知障害（例えば、計画、抽象的思考、柔軟性、ルール獲得、対人感受性、自己コントロール、注意力、学習、および記憶に関する能力の減退）、うつ病、不安、人格の変化、攻撃性、強制行動、強迫行動、性欲過剰、精神病、無感動、興奮性、自殺念慮、体重の減少、筋萎縮、心不全、グルコース耐性の低下、精巣萎縮、および骨粗鬆症が挙げられる。

【0102】

一部の態様において、本発明は、HDの進行を予防するかまたは遅延させる方法を提供する。常染色体優性のHDは、遺伝子型解析することが可能な遺伝病である。例えば、HTT中のCAGリピートの数は、PCRベースのリピートのサイジングによって決定することができる。このタイプの診断は、人生のあらゆる段階で、若い個体または成体を直接試験すること（例えば、臨床症状の出現に合わせて）、出生前スクリーニングまたは出生前除外の検査（例えば、絨毛膜絨毛のサンプリングまたは羊水穿刺によって）、または胎芽の着床前スクリーニングを介して実行することができる。そのようなものとして、本明細書に記載の方法は、症状の発現前に診断を行うことができるため、HDの予防的処置として使用することができる。例えば、HDを遺伝子検査（出生前検査、出生時検査など）によって診断し、症状の発現（例えば、CNS細胞の損失）の前に予防的に処置して（例えば、本明細書に記載のrAAV粒子を使用して）、HDの症状の発現および/または進行を予防することができる。HD患者は、脳の画像化により見られるように、尾状核および/もしくは被殻および/もしくは皮質の萎縮ならびに/または脳室の拡大を示す場合がある。これらの症状は、HDの家族歴および/または臨床症状と組み合わせて、HDを示す可能性がある。

【0103】

HDの症状の緩和を決定するための手段は、当業界において公知である。例えば、ハンチントン病統一評価尺度（Unified Huntington's Disease Rating Scale; UHDRS）を使用して、運動機能、認知機能、行動異常、および機能的能力を評価することができる（例えば、Huntington Study Group (1996) Movement Disorders 11:136~42を参照）。この評価尺度は、HD日常生活動作尺度（HD Activities and Daily Living Scale）、マースデンおよびクインの舞蹈病重症度尺度（Marsden and Quinn's chorea severity scale）、身体障害および自立性の尺度（Physical Disability and Independence scale）、HD運動性評価尺度（HD motor rating scale; HDMRS）、HD機能的能力尺度（HD functional capacity scale; HDFCS）、および定量的神経学的検査（quantitated neurological exam; QNE）などの試験からの要素を取り入れた、疾患の病理の様々な側面に関する一律の包括的試験を提供するために開発された。HDの症状の緩和を決定するのに有用な他の試験としては、これらに限定されないが、モントリオール認知評価検査（Montreal Cognitive Assessment）、脳の撮像（例えば、MRI）、カテゴリー流暢性検査（Category Fluency Test）、トレイルメイキングテスト、マップサーチ、ストループの文字読み取り検査（Stroop Word Reading Test）、加速タッピング課題（Speeded Tapping Task）、および符号数字モダリティ検査（Symbol Digit Modalities Test）を挙げることができる。

【0104】

本発明の一部の態様において、本方法および本組成物は、HDを有するヒトを処置するために使用される。上述したように、HDは、常染色体優性の方式で遺伝し、HTT遺伝子におけるCAGリピートの拡大によって引き起こされる。若年発症HDは、ほとんどの場合、父方から遺伝する。ハンチントン病様の表現型はまた、他の遺伝子座、例えばHD

10

20

30

40

50

L 1、P R N P、H D L 2、H D L 3、およびH D L 4との相関も示されてきた。G R I N 2 A、G R I N 2 B、M S X 1、G R I K 2、およびA P O E 遺伝子における突然変異など、他の遺伝子座がH Dの症状の発現を改変する可能性があると考えられる。

【 0 1 0 5 】

一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物においてh t t のm R N Aを標的化するための改善されたR N A iを提供する。一部の実施形態において、R N A iは、配列5' - U G G C C G U C C A U C U U G G A C C C G - 3' (配列番号1)を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5' - C G G G U C C A A G A U G G A C G G C C A - 3' (配列番号2)を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含む。本明細書に記載のR N A i (例えば、r A A Vベクターの一部として)は、とりわけハンチントン病の処置において用途を見出すことができる。

10

【 0 1 0 6 】

一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物におけるh t t m R N Aを標的化するための改善されたR N A iを提供する。一部の実施形態において、R N A iは、配列5' - A G U C G G U G U G G U U G A C A A G C A - 3' (配列番号7)を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5' - U G C U U G U C A A C C A C A C C G A C U - 3' (配列番号8)を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含む。本明細書に記載のR N A i (例えば、r A A Vベクターの一部として)は、とりわけハンチントン病を処置することにおいて用途がある可能性がある。

20

【 0 1 0 7 】

本発明の一部の実施形態において、R N A iは、オフターゲットの遺伝子サイレンシングを低減するように改善されている。一部の実施形態において、R N A iは、1つまたはそれ以上のC p Gモチーフを含む。一部の実施形態において、R N A iは、シード領域中に1つまたはそれ以上のC p Gモチーフを含む。

【 0 1 0 8 】

一部の実施形態において、第1の鎖は、配列番号1に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%のいずれかより高い同一性を有する核酸配列を含むが、C p Gモチーフを維持する。一部の実施形態において、第2の鎖は、配列番号2に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%のいずれかより高い同一性を有する核酸配列を含むが、C p Gモチーフを維持する。

30

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態において、第1の鎖は、配列番号7に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%のいずれかより高い同一性を有する核酸配列を含むが、C p Gモチーフを維持する。一部の実施形態において、第2の鎖は、配列番号8に対して、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%のいずれかより高い同一性を有する核酸配列を含むが、C p Gモチーフを維持する。

【 0 1 1 0 】

一部の実施形態において、R N A iは、低分子阻害性R N A (s i R N A)、マイクロR N A (m i R N A)、または小ヘアピンR N A (s h R N A)である。低分子阻害性または干渉R N A (s i R N A)は、長さがおよそ19~25 (例えば、19~23)塩基対の、細胞中でR N A iを誘導する二本鎖R N A分子として当業界で公知である。小ヘアピンR N A (s h R N A)は、短いループ (例えば、約4~11ヌクレオチド)によって連結された二本鎖R N Aのおよそ19~25 (例えば、19~23)塩基対を含む、細胞中でR N A iを誘導するR N A分子として当業界で公知である。

40

【 0 1 1 1 】

一部の実施形態において、m i R N Aは、配列番号1と約90%同一なガイド配列を含む。一部の実施形態において、m i R N Aは、配列番号1に、約90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%

50

同一、99%同一、または100%同一のいずれかであるガイド配列を含む。

【0112】

一部の実施形態において、miRNAは、配列番号2と約90%同一な非ガイド配列を含む。一部の実施形態において、miRNAは、配列番号2に、約90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、または100%同一のいずれかである非ガイド配列を含む。

【0113】

一部の実施形態において、miRNAは、配列番号7と約90%同一なガイド配列を含む。一部の実施形態において、miRNAは、配列番号7に、90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、または100%同一のいずれかであるガイド配列を含む。

10

【0114】

一部の実施形態において、miRNAは、配列番号8と約90%同一な非ガイド配列を含む。一部の実施形態において、miRNAは、配列番号8に、90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、または100%同一のいずれかである非ガイド配列を含む。

【0115】

一部の実施形態において、第1の鎖および第2の鎖は、ループ構造を形成することが可能なRNAによって連結されている。一般的に当業界で公知のように、RNAループ構造（例えば、ステム-ループまたはヘアピン）は、RNA分子が、一緒に塩基対を形成しないRNA配列によって隔てられた一緒に塩基対形成する2つのRNA配列を含む場合に形成される。例えば、配列AおよびCと一緒に塩基対形成するようにそれらは相補的であるかまたは部分的に相補的であるが、配列B中の塩基は一緒に塩基対を形成しない場合、RNA分子A-B-Cでのループ構造が形成される可能性がある。

20

【0116】

一部の実施形態において、ループ構造を形成することが可能なRNAは、4~50ヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態において、ループ構造を形成することが可能なRNAは、13ヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態において、ループ構造を形成することが可能なRNAは、ヌクレオチド配列GUUUUGGCCACUGACUGAC（配列番号13）を含む。一部の実施形態において、ベクターゲノムは、配列番号13の配列に、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のいずれかであるヌクレオチド配列を含む。

30

【0117】

一部の態様において、本発明は、配列5'-UGGCCGUC CAUCUUGGACCCG-3'（配列番号1）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5'-CGGGUCC AAGAUGGACGGCCA-3'（配列番号2）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiを、哺乳動物（例えば、HDを有する哺乳動物）に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、RNAiを含む。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、rAAVベクターをキャプシド化するAAV粒子、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子、または組換えHSVベクターをキャプシド化するHSV粒子であり、rAAVベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはHSVベクターは、RNAiをコードする。

40

【0118】

一部の態様において、本発明は、配列5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAAGCA-3'（配列番号7）を含む第1の核酸および配列5'-UGC UU GUCAACCAACAACCGACU-3'（配列番号8）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiを哺乳動物（例えば、HDを有する哺乳動物）に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、RNAiを含む。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、rAAVベクターをキャプシド化するAAV粒子、組換えアデノ

50

ウイルスベクターをキャプシド化するアデノウイルス粒子、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド化するレンチウイルス粒子、または組換えHSVベクターをキャプシド化するHSV粒子であり、rAAVベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはHSVベクターは、RNAiをコードする。

【0119】

一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の送達は、脳へのウイルス粒子の注射によってなされる。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の送達は、線条体へのウイルス粒子の注射によってなされる。線条体内投与は、高度にHDの影響を受けている脳、線条体（被殻および尾状核を包含する）の領域に、組換えウイルス粒子を送達することである。それに加えて、理論に縛られることは望まないが、線条体に注射された組換えウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）は、これらに限定されないが、投射野（例えば、皮質）などの脳の他の領域に（例えば、逆行性輸送を介して）分散させることもできると考えられる。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、対流強化送達（例えば、線条体への対流強化送達）によって送達される。

10

【0120】

一部の態様において、本発明は、哺乳動物におけるハンチントン病を処置するための方法であって、本発明の開示の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物の細胞におけるhttの蓄積を阻害するための方法であって、本発明の開示の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。一部の態様において、本発明は、ハンチントン病を有する哺乳動物におけるhttの発現を阻害するための方法であって、本発明の開示の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。一部の実施形態において、httは、突然変異htt（例えば、35個より多く、36個より多く、37個より多く、38個より多く、39個より多く、40個より多く、41個より多く、または42個より多くのCAGリピートを含むhtt）である。一部の実施形態において、野生型httの発現および/または蓄積も阻害される。本明細書に記載される場合、理論に縛られることは望まないが、HDを有する哺乳動物における突然変異httの発現および/または蓄積の阻害は、大いに有益であるが、副作用（例えば、本発明の開示のRNAiの）としての同じ哺乳動物における野生型httの発現および/または蓄積の阻害は、十分許容される可能性がある（例えば、意図されない副作用をほとんどまたは全く引き起こさない）と考えられる。

20

30

【0121】

一部の実施形態において、細胞は、ベクター（例えば、本発明の開示のRNAiをコードする発現コンストラクトを含むベクター）を含む。一部の実施形態において、ベクターは、rAAVベクターである。一部の実施形態において、ベクターは、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純疱疹ウイルス（HSV）ベクターである。一部の実施形態において、細胞は、中枢神経系（CNS）細胞である。

【0122】

一部の実施形態において、本発明の開示のRNAiをコードするベクターを含む組換えウイルス粒子の有効量を投与することにより、投与部位がまたはその近くでニューロン（例えば、有棘ニューロンなどの線条体ニューロン）が形質導入される。一部の実施形態において、ニューロンの約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%または100%のいずれかより多くが形質導入される。一部の実施形態において、ニューロンの約5%～約100%、約10%～約50%、約10%～約30%、約25%～約75%、約25%～約50%、または約30%～約50%が形質導入される。miRNAを発現する組換えウイルス粒子が形質導入されたニューロンを同定する方法は、当業界において公知であり；例えば、免疫組織化学、RNA検出（例えば、qPCR、ノーザンブロッティング、RNA-seq、インサイチュハイブリダイゼーションなど）または強化緑色蛍光タンパク質などの共発現されたマーカーの使用が、発現を検出するのに使用することができる。

40

50

【 0 1 2 3 】

本発明の一部の実施形態において、本方法は、H Dを有する哺乳動物、例えばヒトを処置するための本発明の開示のRNAiをコードするベクターを含む組換えウイルス粒子の有効量を哺乳動物の脳に投与することを含む。一部の実施形態において、組成物は、脳中の1つまたはそれ以上の場所に注射されて、少なくともそのニューロン中で本発明の開示のRNAiを発現させる。一部の実施形態において、組成物は、脳中の、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個のいずれか1つまたは10個より多くの場所に注射される。一部の実施形態において、組成物は、線条体に注射される。一部の実施形態において、組成物は、背面の線条体に注射される。一部の実施形態において、組成物は、被殻に注射される。一部の実施形態において、組成物は、尾状核に注射される。一部の実施形態において、組成物は、被殻および尾状核に注射される。

10

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、脳の一方の半球に投与される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、脳の両方の半球に投与される。

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、1つより多くの場所に同時または逐次的に投与される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の複数回の注射は、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、9時間、12時間または24時間以下の間隔があげられる。

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態において、本発明は、本発明の開示のRNAiをコードする組換えウイルスベクターを含む医薬組成物の有効量を投与して、突然変異HTTの活性を抑制することによる、H Dを有するヒトを処置するための方法を提供する。一部の実施形態において、医薬組成物は、1つまたはそれ以上の医薬的に許容される賦形剤を含む。

