

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7565218号
(P7565218)

(45)発行日 令和6年10月10日(2024.10.10)

(24)登録日 令和6年10月2日(2024.10.2)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113 1 3 0 Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864 1 0 0 Z
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 P	25/00
請求項の数 28 (全163頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-570046(P2020-570046)	(73)特許権者	517157204
(86)(22)出願日	令和1年7月2日(2019.7.2)		ボイジャー セラピューティクス インコ
(65)公表番号	特表2021-529513(P2021-529513		ーポレイテッド
	A)		VOYAGER THERAPEUTI
(43)公表日	令和3年11月4日(2021.11.4)		C S, INC.
(86)国際出願番号	PCT/US2019/040230		アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチュー
(87)国際公開番号	WO2020/010042		セッツ州 レキシントン ハイデン アベ
(87)国際公開日	令和2年1月9日(2020.1.9)		ニュー 7 5
審査請求日	令和4年7月1日(2022.7.1)	(74)代理人	100105957
(31)優先権主張番号	62/693,040		弁理士 恩田 誠
(32)優先日	平成30年7月2日(2018.7.2)	(74)代理人	100068755
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 恩田 博宣
	米国(US)	(74)代理人	100142907
(31)優先権主張番号	62/746,104		弁理士 本田 淳
(32)優先日	平成30年10月16日(2018.10.16)	(74)代理人	100152489
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 筋萎縮性側索硬化症および脊髄に関連する障害の治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞におけるSOD1の発現を阻害または抑制するための、2つの末端逆位反復（ITR）間に配置された核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターゲノムであって、前記核酸配列は、アルブミン遺伝子由来のフィラー配列を含むとともに、siRNA二重鎖のセンス鎖配列およびアンチセンス鎖配列をコードしており、
前記センス鎖配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号7のヌクレオチド配列を含むとともに、前記アンチセンス鎖配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号8のヌクレオチド配列を含み、
前記アルブミン遺伝子由来のフィラー配列は、配列番号27のヌクレオチド配列を含む、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターゲノム。

【請求項2】

前記センス鎖配列は、配列番号2のヌクレオチド配列を含み、且つ、
前記アンチセンス鎖配列は、配列番号1のヌクレオチド配列を含む、
請求項1に記載のAAVベクターゲノム。

【請求項3】

（i）前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖配列は、独立して、30ヌクレオチド以下である；
（ii）前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖配列の少なくとも一方は、少なくとも1つまたは2つのヌクレオチドの3'オーバハングを含む；および／または

(i i i) 前記アンチセンス鎖および標的 mRNA は、少なくとも 1 つのミスマッチを含む、

請求項 1 または 2 に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 4】

前記核酸配列は、

- (i) 5 ' フランキング領域；
- (i i) ループ領域；および
- (i i i) 3 ' フランキング領域

をさらに含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 5】

- (i) 前記 5 ' フランキング領域は、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含み、
 - (i i) 前記ループ領域は、配列番号 4 のヌクレオチド配列を含み、且つ
 - (i i i) 前記 3 ' フランキング領域は、配列番号 5 のヌクレオチド配列を含む、
- 請求項 4 に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 6】

前記核酸配列は、配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 7】

前記 A A V ベクターゲノムは、

- (i) プロモータ、
- (i i) イントロン、および／または
- (i i i) ポリ A 配列

をさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 8】

前記プロモータは、ユビキタスプロモータである、請求項 7 に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 9】

前記プロモータは、組織特異的プロモータである、請求項 7 に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 10】

前記プロモータは、H1 プロモータ、PGK プロモータ、EF-1 α プロモータ、CB A プロモータ、シナプシンプロモータ、CAG プロモータ、GFAP プロモータ、またはそれらのトランケート型である、請求項 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 11】

前記 A A V ベクターゲノムは、配列番号 25 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 12】

前記 A A V ベクターゲノムは、5 ' から 3 ' 方向に、

- (i) 配列番号 26 のヌクレオチド配列を含む 5 ' I T R、
- (i i) 配列番号 27 のヌクレオチド配列を含むアルブミン由来フィラー配列、
- (i i i) 配列番号 28 のヌクレオチド配列を含むプロモータ、
- (i v) 配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む調節性ポリヌクレオチド、
- (v) 配列番号 29 のヌクレオチド配列を含むポリ A 配列、および
- (v i) 配列番号 30 のヌクレオチド配列を含む 3 ' I T R

を含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノム。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノムと A A V カプシドタンパク質とを含む、アデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記 A A V カプシドタンパク質は、A A V r h 1 0 カプシドタンパク質、A A V 9 カプシドタンパク質、A A V 5 カプシドタンパク質、またはそれらのバリエーションを含む、請求項 1 3 に記載のアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノムまたは請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の A A V 粒子と、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノムまたは請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の A A V 粒子を含む細胞。

【請求項 1 7】

前記細胞は、哺乳類細胞、昆虫細胞、または細菌細胞である、請求項 1 6 に記載の細胞。

【請求項 1 8】

対象の細胞における S O D 1 を阻害する方法において使用するための組成物であって、2 つの末端逆位反復 (I T R) 間に配置された核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターゲノムを含み、

前記核酸配列は、アルブミン遺伝子由来フィラー配列を含み、

前記核酸配列は、s i R N A 二重鎖のセンス鎖配列およびアンチセンス鎖配列をコードしており、

前記センス鎖配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 7 のヌクレオチド配列を含むとともに、前記アンチセンス鎖配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 8 のヌクレオチド配列を含み、

前記アルブミン遺伝子由来フィラー配列は、配列番号 2 7 のヌクレオチド配列を含む、組成物。

【請求項 1 9】

前記センス鎖配列は、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含み、且つ、

前記アンチセンス鎖配列は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、

請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

(i) 前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖配列は、独立して、3 0 ヌクレオチド以下である；

(i i) 前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖配列の少なくとも一方は、少なくとも 1 つまたは 2 つのヌクレオチドの 3 ' オーバハングを含む；および／または

(i i i) 前記アンチセンス鎖および標的 m R N A は、少なくとも 1 つのミスマッチを含む、

請求項 1 8 または 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

対象の細胞における S O D 1 を阻害する方法において使用するための、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の A A V ベクターゲノムまたは請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の A A V 粒子を含む組成物、あるいは請求項 1 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

(i) S O D 1 は、野生型 S O D 1、少なくとも 1 つの突然変異を有する S O D 1、または、野生型 S O D 1 および少なくとも 1 つの突然変異を有する S O D 1 の両方である；および／または

(i i) S O D 1 の発現は、2 0 ～ 1 0 0 % 阻害または抑制される、

請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記細胞は、C N S 細胞、ニューロン、運動ニューロン、中型有棘ニューロン、アストロサイト、またはそれらの組合せである、請求項 1 8 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 4】

10

20

30

40

50

前記対象は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を有する、請求項18～23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項25】

ALSの治療において使用するための、請求項1～12のいずれか一項に記載のAAVベクターゲノムまたは請求項13もしくは14に記載のAAV粒子を含む組成物、あるいは請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項26】

前記ALSは、孤発性ALSまたは家族性ALSである、請求項24または25に記載の組成物。

【請求項27】

前記組成物は、実質内送達、静脈内送達、または大槽（ICM）内送達により投与される、請求項18～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項28】

(i) 実質内送達による前記投与は、脊髄内の2つの部位で生じ、任意選択で頸部脊髄内の2つの部位で生じ、さらに任意選択で、脊髄のレベルC3およびC5で生じる；

(ii) 前記投与の容積は、脊髄のレベルC3では5 μ L～240 μ Lであり、脊髄のレベルC5では5 μ L～240 μ Lである；

(iii) 前記投与の容積は、脊髄のレベルC3では5 μ L～60 μ Lであり、脊髄のレベルC5では5 μ L～60 μ Lである；

(iv) 前記投与の容積は、脊髄のレベルC3では25 μ L～40 μ Lであり、脊髄のレベルC5では25 μ L～40 μ Lである；

(v) 用量は、脊髄のレベルC3では 1×10^{10} vg～ 1×10^{12} vgであり、脊髄のレベルC5では 1×10^{10} vg～ 1×10^{12} vgである；

(vi) 用量は、脊髄のレベルC3では 5×10^{11} vg～ 8×10^{11} vgであり、脊髄のレベルC5では 5×10^{11} vg～ 8×10^{11} vgである；および／または

(vii) 用量は、脊髄のレベルC3では 2×10^{10} vg～ 7×10^{11} vgであり、脊髄のレベルC5では 2×10^{10} vg～ 7×10^{12} vgである、

請求項27に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、SOD1遺伝子発現および／またはSOD1酵素産生に干渉するために、スーパーオキシドジスムターゼ1（SOD1）遺伝子を標的とするか、またはSOD1を標的とする分子をコードするAAVベクター、低分子干渉RNA（siRNA）二重鎖、shRNA、マイクロRNAまたはそれらの前駆体を含むポリヌクレオチドを設計、調製、製造および／または製剤化するための組成物、方法およびプロセスに関する。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに挿入される。

【0002】

脊髄に関連する疾患および／または他の障害を有する対象において、SOD1を阻害するための、または脊髄関連疾患もしくは障害に関連する任意の遺伝子の発現を変更するための方法も開示される。本方法は、少なくとも1つのポリヌクレオチドを、少なくとも脊髄への実質内送達経路により、脊髄に関連する障害（例えば、神経変性疾患）を有する対象に投与することを含む。これらの実施形態において、疾患は運動ニューロン疾患であり、より具体的には、疾患は筋萎縮性側索硬化症（ALS）である。

【背景技術】

【0003】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、ルー・ゲーリッグ病としても知られており、一次運動皮質、脳幹、および脊髄における上位および下位運動ニューロン（MN）の顕著な喪失により特徴付けられる致死性の進行性神経変性疾患である。上位運動ニューロン（例えば

10

20

30

40

50

、皮質）および下位運動ニューロン（例えば、脊髄）は、通常、メッセージを脳から筋肉へと伝達して、随意運動を生成する。これらのニューロンが変性および／または死滅すると、筋肉へのメッセージが喪失し、それにより筋肉が徐々に衰えおよび／または萎縮し、随意運動を開始または制御することができなくなり、ついには最終的に、ALSを患う個体は、筋力、ならびに運動、発語、摂食、およびさらには呼吸能力を喪失してしまう。ほとんどの患者は、生存のために何らかの形態の呼吸補助を必要とすることになり、呼吸補助があっても、ほとんどのALS患者は、診断から2～5年以内に呼吸不全の結果として死亡する。また、一部の患者（例えば、FTD-ALS）は、疾患進行中に前頭側頭型認知症を発症する場合がある。

【0004】

ALS協会によれば、アメリカ合衆国では、毎年約5,600人がALSと診断される。ALSの発症率は、100,000人当たり2人であり、任意の所与の時点において、30,000人ものアメリカ人が、この疾患を有し得ると推測される。

【0005】

2つの形態のALSが記載されている。1つは孤発性ALS（sALS）であり、アメリカ合衆国において最も一般的な形態ALSであり、診断された全症例の90～95%を占める。もう1つは、家族性ALS（fALS）であり、主に優性遺伝で家系に生じ、アメリカ合衆国における全症例の約5～10%を占めるに過ぎない。sALSおよびfALSは、臨床的に判別不能である。

【0006】

病理学的研究により、数多くの細胞プロセスが、具体的には運動ニューロン（MN）における、ERストレスの増加、フリーラジカル（すなわち、活性酸素種（ROS））の生成、ミトコンドリア機能障害、タンパク質凝集、アポトーシス、炎症、およびグルタミン酸興奮毒性などの疾患発症機序と関連付けられている。

【0007】

ALSの原因は、複雑かつ多様である。一般に、ALSは、環境曝露と相まって複数の遺伝子が組み合わされて個人を感受性にする複雑な遺伝障害であると考えられる。ALSに関連する遺伝子は十数個よりも多くが発見されており、それらには、SOD1（Cu²⁺／Zn²⁺スーパーオキシドジスムターゼ）、TDP-43（TARDBP、TAR DNA結合タンパク質-43）、FUS（サルコマー融合／サルコマー転移（Fused in Sarcoma／Translocated in Sarcoma））、ANG（アンジオゲニン）、ATXN2（アタキシン-2）、バロシン含有タンパク質（VCP）、OPTN（オプチニューリン）、および染色体9、オープンリーディングフレーム72（C9ORF72）における非コードGGGGCCヘキサヌクレオチドリピートの伸長が挙げられる。しかしながら、運動ニューロン変性の正確な機構は依然として解明されていない。

【0008】

現在、ALSの治癒的治療は存在しない。最近まで、リルゾールは、唯一のFDA認可薬であり、グルタミン酸反応をアンタゴナイズして、ALSの病理学的進展を低減する。しかしながら、初期のALS患者で約3か月の寿命延長が報告されているに過ぎず、末期のALS患者には治療利益は観察されておらず、この患者集団には治療選択肢が欠如していることが示されている（非特許文献1）。2017年には、FDAがALSの治療にラジカヴァ（エダラボン）を認可した。かかる認可は22年ぶりのものだった。ラジカヴァは静脈内投与され、フリーラジカルスカベンジャーとしての役目を果たし、ALSを患う患者の酸化ストレスを軽減し、それにより疾患進行を遅延させる。137人の患者を対象とした臨床第3相試験（NCT01492686）では、ラジカヴァは、ALS機能評価スケール改訂版（ALSFRS-R）のスコアにより決定したところ、プラセボを投与した患者と比較して、身体機能の低下を遅延させた（非特許文献2）。ラジカヴァの認可は、ALSの治療の観点では進歩であるとみなされるが、これは依然として治癒ではない。疾患進行を効果的に予防および／または著しく妨げることができる新しい治療戦略には依然として需要がある。

10

20

30

40

50

【0009】

Cu^{2+}/Zn^{2+} スーパーオキシドジスムターゼI型(SOD1)の遺伝子における突然変異は、fALSの最も一般的な原因であり、全fALS症例の約20~30%を占める。最近の報告書は、SOD1突然変異が、全sALS症例の約4%に結び付けられ得ることも示している(非特許文献3)。SOD1関連fALSは、正常なSOD1活性の喪失によって引き起こされるのではなく、むしろ毒性機能の獲得によって引き起こされる可能性が最も高い。突然変異SOD1関連fALS毒性の仮説のうちの1つは、異常なSOD1酵素が、ペルオキシナイトライトまたは過酸化水素などの小分子による有害フリーラジカルの産生を引き起こすことを提唱する。突然変異SOD1神経毒性の他の仮説としては、プロテアソーム活性の阻害、ミトコンドリア損傷、RNAプロセシングの破壊、および細胞内凝集体の形成が挙げられる。ALSにおける突然変異SOD1変異体および／または野生型SOD1の異常蓄積は、病理学的封入体として同定される不溶性線維性凝集体を形成する。凝集したSOD1タンパク質は、ミトコンドリアストレス(非特許文献4)および細胞、特に運動ニューロンに対する他の毒性を誘導し得る。

10

【0010】

これらの知見は、SOD1が、家族性および孤発性ALSの両方の潜在的な治療標的であり得ることを示す。ALS患者の中枢神経系で産生されるSOD1タンパク質を、野生型であるかまたは突然変異体であるかに関わらず低減することができる療法は、運動ニューロン変性ならびに筋力低下および萎縮などの、患者のALSの症状を改善し得る。野生型および／または突然変異SOD1タンパク質凝集の形成を予防するための作用剤および方法は、疾患進行を防止し、ALS症状の改善を可能にし得る。近年、RNA干渉(RNAi)媒介性遺伝子サイレンシングが、研究者の関心を集めている。SOD1遺伝子を標的とする低分子二本鎖RNA(低分子干渉RNA)分子は、ALSの治療におけるそれらの可能性が当該技術分野で教示されている(例えば、特許文献1および特許文献2を参照のこと)。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【文献】米国特許第7,632,938号明細書

【文献】米国特許出願公開第20060229268号明細書

30

【非特許文献】

【0012】

【文献】ベシモン Gら(Bensimon G et al.), J Neurol. 2002 249 609-615

【文献】執筆グループ;エダラボン(MCI-186)ALS19研究グループ(Writing group;Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group) Lancet Neurol. 2017 Jul;16(7):505-512)

【文献】(ロベレヒト(Robberecht)およびフィリップ(Philip), Nat. Rev. Neurosci, 2013, 14, 248-264)

40

【文献】(ペビライネン Pら(Vehvilainen P et al.), Front Cell Neurosci., 2014, 8, 126)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本開示は、ALS患者において、疾患を治療するためにSOD1遺伝子の発現を阻害または防止するためのRNA干渉またはノックダウンに基づく手法を開発する。

本開示は、二本鎖RNA(dsRNA)コンストラクトおよび／またはsiRNAコンストラクト、shRNAコンストラクトおよび／またはマイクロRNAコンストラクトを含む新規ポリヌクレオチド、ならびにそれらの設計方法を提供する。加えて、これらのs

50

iRNAコンストラクトは、細胞送達用の発現ベクター（一方または両方の鎖）にコードされた合成分子であってもよい。かかるベクターとしては、限定はされないが、いずれかのAAV血清型のベクターゲノムなど、アデノ随伴ウイルスベクター、またはレンチウイルスなどの他のウイルス送達媒体が挙げられる。

【0014】

また、本開示は、本開示のAAVベクターおよびウイルスゲノムを送達および／または伝搬するための新規方法であって、限定はされないが、運動ニューロン障害の大ファミリー、ニューロパシー、髄鞘形成の疾患、ならびに固有受容性感覚障害、体性感覚障害、および／または感覚障害などの、脊髄に関連する他の障害に適用し得る方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本開示は、SOD1遺伝子発現および／またはSOD1タンパク質産生を妨害するためのSOD1ターゲティングポリヌクレオチドをコードするAAVベクター、ならびにそれらの使用方法を提供する。筋萎縮性側索硬化症などの運動ニューロン変性に関連する疾患を治療する方法も、本開示に含まれる。

【0016】

特定の実施形態において、SOD1は、未治療対象と比較して、SOD1ターゲティングポリヌクレオチドをコードするAAVで治療された対象では30%抑制される。対象には、所定の用量レベルのAAVを注入またはボーラスとして投与し得る。非限定的な例として、抑制は、C1～L7前角領域で見られる。

【0017】

本開示は、遺伝子発現およびタンパク質産生のRNA分子媒介性遺伝子特異的干渉に関する。筋萎縮性側索硬化症などの運動ニューロン変性に関連する疾患を治療する方法も、本開示に含まれる。本明細書で取り上げられる組成物に含まれるsiRNAは、SOD1遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部と実質的に相補的な、30ヌクレオチド以下、概して19～24ヌクレオチド長である領域を有するアンチセンス鎖（アンチセンス鎖またはガイド鎖）を有するdsRNAを包含する。

【0018】

本開示によれば、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖の各鎖は約19～25ヌクレオチド長、好ましくは約19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、または25ヌクレオチド長である。一部の態様において、siRNAは、非修飾RNA分子であってもよい。

【0019】

特定の実施形態において、siRNAまたはdsRNAは、互いに相補的な少なくとも2つの配列を含む。dsRNAは、第1の配列を有するセンス鎖と、第2の配列を有するアンチセンス鎖とを含む。アンチセンス鎖は、SOD1をコードするmRNAの少なくとも一部と実質的に相補的なヌクレオチド配列を含み、相補性領域は30ヌクレオチド以下、および少なくとも15ヌクレオチド長である。概して、dsRNAは19～24、例えば19～21ヌクレオチド長である。一部の実施形態においてdsRNAは約15～約25ヌクレオチド長であり、他の実施形態においてdsRNAは約25～約30ヌクレオチド長である。

【0020】

本開示によれば、siRNA二重鎖、siRNA二重鎖またはSOD1もしくは他の神経変性関連遺伝子もしくは脊髄疾患関連核酸を標的とするdsRNAの一方の鎖をコードする核酸を含むAAVベクターが作製され、AAVベクター血清型は、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV

10

20

30

40

50

16. 3、AAV24. 1、AAV27. 3、AAV42. 12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-a、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44. 1、AAV44. 2、AAV44. 5、AAV223. 1、AAV223. 2、AAV223. 4、AAV223. 5、AAV223. 6、AAV223. 7、AAV1-7/rh. 48、AAV1-8/rh. 49、AAV2-15/rh. 62、AAV2-3/rh. 61、AAV2-4/rh. 50、AAV2-5/rh. 51、AAV3. 1/hu. 6、AAV3. 1/hu. 9、AAV3-9/rh. 52、AAV3-11/rh. 53、AAV4-8/rh. 1. 64、AAV4-9/rh. 54、AAV4-19/rh. 55、AAV5-3/rh. 57、AAV5-22/rh. 58、AAV7. 3/hu. 7、AAV16. 8/hu. 10、AAV16. 12/hu. 11、AAV29. 3/bb. 1、AAV29. 5/bb. 2、AAV106. 1/hu. 37、AAV114. 3/hu. 40、AAV127. 2/hu. 41、AAV127. 5/hu. 42、AAV128. 3/hu. 44、AAV130. 4/hu. 48、AAV145. 1/hu. 53、AAV145. 5/hu. 54、AAV145. 6/hu. 55、AAV161. 10/hu. 60、AAV161. 6/hu. 61、AAV33. 12/hu. 17、AAV33. 4/hu. 15、AAV33. 8/hu. 16、AAV52/hu. 19、AAV52. 1/hu. 20、AAV58. 2/hu. 25、AAVA3. 3、AAVA3. 4、AAVA3. 5、AAVA3. 7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh. 72、AAVhu. 8、AAVrh. 68、AAVrh. 70、AAVpi. 1、AAVpi. 3、AAVpi. 2、AAVrh. 60、AAVrh. 44、AAVrh. 65、AAVrh. 55、AAVrh. 47、AAVrh. 69、AAVrh. 45、AAVrh. 59、AAVhu. 12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu. 1、AAVH-5/hu. 3、AAVLG-10/rh. 40、AAVLG-4/rh. 38、AAVLG-9/hu. 39、AAVN721-8/rh. 43、AAVCh. 5、AAVCh. 5R1、AAVcy. 2、AAVcy. 3、AAVcy. 4、AAVcy. 5、AAVCy. 5R1、AAVCy. 5R2、AAVCy. 5R3、AAVCy. 5R4、AAVcy. 6、AAVhu. 1、AAVhu. 2、AAVhu. 3、AAVhu. 4、AAVhu. 5、AAVhu. 6、AAVhu. 7、AAVhu. 9、AAVhu. 10、AAVhu. 11、AAVhu. 13、AAVhu. 15、AAVhu. 16、AAVhu. 17、AAVhu. 18、AAVhu. 20、AAVhu. 21、AAVhu. 22、AAVhu. 23. 2、AAVhu. 24、AAVhu. 25、AAVhu. 27、AAVhu. 28、AAVhu. 29、AAVhu. 29R、AAVhu. 31、AAVhu. 32、AAVhu. 34、AAVhu. 35、AAVhu. 37、AAVhu. 39、AAVhu. 40、AAVhu. 41、AAVhu. 42、AAVhu. 43、AAVhu. 44、AAVhu. 44R1、AAVhu. 44R2、AAVhu. 44R3、AAVhu. 45、AAVhu. 46、AAVhu. 47、AAVhu. 48、AAVhu. 48R1、AAVhu. 48R2、AAVhu. 48R3、AAVhu. 49、AAVhu. 51、AAVhu. 52、AAVhu. 54、AAVhu. 55、AAVhu. 56、AAVhu. 57、AAVhu. 58、AAVhu. 60、AAVhu. 61、AAVhu. 63、AAVhu. 64、AAVhu. 66、AAVhu. 67、AAVhu. 14/9、AAVhu. t 19、AAVrh. 2、AAVrh. 2R、AAVrh. 8、AAVrh. 8R、AAVrh. 10、AAVrh. 12、AAVrh. 13、AAVrh. 13R、AAVrh. 14、AAVrh. 17、AAVrh. 18、AAVrh. 19、AAVrh. 20、AAVrh. 21、AAVrh. 22、AAVrh. 23、AAVrh. 24、AAVrh. 25、AAVrh. 31、AAVrh. 32、AAVrh. 33、AAVrh. 34、A

10

20

30

40

50

AVrh. 35、AAVrh. 36、AAVrh. 37、AAVrh. 37R2、AAVrh. 38、AAVrh. 39、AAVrh. 40、AAVrh. 46、AAVrh. 48、AAVrh. 48. 1、AAVrh. 48. 1. 2、AAVrh. 48. 2、AAVrh. 49、AAVrh. 51、AAVrh. 52、AAVrh. 53、AAVrh. 54、AAVrh. 56、AAVrh. 57、AAVrh. 58、AAVrh. 61、AAVrh. 64、AAVrh. 64R1、AAVrh. 64R2、AAVrh. 67、AAVrh. 73、AAVrh. 74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R mutant、AAVrh8R R533A mutant、AAAV、BAAV、caprine AAV、bovine AAV、AAVhE1. 1、AAVhEr1. 5、AAVhER1. 14、AAVhEr1. 8、AAVhEr1. 16、AAVhEr1. 18、AAVhEr1. 35、AAVhEr1. 7、AAVhEr1. 36、AAVhEr2. 29、AAVhEr2. 4、AAVhEr2. 16、AAVhEr2. 30、AAVhEr2. 31、AAVhEr2. 36、AAVhER1. 23、AAVhEr3. 1、AAV2. 5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAVシャッフル100-1、AAVシャッフル100-3、AAVシャッフル100-7、AAVシャッフル10-2、AAVシャッフル10-6、AAVシャッフル10-8、AAVシャッフル100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh. 50、AAVrh. 43、AAVrh. 62、AAVrh. 48、AAVhu. 19、AAVhu. 11、AAVhu. 53、AAV4-8/rh. 64、AAV LG-9/hu. 39、AAV54. 5/hu. 23、AAV54. 2/hu. 22、AAV54. 7/hu. 24、AAV54. 1/hu. 21、AAV54. 4R/hu. 27、AAV46. 2/hu. 28、AAV46. 6/hu. 29、AAV128. 1/hu. 43、トゥルータイプAAV (ttAAV)、UPENN AAV10、ジャパニーズAAV10血清型、AAV CBr-7. 1、AAV CBr-7. 10、AAV CBr-7. 2、AAV CBr-7. 3、AAV CBr-7. 4、AAV CBr-7. 5、AAV CBr-7. 7、AAV CBr-7. 8、AAV CBr-B7. 3、AAV CBr-B7. 4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6. 1、AAV CHt-6. 10、AAV CHt-6. 5、AAV CHt-6. 6、AAV CHt-6. 7、AAV CHt-6. 8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv

10

20

30

40

50

1-1、AAV CLv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV CLv1-7、AAV CLv1-8、AAV CLv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8. 10、AAV CSp-8. 2、AAV CSp-8. 4、AAV CSp-8. 5、AAV CSp-8. 6、AAV CSp-8. 7、AAV CSp-8. 8、AAV CSp-8. 9、AAV CSp-9、AAV. hu. 48R3、AAV. VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12

10

20

/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8、AAVF9/HSC9、AAV-PHP. B、AAV-PHP. A、G2B-26、G2B-13、TH1. 1-32、TH1. 1-35、AAVPHP. B2、AAVPHP. B3、AAVPHP. N/PHP. B-DGT、AAVPHP. B-EST、AAVPHP. B-GGT、AAVPHP. B-ATP、AAVPHP. B-ATT-T、AAVPHP. B-DGT-T、AAVPHP. B-GGT-T、AAVPHP. B-SGS、AAVPHP. B-AQP、AAVPHP. B-QQP、AAVPHP. B-SNP(3)、AAVPHP. B-SNP、AAVPHP. B-QGT、AAVPHP. B-NQT、AAVPHP. B-EGS、AAVPHP. B-SGN、AAVPHP. B-EGT、AAVPHP. B-DST、AAVPHP. B-DST、AAVPHP. B-STP、AAVPHP. B-PQP、AAVPHP. B-SQP、AAVPHP. B-QLP、AAVPHP. B-TMP、AAVPHP. B-TTP、AAVPHP. S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5およびそれらのバリエーションであってもよい。

30

【0021】

本開示はまた、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二重鎖と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物も提供する。一部の態様において、siRNA二重鎖をコードする核酸配列はAAVベクターに挿入される。

40

【0022】

一部の実施形態において、本開示は、細胞におけるSOD1遺伝子発現の阻害/サイレンシングする方法を提供する。したがって、siRNA二重鎖またはdsRNAを使用して、細胞、詳細には運動ニューロンにおけるSOD1遺伝子発現を実質的に阻害することができる。一部の態様において、SOD1遺伝子発現の阻害とは、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%の阻害を指す。したがって、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%阻害され得る。SOD1遺伝子は、野生型遺伝子、または少なくとも1つの突然変異を有する突然変異SOD1遺伝子のい

50

れであってもよい。したがって、SOD1タンパク質は、野生型タンパク質、または少なくとも1つの突然変異を有する突然変異ポリペプチドのいずれかである。

【0023】

一部の実施形態において、本開示は、治療を必要としている対象の、異常なSOD1遺伝子および／またはSOD1タンパク質に関連する筋萎縮性側索硬化症を治療または改善する方法であって、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二重鎖の薬学的有効量を対象に投与すること、上記siRNA二重鎖を標的細胞に送達すること、SOD1遺伝子発現およびタンパク質産生を阻害すること、および対象のALSの症状を改善することを含む方法を提供する。

【0024】

一部の実施形態において、AAVベクターゲノムは、プロモータを含み得る。一態様において、プロモータはH1であり得る。一部の実施形態において、AAVベクターゲノムは、フィラー配列を含み得る。フィラー配列は、レンチウイルスに由来し得る。一部の実施形態において、フィラーは、哺乳類アルブミン遺伝子に由来し得る。一部の実施形態において、哺乳類アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。

【0025】

一部の態様において、ALSは、SOD1突然変異に結び付けられる家族性ALSである。他の態様において、必ずしも遺伝子突然変異の結果ではないが、ALSは、SOD1タンパク質の異常凝集またはSOD1タンパク質機能若しくは局在化の混乱により特徴付けられる孤発性ALSである。本方法によって改善されるALSの症状としては、運動ニューロン変性、筋力低下、筋肉の硬直、不明瞭発語および／または呼吸困難を挙げることができる。

【0026】

一部の実施形態において、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖若しくはdsRNAまたはかかるsiRNAコード分子を含むAAVベクターは、対象の中樞神経系に直接、例えば頭蓋内注射によって導入されてもよい。

【0027】

一部の実施形態において、本開示の医薬組成物は単独療法として使用される。他の実施形態において、本開示の医薬組成物は併用療法で使用される。併用療法は、運動ニューロン変性に対するそれらの神経保護効果に関して試験済みの、小分子化合物、成長因子およびホルモンなどの1つ以上の神経保護剤との併用であってもよい。

【0028】

一部の実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるプラスミドまたはAAVベクターの治療有効量をそれを必要としている対象に投与することによって筋萎縮性側索硬化症を治療または改善する方法を提供する。ALSは、家族性ALSまたは孤発性ALSであってもよい。

【0029】

本方法には、対象の1つ以上の部位にAAV粒子を実質内投与することが関与してもよい。本方法には、対象の骨髄にAAV粒子を実質内投与することが関与してもよい。一部の態様において、AAV粒子は、脊髄内の2つの部位に投与されてもよい。一部の実施形態において、AAV粒子は、頸部脊髄内の2つの部位に投与されてもよい。一部の実施形態において、AAV粒子は、脊髄のレベルC3およびC5に投与されてもよい。特定の実施形態において、投与の容積は、脊髄のレベルC3では約5 μ L～約240 μ Lであり、脊髄のレベルC5では約5 μ L～約240 μ Lである。特定の実施形態において、投与の容積は、脊髄のレベルC3では約5 μ L～約60 μ Lであってもよく、脊髄のレベルC5では約5 μ L～約60 μ Lであってもよい。一態様において、投与の容積は、脊髄のレベルC3では約25～約40 μ Lであってもよく、脊髄のレベルC5では約25～約40 μ Lであってもよい。骨髄に投与される用量は、脊髄のレベルC3では約 1×10^{10} v g～約 1×10^{12} v gであってもよく、脊髄のレベルC5では約 1×10^{10} v g～約 1×10^{12} v gであってもよい。一部の態様において、骨髄に投与される用量は、脊髄のレ

10

20

30

40

50

ベル C 3 では約 $5 \times 10^{11} \text{ v g}$ ～ 約 $8 \times 10^{11} \text{ v g}$ であってもよく、脊髄のレベル C 5 では約 $5 \times 10^{11} \text{ v g}$ ～ 約 $8 \times 10^{11} \text{ v g}$ であってもよい。特定の実施形態において、用量は、脊髄のレベル C 3 では約 $2 \times 10^{10} \text{ v g}$ ～ 約 $7 \times 10^{11} \text{ v g}$ であってもよく、脊髄のレベル C 5 では約 $2 \times 10^{10} \text{ v g}$ ～ 約 $7 \times 10^{12} \text{ v g}$ であってもよい。一態様では、注入速度は $5 \mu\text{L} / \text{分}$ であってもよい。

【0030】

前出の目的、特徴、および利点ならびに他の目的、特徴、および利点は、付属の図面において例示される、本開示の特定の実施形態についての以下の説明から明らかになるであろう。図面は、必ずしも縮尺通りではなく、本開示の多様な実施形態についての原理を例示することに強調を置いている。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】異なる nM 濃度の siRNA によるヒト SOD1 mRNA 発現の用量応答曲線を示す図。

【図2】SK-RST 細胞株における SOD1 mRNA ノックダウンを示す図。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本開示は、治療剤としての SOD1 ターゲティングポリヌクレオチドに関する。RNA 干渉媒介性遺伝子サイレンシングは、遺伝子発現を特異的に阻害することができる。したがって、本開示は、SOD1 遺伝子を標的とする低分子二本鎖 RNA (dsRNA) 分子 (低分子干渉 RNA、siRNA)、shRNA、マイクロ RNA およびそれらの前駆体などのポリヌクレオチド、かかるポリヌクレオチドを包含する医薬組成物、ならびにそれらの設計プロセスを提供する。また、本開示は、脊髄に関連する障害および／または神経変性疾患、特に筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を治療するための、SOD1 遺伝子発現およびタンパク質産生を阻害するためのそれらの使用方法を提供する。

【0033】

本開示の 1 つ以上の実施形態の詳細が下記の添付の説明に示される。本発明の実施または試験においては本明細書に記載されるものと同等のまたは等価な任意の材料および方法を使用し得るが、ここで好ましい材料および方法について説明する。本発明の他の特徴、目的および利点が、この説明から明らかになるであろう。説明においては、文脈上特に明確に指示されない限り、単数形に複数形も含まれる。特に定義されない限り、本明細書で使用する全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を有する。矛盾が生じた場合、本説明が優先するものとする。

【0034】

脊髄に関連する障害

脊髄は、中枢神経系 (CNS ; 脳および脊髄) を共に特徴付ける 2 つの構成部分のうちの 1 つである。脊髄は、身体を脳と接続し、運動および感覚に必要なメッセージおよび情報交換のための導管としての役目を果たす。脊髄は、脊柱内に収容されており、神経線維および細胞体、ならびに支持細胞で構成される、壊れやすく細い管状束である。

【0035】

運動ニューロンおよび脊髄経路は、運動の開始、実行、修正、および精度にとって重要である。これらのニューロンおよび／または経路は、限定ではないが、外傷、腫瘍性増殖、心臓血管異常、炎症、脱髄、ニューロパシー、変性および／または細胞死など、何らかの様式で損傷すると、その帰結は、典型的には何らかの形態の運動異常である。同様に、感覚ニューロンおよび脊髄経路は、固有受容性感覚および感覚にとって重要であり、損傷すると、特定の刺激を感知できないことおよび／または疼痛症候群がもたらされる場合がある。

【0036】

上記に記載されているものなど、脊髄に関連する障害の非限定的な例としては、限定ではないが、以下のものが挙げられる：運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症 (ALS

10

20

30

40

50

；ルー・ゲーリック病）、進行性球麻痺、偽性球麻痺、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮症、脊髄性筋萎縮症、ポリオ後症候群、球麻痺、ケネディー病、遺伝性痙攣性対麻痺、フリードライヒ運動失調症、シャルコー・マリー・トゥース病、遺伝性運動感覚性ニューロパシー、腓骨筋萎縮症、ニューロパシー、脱髄疾患、ウイルス性脱髄、代謝性脱髄、多発性硬化症、視神経脊髄炎（デビック病）、同心性硬化症（バロー硬化症）、運動失調症、対麻痺、脊髄小脳失調症、急性散在性脳脊髄炎、複合性局所疼痛症候群（CPRS IおよびCPRS II）、毛細血管拡張性運動失調、発作性運動失調症、多系統萎縮症、散発性運動失調症、脂質蓄積症、ニーマン・ピック病、ファブリ病、ファバー疾患、GM1またはGM2ガングリオシドーシス、テイサックス病、サンドホフ病、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、マシャド・ジョゼフ病（脊髄小脳失調症3型）、脳膜炎、骨髄炎、ミオパシー、ミトコンドリアミオパシー、脳筋症、バース症候群、慢性進行性外眼筋麻痺、カーンズ・セイヤ症候群、リー症候群、ミトコンドリアDNA枯渇症候群、赤色ぼろ線維・ミオクロヌステんかん、NARP（ニューロパシー・運動失調・網膜色素変性症）、神経筋接合部の疾患、重症筋無力症、ミオクロヌス、神経障害性疼痛、神経変性疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、レビー小体病、ビタミンB12欠乏症、亜急性脊髄連合変性症（リヒトハイム症）、熱帯性痙攣性不全対麻痺、遠位遺伝性運動ニューロパシー、モルヴァン症候群、白質萎縮症、および／またはレット症候群。

【0037】

特定の実施形態において、本開示の組成物および方法は、中枢神経系の任意の疾患を治療するために使用され得る。

特定の実施形態において、本開示の組成物および方法は、脊髄に関連する疾患を治療するために使用され得る。

【0038】

特定の実施形態において、本開示の組成物および方法は、神経変性疾患を治療するために使用され得る。

特定の実施形態において、本開示の組成物および方法は、運動ニューロン疾患を治療するために使用され得る。

【0039】

特定の実施形態において、本開示の組成物および方法は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を治療するために使用され得る。

筋萎縮性側索硬化症（ALS）およびSOD1

成人発症型神経変性障害である筋萎縮性側索硬化症（ALS）とは、運動皮質、脳幹、および脊髄における運動ニューロンの選択的死を特徴とする、進行性かつ致死性の疾患である。ALSと診断された患者は、痙攣、反射亢進または反射低下、線維束性攣縮、筋肉萎縮、および麻痺を特徴とする、進行性の筋肉表現型を発現する。これらの運動機能障害は、運動ニューロンの喪失に起因する、筋肉の除神経により引き起こされる。ALSの、主要な病理学的特徴は、皮質脊髄路の変性および下位運動ニューロン（LMN）または前角細胞の広範囲にわたる喪失（ガタクラ（Ghatk et al.），J Neuro pathol Exp Neurol.，1986，45，385-395）、一次運動野内のベッツ細胞および他の錐体細胞の変性および喪失（宇高ら（Udaka et al.），Acta Neuropathol，1986，70，289-295；前川ら（Maekawa et al.），Brain，2004，127，1237-1251）、ならびに運動皮質および脊髄における反応性のグリオーシス（川又ら（Kawamata et al.），Am J Pathol.，1992，140，691-707；およびシッファーら（Schiffer et al.），J Neurol Sci.，1996，139，27-33）を含む。ALSは通例、呼吸器の不全および／または炎症に起因する診断後3～5年以内に致死性となる（ローランドLPおよびシュナイダーNA（Rowland LPおよびShneider NA），N Engl J. Med.，2001，344，1688-1700）。

【0040】

A L Sの細胞の特徴は、変性しつつある運動ニューロンおよび周囲の細胞（例えば、アストロサイト）における、タンパク質性封入体、ユビキチン化封入体、細胞質性封入体の存在である。ユビキチン化封入体（すなわち、レビー小体様封入体または糸くず様封入体）は、A L Sにおいて、最も一般的かつ特異的なタイプの封入体であり、脊髄および脳幹のLMN内、ならびに皮質脊髄の上位運動ニューロン（UMN）内において見出される（松本ら（Matsumoto et al.）, J Neurol Sci., 1993, 115, 208-213；および佐々木および丸山（Sasak and Maruyama）, Acta Neuropathol., 1994, 87, 578-585）。ユビキチン、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ1（SOD1）、ペリフェリン、およびドルフィンを含む、少数のタンパク質が、封入体の構成要素であると同定されている。神経フィラメント性封入体は、A L Sの脊髄運動ニューロン内の、集塊状ヒアリン封入体（HCI）および軸索「スフェロイド」において見出されることが多い。他のタイプの、それほど特殊ではない封入体は、皮質の上層における、プニナ小体（シスタチンC含有封入体）および三日月形封入体（SCI）を含む。A L Sにおいて見られる、他の神経病理学的特徴は、ゴルジ装置の断片化、ミトコンドリア空胞変性、およびシナプス末端の超構造的異常を含む（藤田ら（Fujita et al.）, Acta Neuropathol., 2002, 103, 243-247）。

【0041】

加えて、前頭側頭型認知症性A L S（FTD-A L S）において、FTD-A L S患者において、認知機能障害を引き起こし得る皮質萎縮（前頭葉および側頭葉を含む）もまた観察される。

【0042】

A L Sは、複雑かつ多因子性の疾患であり、A L Sの発症機序の一因となると仮定された複数の機構は、タンパク質分解の機能不全、グルタミン酸興奮毒性、ミトコンドリアの機能不全、アポトーシス、酸化ストレス、炎症、タンパク質のミスフォールディングおよび凝集、RNA代謝の異常、および遺伝子発現の変更を含む。

【0043】

A L S症例のうちの約10%は、疾患の家族歴を有し、これらの患者を、一般に、メンデルの優性遺伝方式および高浸透度を伴う、家族性A L S（f A L S）患者または遺伝性患者と称する。残り（約90%～95%）は、家族歴の記録と関連せず、環境因子、遺伝子的多型、体細胞の突然変異、および、おそらく、遺伝子-環境相互作用を含む、他の危険性因子に起因すると考えられるので、孤発性A L S（s A L S）として分類される。大半の症例において、家族性（または遺伝性）A L Sは、常染色体優性疾患として、遺伝性であるが、常染色体劣性遺伝およびX連鎖遺伝ならびに不完全な浸透度を伴う家系も存在する。孤発性形態と家族性形態とは、臨床的に識別不可能であることから、共通の発症機序が示唆される。A L Sにおける、運動ニューロンの選択的死の正確な原因は、理解しがたいままである。f A L Sにおける遺伝的因子の理解が進むと、疾患の両方の形態に対して、光を投げかけ得る。

【0044】

近年、A L Sの遺伝的原因の研究および理解が急速に進み、f A L Sを引き起こすことが今や公知である、10個超の異なる遺伝子における突然変異の発見に結び付いている。最も一般的な突然変異は、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ1（SOD1；約20%）（ローゼンDRら（Rosen DR et al.）, Nature, 1993, 362, 59-62）、FUS/TLS（fused in sarcoma/translated in liposarcoma；1～5%）、およびTDP-43（TARDBP；1～5%）をコードする遺伝子内に見出される。近年、C9orf72遺伝子内の、ヘキサヌクレオチドリピート（GGGGCC）_nの伸長が、欧米人口において、f A L Sの最も高頻度（約40%）の原因として同定された（レントンら（Renton et al.）, Nat. Neurosci., 2014, 17, 17-23により総説されている）。A L Sにおいて突然変異している他の遺伝子は、アルシン（ALS2）、セナタ

キシン (SETX)、小胞関連膜タンパク質 (VAPB)、アンギオゲニン (ANG) を含む。fALS 遺伝子は、異なる細胞機構を制御することから、ALS の発症機序が、複雑であり、最終的に、運動ニューロン変性をもたらす、幾つかの異なる過程に関し得ることが示唆される。

【0045】

SOD1 は、哺乳動物において同定され、特徴付けられた、3 つのヒトスーパーオキシドジスムターゼ：銅-亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (Cu/Zn SOD または SOD1)、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn SOD または SOD2)、および細胞外スーパーオキシドジスムターゼ (EC SOD または SOD3) のうちの 1 つである。SOD1 は、ヒト第 21 染色体上の SOD1 遺伝子 (GeneBank アクセション番号 NM_000454.4) によりコードされる、サブユニット 1 つ当たり 1 つの銅結合部位と、1 つの亜鉛結合部位とを伴う、32 kDa のホモ二量体による、153 残基のポリペプチドである (表 10 を参照のこと)。SOD1 は、結合した銅イオンにおける、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) の、酸素分子 (O_2) および過酸化水素 (H_2O_2) への反応を触媒する。SOD1 の細胞内濃度は、高濃度 (10 ~ 100 μM の範囲) であり、中枢神経系 (CNS) 内の全タンパク質含量のうちの 1 % を占める。このタンパク質は、真核細胞の細胞質だけでなく、核、リソソーム、ペルオキシソーム、およびミトコンドリア膜間腔にも局在化されている (リンデナウ J ら (Lindenau J et al.), Glia, 2000, 29, 25-34)。

【0046】

SOD1 遺伝子内の突然変異は、fALS 患者のうちの 15 ~ 20 % および全ての ALS 症例のうちの 1 ~ 2 % により保有されている。現在のところ、153 アミノ酸の SOD1 ポリペプチド全体にわたって分布する、少なくとも 170 の異なる突然変異が、ALS を引き起こすことが見出されており、ALS Online Genetic Database (ALSOD) において、最新のリストを見出すことができる (ロー R ら (Wroe R et al.), Amyotroph Lateral Scler., 2008, 9, 249-250)。表 1 は、ALS における SOD1 内の突然変異の一部の例を列挙する。これらの突然変異は、欠失、挿入、および C 末端の切断もまた生じるが、主に、単一のアミノ酸置換 (すなわち、ミスセンス突然変異) である。異なる SOD1 突然変異は、異なる領域的分布パターンを提示する。例えば、SOD1 遺伝子の突然変異により引き起こされる ALS を伴う、全ての米国人のうちの約半分は、特定の突然変異である Ala4Val (または A4V) を有する。A4V 突然変異は、典型的に、より重度の徴候および症状と関連する。I113T 突然変異は、英国において、極めて一般的な突然変異である。欧州において最も蔓延する突然変異は、D90A 置換である。

【0047】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1. ALSにおけるSOD1突然変異の例

	突然変異
エクソン1 (220bp)	Q22L; E21K, G; F20C; N19S; G16A, S; V14M, S; G12R; G10G, V, R; L8Q, V; V7E; C6G, F; V5L; A4T, V, S
エクソン2 (97bp)	T54R; E49K; H48R, Q; V47F, A; H46R; F45C; H43R; G41S, D; G37R; V29, insA
エクソン3 (70bp)	D76Y, V; G72S, C; L67R; P66A; N65S; S59I, S
エクソン4 (118bp)	D124G, V; V118L, InsAAAAAC; L117V; T116T; R115G; G114A; I113T, F; I112M, T; G108V; L106V, F; S106L, delTCACTC; I104F; D101G, Y, H, N; E100G, K; I99V; V97L, M; D96N, V; A95T, V; G93S, V, A, C, R, D; D90V, A; A89T, V; T88delACTGCTGAC; V87A, M; N86I, S, D, K; G85R, S; L84V, F; H80R
エクソン5 (461bp)	I151T, S; I149T; V148I, G; G147D, R; C146R, 停止; A145T, G; L144F, S; G141E, 停止; A140A, G; N139D, K, H, N; G138E; T137R; S134N; E133V, delGAA, insTT; E132insTT; G127R, InsTGGG; L126S, delITT, 停止; D126, delTT

10

SOD1 遺伝子の欠損と関連するニューロン死の機構について研究するため、当技術分野では、SOD1 と関連する ALS についての幾つかの齧歯動物モデルであって、ミスセンス突然変異、小規模な欠失、または挿入を含む、様々な突然変異を伴うヒト SOD1 遺伝子を発現する齧歯動物モデルが開発された。ALS マウスモデルの一部の例は、SOD1^{G93A}、SOD1^{A4V}、SOD1^{G37R}、SOD1^{G85R}、SOD1^{D90A}、SOD1^{L84V}、SOD1^{I113T}、SOD1^{H36R/H48Q}、SOD1^{G127X}、SOD1^{L126X}、および SOD1^{L126delTT}を含む。2つの異なるヒト SOD1 突然変異：SOD1^{H46R}および SOD1^{G93R}を保有する、2つのトランス遺伝子ラットモデルが存在する。これらの齧歯動物 ALS モデルは、ヒト ALS 患者と同様の筋力低下、およびヒト疾患の幾つかの特徴、特に、脊髄運動ニューロンの選択的死、タンパク質封入体の、運動ニューロン内の凝集、およびマイクログリアの活性化を反映する、他の病原性の特徴を発症し得る。当技術分野では、トランスジェニック齧歯動物が、ヒト SOD1 関連 ALS 疾患の良好なモデルであり、疾患の発症機序について研究し、疾患の治療を開発するためのモデルをもたらすことが周知である。

20

30

【0048】

動物モデルおよび細胞モデルにおける研究は、SOD1 の病原性バリエーションが、機能獲得により、ALS を引き起こすことを示した。すなわち、スーパーオキシドジスムターゼ酵素は、SOD1 突然変異により変更されると、新規であるが有害な特性を獲得する。例えば、ALS における、一部の SOD1 突然変異バリエーションは、レドックスサイクルの破壊により、酸化ストレスを増大させる（例えば、毒性スーパーオキシドラジカルの蓄積の増大）。他の研究はまた、ALS における、一部の SOD1 突然変異バリエーションが、その正常な生理学的機能から独立した毒性特性（ミスフォールディングした SOD1 バリエーションの異常な凝集など）を獲得し得ることも指し示す。異常レドックス化学反応モデルにおいて、突然変異体 SOD1 は、不安定であり、異常化学反応を介して、通常とは異なる基質と相互作用し、反応性酸素分子種（ROS）の過剰産生を引き起こす。タンパク質毒性モデルにおいて、不安定な、ミスフォールディング SOD1 は、細胞質性封入体へと凝集し、細胞過程に重要なタンパク質を隔離してしまう。これらの2つの仮説は、相互に排除的ではない。活性部位内の金属に結合する、選択されたヒスチジン残基の酸化が、SOD1 の凝集を媒介することが示されている。

40

【0049】

凝集した突然変異体 SOD1 タンパク質はまた、ミトコンドリア機能不全（ベービライネンら（Vehvilainen P et al.）, Front Cell Neurosci., 2014, 8, 126）、軸索輸送の機能障害、RNA代謝の異常、グリア

50

細胞病態、およびグルタミン酸興奮毒性も誘導し得る。一部の孤発性ALS症例において、ミスフォールディングした野生型SOD1タンパク質は、家族性ALSと関連するSOD1バリエーションと同様の「毒性コンフォメーション」を形成する、罹患運動ニューロン内に見出される（ロトゥンノMSおよびボスコDA（Rotunno MS and Bosco DA）, *Front Cell Neurosci.*, 2013, 16, 7, 253）。このような証拠は、ALSが、アルツハイマー病およびパーキンソン病など、他の神経変性疾患と類似する、タンパク質ミスフォールディングの疾患であることを示唆する。

【0050】

現在のところ、ALSを患う患者には、治療的治療が利用可能でない。最近まで、唯一のFDA承認薬は、グルタミン酸放出の阻害剤であるリルゾール（リルテックとも呼ばれる）であり、ALSに対して中程度の効果を示すが、18カ月間にわたって服用しても、生存を2～3カ月間延長するに過ぎなかった。残念ながら、リルゾールを服用する患者は、疾患進行の緩徐化または筋肉機能の改善を一切経ない。したがって、リルゾールは、治療も、有効な治療すらも提示しない。2017年には、FDAがALSの治療にラジカヴァ（エダラボン）を認可した。かかる認可は22年ぶりのものだった。静脈内投与され、フリーラジカスカルベンジャーおよび抗酸化剤としての役目を果たすラジカヴァは、疾患進行を遅延させることが示されている。137人の患者を対象とした臨床第3相試験（NCT01492686）では、ラジカヴァは、ALS機能評価スケール改訂版（ALSF-RS-R）のスコアにより決定したところ、プラセボを投与した患者と比較して、身体機能の低下を遅延させた（執筆グループ；エダラボン（MCI-186）ALS19研究グループ *Lancet Neurol.* 2017 Jul; 16 (7) : 505-512）。ラジカヴァの認可は、ALSの治療の観点では進歩であるとみなされるが、これは依然として治療ではない。研究者らは、より良好な治療剤の探求を続けている。

【0051】

異常なSOD1タンパク質凝集を阻害するための1つの手法は、ALSにおけるSOD1遺伝子の発現をサイレンシングする／阻害することである。突然変異対立遺伝子の特異的な遺伝子サイレンシングのための低分子干渉RNAが、ALSの治療に治療的に有益であることが報告されている（例えば、それらの各々の内容が、参照によりそれらの全体において本明細書に援用される、ラルフGSら（Ralph GS et al.）, *Nat. Medicine*, 2005, 11 (4), 429-433；およびラウルCら（Raoul C et al.）, *Nat. Medicine*, 2005, 11 (4), 423-428；およびマックスウェルMMら（Maxwell MM et al.）, *PNAS*, 2004, 101 (9), 3178-3183；およびディングHら（Ding H et al.）, *Chinese Medical J.*, 2011, 124 (1), 106-110；およびシュワルツDSら（Scharz DS et al.）, *PloS Genet.*, 2006, 2 (9), e140）。

【0052】

当技術分野では、SOD1遺伝子を標的とし、ALSにおけるSOD1の発現を調節する他の多くのRNA治療剤も教示されており、のようなRNAベースの薬剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび二本鎖低分子干渉RNAを含む。例えば、それらの各々の内容が、参照によりその全体において本明細書に援用される、ワンHら（Wang H et al.）, *J Biol. Chem.*, 2008, 283 (23), 15845-15852；米国特許第7, 498, 316号明細書；同第7, 632, 938号明細書；同第7, 678, 895号明細書；同第7, 951, 784号明細書；同第7, 977, 314号明細書；同第8, 183, 219号明細書；同第8, 309, 533号明細書および同第8, 586, 554号明細書；および米国特許出願公開第2006/0229268号明細書および同第2011/0263680号明細書を参照されたい。

【0053】

本開示は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターなどのウイルスベクターを用いて、siRNA二重鎖またはSOD1ターゲティングポリヌクレオチドを高効率で細胞に送達

10

20

30

40

50

する。RNA i 分子、例えば本開示の siRNA 分子を含む AAV ベクターは、運動ニューロンへの活性薬剤の送達を増加させ得る。SOD1 ターゲティングポリヌクレオチドは、細胞内の SOD1 遺伝子の発現（例えば、mRNA レベル）を、著明に阻害することが可能であってもよく；したがって、タンパク質の凝集および封入体の形成、フリーラジカルの増大、ミトコンドリア機能不全、ならびに RNA 代謝など、SOD1 の発現に誘導される、細胞内のストレスを改善する。

【0054】

かかる SOD1 ターゲティングポリヌクレオチドは、ALS の治療のために使用され得る。本開示によれば、患者の ALS を治療および／または改善する方法であって、患者に対して、1 つ以上の siRNA 二重鎖をコードする少なくとも 1 つの SOD1 ターゲティングポリヌクレオチドの有効量を細胞に投与すること、および SOD1 遺伝子発現の阻害／サイレンシングを可能にすることを含む方法が提供される。

【0055】

組成物

ベクター

一部の実施形態において、本明細書に記載される siRNA 分子は、プラスミドまたはウイルスベクターなどのベクターに挿入されてもよくまたはコードされてもよい。好ましくは、siRNA 分子は、ウイルスベクターに挿入またはコードされる。

【0056】

ウイルスベクターは、ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターなどであってもよい。一部の特定の実施形態において、ウイルスベクターは AAV ベクターである。

【0057】

レトロウイルスベクター

一部の実施形態において、SOD1 遺伝子を標的とする siRNA 二重鎖は、レトロウイルスベクターよりコードされてもよい（例えば、米国特許第 5,399,346 号明細書；同第 5,124,263 号明細書；同第 4,650,764 号明細書および同第 4,980,289 号明細書を参照のこと；これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）。

【0058】

アデノウイルスベクター

アデノウイルスは、インビボで核酸を様々な細胞タイプへと効率的に送達するように修飾することができる真核生物 DNA ウイルスであり、遺伝子を神経細胞へと標的化するためのものを含む遺伝子治療プロトコルにて広範に使用されている。種々の複製欠損アデノウイルスおよび最小アデノウイルスベクターが、核酸療法剤に関して記載されている（例えば、国際公開第 199426914 号パンフレット、国際公開第 199502697 号パンフレット、国際公開第 199428152 号パンフレット、国際公開第 199412649 号パンフレット、国際公開第 199502697 号パンフレット、国際公開第 199622378 号パンフレットを参照のこと；これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）。かかるアデノウイルスベクターも、本開示の siRNA 分子の細胞への送達に使用し得る。

【0059】

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター

AAV は、依存性パルボウイルスである。他のパルボウイルスと同様に、AAV は、複製に関与するタンパク質（Rep）およびカプシドの構造タンパク質（Cap）をコードする 2 つのオープンリーディングフレームを含有する約 5000 ヌクレオチド長のゲノムを有する一本鎖非エンベロープ DNA ウイルスである。オープンリーディングフレームは、ウイルスゲノムの複製開始点としての役目を果たす 2 つの末端逆位配列（ITR）配列により隣接される。更に、AAV ゲノムは、AAV カプシドへのウイルスゲノムのパッケ

ージングを可能にするパッケージング配列を含有する。AAVベクターには、感染細胞にて増殖性感染を起こすためのコヘルパー（例えば、アデノウイルス）が必要である。かかるヘルパー機能の非存在下では、AAVビリオンは、本質的に、宿主細胞に侵入し、細胞のゲノムに組み込まれる。

【0060】

AAVベクターは、幾つかの固有特徴を有するため、siRNA送達について調査されている。これらの特徴としては、(i) 分裂細胞および非分裂細胞の両方に感染する能力；(ii) ヒト細胞を含む幅広い範囲の宿主に対する感染力；(iii) 野生型AAVはいかなる疾患にもまったく関連付けられておらず、感染細胞で複製することができないこと；(iv) ベクターに対する細胞媒介性免疫応答の欠如および(v) 宿主染色体に組み込まれるかまたはエピゾーム的に存続し、それにより長期発現能力をもたらすことができることが挙げられる。更に、AAVベクターによる感染は、細胞遺伝子発現パターンの変化に及ぼす影響が最小限である（スティルウェルおよびサムルスキ（Stillwell and Samulski et al.）, *Biotechniques*, 2003, 34, 148）。

【0061】

典型的には、siRNA送達用のAAVベクターは、ウイルスゲノム内に機能的RepおよびCapタンパク質をコードする配列を欠如するため複製欠損である組換えウイルスベクターであってもよい。ある場合には、欠損AAVベクターは、ほとんどのすべてのコード配列を欠如してもよく、本質的に、1つまたは2つのAAV ITR配列およびパッケージング配列のみを含有する。

【0062】

また、AAVベクターは、自己相補的AAVベクター（scAAV）を含んでもよい。scAAVベクターは、共にアニーリングして二本鎖DNAを形成する両方のDNA鎖を含有する。第2鎖の合成をスキップすることにより、scAAVは、細胞において迅速に発現することが可能である。

【0063】

AAVベクターを作製および／または修飾する方法は、シュードタイプAAVベクターなど、当該技術分野において開示されている（国際公開第200028004号パンフレット、同第200123001号パンフレット、同第2004112727号パンフレット、同第2005005610号パンフレットおよび同第2005072364号パンフレット、これらの各々の内容は全体として参照により本明細書に援用される）。

【0064】

siRNA分子を哺乳類細胞に送達するためのAAVベクターは、限定はされないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8およびAAV-DJを含む、AAVの種々の血清型から調製されてもよく、またはそれらに由来してもよい。ある場合には、異なるAAV血清型が共に、または他のタイプのウイルスと混合されることにより、キメラAAVベクターが作製されてもよい。

【0065】

特定の実施形態において、AAV血清型は、AAVrh10である。

siRNA送達用のAAVベクターは、送達の効率を増強するように修飾されてもよい。siRNA発現カセットを含有するかかる修飾AAVベクターは、効率的にパッケージングすることができ、高頻度でおよび最低限の毒性で標的細胞への感染を成功させるために使用することができる。

【0066】

一部の実施形態において、本開示のsiRNA二重鎖を送達するためのAAVベクターは、ヒト血清型AAVベクターであってもよい。かかるヒトAAVベクターは、任意の公知の血清型、例えば、血清型AAV1～AAV11のいずれか1つに由来し得る。非限定

10

20

30

40

50

的な例として、AAVベクターは、AAV1由来カプシドにAAV1由来ゲノムを含むベクター；AAV2由来ゲノムにAAV2由来ゲノムを含むベクター；AAV4由来カプシドにAAV4由来ゲノムを含むベクター；AAV6由来カプシドにAAV6由来ゲノムを含むベクターまたはAAV9由来カプシドにAAV9由来ゲノムを含むベクターであってもよい。

【0067】

他の実施形態において、本開示のsiRNA二重鎖を送達するためのAAVベクターは、少なくとも2つの異なるAAV血清型を起源とする配列および／または成分を含有するシュードタイプAAVベクターであってもよい。シュードタイプAAVベクターは、あるAAV血清型に由来するAAVゲノムと、少なくとも一部が異なるAAV血清型に由来するカプシドタンパク質とを含むベクターであってもよい。非限定的な例として、かかるシュードタイプAAVベクターは、AAV1由来カプシドにAAV2由来ゲノムを含むベクター；またはAAV6由来カプシドにAAV2由来ゲノムを含むベクター；またはAAV4由来カプシドにAAV2由来ゲノム；もしくはAAV9由来カプシドにAAV2由来ゲノムを含むベクターであってもよい。

【0068】

他の実施形態において、AAVベクターは、siRNA分子を中枢神経系に送達するために使用し得る（例えば、米国特許第6,180,613号明細書；この内容は全体として参照により本明細書に援用される）。

【0069】

一部の態様において、本開示のsiRNA二重鎖を送達するためのAAVベクターは、非ウイルス起源のペプチドを含む修飾カプシドを更に含んでもよい。他の態様において、siRNA二重鎖の脳および脊髄への送達を促進するため、AAVベクターはCNS特異的キメラカプシドを含んでもよい。例えば、CNS向性を呈するAAVバリエーションからのcapヌクレオチド配列のアラインメントを作成することにより可変領域（VR）配列および構造を同定してもよい。

【0070】

本開示は、カプシド（Cap）遺伝子によってコードされる構造カプシドタンパク質（VP1、VP2およびVP3を含む）を参照する。これらのカプシドタンパク質は、AAVなどのウイルスベクターの外側タンパク質構造シェル（つまり、カプシド）を形成する。Capポリヌクレオチドから合成されるVPカプシドタンパク質は、一般に、ペプチド配列の最初のアミノ酸としてメチオニン（Met1）を含み、Met1は、対応するCapヌクレオチド配列の開始コドン（AUGまたはATG）に関連する。しかしながら、最初のメチオニン（Met1）残基または一般に任意の最初のアミノ酸（AA1）は、Met-アミノペプチダーゼなどのタンパク質プロセッシング酵素によってポリペプチド合成後または合成中に切断されるのが一般的である。この「Met/AAクリッピング」プロセスは、ポリペプチド配列の二番目のアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、セリン、トレオニンなど）の対応するアセチル化と相関することが多い。Metクリッピングは、一般的にはVP1およびVP3カプシドタンパク質で生じるが、VP2カプシドタンパク質でも生じる場合がある。

【0071】

Met/AAクリッピングが不完全であると、ウイルスカプシドを含む1つ以上の（1つ、2つ、または3つの）VPカプシドタンパク質の混合物が産生される場合があり、それらの一部はMet1/AA1アミノ酸（Met+/AA+）を含み得、それらの一部はMet/AAクリッピング（Met-/AA-）の結果としてMet1/AA1アミノ酸を欠如し得る。カプシドタンパク質のMet/AAクリッピングに関するさらなる考察については、ジンら（Jin, et al.）、組換えアデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質を完全に特徴付けるための直接的液体クロマトグラフィー／質量分析（Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of

10

20

30

40

50

Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins.) Hum Gene Ther Methods. 2017 Oct. 28 (5): 255-267; ウォンら (Hwang, et al.) 細胞タンパク質の N 末端アセチル化は特異的分解シグナルを創出する (N-Terminal Acetylation of Cellular Proteins Creates Specific Degradation Signals.) Science. 2010 February 19. 327 (5968): 973-977 を参照のこと。これらの内容は各々、参照により全体として本明細書に援用される。

【0072】

本開示によれば、カプシドタンパク質への参照は、クリッピングされた (Met- / AA-) またはクリッピングされていない (Met+ / AA+) のいずれかに限定されることはなく、状況に応じて、独立したカプシドタンパク質、カプシドタンパク質の混合物で構成されるウイルスカプシド、および / または本開示のカプシドタンパク質をコードする、記述する、産生する、もしくはもたらすポリヌクレオチド配列 (またはそれらの断片) を指すことができる。また、「カプシドタンパク質」または「エカプシドポリペプチド」 (VP1、VP2 または VP2 など) への直接的参照は、Met1 / AA1 アミノ酸 (Met+ / AA+) ならびに Met / AA クリッピング (Met- / AA-) の結果として Met1 / AA1 アミノ酸を欠如する対応する VP カプシドタンパク質を含む VP カプシドタンパク質を含み得る。

【0073】

さらに、本開示によれば、Met1 / AA1 アミノ酸 (Met+ / AA+) をそれぞれ含む 1 つ以上のカプシドタンパク質を含むかまたはコードする特定の配列番号 (タンパク質であるかまたは核酸であるかに関わらず) への参照は、配列の精査した際に Met1 / AA1 アミノ酸を欠如する VP カプシドタンパク質を教示すると理解されるべきであり、それは、最初に挙げられているアミノ酸 (Met1 / AA1 であるか否かに関わらず) を単に欠如するあらゆる配列であることは言うまでもなく明らかである。

【0074】

また、非限定的な例として、736 アミノ酸長であり、AUG / ATG 開始コドンによってコードされる「Met1」アミノ酸を含む (Met+) VP1 ポリペプチド配列への参照は、735 アミノ酸長であり、736 アミノ酸 Met+ 配列の「Met1」アミノ酸を含まない (Met-) VP1 ポリペプチド配列を教示すると理解することができる。また、第 2 の非限定的な例として、736 アミノ酸長であり、NNN 開始コドンによってコードされる「AA1」アミノ酸を含む (AA1+) VP1 ポリペプチド配列への参照は、735 アミノ酸長であり、736 アミノ酸 AA1+ 配列の「AA1」アミノ酸を含まない (AA1-) VP1 ポリペプチド配列を教示すると理解することができる。

【0075】

VP カプシドタンパク質から形成されるウイルスカプシドへの参照 (特定の AAV カプシド血清型への参照など) は、Met1 / AA1 アミノ酸を含む (Met+ / AA1+) VP カプシドタンパク質、Met / AA1 クリッピングの結果として Met1 / AA1 アミノ酸を欠如する (Met- / AA1-) 対応する VP カプシドタンパク質、およびそれらの組合せ (Met+ / AA1+ および Met- / AA1-) を組み込み得る。

【0076】

非限定的な例として、AAV カプシド血清型は、VP1 (Met+ / AA1+)、VP1 (Met- / AA1-)、または VP1 (Met+ / AA1+) および VP1 (Met- / AA1-) の組合せを含み得る。AAV カプシド血清型は、VP3 (Met+ / AA1+)、VP3 (Met- / AA1-)、または VP3 (Met+ / AA1+) および VP3 (Met- / AA1-) の組合せも含み得、VP2 (Met+ / AA1) および VP2 (Met- / AA1-) の類似の任意選択の組合せも含み得る。

【0077】

ウイルスゲノム

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、示されるように、A A V 粒子は、ペイロード領域を有するウイルスゲノムを含む。

【0078】

ウイルスゲノムサイズ

特定の実施形態において、本明細書に記載されるペイロードを含むウイルスゲノムは、一本鎖または二本鎖ウイルスゲノムであってもよい。ウイルスゲノムのサイズは、小型、中型、大型または最大サイズであってもよい。加えて、ウイルスゲノムはプロモータおよびポリAテールを含み得る。

【0079】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるペイロードを含むウイルスゲノムは、小型一本鎖ウイルスゲノムであってもよい。小型一本鎖ウイルスゲノムは、約2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、および3.5 kb サイズなど、2.7~3.5 kb サイズであってもよい。非限定的な例として、小型一本鎖ウイルスゲノムは3.2 kb サイズであってもよい。加えて、ウイルスゲノムはプロモータおよびポリAテールを含み得る。

10

【0080】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるペイロードを含むウイルスゲノムは、小型二本鎖ウイルスゲノムであってもよい。小型二本鎖ウイルスゲノムは、約1.3、1.4、1.5、1.6、および1.7 kb サイズなど、1.3~1.7 kb サイズであってもよい。非限定的な例として、小型二本鎖ウイルスゲノムは1.6 kb サイズであってもよい。加えて、ウイルスゲノムはプロモータおよびポリAテールを含み得る。

20

【0081】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるペイロードを含むウイルスゲノムは、中型一本鎖ウイルスゲノムであってもよい。中型一本鎖ウイルスゲノムは、約3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2 および4.3 kb サイズなど、3.6~4.3 kb サイズであってもよい。非限定的な例として、中型一本鎖ウイルスゲノムは4.0 kb サイズであってもよい。加えて、ウイルスゲノムはプロモータおよびポリAテールを含み得る。

【0082】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるペイロードを含むウイルスゲノムは、中型二本鎖ウイルスゲノムであってもよい。中型二本鎖ウイルスゲノムは、約1.8、1.9、2.0、および2.1 kb サイズなど、1.8~2.1 kb サイズであってもよい。非限定的な例として、中型二本鎖ウイルスゲノムは2.0 kb サイズであってもよい。加えて、ウイルスゲノムはプロモータおよびポリAテールを含み得る。

30

【0083】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるペイロードを含むウイルスゲノムは、大型一本鎖ウイルスゲノムであってもよい。大型一本鎖ウイルスゲノムは、約4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9 および6.0 kb サイズなど、4.4~6.0 kb サイズであってもよい。非限定的な例として、大型一本鎖ウイルスゲノムは4.7 kb サイズであってもよい。別の非限定的な例として、大型一本鎖ウイルスゲノムは4.8 kb サイズであってもよい。更に別の非限定的な例として、大型一本鎖ウイルスゲノムは6.0 kb サイズであってもよい。加えて、ウイルスゲノムはプロモータおよびポリAテールを含み得る。

40

【0084】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるペイロードを含むウイルスゲノムは、大型二本鎖ウイルスゲノムであってもよい。大型二本鎖ウイルスゲノムは、約2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 および3.0 kb サイズなど、2.2~3.0 kb サイズであってもよい。非限定的な例として、大型二本鎖ウイルスゲノムは2.4 kb サイズであってもよい。加えて、ウイルスゲノムはプロモータおよびポリAテールを含み得る。

50

リAテールを含み得る。

【0085】

ウイルスゲノム成分：末端逆位配列（ITR）

本開示のAAV粒子は、少なくとも1つのITR領域とペイロード領域とを有するウイルスゲノムを含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは2つのITRを有する。これらの2つのITRは5'末端および3'末端でペイロード領域に隣接する。ITRは、複製のための認識部位を含む複製起点として働く。ITRは、相補的でかつ対称に配置され得る配列領域を含む。本開示のウイルスゲノムに組み込まれるITRは、天然に存在するポリヌクレオチド配列または組換え的に誘導されたポリヌクレオチド配列を含み得る。

【0086】

ITRは、本明細書の血清型のいずれか、またはその誘導體から選択される、カプシドと同じ血清型に由来してもよい。ITRはカプシドと異なる血清型であってもよい。特定の実施形態において、AAV粒子は2つ以上のITRを有する。非限定的な例では、AAV粒子は、2つのITRを含むウイルスゲノムを有する。特定の実施形態において、ITRは互いに同じ血清型である。別の実施形態において、ITRは異なる血清型である。非限定的な例としては、ITRのうちゼロ個、一方または両方がカプシドと同じ血清型を有することが挙げられる。特定の実施形態において、AAV粒子のウイルスゲノムの両方のITRがAAV2 ITRである。

【0087】

独立に、各ITRは約100～約150ヌクレオチド長であってもよい。ITRは、約100～105ヌクレオチド長、106～110ヌクレオチド長、111～115ヌクレオチド長、116～120ヌクレオチド長、121～125ヌクレオチド長、126～130ヌクレオチド長、131～135ヌクレオチド長、136～140ヌクレオチド長、141～145ヌクレオチド長または146～150ヌクレオチド長であってもよい。特定の実施形態において、ITRは140～142ヌクレオチド長である。ITR長さの非限定的な例は、102、140、141、142、145ヌクレオチド長、およびそれと少なくとも95%の同一性を有するものである。

【0088】

特定の実施形態において、AAV粒子は、発現ベクターにおいてフリップITRの5'末端の近傍に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。別の実施形態において、AAV粒子は、発現ベクターにおいてフリップITRの3'末端の近傍に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。更に別の実施形態において、AAV粒子は、発現ベクターにおいてフロップITRの5'末端の近傍に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。更に別の実施形態において、AAV粒子は、発現ベクターにおいてフロップITRの3'末端の近傍に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。特定の実施形態において、AAV粒子は、発現ベクターにおいてフリップITRの5'末端とフロップITRの3'末端との間に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。特定の実施形態において、AAV粒子は、発現ベクターにおいてフリップITRの3'末端とフリップITRの5'末端との間に（例えば、フリップITRの5'末端とフロップITRの3'末端との間またはフロップITRの3'末端とフリップITRの5'末端との間の中間に）位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。非限定的な例として、AAV粒子は、発現ベクターにおいてITR（例えばフリップまたはフロップITR）の5'または3'末端から下流に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチドまたは30ヌクレオチド超以内に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。非限定的な例として、AAV粒子は、発現ベクターにおいてITR（例えばフリップまたはフロップITR）の5'または3'末端から上流に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチドまたは30ヌクレオチド超以

10

20

30

40

50

内に位置してもよい s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む。別の非限定的な例として、A A V 粒子は、発現ベクターにおいて I T R（例えばフリップまたはフロップ I T R）の 5' または 3' 末端から下流に 1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、10～15、10～20、10～25、10～30、15～20、15～25、15～30、20～25、20～30 または 25～30 ヌクレオチド以内に位置してもよい s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む。別の非限定的な例として、A A V 粒子は、発現ベクターにおいて I T R（例えばフリップまたはフロップ I T R）の 5' または 3' 末端から上流に 1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、10～15、10～20、10～25、10～30、15～20、15～25、15～30、20～25、20～30 または 25～30 以内に位置してもよい s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む。非限定的な例として、A A V 粒子は、発現ベクターにおいて I T R（例えばフリップまたはフロップ I T R）の 5' または 3' 末端から上流にあるヌクレオチドの最初の 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25% または 25% 超以内に位置してもよい s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む。別の非限定的な例として、A A V 粒子は、発現ベクターにおいて I T R（例えばフリップまたはフロップ I T R）の 5' または 3' 末端から下流に最初の 1～5%、1～10%、1～15%、1～20%、1～25%、5～10%、5～15%、5～20%、5～25%、10～15%、10～20%、10～25%、15～20%、15～25%、または 20～25% で位置してもよい s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む。

【0089】

ウイルスゲノム成分：プロモータ

特定の実施形態において、ウイルスゲノムのペイロード領域は、トランス遺伝子標的特異性および発現を増強する少なくとも 1 つのエレメントを含む（例えば、パウエル（P o w e l l）ら著、「遺伝子療法におけるトランス遺伝子標的特異性および発現を増強するウイルス発現カセットエレメント（V i r a l E x p r e s s i o n C a s s e t t e E l e m e n t s t o E n h a n c e T r a n s g e n e T a r g e t S p e c i f i c i t y a n d E x p r e s s i o n i n G e n e T h e r a p y）」、2015 年を参照のこと；この内容は本明細書において全体として参照により援用される）。トランス遺伝子標的特異性および発現を増強するエレメントの非限定的な例としては、プロモータ、内因性 m i R N A、転写後調節エレメント（P R E）、ポリアデニル化（ポリ A）シグナル配列および上流エンハンサー（U S E）、C M V エンハンサーおよびイントロンが挙げられる。

【0090】

当業者であれば、標的細胞中での本開示のポリペプチドの発現には、限定はされないが、種特異的な、誘導可能な、組織特異的な、または細胞周期特異的なプロモータを含む、特異的なプロモータが必要とされ得ることを認識し得る（パー（P a r r）ら著、ネイチャー・メディシン（N a t . M e d . ）、第 3 巻、p . 1145～9（1997 年）；この内容は本明細書において全体として参照により援用される）。

【0091】

特定の実施形態において、プロモータは、A A V 粒子のウイルスゲノムのペイロード領域にコードされたポリペプチドの発現をドライブする場合、有効と見なされる。

特定の実施形態において、プロモータは、調節性ポリヌクレオチドの発現をドライブするのに有効と見なされるプロモータである。

【0092】

特定の実施形態において、プロモータは、標的とされている細胞中で発現をドライブする場合、有効と見なされるプロモータである。

特定の実施形態において、プロモータは、標的組織においてペイロードの発現をある期間ドライブする。プロモータによりドライブされた発現は、1 時間、2 時間、3 時間、4

時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、8日、9日、10日、11日、12日、13日、2週間、15日、16日、17日、18日、19日、20日、3週間、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、1年、13カ月、14カ月、15カ月、16カ月、17カ月、18カ月、19カ月、20カ月、21カ月、22カ月、23カ月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年または10年超の期間であってもよい。発現は、1～5時間、1～12時間、1～2日、1～5日、1～2週間、1～3週間、1～4週間、1～2カ月、1～4カ月、1～6カ月、2～6カ月、3～6カ月、3～9カ月、4～8カ月、6～12カ月、1～2年、1～5年、2～5年、3～6年、3～8年、4～8年または5～10年であってもよい。

10

【0093】

特定の実施形態において、プロモータは、少なくとも1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年、55年、60年、65年、または65年超にわたって、ペイロードの発現をドライブする。

20

【0094】

プロモータは、天然に存在してもよくまたは天然に存在しなくともよい。プロモータの非限定的な例としては、ウイルスプロモータ、植物プロモータおよび哺乳類プロモータが挙げられる。一部の実施形態において、プロモータは、ヒトプロモータであってもよい。一部の実施形態において、プロモータは、トランケート型であってもよい。

【0095】

ほとんどの組織で発現をドライブまたは促進するプロモータとしては、限定はされないが、ヒト伸長因子1 α -サブユニット(EF1 α)、サイトメガロウイルス(CMV)前初期エンハンサーおよび／もしくはプロモータ、ニワトリ β -アクチン(CBA)およびその誘導体CAG、 β グルクロニダーゼ(GUSB)、またはユビキチンC(UBC)が挙げられる。限定はされないが、筋肉特異的プロモータ、B細胞プロモータ、単球プロモータ、白血球プロモータ、マクロファージプロモータ、膵腺房細胞プロモータ、内皮細胞プロモータ、肺組織プロモータ、アストロサイトプロモータ、またはニューロン、アストロサイト、もしくはオリゴデンドロサイトに発現を制限するために使用することができる神経系プロモータなど、組織特異的発現エレメントを使用して、発現を特定の細胞型に限定することができる。

30

【0096】

筋肉特異的プロモータの非限定的な例としては、哺乳類筋肉クレアチンキナーゼ(MCK)プロモータ、哺乳類デスミン(DES)プロモータ、哺乳類トロポニンI(TNNI2)プロモータ、および哺乳類骨格筋型アルファ α -アクチン(ASKA)プロモータ(例えば、米国特許出願公開第20110212529号明細書を参照。その内容は本明細書において全体として参照により援用される)。

40

【0097】

ニューロンの組織特異的発現エレメントの非限定的な例としては、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血小板由来増殖因子B鎖(PDGF- β)、シナプシン(Syn)、メチル-CpG結合タンパク質(MeCP2)、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII(CaMKII)、代謝調節型グルタミン酸受容体2(mGluR2)、ニューロフィラメント軽鎖(NFL)または重鎖

50

(NFH)、 β -グロビンミニ遺伝子 $n\beta 2$ 、プレプロエンケファリン(PPE)、エンケファリン(Enk)および興奮性アミノ酸トランスポーター2(EAAT2)プロモータが挙げられる。アストロサイトに対する組織特異的発現エレメントの非限定的な例としては、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)およびEAAT2プロモータが挙げられる。オリゴデンドロサイトに対する組織特異的発現エレメントの非限定的な例としては、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)プロモータが挙げられる。

【0098】

特定の実施形態において、プロモータは、1 kb未満であってもよい。プロモータは、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800または800ヌクレオチド超の長さを有してもよい。プロモータは、200~300、200~400、200~500、200~600、200~700、200~800、300~400、300~500、300~600、300~700、300~800、400~500、400~600、400~700、400~800、500~600、500~700、500~800、600~700、600~800または700~800の長さを有してもよい。

【0099】

特定の実施形態において、プロモータは、限定はされないが、CMVおよびCBAなど、同じまたは異なる開始または親プロモータの2つ以上の成分の組合せであってもよい。各成分は、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800または800超の長さを有してもよい。各成分は、200~300、200~400、200~500、200~600、200~700、200~800、300~400、300~500、300~600、300~700、300~800、400~500、400~600、400~700、400~800、500~600、500~700、500~800、600~700、600~800または700~800の長さを有してもよい。特定の実施形態において、プロモータは、382ヌクレオチドCMVエンハンサー配列と260ヌクレオチドCBAプロモータ配列との組合せである。

【0100】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムはユビキタスプロモータを含む。ユビキタスプロモータの非限定的な例としては、CMV、CBA(誘導体CAG、CBh等を含む)、EF-1 α 、PGK、UBC、GUSB(hGBp)、およびUCOE(HNRPA2B1-CBX3のプロモータ)が挙げられる。

【0101】

ユーら(Yu et al.) (Molecular Pain, 2011, 7, 63; これらの内容は本明細書において全体として参照により援用される)は、レンチウイルスベクターを使用してラットDRG細胞および初代DRG細胞におけるCAG、EF1 α 、PGKおよびUBCプロモータ下のeGFPの発現を評価し、UBCが他の3つのプロモータよりも弱い発現を示し、全てのプロモータについて僅か10~12%のグリア細胞発現しか見られなかったことを見出した。セーデルブロムら(Soderblom et al.) (E. Neuro, 2015; これらの内容は本明細書において全体として参照に

より援用される)は、運動皮質における注射後のCMVおよびUBCプロモータを含むAAV8およびCMVプロモータを含むAAV2におけるeGFPの発現を評価した。UBCまたはEF1 α プロモータを含むプラスミドの鼻腔内投与は、CMVプロモータによる発現よりも高い持続的気道発現を示した(例えば、ギルら(Gill et al.), Gene Therapy, 2001, 8, 1539-1546(この内容は本明細書において全体として参照により援用される)を参照のこと)。フセインら(Husain et al.) (Gene Therapy, 2009; これらの内容は本明細書において全体として参照により援用される)は、hGUSBプロモータ、HSV-1LATプロモータおよびNSEプロモータを含むH β Hコンストラクトを評価し、このH β Hコンストラクトがマウス脳においてNSEよりも弱い発現を示したことを見出した。パッシーニおよびウォルフ(Passini and Wolfe) (J. Virol., 2001, 12382-12392、これらの内容は本明細書において全体として参照により援用される)は、新生仔マウスにおける脳室内注射後のH β Hベクターの長期効果を評価し、少なくとも1年間にわたり持続的発現があったことを見出した。スー(Xu et al.) (Gene Therapy, 2001, 8, 1323-1332; これらの内容は本明細書において全体として参照により援用される)により、NFLおよびNFHプロモータを使用したとき、CMV-lacZ、CMV-luc、EF、GFAP、hENK、nAChR、PPE、PPE+wpres、NSE(0.3kb)、NSE(1.8kb)およびNSE(1.8kb+wpres)と比較して全ての脳領域で低発現が見出された。スー(Xu)らは、プロモータ活性が、降順に、NSE(1.8kb)、EF、NSE(0.3kb)、GFAP、CMV、hENK、PPE、NFLおよびNFHであることを見出した。NFLは650ヌクレオチドプロモータであり、NFHは920ヌクレオチドプロモータであり、両方とも肝臓には存在しないが、NFHは固有受容感覚ニューロン、脳および脊髄に豊富にあり、NFHは心臓に存在する。Scn8aは、DRG、脊髄および脳全体にわたって発現する470ヌクレオチドプロモータであり、特に海馬ニューロンおよび小脳プルキンエ細胞、皮質、視床および視床下部に高発現が見られる(例えば、ドレウスら(Drews et al.)「ナトリウムチャネル遺伝子SCN8Aにおける、進化的に保存された機能性非コードエレメントの同定(Identification of evolutionary conserved, functional noncoding elements in the promoter region of the sodium channel gene SCN8A)」, Mamm Genome(2007), 18, 723-731; およびレイモンドら(Raymond et al.)「選択的スプライスによるナトリウムチャネル α -サブユニット遺伝子の発現(Expression of Alternatively Spliced Sodium Channel α -subunit genes)」, Journal of Biological Chemistry(2004), 279(44), 46234-46241を参照のこと; この各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される)。

【0102】

前述のユー(Yu)、セーデルブロム(Soderblom)、ギル(Gill)、フセイン(Husain)、パッシーニ(Passini)、スー(Xu)、ドレウス(Drews)またはレイモンド(Raymond)によって教示されるプロモータはいずれも、本組成物に使用することができる。

【0103】

特定の実施形態において、プロモータは細胞特異的ではない。

特定の実施形態において、プロモータはユビキチンc(UBC)プロモータである。UBCプロモータは、300~350ヌクレオチドのサイズを有し得る。非限定的な例として、UBCプロモータは332ヌクレオチドである。

【0104】

特定の実施形態において、プロモータは、 β -グルクロニダーゼ(GUSB)プロモータである。GUSBプロモータは、350~400ヌクレオチドのサイズを有し得る。非

限定的な例として、G U S Bプロモータは3 7 8ヌクレオチドである。

【0105】

特定の実施形態において、プロモータはニューロフィラメント軽鎖（N F L）プロモータである。N F Lプロモータはサイズが6 0 0～7 0 0ヌクレオチドであり得る。非限定的な例として、N F Lプロモータは6 5 0ヌクレオチドである。非限定的な例として、コンストラクトはA A V－プロモーターC M V／グロビンイントロナー調節性ポリヌクレオチド－R B Gであってもよく、ここでA A Vは自己相補的であってもよく、およびA A VはD J血清型であってもよい。

【0106】

特定の実施形態において、プロモータはニューロフィラメント重鎖（N F H）プロモータである。N F Hプロモータはサイズが9 0 0～9 5 0ヌクレオチドであり得る。非限定的な例として、N F Hプロモータは9 2 0ヌクレオチドである。非限定的な例として、コンストラクトはA A V－プロモーターC M V／グロビンイントロナー調節性ポリヌクレオチド－R B Gであってもよく、ここでA A Vは自己相補的であってもよく、およびA A VはD J血清型であってもよい。

10

【0107】

特定の実施形態において、プロモータはs c n 8 aプロモータである。s c n 8 aプロモータはサイズが4 5 0～5 0 0ヌクレオチドであり得る。非限定的な例として、s c n 8 aプロモータは4 7 0ヌクレオチドである。非限定的な例として、コンストラクトはA A V－プロモーターC M V／グロビンイントロナー調節性ポリヌクレオチド－R B Gであってもよく、ここでA A Vは自己相補的であってもよく、およびA A VはD J血清型であってもよい。

20

【0108】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムはP o l I I Iプロモータを含む。

特定の実施形態において、ウイルスゲノムはP 1プロモータを含む。

特定の実施形態において、ウイルスゲノムはF X Nプロモータを含む。

【0109】

特定の実施形態において、プロモータは、ホスホグリセリン酸キナーゼ1（P G K）プロモータである。

特定の実施形態において、プロモータは、ニワトリβ－アクチン（C B A）プロモータである。

30

【0110】

特定の実施形態において、プロモータは、ニワトリベータ－アクチン（C B A）プロモータに融合されたサイトメガロウイルス（C M V）エンハンサーを含むコンストラクトであるC A Gプロモータである。

【0111】

特定の実施形態において、プロモータは、サイトメガロウイルス（C M V）プロモータである。

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、H 1プロモータを含む。

【0112】

40

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、U 6プロモータを含む。

特定の実施形態において、プロモータは、肝臓または骨格筋プロモータである。肝臓プロモータの非限定的な例としては、ヒトα－1－抗トリプシン（h A A T）およびチロキシン結合グロブリン（T B G）が挙げられる。骨格筋プロモータの非限定的な例としては、デスミン、M C Kまたは合成C 5－1 2が挙げられる。

【0113】

特定の実施形態において、プロモータは、R N A p o l I I Iプロモータである。非限定的な例として、R N A p o l I I IプロモータはU 6である。非限定的な例として、R N A p o l I I IプロモータはH 1である。

【0114】

50

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、2つのプロモータを含む。非限定的な例として、プロモータは、EF1 α プロモータおよびCMVプロモータである。

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、エンハンサーエレメント、プロモータおよび／または5'UTRイントロンを含む。また、エンハンサーエレメントは、本明細書では「エンハンサー」とも称され、限定はされないが、CMVエンハンサーであってもよく、プロモータは、限定はされないが、CMV、CBA、UBC、GUSB、NSE、シナプシン、MeCP2、およびGFAPプロモータであってもよく、および5'UTR／イントロンは、限定はされないが、SV40およびCBA-MVMであってもよい。非限定的な例として、組合せで使用されるエンハンサー、プロモータおよび／またはイントロンは、(1) CMVエンハンサー、CMVプロモータ、SV40 5'UTRイントロン；(2) CMVエンハンサー、CBAプロモータ、SV40 5'UTRイントロン；(3) CMVエンハンサー、CBAプロモータ、CBA-MVM 5'UTRイントロン；(4) UBCプロモータ；(5) GUSBプロモータ；(6) NSEプロモータ；(7) シナプシンプロモータ；(8) MeCP2プロモータ、(9) GFAPプロモータ、(10) H1プロモータ；および(11) U6プロモータであってもよい。

【0115】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、操作されたプロモータを含む。

別の実施形態において、ウイルスゲノムは、天然に発現されるタンパク質のプロモータを含む。

【0116】

ウイルスゲノム成分：非翻訳領域(UTR)

定義上、遺伝子の野生型非翻訳領域(UTR)は、転写されるが翻訳されない。一般的には、5'UTRは、転写開始部位から始まり、開始コドンで終了し、3'UTRは、終止コドンの直後から始まり、転写の終結シグナルまで継続する。