20

【 0 1 2 7 】

一部の実施形態において、本方法は、本発明の開示のRNAiをコードする組換えウイルスベクターを含む医薬組成物の有効量を投与して、突然変異HTTの活性を抑制することを含む。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、少なくとも約 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 、または 50×10^{12} ゲノムコピー/mLのいずれかである。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、約 $5 \times 10^{12} \sim 6 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12} \sim 7 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12} \sim 8 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12} \sim 9 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 11 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12} \sim 15 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12} \sim 20 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12} \sim 30 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ 、または $50 \times 10^{12} \sim 100 \times 10^{12}$ ゲノムコピー/mLのいずれかである。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、約 $5 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 、または $25 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ ゲノムコピー/mLのいずれかである。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、少なくとも約 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 、または 50×10^9 形質導入単位/mLのいずれかである。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、約 $5 \times 10^9 \sim 6 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9 \sim 7 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9 \sim 8 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 11 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9 \sim 20 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9 \sim 25 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9 \sim 30 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$ または $50 \times 10^9 \sim 100 \times 10^9$ 形質導入単位/mLのいずれかである。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、約 $5 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 10×10^9

30

40

50

$\sim 1.5 \times 10^9$ 、 $1.5 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^9$ 、または $2.5 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^9$ 形質導入単位/mLのいずれかである。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、少なくとも約 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1.0×10^{10} 、 1.1×10^{10} 、 1.5×10^{10} 、 2.0×10^{10} 、 2.5×10^{10} 、 3.0×10^{10} 、 4.0×10^{10} 、または 5.0×10^{10} 感染単位/mLのいずれかである。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、少なくとも約 $5 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10} \sim 7 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10} \sim 8 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10} \sim 9 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10} \sim 1.0 \times 10^{10}$ 、 $1.0 \times 10^{10} \sim 1.1 \times 10^{10}$ 、 $1.1 \times 10^{10} \sim 1.5 \times 10^{10}$ 、 $1.5 \times 10^{10} \sim 2.0 \times 10^{10}$ 、 $2.0 \times 10^{10} \sim 2.5 \times 10^{10}$ 、 $2.5 \times 10^{10} \sim 3.0 \times 10^{10}$ 、 $3.0 \times 10^{10} \sim 4.0 \times 10^{10}$ 、 $4.0 \times 10^{10} \sim 5.0 \times 10^{10}$ 、または $5.0 \times 10^{10} \sim 1.00 \times 10^{10}$ 感染単位/mLのいずれかである。一部の実施形態において、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルスの力価は、少なくとも約 $5 \times 10^{10} \sim 1.0 \times 10^{10}$ 、 $1.0 \times 10^{10} \sim 1.5 \times 10^{10}$ 、 $1.5 \times 10^{10} \sim 2.5 \times 10^{10}$ 、または $2.5 \times 10^{10} \sim 5.0 \times 10^{10}$ 感染単位/mLのいずれかである。

10

【0128】

一部の実施形態において、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、体重1kg当たり少なくとも約 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$ ゲノムコピーのいずれかである。一部の実施形態において、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、体重1kg当たり約 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$ ゲノムコピーのいずれかである。

20

【0129】

一部の実施形態において、個体に投与されるウイルス粒子の総量は、少なくとも約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{14}$ ゲノムコピーのいずれかである。一部の実施形態において、個体に投与されるウイルス粒子の総量は、約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{14}$ ゲノムコピーのいずれかである。

【0130】

本発明の一部の実施形態において、線条体に注射される組成物の体積は、約1 μ l、2 μ l、3 μ l、4 μ l、5 μ l、6 μ l、7 μ l、8 μ l、9 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l、50 μ l、75 μ l、100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l、もしくは1mLのいずれか1つ、またはその間のいずれかの量より多くである。

30

【0131】

一部の実施形態において、組成物の第1の体積が、脳の第1の領域に注射され、組成物の第2の体積が、脳の第2の領域に注射される。例えば、一部の実施形態において、組成物の第1の体積が、尾状核に注射され、組成物の第2の体積が、被殻に注射される。一部の実施形態において、組成物の1Xの体積が、尾状核に注射され、組成物の1.5X、2X、2.5X、3X、3.5X、または4Xの体積が、被殻に注射され、ここでXは、約1 μ l、2 μ l、3 μ l、4 μ l、5 μ l、6 μ l、7 μ l、8 μ l、9 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l、50 μ l、75 μ l、100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l、もしくは1mLのいずれか1つ、またはその間のいずれかの量より多くの体積である。

40

【0132】

本発明の組成物（例えば、本発明の開示のRNAiをコードするベクターを含む組換えウイルス粒子）は、単独で、またはHDを処置するための1つまたはそれ以上の追加の治療剤と組み合わせてのいずれかで使用することができる。逐次的な投与間の間隔は、少なくとも数分、数時間、または数日（または代替としてそれ未満）の単位であってもよい。

【0133】

V. RNAi発現コンストラクトおよびベクター

本発明は、本明細書に記載のRNAiの発現のための発現コンストラクト、ベクターおよびウイルス粒子を提供する。

50

【0134】

一部の実施形態において、本発明の開示のRNAiをコードする核酸は、異種miRNA足場を含む。一部の実施形態において、異種miRNA足場の使用は、miRNA発現を調節する；例えば、miRNA発現を増加させるか、またはmiRNA発現を減少させるのに使用される。当業界において公知のあらゆるmiRNA足場を使用することができる。一部の実施形態において、miRNA足場は、miR-155足場から誘導される（例えば、Lagos-Quintana, M.ら(2002) Curr. Biol. 12: 735~9およびLife Technologies、Thermo Fisher Scientific; Waltham, MAからのInvitrogen(商標) BLOCK-iT(商標) Pol II miRNAi発現ベクターキットを参照）。一部の実施形態において、本発明の開示のRNAiをコードする核酸は、miRNA足場を含む。一部の実施形態において、miRNA足場は、配列番号14によって提供される。

10

【0135】

一部の実施形態において、RNAiは、ハンチントン病に関連するポリペプチド（例えば、突然変異HTT）をコードするRNAを標的化する。理論に縛られることは望まないが、RNAiは、機能獲得がハンチントン病との関連が示されているポリペプチド（例えば、突然変異HTT）の発現および/または活性を低減または消去するのに使用できると考えられる。

【0136】

一部の実施形態において、導入遺伝子（例えば、本発明の開示のRNAi）は、プロモーターに機能するように連結されている。例示的なプロモーターとしては、これらに限定されないが、サイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーター、RSV LTR、MoMLV LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーターおよびCK6プロモーター、トランススチレチンプロモーター(TTR)、TKプロモーター、テトラサイクリン応答プロモーター(TRE)、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター(LSP)、E2Fプロモーター、テロメラーゼ(hTERT)プロモーター；サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベータ-アクチン/ウサギ-グロビンプロモーター(CAGプロモーター；Niwaら、Gene、1991、108(2): 193~9)、ならびに延長因子1-アルファプロモーター(EF1-アルファ)プロモーター(Kimら、Gene、1990、91(2): 217~23およびGuoら、Gene Ther., 1996、3(9): 802~10)が挙げられる。一部の実施形態において、プロモーターは、ニワトリ-アクチン(CBA)プロモーターに連結されたヒト-グルクロニダーゼプロモーターまたはサイトメガロウイルスエンハンサーを含む。プロモーターは、構成的、誘導性または抑制性プロモーターであってもよい。一部の実施形態において、本発明は、CBAプロモーターに機能するように連結した、本発明の開示の異種導入遺伝子をコードする核酸を含む組換えベクターを提供する。例示的なプロモーターおよび説明は、例えば、米国付与前公報第20140335054号で見出すことができる。一部の実施形態において、プロモーターは、CBAプロモーター、最小のCBAプロモーター、CMVプロモーターまたはGUSBプロモーターである。

20

30

40

【0137】

構成的プロモーターの例としては、これらに限定されないが、レトロウイルス性のラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター（場合によりRSVエンハンサーを有する）、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター（場合によりCMVエンハンサーを有する）[例えば、Boshartら、Cell、41: 521~530(1985)を参照]、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、13-アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、およびEF1aプロモーター[Invitrogen]が挙げられる。

【0138】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の制御を可能にし、外因的に供給された化合物、温

50

度などの環境要因、または具体的な生理学的条件の存在、例えば細胞の急性期、特定の分化状態によって制御される場合もあるし、または細胞の複製においてのみ制御される場合もある。誘導性プロモーターおよび誘導性の系は、これらに限定されないが、Invitrogen、ClontechおよびAriadなどの様々な商業的な供給源から入手可能である。他の多くの系が説明されており、当業者により容易に選択することができる。外因的に供給されたプロモーターによって制御される誘導性プロモーターの例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン(MT)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導性マウス乳がんウイルス(MMTV)プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系(WO 98/10088)；エクジソン昆虫プロモーター(Noら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93:3346~3351(1996))、テトラサイクリン抑制系(Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:5547~5551(1992))、テトラサイクリン誘導性の系(Gossenら、Science、268:1766~1769(1995))が挙げられる。Harveyら、Curr. Opin. Chem. Biol.、2:512~518(1998))、RU486誘導性の系(Wangら、Nat. Biotech.、15:239~243(1997))ならびにWangら、Gene Ther.、4:432~441(1997))およびラバマイシン誘導性の系(Magarira、J. Clin. Invest.、100:2865~2872(1997))も参照されたい。この状況において有用な可能性があるよりさらに他のタイプの誘導性プロモーターは、具体的な生理学的状態、例えば温度、急性期、細胞の特定の分化状態によって制御されるか、または細胞の複製においてのみ制御されるものである。

【0139】

別の実施形態において、導入遺伝子にとってネイティブのプロモーター、またはそれらのフラグメントが使用されると予想される。導入遺伝子の発現がネイティブの発現を模倣することが望ましい場合、ネイティブのプロモーターが好ましい可能性がある。導入遺伝子の発現が、一時的もしくは発生的に、または組織特異的な方式で、または特異的な転写刺激に応答して制御されなければならない場合、ネイティブのプロモーターが使用される可能性がある。さらなる実施形態において、他のネイティブの発現コントロールエレメント、例えばエンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位またはコザックコンセンサス配列も、ネイティブの発現を模倣するのに使用することができる。

【0140】

一部の実施形態において、制御配列は、組織特異的な遺伝子発現能をもたらす。一部のケースにおいて、組織特異的な制御配列は、組織特異的な方式で転写を誘導する組織特異的な転写因子に結合する。このような組織特異的な制御配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)は当業界において周知である。例示的な組織特異的な制御配列としては、これらに限定されないが、以下の組織特異的なプロモーター：ニューロンの、例えばニューロン特異的エノラーゼ(NSE)プロモーター(Andersenら、Cell. Mol. Neurobiol.、13:503~15(1993))、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター(Piccioliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:5611~5(1991))、およびニューロン特異的なvgf遺伝子プロモーター(Piccioliら、Neuron、15:373~84(1995))が挙げられる。一部の実施形態において、組織特異的なプロモーターは、ニューロン核(NeuN)、グリア細胞繊維性酸性タンパク質(GFAP)、腺腫性結腸ポリポーシス(APC)、およびイオン化カルシウム結合アダプター分子1(Iba-1)から選択される遺伝子のプロモーターである。他の適切な組織特異的なプロモーターは、当業者に明らかであると予想される。一部の実施形態において、プロモーターは、ニワトリベータ-アクトチンプロモーター(CBA)である。

【0141】

一部の実施形態において、プロモーターは、CNSの細胞中で異種核酸を発現する。そのようなものとして、一部の実施形態において、本発明の治療用ポリペプチドまたは治療

10

20

30

40

50

用核酸は、CNSの障害を処置するのに使用することができる。一部の実施形態において、プロモーターは、脳の細胞において異種核酸を発現する。脳の細胞は、これらに限定されないが、ニューロン（例えば感覚ニューロン、運動ニューロン、介在ニューロン、ドーパミン作動性ニューロン、中型有棘ニューロン、コリン作動性ニューロン、GABA作動性ニューロン、錐体ニューロンなど）、グリア細胞（例えば小グリア細胞、大グリア細胞、星状細胞、希突起膠細胞、上衣細胞、放射状グリアなど）、脳実質細胞、小グリア細胞、上衣細胞（ependymal cell）、および/またはプルキンエ細胞などの当業界において公知のあらゆる脳の細胞を指すことができる。一部の実施形態において、プロモーターは、ニューロンおよび/またはグリア細胞において異種核酸を発現する。一部の実施形態において、ニューロンは、尾状核の中型有棘ニューロン、被殻の中型有棘ニューロン、皮質第IV層のニューロンおよび/または皮質第V層のニューロンである。

10

【0142】

CNS細胞、脳の細胞、ニューロン、およびグリア細胞において転写物（例えば、異種導入遺伝子）を発現する様々なプロモーターは当業界において公知であり、本明細書で記載される。このようなプロモーターは、通常、選択された遺伝子または異種制御配列と連結された制御配列を含んでいてもよい。多くの場合、有用な異種制御配列としては、哺乳類またはウイルス遺伝子をコードする配列から誘導された配列が挙げられる。例としては、これらに限定されないが、SV40初期プロモーター、マウス乳がんウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP）、単純疱疹ウイルス（HSV）プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、例えばCMV前初期プロモーター領域（CMVIE）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、合成プロモーター、ハイブリッドプロモーターなどが挙げられる。加えて、マウスメタロチオネイン遺伝子などの非ウイルス遺伝子から誘導された配列も使用することができる。このようなプロモーター配列は、例えば、Stratagene（San Diego, CA）から市販されている。CNS特異的なプロモーターおよび誘導性プロモーターを使用してもよい。CNS特異的なプロモーターの例としては、これらに限定されないが、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）、およびニューロン特異的なエノラーゼ（NSE）などのCNS特異的な遺伝子から単離したプロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターの例としては、とりわけエクジソン、テトラサイクリン、メタロチオネイン、および低酸素に関するDNA応答エレメントが挙げられる。

20

30

【0143】

本発明は、本明細書に記載されるRNAiをコードする1つまたはそれ以上の核酸配列を導入するため、またはAAVウイルス粒子にパッケージ化するための組換えウイルスゲノムの使用を予期する。組換えウイルスゲノムは、RNAiの発現を確立するためのあらゆるエレメント、例えば、プロモーター、イントロン（例えば、キメライントロン）、異種核酸、ITR、リボソーム結合エレメント、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、イントロン、ポリAシグナル、および/または複製起点の全部または機能的な部分を包含し得る。一部の実施形態において、rAAVベクターは、エンハンサー、イントロン（例えば、スプライスドナー/スプライスアクセプター対）、マトリックスアタッチメント部位、またはポリアデニル化シグナルの1つまたはそれ以上を含む。本発明で使用するための様々なイントロンが当業者公知である、その例としては、MVMイントロン、FIIX短縮イントロン1、 β -グロビンSD/イムノグロビン重鎖SA、アデノウイルスSD/イムノグロビンSA、SV40後期SD/SA（19S/16S）、およびハイブリッドアデノウイルスSD/IgG SAが挙げられる。（Wuら、2008、Kurachiら、1995、Choiら、2014）、Wongら、1985、Yewら、1997、HuangおよびGorman（1990）。