【0117】

特定の標的臓器の、豊富に発現される遺伝子に典型的に見出される特徴を、UTR内に操作して、安定性およびタンパク質産生を増強することができる。非限定的な例として、肝臓において通常発現されるmRNA(例えば、アルブミン、血清アミロイドA、アポリポタンパク質A/B/E、トランスフェリン、アルファフェトプロテイン、エリスロポエチン、または第VII因子)に由来する5'UTRを、本開示のAAV粒子のウイルスゲノムに使用して、肝細胞株または肝臓での発現を増強することができる。

【0118】

理論によって束縛されることを望むものではないが、野生型5'非翻訳領域(UTR)は、翻訳開始に役割を果たす特徴を含む。コザック配列は、リボソームが多数の遺伝子の翻訳を開始させる過程に関与することが広く知られており、通常は5'UTRに含まれている。コザック配列は、コンセンサスCCR(A/G)CCAUGGを有し、式中Rは、開始コドン(ATG)の3塩基上流にあるプリン(アデニンまたはグアニン)であり、別の「G」がその後続く。

【0119】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムの5'UTRは、コザック配列を含む。

特定の実施形態において、ウイルスゲノムの5'UTRは、コザック配列を含まない。

理論によって束縛されることを望むものではないが、野生型3'UTRは、アデノシンおよびウリジンのストレッチがそこに埋め込まれていることが知られている。これらのAUリッチシグネチャーは、高いターンオーバー率を有する遺伝子において特に広く見受けられる。それらの配列特徴および機能的特性に基づき、AUリッチエレメント(ARE)は、3つのクラスに分離することができる(チェンら(Chen et al.), 1995)。その内容は本明細書において全体として参照により援用される)：限定はされないが、c-MycおよびMyoDなどのクラスI AREは、Uリッチ領域内にAUUUAモチーフの幾つかの分散コピーを含有する。限定はされないが、GM-CSFおよびTNF- α などのクラスII AREは、2つ以上のオーバーラップUUAUUUA(U/A)(

10

20

30

40

50

U/A) ノナマーを有する。限定はされないが、c-Jun およびミオゲニンなどのクラス III AREs は、それほど十分に規定されていない。これらの U リッチ領域は、AUUA モチーフを含有しない。ARE に結合するほとんどのタンパク質は、メッセンジャーを不安定化することが知られているが、ELAV ファミリーのメンバーである最も顕著には HuR は、mRNA の安定性を増加させることが実証されている。HuR は、3 つ全てのクラスの ARE に結合する。HuR 特異的結合部位を核酸分子の 3' UTR 内に、操作により加えることは、インビボにて、HuR 結合を、したがってメッセージの安定化をもたらすことになる。

【0120】

3' UTR AU リッチエレメント (ARE) の導入、除去または修飾を使用して、ポリヌクレオチドの安定性を調節することができる。特異的なポリヌクレオチド、例えばウイルスゲノムのペイロード領域を操作する場合、ARE の 1 つ以上のコピーを導入して、ポリヌクレオチドをより不安定にし、それにより、翻訳を減らし、結果として生じるタンパク質の産生を減少させることができる。同様に、ARE を、同定および除去または突然変異させて、細胞内安定性を増加させ、したがって結果として生じるタンパク質の翻訳および産生を増加させることができる。

【0121】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムの 3' UTR は、ポリ A テールを鋳型付加するためのオリゴ (dT) 配列を含み得る。

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、少なくとも 1 つの miRNA シード、結合部位または完全な配列を含み得る。microRNA (または miRNA または miR) は、核酸標的の部位に結合し、核酸分子安定性を低減することまたは翻訳を阻害することのいずれかによって遺伝子発現を下方制御する 19 ~ 25 ヌクレオチド非コード RNA である。microRNA 配列は、「シード」領域、すなわち成熟 microRNA の 2 ~ 8 位の領域の配列を含む。この配列は、核酸の miRNA 標的配列に対して完全な Watson-Crick 型相補性を有する。

【0122】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、少なくとも 1 つの miRNA 結合部位、配列またはシード領域を含む、変更するまたは除去するように操作されていてもよい。

当該技術分野で公知の任意の遺伝子に由来する任意の UTR を、AAV 粒子のウイルスゲノムに組み込むことができる。これらの UTR またはそれらの部分は、それらが選択されたかまたはそれらの配向性もしくは位置が変更され得る遺伝子と同じ配向性に配置され得る。特定の実施形態において、AAV 粒子のウイルスゲノムに使用される UTR は、逆位化、短縮化、延長化、当該技術分野で公知の 1 つ以上の他の 5' UTR または 3' UTR で作製され得る。本明細書で使用されるとき、用語「変更される」は、UTR に関する場合、UTR が、参照配列に対して何らかの点で変化していることを意味する。例えば、3' または 5' UTR は、上記で教示されるような配向性または位置の変化によって野生型または天然 UTR に対して変更されていてもよく、または追加ヌクレオチドの介在、ヌクレオチドの欠失、ヌクレオチドの交換もしくは転位によって変更されていてもよい。

【0123】

特定の実施形態において、AAV 粒子のウイルスゲノムは、野生型 UTR の変異体でない少なくとも 1 つの人工 UTR を含む。

特定の実施形態において、AAV 粒子のウイルスゲノムは、そのタンパク質が、共通の機能、構造、特徴、または特性を共有する転写物のファミリーから選択されている UTR を含む。

【0124】

ウイルスゲノム成分：ポリアデニル化配列

特定の実施形態において、本開示の AAV 粒子のウイルスゲノムは少なくとも 1 つのポリアデニル化配列を含む。AAV 粒子のウイルスゲノムは、ペイロードコード配列の 3' 末端と 3' ITR の 5' 末端との間にポリアデニル化配列を含み得る。

10

20

30

40

50

[illegible]

50

7、498、499、および500ヌクレオチド長であってもよい。

【0126】

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は50～100ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は50～150ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は50～160ヌクレオチド長である。

【0127】

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は50～200ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は60～100ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は60～150ヌクレオチド長である。

【0128】

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は60～160ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は60～200ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は70～100ヌクレオチド長である。

【0129】

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は70～150ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は70～160ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は70～200ヌクレオチド長である。

【0130】

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は80～100ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は80～150ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は80～160ヌクレオチド長である。

【0131】

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は80～200ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は90～100ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は90～150ヌクレオチド長である。

【0132】

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は90～160ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は90～200ヌクレオチド長である。

特定の実施形態において、AAV粒子は、発現ベクターにおいてポリアデニル化配列の上流に位置してもよい、siRNA分子をコードする核酸配列を含む。更に、AAV粒子は、限定はされないが、CMV、U6、CAG、CBA、またはSV40イントロンもしくはヒトβグロビンイントロンを伴うCBAプロモータなど、発現ベクターにおいてプロモータの下流に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。非限定的な例として、AAV粒子は、発現ベクターにおいてプロモータから下流および／またはポリアデニル化配列の上流に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチドまたは30ヌクレオチド超以内に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。別の非限定的な例として、AAV粒子は、発現ベクターにおいてプロモータから下流および／またはポリアデニル化配列の上流に1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、10～15、10～20、10～25、10～30、15～20、15～25、15～30、20～25、20～30または25～30ヌクレオチド以内に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。非限定的な例として、AAV粒子は、発現ベクターにおいてプロモータから下流および／またはポリアデニル化配列の上流にあるヌクレオチドの最初の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%または25%超以内に位置してもよいsiRNA分子をコードする核酸配列を含む。別の非限定的な例として、AAV粒子は、発現ベクターにおいてプロモータから下流および／またはポリアデニル化配列の上流に最初の1～5%、1～10%、1～15%、1～20%、1～25%、5～10%、5～15%、5～20%、5～25%、10～15%、10～20%、10～25%、15～20%、

10

20

30

40

50

15～25%、または20～25%で位置してもよいs i R N A分子をコードする核酸配列を含む。

【0133】

特定の実施形態において、A A V粒子は、ウサギグロビンポリアデニル化（ポリA）シグナル配列（r B G p A）を含む。

特定の実施形態において、A A V粒子は、ヒト成長ホルモンポリアデニル化（ポリA）シグナル配列を含む。

【0134】

ウイルスゲノム成分：イントロン

特定の実施形態において、ペイロード領域は、1つ以上のイントロンまたはそれらの部分など、発現を増強するための少なくとも1つのエレメントを含む。イントロンの非限定的な例としては、M V M（67～97 b p s）、F・I Xトランケート型イントロン1（300 b p）、β-グロビンS D／免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプター（250 b p）、アデノウイルススプライスドナー／イムノグロビンスプライスアクセプター（500 b p）、S V 40後期スプライスドナー／スプライスアクセプター（19 S／16 S）（180 b p）およびハイブリッドアデノウイルススプライスドナー／I g Gスプライスアクセプター（230 b p）が挙げられる。

【0135】

特定の実施形態において、イントロンまたはイントロン部分は100～500ヌクレオチド長であってもよい。イントロンは、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490または500の長さを有してもよい。イントロンは、80～100、80～120、80～140、80～160、80～180、80～200、80～250、80～300、80～350、80～400、80～450、80～500、200～300、200～400、200～500、300～400、300～500、または400～500の長さを有してもよい。

【0136】

特定の実施形態において、A A Vウイルスゲノムは、限定はされないが、C M VまたはU 6などのプロモータを含み得る。非限定的な例として、本開示のs i R N A分子の核酸配列を含むA A Vのプロモータは、C M Vプロモータである。別の非限定的な例として、本開示のs i R N A分子の核酸配列を含むA A Vのプロモータは、U 6プロモータである。

【0137】

特定の実施形態において、A A VウイルスゲノムはC M Vプロモータを含み得る。

特定の実施形態において、A A VウイルスゲノムはU 6プロモータを含み得る。

特定の実施形態において、A A VウイルスゲノムはC M VおよびU 6プロモータを含み得る。

【0138】

特定の実施形態において、A A Vウイルスゲノムは、H 1プロモータを含み得る。

特定の実施形態において、A A VウイルスゲノムはC B Aプロモータを含み得る。

特定の実施形態において、コード化s i R N A分子は、限定はされないが、C M V、U 6、H 1、C B A、C A G、またはS V 40もしくは当該技術分野において公知の他のものなどのイントロンを伴うC B Aプロモータなど、発現ベクターにおいてプロモータの下流に位置してもよい。更に、コード化s i R N A分子はまた、発現ベクターにおいてポリアデニル化配列の上流に位置してもよい。非限定的な例として、コード化s i R N A分子は、発現ベクターにおいてプロモータから下流および／またはポリアデニル化配列の上流に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、3

10

20

30

40

50

0ヌクレオチドまたは30ヌクレオチド超以内に位置してもよい。別の非限定的な例として、コード化*s i R N A*分子は、発現ベクターにおいてプロモータから下流および／またはポリアデニル化配列の上流に1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、10～15、10～20、10～25、10～30、15～20、15～25、15～30、20～25、20～30または25～30ヌクレオチド以内に位置してもよい。非限定的な例として、コード化*s i R N A*分子は、発現ベクターにおいてプロモータから下流および／またはポリアデニル化配列の上流にあるヌクレオチドの最初の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%または25%超以内に位置してもよい。別の非限定的な例として、コード化*s i R N A*分子は、発現ベクターにおいてプロモータから下流および／またはポリアデニル化配列の上流に最初の1～5%、1～10%、1～15%、1～20%、1～25%、5～10%、5～15%、5～20%、5～25%、10～15%、10～20%、10～25%、15～20%、15～25%、または20～25%で位置してもよい。

10

【0139】

ウイルスゲノム成分：フィラー配列

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、1つ以上のフィラー配列を含む。

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、ウイルスゲノムの長さをパッケージングに最適なサイズにするために、1つ以上のフィラー配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、ウイルスゲノムの長さを約2.3 kbにするために、少なくとも1つのフィラー配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、ウイルスゲノムの長さを約4.6 kbにするために、少なくとも1つのフィラー配列を含む。

20

【0140】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、ベクターゲノムのヘアピン構造（例えば、本明細書に記載される調節性ポリヌクレオチド）が、発現および／またはパッケージング中に末端逆位配列（ITR）として読み取られ得る可能性を低減させるために、1つ以上のフィラー配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、ウイルスゲノムの長さを約2.3 kbにするために、少なくとも1つのフィラー配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、ウイルスゲノムの長さを約4.6 kbにするために、少なくとも1つのフィラー配列を含む。

30

【0141】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、一本鎖（*s s*）ウイルスゲノムであり、限定はされないが、0.1 kb、0.2 kb、0.3 kb、0.4 kb、0.5 kb、0.6 kb、0.7 kb、0.8 kb、0.9 kb、1 kb、1.1 kb、1.2 kb、1.3 kb、1.4 kb、1.5 kb、1.6 kb、1.7 kb、1.8 kb、1.9 kb、2 kb、2.1 kb、2.2 kb、2.3 kb、2.4 kb、2.5 kb、2.6 kb、2.7 kb、2.8 kb、2.9 kb、3 kb、3.1 kb、3.2 kb、3.3 kb、3.4 kb、3.5 kb、3.6 kb、3.7 kb、または3.8 kbなどの、約0.1 kb～3.8 kbの長さを有する1つ以上のフィラー配列を含む。非限定的な例として、ベクターゲノム中のフィラー配列の合計長は、3.1 kbである。非限定的な例として、ベクターゲノム中のフィラー配列の合計長は、2.7 kbである。非限定的な例として、ベクターゲノム中のフィラー配列の合計長は、0.8 kbである。非限定的な例として、ベクターゲノム中のフィラー配列の合計長は、0.4 kbである。非限定的な例として、ベクターゲノム中の各フィラー配列の長さは、0.8 kbである。非限定的な例として、ベクターゲノム中の各フィラー配列の長さは、0.4 kbである。

40

【0142】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、自己相補的（*s c*）ウイルスゲノムであり、限定はされないが、0.1 kb、0.2 kb、0.3 kb、0.4 kb、0.5 kb、0.6 kb、0.7 kb、0.8 kb、0.9 kb、1 kb、1.1 kb、1.2 kb、1.3 kb、1.4 kb、または1.5 kbなどの、約0.1 kb～1.5 kbの長さ

50

を有する1つ以上のフィラー配列を含む。非限定的な例として、ベクターゲノム中のフィラー配列の合計長は、0.8 kbである。非限定的な例として、ベクターゲノム中のフィラー配列の合計長は、0.4 kbである。非限定的な例として、ベクターゲノム中の各フィラー配列の長さは、0.8 kbである。非限定的な例として、ベクターゲノム中の各フィラー配列の長さは、0.4 kbである。

【0143】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、フィラー配列の任意の部分を含む。ウイルスゲノムは、フィラー配列の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%を含んでいてもよい。

10

【0144】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、一本鎖(ss)ウイルスゲノムであり、ウイルスゲノムの長さを約4.6 kbにするために、1つ以上のフィラー配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、5' ITR配列の3'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、プロモータ配列の5'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、ポリアデニル化シグナル配列の3'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、3' ITR配列の5'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、2つのイントロン配列間に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、イントロン配列内に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、2つのフィラー配列を含み、第1のフィラー配列は、5' ITR配列の3'に位置し、第2のフィラー配列は、ポリアデニル化シグナル配列の3'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、2つのフィラー配列を含み、第1のフィラー配列は、プロモータ配列の5'に位置し、第2のフィラー配列は、ポリアデニル化シグナル配列の3'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、2つのフィラー配列を含み、第1のフィラー配列は、5' ITR配列の3'に位置し、第2のフィラー配列は、5' ITR配列の5'に位置する。

20

30

【0145】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、自己相補的(sc)ウイルスゲノムであり、ウイルスゲノムの長さを約2.3 kbにするために、1つ以上のフィラー配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、5' ITR配列の3'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、プロモータ配列の5'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、ポリアデニル化シグナル配列の3'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、3' ITR配列の5'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、2つのイントロン配列間に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は、イントロン配列内に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、2つのフィラー配列を含み、第1のフィラー配列は、5' ITR配列の3'に位置し、第2のフィラー配列は、ポリアデニル化シグナル配列の3'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、2つのフィラー配列を含み、第1のフィラー配列は、プロモータ配列の5'に位置し、第2のフィラー配列は、ポリアデニル化シグナル配列の3'に位置する。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、2つのフィラー配列を含み、第1のフィラー配列は、5' ITR配列の3'に位置し、第2のフィラー配列は、5' ITR配列の5'に位置する。

40

【0146】

50

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、ウイルスゲノムのより多くの領域の1つの間に1つ以上のフィラー配列を含み得る。特定の実施形態において、フィラー領域は、限定はされないが、ペイロード領域、末端逆位配列（ITR）、プロモータ領域、イントロン領域、エンハンサー領域、ポリアデニル化シグナル配列領域、および／またはエクソン領域などの領域の前に位置していてもよい。特定の実施形態において、フィラー領域は、限定はされないが、ペイロード領域、末端逆位配列（ITR）、プロモータ領域、イントロン領域、エンハンサー領域、ポリアデニル化シグナル配列領域、および／またはエクソン領域などの領域の後に位置していてもよい。特定の実施形態において、フィラー領域は、限定はされないが、ペイロード領域、末端逆位配列（ITR）、プロモータ領域、イントロン領域、エンハンサー領域、ポリアデニル化シグナル配列領域、および／またはエクソン領域などの領域の前および後に位置していてもよい。

10

【0147】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、ウイルスゲノムの少なくとも1つの領域を二分する（bifurcate）1つ以上のフィラー配列を含み得る。ウイルスゲノムの二分された領域は、フィラー配列領域の5'にある領域の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%を含んでいてもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の10%がフィラー配列の5'に位置し、領域の90%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の20%がフィラー配列の5'に位置し、領域の80%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の30%がフィラー配列の5'に位置し、領域の70%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の40%がフィラー配列の5'に位置し、領域の60%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の50%がフィラー配列の5'に位置し、領域の50%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の60%がフィラー配列の5'に位置し、領域の40%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の70%がフィラー配列の5'に位置し、領域の30%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の80%がフィラー配列の5'に位置し、領域の20%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。非限定的な例として、フィラー配列は、領域の90%がフィラー配列の5'に位置し、領域の10%がフィラー配列の3'に位置するように、少なくとも1つの領域を二分してもよい。

20

30

【0148】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、5' ITRの後にフィラー配列を含む。

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、プロモータ領域の後にフィラー配列を含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、ペイロード領域の後にフィラー配列を含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、イントロン領域の後にフィラー配列を含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、エンハンサー領域の後にフィラー配列を含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、ポリアデニル化シグナル配列領域の後にフィラー配列を含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、エクソン領域の後にフィラー配列を含む。

40

【0149】

特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、プロモータ領域の前にフィラー配列を含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、ペイロード領域の前にフィラー配列を含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、イントロン領域の前にフィラー配列を含む。特定の実施形態において、ウイルスゲノムは、エンハンサー領域の前にフィラー

50

【 0 1 5 0 】

10

20

30

40

されないが、エンハンサー領域および3' ITRなどの、2つの領域間に位置していてもよい。

【0154】

特定の実施形態において、フィラー配列は、限定はされないが、ポリアデニル化シグナル配列領域およびエクソン領域などの、2つの領域間に位置していてもよい。特定の実施形態において、フィラー配列は、限定はされないが、ポリアデニル化シグナル配列領域および3' ITRなどの、2つの領域間に位置していてもよい。

【0155】

特定の実施形態において、フィラー配列は、限定はされないが、エクソン領域および3' ITRなどの、2つの領域間に位置してもよい。

特定の実施形態において、フィラー配列は、レンチウイルスの領域または部分に由来してもよい。

【0156】

一部の実施形態において、フィラー配列は、アルブミン遺伝子の領域または部分に由来してもよい。特定の実施形態において、フィラー配列は、ヒトアルブミン遺伝子（NCBI参照配列：NG_009291.1）の領域または部分に由来してもよい。

【0157】

ペイロード

本開示のAAV粒子は、少なくとも1つのペイロード領域を含む。本明細書で使用されるとき、「ペイロード」または「ペイロード領域」は、ウイルスゲノムによりもしくはその内にコードされる1つ以上のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド領域、またはかかるポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド領域、例えばトランス遺伝子、ポリペプチドもしくはマルチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現産物、または調節性核酸もしくは制御性核酸を指す。本開示のペイロードは、典型的には、調節性ポリヌクレオチドまたはその断片もしくは変異体をコードする。

【0158】

ペイロード領域は、mRNAの天然構成と同様のまたは反映した領域を再現するように構築され得る。

ペイロード領域は、コードおよび非コード核酸配列の組合せを含み得る。

【0159】

一部の実施形態では、AAVペイロード領域は、コードまたは非コードRNAをコードし得る。

特定の実施形態において、AAV粒子は、siRNA、miRNAまたは他のRNAi剤をコードする核酸配列を含むペイロード領域を有するウイルスゲノムを含む。かかる実施形態において、2つ以上のポリペプチドをコードするウイルスゲノムが、ウイルス粒子へと複製およびパッケージングされ得る。ウイルス粒子で形質導入された標的細胞は、単一細胞内部において、コード化siRNA、miRNAまたは他のRNAi剤を発現し得る。

【0160】

調節性ポリヌクレオチド

特定の実施形態において、調節性ポリヌクレオチド、例えばRNAまたはDNA分子を使用して、神経変性疾患、詳細には筋萎縮性側索硬化症（ALS）を治療することができる。本明細書で使用されるとき、「調節性ポリヌクレオチド」は、標的遺伝子のレベルまたは量、例えばmRNAまたはタンパク質レベルを調節する（増加させるかまたは減少させるかのいずれか）働きをする任意の核酸配列である。

【0161】

特定の実施形態において、調節性ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのsiRNA分子をコードする少なくとも1つの核酸配列を含み得る。核酸は、2つ以上ある場合には独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9個、または9個超のsiRNA分子をコードし得る。

10

20

30

40

50

【0162】

特定の実施形態において、分子足場は、CMVプロモータ、その断片または変異体の下流に位置してもよい。

特定の実施形態において、分子足場は、CBAプロモータ、その断片または変異体の下流に位置してもよい。

【0163】

特定の実施形態において、分子足場は、CMVプロモータの下流に位置する天然pri-miRNA足場であってもよい。非限定的な例として、天然pri-miRNA足場はヒトmiR155足場に由来する。

【0164】

特定の実施形態において、分子足場は、CBAプロモータの下流に位置する天然pri-miRNA足場であってもよい。

特定の実施形態において、分子足場および調節性ポリヌクレオチドの選択は、pri-miRNA内での調節性ポリヌクレオチドを比較する方法によって決定される（例えば、ミニアリコバら（Miniarikova et al.）, 「ハンチントン病に対する遺伝子療法を開発するためのハンチンチンを標的とする治療用miRNAの設計、特徴付け、およびリード選択（Design, Characterization, and Lead Selection of Therapeutic miRNAs Targeting Huntingtin for Development of Gene Therapy for Huntington's Disease）」, Molecular Therapy—Nucleic Acids（2016）, 5, e297および国際公開第2016102664号パンフレット（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）により記載される方法を参照のこと）。調節性ポリヌクレオチドの活性を評価するため、使用し得る使用される分子足場は、ヒトpri-miRNA足場（例えば、miR155足場）であり、プロモータはCMVであってもよい。活性はインビトロでHEK293T細胞およびレポータ（例えばルシフェラーゼ）を用いて決定されてもよい。

【0165】

調節性ポリヌクレオチドに最適な分子足場を評価するため、調節性ポリヌクレオチドがpri-miRNA足場においてCAGプロモータと共に使用される。このコンストラクトには50ngのレポータ（例えば、ルシフェラーゼレポータ）がコトランスフェクトされる。50ngコトランスフェクションで80%より高いノックダウンのコンストラクトが有効と見なされる。一態様では、強力なガイド鎖活性を有するコンストラクトが好ましい。分子足場をHEK293T細胞においてNGSによって処理して、ガイドーパッセンジャー比、およびプロセッシング変動性を決定することができる。

【0166】

インビボでの分子足場および調節性ポリヌクレオチドの評価には、調節性ポリヌクレオチドを含む分子足場がAAVにパッケージングされて（例えば、血清型はAAV5であってもよい（例えば、国際公開第2015060722号パンフレットに記載される方法およびコンストラクトを参照のこと、この内容は本明細書において全体として参照により援用される））、インビボモデルに投与され、モデルの種々の範囲（例えば、組織領域）においてガイドーパッセンジャー比、5'および3'末端プロセッシング、ガイド鎖のパッセンジャー鎖に対する比、およびノックダウンを決定することができる。

【0167】

特定の実施形態において、分子足場および調節性ポリヌクレオチドの選択は、天然pri-miRNAおよび合成pri-miRNAでの調節性ポリヌクレオチドを比較する方法によって決定される。調節性ポリヌクレオチドは、限定はされないが、エクソン1以外のエクソンを標的とし得る。調節性ポリヌクレオチドの活性の評価には、分子足場がCBAプロモータと共に使用される。一態様では、活性はインビトロでHEK293T細胞、HeLa細胞およびレポータ（例えば、ルシフェラーゼ）を用いて決定されてもよく、お

10

20

30

40

50

およびノックダウン効率的な調節性ポリヌクレオチドは、試験した細胞において少なくとも80%のSOD1ノックダウンを示した。加えて、最も効率的と見なされる調節性ポリヌクレオチドは有意なパッセンジャー鎖（p鎖）活性が低い乃至全くないことを示した。別の態様では、内因性SOD1ノックダウン有効性はインビトロでHEK293T細胞、HeLa細胞およびレポータを用いてトランスフェクションにより評価される。効率的な調節性ポリヌクレオチドは50%より高い内因性SOD1ノックダウンを示す。更に別の態様では、内因性SOD1ノックダウン有効性は、種々の細胞型（例えば、HEK293、HeLa、初代アストロサイト、U251アストロサイト、SH-SY5Yニューロン細胞およびALS患者に由来する線維芽細胞）において感染（例えば、AAV2）によって評価される。効率的な調節性ポリヌクレオチドは60%より高い内因性SOD1ノックダウンを示す。

10

【0168】

インビボでの分子足場および調節性ポリヌクレオチドの評価には、調節性ポリヌクレオチドを含む分子足場がAAVにパッケージングされてインビボモデルに投与され、モデルの種々の範囲（例えば組織領域）においてガイドーパッセンジャー比、5'および3'末端プロセッシング、ガイド鎖のパッセンジャー鎖に対する比、およびノックダウンを決定することができる。分子足場をNGSによってインビボ試料から処理して、ガイドーパッセンジャー比、およびプロセッシング変動性を決定することができる。

【0169】

特定の実施形態において、調節性ポリヌクレオチドは以下の特性のうちの少なくとも1つを用いて設計される：ループ変異体、シードミスマッチ／バルジ／ゆらぎ変異体、ステムミスマッチ、ループ変異体およびヴァッサルステム（*vassal stem*）ミスマッチ変異体、シードミスマッチおよびベーサルステム（*basal stem*）ミスマッチ変異体、ステムミスマッチおよびベーサルステム（*basal stem*）ミスマッチ変異体、シードゆらぎおよびベーサルステム（*basal stem*）ゆらぎ変異体、またはステム配列変異体。

20

【0170】

本開示は、部分的に、神経変性障害を治療するためのRNA干渉（RNAi）誘導性の遺伝子発現阻害に関する。SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖またはdsRNAが提供される。かかるsiRNA二重鎖またはdsRNAは、細胞、例えば運動ニューロンにおいてSOD1遺伝子発現をサイレンシングし、したがって運動死および筋萎縮などのALSの症状を改善することができる。SOD1 siRNAは、組換えAAVベクターのポリヌクレオチドにコードされてもよい。

30

【0171】

特定のmRNAを標的とするsiRNA二重鎖またはdsRNAを、標的SOD1ターゲティングポリヌクレオチドの一部としてインビトロで設計および合成して、RNAi過程を活性化させるため細胞に導入してもよい。

【0172】

siRNA分子

本開示は、神経変性障害を治療するためのRNA干渉（RNAi）誘導性の遺伝子発現阻害に関する。本明細書には、目的の遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖またはコード化dsRNA（本明細書では、まとめて「siRNA分子」と称される）が提供される。そのようなsiRNA二重鎖またはコード化dsRNAは、限定はされないが、中型有棘ニューロン、皮質ニューロンおよび／またはアストロサイトなどの細胞の遺伝子発現を軽減またはサイレンシングすることができる。

40

【0173】

RNAi（転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）、クエリング、または共抑制としても知られる）は、RNA分子が典型的には特異的mRNA分子の破壊を引き起こすことにより遺伝子発現を配列特異的に阻害する転写後遺伝子サイレンシング過程である。RNAiの活性成分は低分子干渉RNA（siRNA）と呼ばれる短鎖／低分子二本鎖RNA

50

(dsRNA)であり、これは典型的には15～30ヌクレオチド（例えば、19～25、19～24または19～21ヌクレオチド）および2-ヌクレオチドの3'オーバーハングを含有し、かつ標的遺伝子の核酸配列と一致する。これらの低分子RNA種は、天然ではインビボでより大きいdsRNAのダイサー媒介性切断によって産生されることができ、および哺乳類細胞で機能性である。

【0174】

microRNA (miRNA) と称される、天然で発現する低分子RNA分子は、mRNAの発現を調節することにより遺伝子サイレンシングを誘発する。RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)を含有するmiRNAは、シード領域と呼ばれるmiRNAの5'領域におけるヌクレオチド2～7と完全な配列相補性を呈し、かつその3'領域と他の塩基対を呈するmRNAを標的とする。miRNA媒介性の遺伝子発現下方制御は、標的mRNAの切断、標的mRNAの翻訳阻害、またはmRNA崩壊によって引き起こされ得る。miRNAターゲティング配列は、通常、標的mRNAの3'-UTRに位置する。単一のmiRNAが様々な遺伝子の100より多くの転写物を標的とすることができ、および1つのmRNAが異なるmiRNAの標的となることができる。

【0175】

特異的mRNAを標的とするsiRNA二重鎖またはdsRNAがインビトロで設計および合成されて、RNAi過程を活性化させるため細胞に導入されてもよい。エルバシール(Elbashir)らは、21ヌクレオチドsiRNA二重鎖(低分子干渉RNAと称される)が哺乳類細胞において免疫応答を誘導することなく強力かつ特異的な遺伝子ノックダウンを生じさせる能力を有したことを実証した(エルバシール・SMら(Elbashir SM et al.), Nature, 2001, 411, 494-498)。この最初の報告以来、siRNAによる転写後遺伝子サイレンシングは哺乳類細胞における強力な遺伝子解析ツールとして急速に浮上しており、新規療法を生み出す可能性を秘めている。

【0176】

ハンチントン病などのポリグルタミン伸長疾患を引き起こすポリグルタミンリピートタンパク質をコードする核酸配列を標的とするように設計されたRNAi分子が、米国特許第9,169,483号明細書および同第9,181,544号明細書ならびに国際公開第2015179525号パンフレット(これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される)に記載されている。米国特許第9,169,483号明細書および同第9,181,544号明細書ならびに国際公開第2015179525号パンフレットは、各々が、第1のRNA鎖(例えば、15連続ヌクレオチド)と第2のRNA鎖(例えば、第1の鎖の少なくとも12連続ヌクレオチドと相補的)とを含む単離RNA二重鎖を提供し、ここでRNA二重鎖は約15～30塩基対長である。第1のRNA鎖と第2のRNA鎖とはRNAループ(約4～50ヌクレオチド)により作動可能に連結されてヘアピン構造を形成してもよく、これが発現カセットに挿入され得る。ループ部分の非限定的な例としては、米国特許第9,169,483号明細書の配列番号9～14(この内容は本明細書において全体として参照により援用される)が挙げられる。完全配列または配列の一部のいずれかの、RNA二重鎖の形成に使用し得るRNA鎖の非限定的な例としては、米国特許第9,169,483号明細書の配列番号1～8ならびに米国特許第9,181,544号明細書の配列番号1～11、33～59、208～210、213～215および218～221(これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される)が挙げられる。RNAi分子の非限定的な例としては、米国特許第9,169,483号明細書の配列番号1～8、米国特許第9,181,544号明細書の配列番号1～11、33～59、208～210、213～215および218～221ならびに国際公開第2015179525号パンフレットの配列番号1、6、7、および35～38(これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される)が挙げられる。

【0177】

RNA iを活性化させるため、インビトロ合成したsiRNA分子が細胞に導入されてもよい。外因性siRNA二重鎖は、細胞に導入されると、内因性dsRNAと同様にアセンブルして、siRNA二重鎖の2本の鎖のうち的一方（すなわちアンチセンス鎖）に相補的なRNA配列と相互作用する多ユニット複合体であるRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）を形成することができる。この過程でsiRNAのセンス鎖（またはパッセンジャー鎖）が複合体から失われ、一方でsiRNAのアンチセンス鎖（またはガイド鎖）はその相補RNAとマッチする。詳細には、siRNAを含有するRISCの標的は、完全な配列相補性を呈するmRNAである。次に、標的の切断、放出および分解によってsiRNA媒介性遺伝子サイレンシングが起こる。

【0178】

標的mRNAに相同なセンス鎖と標的mRNAに相補的なアンチセンス鎖とを含むsiRNA二重鎖は、標的RNAの破壊効率の点で、一本鎖（ss）-siRNA（例えばアンチセンス鎖RNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド）の使用と比較してはるかに大きい利点をもたらす。多くの場合に、ss-siRNAの使用は、対応する二重鎖の有効な遺伝子サイレンシング効力を達成するのに、より高い濃度のss-siRNAを必要とする。

【0179】

前述の分子のいずれも、ウイルスゲノムによってコードされてもよい。

目的の遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖の設計および配列

本開示は、遺伝子発現および／またはタンパク質産生に干渉するためにmRNAを標的とする低分子干渉RNA（siRNA）二重鎖（およびそれらをコードする調節性ポリヌクレオチド）を提供する。

【0180】

本開示のコード化siRNA二重鎖は、共にハイブリダイズして二重鎖構造を形成するアンチセンス鎖およびセンス鎖を含有し、ここでアンチセンス鎖は標的遺伝子の核酸配列に相補的であり、センス鎖は標的遺伝子の核酸配列と相同である。一部の態様において、アンチセンス鎖の5'末端は5'リン酸基を有し、センス鎖の3'末端は3'ヒドロキシル基を含む。他の態様において、各鎖の3'末端にはヌクレオチドオーバハングがない、1つある、または2つある。

【0181】

当該技術分野では、siRNAの設計に関して幾つかの指針が提案されている。これらの指針は、概して、サイレンシングしようとする遺伝子中の領域を標的とする19ヌクレオチド二重鎖形成領域、対称2〜3ヌクレオチド3'オーバハング、5'-リン酸基および3'-ヒドロキシル基を作成することを推奨している。siRNA配列の好ましさを左右し得る他の規則としては、限定はされないが、（i）アンチセンス鎖の5'末端におけるA/U；（ii）センス鎖の5'末端におけるG/C；（iii）アンチセンス鎖の5'端側3分の1にある少なくとも5個のA/U残基；および（iv）9ヌクレオチド長より長いかなるGCストレッチも存在しないことが挙げられる。標的遺伝子の具体的な配列と合わせて、かかる考慮点に従い、哺乳類標的遺伝子発現の抑制に不可欠な極めて有効なsiRNA分子を容易に設計し得る。

【0182】

本開示によれば、目的の遺伝子を標的とするsiRNA分子（例えば、siRNA二重鎖またはコード化dsRNA）が設計される。かかるsiRNA分子は、特異的に遺伝子発現およびタンパク質産生を抑制することができる。一部の態様において、siRNA分子は、細胞の遺伝子変異体、すなわち突然変異型転写物を選択的に「ノックアウト」するように設計および使用される。一部の態様において、siRNA分子は、細胞の遺伝子変異体を選択的に「ノックダウン」するように設計および使用される。他の態様において、siRNA分子は、目的の遺伝子の野生型および突然変異型の両方を阻害または抑制することが可能である。

【0183】

特定の実施形態において、本開示の s i R N A 分子は、両方の鎖が共にハイブリダイズして二重鎖構造を形成するセンス鎖と相補的アンチセンス鎖とを含む。アンチセンス鎖は、標的 m R N A 配列に対して標的特異的 R N A i を導くのに十分な相補性を有し、すなわち s i R N A 分子は、R N A i 機構または過程による標的 m R N A の破壊を惹起するのに十分な配列を有する。

【0184】

特定の実施形態において、本開示の s i R N A 分子は、両方の鎖が共にハイブリダイズして二重鎖構造を形成するセンス鎖と相補的アンチセンス鎖とを含み、ここで m R N A とのハイブリダイゼーションの開始部位は、標的 m R N A 配列上のヌクレオチド 10 ~ 1000 にある。非限定的な例として、開始部位は、標的 m R N A 配列上のヌクレオチド 10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 40、40 ~ 50、60 ~ 70、70 ~ 80、80 ~ 90、90 ~ 100、100 ~ 150、150 ~ 200、200 ~ 250、250 ~ 300、300 ~ 350、350 ~ 400、400 ~ 450、450 ~ 500、500 ~ 550、550 ~ 600、600 ~ 650、650 ~ 700、700 ~ 750、750 ~ 800、800 ~ 850、850 ~ 900、900 ~ 950、950 ~ 1000 にあってもよい。更に別の非限定的な例として、開始部位は、標的 m R N A 配列上のヌクレオチド 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、

10

20

30

40

50

3 7 4、3 7 5、3 7 6、3 7 7、3 7 8、3 7 9、3 8 0、3 8 1、3 8 2、3 8 3、
3 8 4、3 8 5、3 8 6、3 8 7、3 8 8、3 8 9、3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、
3 9 4、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、
4 0 4、4 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 0、4 1 1、4 1 2、4 1 3、
4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、
4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8、4 2 9、4 3 0、4 3 1、4 3 2、4 3 3、
4 3 4、4 3 5、4 3 6、4 3 7、4 3 8、4 3 9、4 4 0、4 4 1、4 4 2、4 4 3、
4 4 4、4 4 5、4 4 6、4 4 7、4 4 8、4 4 9、4 5 0、4 5 1、4 5 2、4 5 3、
4 5 4、4 5 5、4 5 6、4 5 7、4 5 8、4 5 9、4 6 0、4 6 1、4 6 2、4 6 3、
4 6 4、4 6 5、4 6 6、4 6 7、4 6 8、4 6 9、4 7 0、4 7 1、4 7 2、4 7 3、
4 7 4、4 7 5、4 7 6、4 7 7、4 7 8、4 7 9、4 8 0、4 8 1、4 8 2、4 8 3、
4 8 4、4 8 5、4 8 6、4 8 7、4 8 8、4 8 9、4 9 0、4 9 1、4 9 2、4 9 3、
4 9 4、4 9 5、4 9 6、4 9 7、4 9 8、4 9 9、5 0 0、5 0 1、5 0 2、5 0 3、
5 0 4、5 0 5、5 0 6、5 0 7、5 0 8、5 0 9、5 1 0、5 1 1、5 1 2、5 1 3、
5 1 4、5 1 5、5 1 6、5 1 7、5 1 8、5 1 9、5 2 0、5 2 1、5 2 2、5 2 3、
5 2 4、5 2 5、5 2 6、5 2 7、5 2 8、5 2 9、5 3 0、5 3 1、5 3 2、5 3 3、
5 3 4、5 3 5、5 3 6、5 3 7、5 3 8、5 3 9、5 4 0、5 4 1、5 4 2、5 4 3、
5 4 4、5 4 5、5 4 6、5 4 7、5 4 8、5 4 9、5 5 0、5 5 1、5 5 2、5 5 3、
5 5 4、5 5 5、5 5 6、5 5 7、5 5 8、5 5 9、5 6 0、5 6 1、5 6 2、5 6 3、
5 6 4、5 6 5、5 6 6、5 6 7、5 6 8、5 6 9、5 7 0、5 7 1、5 7 2、5 7 3、
5 7 4、5 7 5、5 7 6、5 7 7、5 7 8、5 7 9、5 8 0、5 8 1、5 8 2、5 8 3、
5 8 4、5 8 5、5 8 6、5 8 7、5 8 8、5 8 9、5 9 0、5 9 1、5 9 2、5 9 3、
5 9 4、5 9 5、5 9 6、5 9 7、5 9 8、5 9 9、6 0 0、6 0 1、6 0 2、6 0 3、
6 0 4、6 0 5、6 0 6、6 0 7、6 0 8、6 0 9、6 1 0、6 1 1、6 1 2、6 1 3、
6 1 4、6 1 5、6 1 6、6 1 7、6 1 8、6 1 9、6 2 0、6 2 1、6 2 2、6 2 3、
6 2 4、6 2 5、6 2 6、6 2 7、6 2 8、6 2 9、6 3 0、6 3 1、6 3 2、6 3 3、
6 3 4、6 3 5、6 3 6、6 3 7、6 3 8、6 3 9、6 4 0、6 4 1、6 4 2、6 4 3、
6 4 4、6 4 5、6 4 6、6 4 7、6 4 8、6 4 9、6 5 0、6 5 1、6 5 2、6 5 3、
6 5 4、6 5 5、6 5 6、6 5 7、6 5 8、6 5 9、6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 6 3、
6 6 4、6 6 5、6 6 6、6 6 7、6 6 8、6 6 9、6 7 0、6 7 1、6 7 2、6 7 3、
6 7 4、6 7 5、6 7 6、6 7 7、6 7 8、6 7 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、6 8 3、
6 8 4、6 8 5、6 8 6、6 8 7、6 8 8、6 8 9、6 9 0、6 9 1、6 9 2、6 9 3、
6 9 4、6 9 5、6 9 6、6 9 7、6 9 8、6 9 9、7 0 0、7 0 1、7 0 2、7 0 3、
7 0 4、7 0 5、7 0 6、7 0 7、7 0 8、7 0 9、7 1 0、7 1 1、7 1 2、7 1 3、
7 1 4、7 1 5、7 1 6、7 1 7、7 1 8、7 1 9、7 2 0、7 2 1、7 2 2、7 2 3、
7 2 4、7 2 5、7 2 6、7 2 7、7 2 8、7 2 9、7 3 0、7 3 1、7 3 2、7 3 3、
7 3 4、7 3 5、7 3 6、7 3 7、7 3 8、7 3 9、7 4 0、7 4 1、7 4 2、7 4 3、
7 4 4、7 4 5、7 4 6、7 4 7、7 4 8、7 4 9、7 5 0、7 5 1、7 5 2、7 5 3、
7 5 4、7 5 5、7 5 6、7 5 7、7 5 8、7 5 9、7 6 0、7 6 1、7 6 2、7 6 3、
7 6 4、7 6 5、7 6 6、7 6 7、7 6 8、7 6 9、7 7 0、7 7 1、7 7 2、7 7 3、
7 7 4、7 7 5、7 7 6、7 7 7、7 7 8、7 7 9、7 8 0、7 8 1、7 8 2、7 8 3、
7 8 4、7 8 5、7 8 6、7 8 7、7 8 8、7 8 9、7 9 0、7 9 1、7 9 2、7 9 3、
7 9 4、7 9 5、7 9 6、7 9 7、7 9 8、7 9 9、8 0 0、8 0 1、8 0 2、8 0 3、
8 0 4、8 0 5、8 0 6、8 0 7、8 0 8、8 0 9、8 1 0、8 1 1、8 1 2、8 1 3、
8 1 4、8 1 5、8 1 6、8 1 7、8 1 8、8 1 9、8 2 0、8 2 1、8 2 2、8 2 3、
8 2 4、8 2 5、8 2 6、8 2 7、8 2 8、8 2 9、8 3 0、8 3 1、8 3 2、8 3 3、
8 3 4、8 3 5、8 3 6、8 3 7、8 3 8、8 3 9、8 4 0、8 4 1、8 4 2、8 4 3、
8 4 4、8 4 5、8 4 6、8 4 7、8 4 8、8 4 9、8 5 0、8 5 1、8 5 2、8 5 3、
8 5 4、8 5 5、8 5 6、8 5 7、8 5 8、8 5 9、8 6 0、8 6 1、8 6 2、8 6 3、
8 6 4、8 6 5、8 6 6、8 6 7、8 6 8、8 6 9、8 7 0、8 7 1、8 7 2、8 7 3、

10

20

30

40

50

874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、
884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、
894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、
904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、
914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、
924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、
934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、
944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、
954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、
964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、
974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、
984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、
994、995、996、997、998、999、および1000にあってもよい。

10

【0185】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖と標的mRNA配列とは100%の相補性を有する。アンチセンス鎖は標的mRNA配列の任意の一部と相補的であってもよい。

他の実施形態において、アンチセンス鎖と標的mRNA配列とは少なくとも1つのミスマッチを含む。非限定的な例として、アンチセンス鎖と標的mRNA配列とは、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~99%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~99%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~99%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~99%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~99%、70~80%、70~90%、70~95%、70~99%、80~90%、80~95%、80~99%、90~95%、90~99%または95~99%の相補性を有する。

20

【0186】

特定の実施形態において、siRNAまたはdsRNAは、互いに相補的な少なくとも2つの配列を含む。

30

本開示によれば、siRNA分子は長さが約10~50ヌクレオチドまたはそれ以上であり、すなわち、各鎖が10~50ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を含む。好ましくは、siRNA分子は長さが各鎖約15~30、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドであり、ここで鎖の一方は標的領域と十分に相補的である。特定の実施形態において、siRNA分子の各鎖は、約19~25、19~24または19~21ヌクレオチドの長さを有する。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、19ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、20ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、21ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、22ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、23ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、24ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、25ヌクレオチド長である。

40

【0187】

一部の実施形態において、本開示のsiRNA分子は、約19ヌクレオチド~約25ヌクレオチド、および3'末端に2オーバーハングヌクレオチドを含む合成RNA二重鎖であり得る。一部の態様において、siRNA分子は非修飾RNA分子であってもよい。他の態

50

様において、*siRNA*分子は、塩基、糖または骨格修飾などの少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含有し得る。

【0188】

特定の実施形態において、本開示の*siRNA*分子は、アンチセンス配列およびセンス配列またはその断片もしくは変異体を含み得る。非限定的な例として、アンチセンス配列およびセンス配列は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~99%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~99%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~99%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~99%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~99%、70~80%、70~90%、70~95%、70~99%、80~90%、80~95%、80~99%、90~95%、90~99%または95~99%の相補性を有する。

【0189】

他の実施形態において、本開示の*siRNA*分子は、細胞への送達用のプラスミドベクター、AAV粒子、ウイルスゲノムまたは他の核酸発現ベクターにコードすることができる。

【0190】

DNA発現プラスミドを使用して本開示の*siRNA*二重鎖または*dsRNA*を細胞で安定に発現させ、標的遺伝子発現の長期阻害を実現することができる。一態様において、*siRNA*二重鎖のセンス鎖とアンチセンス鎖とは、典型的には短いスペーサ配列によって連結され、低分子ヘアピンRNA (*shRNA*) と呼ばれるステムループ構造の発現をもたらす。ヘアピンはダイサーによって認識および切断され、そのようにして成熟*siRNA*分子が生じる。

【0191】

本開示によれば、mRNAを標的とする*siRNA*分子をコードする核酸を含むAAV粒子が産生され、AAV血清型は、本明細書に挙げられる血清型のいずれであってもよい。AAV血清型の非限定的な例としては、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A、AAV-PHP.B、AAV-PHP.B2、AAV-PHP.B3、AAV-PHP.N/PHP.B-DGT、AAV-PHP.B-EST、AAV-PHP.B-GGT、AAV-PHP.B-ATP、AAV-PHP.B-ATT-T、AAV-PHP.B-DGT-T、AAV-PHP.B-GGT-T、AAV-PHP.B-SGS、AAV-PHP.B-AQP、AAV-PHP.B-QQP、AAV-PHP.B-SNP(3)、AAV-PHP.B-SNP、AAV-PHP.B-QGT、AAV-PHP.B-NQT、AAV-PHP.B-EGS、AAV-PHP.B-SGN、AAV-PHP.B-EGT、AAV-PHP.B-DST、AAV-PHP.B-DST、AAV-PHP.B-STP、AAV-PHP.B-PQP、AAV-PHP.B-SQP、AAV-PHP.B-QLP、AAV-PHP.B-TMP、AAV-PHP.B-TTP、AAV-PHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5およびそれらのバリエーションが挙げられる。

【0192】

一部の実施形態において、本開示の*siRNA*二重鎖またはコード化*dsRNA*は、標的mRNAを抑制（または分解）する。したがって、*siRNA*二重鎖またはコード化*dsRNA*を使用して、細胞、例えばニューロンにおける遺伝子発現を実質的に阻害するこ

とができる。一部の態様において、遺伝子発現の阻害とは、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%、99%および100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~45%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、35~45%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、45~50%、45~55%、50~60%、50~70%、50~75%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、55~65%、57~68%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~85%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、85~99%、90~95%、90~100%もしくは95~100%の阻害を指す。したがって、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%、99%および100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~45%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、35~45%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、45~50%、45~55%、50~60%、50~70%、50~75%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、55~65%、57~68%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~85%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、85~99%、90~95%、90~100%もしくは95~100%阻害され得る。非限定的な例として、阻害は、30~40%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、30~45%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、35~45%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、50%を超えてもよい。非限定的な例として、阻害は、50~60%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、60%を超えてもよい。非限定的な例として、阻害は、50~75%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、55~65%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、57~68%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、70~80%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、70~85%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、85~99%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、35%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、36%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、40%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、41%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、43%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、45%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、49%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、62%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、64%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、74%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、77%であってもよい。非限定的な例として、阻

10

20

30

40

50

害は、84%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、87%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、95%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、99%であってもよい。非限定的な例として、阻害は、100%であってもよい。

【0193】

特定の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、脊髄運動ニューロンにおいて標的 mRNA を抑制（または分解）する。一部の態様において、遺伝子発現の阻害とは、少なくとも約 20%、好ましくは少なくとも約 30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%、99% および 100%、または少なくとも 20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~45%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、35~45%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、45~50%、45~55%、50~60%、50~70%、50~75%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、55~65%、57~68%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~85%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、85~99%、90~95%、90~100% もしくは 95~100% の抑制を指す。したがって、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約 20%、好ましくは少なくとも約 30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%、99% および 100%、または少なくとも 20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~45%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、35~45%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、45~50%、45~55%、50~60%、50~70%、50~75%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、55~65%、57~68%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~85%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、85~99%、90~95%、90~100% もしくは 95~100% 阻害され得る。非限定的な例として、抑制は、30~45%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、35~45%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、50%を超えてもよい。非限定的な例として、抑制は、60%を超えてもよい。非限定的な例として、抑制は、50~60%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、55~65%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、50~75%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、57~68%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、70~80%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、70~85%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、85~99%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、35%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、36%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、40%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、

10

20

30

40

50

41%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、43%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、45%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、49%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、62%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、64%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、74%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、77%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、84%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、87%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、95%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、99%であってもよい。非限定的な例として、抑制は、100%であってもよい。

【0194】

特定の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、脊髄運動ニューロンにおいて標的 mRNA を 78% 抑制（または分解）する。

特定の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、脊髄運動ニューロンにおいて標的 mRNA を 45～55% 抑制（または分解）する。

【0195】

特定の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、運動ニューロン形態学的特徴の vg+ 細胞において標的 mRNA を抑制（または分解）する。一部の態様において、遺伝子発現の阻害とは、少なくとも約 20%、好ましくは少なくとも約 30%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95% および 100%、または少なくとも 20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～100%、30～40%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、45～50%、45～55%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100% 若しくは 95～100% の阻害を指す。したがって、標的遺伝子発現のタンパク質産生は、少なくとも約 20%、好ましくは少なくとも約 30%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95% および 100%、または少なくとも 20～30%、20～40%、20～50%、20～60%、20～70%、20～80%、20～90%、20～95%、20～100%、30～40%、30～50%、30～60%、30～70%、30～80%、30～90%、30～95%、30～100%、40～50%、40～60%、40～70%、40～80%、40～90%、40～95%、40～100%、45～50%、45～55%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～95%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～95%、60～100%、70～80%、70～90%、70～95%、70～100%、80～90%、80～95%、80～100%、90～95%、90～100% 若しくは 95～100% 阻害され得る。

【0196】

特定の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、運動ニューロン形態学的特徴の vg+ 細胞において標的 mRNA を 53% 抑制（または分解）する。

【0197】

特定の実施形態において、s i R N A分子は、ガイド鎖に位置する標的に対するm i R N Aシードマッチを含む。別の実施形態において、s i R N A分子は、パッセンジャー鎖に位置する標的に対するm i R N Aシードマッチを含む。更に別の実施形態において、目的の遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖またはコード化d s R N Aは、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖に位置する標的に対するシードマッチを含まない。

【0198】

特定の実施形態において、目的の遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖またはコード化d s R N Aは、ガイド鎖について有意な完全長オフターゲット効果をほぼ有しないものであり得る。別の実施形態において、目的の遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖またはコード化d s R N Aは、パッセンジャー鎖について有意な完全長オフターゲット効果をほぼ有しないものであり得る。目的の遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖またはコード化d s R N Aは、パッセンジャー鎖について1%未満、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1~5%、2~6%、3~7%、4~8%、5~9%、5~10%、6~10%、5~15%、5~20%、5~25%、5~30%、10~20%、10~30%、10~40%、10~50%、15~30%、15~40%、15~45%、20~40%、20~50%、25~50%、30~40%、30~50%、35~50%、40~50%、45~50%の完全長オフターゲット効果を有し得る。更に別の実施形態において、目的の遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖またはコード化d s R N Aは、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖について有意な完全長オフターゲット効果をほぼ有しないものであり得る。目的の遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖またはコード化d s R N Aは、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖について1%未満、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1~5%、2~6%、3~7%、4~8%、5~9%、5~10%、6~10%、5~15%、5~20%、5~25%、5~30%、10~20%、10~30%、10~40%、10~50%、15~30%、15~40%、15~45%、20~40%、20~50%、25~50%、30~40%、30~50%、35~50%、40~50%、45~50%の完全長オフターゲット効果を有し得る。

【0199】

特定の実施形態において、目的の遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖またはコード化d s R N Aはインビトロで高い活性を有し得る。別の実施形態において、s i R N A分子はインビトロで低い活性を有し得る。更に別の実施形態において、目的の遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖またはd s R N Aはインビトロで高いガイド鎖活性および低いパッセンジャー鎖活性を有し得る。

【0200】

特定の実施形態において、s i R N A分子はインビトロで高いガイド鎖活性および低いパッセンジャー鎖活性を有する。ガイド鎖による標的のノックダウン(KD)は少なくとも40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%または100%であり得る。ガイド鎖による標的のノックダウンは40~50%、45~50%、50~55%、50~60%、60~65%、60~70%、60~75%、60~80%、60~85%、60~90%、60~95%、60~99%、60~99.5%、60~100%、65~70%、65~75%、65~80%、65~85%、65~90%、65~95%、65~99%、65~99.5%、65~100%、70~75%、70~80%、70~85%、70~90%、70~95%、70~99%、70~99.5%、70~100%、75~80%、75~85%、75~90%、75~95%、75~99%、75~99.5%、75~100%、80~85%、80~90%、80~95%、80~99%、80~99.5%、80~100%、85~90%、85~95%、85~99%、85~99.5%、85~100%、90~95%、90~99%、90~99.5%、90~100%、95~99%、95~

99.5%、95~100%、99~99.5%、99~100%または99.5~100%であり得る。非限定的な例として、ガイド鎖による標的ノックダウン(KD)は70%より高い。非限定的な例として、ガイド鎖による標的ノックダウン(KD)は60%より高い。

【0201】

特定の実施形態において、siRNA分子の送達に由来する最も高いノックダウンは、注射部位の周囲で見られる。

特定の実施形態において、ノックダウンは、siRNA分子の送達後、前角でおよび注射部位の周囲で見られる。

【0202】

特定の実施形態において、siRNA二重鎖は、センス配列またはアンチセンス配列について、目的の遺伝子ではない配列に対するmiRNAシードマッチがないように設計される。

【0203】

特定の実施形態において、最も近いオフターゲットに対するガイド鎖のIC₅₀は、オンターゲット遺伝子に対するガイド鎖のIC₅₀の100倍よりも高い。非限定的な例として、最も近いオフターゲットに対するガイド鎖のIC₅₀が標的に対するガイド鎖のIC₅₀の100倍よりも高い場合、そのsiRNA分子は、インビトロでの目的の遺伝子の阻害に高いガイド鎖選択性を有すると言われる。

【0204】

特定の実施形態において、ガイド鎖の5'プロセッシングは、インビトロまたはインビボで少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%の確率で5'末端に正しい開始(n)を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の5'プロセッシングは正確であり、インビトロで少なくとも99%の確率で5'末端に正しい開始(n)を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の5'プロセッシングは正確であり、インビボで少なくとも99%の確率で5'末端に正しい開始(n)を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の5'プロセッシングは正確であり、インビトロで少なくとも90%の確率で5'末端に正しい開始(n)を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の5'プロセッシングは正確であり、インビボで少なくとも90%の確率で5'末端に正しい開始(n)を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の5'プロセッシングは正確であり、インビトロで少なくとも85%の確率で5'末端に正しい開始(n)を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の5'プロセッシングは正確であり、インビボで少なくとも85%の確率で5'末端に正しい開始(n)を有する。

【0205】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖(G:P)(アンチセンス鎖対センス鎖とも称される)の発現比は、インビトロまたはインビボで1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1;1、2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、または99:1である。ガイド対パッセンジャー比とは、pri-miRNAの細胞内プロセッシング後のガイド鎖対パッセンジャー鎖の比を指す。例えば、

10

20

30

40

50

80：20のガイド対パッセンジャー比であれば、前駆体からプロセシングされるパッセンジャー鎖2つにつき8つのガイド鎖を有し得る。非限定的な例として、ガイド鎖対パッセンジャー鎖比はインビトロで8：2である。非限定的な例として、ガイド鎖対パッセンジャー鎖比はインビボで8：2である。非限定的な例として、ガイド鎖対パッセンジャー鎖比はインビトロで9：1である。非限定的な例として、ガイド鎖対パッセンジャー鎖比はインビボで9：1である。

【0206】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）比は、1～99、1.3～99、5～99、10～99、15～99、20～99、25～99、30～99、35～99、40～99、45～99、50～99、55～99、60～99、65～99、70～99、75～99、80～99、85～99、90～99、95～99、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、1～35、1～40、1～45、1～50、1～55、1～60、1～65、1～70、1～75、1～80、1～85、1～90、1～95、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、5～35、5～40、5～45、5～50、5～55、5～60、5～65、5～70、5～75、5～80、5～85、5～90、5～95、10～15、10～20、10～25、10～30、10～35、10～40、10～45、10～50、10～55、10～60、10～65、10～70、10～75、10～80、10～85、10～90、10～95、15～20、15～25、15～30、15～35、15～40、15～45、15～50、15～55、15～60、15～65、15～70、15～75、15～80、15～85、15～90、15～95、20～25、20～30、20～35、20～40、20～45、20～50、20～55、20～60、20～65、20～70、20～75、20～80、20～85、20～90、20～95、25～30、25～35、25～40、25～45、25～50、25～55、25～60、25～65、25～70、25～75、25～80、25～85、25～90、25～95、30～35、30～40、30～45、30～50、30～55、30～60、30～65、30～70、30～75、30～80、30～85、30～90、30～95、35～40、35～45、35～50、35～55、35～60、35～65、35～70、35～75、35～80、35～85、35～90、35～95、40～45、40～50、40～55、40～60、40～65、40～70、40～75、40～80、40～85、40～90、40～95、45～50、45～55、45～60、45～65、45～70、45～75、45～80、45～85、45～90、45～95、50～55、50～60、50～65、50～70、50～75、50～80、50～85、50～90、50～95、55～60、55～65、55～70、55～75、55～80、55～85、55～90、55～95、60～65、60～70、60～75、60～80、60～85、60～90、60～95、65～70、65～75、65～80、65～85、65～90、65～95、70～75、70～80、70～85、70～90、70～95、75～80、75～85、75～90、75～95、80～85、80～90、80～95、85～90、85～95、または90～95の範囲である。非限定的な例として、ガイド鎖対パッセンジャー鎖比は、1.3～99の範囲である。非限定的な例として、ガイド鎖対パッセンジャー鎖比は、10～99の範囲である。

【0207】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）比は、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、30.5、31、31.5、32、32.5、33、33.5、34、34.5、35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、

5、46、46.5、47、47.5、48、48.5、49、49.5、50、50.5、51、51.5、52、52.5、53、53.5、54、54.5、55、55.5、56、56.5、57、57.5、58、58.5、59、59.5、60、60.5、61、61.5、62、62.5、63、63.5、64、64.5、65、65.5、66、66.5、67、67.5、68、68.5、69、69.5、70、70.5、71、71.5、72、72.5、73、73.5、74、74.5、75、75.5、76、76.5、77、77.5、78、78.5、79、79.5、80、80.5、81、81.5、82、82.5、83、83.5、84、84.5、85、85.5、86、86.5、87、87.5、88、88.5、89、89.5、90、90.5、91、91.5、92、92.5、93、93.5、94、94.5、95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、または99である。非限定的な例として、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）比は11.5である。非限定的な例として、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）比は、99である。

10

【0208】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は1より大きい。

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は2より大きい。

【0209】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は5より大きい。

20

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は10より大きい。

【0210】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は20より大きい。

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は50より大きい。

【0211】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は300より大きい。

30

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は314である。

【0212】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は400より大きい。

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は434である。

【0213】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は少なくとも3：1である。

40

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は少なくとも5：1である。

【0214】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は少なくとも10：1である。

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対センス鎖とも称される）の発現比は少なくとも20：1である。

【0215】

特定の実施形態において、ガイド鎖対パッセンジャー鎖（G：P）（アンチセンス鎖対

50

センス鎖とも称される)の発現比は少なくとも50:1である。

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖(P:G)(センス鎖対アンチセンス鎖とも称される)の発現比は、インビトロまたはインビボで1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1;1、2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、または99:1である。パッセンジャー対ガイド比とは、*primicroRNA*の細胞内プロセシング後の、ガイド鎖に対するパッセンジャー鎖の比を指す。例えば、80:20のパッセンジャー対ガイド比であれば、前駆体からプロセシングされるガイド鎖2つにつき8つのパッセンジャー鎖を有し得る。非限定的な例として、パッセンジャー鎖対ガイド鎖比はインビトロで80:20である。非限定的な例として、パッセンジャー鎖対ガイド鎖比はインビボで80:20である。非限定的な例として、パッセンジャー鎖対ガイド鎖比はインビトロで8:2である。非限定的な例として、パッセンジャー鎖対ガイド鎖比はインビボで8:2である。非限定的な例として、パッセンジャー鎖対ガイド鎖比はインビトロで9:1である。非限定的な例として、パッセンジャー鎖対ガイド鎖比はインビボで9:1である。

【0216】

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖(P:G)比は、1~99、1.3~99、5~99、10~99、15~99、20~99、25~99、30~99、35~99、40~99、45~99、50~99、55~99、60~99、65~99、70~99、75~99、80~99、85~99、90~99、95~99、1~10、1~15、1~20、1~25、1~30、1~35、1~40、1~45、1~50、1~55、1~60、1~65、1~70、1~75、1~80、1~85、1~90、1~95、5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、5~40、5~45、5~50、5~55、5~60、5~65、5~70、5~75、5~80、5~85、5~90、5~95、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、10~40、10~45、10~50、10~55、10~60、10~65、10~70、10~75、10~80、10~85、10~90、10~95、15~20、15~25、15~30、15~35、15~40、15~45、15~50、15~55、15~60、15~65、15~70、15~75、15~80、15~85、15~90、15~95、20~25、20~30、20~35、20~40、20~45、20~50、20~55、20~60、20~65、20~70、20~75、20~80、20~85、20~90、20~95、25~30、25~35、25~40、25~45、25~50、25~55、25~60、25~65、25~70、25~75、25~80、25~85、25~90、25~95、30~35、30~40、30~45、30~50、30~55、30~60、30~65、30~70、30~75、30~80、30~85、30~90、30~95、35~40、35~45、35~50、35~55、35~60、35~65、35~70、35~75、35~80、35~85、35~90、35~95、40~45、40~50、40~55、40~60、40~65、40~70、40~75、40~80、40~85、40~90

、40～95、45～50、45～55、45～60、45～65、45～70、45～75、45～80、45～85、45～90、45～95、50～55、50～60、50～65、50～70、50～75、50～80、50～85、50～90、50～95、55～60、55～65、55～70、55～75、55～80、55～85、55～90、55～95、60～65、60～70、60～75、60～80、60～85、60～90、60～95、65～70、65～75、65～80、65～85、65～90、65～95、70～75、70～80、70～85、70～90、70～95、75～80、75～85、75～90、75～95、80～85、80～90、80～95、85～90、85～95、または90～95の範囲である。

【0217】

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）比は、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、30.5、31、31.5、32、32.5、33、33.5、34、34.5、35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、46、46.5、47、47.5、48、48.5、49、49.5、50、50.5、51、51.5、52、52.5、53、53.5、54、54.5、55、55.5、56、56.5、57、57.5、58、58.5、59、59.5、60、60.5、61、61.5、62、62.5、63、63.5、64、64.5、65、65.5、66、66.5、67、67.5、68、68.5、69、69.5、70、70.5、71、71.5、72、72.5、73、73.5、74、74.5、75、75.5、76、76.5、77、77.5、78、78.5、79、79.5、80、80.5、81、81.5、82、82.5、83、83.5、84、84.5、85、85.5、86、86.5、87、87.5、88、88.5、89、89.5、90、90.5、91、91.5、92、92.5、93、93.5、94、94.5、95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、または99である。

【0218】

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は1より大きい。

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は2より大きい。

【0219】

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は5より大きい。

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は10より大きい。

【0220】

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は20より大きい。

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は50より大きい。

【0221】

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は少なくとも3：1である。

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は少なくとも5：1である。

【0222】

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は少なくとも10：1である。

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は少なくとも20：1である。

【0223】

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖対ガイド鎖（P：G）（センス鎖対アンチセンス鎖とも称される）の発現比は少なくとも50：1である。

特定の実施形態において、パッセンジャー鎖ーガイド鎖二重鎖は、*pre-micro*または*pre-microRNA*が、しかし当該技術分野において公知のおよび本明細書に記載される方法、プロセッシングを測定したとき2倍より高いガイド鎖対パッセンジャー鎖比を示す場合に有効と見なされる。非限定的な例として、*pre-micro*または*pre-microRNA*は、プロセッシングを測定したとき、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍より高い、または2～5倍、2～10倍、2～15倍、3～5倍、3～10倍、3～15倍、4～5倍、4～10倍、4～15倍、5～10倍、5～15倍、6～10倍、6～15倍、7～10倍、7～15倍、8～10倍、8～15倍、9～10倍、9～15倍、10～15倍、11～15倍、12～15倍、13～15倍、または14～15倍のガイド鎖対パッセンジャー鎖比を示す。

【0224】

特定の実施形態において、*dsRNA*をコードするベクターゲノムは、コンストラクトの完全長の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99%超である配列を含む。非限定的な例として、ベクターゲノムは、コンストラクトの完全長配列の少なくとも80%である配列を含む。

【0225】

特定の実施形態において、*siRNA*分子を使用して、目的の遺伝子配列上の少なくとも1つのエクソンを標的とすることにより、目的の遺伝子の野生型または突然変異バージョンをサイレンシングすることができる。エクソンは、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、エクソン12、エクソン13、エクソン14、エクソン15、エクソン16、エクソン17、エクソン18、エクソン19、エクソン20、エクソン21、エクソン22、エクソン23、エクソン24、エクソン25、エクソン26、エクソン27、エクソン28、エクソン29、エクソン30、エクソン31、エクソン32、エクソン33、エクソン34、エクソン35、エクソン36、エクソン37、エクソン38、エクソン39、エクソン40、エクソン41、エクソン42、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン47、エクソン48、エクソン49、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、エクソン54、エクソン55、エクソン56、エクソン57、エクソン58、エクソン59、エクソン60、エクソン61、エクソン62、エクソン63、エクソン64、エクソン65、エクソン66、および／またはエクソン67であってもよい。

【0226】

SOD1遺伝子を標的とする*siRNA*二重鎖の設計および配列

本開示は、SOD1遺伝子発現および／またはSOD1タンパク質産生に干渉するためSOD1 mRNAを標的とする低分子干渉RNA（*siRNA*）二重鎖（およびそれらをコードする調節性ポリヌクレオチド）を提供する。

【0227】

本開示のコード化*siRNA*二重鎖は、共にハイブリダイズして二重鎖構造を形成するアンチセンス鎖とセンス鎖とを含有し、ここでアンチセンス鎖は、標的SOD1遺伝子の核酸配列に相補的であり、センス鎖は標的SOD1遺伝子の核酸配列に相同である。一部の態様において、アンチセンス鎖の5'末端は5'リン酸基を有し、センス鎖の3'末端は3'ヒドロキシル基を含有する。他の態様において、各鎖の3'末端にはヌクレオチドオーバーハ

10

20

30

40

50

ングがない、1つある、または2つある。

【0228】

当該技術分野では、s i R N Aの設計に関して幾つかの指針が提案されている。これらの指針は、概して、サイレンシングしようとする遺伝子中の領域を標的とする19ヌクレオチド二重鎖形成領域、対称2〜3ヌクレオチド3'オーバハング、5'-リン酸基および3'-ヒドロキシル基を作成することを推奨している。s i R N A配列の好ましさを左右し得る他の規則としては、限定はされないが、(i) アンチセンス鎖の5'末端におけるA/U；(ii) センス鎖の5'末端におけるG/C；(iii) アンチセンス鎖の5'端側3分の1にある少なくとも5個のA/U残基；および(iv) 9ヌクレオチド長より長いかなるGCストレッチも存在しないことが挙げられる。標的遺伝子の具体的な配列と合わせて、かかる考慮点に従い、S O D 1遺伝子発現の抑制に不可欠な極めて有効なs i R N A分子を容易に設計し得る。

10

【0229】

本開示によれば、S O D 1遺伝子を標的とするs i R N A分子（例えば、s i R N A二重鎖またはコード化d s R N A）が設計される。かかるs i R N A分子は、特異的にS O D 1遺伝子発現およびタンパク質産生を抑制することができる。一部の態様において、s i R N A分子は、細胞のS O D 1遺伝子変異体、すなわちA L S疾患を有する患者に同定される突然変異型S O D 1転写物を選択的に「ノックアウト」するように設計および使用される。一部の態様において、s i R N A分子は、細胞のS O D 1遺伝子変異体を選択的に「ノックダウン」するように設計および使用される。他の態様において、s i R N A分子は、野生型および突然変異型の両方のS O D 1遺伝子を阻害または抑制することが可能である。

20

【0230】

特定の実施形態において、本開示のs i R N A分子は、両方の鎖が共にハイブリダイズして二重鎖構造を形成するセンス鎖と相補的アンチセンス鎖とを含む。アンチセンス鎖は標的的特異的R N A iを導くのに十分な、S O D 1 m R N A配列との相補性を有し、すなわちs i R N A分子は、R N A i機構または過程による標的m R N Aの破壊を惹起するのに十分な配列を有する。

【0231】

特定の実施形態において、本開示のs i R N A分子は、両方の鎖が共にハイブリダイズして二重鎖構造を形成するセンス鎖と相補的アンチセンス鎖とを含み、ここでS O D 1 m R N Aとのハイブリダイゼーションの開始部位は、S O D 1 m R N A配列上のヌクレオチド15〜1000である。非限定的な例として、開始部位は、S O D 1 m R N A配列上のヌクレオチド15〜25、15〜50、15〜75、15〜100、100〜150、150〜200、200〜250、250〜300、300〜350、350〜400、400〜450、450〜500、500〜550、550〜600、600〜650、650〜700、700〜750、750〜800、800〜850、850〜900、900〜950および950〜1000であってもよい。更に別の非限定的な例として、開始部位は、S O D 1 m R N A配列上のヌクレオチド26、27、28、29、30、32、33、34、35、36、37、74、76、77、78、149、153、157、160、177、192、193、195、196、197、198、199、206、209、210、239、241、261、263、264、268、269、276、278、281、284、290、291、295、296、316、317、329、330、337、350、351、352、354、357、358、364、375、378、383、384、390、392、395、404、406、417、418、469、470、475、476、480、487、494、496、497、501、504、515、518、522、523、524、552、554、555、562、576、577、578、579、581、583、584、585、587、588、589、593、594、595、596、597、598、599、602、607、608、609、610、611、612、613、616、621、633、6

30

40

50

35、636、639、640、641、642、643、644、645、654、660、661、666、667、668、669、673、677、692、698、699、700、701、706、749、770、772、775、781、800、804、819、829、832、833、851、854、855、857、858、859、861、869、891、892、906、907、912、913、934、944、および947であってもよい。

【0232】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖と標的SOD1 mRNA配列とは100%の相補性を有する。アンチセンス鎖は標的SOD1 mRNA配列の任意の一部と相補的であってもよい。

【0233】

他の実施形態において、アンチセンス鎖と標的SOD1 mRNA配列とは少なくとも1つのミスマッチを含む。非限定的な例として、アンチセンス鎖と標的SOD1 mRNA配列とは、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~99%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~99%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~99%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~99%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~99%、70~80%、70~90%、70~95%、70~99%、80~90%、80~95%、80~99%、90~95%、90~99%または95~99%の相補性を有する。

【0234】

特定の実施形態において、SOD1を標的とするsiRNAまたはdsRNAは、互いに相補的な少なくとも2つの配列を含む。

本開示によれば、SOD1を標的とするsiRNA分子は長さが約10~50ヌクレオチドまたはそれ以上であり、すなわち、各鎖が10~50ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を含む。好ましくは、siRNA分子は長さが各鎖約15~30、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドであり、ここで鎖の一方は標的領域と十分に相補的である。特定の実施形態において、siRNA分子の各鎖は長さが約19~25、19~24または19~21ヌクレオチドである。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、19ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、20ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、21ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、22ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、23ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、24ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも一方の鎖は、25ヌクレオチド長である。

【0235】

一部の実施形態において、SOD1を標的とする本開示のsiRNA分子は、約19ヌクレオチド~約25ヌクレオチド、および3'末端に2オーバーハングヌクレオチドを含む合成RNA二重鎖であり得る。一部の態様において、siRNA分子は非修飾RNA分子であってもよい。他の態様において、siRNA分子は、塩基、糖または骨格修飾などの少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含有し得る。

【0236】

特定の実施形態において、SOD1を標的とする本開示のsiRNA分子は、限定はされないが、表2のアンチセンス（ガイド）配列またはそれらの断片もしくは変異体などのヌクレオチド配列を含み得る。非限定的な例として、本開示のsiRNA分子に使用されるアンチセンス配列は、表2のヌクレオチド配列の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~99%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~99%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~99%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~99%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~99%、70~80%、70~90%、70~95%、70~99%、80~90%、80~95%、80~99%、90~95%、90~99%または95~99%である。別の非限定的な例として、本開示のsiRNA分子に使用されるアンチセンス配列は、表2のヌクレオチド配列の少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または21超の連続ヌクレオチドを含む。更に別の非限定的な例として、本開示のsiRNA分子に使用されるアンチセンス配列は、表2の配列のヌクレオチド1~22、1~21、1~20、1~19、1~18、1~17、1~16、1~15、1~14、1~13、1~12、1~11、1~10、1~9、1~8、2~22、2~21、2~20、2~19、2~18、2~17、2~16、2~15、2~14、2~13、2~12、2~11、2~10、2~9、2~8、3~22、3~21、3~20、3~19、3~18、3~17、3~16、3~15、3~14、3~13、3~12、3~11、3~10、3~9、3~8、4~22、4~21、4~20、4~19、4~18、4~17、4~16、4~15、4~14、4~13、4~12、4~11、4~10、4~9、4~8、5~22、5~21、5~20、5~19、5~18、5~17、5~16、5~15、5~14、5~13、5~12、5~11、5~10、5~9、5~8、6~22、6~21、6~20、6~19、6~18、6~17、6~16、6~15、6~14、6~13、6~12、6~11、6~10、7~22、7~21、7~20、7~19、7~18、7~17、7~16、7~15、7~14、7~13、7~12、8~22、8~21、8~20、8~19、8~18、8~17、8~16、8~15、8~14、8~13、8~12、9~22、9~21、9~20、9~19、9~18、9~17、9~16、9~15、9~14、10~22、10~21、10~20、10~19、10~18、10~17、10~16、10~15、10~14、11~22、11~21、11~20、11~19、11~18、11~17、11~16、11~15、11~14、12~22、12~21、12~20、12~19、12~18、12~17、12~16、13~22、13~21、13~20、13~19、13~18、13~17、13~16、14~22、14~21、14~20、14~19、14~18、14~17、15~22、15~21、15~20、15~19、15~18、16~22、16~21、16~20、17~22、17~21、または18~22を含む。

【0237】

【表2】

表2. アンチセンス配列

アンチセンスID	配列	配列番号
A-4002	UAUUAAGUGAGGACCUGCUU	1

特定の実施形態において、SOD1を標的とする本開示のsiRNA分子は、限定はさ

れないが、表3のセンス（パッセンジャー）配列またはそれらの断片もしくは変異体などのヌクレオチド配列を含み得る。非限定的な例として、本開示の*s i R N A*分子に使用されるセンス配列は、表3のヌクレオチド配列の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~99%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~99%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~99%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~99%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~99%、70~80%、70~90%、70~95%、70~99%、80~90%、80~95%、80~99%、90~95%、90~99%または95~99%である。別の非限定的な例として、本開示の*s i R N A*分子に使用されるセンス配列は、表3のヌクレオチド配列の少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または21超の連続ヌクレオチドを含む。更に別の非限定的な例として、本開示の*s i R N A*分子に使用されるセンス配列は、表3の配列のヌクレオチド1~22、1~21、1~20、1~19、1~18、1~17、1~16、1~15、1~14、1~13、1~12、1~11、1~10、1~9、1~8、2~22、2~21、2~20、2~19、2~18、2~17、2~16、2~15、2~14、2~13、2~12、2~11、2~10、2~9、2~8、3~22、3~21、3~20、3~19、3~18、3~17、3~16、3~15、3~14、3~13、3~12、3~11、3~10、3~9、3~8、4~22、4~21、4~20、4~19、4~18、4~17、4~16、4~15、4~14、4~13、4~12、4~11、4~10、4~9、4~8、5~22、5~21、5~20、5~19、5~18、5~17、5~16、5~15、5~14、5~13、5~12、5~11、5~10、5~9、5~8、6~22、6~21、6~20、6~19、6~18、6~17、6~16、6~15、6~14、6~13、6~12、6~11、6~10、7~22、7~21、7~20、7~19、7~18、7~17、7~16、7~15、7~14、7~13、7~12、8~22、8~21、8~20、8~19、8~18、8~17、8~16、8~15、8~14、8~13、8~12、9~22、9~21、9~20、9~19、9~18、9~17、9~16、9~15、9~14、10~22、10~21、10~20、10~19、10~18、10~17、10~16、10~15、10~14、11~22、11~21、11~20、11~19、11~18、11~17、11~16、11~15、11~14、12~22、12~21、12~20、12~19、12~18、12~17、12~16、13~22、13~21、13~20、13~19、13~18、13~17、13~16、14~22、14~21、14~20、14~19、14~18、14~17、15~22、15~21、15~20、15~19、15~18、16~22、16~21、16~20、17~22、17~21、または18~22を含む。

【0238】

【表3】

表3. センス配列

センスID	配列	配列番号
S-4003	GCAGGUCCUCACUUUAAUGCU	2

特定の実施形態において、*S O D 1*を標的とする本開示の*s i R N A*分子は、表2からのアンチセンス配列および表3からのセンス配列、またはそれらの断片もしくは変異体を

含み得る。非限定的な例として、アンチセンス配列およびセンス配列は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~99%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~99%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~99%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~99%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~99%、70~80%、70~90%、70~95%、70~99%、80~90%、80~95%、80~99%、90~95%、90~99%または95~99%の相補性を有する。

【0239】

特定の実施形態において、SOD1を標的とする本開示のsiRNA分子は、表4に記載されるとおりのセンスおよびアンチセンスsiRNA二重鎖を含み得る。非限定的な例として、これらのsiRNA二重鎖は、内因性SOD1遺伝子発現に対するインビトロ阻害活性に関して試験されてもよい。

【0240】

【表4】

表4. SOD1 dsRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖配列

siRNA 二重鎖 ID	SS ID	センス鎖配列 (5'-3')	SS 配列ID	AS ID	アンチセンス鎖配列 (5'-3')	AS 配列ID
D-4012	S-4003	GCAGGUCCUCAC UUUAAUGCU	2	A-4002	UAUUAAAGUGA GGACCUGCUU	1

他の実施形態において、SOD1を標的とする本開示のsiRNA分子は、細胞への送達用のプラスミドベクター、AAV粒子、ウイルスゲノムまたは他の核酸発現ベクターにコードすることができる。

【0241】

DNA発現プラスミドを使用して、SOD1を標的とする本開示のsiRNA二重鎖またはdsRNAを細胞内で安定的に発現させ、標的遺伝子発現の長期阻害を実現することができる。一態様において、siRNA二重鎖のセンス鎖とアンチセンス鎖とは、典型的には、短いスペーサ配列によって連結され、低分子ヘアピンRNA (shRNA) と呼ばれるステムループ構造の発現をもたらす。ヘアピンはダイサーによって認識および切断され、そのようにして成熟siRNA分子が生じる。

【0242】

本開示によれば、SOD1 mRNAを標的とするsiRNA分子をコードする核酸を含むAAV粒子が産生され、AAV血清型は、本明細書に挙げられる血清型のいずれであってもよい。AAV血清型の非限定的な例としては、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A、および／またはAAV-PHP.B、AAV-PHP.B2、AAV-PHP.B3、AAV-PHP.N/PHP.B-DGT、AAV-PHP.B-EST、AAV-PHP.B-GGT、AAV-PHP.B-ATP、AAV-PHP.B-ATT-T、AAV-PHP.B-DGT-T、AAV-PHP.B-GGT-T、AAV-PHP.B-SGS、AAV-PHP.B-AQP、AAV-PHP.B-QQP、AAV-PHP.B-SNP(3)、AAV-PHP.B-SNP、AAV-PHP.B-QGT、AAV-PHP.B-NQT、AAV-PHP.B-EGS、AAV-PHP.

B-SGN、AAVPHP、B-EGT、AAVPHP、B-DST、AAVPHP、B-DST、AAVPHP、B-STP、AAVPHP、B-PQP、AAVPHP、B-SQP、AAVPHP、B-QLP、AAVPHP、B-TMP、AAVPHP、B-TTP、AAVPHP、S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5およびそれらのバリエーションが挙げられる。

【0243】

一部の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、SOD1 mRNA を抑制（または分解）する。したがって、本 siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA を使用して、細胞における SOD1 遺伝子発現を実質的に阻害することができる。一部の態様において、SOD1 遺伝子発現の阻害とは、少なくとも約 20%、好ましくは少なくとも約 30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% および 100%、または少なくとも 20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100% または 95~100% の阻害を指す。したがって、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約 20%、好ましくは少なくとも約 30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% および 100%、または少なくとも 20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100% または 95~100% 阻害され得る。

【0244】

本開示によれば、siRNA 分子は、培養細胞での SOD1 mRNA レベルを低下させるように設計され、それらの能力に関して試験される。かかる siRNA 分子は、限定はされないが、表 4 に挙げられるものなどが挙げられ、二重鎖を形成し得る。非限定的な例として、siRNA 二重鎖は siRNA 二重鎖 ID: D-4012 であってもよい。

【0245】

特定の実施形態において、siRNA 分子は、ガイド鎖に位置する SOD1 に対する miRNA シードマッチを含む。別の実施形態において、siRNA 分子は、パッセンジャー鎖に位置する SOD1 に対する miRNA シードマッチを含む。更に別の実施形態において、SOD1 遺伝子を標的とする siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖に位置する SOD1 に対するシードマッチを含まない。

【0246】

特定の実施形態において、SOD1 遺伝子を標的とする siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、ガイド鎖について有意な完全長オフターゲット効果をほぼ有しないものであり得る。別の実施形態において、SOD1 遺伝子を標的とする siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、パッセンジャー鎖について有意な完全長オフターゲット効果をほぼ有しないものであり得る。SOD1 遺伝子を標的とする siRNA 二重鎖またはコード化 dsRNA は、パッセンジャー鎖について 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、

30%、35%、40%、45%、50%、1~5%、2~6%、3~7%、4~8%、5~9%、5~10%、6~10%、5~15%、5~20%、5~25%、5~30%、10~20%、10~30%、10~40%、10~50%、15~30%、15~40%、15~45%、20~40%、20~50%、25~50%、30~40%、30~50%、35~50%、40~50%、45~50%未満の完全長オフターゲット効果を有し得る。更に別の実施形態において、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖またはコード化dsRNAは、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖について有意な完全長オフターゲットをほぼ有しないものであり得る。SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖またはコード化dsRNAは、ガイド鎖またはパッセンジャー鎖について、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1~5%、2~6%、3~7%、4~8%、5~9%、5~10%、6~10%、5~15%、5~20%、5~25%、5~30%、10~20%、10~30%、10~40%、10~50%、15~30%、15~40%、15~45%、20~40%、20~50%、25~50%、30~40%、30~50%、35~50%、40~50%、45~50%未満の完全長オフターゲット効果を有し得る。

【0247】

特定の実施形態において、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖またはコード化dsRNAは、インビトロで高い活性を有し得る。別の実施形態において、siRNA分子は、インビトロで低い活性を有し得る。更に別の実施形態において、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖またはdsRNAは、インビトロで高いガイド鎖活性および低いパッセンジャー鎖活性を有し得る。

【0248】

特定の実施形態において、SOD1を標的とするsiRNA分子はインビトロで高いガイド鎖活性および低いパッセンジャー鎖活性を有する。ガイド鎖による標的ノックダウン(KD)は、少なくとも40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%または100%であり得る。ガイド鎖による標的ノックダウンは、40~50%、45~50%、50~55%、50~60%、60~65%、60~70%、60~75%、60~80%、60~85%、60~90%、60~95%、60~99%、60~99.5%、60~100%、65~70%、65~75%、65~80%、65~85%、65~90%、65~95%、65~99%、65~99.5%、65~100%、70~75%、70~80%、70~85%、70~90%、70~95%、70~99%、70~99.5%、70~100%、75~80%、75~85%、75~90%、75~95%、75~99%、75~99.5%、75~100%、80~85%、80~90%、80~95%、80~99%、80~99.5%、80~100%、85~90%、85~95%、85~99%、85~99.5%、85~100%、90~95%、90~99%、90~99.5%、90~100%、95~99%、95~99.5%、95~100%、99~99.5%、99~100%または99.5~100%であり得る。非限定的な例として、ガイド鎖による標的ノックダウン(KD)は、70%よりも大きい。非限定的な例として、ガイド鎖による標的ノックダウン(KD)は、60%よりも大きい。

【0249】

特定の実施形態において、siRNA二重鎖標的SOD1は、センス配列またはアンチセンス配列について非SOD1配列に対するmiRNAシードマッチがないように設計される。

【0250】

特定の実施形態において、最も近いオフターゲットに対する、SOD1を標的とするsiRNA二重鎖のガイド鎖のIC₅₀は、オンターゲット遺伝子、SOD1に対するガイド鎖のIC₅₀の100倍よりも高い。非限定的な例として、最も近いオフターゲットに対するガイド鎖のIC₅₀が標的に対するガイド鎖のIC₅₀の100倍よりも高い場合、

その s i R N A 分子は、インビトロでの S O D 1 の阻害に高いガイド鎖選択性を有すると
言われる。

【 0 2 5 1 】

特定の実施形態において、S O D 1 を標的とする s i R N A 二重鎖のガイド鎖の 5 ' プロ
セシングは、インビトロまたはインビボで、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %
、9 5 %、9 9 % または 1 0 0 % の確率で 5 ' 末端に正しい開始 (n) を有する。非限定的
な例として、ガイド鎖の 5 ' プロセシングは正確であり、インビトロで少なくとも 9 9 % の
確率で 5 ' 末端に正しい開始 (n) を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の 5 ' プロセ
シングは正確であり、インビボで少なくとも 9 9 % の確率で 5 ' 末端に正しい開始 (n) を
有する。非限定的な例として、ガイド鎖の 5 ' プロセシングは正確であり、インビトロで少
なくとも 9 0 % の確率で 5 ' 末端に正しい開始 (n) を有する。非限定的な例として、ガイ
ド鎖の 5 ' プロセシングは正確であり、インビボで少なくとも 9 0 % の確率で 5 ' 末端に正
しい開始 (n) を有する。非限定的な例として、ガイド鎖の 5 ' プロセシングは正確であり
、インビトロで少なくとも 8 5 % の確率で 5 ' 末端に正しい開始 (n) を有する。非限定的
な例として、ガイド鎖の 5 ' プロセシングは正確であり、インビボで少なくとも 8 5 % の確
率で 5 ' 末端に正しい開始 (n) を有する。

10

【 0 2 5 2 】

特定の実施形態において、S O D 1 を標的とする s i R N A 二重鎖のガイド鎖の 5 ' プロ
セシングは、7 5 ~ 9 5 %、7 5 ~ 9 0 %、7 5 ~ 8 5 %、7 5 ~ 8 0 %、8 0 ~ 9 5 %
、8 0 ~ 9 0 %、8 0 ~ 8 5 %、8 5 ~ 9 5 %、8 5 ~ 9 0 %、または 9 0 ~ 9 5 % の範
囲の 5 ' 末端に正しい開始 (n) を有する。非限定的な例として、S O D 1 を標的とする s
i R N A 二重鎖のガイド鎖の 5 ' プロセシングは、7 5 ~ 9 5 % の範囲の 5 ' 末端に正しい
開始 (n) を有する。

20

【 0 2 5 3 】

特定の実施形態において、S O D 1 を標的とする s i R N A 二重鎖のガイド鎖の 5 ' プロ
セシングは、発現されたコンストラクトの 7 5 %、7 5 . 1 %、7 5 . 2 %、7 5 . 3 %
、7 5 . 4 %、7 5 . 5 %、7 5 . 6 %、7 5 . 7 %、7 5 . 8 %、7 5 . 9 %、7 6 %
、7 6 . 1 %、7 6 . 2 %、7 6 . 3 %、7 6 . 4 %、7 6 . 5 %、7 6 . 6 %、7 6 .
7 %、7 6 . 8 %、7 6 . 9 %、7 7 %、7 7 . 1 %、7 7 . 2 %、7 7 . 3 %、7 7 .
4 %、7 7 . 5 %、7 7 . 6 %、7 7 . 7 %、7 7 . 8 %、7 7 . 9 %、7 8 %、7 8 .
1 %、7 8 . 2 %、7 8 . 3 %、7 8 . 4 %、7 8 . 5 %、7 8 . 6 %、7 8 . 7 %、7
8 . 8 %、7 8 . 9 %、7 9 %、7 9 . 1 %、7 9 . 2 %、7 9 . 3 %、7 9 . 4 %、7
9 . 5 %、7 9 . 6 %、7 9 . 7 %、7 9 . 8 %、7 9 . 9 %、8 0 %、8 0 . 1 %、8
0 . 2 %、8 0 . 3 %、8 0 . 4 %、8 0 . 5 %、8 0 . 6 %、8 0 . 7 %、8 0 . 8 %
、8 0 . 9 %、8 1 %、8 1 . 1 %、8 1 . 2 %、8 1 . 3 %、8 1 . 4 %、8 1 . 5 %
、8 1 . 6 %、8 1 . 7 %、8 1 . 8 %、8 1 . 9 %、8 2 %、8 2 . 1 %、8 2 . 2 %
、8 2 . 3 %、8 2 . 4 %、8 2 . 5 %、8 2 . 6 %、8 2 . 7 %、8 2 . 8 %、8 2 .
9 %、8 3 %、8 3 . 1 %、8 3 . 2 %、8 3 . 3 %、8 3 . 4 %、8 3 . 5 %、8 3 .
6 %、8 3 . 7 %、8 3 . 8 %、8 3 . 9 %、8 4 %、8 4 . 1 %、8 4 . 2 %、8 4 .
3 %、8 4 . 4 %、8 4 . 5 %、8 4 . 6 %、8 4 . 7 %、8 4 . 8 %、8 4 . 9 %、8
5 %、8 5 . 1 %、8 5 . 2 %、8 5 . 3 %、8 5 . 4 %、8 5 . 5 %、8 5 . 6 %、8
5 . 7 %、8 5 . 8 %、8 5 . 9 %、8 6 %、8 6 . 1 %、8 6 . 2 %、8 6 . 3 %、8
6 . 4 %、8 6 . 5 %、8 6 . 6 %、8 6 . 7 %、8 6 . 8 %、8 6 . 9 %、8 7 %、8
7 . 1 %、8 7 . 2 %、8 7 . 3 %、8 7 . 4 %、8 7 . 5 %、8 7 . 6 %、8 7 . 7 %
、8 7 . 8 %、8 7 . 9 %、8 8 %、8 8 . 1 %、8 8 . 2 %、8 8 . 3 %、8 8 . 4 %
、8 8 . 5 %、8 8 . 6 %、8 8 . 7 %、8 8 . 8 %、8 8 . 9 %、8 9 %、8 9 . 1 %
、8 9 . 2 %、8 9 . 3 %、8 9 . 4 %、8 9 . 5 %、8 9 . 6 %、8 9 . 7 %、8 9 .
8 %、8 9 . 9 %、9 0 %、9 0 . 1 %、9 0 . 2 %、9 0 . 3 %、9 0 . 4 %、9 0 .
5 %、9 0 . 6 %、9 0 . 7 %、9 0 . 8 %、9 0 . 9 %、9 1 %、9 1 . 1 %、9 1 .
2 %、9 1 . 3 %、9 1 . 4 %、9 1 . 5 %、9 1 . 6 %、9 1 . 7 %、9 1 . 8 %、9

30

40

50

1. 9%、92%、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%、92.6%、92.7%、92.8%、92.9%、93%、93.1%、93.2%、93.3%、93.4%、93.5%、93.6%、93.7%、93.8%、93.9%、94%、94.1%、94.2%、94.3%、94.4%、94.5%、94.6%、94.7%、94.8%、94.9%、または95%の5'末端に正しい開始(n)を有する。非限定的な例として、SOD1を標的とするsiRNA二重鎖のガイド鎖の5'プロセッシングは、発現されたコンストラクトの81%の5'末端に正しい開始(n)を有する。非限定的な例として、SOD1を標的とするsiRNA二重鎖のガイド鎖の5'プロセッシングは、発現されたコンストラクトの90%の5'末端に正しい開始(n)を有する。

【0254】

特定の実施形態において、SOD1に対するパッセンジャー鎖-ガイド鎖二重鎖は、pri-microまたはpre-microRNAが、当該技術分野において公知のおよび本明細書に記載される方法により、プロセッシングを測定したとき2倍より高いガイド鎖対パッセンジャー鎖比を示す場合に有効と見なされる。非限定的な例として、pri-microまたはpre-microRNAは、プロセッシングを測定したとき、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍より高い、または2~5倍、2~10倍、2~15倍、3~5倍、3~10倍、3~15倍、4~5倍、4~10倍、4~15倍、5~10倍、5~15倍、6~10倍、6~15倍、7~10倍、7~15倍、8~10倍、8~15倍、9~10倍、9~15倍、10~15倍、11~15倍、12~15倍、13~15倍、または14~15倍のガイド鎖対パッセンジャー鎖比を示す。

【0255】

特定の実施形態において、siRNA分子を使用して、SOD1配列上の少なくとも1つのエクソンを標的とすることにより野生型または突然変異型SOD1をサイレンシングすることができる。エクソンは、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、エクソン12、エクソン13、エクソン14、エクソン15、エクソン16、エクソン17、エクソン18、エクソン19、エクソン20、エクソン21、エクソン22、エクソン23、エクソン24、エクソン25、エクソン26、エクソン27、エクソン28、エクソン29、エクソン30、エクソン31、エクソン32、エクソン33、エクソン34、エクソン35、エクソン36、エクソン37、エクソン38、エクソン39、エクソン40、エクソン41、エクソン42、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン47、エクソン48、エクソン49、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、エクソン54、エクソン55、エクソン56、エクソン57、エクソン58、エクソン59、エクソン60、エクソン61、エクソン62、エクソン63、エクソン64、エクソン65、エクソン66、および/またはエクソン67であってもよい。

【0256】

特定の実施形態において、全内因性miRNAプールのガイド鎖の範囲は、0.001~0.6%、0.005~0.6%、0.01~0.6%、0.015~0.6%、0.02~0.6%、0.025~0.6%、0.03~0.6%、0.035~0.6%、0.04~0.6%、0.045~0.6%、0.05~0.6%、0.055~0.6%、0.06~0.6%、0.065~0.6%、0.07~0.6%、0.075~0.6%、0.08~0.6%、0.085~0.6%、0.09~0.6%、0.095~0.6%、0.1~0.6%、0.15~0.6%、0.2~0.6%、0.25~0.6%、0.3~0.6%、0.35~0.6%、0.4~0.6%、0.45~0.6%、0.5~0.6%、0.55~0.6%、0.001~0.5%、0.005~0.5%、0.01~0.5%、0.015~0.5%、0.02~0.5%、0.025~0.5%、0.03~0.5%、0.035~0.5%、0.04~0.5%、0.045~0.5%、0.05~0.5%、0.055~0.5%、0.06~0.5%、0.