40

【0144】

一部の実施形態において、RNAiをコードするベクターを含むrAAV粒子の有効量を投与することにより、投与部位（例えば、線条体および/または皮質）かもしくはその近くで、または投与部位からより遠位で細胞（例えば、CNS細胞、脳の細胞、ニューロ

50

ン、および/またはグリア細胞)が形質導入される。一部の実施形態において、ニューロンの約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%または100%のいずれかより多くが形質導入される。一部の実施形態において、ニューロンの約5%~約100%、約10%~約50%、約10%~約30%、約25%~約75%、約25%~約50%、または約30%~約50%が形質導入される。miRNAを発現する組換えウイルス粒子によって形質導入されたニューロンを同定する方法は、当業界において公知であり;例えば、免疫組織化学、RNA検出(例えば、qPCR、ノーザンブロットティング、RNA-seq、インサイチュハイブリダイゼーションなど)または強化緑色蛍光タンパク質などの共発現されたマーカーの使用が、発現を検出するのに使用することができる。

10

【0145】

一部の態様において、本発明は、組換え自己相補性ゲノム(例えば、自己相補的なrAAVベクター)を含むウイルス粒子を提供する。自己相補性ベクターゲノムを有するAAVウイルス粒子および自己相補性AAVゲノムの使用法は、米国特許第6,596,535号;7,125,717号;7,465,583号;7,785,888号;7,790,154号;7,846,729号;8,093,054号;および8,361,457号;ならびにWang Z.ら、(2003)Gene Ther 10:2105~2111に記載されており、これらのそれぞれは、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。自己相補性ゲノムを含むrAAVは、その部分的に相補的な配列(例えば、異種核酸の相補的なコードおよび非コード鎖)によって二本鎖DNA分子を迅速に形成すると予想される。一部の実施形態において、ベクターは、異種核酸をコードする第1の核酸配列およびその核酸の相補物をコードする第2の核酸配列を含み、第1の核酸配列は、その長さのほとんどまたは全てにわたり、第2の核酸配列と鎖内の塩基対を形成することができる。

20

【0146】

一部の実施形態において、RNAiをコードする第1の異種核酸配列およびRNAiの相補物をコードする第2の異種核酸配列は、突然変異ITR(例えば、右のITR)によって連結される。一部の実施形態において、ITRは、ポリヌクレオチド配列5'-CCACCTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGGCC

30

TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA-3'(配列番号15)を含む。突然変異ITRは、末端分解配列を含むD領域の欠失を含む。結果として、AAVウイルスゲノムの複製時に、repタンパク質は、突然変異ITRのところでウイルスゲノムを切断しないと予想され、そのようなものとして、以下のもの:AAVのITR、制御配列を包含する第1の異種ポリヌクレオチド配列、突然変異したAAVのITR、第1の異種ポリヌクレオチドおよび第3のAAVのITRと逆方向の第2の異種ポリヌクレオチドを、5'から3'の順で含む組換えウイルスゲノムが、ウイルスのキャプシド中にパッケージ化されると予想される。

【0147】

VI. ウイルス粒子およびウイルス粒子を生産する方法

40

本発明は、とりわけ、本発明の開示のRNAiをコードする核酸を含む組換えウイルス粒子、加えて、哺乳動物における疾患または障害;例えばハンチントン病を処置するためのそれらの使用方法を提供する。

【0148】

ウイルス粒子

本発明は、本明細書で開示されるRNAiを含むウイルス粒子を提供する。一部の実施形態において、本発明は、本明細書で開示される本発明のRNAiを送達するためのウイルス粒子を提供する。例えば、本発明は、哺乳動物において疾患または障害を処置するためのRNAiを送達するための、組換えウイルス粒子を使用する方法;例えば、HDを処置するためのRNAiを含むrAAV粒子を使用する方法を提供する。一部の実施形態に

50

において、組換えウイルス粒子は、組換え AAV 粒子である。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、1 または 2 つの ITR が隣接する本発明の開示の RNAi の配列を含む核酸を含む組換え AAV 粒子である。核酸は、AAV 粒子中にキャプシド化されている。また AAV 粒子は、キャプシドタンパク質も含む。一部の実施形態において、核酸は、転写方向で構成要素に作動可能に連結された目的のコード配列（例えば、本発明の開示の RNAi の核酸）、転写開始および終結配列を包含する制御配列を含み、それにより発現カセットが形成される。発現カセットは、5' および 3' 末端に少なくとも 1 つの機能的な AAV の ITR 配列を有する。「機能的な AAV の ITR 配列」は、AAV ビリオンのレスキュー、複製およびパッケージ化を目的とした ITR 配列機能を意味する。全て参照によってそれらの全体が本明細書に組み入れられる、Davidson ら、PNAS、2000、97(7)3428~32; Passini ら、J. Virol., 2003、77(12):7034~40; および Pechan ら、Gene Ther., 2009、16:10~16 を参照されたい。本発明の一部の態様を実施するために、組換えベクターは、少なくともキャプシド化に必須な AAV の配列の全て、および rAAV による感染のための物理的構造を含む。本発明のベクターで使用するための AAV の ITR は、野生型ヌクレオチド配列を有していなくてもよく（例えば、Kotin, Hum. Gene Ther., 1994、5:793~801 で説明されている通り）、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換によって変更されてもよく、または AAV の ITR は、数々の AAV 血清型のいずれかからから誘導されてもよい。40 種を超える AAV 血清型がこれまでに知られており、新しい血清型および既存の血清型のバリエーションが同定され続けている。Ga
o ら、PNAS、2002、99(18):11854~6; Ga
o ら、PNAS、2003、100(10):6081~6; および Bossi ら、J. Virol., 2003、77(12):6799~810 を参照されたい。あらゆる AAV 血清型の使用が、本発明の範囲内であるとみなされる。一部の実施形態において、rAAV ベクターは、これらに限定されないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギ AAV、ウシ AAV、またはマウス AAV キャプシド血清型 ITR などの AAV 血清型から誘導されたベクターである。一部の実施形態において、AAV における核酸は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギ AAV、ウシ AAV、またはマウス AAV キャプシド血清型 ITR などの ITR を含む。一部の実施形態において、AAV における核酸は、本明細書に記載の RNAi をさらにコードする。例えば、AAV における核酸は、本明細書において予期されるあらゆる AAV 血清型の少なくとも 1 つの ITR を含んでいてもよく、ガイド領域を含む 1 つの鎖および非ガイド領域を含む別の鎖を含む RNAi をさらにコードしていてもよい。一実施形態において、AAV における核酸は、あらゆる AAV 血清型の少なくとも 1 つの ITR を含んでいてもよく、配列 5' - UGGCCG UCCAUCUUGGACCCG - 3'（配列番号 1）を含む第 1 の核酸を含む第 1 の鎖および配列 5' - CGGGUCCAAGAU GGACGGCCA - 3'（配列番号 2）を含む第 2 の核酸を含む第 2 の鎖を含む RNAi をさらにコードしていてもよい。一部の実施形態において、AAV における核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2 の ITR）、プロモーター、本明細書で開示される RNAi をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル、ならびに AAV の ITR（例えば、AAV2 の ITR）をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAV における核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2 の ITR）、プロモーター、配列 5' - UGGCCG UCCAUCUUGGACCCG - 3'（配列番号 1）を含む第 1 の核酸を含む第 1 の鎖および配列 5' - CGGGUCCAAGAU GGACGGCCA - 3'（配列番号 2）を含む第 2 の核酸を含む第 2 の鎖を含む RNAi をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル、ならびに AAV の ITR（例えば、AAV2 の ITR）をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAV

10

20

30

40

50

における核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2のITR）、CBAプロモーター、本明細書で開示されるRNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモンのポリA）、ならびにAAVのITR（例えば、AAV2のITR）をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2のITR）、CBAプロモーター、イントロン（例えば、キメライントロン）、配列5' - UGGCCGUC CAUCUUGGACCCG - 3'（配列番号1）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5' - CGGGUCC AAGAUGGACGGCCA - 3'（配列番号2）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモンのポリA）、およびAAVのITR（例えば、AAV2のITR）の全部または機能的な部分をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、第1の鎖および第2の鎖は二重鎖を形成する。一部の実施形態において、第1の鎖は、リンカーによって第2の鎖に連結されている。一部の実施形態において、リンカーは、配列番号13の核酸配列を含む。

【0149】

一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2のITR）、CBAプロモーター、配列5' - CGGGUCC AAGAUGGACGGCCA - 3'（配列番号2）を含む第1の核酸を含む第1の鎖、および配列5' - UGGCCGUC CAUCUUGGACCCCG - 3'（配列番号1）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモンのポリA）、ならびにAAVのITR（例えば、AAV2のITR）をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、第1の鎖および第2の鎖は、二重鎖を形成する。一部の実施形態において、第1の鎖は、リンカーによって第2の鎖に連結されている。一部の実施形態において、リンカーは、配列番号13の核酸配列を含む。

【0150】

別の実施形態において、AAVにおける核酸は、本明細書において予期されるあらゆるAAV血清型の少なくとも1つのITRを含んでいてもよく、配列5' - AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA - 3'（配列番号7）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5' - UGCUUGUCAACCAACACCGACU - 3'（配列番号8）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiをさらにコードしていてもよい。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2のITR）、プロモーター、本明細書で開示されるRNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル、およびAAVのITR（例えば、AAV2のITR）をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2のITR）、プロモーター、配列5' - AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA - 3'（配列番号7）を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列5' - UGCUUGUCAACCAACACCGACU - 3'（配列番号8）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル、ならびにAAVのITR（例えば、AAV2のITR）をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2のITR）、CBAプロモーター、キメライントロン、本明細書で開示されるRNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモンのポリA）、およびAAVのITR（例えば、AAV2のITR）をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下：ITR（例えば、AAV2のITR）、CBAプロモーター、キメライントロン、配列5' - AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA - 3'（配列番号7）を含む第1の核酸を含む第1の鎖、および配列5' - UGCUUGUCAACCAACACCGACU - 3'（配列番号8）を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含むRNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモンのポリA）、ならびにAAVのITR（例えば、AAV2のITR）をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、第1の鎖および第2の鎖は、二重鎖を形成する。一部の実施形態において、第1の鎖は、リンカーによって第2の鎖に連結されている。一部の実施形

10

20

30

40

50

態において、リンカーは、配列番号 13 の核酸配列を含む。

【0151】

別の実施形態において、AAVにおける核酸は、本明細書において予期されるあらゆる AAV血清型の少なくとも1つの ITRを含んでいてもよく、配列 5' - UGC UUG UC AAC CAC ACC GAC U - 3' (配列番号 8) を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列 5' - AGUC GGUGUGGUUGACAAGCA - 3' (配列番号 7) を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含む RNAi をさらにコードしていてもよい。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下: ITR (例えば、AAV2 の ITR)、プロモーター、本明細書で開示される RNAi をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル、および AAV の ITR (例えば、AAV2 の ITR) をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下: ITR (例えば、AAV2 の ITR)、プロモーター、イントロン、配列 5' - UGC UUG UC AAC CAC ACC GAC U - 3' (配列番号 8) を含む第1の核酸を含む第1の鎖および配列 5' - AGUC GGUGUGGUUGACAAGCA - 3' (配列番号 7) を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含む RNAi をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル、ならびに AAV の ITR (例えば、AAV2 の ITR) をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下: ITR (例えば、AAV2 の ITR)、CBA プロモーター、本明細書で開示される RNAi をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル (例えば、ウシ成長ホルモンのポリA)、および AAV の ITR (例えば、AAV2 の ITR) をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAVにおける核酸は、5' から 3' へ、以下: ITR (例えば、AAV2 の ITR)、CBA プロモーター、イントロン、配列 5' - UGC UUG UC AAC CAC ACC GAC U - 3' を含む第1の核酸を含む第1の鎖、および配列 5' - AGUC GGUGUGGUUGACAAGCA - 3' (配列番号 7) を含む第2の核酸を含む第2の鎖を含む RNAi をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル (例えば、ウシ成長ホルモンのポリA)、ならびに AAV の ITR (例えば、AAV2 の ITR) をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、第1の鎖および第2の鎖は、二重鎖を形成する。一部の実施形態において、第1の鎖は、リンカーによって第2の鎖に連結されている。一部の実施形態において、リンカーは、配列番号 13 の核酸配列を含む。

【0152】

一部の実施形態において、ベクターは、(1つまたはそれ以上の) スタッファー核酸を包含していてもよい。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、レポーターポリペプチドをコードする配列を含んでいてもよい。当業者に認識されていると予想されるように、スタッファー核酸は、ベクター内の様々な領域に配置されていてもよく、ベクター内において、連続する配列 (例えば、単一の配置における単一のスタッファー核酸) で構成されていてもよいし、または複数の配列 (例えば、1つより多くの配置 (例えば、2つの配置、3つの配置など) における1つより多くのスタッファー核酸) で構成されていてもよい。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、RNAi 配列の下流に配置されていてもよい。実施形態において、スタッファー核酸は、RNAi 配列の上流に (例えば、プロモーターと RNAi をコードする核酸との間に) 配置されていてもよい。同様に当業者に認識されていると予想されるように、様々な核酸が、スタッファー核酸として使用することができる。一部の実施形態において、スタッファー核酸は、ヒトアルファ-1-抗トリプシン (AAT) スタッファー配列または C16P1 第16染色体 P1 クローン (ヒト C16) スタッファー配列の全部または一部を含む。一部の実施形態において、スタッファー配列は、遺伝子の全部または一部を含む。例えば、スタッファー配列は、ヒト AAT 配列の一部を含む。当業者は、遺伝子 (例えば、ヒト AAT 配列) の異なる部分をスタッファーフラグメントとして使用できることを認識していると予想される。例えば、スタッファーフラグメントは、遺伝子の 5' 末端、遺伝子の 3' 末端、遺伝子の中央部分、遺伝子の非コード部分 (例えば、イントロン)、遺伝子のコード領域 (例えばエクソン)、または遺伝子の非コードおよびコード部分の混合物由来であってもよい。当業者はまた、ス