0.065~0.5%、0.07~0.5%、0.075~0.5%、0.08~0.5%、0.085~0.5%、0.09~0.5%、0.095~0.5%、0.1~0.5%、0.15~0.5%、0.2~0.5%、0.25~0.5%、0.3~0.5%、0.35~0.5%、0.4~0.5%、0.45~0.5%、0.001~0.4%、0.005~0.4%、0.01~0.4%、0.015~0.4%、0.02~0.4%、0.025~0.4%、0.03~0.4%、0.035~0.4%、0.04~0.4%、0.045~0.4%、0.05~0.4%、0.055~0.4%、0.06~0.4%、0.065~0.4%、0.07~0.4%、0.075~0.4%、0.08~0.4%、0.085~0.4%、0.09~0.4%、0.095~0.4%、0.1~0.4%、0.15~0.4%、0.2~0.4%、0.25~0.4%、0.3~0.4%、0.35~0.4%、0.001~0.3%、0.005~0.3%、0.01~0.3%、0.015~0.3%、0.02~0.3%、0.025~0.3%、0.03~0.3%、0.035~0.3%、0.04~0.3%、0.045~0.3%、0.05~0.3%、0.055~0.3%、0.06~0.3%、0.065~0.3%、0.07~0.3%、0.075~0.3%、0.08~0.3%、0.085~0.3%、0.09~0.3%、0.095~0.3%、0.1~0.3%、0.15~0.3%、0.2~0.3%、0.25~0.3%、0.001~0.2%、0.005~0.2%、0.01~0.2%、0.015~0.2%、0.02~0.2%、0.025~0.2%、0.03~0.2%、0.035~0.2%、0.04~0.2%、0.045~0.2%、0.05~0.2%、0.055~0.2%、0.06~0.2%、0.065~0.2%、0.07~0.2%、0.075~0.2%、0.08~0.2%、0.085~0.2%、0.09~0.2%、0.095~0.2%、0.1~0.2%、0.15~0.2%、0.001~0.1%、0.005~0.1%、0.01~0.1%、0.015~0.1%、0.02~0.1%、0.025~0.1%、0.03~0.1%、0.035~0.1%、0.04~0.1%、0.045~0.1%、0.05~0.1%、0.055~0.1%、0.06~0.1%、0.065~0.1%、0.07~0.1%、0.075~0.1%、0.08~0.1%、0.085~0.1%、0.09~0.1%、または0.095~0.1%である。非限定的な例として、範囲は0.06~0.6%である。非限定的な例として、範囲は0.4~0.5%である。

【0257】

特定の実施形態において、全内因性miRNAプールに対するガイド鎖のパーセントは、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、または0.6%である。非限定的な例として、パーセントは0.06%である。非限定的な例として、パーセントは0.4%である。非限定的な例として、パーセントは0.5%である。

【0258】

siRNA修飾

一部の実施形態において、本開示のsiRNA分子は、前駆体またはDNAとして送達されるのでない場合、限定はされないがインビボでのsiRNAの安定性の増加など、RNA分子の幾つの特徴を調節するように化学的に修飾されてもよい。化学的に修飾されたsiRNA分子はヒトの治療適用において使用することができ、siRNA分子のRNAi活性を損なうことなく改良される。非限定的な例として、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方の3'末端および5'末端の両方で修飾されたsiRNA分子。

【0259】

一部の態様において、本開示のsiRNA二重鎖は、限定はされないが、糖修飾ヌクレオチド、核酸塩基修飾および／または骨格修飾など、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含み得る。一部の態様において、siRNA分子は、組合せの修飾、例えば組合せの核酸塩基

および骨格修飾を含み得る。

【0260】

特定の実施形態において、修飾ヌクレオチドは糖修飾ヌクレオチドであってもよい。糖修飾ヌクレオチドとしては、限定はされないが、2'-フルオロ、2'-アミノおよび2'-チオ修飾リボヌクレオチド、例えば2'-フルオロ修飾リボヌクレオチドが挙げられる。修飾ヌクレオチドは糖部分、ならびにリボシルでない糖類またはその類似体を有するヌクレオチドが修飾されてもよい。例えば、糖部分は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、および他の糖類、複素環、または炭素環であってもよく、またはそれをベースとしてもよい。

【0261】

特定の実施形態において、修飾ヌクレオチドは核酸塩基修飾ヌクレオチドであってもよい。

特定の実施形態において、修飾ヌクレオチドは骨格修飾ヌクレオチドであってもよい。一部の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖は骨格に他の修飾を更に含み得る。通常の「骨格」は、本明細書で使用されるとき、DNA または RNA 分子における交互に繰り返す糖-リン酸配列を指す。デオキシリボース/リボース糖が3'-ヒドロキシル基および5'-ヒドロキシル基の両方においてエステル結合でリン酸基につながり合わせられ、これは「リン酸ジエステル」結合/リンカーとしても知られる(PO 連結)。PO 骨格は「ホスホロチオエート骨格」として修飾されてもよい(PS 連結)。ある場合には、天然のリン酸ジエステル結合がアミド結合によって置き換えられてもよく、但し2つの糖単位間の4つの原子は保たれる。かかるアミド修飾は、オリゴヌクレオチドの固相合成を促進し、siRNA 相補体と形成された二重鎖の熱力学的安定性を増加させることができる。例えば Mesmaeker et al. (Pure & Appl. Chem., 1997, 3, 437-440) を参照のこと; この内容は全体として参照により本明細書に援用される。

【0262】

修飾塩基とは、1つ以上の原子または基の置換または付加によって修飾された、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、キサンチン、イノシン、およびキユーオシンなどのヌクレオチド塩基を指す。核酸塩基部分に対する修飾の幾つかの例としては、限定はされないが、アルキル化、ハロゲン化、チオール化、アミノ化、アミド化、またはアセチル化塩基が、個別にまたは組合せて挙げられる。より具体的な例としては、例えば、5-プロピニルウリジン、5-プロピニルシチジン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、N, N, -ジメチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-アミノアデニン、1-メチルイノシン、3-メチルウリジン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジンおよび5位に修飾を有する他のヌクレオチド、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ハロシチジン、5-ハロウリジン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、3-メチルシチジン、6-メチルウリジン、2-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2, 2-ジメチルグアノシン、5-メチルアミノエチルウリジン、5-メチルオキシウリジン、デアザヌクレオチド、例えば7-デアザアデノシン、6-アゾウリジン、6-アゾシチジン、6-アゾチミジン、5-メチル-2-チオウリジン、他のチオ塩基、例えば2-チオウリジンおよび4-チオウリジンおよび2-チオシチジン、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、キユーオシン、アーケオシン、ナフチルおよび置換ナフチル基、任意のO-およびN-アルキル化プリンおよびピリミジン、例えばN6-メチルアデノシン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニルおよび修飾フェニル基、例えばアミノフェノールまたは2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、G クランプヌクレオチドとして働く修飾シトシン、8-置換アデニンおよびグアニン、5-置換ウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシルアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、およびアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドが挙げられる。

【0263】

特定の実施形態において、修飾ヌクレオチドはセンス鎖上にだけあってもよい。

別の実施形態において、修飾ヌクレオチドはアンチセンス鎖上にだけあってもよい。

一部の実施形態において、修飾ヌクレオチドはセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方にあってもよい。

【0264】

一部の実施形態において、化学的に修飾されたヌクレオチドは、アンチセンス鎖が標的 mRNA 配列と対を形成する能力に影響を及ぼさない。

特定の実施形態において、本開示の siRNA 分子をコードする核酸配列を含む AAV 粒子は、ポリシストロン性分子である siRNA 分子をコードし得る。加えて siRNA 分子は siRNA 分子の領域間に 1 つ以上のリンカーを含んでもよい。

10

【0265】

分子足場

特定の実施形態において、siRNA 分子は、分子足場もまた含む調節性ポリヌクレオチドにコードされてもよい。本明細書で使用されるとき「分子足場」は、それに対して後続の分子を設計または作製する配列または構造基盤を形成するフレームワークまたは出発分子である。

【0266】

特定の実施形態において、分子足場は少なくとも 1 つの 5' フランキング領域を含む。非限定的な例として、5' フランキング領域は、任意の長さであってよい、かつ全体または一部が野生型 microRNA 配列に由来し得るか、または完全に人工的な配列であり得る 5' フランキング配列を含み得る。

20

【0267】

一部の実施形態において、5' および 3' フランキング配列の一方または両方が存在しない。

一部の実施形態において、5' および 3' フランキング配列は長さが同じである。

【0268】

一部の実施形態において、5' フランキング配列は、1~10ヌクレオチド長であるか、5~15ヌクレオチド長であるか、10~30ヌクレオチド長であるか、20~50ヌクレオチド長であるか、40ヌクレオチド長よりも長いか、50ヌクレオチド長よりも長いか、100ヌクレオチド長よりも長いか、または200ヌクレオチド長よりも長い。

30

【0269】

一部の実施形態において、5' フランキング配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、

40

50

202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、
212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、
222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、
232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、
242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、
252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、
262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、
272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、
282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、
292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、
302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、
312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、
322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、
332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、
342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、
352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、
362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、
372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、
382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、
392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、
402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、
412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、
422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、
432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、
442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、
452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、
462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、
472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、
482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、
492、493、494、495、496、497、498、499、または500ヌク
レオチド長であってもよい。

10

20

30

【0270】

特定の実施形態において、3'フランキング配列は、1～10ヌクレオチド長であるか、5～15ヌクレオチド長であるか、10～30ヌクレオチド長であるか、20～50ヌクレオチド長であるか、40ヌクレオチド長よりも長いか、50ヌクレオチド長よりも長いか、100ヌクレオチド長よりも長いか、または200ヌクレオチド長よりも長い。

【0271】

特定の実施形態において、3'フランキング配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、

40

50

152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、
 162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、
 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、
 182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、
 192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、
 202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、
 212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、
 222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、
 232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、
 242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、
 252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、
 262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、
 272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、
 282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、
 292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、
 302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、
 312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、
 322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、
 332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、
 342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、
 352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、
 362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、
 372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、
 382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、
 392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、
 402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、
 412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、
 422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、
 432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、
 442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、
 452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、
 462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、
 472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、
 482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、
 492、493、494、495、496、497、498、499、または500ヌク
 レオチド長であってもよい。

【0272】

一部の実施形態において、5'および3'フランキンク配列は配列が同じである。一部の
 実施形態において、5'および3'フランキンク配列は、互いにアラインメントさせると、
 2%、3%、4%、5%、10%、20%、または30%超が異なる。

【0273】

特定の実施形態において、分子足場は少なくとも1つの3'フランキンク領域を含む。非
 限定的な例として、3'フランキンク領域は、任意の長さであってもよい、かつ全体または一
 部が野生型microRNA配列に由来し得るか、または完全に人工的な配列であり得る
 3'フランキンク配列を含み得る。

【0274】

特定の実施形態において、分子足場は少なくとも1つのループモチーフ領域を含む。非
 限定的な例として、ループモチーフ領域は、任意の長さであってもよい配列を含み得る。

特定の実施形態において、分子足場は、5'フランキンク領域、ループモチーフ領域およ
 び／または3'フランキンク領域を含む。

10

20

30

40

50

【0275】

特定の実施形態において、本明細書に記載される少なくとも1つの *s i R N A*、*m i R N A* または他の *R N A i* 剤は、少なくとも1つの分子足場もまた含む調節性ポリヌクレオチドによってコードされてもよい。分子足場は、任意の長さであってよい、かつ全体または一部が野生型 *m i c r o R N A* 配列に由来し得るか、または完全に人工的な配列であり得る5'フランキング配列を含み得る。3'フランキング配列はサイズおよび由来の点で5'フランキング配列および／またはある3'フランキング配列を反映し得る。いずれのフランキング配列も存在しないこともある。3'フランキング配列は任意選択で1つ以上のCNNCモチーフ（式中、「N」は任意のヌクレオチドを表す）を含有し得る。

【0276】

ステムループ構造のステムを形成することが、本明細書に記載される少なくとも1つの *s i R N A*、*m i R N A* または他の *R N A i* 剤をコードする調節性ポリヌクレオチドの最低条件（*m i n i m u m*）である。一部の実施形態において、本明細書に記載される *s i R N A*、*m i R N A* または他の *R N A i* 剤は、標的配列に部分的に相補性であるかまたはハイブリダイズすることになる少なくとも1つの核酸配列を含む。一部の実施形態において、ペイロードは *s i R N A* 分子または *s i R N A* 分子の断片である。

【0277】

一部の実施形態において、調節性ポリヌクレオチドのステムループ構造の5'アームは、センス配列をコードする核酸配列を含む。調節性ポリヌクレオチドによってコードされ得るセンス配列、またはその断片もしくは変異体の非限定的な例は表3に記載する。

【0278】

一部の実施形態において、調節性ポリヌクレオチドのステムループの3'アームは、アンチセンス配列をコードする核酸配列を含む。アンチセンス配列は、一部の例では、最も5'側の末端に「G」ヌクレオチドを含む。調節性ポリヌクレオチドによってコードされ得るアンチセンス配列、またはその断片もしくは変異体の非限定的な例は表2に記載する。

【0279】

他の実施形態では、センス配列が調節性ポリヌクレオチドのステムループ構造のステムの3'アームにあってもよく、一方アンチセンス配列が5'アームにある。調節性ポリヌクレオチドによってコードされ得るセンス配列およびアンチセンス配列の非限定的な例は表2および表3に記載する。

【0280】

特定の実施形態において、センス配列とアンチセンス配列とは、それらの長さの実質的な部分にわたって完全に相補的であってもよい。他の実施形態においてセンス配列とアンチセンス配列とは、独立にそれらの鎖の長さの少なくとも50、60、70、80、85、90、95、または99%にわたって少なくとも70、80、90、95または99%相補的であってもよい。

【0281】

センス配列の同一性も、アンチセンス配列の相同性も、標的配列と100%相補的である必要はない。

特定の実施形態において、調節性ポリヌクレオチドのステムループ構造のセンス配列とアンチセンス配列とをループ配列（ループモチーフ、リンカーまたはリンカーモチーフとしても知られる）が分離している。ループ配列は、任意の長さ、4～30ヌクレオチド、4～20ヌクレオチド、4～15ヌクレオチド、5～15ヌクレオチド、6～12ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、および／または15ヌクレオチドであってもよい。

【0282】

一部の実施形態において、ループ配列は、少なくとも1つのUGUGモチーフをコードする核酸配列を含む。一部の実施形態において、UGUGモチーフをコードする核酸配列は、ループ配列の5'末端に位置する。

10

20

30

40

50

【0283】

特定の実施形態において、調節性ポリヌクレオチドには、1つ以上のモジュール（例えば、5'フランキング領域、ループモチーフ領域、3'フランキング領域、センス配列、アンチセンス配列）を互いに分離するスペーサ領域が存在してもよい。かかるスペーサ領域は1つ以上存在してもよい。

【0284】

特定の実施形態において、センス配列とフランキング領域配列との間には、8～20、すなわち、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチドのスペーサ領域が存在してもよい。

【0285】

特定の実施形態において、スペーサ領域の長さは13ヌクレオチドであり、センス配列の5'末端とフランキング配列の3'末端との間に位置する。特定の実施形態において、スペーサは配列の約1ヘリカルターンを形成するのに十分な長さである。

【0286】

特定の実施形態において、アンチセンス配列とフランキング配列との間には、8～20、すなわち、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチドのスペーサ領域が存在してもよい。

【0287】

特定の実施形態において、スペーサ配列は10～13、すなわち、10、11、12または13ヌクレオチドであり、アンチセンス配列の3'末端とフランキング配列の5'末端との間に位置する。特定の実施形態において、スペーサは配列の約1ヘリカルターンを形成するのに十分な長さである。

【0288】

特定の実施形態において、調節性ポリヌクレオチドの分子足場は、5'から3'方向に、5'フランキング配列、5'アーム、ループモチーフ、3'アームおよび3'フランキング配列を含む。非限定的な例として、5'アームが、センス配列をコードする核酸配列を含んでいてもよく、3'アームが、アンチセンス配列をコードする核酸配列を含む。別の非限定的な例では、5'アームがアンチセンス配列をコードする核酸配列を含み、3'アームがセンス配列をコードする核酸配列を含む。

【0289】

特定の実施形態において、5'アーム、センスおよび／またはアンチセンス配列、ループモチーフおよび／または3'アーム配列は改変されてもよい（例えば、1ヌクレオチド以上の置換、ヌクレオチドの付加および／またはヌクレオチドの欠失）。改変はコンストラクトの機能に有益な変化を生じさせ得る（例えば、標的配列のノックダウンを増加させ、コンストラクトの分解を低減し、オフターゲット効果を低減し、ペイロードの効率を増加させ、およびペイロードの分解を低減し得る）。

【0290】

特定の実施形態において、ガイド鎖（本明細書ではアンチセンス鎖とも称される）の切出し率をパッセンジャー鎖（本明細書ではセンス鎖とも称される）の切出し率よりも高くするため、調節性ポリヌクレオチドの分子足場が配列される。ガイド鎖またはパッセンジャー鎖の切出し率は、独立に、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99%超であり得る。非限定的な例として、ガイド鎖の切出し率は少なくとも80%である。別の非限定的な例として、ガイド鎖の切出し率は少なくとも90%である。

【0291】

特定の実施形態において、ガイド鎖の切出し率はパッセンジャー鎖の切出し率よりも高い。一態様において、ガイド鎖の切出し率は、パッセンジャー鎖よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、

10

20

30

40

50

95%、99%または99%超高くてもよい。

【0292】

特定の実施形態において、ガイド鎖の切出し効率は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99%超である。非限定的な例として、ガイド鎖の切出し効率は80%よりも高い。

【0293】

特定の実施形態において、分子足場からのガイド鎖の切出し効率はパッセンジャー鎖の切出しよりも高い。分子足場からのガイド鎖の切出しは、パッセンジャー鎖の切出しよりも2、3、4、5、6、7、8、9、10倍または10倍超高効率であり得る。

【0294】

特定の実施形態において、分子足場は二重機能ターゲティング調節性ポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用されるとき、「二重機能ターゲティング」調節性ポリヌクレオチドは、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖の両方が同じ標的をロックダウンするポリヌクレオチド、またはガイド鎖およびパッセンジャー鎖が異なる標的をロックダウンするポリヌクレオチドである。

【0295】

特定の実施形態において、本明細書に記載される調節性ポリヌクレオチドの分子足場は、5'フランキング領域、ループモチーフ領域および3'フランキング領域を含み得る。本明細書に記載される調節性ポリヌクレオチドに使用され得るまたは使用されるそれらの断片であり得る5'フランキング領域、ループモチーフ領域（リンカー領域とも称され得る）および3'フランキング領域の配列の非限定的な例は、表5～表7に示される。

【0296】

【表5】

表5. 分子足場の5'フランキング領域

5'フランキング領域名	5'フランキング領域配列	5'フランキング領域配列ID
5F1	CTCCCGCAGAACACCATGCGCTCCACGGAA	3
5F2	GTGCTGGGCGGGGGGCGGGCGGGCCCTCCCGC AGAACACCATGCGCTCTTCGGAA	13
5F3	GTGCTGGGCGGGGGGCGGGCGGGCCCTCCCGC AGAACACCATGCGCTCCACGGAA	14

【0297】

【表6】

表6. 分子足場のループモチーフ領域

ループモチーフ領域名	ループモチーフ領域配列	ループモチーフ領域配列ID
L1	GTGGCCACTGAGAAG	4
L2	TGTGATTTGG	15
L3	GTGGCCACTGAGAAG	16

【0298】

10

20

30

40

50

【表 7】

表7. 分子足場の3' フランキング領域

3' フランキング 領域名	3' フランキング領域配列	3' フランキング 領域配列ID
3F1	CTGAGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGAG GGCC	5
3F2	TGGCCGTGTAGTGCTACCCAGCGCTGGCTGCC TCCTCAGCATTGCAATTCCTCTCCCATCTGGG CACCAGTCAGCTACCCCTGGTGGGAATCTGGGT AGCC	17
3F3	CTGTGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGAG GGCCGCCCTACCTCAGTGA	18

10

特定の実施形態において、分子足場は、表 5 に挙げられる少なくとも 1 つの 5' フランキング領域、断片、またはその変異体を含み得る。非限定的な例として、5' フランキング領域は、5 F 1 であってもよい。

【0 2 9 9】

特定の実施形態において、分子足場は、少なくとも 1 つの 5 F 1 フランキング領域を含み得る。

特定の実施形態において、分子足場は、表 6 に挙げられる少なくとも 1 つのループモチーフ領域、その断片または変異体を含み得る。非限定的な例として、ループモチーフ領域は、L 1 であってもよい。

20

【0 3 0 0】

特定の実施形態において、分子足場は、少なくとも 1 つの L 1 ループモチーフ領域を含み得る。

特定の実施形態において、分子足場は、表 7 に挙げられる少なくとも 1 つの 3' フランキング領域、断片、またはその変異体を含み得る。非限定的な例として、3' フランキング領域は、3 F 1 であってもよい。

【0 3 0 1】

特定の実施形態において、分子足場は、少なくとも 1 つの 3 F 1 フランキング領域を含み得る。

30

特定の実施形態において、分子足場は、表 5 および表 6 に記載されたとおりの、少なくとも 1 つの 5' フランキング領域、その断片または変異体と、少なくとも 1 つのループモチーフ領域、その断片または変異体とを含み得る。非限定的な例として、5' フランキング領域およびループモチーフ領域は、5 F 1 および L 1 であってもよい。

【0 3 0 2】

特定の実施形態において、分子足場は、表 6 および表 7 に記載されたとおりの、少なくとも 1 つの 3' フランキング領域、その断片または変異体と、少なくとも 1 つのループモチーフ領域、その断片または変異体とを含み得る。非限定的な例として、3' フランキング領域およびループモチーフ領域は、3 F 1 および L 1 であってもよい。

40

【0 3 0 3】

特定の実施形態において、分子足場は、表 5 および表 7 に記載されたとおりの、少なくとも 1 つの 5' フランキング領域、その断片または変異体と、少なくとも 1 つの 3' フランキング領域、その断片または変異体とを含み得る。非限定的な例として、フランキング領域は、5 F 1 および 3 F 1 であってもよい。

【0 3 0 4】

特定の実施形態において、分子足場は、表 5 ～表 7 に記載されたとおりの、少なくとも 1 つの 5' フランキング領域、その断片または変異体と、少なくとも 1 つのループモチーフ領域、その断片または変異体と、少なくとも 1 つの 3' フランキング領域、その断片または変異体とを含み得る。非限定的な例として、フランキング領域およびループモチーフ領域

50

は、5 F 1、L 1 および 3 F 1 であってもよい。

【0305】

特定の実施形態において、分子足場は天然の p r i - m i R N A 足場であってもよい。非限定的な例として、分子足場は、ヒト m i R 1 5 5 足場に由来する足場であってもよい。

【0306】

特定の実施形態において、分子足場は当該技術分野において公知の1つ以上のリンカーを含み得る。リンカーは、領域間を、または1つの分子足場を別の分子足場と分離し得る。非限定的な例として、分子足場はポリシストロン性であってもよい。

【0307】

分子足場と、S O D 1 を標的とする s i R N A 分子とを含む調節性ポリヌクレオチド

特定の実施形態において、調節性ポリヌクレオチドは、表8に記載されるとおりの、5' および 3' フランキング領域と、ループモチーフ領域と、センス配列およびアンチセンス配列をコードする核酸配列とを含み得る。表8には、パッセンジャー鎖およびガイド鎖ならびに 5' および 3' フランキング領域およびループ領域（リンカー領域とも称される）の D N A 配列識別名が記載される。表8において、配列名の「m i R」成分は、必ずしも m i R N A 遺伝子の配列付番に対応するわけではない（例えば、V O Y S O D 1 m i R - 1 0 2 は配列名であるが、必ずしも m i R - 1 0 2 がその配列の一部であることを意味するわけではない）。

【0308】

【表8】

表8. SOD1調節性ポリヌクレオチド配列領域(5' から3')

調節性 ポリヌクレオチド コンストラクト名	5' フランキングから 3' フランキング 配列番号	5' フラン キング 配列番号	パッセン ジャー 配列番号	ループ 配列番号	ガイド 配列 番号	3' フランキング 配列番号
VOYSOD1miR104- 788.2	6	3	7	4	8	5
VOYSOD1miR127-860	19	13	20	15	21	17
VOYSOD1miR114-861	22	14	23	16	24	18

調節性ポリヌクレオチドを含む A A V 粒子

特定の実施形態において、A A V 粒子は、調節性ポリヌクレオチド配列を含むペイロード領域を有するウイルスゲノムを含む。かかる実施形態において、2つ以上のポリペプチドをコードするウイルスゲノムが、ウイルス粒子へと複製またはパッケージングされ得る。調節性ポリヌクレオチドを含むウイルス粒子で形質導入された標的細胞は、単一細胞中でコード化センスおよび／またはアンチセンス配列を発現し得る。

【0309】

一部の実施形態において、A A V 粒子は、神経学的疾患および／または障害を治療、予防、緩和、または改善するための医学分野に有用である。

特定の実施形態において、少なくとも1つの s i R N A 分子をコードする核酸配列を含む調節性ポリヌクレオチド配列を含む A A V 粒子を、哺乳類細胞に導入し得る。

【0310】

A A V 粒子ペイロード領域が調節性ポリヌクレオチドを含む場合、調節性ポリヌクレオチドは、標的遺伝子をノックダウンするためのセンス配列および／またはアンチセンス配列を含み得る。本明細書に記載される調節性ポリヌクレオチドをコードする A A V ウイルスゲノムは、ヒト疾患、ウイルス、感染症、獣医学的応用の分野、ならびに様々なインビボおよびインビトロ設定において有用であり得る。

【0311】

特定の実施形態において、A A V 粒子ウイルスゲノムは、少なくとも1つの末端逆位配列（I T R）領域を含み得る。I T R 領域は、独立に、限定はされないが、7 5、7 6、

77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、および175ヌクレオチドなどの長さを有していてもよい。ウイルスゲノムのITR領域の長さは、75～80、75～85、75～100、80～85、80～90、80～105、85～90、85～95、85～110、90～95、90～100、90～115、95～100、95～105、95～120、100～105、100～110、100～125、105～110、105～115、105～130、110～115、110～120、110～135、115～120、115～125、115～140、120～125、120～130、120～145、125～130、125～135、125～150、130～135、130～140、130～155、135～140、135～145、135～160、140～145、140～150、140～165、145～150、145～155、145～170、150～155、150～160、150～175、155～160、155～165、160～165、160～170、165～170、165～175、および170～175ヌクレオチドであってもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約105ヌクレオチド長であるITRを含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約141ヌクレオチド長であるITRを含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約130ヌクレオチド長であるITRを含む。

【0312】

特定の実施形態において、AAV粒子ウイルスゲノムは、2つの末端逆位配列（ITR）領域を含み得る。ITR領域の各々は、独立に、限定はされないが、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、および175ヌクレオチドなどの長さを有していてもよい。ウイルスゲノムのITR領域の長さは、75～80、75～85、75～100、80～85、80～90、80～105、85～90、85～95、85～110、90～95、90～100、90～115、95～100、95～105、95～120、100～105、100～110、100～125、105～110、105～115、105～130、110～115、110～120、110～135、115～120、115～125、115～140、120～125、120～130、120～145、125～130、125～135、125～150、130～135、130～140、130～155、135～140、135～145、135～160、140～145、140～150、140～165、145～150、145～155、145～170、150～155、150～160、150～175、155～160、155～165、160～165、160～170、165～170、165～175、および170～175ヌクレオチドであってもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約105ヌクレオチド長および1

10

20

30

40

50

41ヌクレオチド長であるITRを含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約105ヌクレオチド長および130ヌクレオチド長であるITRを含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約130ヌクレオチド長および141ヌクレオチド長であるITRを含む。

【0313】

特定の実施形態において、AAV粒子ウイルスゲノムは、2つのITR配列領域を含む。

特定の実施形態において、AAV粒子ウイルスゲノムは、少なくとも1つの多重フィラー配列領域を含み得る。フィラー領域は、独立に、限定はされないが、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、48

10

20

30

40

50

4、485、486、487、488、489、490、491、492、493、49
4、495、496、497、498、499、500、501、502、503、50
4、505、506、507、508、509、510、511、512、513、51
4、515、516、517、518、519、520、521、522、523、52
4、525、526、527、528、529、530、531、532、533、53
4、535、536、537、538、539、540、541、542、543、54
4、545、546、547、548、549、550、551、552、553、55
4、555、556、557、558、559、560、561、562、563、56
4、565、566、567、568、569、570、571、572、573、57
4、575、576、577、578、579、580、581、582、583、58
4、585、586、587、588、589、590、591、592、593、59
4、595、596、597、598、599、600、601、602、603、60
4、605、606、607、608、609、610、611、612、613、61
4、615、616、617、618、619、620、621、622、623、62
4、625、626、627、628、629、630、631、632、633、63
4、635、636、637、638、639、640、641、642、643、64
4、645、646、647、648、649、650、651、652、653、65
4、655、656、657、658、659、660、661、662、663、66
4、665、666、667、668、669、670、671、672、673、67
4、675、676、677、678、679、680、681、682、683、68
4、685、686、687、688、689、690、691、692、693、69
4、695、696、697、698、699、700、701、702、703、70
4、705、706、707、708、709、710、711、712、713、71
4、715、716、717、718、719、720、721、722、723、72
4、725、726、727、728、729、730、731、732、733、73
4、735、736、737、738、739、740、741、742、743、74
4、745、746、747、748、749、750、751、752、753、75
4、755、756、757、758、759、760、761、762、763、76
4、765、766、767、768、769、770、771、772、773、77
4、775、776、777、778、779、780、781、782、783、78
4、785、786、787、788、789、790、791、792、793、79
4、795、796、797、798、799、800、801、802、803、80
4、805、806、807、808、809、810、811、812、813、81
4、815、816、817、818、819、820、821、822、823、82
4、825、826、827、828、829、830、831、832、833、83
4、835、836、837、838、839、840、841、842、843、84
4、845、846、847、848、849、850、851、852、853、85
4、855、856、857、858、859、860、861、862、863、86
4、865、866、867、868、869、870、871、872、873、87
4、875、876、877、878、879、880、881、882、883、88
4、885、886、887、888、889、890、891、892、893、89
4、895、896、897、898、899、900、901、902、903、90
4、905、906、907、908、909、910、911、912、913、91
4、915、916、917、918、919、920、921、922、923、92
4、925、926、927、928、929、930、931、932、933、93
4、935、936、937、938、939、940、941、942、943、94
4、945、946、947、948、949、950、951、952、953、95
4、955、956、957、958、959、960、961、962、963、96
4、965、966、967、968、969、970、971、972、973、97
4、975、976、977、978、979、980、981、982、983、98

10

20

30

40

50

4、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、1000、1001、1002、1003、1004、1005、1006、1007、1008、1009、1010、1011、1012、1013、1014、1015、1016、1017、1018、1019、1020、1021、1022、1023、1024、1025、1026、1027、1028、1029、1030、1031、1032、1033、1034、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1044、1045、1046、1047、1048、1049、1050、1051、1052、1053、1054、1055、1056、1057、1058、1059、1060、1061、1062、1063、1064、1065、1066、1067、1068、1069、1070、1071、1072、1073、1074、1075、1076、1077、1078、1079、1080、1081、1082、1083、1084、1085、1086、1087、1088、1089、1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1106、1107、1108、1109、1110、1111、1112、1113、1114、1115、1116、1117、1118、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、1126、1127、1128、1129、1130、1131、1132、1133、1134、1135、1136、1137、1138、1139、1140、1141、1142、1143、1144、1145、1146、1147、1148、1149、1150、1151、1152、1153、1154、1155、1156、1157、1158、1159、1160、1161、1162、1163、1164、1165、1166、1167、1168、1169、1170、1171、1172、1173、1174、1175、1176、1177、1178、1179、1180、1181、1182、1183、1184、1185、1186、1187、1188、1189、1190、1191、1192、1193、1194、1195、1196、1197、1198、1199、1200、1201、1202、1203、1204、1205、1206、1207、1208、1209、1210、1211、1212、1213、1214、1215、1216、1217、1218、1219、1220、1221、1222、1223、1224、1225、1226、1227、1228、1229、1230、1231、1232、1233、1234、1235、1236、1237、1238、1239、1240、1241、1242、1243、1244、1245、1246、1247、1248、1249、1250、1251、1252、1253、1254、1255、1256、1257、1258、1259

10

20

30

、1260、1261、1262、1263、1264、1265、1266、1267、1268、1269、1270、1271、1272、1273、1274、1275、1276、1277、1278、1279、1280、1281、1282、1283、1284、1285、1286、1287、1288、1289、1290、1291、1292、1293、1294、1295、1296、1297、1298、1299、1300、1301、1302、1303、1304、1305、1306、1307、1308、1309、1310、1311、1312、1313、1314、1315、1316、1317、1318、1319、1320、1321、1322、1323、1324、1325、1326、1327、1328、1329、1330、1331、1332、1333、1334、1335、1336、1337、1338、1339、1340、1341、1342、1343、1344、1345、1346、1347、1348、1349、1350、1351、1352、1353、1354、1355、1356、1357、1358、1359、1360、1361、1362、1363、1364、1365、1366、1367、1368、1369、1370、1371、1372、1373、1374、1375、1376、1377、1378、1379

40

50

、 1 3 8 0、 1 3 8 1、 1 3 8 2、 1 3 8 3、 1 3 8 4、 1 3 8 5、 1 3 8 6、 1 3 8 7
、 1 3 8 8、 1 3 8 9、 1 3 9 0、 1 3 9 1、 1 3 9 2、 1 3 9 3、 1 3 9 4、 1 3 9 5
、 1 3 9 6、 1 3 9 7、 1 3 9 8、 1 3 9 9、 1 4 0 0、 1 4 0 1、 1 4 0 2、 1 4 0 3
、 1 4 0 4、 1 4 0 5、 1 4 0 6、 1 4 0 7、 1 4 0 8、 1 4 0 9、 1 4 1 0、 1 4 1 1
、 1 4 1 2、 1 4 1 3、 1 4 1 4、 1 4 1 5、 1 4 1 6、 1 4 1 7、 1 4 1 8、 1 4 1 9
、 1 4 2 0、 1 4 2 1、 1 4 2 2、 1 4 2 3、 1 4 2 4、 1 4 2 5、 1 4 2 6、 1 4 2 7
、 1 4 2 8、 1 4 2 9、 1 4 3 0、 1 4 3 1、 1 4 3 2、 1 4 3 3、 1 4 3 4、 1 4 3 5
、 1 4 3 6、 1 4 3 7、 1 4 3 8、 1 4 3 9、 1 4 4 0、 1 4 4 1、 1 4 4 2、 1 4 4 3
、 1 4 4 4、 1 4 4 5、 1 4 4 6、 1 4 4 7、 1 4 4 8、 1 4 4 9、 1 4 5 0、 1 4 5 1
、 1 4 5 2、 1 4 5 3、 1 4 5 4、 1 4 5 5、 1 4 5 6、 1 4 5 7、 1 4 5 8、 1 4 5 9
、 1 4 6 0、 1 4 6 1、 1 4 6 2、 1 4 6 3、 1 4 6 4、 1 4 6 5、 1 4 6 6、 1 4 6 7
、 1 4 6 8、 1 4 6 9、 1 4 7 0、 1 4 7 1、 1 4 7 2、 1 4 7 3、 1 4 7 4、 1 4 7 5
、 1 4 7 6、 1 4 7 7、 1 4 7 8、 1 4 7 9、 1 4 8 0、 1 4 8 1、 1 4 8 2、 1 4 8 3
、 1 4 8 4、 1 4 8 5、 1 4 8 6、 1 4 8 7、 1 4 8 8、 1 4 8 9、 1 4 9 0、 1 4 9 1
、 1 4 9 2、 1 4 9 3、 1 4 9 4、 1 4 9 5、 1 4 9 6、 1 4 9 7、 1 4 9 8、 1 4 9 9
、 1 5 0 0、 1 5 0 1、 1 5 0 2、 1 5 0 3、 1 5 0 4、 1 5 0 5、 1 5 0 6、 1 5 0 7
、 1 5 0 8、 1 5 0 9、 1 5 1 0、 1 5 1 1、 1 5 1 2、 1 5 1 3、 1 5 1 4、 1 5 1 5
、 1 5 1 6、 1 5 1 7、 1 5 1 8、 1 5 1 9、 1 5 2 0、 1 5 2 1、 1 5 2 2、 1 5 2 3
、 1 5 2 4、 1 5 2 5、 1 5 2 6、 1 5 2 7、 1 5 2 8、 1 5 2 9、 1 5 3 0、 1 5 3 1
、 1 5 3 2、 1 5 3 3、 1 5 3 4、 1 5 3 5、 1 5 3 6、 1 5 3 7、 1 5 3 8、 1 5 3 9
、 1 5 4 0、 1 5 4 1、 1 5 4 2、 1 5 4 3、 1 5 4 4、 1 5 4 5、 1 5 4 6、 1 5 4 7
、 1 5 4 8、 1 5 4 9、 1 5 5 0、 1 5 5 1、 1 5 5 2、 1 5 5 3、 1 5 5 4、 1 5 5 5
、 1 5 5 6、 1 5 5 7、 1 5 5 8、 1 5 5 9、 1 5 6 0、 1 5 6 1、 1 5 6 2、 1 5 6 3
、 1 5 6 4、 1 5 6 5、 1 5 6 6、 1 5 6 7、 1 5 6 8、 1 5 6 9、 1 5 7 0、 1 5 7 1
、 1 5 7 2、 1 5 7 3、 1 5 7 4、 1 5 7 5、 1 5 7 6、 1 5 7 7、 1 5 7 8、 1 5 7 9
、 1 5 8 0、 1 5 8 1、 1 5 8 2、 1 5 8 3、 1 5 8 4、 1 5 8 5、 1 5 8 6、 1 5 8 7
、 1 5 8 8、 1 5 8 9、 1 5 9 0、 1 5 9 1、 1 5 9 2、 1 5 9 3、 1 5 9 4、 1 5 9 5
、 1 5 9 6、 1 5 9 7、 1 5 9 8、 1 5 9 9、 1 6 0 0、 1 6 0 1、 1 6 0 2、 1 6 0 3
、 1 6 0 4、 1 6 0 5、 1 6 0 6、 1 6 0 7、 1 6 0 8、 1 6 0 9、 1 6 1 0、 1 6 1 1
、 1 6 1 2、 1 6 1 3、 1 6 1 4、 1 6 1 5、 1 6 1 6、 1 6 1 7、 1 6 1 8、 1 6 1 9
、 1 6 2 0、 1 6 2 1、 1 6 2 2、 1 6 2 3、 1 6 2 4、 1 6 2 5、 1 6 2 6、 1 6 2 7
、 1 6 2 8、 1 6 2 9、 1 6 3 0、 1 6 3 1、 1 6 3 2、 1 6 3 3、 1 6 3 4、 1 6 3 5
、 1 6 3 6、 1 6 3 7、 1 6 3 8、 1 6 3 9、 1 6 4 0、 1 6 4 1、 1 6 4 2、 1 6 4 3
、 1 6 4 4、 1 6 4 5、 1 6 4 6、 1 6 4 7、 1 6 4 8、 1 6 4 9、 1 6 5 0、 1 6 5 1
、 1 6 5 2、 1 6 5 3、 1 6 5 4、 1 6 5 5、 1 6 5 6、 1 6 5 7、 1 6 5 8、 1 6 5 9
、 1 6 6 0、 1 6 6 1、 1 6 6 2、 1 6 6 3、 1 6 6 4、 1 6 6 5、 1 6 6 6、 1 6 6 7
、 1 6 6 8、 1 6 6 9、 1 6 7 0、 1 6 7 1、 1 6 7 2、 1 6 7 3、 1 6 7 4、 1 6 7 5
、 1 6 7 6、 1 6 7 7、 1 6 7 8、 1 6 7 9、 1 6 8 0、 1 6 8 1、 1 6 8 2、 1 6 8 3
、 1 6 8 4、 1 6 8 5、 1 6 8 6、 1 6 8 7、 1 6 8 8、 1 6 8 9、 1 6 9 0、 1 6 9 1
、 1 6 9 2、 1 6 9 3、 1 6 9 4、 1 6 9 5、 1 6 9 6、 1 6 9 7、 1 6 9 8、 1 6 9 9
、 1 7 0 0、 1 7 0 1、 1 7 0 2、 1 7 0 3、 1 7 0 4、 1 7 0 5、 1 7 0 6、 1 7 0 7
、 1 7 0 8、 1 7 0 9、 1 7 1 0、 1 7 1 1、 1 7 1 2、 1 7 1 3、 1 7 1 4、 1 7 1 5
、 1 7 1 6、 1 7 1 7、 1 7 1 8、 1 7 1 9、 1 7 2 0、 1 7 2 1、 1 7 2 2、 1 7 2 3
、 1 7 2 4、 1 7 2 5、 1 7 2 6、 1 7 2 7、 1 7 2 8、 1 7 2 9、 1 7 3 0、 1 7 3 1
、 1 7 3 2、 1 7 3 3、 1 7 3 4、 1 7 3 5、 1 7 3 6、 1 7 3 7、 1 7 3 8、 1 7 3 9
、 1 7 4 0、 1 7 4 1、 1 7 4 2、 1 7 4 3、 1 7 4 4、 1 7 4 5、 1 7 4 6、 1 7 4 7
、 1 7 4 8、 1 7 4 9、 1 7 5 0、 1 7 5 1、 1 7 5 2、 1 7 5 3、 1 7 5 4、 1 7 5 5
、 1 7 5 6、 1 7 5 7、 1 7 5 8、 1 7 5 9、 1 7 6 0、 1 7 6 1、 1 7 6 2、 1 7 6 3
、 1 7 6 4、 1 7 6 5、 1 7 6 6、 1 7 6 7、 1 7 6 8、 1 7 6 9、 1 7 7 0、 1 7 7 1
、 1 7 7 2、 1 7 7 3、 1 7 7 4、 1 7 7 5、 1 7 7 6、 1 7 7 7、 1 7 7 8、 1 7 7 9

10

20

30

40

50

、 1780、1781、1782、1783、1784、1785、1786、1787
、 1788、1789、1790、1791、1792、1793、1794、1795
、 1796、1797、1798、1799、1800、1801、1802、1803
、 1804、1805、1806、1807、1808、1809、1810、1811
、 1812、1813、1814、1815、1816、1817、1818、1819
、 1820、1821、1822、1823、1824、1825、1826、1827
、 1828、1829、1830、1831、1832、1833、1834、1835
、 1836、1837、1838、1839、1840、1841、1842、1843
、 1844、1845、1846、1847、1848、1849、1850、1851
、 1852、1853、1854、1855、1856、1857、1858、1859
、 1860、1861、1862、1863、1864、1865、1866、1867
、 1868、1869、1870、1871、1872、1873、1874、1875
、 1876、1877、1878、1879、1880、1881、1882、1883
、 1884、1885、1886、1887、1888、1889、1890、1891
、 1892、1893、1894、1895、1896、1897、1898、1899
、 1900、1901、1902、1903、1904、1905、1906、1907
、 1908、1909、1910、1911、1912、1913、1914、1915
、 1916、1917、1918、1919、1920、1921、1922、1923
、 1924、1925、1926、1927、1928、1929、1930、1931
、 1932、1933、1934、1935、1936、1937、1938、1939
、 1940、1941、1942、1943、1944、1945、1946、1947
、 1948、1949、1950、1951、1952、1953、1954、1955
、 1956、1957、1958、1959、1960、1961、1962、1963
、 1964、1965、1966、1967、1968、1969、1970、1971
、 1972、1973、1974、1975、1976、1977、1978、1979
、 1980、1981、1982、1983、1984、1985、1986、1987
、 1988、1989、1990、1991、1992、1993、1994、1995
、 1996、1997、1998、1999、2000、2001、2002、2003
、 2004、2005、2006、2007、2008、2009、2010、2011
、 2012、2013、2014、2015、2016、2017、2018、2019
、 2020、2021、2022、2023、2024、2025、2026、2027
、 2028、2029、2030、2031、2032、2033、2034、2035
、 2036、2037、2038、2039、2040、2041、2042、2043
、 2044、2045、2046、2047、2048、2049、2050、2051
、 2052、2053、2054、2055、2056、2057、2058、2059
、 2060、2061、2062、2063、2064、2065、2066、2067
、 2068、2069、2070、2071、2072、2073、2074、2075
、 2076、2077、2078、2079、2080、2081、2082、2083
、 2084、2085、2086、2087、2088、2089、2090、2091
、 2092、2093、2094、2095、2096、2097、2098、2099
、 2100、2101、2102、2103、2104、2105、2106、2107
、 2108、2109、2110、2111、2112、2113、2114、2115
、 2116、2117、2118、2119、2120、2121、2122、2123
、 2124、2125、2126、2127、2128、2129、2130、2131
、 2132、2133、2134、2135、2136、2137、2138、2139
、 2140、2141、2142、2143、2144、2145、2146、2147
、 2148、2149、2150、2151、2152、2153、2154、2155
、 2156、2157、2158、2159、2160、2161、2162、2163
、 2164、2165、2166、2167、2168、2169、2170、2171
、 2172、2173、2174、2175、2176、2177、2178、2179

10

20

30

40

50

、 2 1 8 0、 2 1 8 1、 2 1 8 2、 2 1 8 3、 2 1 8 4、 2 1 8 5、 2 1 8 6、 2 1 8 7
、 2 1 8 8、 2 1 8 9、 2 1 9 0、 2 1 9 1、 2 1 9 2、 2 1 9 3、 2 1 9 4、 2 1 9 5
、 2 1 9 6、 2 1 9 7、 2 1 9 8、 2 1 9 9、 2 2 0 0、 2 2 0 1、 2 2 0 2、 2 2 0 3
、 2 2 0 4、 2 2 0 5、 2 2 0 6、 2 2 0 7、 2 2 0 8、 2 2 0 9、 2 2 1 0、 2 2 1 1
、 2 2 1 2、 2 2 1 3、 2 2 1 4、 2 2 1 5、 2 2 1 6、 2 2 1 7、 2 2 1 8、 2 2 1 9
、 2 2 2 0、 2 2 2 1、 2 2 2 2、 2 2 2 3、 2 2 2 4、 2 2 2 5、 2 2 2 6、 2 2 2 7
、 2 2 2 8、 2 2 2 9、 2 2 3 0、 2 2 3 1、 2 2 3 2、 2 2 3 3、 2 2 3 4、 2 2 3 5
、 2 2 3 6、 2 2 3 7、 2 2 3 8、 2 2 3 9、 2 2 4 0、 2 2 4 1、 2 2 4 2、 2 2 4 3
、 2 2 4 4、 2 2 4 5、 2 2 4 6、 2 2 4 7、 2 2 4 8、 2 2 4 9、 2 2 5 0、 2 2 5 1
、 2 2 5 2、 2 2 5 3、 2 2 5 4、 2 2 5 5、 2 2 5 6、 2 2 5 7、 2 2 5 8、 2 2 5 9
、 2 2 6 0、 2 2 6 1、 2 2 6 2、 2 2 6 3、 2 2 6 4、 2 2 6 5、 2 2 6 6、 2 2 6 7
、 2 2 6 8、 2 2 6 9、 2 2 7 0、 2 2 7 1、 2 2 7 2、 2 2 7 3、 2 2 7 4、 2 2 7 5
、 2 2 7 6、 2 2 7 7、 2 2 7 8、 2 2 7 9、 2 2 8 0、 2 2 8 1、 2 2 8 2、 2 2 8 3、

10

2 2 8 4、 2 2 8 5、 2 2 8 6、 2 2 8 7、 2 2 8 8、 2 2 8 9、 2 2 9 0、 2 2 9 1、
2 2 9 2、 2 2 9 3、 2 2 9 4、 2 2 9 5、 2 2 9 6、 2 2 9 7、 2 2 9 8、 2 2 9 9、
2 3 0 0、 2 3 0 1、 2 3 0 2、 2 3 0 3、 2 3 0 4、 2 3 0 5、 2 3 0 6、 2 3 0 7、
2 3 0 8、 2 3 0 9、 2 3 1 0、 2 3 1 1、 2 3 1 2、 2 3 1 3、 2 3 1 4、 2 3 1 5、
2 3 1 6、 2 3 1 7、 2 3 1 8、 2 3 1 9、 2 3 2 0、 2 3 2 1、 2 3 2 2、 2 3 2 3、
2 3 2 4、 2 3 2 5、 2 3 2 6、 2 3 2 7、 2 3 2 8、 2 3 2 9、 2 3 3 0、 2 3 3 1、
2 3 3 2、 2 3 3 3、 2 3 3 4、 2 3 3 5、 2 3 3 6、 2 3 3 7、 2 3 3 8、 2 3 3 9、
2 3 4 0、 2 3 4 1、 2 3 4 2、 2 3 4 3、 2 3 4 4、 2 3 4 5、 2 3 4 6、 2 3 4 7、
2 3 4 8、 2 3 4 9、 2 3 5 0、 2 3 5 1、 2 3 5 2、 2 3 5 3、 2 3 5 4、 2 3 5 5、
2 3 5 6、 2 3 5 7、 2 3 5 8、 2 3 5 9、 2 3 6 0、 2 3 6 1、 2 3 6 2、 2 3 6 3、
2 3 6 4、 2 3 6 5、 2 3 6 6、 2 3 6 7、 2 3 6 8、 2 3 6 9、 2 3 7 0、 2 3 7 1、
2 3 7 2、 2 3 7 3、 2 3 7 4、 2 3 7 5、 2 3 7 6、 2 3 7 7、 2 3 7 8、 2 3 7 9、
2 3 8 0、 2 3 8 1、 2 3 8 2、 2 3 8 3、 2 3 8 4、 2 3 8 5、 2 3 8 6、 2 3 8 7、
2 3 8 8、 2 3 8 9、 2 3 9 0、 2 3 9 1、 2 3 9 2、 2 3 9 3、 2 3 9 4、 2 3 9 5、
2 3 9 6、 2 3 9 7、 2 3 9 8、 2 3 9 9、 2 4 0 0、 2 4 0 1、 2 4 0 2、 2 4 0 3、
2 4 0 4、 2 4 0 5、 2 4 0 6、 2 4 0 7、 2 4 0 8、 2 4 0 9、 2 4 1 0、 2 4 1 1、
2 4 1 2、 2 4 1 3、 2 4 1 4、 2 4 1 5、 2 4 1 6、 2 4 1 7、 2 4 1 8、 2 4 1 9、
2 4 2 0、 2 4 2 1、 2 4 2 2、 2 4 2 3、 2 4 2 4、 2 4 2 5、 2 4 2 6、 2 4 2 7、
2 4 2 8、 2 4 2 9、 2 4 3 0、 2 4 3 1、 2 4 3 2、 2 4 3 3、 2 4 3 4、 2 4 3 5、
2 4 3 6、 2 4 3 7、 2 4 3 8、 2 4 3 9、 2 4 4 0、 2 4 4 1、 2 4 4 2、 2 4 4 3、
2 4 4 4、 2 4 4 5、 2 4 4 6、 2 4 4 7、 2 4 4 8、 2 4 4 9、 2 4 5 0、 2 4 5 1、
2 4 5 2、 2 4 5 3、 2 4 5 4、 2 4 5 5、 2 4 5 6、 2 4 5 7、 2 4 5 8、 2 4 5 9、
2 4 6 0、 2 4 6 1、 2 4 6 2、 2 4 6 3、 2 4 6 4、 2 4 6 5、 2 4 6 6、 2 4 6 7、
2 4 6 8、 2 4 6 9、 2 4 7 0、 2 4 7 1、 2 4 7 2、 2 4 7 3、 2 4 7 4、 2 4 7 5、
2 4 7 6、 2 4 7 7、 2 4 7 8、 2 4 7 9、 2 4 8 0、 2 4 8 1、 2 4 8 2、 2 4 8 3、
2 4 8 4、 2 4 8 5、 2 4 8 6、 2 4 8 7、 2 4 8 8、 2 4 8 9、 2 4 9 0、 2 4 9 1、
2 4 9 2、 2 4 9 3、 2 4 9 4、 2 4 9 5、 2 4 9 6、 2 4 9 7、 2 4 9 8、 2 4 9 9、
2 5 0 0、 2 5 0 1、 2 5 0 2、 2 5 0 3、 2 5 0 4、 2 5 0 5、 2 5 0 6、 2 5 0 7、
2 5 0 8、 2 5 0 9、 2 5 1 0、 2 5 1 1、 2 5 1 2、 2 5 1 3、 2 5 1 4、 2 5 1 5、
2 5 1 6、 2 5 1 7、 2 5 1 8、 2 5 1 9、 2 5 2 0、 2 5 2 1、 2 5 2 2、 2 5 2 3、
2 5 2 4、 2 5 2 5、 2 5 2 6、 2 5 2 7、 2 5 2 8、 2 5 2 9、 2 5 3 0、 2 5 3 1、
2 5 3 2、 2 5 3 3、 2 5 3 4、 2 5 3 5、 2 5 3 6、 2 5 3 7、 2 5 3 8、 2 5 3 9、
2 5 4 0、 2 5 4 1、 2 5 4 2、 2 5 4 3、 2 5 4 4、 2 5 4 5、 2 5 4 6、 2 5 4 7、
2 5 4 8、 2 5 4 9、 2 5 5 0、 2 5 5 1、 2 5 5 2、 2 5 5 3、 2 5 5 4、 2 5 5 5、
2 5 5 6、 2 5 5 7、 2 5 5 8、 2 5 5 9、 2 5 6 0、 2 5 6 1、 2 5 6 2、 2 5 6 3、
2 5 6 4、 2 5 6 5、 2 5 6 6、 2 5 6 7、 2 5 6 8、 2 5 6 9、 2 5 7 0、 2 5 7 1、

20

30

40

50

2 5 7 2、2 5 7 3、2 5 7 4、2 5 7 5、2 5 7 6、2 5 7 7、2 5 7 8、2 5 7 9、
2 5 8 0、2 5 8 1、2 5 8 2、2 5 8 3、2 5 8 4、2 5 8 5、2 5 8 6、2 5 8 7、
2 5 8 8、2 5 8 9、2 5 9 0、2 5 9 1、2 5 9 2、2 5 9 3、2 5 9 4、2 5 9 5、
2 5 9 6、2 5 9 7、2 5 9 8、2 5 9 9、2 6 0 0、2 6 0 1、2 6 0 2、2 6 0 3、
2 6 0 4、2 6 0 5、2 6 0 6、2 6 0 7、2 6 0 8、2 6 0 9、2 6 1 0、2 6 1 1、
2 6 1 2、2 6 1 3、2 6 1 4、2 6 1 5、2 6 1 6、2 6 1 7、2 6 1 8、2 6 1 9、
2 6 2 0、2 6 2 1、2 6 2 2、2 6 2 3、2 6 2 4、2 6 2 5、2 6 2 6、2 6 2 7、
2 6 2 8、2 6 2 9、2 6 3 0、2 6 3 1、2 6 3 2、2 6 3 3、2 6 3 4、2 6 3 5、
2 6 3 6、2 6 3 7、2 6 3 8、2 6 3 9、2 6 4 0、2 6 4 1、2 6 4 2、2 6 4 3、
2 6 4 4、2 6 4 5、2 6 4 6、2 6 4 7、2 6 4 8、2 6 4 9、2 6 5 0、2 6 5 1、
2 6 5 2、2 6 5 3、2 6 5 4、2 6 5 5、2 6 5 6、2 6 5 7、2 6 5 8、2 6 5 9、
2 6 6 0、2 6 6 1、2 6 6 2、2 6 6 3、2 6 6 4、2 6 6 5、2 6 6 6、2 6 6 7、
2 6 6 8、2 6 6 9、2 6 7 0、2 6 7 1、2 6 7 2、2 6 7 3、2 6 7 4、2 6 7 5、
2 6 7 6、2 6 7 7、2 6 7 8、2 6 7 9、2 6 8 0、2 6 8 1、2 6 8 2、2 6 8 3、
2 6 8 4、2 6 8 5、2 6 8 6、2 6 8 7、2 6 8 8、2 6 8 9、2 6 9 0、2 6 9 1、
2 6 9 2、2 6 9 3、2 6 9 4、2 6 9 5、2 6 9 6、2 6 9 7、2 6 9 8、2 6 9 9、
2 7 0 0、2 7 0 1、2 7 0 2、2 7 0 3、2 7 0 4、2 7 0 5、2 7 0 6、2 7 0 7、
2 7 0 8、2 7 0 9、2 7 1 0、2 7 1 1、2 7 1 2、2 7 1 3、2 7 1 4、2 7 1 5、
2 7 1 6、2 7 1 7、2 7 1 8、2 7 1 9、2 7 2 0、2 7 2 1、2 7 2 2、2 7 2 3、
2 7 2 4、2 7 2 5、2 7 2 6、2 7 2 7、2 7 2 8、2 7 2 9、2 7 3 0、2 7 3 1、
2 7 3 2、2 7 3 3、2 7 3 4、2 7 3 5、2 7 3 6、2 7 3 7、2 7 3 8、2 7 3 9、
2 7 4 0、2 7 4 1、2 7 4 2、2 7 4 3、2 7 4 4、2 7 4 5、2 7 4 6、2 7 4 7、
2 7 4 8、2 7 4 9、2 7 5 0、2 7 5 1、2 7 5 2、2 7 5 3、2 7 5 4、2 7 5 5、
2 7 5 6、2 7 5 7、2 7 5 8、2 7 5 9、2 7 6 0、2 7 6 1、2 7 6 2、2 7 6 3、
2 7 6 4、2 7 6 5、2 7 6 6、2 7 6 7、2 7 6 8、2 7 6 9、2 7 7 0、2 7 7 1、
2 7 7 2、2 7 7 3、2 7 7 4、2 7 7 5、2 7 7 6、2 7 7 7、2 7 7 8、2 7 7 9、
2 7 8 0、2 7 8 1、2 7 8 2、2 7 8 3、2 7 8 4、2 7 8 5、2 7 8 6、2 7 8 7、
2 7 8 8、2 7 8 9、2 7 9 0、2 7 9 1、2 7 9 2、2 7 9 3、2 7 9 4、2 7 9 5、
2 7 9 6、2 7 9 7、2 7 9 8、2 7 9 9、2 8 0 0、2 8 0 1、2 8 0 2、2 8 0 3、
2 8 0 4、2 8 0 5、2 8 0 6、2 8 0 7、2 8 0 8、2 8 0 9、2 8 1 0、2 8 1 1、
2 8 1 2、2 8 1 3、2 8 1 4、2 8 1 5、2 8 1 6、2 8 1 7、2 8 1 8、2 8 1 9、
2 8 2 0、2 8 2 1、2 8 2 2、2 8 2 3、2 8 2 4、2 8 2 5、2 8 2 6、2 8 2 7、
2 8 2 8、2 8 2 9、2 8 3 0、2 8 3 1、2 8 3 2、2 8 3 3、2 8 3 4、2 8 3 5、
2 8 3 6、2 8 3 7、2 8 3 8、2 8 3 9、2 8 4 0、2 8 4 1、2 8 4 2、2 8 4 3、
2 8 4 4、2 8 4 5、2 8 4 6、2 8 4 7、2 8 4 8、2 8 4 9、2 8 5 0、2 8 5 1、
2 8 5 2、2 8 5 3、2 8 5 4、2 8 5 5、2 8 5 6、2 8 5 7、2 8 5 8、2 8 5 9、
2 8 6 0、2 8 6 1、2 8 6 2、2 8 6 3、2 8 6 4、2 8 6 5、2 8 6 6、2 8 6 7、
2 8 6 8、2 8 6 9、2 8 7 0、2 8 7 1、2 8 7 2、2 8 7 3、2 8 7 4、2 8 7 5、
2 8 7 6、2 8 7 7、2 8 7 8、2 8 7 9、2 8 8 0、2 8 8 1、2 8 8 2、2 8 8 3、
2 8 8 4、2 8 8 5、2 8 8 6、2 8 8 7、2 8 8 8、2 8 8 9、2 8 9 0、2 8 9 1、
2 8 9 2、2 8 9 3、2 8 9 4、2 8 9 5、2 8 9 6、2 8 9 7、2 8 9 8、2 8 9 9、
2 9 0 0、2 9 0 1、2 9 0 2、2 9 0 3、2 9 0 4、2 9 0 5、2 9 0 6、2 9 0 7、
2 9 0 8、2 9 0 9、2 9 1 0、2 9 1 1、2 9 1 2、2 9 1 3、2 9 1 4、2 9 1 5、
2 9 1 6、2 9 1 7、2 9 1 8、2 9 1 9、2 9 2 0、2 9 2 1、2 9 2 2、2 9 2 3、
2 9 2 4、2 9 2 5、2 9 2 6、2 9 2 7、2 9 2 8、2 9 2 9、2 9 3 0、2 9 3 1、
2 9 3 2、2 9 3 3、2 9 3 4、2 9 3 5、2 9 3 6、2 9 3 7、2 9 3 8、2 9 3 9、
2 9 4 0、2 9 4 1、2 9 4 2、2 9 4 3、2 9 4 4、2 9 4 5、2 9 4 6、2 9 4 7、
2 9 4 8、2 9 4 9、2 9 5 0、2 9 5 1、2 9 5 2、2 9 5 3、2 9 5 4、2 9 5 5、
2 9 5 6、2 9 5 7、2 9 5 8、2 9 5 9、2 9 6 0、2 9 6 1、2 9 6 2、2 9 6 3、
2 9 6 4、2 9 6 5、2 9 6 6、2 9 6 7、2 9 6 8、2 9 6 9、2 9 7 0、2 9 7 1、

10

20

30

40

50

2972、2973、2974、2975、2976、2977、2978、2979、
2980、2981、2982、2983、2984、2985、2986、2987、
2988、2989、2990、2991、2992、2993、2994、2995、
2996、2997、2998、2999、3000、3001、3002、3003、
3004、3005、3006、3007、3008、3009、3010、3011、
3012、3013、3014、3015、3016、3017、3018、3019、
3020、3021、3022、3023、3024、3025、3026、3027、
3028、3029、3030、3031、3032、3033、3034、3035、
3036、3037、3038、3039、3040、3041、3042、3043、
3044、3045、3046、3047、3048、3049、3050、3051、
3052、3053、3054、3055、3056、3057、3058、3059、
3060、3061、3062、3063、3064、3065、3066、3067、
3068、3069、3070、3071、3072、3073、3074、3075、
3076、3077、3078、3079、3080、3081、3082、3083、
3084、3085、3086、3087、3088、3089、3090、3091、
3092、3093、3094、3095、3096、3097、3098、3099、
3100、3101、3102、3103、3104、3105、3106、3107、
3108、3109、3110、3111、3112、3113、3114、3115、
3116、3117、3118、3119、3120、3121、3122、3123、
3124、3125、3126、3127、3128、3129、3130、3131、
3132、3133、3134、3135、3136、3137、3138、3139、
3140、3141、3142、3143、3144、3145、3146、3147、
3148、3149、3150、3151、3152、3153、3154、3155、
3156、3157、3158、3159、3160、3161、3162、3163、
3164、3165、3166、3167、3168、3169、3170、3171、
3172、3173、3174、3175、3176、3177、3178、3179、
3180、3181、3182、3183、3184、3185、3186、3187、
3188、3189、3190、3191、3192、3193、3194、3195、
3196、3197、3198、3199、3200、3201、3202、3203、
3204、3205、3206、3207、3208、3209、3210、3211、
3212、3213、3214、3215、3216、3217、3218、3219、
3220、3221、3222、3223、3224、3225、3226、3227、
3228、3229、3230、3231、3232、3233、3234、3235、
3236、3237、3238、3239、3240、3241、3242、3243、
3244、3245、3246、3247、3248、3249、および3250ヌクレ
オチドなどの長さを有していてもよい。ウイルスゲノムの任意のフィラー領域の長さは、
50～100、100～150、150～200、200～250、250～300、3
00～350、350～400、400～450、450～500、500～550、5
50～600、600～650、650～700、700～750、750～800、8
00～850、850～900、900～950、950～1000、1000～105
0、1050～1100、1100～1150、1150～1200、1200～125
0、1250～1300、1300～1350、1350～1400、1400～1450

、1450～1500、1500～1550、1550～1600、1600～1650
、1650～1700、1700～1750、1750～1800、1800～1850
、1850～1900、1900～1950、1950～2000、2000～2050
、2050～2100、2100～2150、2150～2200、2200～2250
、2250～2300、2300～2350、2350～2400、2400～2450
、2450～2500、2500～2550、2550～2600、2600～2650
、2650～2700、2700～2750、2750～2800、2800～2850

10

20

30

40

50

、2850～2900、2900～2950、2950～3000、3000～3050、3050～3100、3100～3150、3150～3200、および3200～3250ヌクレオチドであってもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約55ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約56ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約97ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約103ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約105ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約357ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約363ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約712ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約714ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約1203ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約1209ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約1512ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約1519ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約2395ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約2403ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約2405ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約3013ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約3021ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。

【0314】

特定の実施形態において、AAV粒子ウイルスゲノムは、少なくとも1つの多重フィラー配列領域を含み得る。フィラー領域は、独立に、限定はされないが、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、31

10

20

30

40

50

4、315、316、317、318、319、320、321、322、323、32
4、325、326、327、328、329、330、331、332、333、33
4、335、336、337、338、339、340、341、342、343、34
4、345、346、347、348、349、350、351、352、353、35
4、355、356、357、358、359、360、361、362、363、36
4、365、366、367、368、369、370、371、372、373、37
4、375、376、377、378、379、380、381、382、383、38
4、385、386、387、388、389、390、391、392、393、39
4、395、396、397、398、399、400、401、402、403、40
4、405、406、407、408、409、410、411、412、413、41
4、415、416、417、418、419、420、421、422、423、42
4、425、426、427、428、429、430、431、432、433、43
4、435、436、437、438、439、440、441、442、443、44
4、445、446、447、448、449、450、451、452、453、45
4、455、456、457、458、459、460、461、462、463、46
4、465、466、467、468、469、470、471、472、473、47
4、475、476、477、478、479、480、481、482、483、48
4、485、486、487、488、489、490、491、492、493、49
4、495、496、497、498、499、500、501、502、503、50
4、505、506、507、508、509、510、511、512、513、51
4、515、516、517、518、519、520、521、522、523、52
4、525、526、527、528、529、530、531、532、533、53
4、535、536、537、538、539、540、541、542、543、54
4、545、546、547、548、549、550、551、552、553、55
4、555、556、557、558、559、560、561、562、563、56
4、565、566、567、568、569、570、571、572、573、57
4、575、576、577、578、579、580、581、582、583、58
4、585、586、587、588、589、590、591、592、593、59
4、595、596、597、598、599、600、601、602、603、60
4、605、606、607、608、609、610、611、612、613、61
4、615、616、617、618、619、620、621、622、623、62
4、625、626、627、628、629、630、631、632、633、63
4、635、636、637、638、639、640、641、642、643、64
4、645、646、647、648、649、650、651、652、653、65
4、655、656、657、658、659、660、661、662、663、66
4、665、666、667、668、669、670、671、672、673、67
4、675、676、677、678、679、680、681、682、683、68
4、685、686、687、688、689、690、691、692、693、69
4、695、696、697、698、699、700、701、702、703、70
4、705、706、707、708、709、710、711、712、713、71
4、715、716、717、718、719、720、721、722、723、72
4、725、726、727、728、729、730、731、732、733、73
4、735、736、737、738、739、740、741、742、743、74
4、745、746、747、748、749、750、751、752、753、75
4、755、756、757、758、759、760、761、762、763、76
4、765、766、767、768、769、770、771、772、773、77
4、775、776、777、778、779、780、781、782、783、78
4、785、786、787、788、789、790、791、792、793、79
4、795、796、797、798、799、800、801、802、803、80
4、805、806、807、808、809、810、811、812、813、81

10

20

30

40

50

4、815、816、817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、1000、1001、1002、1003、1004、1005、1006、1007、1008、1009、1010、1011、1012、1013、1014、1015、1016、1017、1018、1019、1020、1021、1022、1023、1024、1025、1026、1027、1028、1029、1030、1031、1032、1033、1034、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1044、1045、1046、1047、1048、1049、1050、1051、1052、1053、1054、1055、1056、1057、1058、1059、1060、1061、1062、1063、1064、1065、1066、1067、1068、1069、1070、1071、1072、1073、1074、1075、1076、1077、1078、1079、1080、1081、1082、1083、1084、1085、1086、1087、1088、1089、1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1106、1107、1108、1109、1110、1111、1112、1113、1114、1115、1116、1117、1118、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、1126、1127、1128、1129、1130、1131、1132、1133、1134、1135、1136、1137、1138、1139、1140、1141、1142、1143、1144、1145、1146、1147、1148、1149、1150、1151、1152、1153、1154、1155、1156、1157、1158、1159、1160、1161、1162、1163、1164、1165、1166、1167、1168、1169、1170、1171、1172、1173、1174、1175、1176、1177、1178、1179、1180、1181、1182、1183、1184、1185、1186、1187、1188、1189、1190、1191、1192、1193、1194、1195、1196、1197、1198、1199、1200、1201、1202、1203、1204、1205、1206、1207、1208、1209、1210、1211、1212、1213、1214、1215、1216、1217、1218、1219、1220、1221、1222、1223、1224、1225、1226、1227、1228、1229、1230、1231、1232、1233、1234、1235、1236、1237、1238、1239、1240、1241、1242、1243、1244、1245、1246、1247、1248、1249、1250、1251

10

20

30

40

50

1、1 2 5 2、1 2 5 3、1 2 5 4、1 2 5 5、1 2 5 6、1 2 5 7、1 2 5 8、1 2 5 9

、1 2 6 0、1 2 6 1、1 2 6 2、1 2 6 3、1 2 6 4、1 2 6 5、1 2 6 6、1 2 6 7
、1 2 6 8、1 2 6 9、1 2 7 0、1 2 7 1、1 2 7 2、1 2 7 3、1 2 7 4、1 2 7 5
、1 2 7 6、1 2 7 7、1 2 7 8、1 2 7 9、1 2 8 0、1 2 8 1、1 2 8 2、1 2 8 3
、1 2 8 4、1 2 8 5、1 2 8 6、1 2 8 7、1 2 8 8、1 2 8 9、1 2 9 0、1 2 9 1
、1 2 9 2、1 2 9 3、1 2 9 4、1 2 9 5、1 2 9 6、1 2 9 7、1 2 9 8、1 2 9 9
、1 3 0 0、1 3 0 1、1 3 0 2、1 3 0 3、1 3 0 4、1 3 0 5、1 3 0 6、1 3 0 7
、1 3 0 8、1 3 0 9、1 3 1 0、1 3 1 1、1 3 1 2、1 3 1 3、1 3 1 4、1 3 1 5
、1 3 1 6、1 3 1 7、1 3 1 8、1 3 1 9、1 3 2 0、1 3 2 1、1 3 2 2、1 3 2 3
、1 3 2 4、1 3 2 5、1 3 2 6、1 3 2 7、1 3 2 8、1 3 2 9、1 3 3 0、1 3 3 1
、1 3 3 2、1 3 3 3、1 3 3 4、1 3 3 5、1 3 3 6、1 3 3 7、1 3 3 8、1 3 3 9
、1 3 4 0、1 3 4 1、1 3 4 2、1 3 4 3、1 3 4 4、1 3 4 5、1 3 4 6、1 3 4 7
、1 3 4 8、1 3 4 9、1 3 5 0、1 3 5 1、1 3 5 2、1 3 5 3、1 3 5 4、1 3 5 5
、1 3 5 6、1 3 5 7、1 3 5 8、1 3 5 9、1 3 6 0、1 3 6 1、1 3 6 2、1 3 6 3
、1 3 6 4、1 3 6 5、1 3 6 6、1 3 6 7、1 3 6 8、1 3 6 9、1 3 7 0、1 3 7 1
、1 3 7 2、1 3 7 3、1 3 7 4、1 3 7 5、1 3 7 6、1 3 7 7、1 3 7 8、1 3 7 9
、1 3 8 0、1 3 8 1、1 3 8 2、1 3 8 3、1 3 8 4、1 3 8 5、1 3 8 6、1 3 8 7
、1 3 8 8、1 3 8 9、1 3 9 0、1 3 9 1、1 3 9 2、1 3 9 3、1 3 9 4、1 3 9 5
、1 3 9 6、1 3 9 7、1 3 9 8、1 3 9 9、1 4 0 0、1 4 0 1、1 4 0 2、1 4 0 3
、1 4 0 4、1 4 0 5、1 4 0 6、1 4 0 7、1 4 0 8、1 4 0 9、1 4 1 0、1 4 1 1
、1 4 1 2、1 4 1 3、1 4 1 4、1 4 1 5、1 4 1 6、1 4 1 7、1 4 1 8、1 4 1 9
、1 4 2 0、1 4 2 1、1 4 2 2、1 4 2 3、1 4 2 4、1 4 2 5、1 4 2 6、1 4 2 7
、1 4 2 8、1 4 2 9、1 4 3 0、1 4 3 1、1 4 3 2、1 4 3 3、1 4 3 4、1 4 3 5
、1 4 3 6、1 4 3 7、1 4 3 8、1 4 3 9、1 4 4 0、1 4 4 1、1 4 4 2、1 4 4 3
、1 4 4 4、1 4 4 5、1 4 4 6、1 4 4 7、1 4 4 8、1 4 4 9、1 4 5 0、1 4 5 1
、1 4 5 2、1 4 5 3、1 4 5 4、1 4 5 5、1 4 5 6、1 4 5 7、1 4 5 8、1 4 5 9
、1 4 6 0、1 4 6 1、1 4 6 2、1 4 6 3、1 4 6 4、1 4 6 5、1 4 6 6、1 4 6 7
、1 4 6 8、1 4 6 9、1 4 7 0、1 4 7 1、1 4 7 2、1 4 7 3、1 4 7 4、1 4 7 5
、1 4 7 6、1 4 7 7、1 4 7 8、1 4 7 9、1 4 8 0、1 4 8 1、1 4 8 2、1 4 8 3
、1 4 8 4、1 4 8 5、1 4 8 6、1 4 8 7、1 4 8 8、1 4 8 9、1 4 9 0、1 4 9 1
、1 4 9 2、1 4 9 3、1 4 9 4、1 4 9 5、1 4 9 6、1 4 9 7、1 4 9 8、1 4 9 9
、1 5 0 0、1 5 0 1、1 5 0 2、1 5 0 3、1 5 0 4、1 5 0 5、1 5 0 6、1 5 0 7
、1 5 0 8、1 5 0 9、1 5 1 0、1 5 1 1、1 5 1 2、1 5 1 3、1 5 1 4、1 5 1 5
、1 5 1 6、1 5 1 7、1 5 1 8、1 5 1 9、1 5 2 0、1 5 2 1、1 5 2 2、1 5 2 3
、1 5 2 4、1 5 2 5、1 5 2 6、1 5 2 7、1 5 2 8、1 5 2 9、1 5 3 0、1 5 3 1
、1 5 3 2、1 5 3 3、1 5 3 4、1 5 3 5、1 5 3 6、1 5 3 7、1 5 3 8、1 5 3 9
、1 5 4 0、1 5 4 1、1 5 4 2、1 5 4 3、1 5 4 4、1 5 4 5、1 5 4 6、1 5 4 7
、1 5 4 8、1 5 4 9、1 5 5 0、1 5 5 1、1 5 5 2、1 5 5 3、1 5 5 4、1 5 5 5
、1 5 5 6、1 5 5 7、1 5 5 8、1 5 5 9、1 5 6 0、1 5 6 1、1 5 6 2、1 5 6 3
、1 5 6 4、1 5 6 5、1 5 6 6、1 5 6 7、1 5 6 8、1 5 6 9、1 5 7 0、1 5 7 1
、1 5 7 2、1 5 7 3、1 5 7 4、1 5 7 5、1 5 7 6、1 5 7 7、1 5 7 8、1 5 7 9
、1 5 8 0、1 5 8 1、1 5 8 2、1 5 8 3、1 5 8 4、1 5 8 5、1 5 8 6、1 5 8 7
、1 5 8 8、1 5 8 9、1 5 9 0、1 5 9 1、1 5 9 2、1 5 9 3、1 5 9 4、1 5 9 5
、1 5 9 6、1 5 9 7、1 5 9 8、1 5 9 9、1 6 0 0、1 6 0 1、1 6 0 2、1 6 0 3
、1 6 0 4、1 6 0 5、1 6 0 6、1 6 0 7、1 6 0 8、1 6 0 9、1 6 1 0、1 6 1 1
、1 6 1 2、1 6 1 3、1 6 1 4、1 6 1 5、1 6 1 6、1 6 1 7、1 6 1 8、1 6 1 9
、1 6 2 0、1 6 2 1、1 6 2 2、1 6 2 3、1 6 2 4、1 6 2 5、1 6 2 6、1 6 2 7
、1 6 2 8、1 6 2 9、1 6 3 0、1 6 3 1、1 6 3 2、1 6 3 3、1 6 3 4、1 6 3 5
、1 6 3 6、1 6 3 7、1 6 3 8、1 6 3 9、1 6 4 0、1 6 4 1、1 6 4 2、1 6 4 3

10

20

30

40

50

、 1 6 4 4、 1 6 4 5、 1 6 4 6、 1 6 4 7、 1 6 4 8、 1 6 4 9、 1 6 5 0、 1 6 5 1
、 1 6 5 2、 1 6 5 3、 1 6 5 4、 1 6 5 5、 1 6 5 6、 1 6 5 7、 1 6 5 8、 1 6 5 9
、 1 6 6 0、 1 6 6 1、 1 6 6 2、 1 6 6 3、 1 6 6 4、 1 6 6 5、 1 6 6 6、 1 6 6 7
、 1 6 6 8、 1 6 6 9、 1 6 7 0、 1 6 7 1、 1 6 7 2、 1 6 7 3、 1 6 7 4、 1 6 7 5
、 1 6 7 6、 1 6 7 7、 1 6 7 8、 1 6 7 9、 1 6 8 0、 1 6 8 1、 1 6 8 2、 1 6 8 3
、 1 6 8 4、 1 6 8 5、 1 6 8 6、 1 6 8 7、 1 6 8 8、 1 6 8 9、 1 6 9 0、 1 6 9 1
、 1 6 9 2、 1 6 9 3、 1 6 9 4、 1 6 9 5、 1 6 9 6、 1 6 9 7、 1 6 9 8、 1 6 9 9
、 1 7 0 0、 1 7 0 1、 1 7 0 2、 1 7 0 3、 1 7 0 4、 1 7 0 5、 1 7 0 6、 1 7 0 7
、 1 7 0 8、 1 7 0 9、 1 7 1 0、 1 7 1 1、 1 7 1 2、 1 7 1 3、 1 7 1 4、 1 7 1 5
、 1 7 1 6、 1 7 1 7、 1 7 1 8、 1 7 1 9、 1 7 2 0、 1 7 2 1、 1 7 2 2、 1 7 2 3
、 1 7 2 4、 1 7 2 5、 1 7 2 6、 1 7 2 7、 1 7 2 8、 1 7 2 9、 1 7 3 0、 1 7 3 1
、 1 7 3 2、 1 7 3 3、 1 7 3 4、 1 7 3 5、 1 7 3 6、 1 7 3 7、 1 7 3 8、 1 7 3 9
、 1 7 4 0、 1 7 4 1、 1 7 4 2、 1 7 4 3、 1 7 4 4、 1 7 4 5、 1 7 4 6、 1 7 4 7
、 1 7 4 8、 1 7 4 9、 1 7 5 0、 1 7 5 1、 1 7 5 2、 1 7 5 3、 1 7 5 4、 1 7 5 5
、 1 7 5 6、 1 7 5 7、 1 7 5 8、 1 7 5 9、 1 7 6 0、 1 7 6 1、 1 7 6 2、 1 7 6 3
、 1 7 6 4、 1 7 6 5、 1 7 6 6、 1 7 6 7、 1 7 6 8、 1 7 6 9、 1 7 7 0、 1 7 7 1
、 1 7 7 2、 1 7 7 3、 1 7 7 4、 1 7 7 5、 1 7 7 6、 1 7 7 7、 1 7 7 8、 1 7 7 9
、 1 7 8 0、 1 7 8 1、 1 7 8 2、 1 7 8 3、 1 7 8 4、 1 7 8 5、 1 7 8 6、 1 7 8 7
、 1 7 8 8、 1 7 8 9、 1 7 9 0、 1 7 9 1、 1 7 9 2、 1 7 9 3、 1 7 9 4、 1 7 9 5
、 1 7 9 6、 1 7 9 7、 1 7 9 8、 1 7 9 9、 1 8 0 0、 1 8 0 1、 1 8 0 2、 1 8 0 3
、 1 8 0 4、 1 8 0 5、 1 8 0 6、 1 8 0 7、 1 8 0 8、 1 8 0 9、 1 8 1 0、 1 8 1 1
、 1 8 1 2、 1 8 1 3、 1 8 1 4、 1 8 1 5、 1 8 1 6、 1 8 1 7、 1 8 1 8、 1 8 1 9
、 1 8 2 0、 1 8 2 1、 1 8 2 2、 1 8 2 3、 1 8 2 4、 1 8 2 5、 1 8 2 6、 1 8 2 7
、 1 8 2 8、 1 8 2 9、 1 8 3 0、 1 8 3 1、 1 8 3 2、 1 8 3 3、 1 8 3 4、 1 8 3 5
、 1 8 3 6、 1 8 3 7、 1 8 3 8、 1 8 3 9、 1 8 4 0、 1 8 4 1、 1 8 4 2、 1 8 4 3
、 1 8 4 4、 1 8 4 5、 1 8 4 6、 1 8 4 7、 1 8 4 8、 1 8 4 9、 1 8 5 0、 1 8 5 1
、 1 8 5 2、 1 8 5 3、 1 8 5 4、 1 8 5 5、 1 8 5 6、 1 8 5 7、 1 8 5 8、 1 8 5 9
、 1 8 6 0、 1 8 6 1、 1 8 6 2、 1 8 6 3、 1 8 6 4、 1 8 6 5、 1 8 6 6、 1 8 6 7
、 1 8 6 8、 1 8 6 9、 1 8 7 0、 1 8 7 1、 1 8 7 2、 1 8 7 3、 1 8 7 4、 1 8 7 5
、 1 8 7 6、 1 8 7 7、 1 8 7 8、 1 8 7 9、 1 8 8 0、 1 8 8 1、 1 8 8 2、 1 8 8 3
、 1 8 8 4、 1 8 8 5、 1 8 8 6、 1 8 8 7、 1 8 8 8、 1 8 8 9、 1 8 9 0、 1 8 9 1
、 1 8 9 2、 1 8 9 3、 1 8 9 4、 1 8 9 5、 1 8 9 6、 1 8 9 7、 1 8 9 8、 1 8 9 9
、 1 9 0 0、 1 9 0 1、 1 9 0 2、 1 9 0 3、 1 9 0 4、 1 9 0 5、 1 9 0 6、 1 9 0 7
、 1 9 0 8、 1 9 0 9、 1 9 1 0、 1 9 1 1、 1 9 1 2、 1 9 1 3、 1 9 1 4、 1 9 1 5
、 1 9 1 6、 1 9 1 7、 1 9 1 8、 1 9 1 9、 1 9 2 0、 1 9 2 1、 1 9 2 2、 1 9 2 3
、 1 9 2 4、 1 9 2 5、 1 9 2 6、 1 9 2 7、 1 9 2 8、 1 9 2 9、 1 9 3 0、 1 9 3 1
、 1 9 3 2、 1 9 3 3、 1 9 3 4、 1 9 3 5、 1 9 3 6、 1 9 3 7、 1 9 3 8、 1 9 3 9
、 1 9 4 0、 1 9 4 1、 1 9 4 2、 1 9 4 3、 1 9 4 4、 1 9 4 5、 1 9 4 6、 1 9 4 7
、 1 9 4 8、 1 9 4 9、 1 9 5 0、 1 9 5 1、 1 9 5 2、 1 9 5 3、 1 9 5 4、 1 9 5 5
、 1 9 5 6、 1 9 5 7、 1 9 5 8、 1 9 5 9、 1 9 6 0、 1 9 6 1、 1 9 6 2、 1 9 6 3
、 1 9 6 4、 1 9 6 5、 1 9 6 6、 1 9 6 7、 1 9 6 8、 1 9 6 9、 1 9 7 0、 1 9 7 1
、 1 9 7 2、 1 9 7 3、 1 9 7 4、 1 9 7 5、 1 9 7 6、 1 9 7 7、 1 9 7 8、 1 9 7 9
、 1 9 8 0、 1 9 8 1、 1 9 8 2、 1 9 8 3、 1 9 8 4、 1 9 8 5、 1 9 8 6、 1 9 8 7
、 1 9 8 8、 1 9 8 9、 1 9 9 0、 1 9 9 1、 1 9 9 2、 1 9 9 3、 1 9 9 4、 1 9 9 5
、 1 9 9 6、 1 9 9 7、 1 9 9 8、 1 9 9 9、 2 0 0 0、 2 0 0 1、 2 0 0 2、 2 0 0 3
、 2 0 0 4、 2 0 0 5、 2 0 0 6、 2 0 0 7、 2 0 0 8、 2 0 0 9、 2 0 1 0、 2 0 1 1
、 2 0 1 2、 2 0 1 3、 2 0 1 4、 2 0 1 5、 2 0 1 6、 2 0 1 7、 2 0 1 8、 2 0 1 9
、 2 0 2 0、 2 0 2 1、 2 0 2 2、 2 0 2 3、 2 0 2 4、 2 0 2 5、 2 0 2 6、 2 0 2 7
、 2 0 2 8、 2 0 2 9、 2 0 3 0、 2 0 3 1、 2 0 3 2、 2 0 3 3、 2 0 3 4、 2 0 3 5
、 2 0 3 6、 2 0 3 7、 2 0 3 8、 2 0 3 9、 2 0 4 0、 2 0 4 1、 2 0 4 2、 2 0 4 3