10

20

30

40

50

タッファー配列の全部または一部をスタッファー配列として使用できることも認識していると予想される。一部の実施形態において、スタッファー配列は、配列番号 18 のヌクレオチド配列を含む。

【0153】

さらなる実施形態において、rAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R、AAVrh.10、AAV11、AAV12のキャプシドタンパク質、またはこれらのキャプシドタンパク質の突然変異体を含む。一部の実施形態において、突然変異キャプシドタンパク質は、AAVキャプシドを形成する能力を維持する。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV5チロシン突然変異キャプシドを含む (Zhong L.ら、(2008) Proc Natl Acad Sci USA 105(22):7827~7832)。さらなる実施形態において、rAAV粒子は、クレードA~FからのAAV血清型のキャプシドタンパク質を含む (Gao、ら、J. Virol. 2004、78(12):6381)。

【0154】

特定の標的細胞の形質導入を最適化するか、または特定の標的組織 (例えば、罹患した組織) 内の特異的な細胞型を標的化するのに、異なるAAV血清型が使用される。rAAV粒子は、同じ血清型または混成の血清型のウイルスタンパク質およびウイルス核酸を含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV1キャプシドタンパク質および少なくとも1つのAAV2のITRを含んでいてもよいし、またはrAAV粒子は、AAV2キャプシドタンパク質および少なくとも1つのAAV1のITRを含んでいてもよい。rAAV粒子生産のためのAAV血清型のあらゆる組合せが、本明細書に各組合せが明示的に述べられているものとして本明細書で提供される。一部の実施形態において、本発明は、AAV1キャプシドおよび少なくとも1つのAAV2のITRが隣接する本発明の開示のrAAVベクター (例えば、本発明の開示のRNAiをコードする核酸を含む発現カセット) を含むrAAV粒子を提供する。一部の実施形態において、本発明は、AAV2キャプシドを含むrAAV粒子を提供する。

【0155】

一部の態様において、本発明は、組換え自己相補性ゲノムを含むウイルス粒子を提供する。自己相補性ゲノムを有するAAVウイルス粒子および自己相補性AAVゲノムの使用方法は、米国特許第6,596,535号;7,125,717号;7,465,583号;7,785,888号;7,790,154号;7,846,729号;8,093,054号;および8,361,457号;ならびにWang Z.ら、(2003) Gene Ther 10:2105~2111に記載されており、これらのそれぞれは、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。自己相補性ゲノムを含むrAAVは、その部分的に相補的な配列 (例えば、導入遺伝子の相補的なコードおよび非コード鎖) によって二本鎖DNA分子を迅速に形成すると予想される。一部の実施形態において、本発明は、AAVゲノムを含むAAVウイルス粒子であって、rAAVゲノムは、第1の異種ポリヌクレオチド配列 (例えば、本発明の開示のRNAi) および第2の異種ポリヌクレオチド配列 (例えば、本発明の開示のRNAiのアンチセンス鎖) を含み、第1の異種ポリヌクレオチド配列は、その長さのほとんどまたは全てにわたり、第2のポリヌクレオチド配列と鎖内の塩基対を形成することができる、AAVウイルス粒子を提供する。一部の実施形態において、第1の異種ポリヌクレオチド配列および第2の異種ポリヌクレオチド配列は、鎖内の塩基対形成を容易にする配列;例えば、ヘアピンDNA構造によって連結される。ヘアピン構造は、当業界において公知であり、例えばmiRNAまたはsiRNA分子である。一部の実施形態において、第1の異種ポリヌクレオチド配列および第2の異種ポリヌクレオチド配列は、突然変異ITR (例えば、右のITR) によって連結される。一部の実施形態において、ITRは、ポリヌクレオチド配列5'-CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCGGCGACCAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCGCTCAGTG

A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A - 3 ' (配列番号 1 5) を含む。突然変異 I T R は、末端分解配列を含む D 領域の欠失を含む。結果として、A A V ウイルスゲノムの複製時に、r e p タンパク質は、突然変異 I T R のところでウイルスゲノムを切断しないと予想され、そのようなものとして、以下のもの：A A V の I T R、制御配列を包含する第 1 の異種ポリヌクレオチド配列、突然変異した A A V の I T R、第 1 の異種ポリヌクレオチドおよび第 3 の A A V の I T R と逆方向の第 2 の異種ポリヌクレオチドを、5 ' から 3 ' の順で含む組換えウイルスゲノムが、ウイルスのキャプシド中にパッケージ化されると予想される。一部の実施形態において、本発明は、機能的な A A V 2 の I T R、本発明の開示の R N A i をコードする第 1 のポリヌクレオチド配列、D 領域の欠失を含み、機能的な末端分解配列が欠失した突然変異した A A V 2 の I T R、第 1 のポリヌクレオチド配列の本発明の開示の R N A i をコードする配列に相補的な配列を含む第 2 のポリヌクレオチド配列、および機能的な A A V 2 の I T R を含む組換えウイルスゲノムを含む A A V ウイルス粒子を提供する。

【 0 1 5 6 】

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、アデノウイルス粒子である。一部の実施形態において、アデノウイルス粒子は、組換えアデノウイルス粒子、例えば、2 つの I T R 間に本発明の開示の R N A i を含むポリヌクレオチドベクターである。一部の実施形態において、アデノウイルス粒子は、1 つまたはそれ以上の E 1 遺伝子を欠失しているか、またはその不完全なコピーを含有しており、それによりアデノウイルスの複製は不完全になる。アデノウイルスは、大きい (約 9 5 0) エンベローブのない正二十面体のキャプシド内に直鎖状の二本鎖 D N A ゲノムを包含する。アデノウイルスは、3 0 k b より大きい異種配列 (例えば、E 1 および / または E 3 領域の代わりに) を取り込むことができる大きいゲノムを有し、それによって、より大きい異種遺伝子との使用にそれらを固有に適合させる。これらはまた、分裂および非分裂細胞に感染して、宿主ゲノムに天然に統合しない (ハイブリッドバリエーションがこの能力を有する可能性があるにもかかわらず) ことも公知である。一部の実施形態において、アデノウイルスベクターは、E 1 の代わりに異種配列を有する第 1 世代アデノウイルスベクターであり得る。一部の実施形態において、アデノウイルスベクターは、E 2 A、E 2 B、および / または E 4 において追加の突然変異または欠失を有する第 2 世代アデノウイルスベクターであり得る。一部の実施形態において、アデノウイルスベクターは、全てのウイルス性コード遺伝子を欠失した、I T R およびパッケージ化シグナルのみを保持し、複製およびパッケージ化のためのトランスにヘルパーアデノウイルスを必要とする第 3 世代または g u t t e d アデノウイルスベクターであり得る。アデノウイルス粒子は、哺乳類細胞の一過性トランスフェクションのためのベクターに加えて遺伝子治療用ベクターとして使用するために調査されている。さらなる説明については、例えば、D a n t h i n n e , X . および I m p e r i a l e , M . J . (2 0 0 0) G e n e T h e r . 7 : 1 7 0 7 ~ 1 4 および T a t s i s , N . および E r t l , H . C . (2 0 0 4) M o l . T h e r . 1 0 : 6 1 6 ~ 2 9 を参照されたい。

【 0 1 5 7 】

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、本発明の開示の R N A i をコードする核酸を含む組換えアデノウイルス粒子である。いずれのアデノウイルス血清型の使用も、本発明の範囲内とみなされる。一部の実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、これらに限定されないが、A d H u 2、A d H u 3、A d H u 4、A d H u 5、A d H u 7、A d H u 1 1、A d H u 2 4、A d H u 2 6、A d H u 3 4、A d H u 3 5、A d H u 3 6、A d H u 3 7、A d H u 4 1、A d H u 4 8、A d H u 4 9、A d H u 5 0、A d C 6、A d C 7、A d C 6 9、ウシ A d 3 型、イヌ A d 2 型、ヒツジ A d、およびブタ A d 3 型などのアデノウイルス血清型から誘導されたベクターである。アデノウイルス粒子はまた、キャプシドタンパク質も含む。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、アデノウイルス粒子を、1 つまたはそれ以上の外来ウイルスのキャプシドタンパク質と組み合わせて含む。このような組合せは、偽型組換えアデノウイルス粒子と称される場合もある。一部の実施形態において、偽型組換えアデノウイルス粒子で使用される外来ウ

10

20

30

40

50

イルスのキャプシドタンパク質は、外来ウイルスまたは別のアデノウイルス血清型から誘導される。一部の実施形態において、外来ウイルスのキャプシドタンパク質は、これらに限定されないが、レオウイルス3型などから誘導される。偽型アデノウイルス粒子で使用するベクターおよびキャプシドタンパク質の組合せの例は、以下の参考文献に見出すことができる (Tat sis, N. ら (2004) Mol. Ther. 10 (4): 616 ~ 629 および Ahi, Y. ら (2011) Curr. Gene Ther. 11 (4): 307 ~ 320)。特定の標的細胞の形質導入を最適化するか、または特定の標的組織 (例えば、罹患した組織) 内の特異的な細胞型を標的化するのに、異なるアデノウイルス血清型が使用される可能性がある。特異的なアデノウイルス血清型によって標的化される組織または細胞としては、これらに限定されないが、肺 (例えば HuAd3)、脾臓および肝臓 (例えば HuAd37)、平滑筋、滑膜細胞、樹状細胞、心臓血管細胞、腫瘍細胞株 (例えば HuAd11)、ならびに樹状細胞 (例えばレオウイルス3型で偽型化した HuAd5、HuAd30、または HuAd35) が挙げられる。さらなる説明については、Ahi, Y. ら (2011) Curr. Gene Ther. 11 (4): 307 ~ 320、Kay, M. ら (2001) Nat. Med. 7 (1): 33 ~ 40、および Tat sis, N. ら (2004) Mol. Ther. 10 (4): 616 ~ 629 を参照されたい。アデノウイルスベクターは、線条体内投与によって投与されている (例えば、Mittoux, V. ら (2002) J. Neurosci. 22: 4478 ~ 86 を参照)。

10

【0158】

20

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、レンチウイルス粒子である。一部の実施形態において、レンチウイルス粒子は、組換えレンチウイルス粒子、例えば、2つのLTR間に本発明の開示のRNAiをコードするポリヌクレオチドベクターである。レンチウイルスは、およそ10kbのゲノムを有するプラスセンスssRNAレトロウイルスである。レンチウイルスは、分裂および非分裂細胞のゲノムに統合されることが公知である。レンチウイルス粒子は、例えば、複数のプラスミド (典型的にはレンチウイルスのゲノムおよび複製および/またはパッケージ化に必要な遺伝子は、ウイルス複製を防ぐために分離されている) を、改変されたレンチウイルスのゲノムをレンチウイルス粒子にパッケージ化するパッケージング細胞株にトランスフェクトすることによって生産することができる。一部の実施形態において、レンチウイルス粒子は、エンベロープタンパク質を欠失した第1世代ベクターを指す場合がある。一部の実施形態において、レンチウイルス粒子は、gag/pol および tat/rev 領域を除いて全ての遺伝子を欠失した第2世代ベクターを指す場合がある。一部の実施形態において、レンチウイルス粒子は、内因性 rev、gag、および pol 遺伝子のみを含有し、tat 遺伝子非含有の形質導入のためのキメラLTRを有する第3世代ベクターを指す場合がある (Dull, T. ら (1998) J. Virol. 72: 8463 ~ 71 を参照)。さらなる説明については、Durand, S. および Cimarelli, A. (2011) Viruses 3: 132 ~ 59 を参照されたい。

30

【0159】

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、本発明の開示のRNAiをコードする核酸を含む組換えレンチウイルス粒子である。いずれのレンチウイルスベクターの使用も、本発明の範囲内とみなされる。一部の実施形態において、レンチウイルスベクターは、これらに限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1)、ヒト免疫不全ウイルス-2 (HIV-2)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウマ感染性貧血ウイルス (EIAV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、ジューブラナ病ウイルス (Jembrana disease virus; JDV)、ビスナウイルス (VV)、およびヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV) などのレンチウイルスから誘導される。レンチウイルス粒子はまた、キャプシドタンパク質も含む。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、レンチウイルスベクターを、1つまたはそれ以上の外来ウイルスのキャプシドタンパク質と組み合わせて含む。このような組合せは、偽型組換え

40

50

レンチウイルス粒子と称される場合もある。一部の実施形態において、偽型組換えレンチウイルス粒子で使用される外来ウイルスのキャプシドタンパク質は、外来ウイルスから誘導される。一部の実施形態において、偽型組換えレンチウイルス粒子で使用される外来ウイルスのキャプシドタンパク質は、水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質（VSV-GP）である。VSV-GPは、遍在的な細胞受容体と相互作用し、偽型組換えレンチウイルス粒子に広範な組織親和性を提供する。加えて、VSV-GPは、偽型組換えレンチウイルス粒子により高い安定性を提供すると考えられる。他の実施形態において、外来ウイルスのキャプシドタンパク質は、これらに限定されないが、チャンディブラウイルス、狂犬病ウイルス、モコラウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）、ロスリバーウイルス（RRV）、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス（SFV）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、エボラウイルスレストン、エボラウイルスザイル、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、トリ白血病ウイルス（ALV）、ヤーグジークテヒツジレトロウイルス（JSRV）、モロニー Maus 白血病ウイルス（MLV）、テナガザル白血病ウイルス（GALV）、ネコ内因性レトロウイルス（RD114）、ヒトTリンパ球向性ウイルス1（HTLV-1）、ヒトフォーミーウイルス、マエディビスナウイルス（MVV）、SARS-CoV、センダイウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、ヒトパラインフルエンザウイルス3型、C型肝炎ウイルス（HCV）、インフルエンザウイルス、家禽ペストウイルス（FPV）、またはアウトグラフィ・カリフォルニカ多重核多角体病ウイルス（*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*; AcMNPV）などから誘導される。偽型レンチウイルス粒子で使用されるベクターおよびキャプシドタンパク質の組合せの例は、例えば、Cronin, J. ら（2005）. *Curr. Gene Ther.* 5（4）: 387～398に見出すことができる。特定の標的細胞の形質導入を最適化するか、または特定の標的組織（例えば、罹患した組織）内の特異的な細胞型を標的化するのに、異なる偽型組換えレンチウイルス粒子を使用することができる。例えば、特異的な偽型組換えレンチウイルス粒子によって標的化された組織としては、これらに限定されないが、肝臓（例えばVSV-G、LCMV、RRV、またはSeV Fタンパク質で偽型化された）、肺（例えばエボラ、マールブルグ、SeV FおよびHN、またはJSRVタンパク質で偽型化された）、膵島細胞（例えばLCMVタンパク質で偽型化された）、中枢神経系（例えばVSV-G、LCMV、狂犬病、またはモコラタンパク質で偽型化された）、網膜（例えばVSV-Gまたはモコラタンパク質で偽型化された）、単球または筋肉（例えばモコラまたはエボラタンパク質で偽型化された）、造血系（例えばRD114またはGALVタンパク質で偽型化された）、またはがん細胞（例えばGALVまたはLCMVタンパク質で偽型化された）が挙げられる。さらなる説明については、Cronin, J. ら（2005）. *Curr. Gene Ther.* 5（4）: 387～398およびKay, M. ら（2001）*Nat. Med.* 7（1）: 33～40を参照されたい。