10

20

30

40

50

、 2 0 4 4、 2 0 4 5、 2 0 4 6、 2 0 4 7、 2 0 4 8、 2 0 4 9、 2 0 5 0、 2 0 5 1
、 2 0 5 2、 2 0 5 3、 2 0 5 4、 2 0 5 5、 2 0 5 6、 2 0 5 7、 2 0 5 8、 2 0 5 9
、 2 0 6 0、 2 0 6 1、 2 0 6 2、 2 0 6 3、 2 0 6 4、 2 0 6 5、 2 0 6 6、 2 0 6 7
、 2 0 6 8、 2 0 6 9、 2 0 7 0、 2 0 7 1、 2 0 7 2、 2 0 7 3、 2 0 7 4、 2 0 7 5
、 2 0 7 6、 2 0 7 7、 2 0 7 8、 2 0 7 9、 2 0 8 0、 2 0 8 1、 2 0 8 2、 2 0 8 3
、 2 0 8 4、 2 0 8 5、 2 0 8 6、 2 0 8 7、 2 0 8 8、 2 0 8 9、 2 0 9 0、 2 0 9 1
、 2 0 9 2、 2 0 9 3、 2 0 9 4、 2 0 9 5、 2 0 9 6、 2 0 9 7、 2 0 9 8、 2 0 9 9
、 2 1 0 0、 2 1 0 1、 2 1 0 2、 2 1 0 3、 2 1 0 4、 2 1 0 5、 2 1 0 6、 2 1 0 7
、 2 1 0 8、 2 1 0 9、 2 1 1 0、 2 1 1 1、 2 1 1 2、 2 1 1 3、 2 1 1 4、 2 1 1 5
、 2 1 1 6、 2 1 1 7、 2 1 1 8、 2 1 1 9、 2 1 2 0、 2 1 2 1、 2 1 2 2、 2 1 2 3
、 2 1 2 4、 2 1 2 5、 2 1 2 6、 2 1 2 7、 2 1 2 8、 2 1 2 9、 2 1 3 0、 2 1 3 1
、 2 1 3 2、 2 1 3 3、 2 1 3 4、 2 1 3 5、 2 1 3 6、 2 1 3 7、 2 1 3 8、 2 1 3 9
、 2 1 4 0、 2 1 4 1、 2 1 4 2、 2 1 4 3、 2 1 4 4、 2 1 4 5、 2 1 4 6、 2 1 4 7
、 2 1 4 8、 2 1 4 9、 2 1 5 0、 2 1 5 1、 2 1 5 2、 2 1 5 3、 2 1 5 4、 2 1 5 5
、 2 1 5 6、 2 1 5 7、 2 1 5 8、 2 1 5 9、 2 1 6 0、 2 1 6 1、 2 1 6 2、 2 1 6 3
、 2 1 6 4、 2 1 6 5、 2 1 6 6、 2 1 6 7、 2 1 6 8、 2 1 6 9、 2 1 7 0、 2 1 7 1
、 2 1 7 2、 2 1 7 3、 2 1 7 4、 2 1 7 5、 2 1 7 6、 2 1 7 7、 2 1 7 8、 2 1 7 9
、 2 1 8 0、 2 1 8 1、 2 1 8 2、 2 1 8 3、 2 1 8 4、 2 1 8 5、 2 1 8 6、 2 1 8 7
、 2 1 8 8、 2 1 8 9、 2 1 9 0、 2 1 9 1、 2 1 9 2、 2 1 9 3、 2 1 9 4、 2 1 9 5
、 2 1 9 6、 2 1 9 7、 2 1 9 8、 2 1 9 9、 2 2 0 0、 2 2 0 1、 2 2 0 2、 2 2 0 3
、 2 2 0 4、 2 2 0 5、 2 2 0 6、 2 2 0 7、 2 2 0 8、 2 2 0 9、 2 2 1 0、 2 2 1 1
、 2 2 1 2、 2 2 1 3、 2 2 1 4、 2 2 1 5、 2 2 1 6、 2 2 1 7、 2 2 1 8、 2 2 1 9
、 2 2 2 0、 2 2 2 1、 2 2 2 2、 2 2 2 3、 2 2 2 4、 2 2 2 5、 2 2 2 6、 2 2 2 7
、 2 2 2 8、 2 2 2 9、 2 2 3 0、 2 2 3 1、 2 2 3 2、 2 2 3 3、 2 2 3 4、 2 2 3 5
、 2 2 3 6、 2 2 3 7、 2 2 3 8、 2 2 3 9、 2 2 4 0、 2 2 4 1、 2 2 4 2、 2 2 4 3
、 2 2 4 4、 2 2 4 5、 2 2 4 6、 2 2 4 7、 2 2 4 8、 2 2 4 9、 2 2 5 0、 2 2 5 1
、 2 2 5 2、 2 2 5 3、 2 2 5 4、 2 2 5 5、 2 2 5 6、 2 2 5 7、 2 2 5 8、 2 2 5 9
、 2 2 6 0、 2 2 6 1、 2 2 6 2、 2 2 6 3、 2 2 6 4、 2 2 6 5、 2 2 6 6、 2 2 6 7
、 2 2 6 8、 2 2 6 9、 2 2 7 0、 2 2 7 1、 2 2 7 2、 2 2 7 3、 2 2 7 4、 2 2 7 5
、 2 2 7 6、 2 2 7 7、 2 2 7 8、 2 2 7 9、 2 2 8 0、 2 2 8 1、 2 2 8 2、 2 2 8 3、

10

20

30

2 2 8 4、 2 2 8 5、 2 2 8 6、 2 2 8 7、 2 2 8 8、 2 2 8 9、 2 2 9 0、 2 2 9 1、
2 2 9 2、 2 2 9 3、 2 2 9 4、 2 2 9 5、 2 2 9 6、 2 2 9 7、 2 2 9 8、 2 2 9 9、
2 3 0 0、 2 3 0 1、 2 3 0 2、 2 3 0 3、 2 3 0 4、 2 3 0 5、 2 3 0 6、 2 3 0 7、
2 3 0 8、 2 3 0 9、 2 3 1 0、 2 3 1 1、 2 3 1 2、 2 3 1 3、 2 3 1 4、 2 3 1 5、
2 3 1 6、 2 3 1 7、 2 3 1 8、 2 3 1 9、 2 3 2 0、 2 3 2 1、 2 3 2 2、 2 3 2 3、
2 3 2 4、 2 3 2 5、 2 3 2 6、 2 3 2 7、 2 3 2 8、 2 3 2 9、 2 3 3 0、 2 3 3 1、
2 3 3 2、 2 3 3 3、 2 3 3 4、 2 3 3 5、 2 3 3 6、 2 3 3 7、 2 3 3 8、 2 3 3 9、
2 3 4 0、 2 3 4 1、 2 3 4 2、 2 3 4 3、 2 3 4 4、 2 3 4 5、 2 3 4 6、 2 3 4 7、
2 3 4 8、 2 3 4 9、 2 3 5 0、 2 3 5 1、 2 3 5 2、 2 3 5 3、 2 3 5 4、 2 3 5 5、
2 3 5 6、 2 3 5 7、 2 3 5 8、 2 3 5 9、 2 3 6 0、 2 3 6 1、 2 3 6 2、 2 3 6 3、
2 3 6 4、 2 3 6 5、 2 3 6 6、 2 3 6 7、 2 3 6 8、 2 3 6 9、 2 3 7 0、 2 3 7 1、
2 3 7 2、 2 3 7 3、 2 3 7 4、 2 3 7 5、 2 3 7 6、 2 3 7 7、 2 3 7 8、 2 3 7 9、
2 3 8 0、 2 3 8 1、 2 3 8 2、 2 3 8 3、 2 3 8 4、 2 3 8 5、 2 3 8 6、 2 3 8 7、
2 3 8 8、 2 3 8 9、 2 3 9 0、 2 3 9 1、 2 3 9 2、 2 3 9 3、 2 3 9 4、 2 3 9 5、
2 3 9 6、 2 3 9 7、 2 3 9 8、 2 3 9 9、 2 4 0 0、 2 4 0 1、 2 4 0 2、 2 4 0 3、
2 4 0 4、 2 4 0 5、 2 4 0 6、 2 4 0 7、 2 4 0 8、 2 4 0 9、 2 4 1 0、 2 4 1 1、
2 4 1 2、 2 4 1 3、 2 4 1 4、 2 4 1 5、 2 4 1 6、 2 4 1 7、 2 4 1 8、 2 4 1 9、
2 4 2 0、 2 4 2 1、 2 4 2 2、 2 4 2 3、 2 4 2 4、 2 4 2 5、 2 4 2 6、 2 4 2 7、
2 4 2 8、 2 4 2 9、 2 4 3 0、 2 4 3 1、 2 4 3 2、 2 4 3 3、 2 4 3 4、 2 4 3 5、

40

50

2 4 3 6、2 4 3 7、2 4 3 8、2 4 3 9、2 4 4 0、2 4 4 1、2 4 4 2、2 4 4 3、
2 4 4 4、2 4 4 5、2 4 4 6、2 4 4 7、2 4 4 8、2 4 4 9、2 4 5 0、2 4 5 1、
2 4 5 2、2 4 5 3、2 4 5 4、2 4 5 5、2 4 5 6、2 4 5 7、2 4 5 8、2 4 5 9、
2 4 6 0、2 4 6 1、2 4 6 2、2 4 6 3、2 4 6 4、2 4 6 5、2 4 6 6、2 4 6 7、
2 4 6 8、2 4 6 9、2 4 7 0、2 4 7 1、2 4 7 2、2 4 7 3、2 4 7 4、2 4 7 5、
2 4 7 6、2 4 7 7、2 4 7 8、2 4 7 9、2 4 8 0、2 4 8 1、2 4 8 2、2 4 8 3、
2 4 8 4、2 4 8 5、2 4 8 6、2 4 8 7、2 4 8 8、2 4 8 9、2 4 9 0、2 4 9 1、
2 4 9 2、2 4 9 3、2 4 9 4、2 4 9 5、2 4 9 6、2 4 9 7、2 4 9 8、2 4 9 9、
2 5 0 0、2 5 0 1、2 5 0 2、2 5 0 3、2 5 0 4、2 5 0 5、2 5 0 6、2 5 0 7、
2 5 0 8、2 5 0 9、2 5 1 0、2 5 1 1、2 5 1 2、2 5 1 3、2 5 1 4、2 5 1 5、
2 5 1 6、2 5 1 7、2 5 1 8、2 5 1 9、2 5 2 0、2 5 2 1、2 5 2 2、2 5 2 3、
2 5 2 4、2 5 2 5、2 5 2 6、2 5 2 7、2 5 2 8、2 5 2 9、2 5 3 0、2 5 3 1、
2 5 3 2、2 5 3 3、2 5 3 4、2 5 3 5、2 5 3 6、2 5 3 7、2 5 3 8、2 5 3 9、
2 5 4 0、2 5 4 1、2 5 4 2、2 5 4 3、2 5 4 4、2 5 4 5、2 5 4 6、2 5 4 7、
2 5 4 8、2 5 4 9、2 5 5 0、2 5 5 1、2 5 5 2、2 5 5 3、2 5 5 4、2 5 5 5、
2 5 5 6、2 5 5 7、2 5 5 8、2 5 5 9、2 5 6 0、2 5 6 1、2 5 6 2、2 5 6 3、
2 5 6 4、2 5 6 5、2 5 6 6、2 5 6 7、2 5 6 8、2 5 6 9、2 5 7 0、2 5 7 1、
2 5 7 2、2 5 7 3、2 5 7 4、2 5 7 5、2 5 7 6、2 5 7 7、2 5 7 8、2 5 7 9、
2 5 8 0、2 5 8 1、2 5 8 2、2 5 8 3、2 5 8 4、2 5 8 5、2 5 8 6、2 5 8 7、
2 5 8 8、2 5 8 9、2 5 9 0、2 5 9 1、2 5 9 2、2 5 9 3、2 5 9 4、2 5 9 5、
2 5 9 6、2 5 9 7、2 5 9 8、2 5 9 9、2 6 0 0、2 6 0 1、2 6 0 2、2 6 0 3、
2 6 0 4、2 6 0 5、2 6 0 6、2 6 0 7、2 6 0 8、2 6 0 9、2 6 1 0、2 6 1 1、
2 6 1 2、2 6 1 3、2 6 1 4、2 6 1 5、2 6 1 6、2 6 1 7、2 6 1 8、2 6 1 9、
2 6 2 0、2 6 2 1、2 6 2 2、2 6 2 3、2 6 2 4、2 6 2 5、2 6 2 6、2 6 2 7、
2 6 2 8、2 6 2 9、2 6 3 0、2 6 3 1、2 6 3 2、2 6 3 3、2 6 3 4、2 6 3 5、
2 6 3 6、2 6 3 7、2 6 3 8、2 6 3 9、2 6 4 0、2 6 4 1、2 6 4 2、2 6 4 3、
2 6 4 4、2 6 4 5、2 6 4 6、2 6 4 7、2 6 4 8、2 6 4 9、2 6 5 0、2 6 5 1、
2 6 5 2、2 6 5 3、2 6 5 4、2 6 5 5、2 6 5 6、2 6 5 7、2 6 5 8、2 6 5 9、
2 6 6 0、2 6 6 1、2 6 6 2、2 6 6 3、2 6 6 4、2 6 6 5、2 6 6 6、2 6 6 7、
2 6 6 8、2 6 6 9、2 6 7 0、2 6 7 1、2 6 7 2、2 6 7 3、2 6 7 4、2 6 7 5、
2 6 7 6、2 6 7 7、2 6 7 8、2 6 7 9、2 6 8 0、2 6 8 1、2 6 8 2、2 6 8 3、
2 6 8 4、2 6 8 5、2 6 8 6、2 6 8 7、2 6 8 8、2 6 8 9、2 6 9 0、2 6 9 1、
2 6 9 2、2 6 9 3、2 6 9 4、2 6 9 5、2 6 9 6、2 6 9 7、2 6 9 8、2 6 9 9、
2 7 0 0、2 7 0 1、2 7 0 2、2 7 0 3、2 7 0 4、2 7 0 5、2 7 0 6、2 7 0 7、
2 7 0 8、2 7 0 9、2 7 1 0、2 7 1 1、2 7 1 2、2 7 1 3、2 7 1 4、2 7 1 5、
2 7 1 6、2 7 1 7、2 7 1 8、2 7 1 9、2 7 2 0、2 7 2 1、2 7 2 2、2 7 2 3、
2 7 2 4、2 7 2 5、2 7 2 6、2 7 2 7、2 7 2 8、2 7 2 9、2 7 3 0、2 7 3 1、
2 7 3 2、2 7 3 3、2 7 3 4、2 7 3 5、2 7 3 6、2 7 3 7、2 7 3 8、2 7 3 9、
2 7 4 0、2 7 4 1、2 7 4 2、2 7 4 3、2 7 4 4、2 7 4 5、2 7 4 6、2 7 4 7、
2 7 4 8、2 7 4 9、2 7 5 0、2 7 5 1、2 7 5 2、2 7 5 3、2 7 5 4、2 7 5 5、
2 7 5 6、2 7 5 7、2 7 5 8、2 7 5 9、2 7 6 0、2 7 6 1、2 7 6 2、2 7 6 3、
2 7 6 4、2 7 6 5、2 7 6 6、2 7 6 7、2 7 6 8、2 7 6 9、2 7 7 0、2 7 7 1、
2 7 7 2、2 7 7 3、2 7 7 4、2 7 7 5、2 7 7 6、2 7 7 7、2 7 7 8、2 7 7 9、
2 7 8 0、2 7 8 1、2 7 8 2、2 7 8 3、2 7 8 4、2 7 8 5、2 7 8 6、2 7 8 7、
2 7 8 8、2 7 8 9、2 7 9 0、2 7 9 1、2 7 9 2、2 7 9 3、2 7 9 4、2 7 9 5、
2 7 9 6、2 7 9 7、2 7 9 8、2 7 9 9、2 8 0 0、2 8 0 1、2 8 0 2、2 8 0 3、
2 8 0 4、2 8 0 5、2 8 0 6、2 8 0 7、2 8 0 8、2 8 0 9、2 8 1 0、2 8 1 1、
2 8 1 2、2 8 1 3、2 8 1 4、2 8 1 5、2 8 1 6、2 8 1 7、2 8 1 8、2 8 1 9、
2 8 2 0、2 8 2 1、2 8 2 2、2 8 2 3、2 8 2 4、2 8 2 5、2 8 2 6、2 8 2 7、
2 8 2 8、2 8 2 9、2 8 3 0、2 8 3 1、2 8 3 2、2 8 3 3、2 8 3 4、2 8 3 5、

10

20

30

40

50

2 8 3 6、2 8 3 7、2 8 3 8、2 8 3 9、2 8 4 0、2 8 4 1、2 8 4 2、2 8 4 3、
2 8 4 4、2 8 4 5、2 8 4 6、2 8 4 7、2 8 4 8、2 8 4 9、2 8 5 0、2 8 5 1、
2 8 5 2、2 8 5 3、2 8 5 4、2 8 5 5、2 8 5 6、2 8 5 7、2 8 5 8、2 8 5 9、
2 8 6 0、2 8 6 1、2 8 6 2、2 8 6 3、2 8 6 4、2 8 6 5、2 8 6 6、2 8 6 7、
2 8 6 8、2 8 6 9、2 8 7 0、2 8 7 1、2 8 7 2、2 8 7 3、2 8 7 4、2 8 7 5、
2 8 7 6、2 8 7 7、2 8 7 8、2 8 7 9、2 8 8 0、2 8 8 1、2 8 8 2、2 8 8 3、
2 8 8 4、2 8 8 5、2 8 8 6、2 8 8 7、2 8 8 8、2 8 8 9、2 8 9 0、2 8 9 1、
2 8 9 2、2 8 9 3、2 8 9 4、2 8 9 5、2 8 9 6、2 8 9 7、2 8 9 8、2 8 9 9、
2 9 0 0、2 9 0 1、2 9 0 2、2 9 0 3、2 9 0 4、2 9 0 5、2 9 0 6、2 9 0 7、
2 9 0 8、2 9 0 9、2 9 1 0、2 9 1 1、2 9 1 2、2 9 1 3、2 9 1 4、2 9 1 5、
2 9 1 6、2 9 1 7、2 9 1 8、2 9 1 9、2 9 2 0、2 9 2 1、2 9 2 2、2 9 2 3、
2 9 2 4、2 9 2 5、2 9 2 6、2 9 2 7、2 9 2 8、2 9 2 9、2 9 3 0、2 9 3 1、
2 9 3 2、2 9 3 3、2 9 3 4、2 9 3 5、2 9 3 6、2 9 3 7、2 9 3 8、2 9 3 9、
2 9 4 0、2 9 4 1、2 9 4 2、2 9 4 3、2 9 4 4、2 9 4 5、2 9 4 6、2 9 4 7、
2 9 4 8、2 9 4 9、2 9 5 0、2 9 5 1、2 9 5 2、2 9 5 3、2 9 5 4、2 9 5 5、
2 9 5 6、2 9 5 7、2 9 5 8、2 9 5 9、2 9 6 0、2 9 6 1、2 9 6 2、2 9 6 3、
2 9 6 4、2 9 6 5、2 9 6 6、2 9 6 7、2 9 6 8、2 9 6 9、2 9 7 0、2 9 7 1、
2 9 7 2、2 9 7 3、2 9 7 4、2 9 7 5、2 9 7 6、2 9 7 7、2 9 7 8、2 9 7 9、
2 9 8 0、2 9 8 1、2 9 8 2、2 9 8 3、2 9 8 4、2 9 8 5、2 9 8 6、2 9 8 7、
2 9 8 8、2 9 8 9、2 9 9 0、2 9 9 1、2 9 9 2、2 9 9 3、2 9 9 4、2 9 9 5、
2 9 9 6、2 9 9 7、2 9 9 8、2 9 9 9、3 0 0 0、3 0 0 1、3 0 0 2、3 0 0 3、
3 0 0 4、3 0 0 5、3 0 0 6、3 0 0 7、3 0 0 8、3 0 0 9、3 0 1 0、3 0 1 1、
3 0 1 2、3 0 1 3、3 0 1 4、3 0 1 5、3 0 1 6、3 0 1 7、3 0 1 8、3 0 1 9、
3 0 2 0、3 0 2 1、3 0 2 2、3 0 2 3、3 0 2 4、3 0 2 5、3 0 2 6、3 0 2 7、
3 0 2 8、3 0 2 9、3 0 3 0、3 0 3 1、3 0 3 2、3 0 3 3、3 0 3 4、3 0 3 5、
3 0 3 6、3 0 3 7、3 0 3 8、3 0 3 9、3 0 4 0、3 0 4 1、3 0 4 2、3 0 4 3、
3 0 4 4、3 0 4 5、3 0 4 6、3 0 4 7、3 0 4 8、3 0 4 9、3 0 5 0、3 0 5 1、
3 0 5 2、3 0 5 3、3 0 5 4、3 0 5 5、3 0 5 6、3 0 5 7、3 0 5 8、3 0 5 9、
3 0 6 0、3 0 6 1、3 0 6 2、3 0 6 3、3 0 6 4、3 0 6 5、3 0 6 6、3 0 6 7、
3 0 6 8、3 0 6 9、3 0 7 0、3 0 7 1、3 0 7 2、3 0 7 3、3 0 7 4、3 0 7 5、
3 0 7 6、3 0 7 7、3 0 7 8、3 0 7 9、3 0 8 0、3 0 8 1、3 0 8 2、3 0 8 3、
3 0 8 4、3 0 8 5、3 0 8 6、3 0 8 7、3 0 8 8、3 0 8 9、3 0 9 0、3 0 9 1、
3 0 9 2、3 0 9 3、3 0 9 4、3 0 9 5、3 0 9 6、3 0 9 7、3 0 9 8、3 0 9 9、
3 1 0 0、3 1 0 1、3 1 0 2、3 1 0 3、3 1 0 4、3 1 0 5、3 1 0 6、3 1 0 7、
3 1 0 8、3 1 0 9、3 1 1 0、3 1 1 1、3 1 1 2、3 1 1 3、3 1 1 4、3 1 1 5、
3 1 1 6、3 1 1 7、3 1 1 8、3 1 1 9、3 1 2 0、3 1 2 1、3 1 2 2、3 1 2 3、
3 1 2 4、3 1 2 5、3 1 2 6、3 1 2 7、3 1 2 8、3 1 2 9、3 1 3 0、3 1 3 1、
3 1 3 2、3 1 3 3、3 1 3 4、3 1 3 5、3 1 3 6、3 1 3 7、3 1 3 8、3 1 3 9、
3 1 4 0、3 1 4 1、3 1 4 2、3 1 4 3、3 1 4 4、3 1 4 5、3 1 4 6、3 1 4 7、
3 1 4 8、3 1 4 9、3 1 5 0、3 1 5 1、3 1 5 2、3 1 5 3、3 1 5 4、3 1 5 5、
3 1 5 6、3 1 5 7、3 1 5 8、3 1 5 9、3 1 6 0、3 1 6 1、3 1 6 2、3 1 6 3、
3 1 6 4、3 1 6 5、3 1 6 6、3 1 6 7、3 1 6 8、3 1 6 9、3 1 7 0、3 1 7 1、
3 1 7 2、3 1 7 3、3 1 7 4、3 1 7 5、3 1 7 6、3 1 7 7、3 1 7 8、3 1 7 9、
3 1 8 0、3 1 8 1、3 1 8 2、3 1 8 3、3 1 8 4、3 1 8 5、3 1 8 6、3 1 8 7、
3 1 8 8、3 1 8 9、3 1 9 0、3 1 9 1、3 1 9 2、3 1 9 3、3 1 9 4、3 1 9 5、
3 1 9 6、3 1 9 7、3 1 9 8、3 1 9 9、3 2 0 0、3 2 0 1、3 2 0 2、3 2 0 3、
3 2 0 4、3 2 0 5、3 2 0 6、3 2 0 7、3 2 0 8、3 2 0 9、3 2 1 0、3 2 1 1、
3 2 1 2、3 2 1 3、3 2 1 4、3 2 1 5、3 2 1 6、3 2 1 7、3 2 1 8、3 2 1 9、
3 2 2 0、3 2 2 1、3 2 2 2、3 2 2 3、3 2 2 4、3 2 2 5、3 2 2 6、3 2 2 7、
3 2 2 8、3 2 2 9、3 2 3 0、3 2 3 1、3 2 3 2、3 2 3 3、3 2 3 4、3 2 3 5、

10

20

30

40

50

3 2 3 6、3 2 3 7、3 2 3 8、3 2 3 9、3 2 4 0、3 2 4 1、3 2 4 2、3 2 4 3、
3 2 4 4、3 2 4 5、3 2 4 6、3 2 4 7、3 2 4 8、3 2 4 9、および3 2 5 0ヌクレ
オチドなどの長さを有していてもよい。ウイルスゲノムの任意のフィラー領域の長さは、
5 0～1 0 0、1 0 0～1 5 0、1 5 0～2 0 0、2 0 0～2 5 0、2 5 0～3 0 0、3
0 0～3 5 0、3 5 0～4 0 0、4 0 0～4 5 0、4 5 0～5 0 0、5 0 0～5 5 0、5
5 0～6 0 0、6 0 0～6 5 0、6 5 0～7 0 0、7 0 0～7 5 0、7 5 0～8 0 0、8
0 0～8 5 0、8 5 0～9 0 0、9 0 0～9 5 0、9 5 0～1 0 0 0、1 0 0 0～1 0 5
0、1 0 5 0～1 1 0 0、1 1 0 0～1 1 5 0、1 1 5 0～1 2 0 0、1 2 0 0～1 2 5
0、1 2 5 0～1 3 0 0、1 3 0 0～1 3 5 0、1 3 5 0～1 4 0 0、1 4 0 0～1 4 5 0

10

、1 4 5 0～1 5 0 0、1 5 0 0～1 5 5 0、1 5 5 0～1 6 0 0、1 6 0 0～1 6 5 0
、1 6 5 0～1 7 0 0、1 7 0 0～1 7 5 0、1 7 5 0～1 8 0 0、1 8 0 0～1 8 5 0
、1 8 5 0～1 9 0 0、1 9 0 0～1 9 5 0、1 9 5 0～2 0 0 0、2 0 0 0～2 0 5 0
、2 0 5 0～2 1 0 0、2 1 0 0～2 1 5 0、2 1 5 0～2 2 0 0、2 2 0 0～2 2 5 0
、2 2 5 0～2 3 0 0、2 3 0 0～2 3 5 0、2 3 5 0～2 4 0 0、2 4 0 0～2 4 5 0
、2 4 5 0～2 5 0 0、2 5 0 0～2 5 5 0、2 5 5 0～2 6 0 0、2 6 0 0～2 6 5 0
、2 6 5 0～2 7 0 0、2 7 0 0～2 7 5 0、2 7 5 0～2 8 0 0、2 8 0 0～2 8 5 0
、2 8 5 0～2 9 0 0、2 9 0 0～2 9 5 0、2 9 5 0～3 0 0 0、3 0 0 0～3 0 5 0
、3 0 5 0～3 1 0 0、3 1 0 0～3 1 5 0、3 1 5 0～3 2 0 0、および3 2 0 0～3
2 5 0ヌクレオチドであってもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約5 5ヌ
クレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約5
6ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、
約9 7ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノム
は、約1 0 3ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイル
スゲノムは、約1 0 5ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウ
イルスゲノムは、約3 5 7ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例とし
て、ウイルスゲノムは、約3 6 3ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な
例として、ウイルスゲノムは、約7 1 2ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限
定的な例として、ウイルスゲノムは、約7 1 4ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む
。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約1 2 0 3ヌクレオチド長であるフィラー領
域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約1 2 0 9ヌクレオチド長であるフ
ィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約1 5 1 2ヌクレオチド長
であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約1 5 1 9ヌクレ
オチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約2 3 9
5ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、
約2 4 0 3ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウイル
スゲノムは、約2 4 0 5ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例として、ウ
イルスゲノムは、約3 0 1 3ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。非限定的な例と
して、ウイルスゲノムは、約3 0 2 1ヌクレオチド長であるフィラー領域を含む。

20

30

【0 3 1 5】

40

特定の実施形態において、A A V粒子ウイルスゲノムは、少なくとも1つのエンハンサ
ー配列領域を含み得る。エンハンサー配列領域は、独立に、限定はされないが、3 0 0、
3 0 1、3 0 2、3 0 3、3 0 4、3 0 5、3 0 6、3 0 7、3 0 8、3 0 9、3 1 0、
3 1 1、3 1 2、3 1 3、3 1 4、3 1 5、3 1 6、3 1 7、3 1 8、3 1 9、3 2 0、
3 2 1、3 2 2、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、
3 3 1、3 3 2、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 6、3 3 7、3 3 8、3 3 9、3 4 0、
3 4 1、3 4 2、3 4 3、3 4 4、3 4 5、3 4 6、3 4 7、3 4 8、3 4 9、3 5 0、
3 5 1、3 5 2、3 5 3、3 5 4、3 5 5、3 5 6、3 5 7、3 5 8、3 5 9、3 6 0、
3 6 1、3 6 2、3 6 3、3 6 4、3 6 5、3 6 6、3 6 7、3 6 8、3 6 9、3 7 0、
3 7 1、3 7 2、3 7 3、3 7 4、3 7 5、3 7 6、3 7 7、3 7 8、3 7 9、3 8 0、

50

381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、および400ヌクレオチドなどの長さを有していてもよい。ウイルスゲノムのエンハンサー領域の長さは、300～310、300～325、305～315、310～320、315～325、320～330、325～335、325～350、330～340、335～345、340～350、345～355、350～360、350～375、355～365、360～370、365～375、370～380、375～385、375～400、380～390、385～395、および390～400ヌクレオチドであってもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約303ヌクレオチド長であるエンハンサー領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約382ヌクレオチド長であるエンハンサー領域を含む。

10

【0316】

特定の実施形態において、AAV粒子ウイルスゲノムは、少なくとも1つのプロモータ配列領域を含み得る。プロモータ配列領域は、独立に、限定はされないが、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、

20

30

40

50

391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、
401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、
411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、
421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、
431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、
441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、
451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、
461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、
471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、
481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、
491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、
501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、
511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、
521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、
531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、
541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、
551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、
561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、
571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、
581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、
591、592、593、594、595、596、597、598、599、および6
00ヌクレオチドなどの長さを有していてもよい。ウイルスゲノムのプロモータ領域の長
さは、4～10、10～20、10～50、20～30、30～40、40～50、50
～60、50～100、60～70、70～80、80～90、90～100、100～
110、100～150、110～120、120～130、130～140、140～
150、150～160、150～200、160～170、170～180、180～
190、190～200、200～210、200～250、210～220、220～
230、230～240、240～250、250～260、250～300、260～
270、270～280、280～290、290～300、300～310、300～
350、310～320、320～330、330～340、340～350、350～
360、350～400、360～370、370～380、380～390、390～
400、400～410、400～450、410～420、420～430、430～
440、440～450、450～460、450～500、460～470、470～
480、480～490、490～500、500～510、500～550、510～
520、520～530、530～540、540～550、550～560、550～
600、560～570、570～580、580～590、および590～600ヌク
レオチドであってもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約4ヌクレオチド長
であるプロモータ領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約17ヌクレオ
チド長であるプロモータ領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約204
ヌクレオチド長であるプロモータ領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、
約219ヌクレオチド長であるプロモータ領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲ
ノムは、約260ヌクレオチド長であるプロモータ領域を含む。非限定的な例として、ウ
イルスゲノムは、約303ヌクレオチド長であるプロモータ領域を含む。非限定的な例と
して、ウイルスゲノムは、約382ヌクレオチド長であるプロモータ領域を含む。非限定
的な例として、ウイルスゲノムは、約588ヌクレオチド長であるプロモータ領域を含む。

【0317】

特定の実施形態において、AAV粒子ウイルスゲノムは、少なくとも1つのエクソン配
列領域を含み得る。エクソン領域は、独立に、限定はされないが、2、3、4、5、6、
7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、2
1、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34

10

20

30

40

50

、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、および150ヌクレオチドなどの長さを有していてもよい。ウイルスゲノムのエクソン領域の長さは、2～10、5～10、5～15、10～20、10～30、10～40、15～20、15～25、20～30、20～40、20～50、25～30、25～35、30～40、30～50、30～60、35～40、35～45、40～50、40～60、40～70、45～50、45～55、50～60、50～70、50～80、55～60、55～65、60～70、60～80、60～90、65～70、65～75、70～80、70～90、70～100、75～80、75～85、80～90、80～100、80～110、85～90、85～95、90～100、90～110、90～120、95～100、95～105、100～110、100～120、100～130、105～110、105～115、110～120、110～130、110～140、115～120、115～125、120～130、120～140、120～150、125～130、125～135、130～140、130～150、135～140、135～145、140～150、および145～150ヌクレオチドであってもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約53ヌクレオチド長であるエクソン領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約134ヌクレオチド長であるエクソン領域を含む。

【0318】

特定の実施形態において、AAV粒子ウイルスゲノムは、少なくとも1つのイントロン配列領域を含み得る。イントロン領域は、独立に、限定はされないが、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255

、 2 5 6、 2 5 7、 2 5 8、 2 5 9、 2 6 0、 2 6 1、 2 6 2、 2 6 3、 2 6 4、 2 6 5
、 2 6 6、 2 6 7、 2 6 8、 2 6 9、 2 7 0、 2 7 1、 2 7 2、 2 7 3、 2 7 4、 2 7 5
、 2 7 6、 2 7 7、 2 7 8、 2 7 9、 2 8 0、 2 8 1、 2 8 2、 2 8 3、 2 8 4、 2 8 5
、 2 8 6、 2 8 7、 2 8 8、 2 8 9、 2 9 0、 2 9 1、 2 9 2、 2 9 3、 2 9 4、 2 9 5
、 2 9 6、 2 9 7、 2 9 8、 2 9 9、 3 0 0、 3 0 1、 3 0 2、 3 0 3、 3 0 4、 3 0 5
、 3 0 6、 3 0 7、 3 0 8、 3 0 9、 3 1 0、 3 1 1、 3 1 2、 3 1 3、 3 1 4、 3 1 5
、 3 1 6、 3 1 7、 3 1 8、 3 1 9、 3 2 0、 3 2 1、 3 2 2、 3 2 3、 3 2 4、 3 2 5
、 3 2 6、 3 2 7、 3 2 8、 3 2 9、 3 3 0、 3 3 1、 3 3 2、 3 3 3、 3 3 4、 3 3 5
、 3 3 6、 3 3 7、 3 3 8、 3 3 9、 3 4 0、 3 4 1、 3 4 2、 3 4 3、 3 4 4、 3 4 5
、 3 4 6、 3 4 7、 3 4 8、 3 4 9、 および 3 5 0 ヌクレオチドなどの長さを有していてもよい。ウイルスゲノムのイントロン領域の長さは、2 5 ～ 3 5、2 5 ～ 5 0、3 5 ～ 4 5、4 5 ～ 5 5、5 0 ～ 7 5、5 5 ～ 6 5、6 5 ～ 7 5、7 5 ～ 8 5、7 5 ～ 1 0 0、8 5 ～ 9 5、9 5 ～ 1 0 5、1 0 0 ～ 1 2 5、1 0 5 ～ 1 1 5、1 1 5 ～ 1 2 5、1 2 5 ～ 1 3 5、1 2 5 ～ 1 5 0、1 3 5 ～ 1 4 5、1 4 5 ～ 1 5 5、1 5 0 ～ 1 7 5、1 5 5 ～ 1 6 5、1 6 5 ～ 1 7 5、1 7 5 ～ 1 8 5、1 7 5 ～ 2 0 0、1 8 5 ～ 1 9 5、1 9 5 ～ 2 0 5、2 0 0 ～ 2 2 5、2 0 5 ～ 2 1 5、2 1 5 ～ 2 2 5、2 2 5 ～ 2 3 5、2 2 5 ～ 2 5 0、2 3 5 ～ 2 4 5、2 4 5 ～ 2 5 5、2 5 0 ～ 2 7 5、2 5 5 ～ 2 6 5、2 6 5 ～ 2 7 5、2 7 5 ～ 2 8 5、2 7 5 ～ 3 0 0、2 8 5 ～ 2 9 5、2 9 5 ～ 3 0 5、3 0 0 ～ 3 2 5、3 0 5 ～ 3 1 5、3 1 5 ～ 3 2 5、3 2 5 ～ 3 3 5、3 2 5 ～ 3 5 0、および 3 3 5 ～ 3 4 5 ヌクレオチドであってもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約 3 2 ヌクレオチド長であるイントロン領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約 1 7 2 ヌクレオチド長であるイントロン領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約 2 0 1 ヌクレオチド長であるイントロン領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約 3 4 7 ヌクレオチド長であるイントロン領域を含む。

【 0 3 1 9 】

特定の実施形態において、A A V 粒子ウイルスゲノムは、少なくとも 1 つのポリアデニル化シグナル配列領域を含み得る。ポリアデニル化シグナル領域配列領域は、独立に、限定はされないが、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、25

7、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、および600ヌクレオチドなどの長さを有してもよい。ウイルスゲノムのポリアデニル化シグナル配列領域の長さは、4～10、10～20、10～50、20～30、30～40、40～50、50～60、50～100、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、100～150、110～120、120～130、130～140、140～150、150～160、150～200、160～170、170～180、180～190、190～200、200～210、200～250、210～220、220～230、230～240、240～250、250～260、250～300、260～270、270～280、280～290、290～300、300～310、300～350、310～320、320～330、330～340、340～350、350～360、350～400、360～370、370～380、380～390、390～400、400～410、400～450、410～420、420～430、430～440、440～450、450～460、450～500、460～470、470～480、480～490、490～500、500～510、500～550、510～520、520～530、530～540、540～550、550～560、550～600、560～570、570～580、580～590、および590～600ヌクレオチドであってもよい。非限定的な例

10

20

30

40

50

として、ウイルスゲノムは、約 1 2 7 ヌクレオチド長であるポリアデニル化シグナル配列領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約 2 2 5 ヌクレオチド長であるポリアデニル化シグナル配列領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約 4 7 6 ヌクレオチド長であるポリアデニル化シグナル配列領域を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、約 4 7 7 ヌクレオチド長であるポリアデニル化シグナル配列領域を含む。

【0320】

特定の実施形態において、AAV粒子ウイルスゲノムは、2つ以上のポリAシグナル配列領域を含む。

調節性ポリヌクレオチド配列を含むペイロード領域を有するウイルスゲノムを含むAAV粒子のITR～ITR配列の非限定的な例は、表9Aに記載される。また、表9Aには、「VOYSOD」識別名によって示されるITR～ITRコンストラクトの代替的名前を提供する。

【0321】

【表9】

表9A. AAV粒子のITR～ITR配列、調節性ポリヌクレオチドを含む
H1.mir.104-788.2(レンチウイルス由来フィラーを有する)

ITR～ITR コンストラクト名称	ITR～ITR配列番号	調節性ポリヌクレオチド 配列番号
レンチウイルス由来フィラーを 有するH1.mir.104-788.2 (VOYSOD16)	9	6

表9Bは、アルブミン由来フィラーを有するH1.mir104-788.2のITR～ITR配列を提供する。表9Bには、ITR～ITR配列を構成する成分も提供されている。一部の実施形態において、成分は、ベクター骨格配列によって互いに隔てられてもよい。

【0322】

【表10】

表9B. AAV粒子のITR～ITR、調節性ポリヌクレオチドを含む
H1.mir.104-788.2(アルブミン由来フィラーを有する)およびその成分

説明	配列番号
アルブミン由来フィラーを有する H1.mir104-788.2のITR～ITR	25
H1.mir104-788.2(アルブミン由来フィラーを有する)の ITR～ITR成分	
5'TTR	26
アルブミン由来フィラー	27
H1プロモーター	28
調節性ポリヌクレオチド (SOD1-miR104-788.2)	6
rBGpA	29
3'TTR	30

特定の実施形態において、AAV粒子は、配列番号9に対して同一性パーセントを有する配列を含むウイルスゲノムを含む。ウイルスゲノムは、配列番号9に対して1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%同一性を有してもよい。ウイルスゲ

ノムは、配列番号9に対して1～10%、10～20%、30～40%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～99%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～99%、60～100%、70～80%、70～90%、70～99%、70～100%、80～85%、80～90%、80～95%、80～99%、80～100%、90～95%、90～99%、または90～100%を有してもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号9に対して80%同一性である配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号9に対して85%同一性である配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号9に対して90%同一性である配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号9に対して95%同一性である配列を含む。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号9に対して99%同一性である配列を含む。

10

【0323】

特定の実施形態において、AAV粒子は、配列番号25に対して同一性パーセントを有する配列を含むウイルスゲノムを含む。ウイルスゲノムは、配列番号25に対して1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%同一性を有してもよい。ウイルスゲノムは、配列番号25に対して1～10%、10～20%、30～40%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、50～99%、50～100%、60～70%、60～80%、60～90%、60～99%、60～100%、70～80%、70～90%、70～99%、70～100%、80～85%、80～90%、80～95%、80～99%、80～100%、90～95%、90～99%、または90～100%を有してもよい。非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号25に対して80%同一性である配列を含む。別の限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号25に対して85%同一性である配列を含む。別の非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号25に対して90%同一性を有する配列を含む。別の非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号25に対して95%同一性を有する配列を含む。別の非限定的な例として、ウイルスゲノムは、配列番号25に対して99%同一性を有する配列を含む。

20

【0324】

AAV粒子は、送達効率が増強されるように修飾されてもよい。本開示のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むかかる修飾AAVベクターは、効率的にパッケージングすることができ、高頻度でおよび最低限の毒性でおよび標的細胞への感染を成功させるために使用することができる。

30

【0325】

一部の実施形態において、本開示のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むAAV粒子は、ヒト血清型AAV粒子であってもよい。かかるヒトAAV粒子は、任意の既知の血清型、例えば血清型AAV1～AAV11のいずれか1つに由来し得る。非限定的な例として、AAV粒子は、AAV1由来カプシドにAAV1由来ゲノムを含むベクター；AAV2由来カプシドにAAV2由来ゲノムを含むベクター；AAV4由来カプシドにAAV4由来ゲノムを含むベクター；AAV6由来カプシドにAAV6由来ゲノムを含むベクターまたはAAV9由来カプシドにAAV9由来ゲノムを含むベクターであってもよい。

40

【0326】

他の実施形態において、本開示のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むAAV粒子は、少なくとも2つの異なるAAV血清型を起源とする配列および／または成分を含有するシュードタイプハイブリッドまたはキメラAAV粒子であってもよい。シュードタイプAAV粒子は、あるAAV血清型に由来するAAVゲノムと、少なくとも一部が異なるAAV血清型に由来するカプシドタンパク質とを含むベクターであってもよい。非限定的な例として、かかるシュードタイプAAV粒子は、AAV1由来カプシドにAAV2由来ゲノムを含むベクター；またはAAV6由来カプシドにAAV2由来ゲノムを含むベクター

50

一；またはAAV4由来カプシドにAAV2由来ゲノム；もしくはAAV9由来カプシドにAAV2由来ゲノムを含むベクターであってもよい。同様に、本開示は、任意のハイブリッドまたはキメラAAV粒子を企図する。

【0327】

他の実施形態において、本開示のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むAAV粒子は、中枢神経系へのsiRNA分子の送達に使用されてもよい（例えば、米国特許第6,180,613号明細書；この内容は本明細書において全体として参照により援用される）。

【0328】

一部の態様において、本開示のsiRNA分子をコードする核酸配列を含むAAV粒子は、非ウイルス起源のペプチドを含む修飾カプシドを更に含み得る。他の態様において、コード化siRNA二重鎖の脳および脊髄への送達を促進するため、AAV粒子はCNS特異的キメラカプシドを含んでもよい。例えば、CNS向性を呈するAAVバリエーションからのcapヌクレオチド配列のアラインメントを作成することにより可変領域（VR）配列および構造を同定してもよい。