【0160】

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、単純疱疹ウイルス（HSV）粒子である。一部の実施形態において、HSV粒子は、rHSV粒子、例えば、2つのTR間に本発明の開示のRNAiをコードするポリヌクレオチドベクターである。HSVは、およそ152 kbのゲノムを有するエンベロープありの二本鎖DNAウイルスである。有利には、その遺伝子のおよそ半分は必須ではなく、異種配列を順応させるために欠失させてもよい。HSV粒子は、非分裂細胞に感染する。加えて、HSV粒子は、天然にニューロン中での潜伏を確立し、逆行性輸送によって移動し、シナプスを通過して移行させることができることから、それらをニューロンのトランスフェクションおよび/または神経系に関する遺伝子治療アプローチにとって有利にしている。一部の実施形態において、HSV粒子は、複製欠損であってもよいし、または複製能を有していてもよい（例えば、1つまたはそれ以上の後期遺伝子の不活性化を介して単一の複製サイクルの能力を有する）。さらなる説明については、Manservigi, R. ら（2010）*Open Virol. J.* 4: 123～56を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0161】

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、本発明の開示のRNAiをコードする核酸を含むrHSV粒子である。いずれのHSVベクターの使用も、本発明の範囲内とみなされる。一部の実施形態において、HSVベクターは、これらに限定されないが、HSV-1およびHSV-2などのHSV血清型から誘導される。HSV粒子はまた、キャプシドタンパク質も含む。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子は、HSVベクターを、1つまたはそれ以上の外来ウイルスのキャプシドタンパク質と組み合わせて含む。このような組合せは、偽型rHSV粒子と称される場合もある。一部の実施形態において、偽型rHSV粒子で使用する外来ウイルスのキャプシドタンパク質は、外来ウイルスまたは別のHSV血清型から誘導される。一部の実施形態において、偽型rHSV粒子で使用する外来ウイルスのキャプシドタンパク質は、水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質(VSV-GP)である。VSV-GPは、遍在的な細胞受容体と相互作用し、偽型rHSV粒子に広範な組織親和性を提供する。加えて、VSV-GPは、偽型rHSV粒子により高い安定性を提供すると考えられる。他の実施形態において、外来ウイルスのキャプシドタンパク質は、異なるHSV血清型由来であってもよい。例えば、HSV-1ベクターは、1つまたはそれ以上のHSV-2キャプシドタンパク質を含有していてもよい。特定の標的細胞の形質導入を最適化するか、または特定の標的組織(例えば、罹患した組織)内の特異的な細胞型を標的化するのに、異なるHSV血清型を使用することができる。特異的なアデノウイルス血清型によって標的化された組織または細胞としては、これらに限定されないが、中枢神経系およびニューロン(例えばHSV-1)が挙げられる。さらなる説明については、Manservigi, R.ら(2010)Open Virol J 4:123~156、Kay, M.ら(2001)Nat. Med. 7(1):33~40、およびMeignier, B.ら(1987)J. Infect. Dis. 155(5):921~930を参照されたい。

10

20

【0162】

ウイルス粒子の生産

rAAV粒子は、当業界において公知の方法を使用して生産することができる。例えば、米国特許第6,566,118号;6,989,264号;および6,995,006号を参照されたい。本発明の実施において、rAAV粒子を生産するための宿主細胞としては、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物および酵母が挙げられる。宿主細胞はまた、AAVベクターゲノムが安定して維持される宿主細胞またはプロデューサー細胞中でAAVのrepおよびcap遺伝子が安定して維持されるパッケージング細胞であってもよい。例示的なパッケージングおよびプロデューサー細胞は、293、A549またはHeLa細胞から誘導される。AAVベクターは、当業界において公知の標準的な技術を使用して精製され、製剤化される。

30

【0163】

当業界において公知のrAAVベクターを生産するための方法としては、これらに限定されないが、トランスフェクション、安定な細胞株の生産、ならびにアデノウイルス-AAVハイブリッド、ヘルペスウイルス-AAVハイブリッド(Conway, JEら、(1997)J. Virology 71(11):8780~8789)およびバキュロウイルス-AAVハイブリッドなどの感染性のハイブリッドウイルスの生産系が挙げられる。rAAVウイルス粒子を生産するためのrAAV生産培養は全て、1)好適な宿主細胞、例えば、ヒトから誘導された細胞株、例えばHeLa、A549、または293細胞、または昆虫から誘導された細胞株、例えばバキュロウイルス生産系のケースではSF-9など;2)野生型または突然変異アデノウイルス(例えば温度感受性アデノウイルス)、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、またはヘルパー機能を提供するプラスミドコンストラクトによって提供される好適なヘルパーウイルス機能;3)AAVのrepおよびcap遺伝子および遺伝子産物;4)少なくとも1つのAAVのITR配列が隣接する核酸(例えば治療用核酸);ならびに5)rAAV生産を支持する好適な培地および培地成分を必要とする。一部の実施形態において、AAVのrepおよびcap遺伝子産物は、

40

50

あらゆる AAV 血清型由来でもよい。一般的に、ただし必須ではないが、rep 遺伝子産物が複製されるように機能して rAAV ゲノムをパッケージ化できる限りは、AAV の rep 遺伝子産物は、rAAV ベクターゲノムの ITR と同じ血清型を有する。rAAV ベクターを生産するために、当業界において公知の好適な培地を使用することができる。これらの培地としては、これらに限定されないが、Hyclone Laboratories および JRH によって生産された培地、例えば改変イーグル培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) など、米国特許第 6,566,118 号に記載されたもの、ならびに米国特許第 6,723,551 号に記載されているような Sf-900 IISFM 培地などの特注の調合物が挙げられ、これらのそれぞれは、特に組換え AAV ベクターの生産で使用するための特注の培地調合物に関して、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。一部の実施形態において、AAV のヘルパー機能は、アデノウイルスまたは HSV によって提供される。一部の実施形態において、AAV のヘルパー機能は、バキュロウイルスによって提供され、宿主細胞は、昆虫細胞 (例えば、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) (Sf9) 細胞) である。

10

【0164】

一部の実施形態において、rAAV 粒子は、三重のトランスフェクション方法、例えば下記に示される例示的な三重のトランスフェクション方法によって生産することができる。簡単に言えば、rep 遺伝子およびキャプシド遺伝子を含むプラスミドを、ヘルパーアデノウイルスプラスミドと共に、(例えば、リン酸カルシウム方法を使用して)細胞株 (例えば、HEK-293 細胞) にトランスフェクトしてもよいし、さらに、ウイルスを収集し、場合により精製してもよい。そのようなものとして、一部の実施形態において、rAAV 粒子は、rAAV ベクターをコードする核酸、AAV の rep および cap をコードする核酸、および AAV ヘルパーウイルス機能をコードする核酸の宿主細胞への三重のトランスフェクションによって生産されたものであり、宿主細胞への核酸のトランスフェクションは、rAAV 粒子を生産することが可能な宿主細胞を生成する。

20

【0165】

一部の実施形態において、rAAV 粒子は、プロデューサー細胞株の方法、例えば下記に示される例示的なプロデューサー細胞株の方法によって生産することができる (Martin ら、(2013) Human Gene Therapy Methods 24: 253 ~ 269 で参照されているものも参照されたい)。簡単に言えば、細胞株 (例えば、HeLa 細胞株) は、rep 遺伝子、キャプシド遺伝子、およびプロモーター-異種核酸配列を含むプラスミドで安定してトランスフェクトすることができる。細胞株をスクリーニングして rAAV 生産のためのリードクローンを選択してもよいし、次いでこれを生産バイオリアクターに拡大して、rAAV 生産を開始させるためのヘルパーとしてアデノウイルス (例えば、野生型アデノウイルス) で感染させることもできる。その後ウイルスを回収してもよいし、アデノウイルスを不活性化させるか (例えば、熱によって) および/または除去してもよいし、rAAV 粒子を精製してもよい。そのようなものとして、一部の実施形態において、rAAV ベクターをコードする核酸、AAV の rep および cap をコードする核酸、ならびに AAV ヘルパーウイルス機能をコードする核酸の 1 つまたはそれ以上を含むプロデューサー細胞株によって、rAAV 粒子を生産した。

30

40

【0166】

一部の態様において、本明細書で開示されるいずれかの rAAV 粒子を生産するための方法であって、(a) rAAV 粒子が生産される条件下で宿主細胞を培養する工程であって、宿主細胞は、(i) 1 つまたはそれ以上の AAV パッケージ遺伝子であって、前記 AAV パッケージ遺伝子のそれぞれは、AAV の複製および/またはキャプシド化タンパク質をコードする、AAV パッケージ遺伝子; (ii) 少なくとも 1 つの AAV の ITR が隣接する本明細書に記載される本発明の開示の RNAi をコードする核酸を含む rAAV プロベクター、および (iii) AAV のヘルパー機能を含む、工程; および (b) 宿主細胞によって生産された rAAV 粒子を回収する工程を含む、方法が提供される。一部の

50

実施形態において、RNAiは、配列番号7のヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態において、前記少なくとも1つのAAVのITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAVキャプシド血清型ITRなどからなる群より選択される。一部の実施形態において、前記キャプシド化タンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6（例えば、野生型AAV6キャプシド、またはバリエーションAAV6キャプシド、例えば米国付与前公報第2012/0164106号に記載のShH10）、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9（例えば、野生型AAV9キャプシド、または米国付与前公報第2013/0323226号に記載の改変されたAAV9キャプシド）、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、チロシンキャプシド突然変異体、ヘパリン結合キャプシド突然変異体、AAV2R471Aキャプシド、AAVAAV2/2-7m8キャプシド、AAVDJキャプシド（例えば、AAV-DJ/8キャプシド、AAV-DJ/9キャプシド、または米国付与前公報第2012/0066783号に記載のキャプシドの他のいずれか）、AAV2N587Aキャプシド、AAV2E548Aキャプシド、AAV2N708Aキャプシド、AAVV708Kキャプシド、ヤギAAVキャプシド、AAV1/AAV2キメラキャプシド、ウシAAVキャプシド、マウスAAVキャプシド、rAAV2/HBoV1キャプシド、または米国特許第8,283,151号もしくは国際公報WO/2003/042397号に記載のAAVキャプシドからなる群より選択される。一部の実施形態において、突然変異キャプシドタンパク質は、AAVキャプシドを形成する能力を維持する。一部の実施形態において、キャプシド化タンパク質は、AAV5チロシン突然変異キャプシドタンパク質である。さらなる実施形態において、rAAV粒子は、クレードA~FからのAAV血清型のキャプシドタンパク質を含む。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV1キャプシド、ならびにAAV2のITR、突然変異AAV2のITRおよび本発明の開示のRNAiをコードする核酸を含む組換えゲノムを含む。さらなる実施形態において、rAAV粒子は、精製される。用語「精製される」は、本明細書で使用される場合、rAAV粒子が天然に存在するかまたはそれから最初に調製されるときに存在する可能性もある他の要素の少なくとも一部を欠いているrAAV粒子の調製物を包含する。したがって、例えば、単離されたrAAV粒子は、培養溶解産物または生産培養上清などの源となる混合物からそれを富化するための精製技術を使用して調製することができる。富化は、様々な方法で、例えば、溶液中に存在するDNアーゼ耐性粒子(DRP)もしくはゲノムコピー(gc)の比率、または感染力などによって測定してもよいし、または富化は、源となる混合物中に存在する第2の干渉する可能性がある物質、例えば生産培養物の汚染物質などの汚染物質、またはヘルパーウイルス、培地の要素などの製造過程の汚染物質に関して測定することができる。

【0167】

アデノウイルスベクター粒子を生産するための数多くの方法が当業界において公知である。例えば、guttadアデノウイルスベクターの場合、アデノウイルスベクターゲノムおよびヘルパーアデノウイルスゲノムを、パッケージング細胞株（例えば、293細胞株）にトランスフェクトしてもよい。一部の実施形態において、ヘルパーアデノウイルスゲノムは、そのパッケージ化シグナルの端にある組換え部位を含有していてもよいし、ヘルパーアデノウイルスより効率的に目的のアデノウイルスベクターがパッケージ化されるように、両方のゲノムをリコンビナーゼ（例えば、Cre/LoxP系が使用される可能性がある）を発現するパッケージング細胞株にトランスフェクトしてもよい（例えば、Alba, R.ら(2005) Gene Ther. 12増刊1: S18~27を参照）。アデノウイルスベクターは、本明細書に記載の方法などの標準的な方法を使用して回収および精製してもよい。

【0168】

レンチウイルスベクター粒子を生産するための数多くの方法が当業界において公知であ

10

20

30

40

50

る。例えば、第3世代レンチウイルスベクターの場合、gagおよびpol遺伝子を含む目的のレンチウイルスゲノムを含有するベクターを、rev遺伝子を含むベクターと共にパッケージング細胞株（例えば、293細胞株）にコトランスフェクトしてもよい。目的のレンチウイルスゲノムはまた、Tatの非存在下で転写を促進するキメラLTRも含有する（Dull, T.ら（1998）J. Virol. 72: 8463～71を参照）。レンチウイルスベクターは、本明細書に記載の方法を使用して回収および精製してもよい（例えば、Segura MMら、（2013）Expert Opin Biol Ther. 13（7）: 987～1011）。

【0169】

HSV粒子を生産するための数多くの方法が当業界において公知である。HSVベクターは、本明細書に記載の方法などの標準的な方法を使用して回収および精製してもよい。例えば、複製欠損HSVベクターの場合、前初期（IE）遺伝子の全てを欠失した目的のHSVゲノムを、ICP4、ICP27、およびICP0などのウイルス生産に必要な遺伝子を提供する補完細胞株にトランスフェクトしてもよい（例えば、Samaniego, L. A.ら（1998）J. Virol. 72: 3307～20を参照）。HSVベクターは、報告されている方法（例えば、Goins, WFら、（2014）Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology 1144: 63～79）を使用して回収および精製してもよい。

【0170】

本発明の開示のRNAiをコードする導入遺伝子を含む組換えウイルス粒子および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物も本明細書で提供される。医薬組成物は、本明細書に記載のあらゆる投与様式に適している可能性がある。本発明の開示のRNAiをコードする核酸を含む組換えウイルス粒子の医薬組成物は、脳に導入することができる。例えば、本発明の開示のRNAiをコードする核酸を含む組換えウイルス粒子は、線条体内に投与することができる。rAAV、アデノウイルス、レンチウイルス、およびHSV粒子などの本発明の開示の組換えウイルス粒子のどれでも使用することができる。

【0171】

一部の実施形態において、本明細書に記載の本発明の開示のRNAiをコードする導入遺伝子を含む組換えウイルス粒子および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物は、ヒトへの投与に好適である。このような担体は当業界において周知である（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第15版、1035～1038頁および1570～1580頁を参照）。一部の実施形態において、本明細書に記載のrAAVおよび医薬的に許容される担体を含む医薬組成物は、哺乳動物の脳への注射に好適である（例えば、線条体内投与）。一部の実施形態において、本明細書に記載の組換えレンチウイルス粒子および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物は、哺乳動物の脳への注射に好適である（例えば、線条体内投与）。一部の実施形態において、本明細書に記載の組換えアデノウイルス粒子および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物は、哺乳動物の脳への注射に好適である（例えば、線条体内投与）。一部の実施形態において、本明細書に記載の組換えHSV粒子および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物は、哺乳動物の脳への注射に好適である（例えば、線条体内投与）。

【0172】

このような医薬的に許容される担体は、滅菌された液体、例えば水および油、例えば石油、動物、植物または合成由来の油、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油などであってもよい。塩類溶液および水性デキストロース、ポリエチレングリコール（PEG）およびグリセロール溶液も、液体担体として、特に注射用溶液のために採用することができる。医薬組成物は、追加成分、例えば保存剤、緩衝液、等張化剤、抗酸化剤および安定剤、非イオン性の湿潤剤または清澄剤、増粘剤などをさらに含んでもよい。本明細書に記載の医薬組成物は、単回単位の剤形または複数回投与の剤形でパッケージ化することができる。組成物は、一般的に、滅菌された実質的に等張の溶液として製剤化される。

【0173】

10

20

30

40

50

V I I . 製造品およびキット

本明細書に記載の方法で使用するためのキットまたは製造品も提供される。態様において、キットは、好適なパッケージ中に、本明細書に記載の組成物（例えば、本発明の開示の組換えウイルス粒子、例えば本発明の開示のRNAiをコードする核酸を含むrAAV粒子）を含む。本明細書に記載の組成物（例えば線条体内用の組成物）のための好適なパッケージは、当業界において公知であり、例えば、バイアル（例えば密封バイアル）、容器、アンプル、ボトル、ジャー、フレキシブルなパッケージ（例えば、密封したマイラーまたはプラスチックバッグ）などが挙げられる。これらの製造品は、さらに滅菌および/または密封してもよい。

【0174】

本発明はまた、本明細書に記載の組成物を含むキットも提供し、これは、組成物の使用方法、例えば本明細書に記載の使用に関する説明書をさらに含んでもよい。本明細書に記載のキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および本明細書に記載のいずれかの方法を実行するための説明を含む添付文書などの、商業的および使用者の観点から所望の他の材料をさらに包含していてもよい。例えば、一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載される哺乳動物から霊長類の脳に少なくとも 1×10^9 ゲノムコピーを送達するための（例えば、線条体内投与を介して）本発明の開示のRNAiをコードする導入遺伝子を含む組換えウイルス粒子の組成物、霊長類の脳への注射に好適な医薬的に許容される担体、ならびに緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および霊長類の脳への注射（例えば、線条体内投与）を実行するための説明を含む添付文書の1つまたはそれ以上を含む。一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載の組換えウイルス粒子と共に、ハンチントン病を処置するための説明書を含む。一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載の方法のいずれか1つに従って本明細書に記載の組換えウイルス粒子を使用するための説明書を含む。

【実施例】

【0175】

本発明は、以下の実施例を参照することにより、よりよく理解される。しかしながら、これらは本発明の範囲を制限すると解釈されるべきではない。本明細書に記載の実施例および実施形態は単に例示の目的のためであり、それらの観点で様々な改変または変化が当業者に示唆されると予想され、本出願の本質および趣旨ならびに添付の特許請求の範囲のうちに包含されることが理解される。

【0176】

実施例1：AAV2/1-miRNA-HttはインビトロでHtt発現を低減する。

RNA干渉(RNAi)は、多くのヒト疾患の処置のためのアプローチを提供する。しかしながら、RNAiベースの療法の安全性は、オフターゲットの遺伝子サイレンシングとして公知の作用である、意図されないmRNAに結合してそれらの発現を低減する低分子阻害性RNA(siRNA)の能力によって妨げられる可能性がある。オフターゲットは主として、シード領域(低分子RNAのヌクレオチド2~8)が意図されないmRNAの3'-UTR中の配列と対合して、それらの転写物の翻訳の抑制および不安定化を指示するときに起こる。これまで、ほとんどの治療的RNAi配列は、主として遺伝子サイレンシング効能に関して選択され、安全性に関しては後で評価される。最小のオフターゲット能を有する2つのsiRNA(すなわち、全ての公知のヒトおよびアカゲザル3'-UTR内におけるシード相補体を欠くもの)を生成して、優性神経変性障害であるハンチントン病(HD)を処置した。このsiRNAは、低いインシリコのオフターゲットプロファイルを有するマウス脳において有力なハンチンチンのサイレンシングを実証する(表1、図1A)。1つの配列(207)を、HDのYAC128マウスモデルにおける行動表現型を回復させるその能力について試験した。AAV2/1-miRNA-Htt-207の線条体への送達は、YAC128マウスにおいて、脳中のHttのmRNAおよびタンパク質レベルを低減するだけでなく、異常な行動プロファイルも修正し、高いガイド鎖活性および正確な5'プロセッシングを実証し、オフターゲット作用の可能性を最小化する。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 7 】

【 表 1 】

表 1. 206 および 207 の miRNA および逆相補体(標的)配列ならびに制限部位オーバーハングを含むクローニングのための上および下の配列。

miRNA 番号	要素	配列	配列 番号
206	miRNA 配列 (アンチセンス、5'→3')	uGGCCGUCCAUCUUGGACCCG	1
206	逆相補体 (センス、5'→3')	CGGGUCCAAGAUGGACGGCCa	2
206	MiRNA 二重鎖をコードする DNA 配列	GTGGCCGTCCATCTTGGACC CGGTTTTGGCCACTGACTGA CCGGGTCCAATGGACGGCCA	3
206	MiRNA 二重鎖の RNA 配列	GUGGCCGUCCAUCUUGGACC CGGUUUUGGCCACUGACUGA CCGGGUCCA AUGGACGGCCA	4
206	実際の miRNA 配列を含有するステム ループをクローニングするための上の 配列(5'→3')、クローニングのための制 限部位のオーバーハングを含む*	TGCT GTGGCCGTCCATCTTG GACCCG GTTTTGGCCACTGA CTGAC CGGGTCCAATGGACG GCCA	5
206	左側の列に記載の配列の逆相補体をク ローニングするための下の配列 (5'→3')、クローニングのための制限部 位のオーバーハングを含む*	CCTGTGGCCGTCCAT TGGAC CCGGT CAGTCAGTGGCCAAA AC CGGGTCCAAGATGGACGG CCAC	6
207	miRNA 配列 (アンチセンス、5'→3')	AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA	7
207	逆相補体 (センス、5'→3')	UGCUUGUCAACCACACCGACU	8
207	MiRNA 二重鎖をコードする DNA 配列	AGTCGGTGTGGTTGACAAGCA GTTTTGGCCACTGACTGACTG CTTGTCACACACCGACT	9
207	MiRNA 二重鎖の RNA 配列	AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA GUUUUGGCCACUGACUGACUG CUUGUCCACACCGACU	10
207	実際の miRNA 配列を含有するステム ループをクローニングするための上の 配列(5'→3')、クローニングのための制 限部位のオーバーハングを含む*	TGCT AGTCGGTGTGGTTGA CAAGCAG TTTTGGCCACTGA CTGAC TGCTTGTCCACACC GACT	11
207	左側の列に記載の配列の逆相補体をク ローニングするための下の配列 (5'→3')、クローニングのための制限部 位のオーバーハングを含む*	CCTGAGTCGGTGTGGG GACAA GCAGT CAGTCAGTGGCCAAA ACT TGCTTGTCAACCACACCG ACTC	12

*クローニングのための配列に関して、クローニングのための制限部位のオーバーハングは下線で示され; miRNA 配列は太字で示され; ループ配列は標準文字で示され; miRNA 逆相補体の塩基 1~8 は太字、イタリックで示され; miRNA 逆相補体の塩基 11~21(170XX の 11~20)はイタリックで示される。

【 0 1 7 8 】

A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t 2 0 6 および 2 0 7 のヒトハンチンチン m R N A の低減を媒介する能力を、インビトロで、ヒト胎児腎臓 (H E K 2 9 3) 細胞を使用して試験した。A A V 2 / 1 - m i R N A - 2 0 6 および 2 0 7 発現プラスミドに加えて、事前に H t t レベルをおよそ 5 0 % 低減させることが示されている m i R N A 配列を含有する陽性対照プラスミド (1 7 0 X A) で、H E K 2 9 3 細胞をトランスフェクトした (処置ごとに 8 つの複製) 。 F u g e n e トランスフェクション試薬を使用して細胞をトランスフェクトし、4 8 時間後に回収した。T a q M a n (登録商標) C e l l s - t o - C T

(商標)キット(Ambion)を使用して全RNAを単離した。定量リアルタイムRT-PCRによってRNAレベルを測定した(ABI Prism 7500 シーケンスデテクター(Applied Biosystems)で遂行し、分析した)。発現レベルをヒトPPIA(ペプチジルプロリルイソメラーゼ)に正規化した。図2で示されるように、206および207プラスミドの両方でのトランスフェクション後、未処置対照と比較して、ヒトHttのmRNAレベルが低減した。Htt低減のレベルは、170 X A陽性対照と比較してほぼ等しかった。

【0179】

実施例2:AAV2/1-miRNA-HttはインビボでHtt発現を低減する。

YAC128 HDマウスの線条体においてHTTタンパク質レベルを低減させるAAV2/1-miRNA-206および207の能力を試験した。成体YAC128マウスに、AAV2/1-miRNA-Htt206(1e10vg/部位)またはAAV2/1-miRNA-Htt207(1e10vg/部位)、またはAAV2/1-CTL3(非コードmiRNA対照)(1e10vg/部位)の両側の線条体内注射を行った。AAV注射後の1カ月に、動物を殺し、PBSで灌流した。組織学および生化学分析のために脳を収集した。生化学分析のために、1つの半球の線条体領域を顕微解剖し、液体窒素中で急速冷凍した。突然変異ヒトおよびマウスHttのmRNAおよびHTTタンパク質の線条体のレベルを、それぞれQPCRおよびウェスタンブロットによって評価した。突然変異ヒトHttおよびマウスHttのmRNAは、CTL3対照動物と比較した場合、AAV2/1-miRNA-Htt206およびAAV2/1-miRNA-Htt207が注射されたマウスにおいて有意に低減した(図3A)。PPIAは、全てのQPCRアッセイで正規化の対照遺伝子として役立てた。突然変異ヒトおよびマウスHTTタンパク質は、CTL3対照動物と比較した場合、全てのAAV2/1-miRNA-Httが注射されたマウスにおいて有意に低減し、全ての処置にわたり同程度の低減(およそ50%、 $p < 0.05$)を記録した(図3B)。ベータ-チューブリンを全てのウェスタンブロットのための正規化の対照遺伝子として役立てた。

【0180】

YAC128マウスの脳および体重に対するAAV2/1-miRNA-Htt206および207の作用を評価した。注射の1カ月後、外科手術の日の動物体重を、殺した日に採った体重と比較した(図4A)。CTL3対照と比較して、AAV2/1-miRNA-Htt206および207間で差はなかった。処置の1カ月後、全てのマウスは健康であり、機敏であり、反応が速いように見え、いずれの処置グループでも体重の減少は観察されなかった。PBS灌流および脳切開の後、水腫脳の湿潤を記録した。CTL3で処置した対照と比較して、AAV2/1-miRNA-Htt206および207で処置したYAC128マウスの脳の重量における統計学的に有意な増加が観察された(図4B)。

【0181】

実施例3:AAV2/1-miRNA-Httは、YAC128マウスにおける行動および協調性の欠陥を修正する

AAV2/1-miRNA-Htt-207の線条体への送達の、YAC128マウスにおける異常な行動表現型を修正する能力を評価した。また、HDのYAC128マウスモデルに存在するよく特徴付けられた表現型の欠陥に対する、突然変異Httのレベルの低減を媒介したAAV2/1-miRNA-Htt207の影響も検査した。年齢を適合させた(3月齢)YAC128およびFVB野生型同腹子マウスに、AAV2/1-miRNA-Htt-207(2e10vg/部位)またはAAV2/1-CTL3対照ベクター(2e10vg/部位)のいずれかの両側の線条体内注射を行った。マウスに行動試験を行い、処置の3カ月後に殺した。脳ホモジネートのウェスタンブロット分析から、突然変異ヒトHTTタンパク質のレベルが、AAV2/1-CTL3で処置した対照と比較した場合、AAV2/1-miRNA-Htt-207が注射されたYAC128およびFVB野生型同腹子マウスの線条体を有意に低減させたことが示された(およそ50%

の低減、 $p < 0.01$ ）。この研究において、マウス H T T タンパク質レベルは有意に低減しなかった（図 5 A および 5 B）。リアルタイム定量 P C R 分析から、m R N A レベルにおける同程度の低減が示された（図 5 C および 5 D）。

【0182】

Y A C 1 2 8 マウスは、3 月齢から始まる運動協調性の欠陥（これは、ロータロッド試験を使用して説明することができる）およびうつ状態の表現型（これは、ポーソルト水泳試験を使用して説明することができる）を示すことが報告されている（S l o w ら、2003、V a n R a a m s d o n k ら、2007）。注射の3カ月後における A A V 2 / 1 - C T L 3 で処置した Y A C 1 2 8 マウスのロータロッド試験から、A A V 2 / 1 - C T L 3 で処置した野生型同腹子と比較した場合、有意な運動協調性の欠陥が示された（A N O V A、 $p < 0.05$ ）（図 6 A）。しかしながら、A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t - 207 で処置した Y A C 1 2 8 マウスは、野生型マウスの性能レベルと区別できないほどの性能レベルを示した（A N O V A、テューキーの事後検定；W T 207 対 Y A C 1 2 8 207、 $p = N S$ ；W T C T L 3 対 Y A C 1 2 8 C T L 3、 $p < 0.05$ ）。したがって、突然変異 H t t レベルの部分的な低下は、Y A C 1 2 8 マウスの運動障害を修正するのに十分であった。A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t - 207 を受けた野生型マウスと A A V 2 / 1 - C T L 3 を受けた野生型マウスとのロータロッド性能において有意差はなかった。以前の報告から、Y A C 1 2 8 マウスは、ポーソルト水泳試験を使用して検出できるうつ状態の表現型を示すことが示された（P o u l a d i ら、2009）。水の容器中に置かれたとき長期間無動である場合、動物は、うつ状態を示すとみなされる。基本的な水泳速度試験を使用して（この場合、プラットフォームに到達までの水泳潜時が測定された）、研究者は、このポーソルト水泳試験におけるうつ状態の表現型は、Y A C 1 2 8 マウスの水泳能力と関連せず、このモデルで観察された十分に立証された運動協調性の欠陥から無関係であったことを実証した（P o u l a d i ら、2000）。3 月齢の Y A C 1 2 8 および W T 同腹子マウスに、A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t - 207 - または A A V 2 / 1 - C T L 3 - ベクターを注射し、3 カ月後、ポーソルト水泳試験で試験した。C T L 3 で処置した Y A C 1 2 8 マウスは、A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t - 207 で処置した Y A C マウスまたは A A V 2 / 1 - C T L 3 で処置した野生型動物のいずれかと比較した場合、無動状態の期間が増加したことを示した（図 6 B；A N O V A、 $p < 0.05$ ）。この場合も、A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t または A A V 2 / 1 - C T L 3 のいずれかを受けた野生型マウスの性能において有意差はなかった。A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t - 207 が注射された Y A C 1 2 8 マウスは、A A V 2 / 1 - C T L 3 で処置した対照より有意に短い時間を無動状態に費やした。実際に、A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t - 207 で処置した Y A C 1 2 8 マウスの性能は、それらの野生型同腹子の性能と類似していたことから、この異常な表現型がほぼ完全に修正されたことが示唆される（A N O V A、テューキーの事後検定；Y A C 207 対 Y A C C T L 3、 $p < 0.05$ ）。

【0183】

Y A C 1 2 8 マウスの脳および体重に対する A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t 207 の作用を評価した。注射の3カ月後、外科手術の日における動物の体重を、殺した日に採った体重と比較した。C T L 3 で処置した対照と比較して、A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t 207 で処置したマウス間で体重の差はなかった（図 7 A）。処置の3カ月後、全てのマウスは健康であり、機敏であり、反応が速いように見え、いずれの処置グループでも体重の減少は観察されなかった。P B S 灌流および脳切開の後、水腫脳の湿潤を記録した。C T L 3 で処置した対照と比較して、A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t 207 で処置した Y A C 1 2 8 マウスの脳の重量における差はなかった（図 7 B）。

【0184】

実施例 4 . m i R N A は、インビボ送達後の高いガイド活性および正確な 5' プロセッシングを実証する

Y A C 1 2 8 マウスを、A A V 2 / 1 - m i R N A - H t t 206 または A A V 2 / 1

- miRNA - Htt 207で頭蓋内注射により処置した。処置後、線条体を除去し、全RNAを単離した。NEBNext低分子RNAライブラリープレップセット (New England Biolabs) を使用して低分子RNAシーケンシングライブラリーを構築し、Illumina MiSeq機器でシーケンシングを実行した。各処置につき2匹の別個のマウスからのサンプルを分析した。ここで全ての内因性配列を含む全てのmiRNAリードが、各処置ベクターにつき全てのガイドおよびパッセンジャーリードと同様に示される。この実験において、AAV2/1-miRNA-Htt 202Tベクターは、これまでにシーケンシングされているため、それによる処置が対照として包含された。各ガイドおよびパッセンジャー鎖の予測される開始位置のパーセントは、>99%であり、207ベクターは、76.1%および79.3%の高いガイド：パッセンジャー鎖の比率を有していた。

10

【0185】

【表2】

表2. ガイド活性および5'プロセッシング

ベクター	202T#	206		207	
サンプルID番号	202	23	28	33	34
全てのリード*	1,898,745	3,184,602	3,307,273	3,386,131	2,599,808
全てのリード数(ガイド)	47,001	196	186	11,801	39,177
期待される開始位置内の%	99.1	100	99.5	97.9	97.6
全てのリード数(パッセンジャー)	465,981	554	719	3,075	12,327
期待される開始位置内の%	99.2	99.1	99.4	99.5	99.2
%ガイド	0.2	26.1	20.6	79.3	79.1

20

【0186】

実施例5. 自己相補的なmiRHtt 207ベクター

207miRHtt発現カセットは、自己相補的ベクターゲノムとしてパッケージ化することができる。これを達成するために、ITRプラスミドは、サイズがわずか2.3kbになるように設計され、それにより、4.6kbの二量体ベクターのパッケージ化が容易になる。4.6kbは、AAVベクターのパッケージ化容量である。ITRプラスミドは、図8に描写されたように、5'WT ITRおよび突然変異D欠失、短縮3'ITR (ITR) を有するように設計することができる。パッケージ化できる予測のベクターゲノムは、自己相補的なベクターゲノムであり、これは、3165bpであると予想され、5'および3'WT ITR、ならびに第3の内部デルタITR (例えば、キメライントロン) を含有すると予想される。加えて、一部の単量体ベクターゲノムがパッケージ化されることが予測され、これらのサイズは、1656bpと予想される。

40

【0187】

自己相補的AAV miRHtt 207ベクターを生成するための代替アプローチ、すなわち1つのキャプシド当たり2つのベクターゲノムをパッケージ化することは、ベクターゲノムの2つのコピーが、3365bpの複製中間種としてパッケージ化されるように、低分子の、一本鎖の、すなわち1755bpのベクターゲノムを作製することになると予想される (図9)。この実施例において、ITRプラスミドは、5'および3'WT ITRおよび3365bpの複製中間体を有すると予想され、3つのWT ITR、1つの5'および3'ならびに1つの内部ITRを有すると予想される。また1755bpの一本鎖化

50

ベクターゲノム種もパッケージ化できる。

【 0 1 8 8 】

追加の配列

全てのポリペプチド配列は、別段の指定がない限りN末端からC末端として提示される。
全ての核酸配列は、別段の指定がない限り5'から3'として提示される。

【 0 1 8 9 】

miRNA足場のDNA配列

c t g g a g g c t t g c t g g a g g c t g t a t g c t g t t a g a c a a t g a t
t c a c a c g g t g t t t t g g c c a c t g a c t g a c a c c g t g t g t c a t
t g t c t a a c a g g a c a c a a g g c c t g t t a c t a g c a c t c a c a t g
g a a c a a a t g g c c (配列番号 1 4)

10

【 0 1 9 0 】

s c A A VベクターのバリエーションA A VのITR

C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C A C T G A G G C C G
G G C G A C C A A A G G T C G C C C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C
G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A (配列番号 1
5)。

【 0 1 9 1 】

20

30

40

50

【化 1】

ssAAV2/1miRHtt.de

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTT
GGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCTATA
TTACCTGTAGGCAATTGGATCCCGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG
GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGAC
GTCAATGGGTGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCA
TCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCGAGCGATGGGGCGGGGG
GGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGG
CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGCCCTATAAAAGC
GAAGCGCGGCGGGGCGGGAGTTCGTGCGCGCTGCTTCCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCCGCCCTCGCGCGCC
CGCCCCGGCTCTGACTGACCGGCTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTCTCTCCGGGCTGTAATT
AGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTT
TGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGCTGCGTGAGCGCGCGTGCCTCCGCGCTGC
CCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCG
GGGCGGCTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGT
GAGCAGGGGGTGTGGGCGCTCGGTGCGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCC
CGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGGGGCTCGCCGTGCGGGGCGGGGGGTGGGCGCAGGTG
GGGTGCGGGGCGGGGCGGGGCGCCCTCGGGCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGAGCGCG
GCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCTTT
TGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCGCGCACCCCTCTAGCGGGCGGGGCGAAGCGGT
GCGCGCGCGGCAAGGAAGAAATGGGCGGGGAGGGCTTCTGCTGCGTGCCTGCGCGCGCGCTCCCTTCTCTCTCC
AGCTTCGGGGTGTCCGCGGGGGAGCGGCTGCTTTCGGGGGGACGGGGCAGGGGCGGGGTTCCGCTTCTGCGTG
TGACCGGCGGCTCTAGAGCTCTGCTAACCATTGTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCTGGGCAACGTGC
TGGTTATTGTGCTGTCTCATCTTTTGGCAAAGAATTCTTCGAAAGATCTGCTAGCTTGGAGCTTGTGAAGGC
TGTATGCTGAGTGGTGTGGTTGACAAGCAGTTTGGCCACTGACTGACTGCTTGTCCACACCGACTCAGGACA
CAAGGCTGTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAA
ATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCGGTGC
CTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA
GTAGGTGTCTATCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGCGAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGC
ATGCTGGGAGCTAGAGTCGACCGGACCGGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCTTGAAGGTTCTCTCC
CATTTGCTGGAGAGAGGGGAAGGTGGGCATCACCAGGGGTGAGTGAAGGTTTGGAAAGTGTAGCAGAATAAGA
AACCATGAGTCCCTCCCTGAGAAGCCCTGAGCCCCCTTGACGACACACATCCCTCGAGGCTCAGCTTCATCATC
TGTAAGAGGTGCTGAAATGACCATCAAGCTGCCGAAAAGATTGTGTGGGGATAATTCAAACTAGAGGAAGA
TGAGAATTTCTACATCGTGGCGATGTCAGGCTAAGAGATGCCATCGTGGCTGTGCATTTTATTGGAATCATAT
GTTTATTGAGGCTGTCTGGATATTACAAATAAAATGTTGGAGCATCAGGCATATTGGTACCTTCTGTCTAAG
GCTCCCTGCCCTTGTAAATTGGCAGCTCAGTTATTCATCCAGGGCAACATTCTGCTTACTATTCTGAGAGCT
TTCTCATCCTCTAGATTGGCAGGGGAAATGCAGATGCTGAGCAGCTCCCTCTGCCATACCAACAGAGCTTC
ACCATCGAGGATGCAGAGTGGACAGGGGCTCAGGGACCCCTGATCCAGCTTTCTCATTGGACAGAAGGAGGA
GACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCCAGGACTTTAGCTGTGCTGACTGCAG
CCTGGCTTGCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAAGAGCAAGGGAGCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCCTGGCCT
TGCTCCACCTCCCTCCCTATGCTGTTTTCTTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCCCTGGGGCCCCCA
GGACCTGGCATTTTAACCCCTCAGGGGCGAGGAGGCGCTGAGATACAGAAGAGTCCATCCTGCTGTATGC
CACACACCATCCCAAGTTACGTACTAGTTGGAAGCCACGCGACCGTTATAGTTACGAGGAACCCCTAGTAT
GGAGTTGGCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACGCCCGG
CTTTGCCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAAGATCT

(配列番号16)

m I R 2 0 7 の D N A 配列は太字で示される (配列番号 17)。

スタッパー配列はイタリックで示される (配列番号 18)。

【 0 1 9 2】

A 1 A T 遺伝子の一部

【 0 1 9 3】

10

20

30

40

【化 2】

aatttggcccttggggcctaggcaattggatccggcccgcagagaaaacatcccagggatcttadagatcacatgcagg
cagggaccagctcaacccctctttaaattgctcatccagggaggggcccagggatggaggggaggggttgaggagcga
gagggcagttatcttggggtgggattccaccctcttcccatgaagaggggagacgtgggtatcttcttcaatcatt
agaagacaaaaggggttgggtgaacttgacccctggggggggtatagacatgggtatggccctctaaaaacatggcccccag
cagcttcagtcctcttctcgtcgtatgggcagcacagccttatgcacgggtcggaggggagagaagcagagacag
ttgttaaggtggttcacagggtccagagcaggttcacgtggacacccctccaggaagcgcctcactcccccggaggg
ccctggccctgcacacacctctccctccctgacacataggctctgctccctccctcaagggtttgggtgatgggggtg
gctccctctggtccatcttccctgacacagcgcctctccctccctcagctcaggtgcacccacacacacaggaagga
gcacgtcactccacgtctgctccctccagggctctctctctctctagtacacggcttgaagctccttgaggacacga
ccctggcagtgacaccttcacagtgccacagaccccaagataagcagccattcattggaaactgcaggttgggtcattgg
tcgctcttagtttctccaaaataagtggtcacttttagctgaatacttccattaaatccagacacccaaatctccacagat
cgaaggagtcagaaattctcttgaacacacttagcccaaacctctctgtgtcaggtatggataaatacaggcccaaa
tgctcagaaggtcttgggcaagttgaattcagggtcagtgacacacccctcaagggagggcccccgaaggtgcag
ctgcacagcagccctcgcctggctttgtgtttgcccacccgcgcctggtcagtgacacacccctcctcaggag
ctcagctgggtctcctcatttcttccctccgcctccctccctcagctcagggacaggtgctgcagcccccacacattc
ttccctacagataccatgggtgcacacaggtcgtcaggggtgatctcacttggagagcttcagggggtgctcctct
gtgaccccccagagaggtcagcccccattgctgaagaccttagtgatcccaggttgacccaggacgctcttcagatca
taggttccagtaarggacagtttgggtaaaatgtaagctggcagacccctcgtcgcagaaaaagaaatccaggcag
gcacagcattctctcttctctgggacccacacacagtcgaaggtgtttcttctctgattatcttctgcccactta
ctctgtggtccctccac
tcaaaagaaatgtaacatcgaaggaatccacaaaagcttgaataccacacacacacacacacacacacacacacac
gactgtctcactcttgcctctgtagtgggtgcacccac
agaaacacaggggctgggtgcagtgccacagtgac
gtgctcctctctgggtttccatggggagac
ggctctctgagtcgttccac
gcattggaacagagaaattccagcctcagattctcttctgaacccacacacacacacacacacacacacacacacac
agtgatcaaaaacgaactagatcagcagggcatgggcataatccagaaatgcacacacacacacacacacacacacac
atgtttaagtatcacttactacaggaac
gcgaacacagggcctggctgttccaatccgaac
cccagggacattctac
ctctgcagaaacgt
gagagaggggaaggtgggcac
ccctccctgagaagccctgagccccccttgacgac
gtcgaactgac
ctac
gggtgtcttggatattacaaaataaaatgttggagcatcaggcatatttgggtacctctctgtcctaaaggtccctgac
ccttgttaattggcagctcagttattcatccagggcaaacattctgcttactattccctgagagctttccctcatcc
tctagattggcaggggaatgcagatgcctgagcagcctccctctgccataccaacagagcttcaccatcgagg
catgcagagtgagacaggggctcagggacccctgatcccagcttctcattggacagaaggaggagactgggggt
ggagaggggacctgggcccccaactaaggccacagcagagccaggacttttagctgtgctgactgcagcctggcttgc
ctccactgcctcctttgcctcaagagcaaggagcctcagagtgagggaagcagccctggccttgcctccac
ctccctccctctgctgttttccctgggacagtgaggagctggcttagaatgcctggggcccccaggaacccctggc
attttaacccctcagggcaggaaggcagctgagatagcagaagagtcacatccctgctgtatgccacacacacacac
ccccacagttacgtactagttcgaagccacgcgtccgaaggccgaatt

(配列番号 20)

一部の実施形態で使用されるスタッファ配列は下線で示される。

【0194】

デルタキメライントロン配列

g g a g t g c g c t g c g c g c t g c c t c g c c c c g t g c c c c g t c c c
g c c g c c g c c t c g c g c c g c c c g c c c c g g c t c t g a c t g a c c g
c g t t a c t c c c a c a g g t g a g c g g g c g g g a c g g c c c t t c t c c
t c c g g g c t g t a a t t a g c g c t t g g t t t a a t g a c g g c t t g t t
t c t t t t c t g t g g c t g c g t g a a g c c t t g a g g g g c t c c g g g
a g c t a g a g c c t c t g c t a a c c a t g t t c a t g c c t t c t t c t t t

10

20

30

40

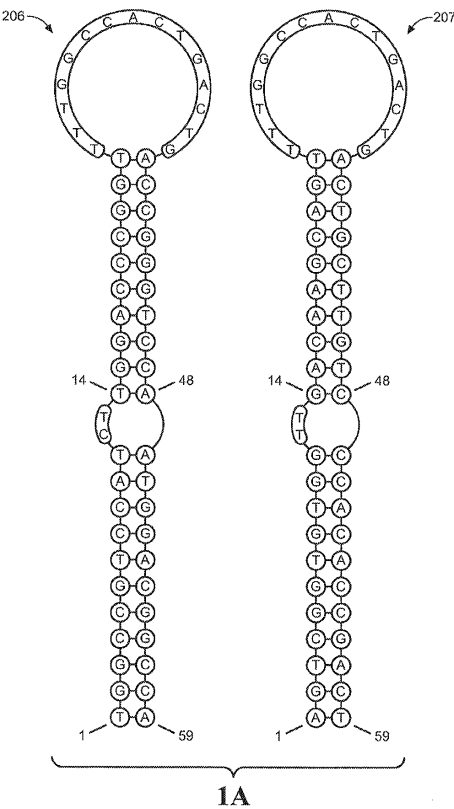
50

t t c c t a c a g c t c c t g g g c a a c g t g c t g g t t a t t g t g c t g t
c t c a t c a t t t t t g g c a a a g a a t t c c t c g a a g a t c c g g t a c c
c a a t t c c g g g g c c c c a c g c t g c g c a t c c g c g

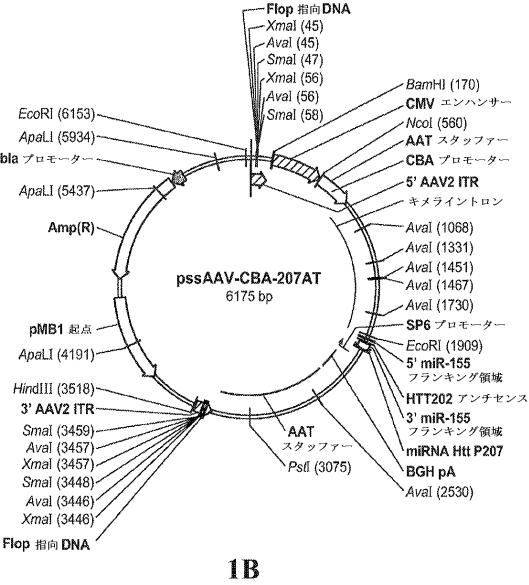
(配列番号 2 1)

【 図面 】

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



10

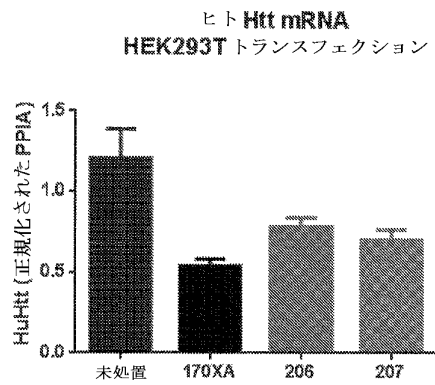
20

30

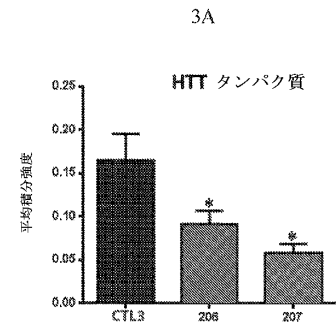
40

50

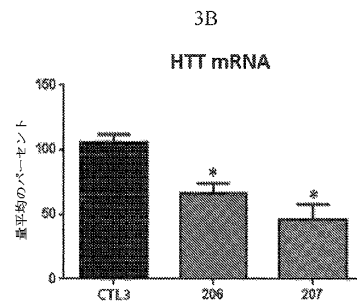
【図 2】



【図 3】

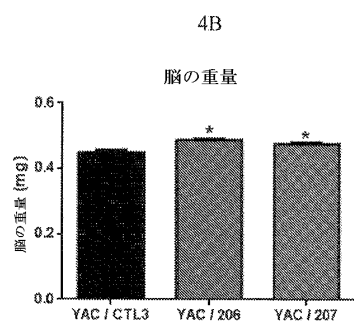
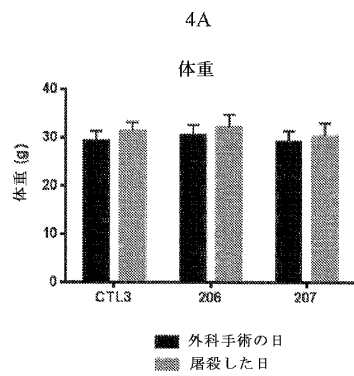


10



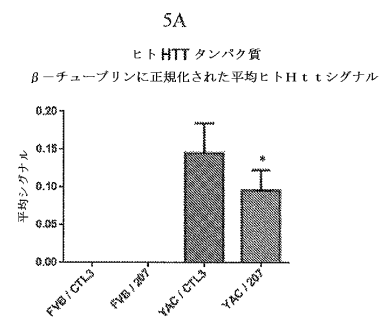
20

【図 4】

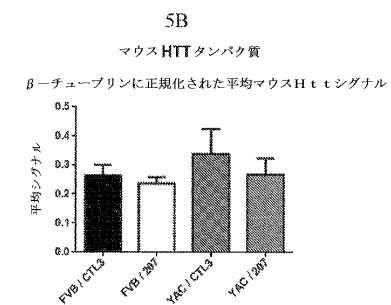


* ANOVA, テューキーの事後検定により CTL3 と有意に異なる

【図 5 - 1】



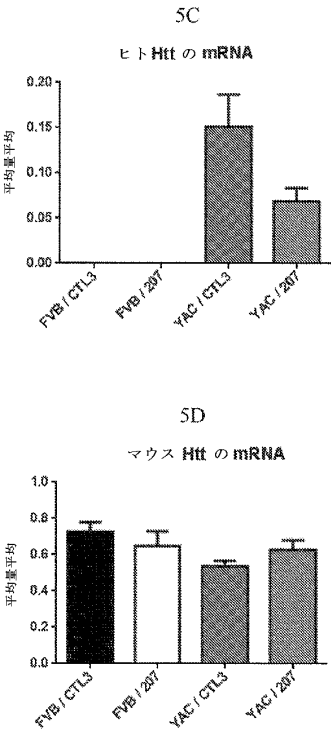
30



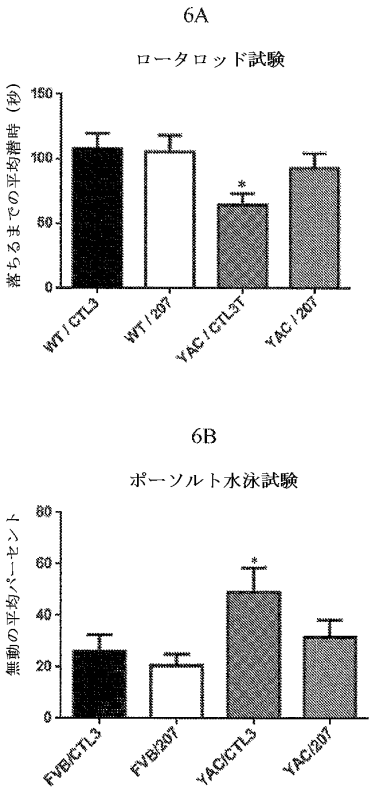
40

50

【 図 5 - 2 】



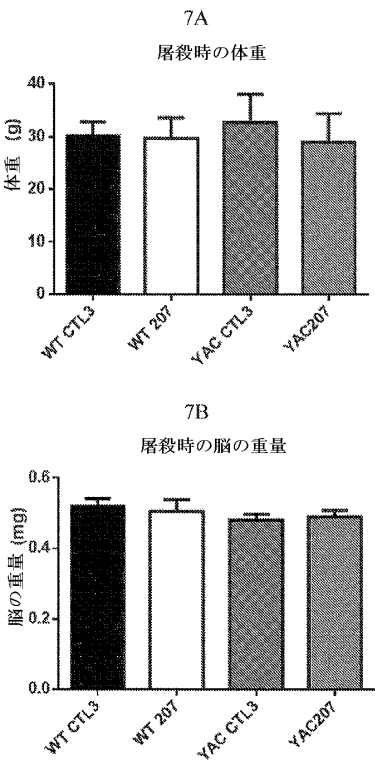
【 図 6 】



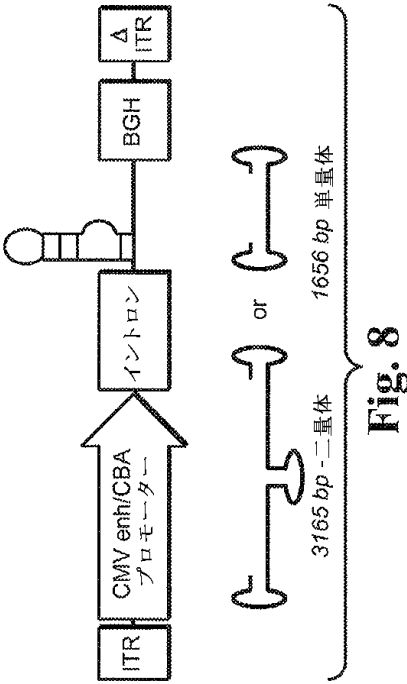
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

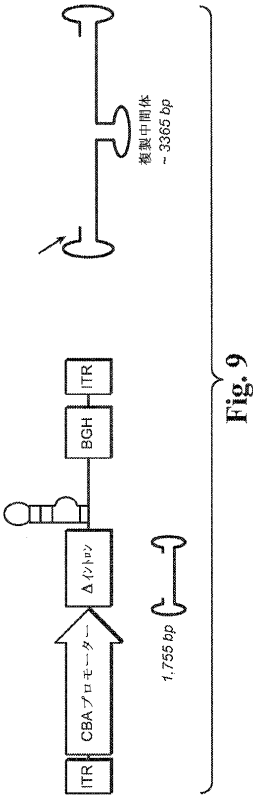


30

40

50

【図 9】



【配列表】

0007248658000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/869 (2006.01)	C 1 2 N	15/869	Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	9/16 (2006.01)	A 6 1 K	9/16	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 . ケンブリッジ . リバー・ストリート 2 8 0 . ナンバー 3

(72)発明者 ブレンダ・リチャーズ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー - 5 2 5 . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ

(72)発明者 リサ・エム・スタネック

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー - 5 2 5 . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 3 0 5 8 9 (WO , A 2)

PFISTER, E. L. et al. , Safe and Efficient Silencing with a Pol II, but Not a Pol III, Promoter Expressing an Artificial miRNA Targeting Human Huntingtin , Molecular therapy. Nucleic acids , 2017年06月 , Vol. 7 , P. 324-334

MINIARIKOVA, J. et al. , Design, Characterization, and Lead Selection of Therapeutic miRNAs Targeting Huntingtin for Development of Gene Therapy for Huntington's Disease , Molecular therapy. Nucleic acids , 2016年 , Vol. 5 , e297

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N

A 6 1 P

A 6 1 K

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q