【0329】

他の実施形態において、本開示のsiRNA分子は、細胞への送達用のプラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、AAVベクター）、ゲノムまたは他の核酸発現ベクターにコードすることができる。

【0330】

DNA発現プラスミドを使用して、本開示のsiRNA二重鎖またはdsRNAを細胞で安定に発現させ、標的遺伝子の長期阻害を実現することができる。

一態様において、SOD1ターゲティングポリヌクレオチドによってコードされるsiRNA二重鎖のセンス鎖とアンチセンス鎖とは、典型的には、短いスペーサ配列によって連結され、低分子ヘアピンRNA（shRNA）と呼ばれるステムループ構造の発現をもたらす。ヘアピンはダイサーによって認識および切断され、そのようにして成熟siRNA分子が生じる。

【0331】

本開示によれば、SOD1 mRNAを標的とするsiRNA分子の核酸を含むAAVベクターが作製され、AAVベクター血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8およびAAV-DJ、およびこれらのバリエーションであってもよい。

【0332】

一部の実施形態において、本開示のsiRNA二重鎖またはdsRNAは、発現されると、標的mRNA（つまり、SOD1）を抑制（または分解）する。したがって、SOD1ターゲティングポリヌクレオチドによってコードされるsiRNA二重鎖またはdsRNAを使用して、細胞、例えば運動ニューロンにおけるSOD1遺伝子発現を実質的に阻害することができる。一部の態様において、SOD1遺伝子発現の阻害とは、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%の阻害を指す。したがって、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%および100%阻害され得る。SOD1遺伝子は、野生型遺伝子、または少なくとも1つの突然変異を有する突然変異SOD1遺伝子のいずれであってもよい。したがって、タンパク質は、野生型タンパク質、または少なくとも1つの突然変異を有する突然変異ポリペプチドのいずれかである。

【0333】

ウイルス作製

本開示は、ウイルス複製細胞をAAVポリヌクレオチドまたはAAVゲノムに接触させることを含む、ウイルス複製細胞におけるウイルスゲノム複製によるパルボウイルス粒子

10

20

30

40

50

、例えば A A V 粒子の作成方法を提供する。

【0334】

本開示は、1) コンピテント細菌細胞にバクミドベクターおよびウイルスコンストラクトベクターおよび／または A A V ペイロードコンストラクトベクターのいずれかをコトランスフェクトする工程、2) 得られたウイルスコンストラクト発現ベクターおよび A A V ペイロードコンストラクト発現ベクターを単離し、ウイルス複製細胞に個別にトランスフェクトする工程、3) ウイルスコンストラクト発現ベクターまたは A A V ペイロードコンストラクト発現ベクターを含む得られたペイロードおよびウイルスコンストラクト粒子を単離および精製する工程、4) ウイルス複製細胞に、ウイルスコンストラクト発現ベクターまたは A A V ペイロードコンストラクト発現ベクターを含む A A V ペイロードおよびウイルスコンストラクト粒子の両方を共感染させる工程、および5) パルボウイルスゲノムを含むウイルス粒子を回収および精製する工程を含む、形質導入効率が增強された（増加した、向上した）A A V 粒子の作製方法を提供する。

10

【0335】

特定の実施形態において、本開示は、1) 限定はされないが H E K 2 9 3 細胞などの哺乳類細胞にペイロード領域、r e p および c a p 遺伝子を発現するコンストラクトならびにヘルパーコンストラクトを同時にコトランスフェクトする工程、2) ウイルスゲノムを含む A A V 粒子を回収および精製する工程を含む、A A V 粒子の作製方法を提供する。

【0336】

細胞

20

本開示は、A A V ポリヌクレオチドおよび／または A A V ゲノムを含む細胞を提供する。

【0337】

本明細書に開示されるウイルス作製は、ペイロード分子をコードするポリヌクレオチド配列を含むペイロードコンストラクト、例えば組換えウイルスコンストラクトを送達するため標的細胞に接触する A A V 粒子の作製プロセスおよび方法を記載する。

【0338】

特定の実施形態において、A A V 粒子は、昆虫細胞を含むウイルス複製細胞で作製されてもよい。

培養下の昆虫細胞の成長条件、および培養下の昆虫細胞における異種産物の産生は当該技術分野において周知であり、米国特許第 6, 2 0 4, 0 5 9 号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）を参照されたい。

30

【0339】

本開示においては、パルボウイルスの複製を可能にする、かつ培養下に維持することのできる任意の昆虫細胞を使用することができる。細胞株は、限定はされないが S f 9 または S f 2 1 細胞株を含めたスポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) からの細胞株、ショウジョウバエ属 (Drosophila) 細胞株、またはヒトスジシマカ (Aedes albopictus) 由来細胞株などの蚊細胞株が用いられてもよい。異種タンパク質を発現させるための昆虫細胞の使用については、ベクター、例えば昆虫細胞適合性ベクターなどの核酸をかかる細胞に導入する方法、および培養下のかかる細胞を維持する方法と同様に、十分に実証されている。例えば、「分子生物学の方法 (Methods in Molecular Biology)」、リチャード (Richard) 編、Humana Press、ニュージャージー州、1995；オライリーら (O'Reilly et al.)、「バキュロウイルス発現ベクター、実験マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)」、Oxford Univ. Press、1994；サムルスキら (Samulski et al.)、J. Vir., 63, 3822-8, 1989；カジガヤら (Kajigaya et al.)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4646-50, 1991；ラフィングら (Ruffing et al.)、J. Vir., 66, 6922-30, 1992；キムバウアーら (Kimbauer et al.)、Vir., 219, 37-44, 1996；チャオら

40

50

(Zhao et al.), Vir., 272, 382-93, 2000; およびサムルスキら (Samulski et al.)、米国特許第6,204,059号明細書を参照されたく、これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される。

【0340】

ウイルス複製細胞は、原核生物（例えば細菌）細胞、ならびに昆虫細胞、酵母細胞および哺乳類細胞を含めた真核細胞を含め、任意の生物学的有機体から選択されてもよい。ウイルス複製細胞には、A549、WEH1、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、W138、HeLa、HEK293、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2ならびに哺乳類に由来する初代線維芽細胞、ヘパトサイトおよび筋芽細胞など、哺乳類細胞が含まれ得る。ウイルス複製細胞には、限定はされないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、およびハムスターを含めた哺乳類種、または限定はされないが、線維芽細胞、ヘパトサイト、腫瘍細胞、細胞株形質転換細胞等を含めた細胞型に由来する細胞が含まれる。

10

【0341】

AAV粒子の哺乳類細胞（小規模）産生

本明細書に開示されるウイルス作製は、ペイロードをコードするポリヌクレオチド配列を含むペイロード、例えば組換えウイルスコンストラクトを送達するため標的細胞に接触するAAV粒子の作製プロセスおよび方法を記載する。

【0342】

特定の実施形態において、AAV粒子は、哺乳類細胞を含むウイルス複製細胞で作製されてもよい。

組換えAAV粒子の作製に一般的に使用されるウイルス複製細胞としては、限定はされないが、米国特許第6,156,303号明細書、同第5,387,484号明細書、同第5,741,683号明細書、同第5,691,176号明細書、および同第5,688,676号明細書；米国特許出願公開第2002/0081721号明細書、および国際公開第00/47757号パンフレット、同第00/24916号パンフレット、および同第96/17947号パンフレット（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載されるとおりの、293細胞、COS細胞、HeLa細胞、KB細胞、および他の哺乳類細胞株が挙げられる。

20

30

【0343】

特定の実施形態において、AAV粒子は哺乳類細胞で作製され、ここでは3つ全てのVPタンパク質が1:1:10 (VP1:VP2:VP3) に近い化学量論で発現する。この制御された発現レベルを実現する調節機構には、差次的スプライシングによって作製される、一方がVP1用、および他方がVP2およびVP3用の2つのmRNAの作製が含まれる。

【0344】

別の実施形態において、AAV粒子はトリプルトランスフェクション方法を用いて哺乳類細胞で作製され、ここではペイロードコンストラクトとパルボウイルスRepおよびパルボウイルスCapとヘルパーコンストラクトとが3つの異なるコンストラクト内に含まれる。AAV粒子作製の3成分のトリプルトランスフェクション方法を利用して、形質導入効率、標的組織（向性）評価、および安定性を含めたアッセイ用の小規模ロットのウイルスを作製し得る。

40

【0345】

本明細書に記載されるAAV粒子は、トリプルトランスフェクション、またはバキュロウイルス媒介性ウイルス産生、または当該技術分野で公知の任意の他の方法によって作製してもよい。当該技術分野で公知の任意の好適な許容細胞またはパッケージング細胞を用いて、ベクターを作製してもよい。哺乳類細胞が好ましいことが多い。複製欠損ヘルパーウイルスから欠失されている機能を提供するトランス補完パッケージング細胞株、例えば293細胞または他のE1aトランス補完細胞も好ましい。

50

【0346】

遺伝子カセットは、パルボウイルス（例えば、AAV）capおよびrep遺伝子の一部またはすべてを含んでもよい。しかしながら、好ましくは、capおよびrep機能の一部またはすべては、カプシドおよび／またはRepタンパク質をコードするパッケージングベクターを細胞に導入することによって、トランスで提供される。最も好ましくは、遺伝子カセットは、カプシドまたはRepタンパク質をコードしない。あるいは、安定して形質転換されてcapおよび／またはrep遺伝子を発現するパッケージング細胞株が使用される。

【0347】

組換えAAVウイルス粒子は、ある場合には、米国特許出願公開第20160032254号明細書に記載される通りの手順に従って培養上清から作製および精製されており、この内容は参照により援用される。また、作製には、293T細胞、sf9昆虫細胞、トリプルトランスフェクションまたは任意の好適な作製方法を使用するものを含む、当該技術分野で公知の方法が関与してもよい。

【0348】

ある場合には、293T細胞（接着／懸濁）に、AAV、すなわちAAV2 rep、アデノウイルスヘルパーコンストラクトおよびITR隣接トランス遺伝子カセットの作製に必要なプラスミドを、ポリエチレンイミン（PEI）を用いてトランスフェクトする。また、AAV2 repプラスミドは、研究されている特定のウイルスのcap配列を含む。血清有り／無しのDMEM／F17で生じるトランスフェクションの24時間後（懸濁の場合は培地を変更しない）、培地を、血清有りまたは無しの新鮮な培地と取り替える。トランスフェクションの3（三）日後、293接着細胞の培養培地から試料を得る。続いて、細胞を擦り取るか、または懸濁細胞をペレットにし、容器へと移す。接着細胞の場合は、遠心分離後に細胞ペレットを除去し、擦り取った後の上清から第2の試料を得る。次に、連続3回の凍結融解サイクル（−80℃〜37℃）または界面活性剤tritonの添加によって、細胞溶解を達成する。遠心分離または深層ろ過によって細胞残屑を除去し、培地から試料3を得る。DNA qPCRによるDNase耐性ゲノム滴定（DNase resistant genome titration）によって、試料をAAV粒子について定量化する。かかるトランスフェクションの総産生収率は、試料3の粒子濃度と等しい。

【0349】

AAV粒子力価を、ゲノムコピー数（1ミリリットル当たりのゲノム粒子）により測定する。ゲノム粒子濃度は、以前に報告されている通りのベクターDNAのDNA定量PCRに基づく（クラークら（Clark et al.）（1999）Hum. Gene Ther. , 10:1031–1039；フェルトワイクラ（Veldwijk et al.）（2002）Mol. Ther. , 6:272–278）。

【0350】

バキュロウイルス

本明細書に開示される粒子作製は、ペイロードをコードするポリヌクレオチド配列を含むペイロードコンストラクトを送達するため標的細胞に接触するAAV粒子の作製プロセスおよび方法を記載する。

【0351】

簡潔に言えば、ウイルスコンストラクトベクターおよびAAVペイロードコンストラクトベクターが、各々、公知の、当業者によって実施されている標準的な分子生物学的技術により、トランスポゾンドナー／アクセプターシステムによってバキュロウイルスプラスミドとしても知られるバクミドに取り込まれる。別個のウイルス複製細胞集団のトランスフェクションにより2つのバキュロウイルスが生じ、一方はウイルスコンストラクト発現ベクターを含み、もう一方はAAVペイロードコンストラクト発現ベクターを含む。これらの2つのバキュロウイルスを使用して単一のウイルス複製細胞集団を感染させて、AAV粒子を作製し得る。

【0352】

限定はされないが、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 細胞を含め、昆虫細胞においてウイルス粒子を作製するためのバキュロウイルス発現ベクターは、高力価のウイルス粒子産物を提供する。ウイルスコンストラクト発現ベクターおよびAAVペイロードコンストラクト発現ベクターをコードする組換えバキュロウイルスは、ウイルス複製細胞の増殖性感染を惹起する。初感染から放出された感染性バキュロウイルス粒子は培養物中の更なる細胞に二次感染し、初期感染多重度の関数である所定回数の感染サイクルで細胞培養物集団全体に指数関数的に感染する。ウラベ・Mら (Urabe, M. et al.), *J Virol.*, 2006 Feb, 80 (4): 1874-85 (この内容は本明細書において全体として参照により援用される) を参照されたい。

10

【0353】

昆虫細胞系におけるバキュロウイルスによるAAV粒子の作製は、公知のバキュロウイルスの遺伝的および物理的不安定性に対処し得る。特定の実施形態において、この作製システムは、タイターレス感染細胞保存およびスケールアップシステムを利用することにより複数継代をかけてバキュロウイルスの不安定性に対処する。ウイルス作製細胞の小規模シード培養物に、ウイルス粒子の構造、非構成成分をコードするウイルス発現コンストラクトがトランスフェクトされる。バキュロウイルス感染ウイルス作製細胞がアリコートに回収され、それが液体窒素で凍結保存され得る；アリコートは、大規模ウイルス作製細胞培養物の感染のための生存能力および感染力を維持している。ワシルコ DJら (Wasilkowski DJ et al.), *Protein Expr Purif.* 2009 Jun; 65 (2): 122-32、この内容は本明細書において全体として参照により援用される。

20

【0354】

遺伝的に安定したバキュロウイルスを使用して、無脊椎動物細胞においてAAV粒子を作製するための成分のうちの1つ以上の供給源を作製してもよい。特定の実施形態において、欠損バキュロウイルス発現ベクターが昆虫細胞のエピソームに保持されてもよい。かかる実施形態において、バクミドベクターは、限定はされないが、プロモータ、エンハンサー、および／または細胞周期調節性複製エレメントを含め、複製制御エレメントを有するように操作される。

30

【0355】

特定の実施形態において、バキュロウイルスは、キチナーゼ／カテプシン遺伝子座への組換えのため（非）選択可能マーカを有するように操作されてもよい。組織培養におけるバキュロウイルスの増殖にchia/v-cath遺伝子座は非必須であり、V-cath (EC 3.4.22.50) は、Arg-Argジペプチド含有基質上で最も活性が高いシステインエンドプロテアーゼである。Arg-Argジペプチドは、デンソウイルスおよびパルボウイルスカプシド構造タンパク質に存在するが、ディペンドウイルスVP1にはまれにしか見られない。

【0356】

特定の実施形態において、バキュロウイルス感染に許容的な安定ウイルス複製細胞は、限定はされないが、AAVゲノム全体、RepおよびCap遺伝子、Rep遺伝子、Cap遺伝子、別個の転写カセットとしての各Repタンパク質、別個の転写カセットとしての各VPタンパク質、AAP（アセンブリ活性化タンパク質）、または天然もしくは非天然プロモータを有するバキュロウイルスヘルパー遺伝子のうちの少なくとも1つを含め、AAV複製およびウイルス粒子産生に必要なエレメントのいずれかの少なくとも1つの安定に組み込まれたコピーを有するように操作される。

40

【0357】

大規模作製

一部の実施形態において、AAV粒子作製は、作製規模を増加させるように改良されてもよい。本開示に係る大規模ウイルス作製方法には、米国特許第5,756,283号明

50

細書、同第6, 258, 595号明細書、同第6, 261, 551号明細書、同第6, 270, 996号明細書、同第6, 281, 010号明細書、同第6, 365, 394号明細書、同第6, 475, 769号明細書、同第6, 482, 634号明細書、同第6, 485, 966号明細書、同第6, 943, 019号明細書、同第6, 953, 690号明細書、同第7, 022, 519号明細書、同第7, 238, 526号明細書、同第7, 291, 498号明細書および同第7, 491, 508号明細書または国際公開第1996039530号パンフレット、同第1998010088号パンフレット、同第1999014354号パンフレット、同第1999015685号パンフレット、同第1999047691号パンフレット、同第2000055342号パンフレット、同第2000075353号パンフレットおよび同第2001023597号パンフレット（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に教示されるもののいずれかが含まれてもよい。ウイルス粒子作製規模を増加させる方法は、典型的には、ウイルス複製細胞の数を増加させることを含む。一部の実施形態において、ウイルス複製細胞は接着細胞を含む。接着ウイルス複製細胞によるウイルス粒子作製規模の増加には、より大きい細胞培養表面が必要である。ある場合には、大規模作製方法は、細胞培養表面を増加させるためのローラボトルの使用を含む。表面積が増加した他の細胞培養基材が当該技術分野において公知である。表面積が増加した更なる接着細胞培養製品の例としては、限定はされないが、セルスタック（登録商標）（CELLSTACK（登録商標））、セルキューブ（登録商標）（CELLCUBE（登録商標））（コーニング社（Corning Corp.））、ニューヨーク州コーニング（Corning））およびヌンク（商標）（NUNC（商標））セル・ファクトリー（商標）（CELL FACTORY（商標））（サーモ・サイエンティフィック（Thermo Scientific））、マサチューセッツ州ウォルサム（Waltham））が挙げられる。ある場合には、大規模接着細胞表面は約1, 000 cm²～約100, 000 cm²を含み得る。ある場合には、大規模接着細胞培養物は、約10⁷～約10⁹細胞、約10⁸～約10¹⁰細胞、約10⁹～約10¹²細胞または少なくとも10¹²細胞を含み得る。ある場合には、大規模接着細胞培養物は、約10⁹～約10¹²、約10¹⁰～約10¹³、約10¹¹～約10¹⁴、約10¹²～約10¹⁵または少なくとも10¹⁵ウイルス粒子を作製し得る。

【0358】

一部の実施形態において、本開示の大規模ウイルス作製方法は浮遊細胞培養の使用を含み得る。浮遊細胞培養は細胞数の大幅な増加を可能にする。典型的には、約10～50 cm²の表面積で成長させることのできる接着細胞数を懸濁液中では約1 cm³の体積で成長させることができる。

【0359】

大規模培養フォーマットでの複製細胞のトランスフェクションは、当該技術分野において公知の任意の方法により行われてもよい。大規模接着細胞培養には、トランスフェクション方法として、限定はされないが、無機化合物（例えばリン酸カルシウム）、有機化合物〔例えばポリエチレンイミン（PEI）〕の使用または非化学的方法（例えば電気穿孔）の使用を挙げることができる。懸濁液中で成長させる細胞では、トランスフェクション方法として、限定はされないが、リン酸カルシウムの使用およびPEIの使用を挙げることができる。ある場合には、大規模浮遊培養物のトランスフェクションは、Feng. L. ら（Feng. L. et al.）, 2008, Biotechnol Appl. Biochem., 50: 121-32（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載される「トランスフェクション手順（Transfection Procedure）」と題される節に従い行われてもよい。かかる実施形態によれば、トランスフェクトしようとするプラスミドの導入用にPEI-DNA複合体が形成され得る。ある場合には、PEI-DNA複合体をトランスフェクトされる細胞に、トランスフェクション前に「ショック」が与えられてもよい。これは、細胞培養物温度を約1時間にわたって4℃に下げることを含む。ある場合には、約10分～約5時間の時間にわたって細胞培養物にショックが与えられてもよい。ある場合には、約0℃～約20℃の温度で細胞

培養物にショックが与えられてもよい。

【0360】

ある場合には、トランスフェクションは、1つ以上のAAVペイロードコンストラクトからの核酸の発現を低下させるため1つ以上のRNAエフェクター分子発現ベクターを含み得る。かかる方法は、ペイロードコンストラクトの発現に浪費される細胞リソースを減少させることによりウイルス粒子の産生を増強し得る。ある場合には、かかる方法は、米国特許出願公開第2014/0099666号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に教示されるものに従い行われてもよい。

【0361】

バイオリアクター

一部の実施形態において、大規模ウイルス作製には細胞培養バイオリアクターが用いられ得る。ある場合には、バイオリアクターは攪拌槽型リアクターを含む。かかるリアクターは、概して、典型的には円筒形状の、攪拌機（例えばインペラ）を備えたベッセルを含む。一部の実施形態において、かかるバイオリアクターベッセルは、ベッセル温度を制御し、および／または周囲温度の変化による影響を最小限に抑えるため、ウォータージャケット内に置かれ得る。バイオリアクターベッセル容積は、サイズが約500mL～約2L、約1L～約5L、約2.5L～約20L、約10L～約50L、約25L～約100L、約75L～約500L、約250L～約2,000L、約1,000L～約10,000L、約5,000L～約50,000Lまたは少なくとも50,000Lの範囲であり得る。ベッセルの底は丸底または平底であり得る。ある場合には、動物細胞培養物が丸底ベッセルのバイオリアクターに維持され得る。

【0362】

ある場合には、バイオリアクターベッセルはサーモサーキュレータを用いて温められてもよい。サーモサーキュレータは熱水をウォータージャケットの周りに圧送する。ある場合には、熱水は、バイオリアクターベッセル内に存在する管（例えばコイル管）を通じて圧送されてもよい。ある場合には、限定はされないが、培養培地の真上にある空気層を含め、バイオリアクターの周りに温風が循環してもよい。加えて、細胞生存が最適となるようにpHおよびCO₂レベルが維持され得る。

【0363】

ある場合には、バイオリアクターは中空系リアクターを含み得る。中空系バイオリアクターは、足場依存性および足場非依存性の両方の細胞の培養を支持し得る。更なるバイオリアクターとしては、限定はされないが、充填床または固定床バイオリアクターを挙げることができる。かかるバイオリアクターは、接着細胞の付着用ガラスビーズを有するベッセルを含み得る。更なる充填床リアクターはセラミックビーズを含み得る。

【0364】

ある場合には、ウイルス粒子は使い捨てバイオリアクターを用いて作製される。一部の実施形態において、かかるバイオリアクターとしては、ウェーブ（商標）（WAVE（商標））使い捨てバイオリアクターを挙げることができる。

【0365】

一部の実施形態において、動物細胞バイオリアクター培養物におけるAAV粒子作製は、米国特許第5,064,764号明細書、同第6,194,191号明細書、同第6,566,118号明細書、同第8,137,948号明細書または米国特許出願公開第2011/0229971号明細書（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に教示される方法により行われてもよい。

【0366】

細胞溶解

本開示の細胞は、限定はされないがウイルス作製細胞を含め、当該技術分野において公知の任意の方法により細胞溶解に供されてもよい。細胞溶解は、本明細書に記載される任意の細胞内に存在する1つ以上の薬剤（例えばウイルス粒子）を入手するために行われ得る。一部の実施形態において、細胞溶解は、米国特許第7,326,555号明細書、同

10

20

30

40

50

第7, 579, 181号明細書、同第7, 048, 920号明細書、同第6, 410, 300号明細書、同第6, 436, 394号明細書、同第7, 732, 129号明細書、同第7, 510, 875号明細書、同第7, 445, 930号明細書、同第6, 726, 907号明細書、同第6, 194, 191号明細書、同第7, 125, 706号明細書、同第6, 995, 006号明細書、同第6, 676, 935号明細書、同第7, 968, 333号明細書、同第5, 756, 283号明細書、同第6, 258, 595号明細書、同第6, 261, 551号明細書、同第6, 270, 996号明細書、同第6, 281, 010号明細書、同第6, 365, 394号明細書、同第6, 475, 769号明細書、同第6, 482, 634号明細書、同第6, 485, 966号明細書、同第6, 943, 019号明細書、同第6, 953, 690号明細書、同第7, 022, 519号明細書、同第7, 238, 526号明細書、同第7, 291, 498号明細書および同第7, 491, 508号明細書または国際公開第1996039530号パンフレット、同第1998010088号パンフレット、同第1999014354号パンフレット、同第1999015685号パンフレット、同第1999047691号パンフレット、同第2000055342号パンフレット、同第2000075353号パンフレットおよび同第2001023597号パンフレット（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に挙げられる方法のいずれかにより行われてもよい。細胞溶解方法は化学的または機械的であってもよい。化学的細胞溶解は、典型的には、1つ以上の細胞を1つ以上の溶解剤と接触させることを含む。機械的溶解は、典型的には、1つ以上の細胞を1つ以上の溶解条件および／または1つ以上の溶解力に供することを含む。

10

20

【0367】

一部の実施形態では、化学的溶解を用いて細胞が溶解されてもよい。本明細書で使用されるとき、用語「溶解剤」は、細胞の破壊を助け得る任意の薬剤を指す。ある場合には、溶解剤は溶液中に導入され、溶解溶液または溶解緩衝液と呼ばれる。本明細書で使用されるとき、用語「溶解溶液」は、1つ以上の溶解剤を含む溶液（典型的には水性）を指す。溶解剤に加えて、溶解溶液は、1つ以上の緩衝剤、可溶化剤、界面活性剤、保存剤、凍結保護物質、酵素、酵素阻害薬および／またはキレータを含み得る。溶解緩衝液は、1つ以上の緩衝剤を含む溶解溶液である。溶解溶液の更なる成分としては、1つ以上の可溶化剤を挙げることができる。本明細書で使用されるとき、用語「可溶化剤」は、溶液の1つ以上の成分の溶解度および／または溶液が適用される1つ以上の実体の溶解度を増強する化合物を指す。ある場合には、可溶化剤はタンパク質溶解度を増強する。ある場合には、可溶化剤は、タンパク質のコンフォメーションおよび／または活性を維持しながらもタンパク質溶解度を増強するその能力に基づき選択される。

30

【0368】

例示的溶解剤としては、米国特許第8, 685, 734号明細書、同第7, 901, 921号明細書、同第7, 732, 129号明細書、同第7, 223, 585号明細書、同第7, 125, 706号明細書、同第8, 236, 495号明細書、同第8, 110, 351号明細書、同第7, 419, 956号明細書、同第7, 300, 797号明細書、同第6, 699, 706号明細書および同第6, 143, 567号明細書（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載されるもののいずれかを挙げることができる。ある場合には、溶解剤は、溶解塩、両性薬剤、カチオン性薬剤、イオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤から選択され得る。溶解塩としては、限定はされないが、塩化ナトリウム（NaCl）および塩化カリウム（KCl）を挙げることができる。更なる溶解塩としては、米国特許第8, 614, 101号明細書、同第7, 326, 555号明細書、同第7, 579, 181号明細書、同第7, 048, 920号明細書、同第6, 410, 300号明細書、同第6, 436, 394号明細書、同第7, 732, 129号明細書、同第7, 510, 875号明細書、同第7, 445, 930号明細書、同第6, 726, 907号明細書、同第6, 194, 191号明細書、同第7, 125, 706号明細書、同第6, 995, 006号明細書、同第6, 676, 935号明細書および同第7, 968, 333号明細書（これらの各々の内容は本明細書において

40

50

全体として参照により援用される)に記載されるもののいずれかを挙げるができる。塩の濃度は、細胞膜を破裂させる有効濃度が得られるように増加または減少させてもよい。両性薬剤とは、本明細書において参照されるとき、酸または塩基として反応する能力を有する化合物である。両性薬剤としては、限定はされないが、リゾホスファチジルコリン、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニウム)-1-プロパンスルホネート(CHAPS)、ツヴィッタージェント(登録商標)(ZWITTERGENT(登録商標))などを挙げるができる。カチオン性薬剤としては、限定はされないが、臭化セチルトリメチルアンモニウム(C(16)TAB)および塩化ベンザルコニウムを挙げるができる。界面活性剤を含む溶解剤には、イオン性界面活性剤または非イオン性界面活性剤が含まれ得る。界面活性剤は、限定はされないが、細胞膜、細胞壁、脂質、炭水化物、リポタンパク質および糖タンパク質を含めた細胞構造を分解するまたは溶解させる働きをし得る。例示的イオン性界面活性剤としては、米国特許第7,625,570号明細書および同第6,593,123号明細書または米国特許出願公開第2014/0087361号明細書(これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される)に教示されるもののいずれかが挙げられる。幾つかのイオン性界面活性剤としては、限定はされないが、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、コール酸塩およびデオキシコール酸塩を挙げるができる。ある場合には、イオン性界面活性剤は溶解溶液中に可溶化剤として含まれてもよい。非イオン性界面活性剤としては、限定はされないが、オクチルグルコシド、ジギトニン、ルブロール、C12E8、ツイーン(登録商標)-20(TWEEN(登録商標)-20)、ツイーン(登録商標)-80(TWEEN(登録商標)-80)、トリトンX-100(Triton X-100)およびノニデットP-40(Nonidet P-40)を挙げるができる。非イオン性界面活性剤は、典型的には弱溶解剤であるが、細胞性および/またはウイルス性タンパク質を可溶化するための可溶化剤として含まれてもよい。更なる溶解剤としては、酵素および尿素を挙げるができる。ある場合には、細胞溶解およびタンパク質溶解度のうちの1つ以上を増強するため、1つ以上の溶解剤が溶解溶液中に組み合わされてもよい。ある場合には、細胞膜破壊によって引き起こされ得るタンパク質分解を防ぐため、酵素阻害薬が溶解溶液中に含まれてもよい。

【0369】

一部の実施形態において、機械的細胞溶解が行われる。機械的細胞溶解方法としては、1つ以上の溶解条件および/または1つ以上の溶解力の使用を挙げるができる。本明細書で使用されるとき、用語「溶解条件」とは、細胞破壊を促進する状態または状況を指す。溶解条件には、特定の温度、圧力、浸透圧純度、塩分などが含まれ得る。ある場合には、溶解条件には温度の増加または低下が含まれる。一部の実施形態によれば、溶解条件には、細胞破壊を促進する温度の変化が含まれる。かかる実施形態により行われる細胞溶解には、凍結融解溶解が含まれ得る。本明細書で使用されるとき、用語「凍結融解溶解」とは、細胞溶液が1回以上の凍結融解サイクルに供される細胞溶解を指す。凍結融解溶解方法によれば、溶液中の細胞が凍結されて、氷の結晶の形成および拡大によって引き起こされる細胞膜の機械的破壊が誘導される。凍結融解溶解方法により用いられる細胞溶液としては、1つ以上の溶解剤、可溶化剤、緩衝剤、凍結保護物質、界面活性剤、保存剤、酵素、酵素阻害薬および/またはキレータを更に挙げることができる。凍結に供した細胞溶液を解凍すると、かかる成分が所望の細胞産物の回収を増強し得る。ある場合には、凍結融解溶解を受ける細胞溶液中に1つ以上の凍結保護物質が含まれる。本明細書で使用されるとき、用語「凍結保護物質」は、1つ以上の物質を凍結に起因する損傷から保護するために使用される薬剤を指す。凍結保護物質としては、米国特許出願公開第2013/0323302号明細書または米国特許第6,503,888号明細書、同第6,180,613号明細書、同第7,888,096号明細書、同第7,091,030号明細書(これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される)に教示されるもののいずれかを挙げるができる。ある場合には、凍結保護物質としては、限定はされないが、ジメチルスルホキシド、1,2-プロパンジオール、2,3-ブタンジオール、

10

20

30

40

50

ホルムアミド、グリセロール、エチレングリコール、1,3-プロパンジオールおよびn-ジメチルホルムアミド、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルデンプン、アガロース、デキストラン類、イノシトール、グルコース、ヒドロキシエチルデンプン、ラクトース、ソルビトール、メチルグルコース、スクロースおよび尿素を挙げることができる。一部の実施形態において、凍結融解溶解は、米国特許第7,704,721号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載される方法のいずれかにより行われてもよい。

【0370】

本明細書で使用されるとき、用語「溶解力」は、細胞を破壊するために用いられる物理的活性を指す。溶解力としては、限定はされないが、機械的力、音波的力、重力、光学的力、電気的力などを挙げることができる。機械的力によって行われる細胞溶解は、本明細書では「機械的溶解」と称される。機械的溶解により用いられ得る機械的力としては、高剪断流体力を挙げることができる。かかる機械的溶解方法によれば、マイクロフルイダイザーが使用されてもよい。マイクロフルイダイザーは、典型的には、細胞溶液が適用され得る入力リザーバを含む。次に細胞溶液がポンプ（例えば高圧ポンプ）によって高速および／または高圧で相互作用チャンバに圧送されることにより剪断流体力が生じ得る。次に得られたライセートが1つ以上の出力リザーバに収集され得る。ポンプ速度および／または圧力を調整することにより、細胞溶解を調節し、および産物（例えばウイルス粒子）の回収を増強し得る。他の機械的溶解方法としては、スクレイピングすることによる細胞の物理的破壊を挙げることができる。

【0371】

細胞溶解方法は、溶解させる細胞の細胞培養フォーマットに基づき選択されてもよい。例えば、接着細胞培養物では、幾つかの化学的および機械的溶解方法が用いられてもよい。かかる機械的溶解方法としては、凍結融解溶解またはスクレイピングを挙げることができる。別の例では、トリトンX-100（Triton-X-100）などの界面活性剤を含む溶解溶液とのインキュベーションによって接着細胞培養物の化学的溶解が行われてもよい。ある場合には、遊離DNAによって生じるライセートの粘度を低下させるため、接着細胞培養物から生成された細胞ライセートがもう一つのヌクレアーゼで処理されてもよい。

【0372】

特定の実施形態において、効率的で規模を調整可能なAAV粒子作製に、溶解のないAAV粒子の回収方法が用いられてもよい。非限定的な例では、AAV粒子は、米国特許出願公開第20090275107号明細書（この内容は全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるとおり、ヘパリン結合部位を欠くAAV粒子を培養し、それによりAAV粒子を細胞培養物の上清中に移らせて、培養物から上清を収集し；および上清からAAV粒子を単離することにより作製されてもよい。

【0373】

清澄化

ウイルス粒子を含む細胞ライセートは清澄化に供され得る。清澄化とは、細胞ライセートからのウイルス粒子の精製において行われる最初の工程を指す。清澄化は、より大きい不溶性のデブリを除去することにより更なる精製にかけるためのライセートを調製する働きをする。清澄化工程としては、限定はされないが、遠心およびろ過を挙げることができる。清澄化において、遠心は、より大きいデブリのみを除去するため低速で行われてもよい。同様に、ろ過は、より大きいデブリのみが除去されるように、より大きい孔径のフィルタを使用して行われてもよい。ある場合には、清澄化の間にタンジェンシャルフローろ過が用いられてもよい。ウイルス清澄化の目的には、細胞ライセートのハイスループット処理および最終的なウイルス回収率の最適化が含まれる。清澄化工程を含める利点には、更に大容積のライセートを処理するため規模を調整可能であることが含まれる。一部の実施形態において、清澄化は、米国特許第8,524,446号明細書、同第5,756,283号明細書、同第6,258,595号明細書、同第6,261,551号明細書、

同第6, 270, 996号明細書、同第6, 281, 010号明細書、同第6, 365, 394号明細書、同第6, 475, 769号明細書、同第6, 482, 634号明細書、同第6, 485, 966号明細書、同第6, 943, 019号明細書、同第6, 953, 690号明細書、同第7, 022, 519号明細書、同第7, 238, 526号明細書、同第7, 291, 498号明細書、同第7, 491, 508号明細書、米国特許出願公開第2013/0045186号明細書、同第2011/0263027号明細書、同第2011/0151434号明細書、同第2003/0138772号明細書、および国際公開第2002012455号パンフレット、同第1996039530号パンフレット、同第1998010088号パンフレット、同第1999014354号パンフレット、同第1999015685号パンフレット、同第1999047691号パンフレット、同第2000055342号パンフレット、同第2000075353号パンフレットおよび同第2001023597号パンフレット（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に提示される方法のいずれかにより行われてもよい。

【0374】

ろ過による細胞ライセート清澄化方法は当該技術分野において十分に理解されており、限定はされないが、受動ろ過およびフローろ過を含め、種々の利用可能な方法により行われてもよい。使用されるフィルタは種々の材料および孔径を含み得る。例えば、細胞ライセートフィルタは、約1 μ M～約5 μ M、約0.5 μ M～約2 μ M、約0.1 μ M～約1 μ M、約0.05 μ M～約0.05 μ Mおよび約0.001 μ M～約0.1 μ Mの孔径を含み得る。細胞ライセートフィルタの例示的孔径としては、限定はされないが、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.09、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.22、0.21、0.20、0.19、0.18、0.17、0.16、0.15、0.14、0.13、0.12、0.11、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.02、0.019、0.018、0.017、0.016、0.015、0.014、0.013、0.012、0.011、0.01、0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.004、0.003、0.002、0.001および0.001 μ Mを挙げることができる。特定の実施形態において、清澄化は、大きいデブリを除去するための2.0 μ M孔径のフィルタによるろ過と、続くインタクトな細胞を除去するための0.45 μ M孔径のフィルタへの通過を含み得る。

【0375】

フィルタ材料は種々の材料を含み得る。かかる材料としては、限定はされないが、ポリマー材料および金属材料（例えば焼結金属および有孔アルミニウム）を挙げることができる。例示的材料としては、限定はされないが、ナイロン、セルロース材料（例えば酢酸セルロース）、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）、ポリエーテルスルホン、ポリアミド、ポリスルホン、ポリプロピレン、およびポリエチレンテレフタレートを挙げることができる。ある場合には、細胞ライセートの清澄化に有用なフィルタとしては、限定はされないが、ウルチプリーツ・プロフィール（商標）（ULTIPLEAT PROFILE（商標））フィルタ（ポール・コーポレーション（Pall Corporation）、ニューヨーク州ポートワシントン）、スポー（商標）（SUPOR（商標））メンブレンフィルタ（ポール・コーポレーション（Pall Corporation）、ニューヨーク州ポートワシントン）を挙げることができる。

【0376】

ある場合には、ろ過速度および／または有効性を増加させるためフローろ過が行われてもよい。ある場合には、フローろ過は真空ろ過を含み得る。かかる方法によれば、フィルタのうちのろ過される細胞ライセートと反対側に真空が作り出される。ある場合には、細胞ライセートを遠心力によってフィルタに通過させてもよい。ある場合には、ポンプを使用

して細胞ライセートが清澄化フィルタに押し通される。1つ以上のフィルタを通る細胞ライセートのフロー速度は、チャンネルサイズおよび／または流圧の一方を調整することにより調節し得る。

【0377】

一部の実施形態によれば、細胞ライセートは遠心によって清澄化されてもよい。遠心を用いると、ライセート中の不溶性粒子をペレット化し得る。清澄化の間、遠心強度〔標準重力の倍数を表す重力単位（g）で表される〕は続く精製工程よりも低くてよい。ある場合には、遠心は細胞ライセートに対して約200g～約800g、約500g～約1500g、約1000g～約5000g、約1200g～約10000gまたは約8000g～約15000gで行われてもよい。一部の実施形態において、細胞ライセートの遠心は8000gで15分間行われる。ある場合には、細胞ライセート中の粒子状物質を沈降速度によって分配するため密度勾配遠心法が行われてもよい。本開示の方法により用いられる勾配としては、限定はされないが、塩化セシウム勾配およびイオジキサノール段階勾配を挙げることができる。

【0378】

精製：クロマトグラフィー

ある場合には、AAV粒子は、清澄化細胞ライセートから1つ以上のクロマトグラフィー方法によって精製されてもよい。クロマトグラフィーとは、混合物から1つ以上の要素を取り分けるための当該技術分野において公知のあらゆる方法を指す。かかる方法としては、限定はされないが、イオン交換クロマトグラフィー（例えば陽イオン交換クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィー）、イムノアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを挙げることができる。一部の実施形態において、ウイルスクロマトグラフィー方法としては、米国特許第5,756,283号明細書、同第6,258,595号明細書、同第6,261,551号明細書、同第6,270,996号明細書、同第6,281,010号明細書、同第6,365,394号明細書、同第6,475,769号明細書、同第6,482,634号明細書、同第6,485,966号明細書、同第6,943,019号明細書、同第6,953,690号明細書、同第7,022,519号明細書、同第7,238,526号明細書、同第7,291,498号明細書および同第7,491,508号明細書または国際公開第1996039530号パンフレット、同第1998010088号パンフレット、同第1999014354号パンフレット、同第1999015685号パンフレット、同第1999047691号パンフレット、同第2000055342号パンフレット、同第2000075353号パンフレットおよび同第2001023597号パンフレット（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に教示されるもののいずれかを挙げることができる。

【0379】

一部の実施形態では、イオン交換クロマトグラフィーを用いてウイルス粒子が単離されてもよい。イオン交換クロマトグラフィーを用いると、カプシドタンパク質と、固定相、典型的にはウイルス調製物（例えば清澄化ライセート）を通過させるカラムに存在する荷電部位との間の電荷間相互作用に基づきウイルス粒子が結合する。ウイルス調製物を加えた後、次に溶出溶液を加えることにより電荷間相互作用が破壊されて、結合したウイルス粒子が溶出し得る。溶出溶液は、結合したウイルス粒子の回収が促進されるように塩濃度および／またはpHを調整することにより最適化されてもよい。単離されるウイルスカプシドの電荷に応じて、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー方法が選択され得る。イオン交換クロマトグラフィー方法としては、限定はされないが、米国特許第7,419,817号明細書、同第6,143,548号明細書、同第7,094,604号明細書、同第6,593,123号明細書、同第7,015,026号明細書および同第8,137,948号明細書（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に教示されるもののいずれかを挙げることができる。

【0380】

一部の実施形態において、イムノアフィニティークロマトグラフィーが用いられてもよい。イムノアフィニティークロマトグラフィーは、1つ以上の免疫化合物（例えば抗体または抗体関連構造）を利用してウイルス粒子を保持するクロマトグラフィーの一形態である。免疫化合物は、限定はされないが、1つ以上のウイルスコートタンパク質を含め、ウイルス粒子表面上の1つ以上の構造に特異的に結合し得る。ある場合には、免疫化合物は特定のウイルス変種に特異的であってもよい。ある場合には、免疫化合物は複数のウイルス変種に結合してもよい。一部の実施形態において、免疫化合物は組換え一本鎖抗体を含んでもよい。かかる組換え一本鎖抗体としては、スミス・R・Hら（Smith, R. H. et al.）, 2009, Mol. Ther. 17 (11) : 1888-96（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載されるものを挙げることができる。かかる免疫化合物は、限定はされないが、AAV1、AAV2、AAV6およびAAV8を含め、幾つかのAAVカプシド変種への結合能を有する。

【0381】

一部の実施形態において、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）が用いられてもよい。SECは、ゲルを使用したサイズによる粒子の分離を含み得る。ウイルス粒子精製では、SECろ過は時に「ポリッシング」と称されることもある。ある場合には、SECは、ほぼ均一な最終産物を生じさせるために行われ得る。かかる最終産物は、ある場合には、前臨床試験および／または臨床試験で使用され得る（コーチン・R・M（Kotin, R. M.）, 2011, Human Molecular Genetics, 20 (1) : R2-R6、この内容は本明細書において全体として参照により援用される）。ある場合には、SECは、米国特許第6,143,548号明細書、同第7,015,026号明細書、同第8,476,418号明細書、同第6,410,300号明細書、同第8,476,418号明細書、同第7,419,817号明細書、同第7,094,604号明細書、同第6,593,123号明細書、および同第8,137,948号明細書（これらの各々の内容は本明細書において全体として参照により援用される）に教示される方法のいずれかにより行われてもよい。

【0382】

特定の実施形態において、少なくとも1つのAAV粒子を含む組成物は、米国特許第6,146,874号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載される方法を用いて単離または精製されてもよい。

【0383】

特定の実施形態において、少なくとも1つのAAV粒子を含む組成物は、米国特許第6,605,144号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載される方法を用いて単離または精製されてもよい。

【0384】

特定の実施形態において、少なくとも1つのAAV粒子を含む組成物は、米国特許第8,283,151号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載される方法を用いて単離または精製されてもよい。

【0385】

特定の実施形態において、少なくとも1つのAAV粒子を含む組成物は、米国特許第8,524,446号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載される方法を用いて単離または精製されてもよい。

【0386】

細胞への導入

siRNA二重鎖の化学的および生物学的安定性を確保するためには、siRNAをコードするポリヌクレオチドを標的細胞の内部に送達することが重要である。本開示のポリヌクレオチドは、様々な手法のいずれかを使用して、細胞へと導入することができる。

【0387】

一部の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、細胞をポリヌクレオチドと接触させることによって細胞へと導入される。一部の実施形態において、ポリヌクレオチド

は、細胞を、ポリヌクレオチドおよび親油性担体を含む組成物と接触させることによって細胞へと導入される。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、細胞において転写されると s i R N A 二重鎖を産生する能力を有する核酸配列を含むベクターを細胞にトランスフェクトするかまたは感染させることによって細胞へと導入される。

【0388】

一部の実施形態において、s i R N A 二重鎖は、細胞において転写されると s i R N A 二重鎖を産生する能力を有する核酸配列を含むベクターを細胞に注入することによって細胞へと導入される。

【0389】

他の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、電気穿孔によって細胞に送達されてもよい（例えば米国特許出願公開第 20050014264 号明細書；この内容は本明細書において全体として参照により援用される）。

【0390】

加えて、ウイルスベクター（例えば、A A V ベクター）に挿入された s i R N A 分子を、ウイルス感染によって細胞へと送達してもよい。これらのウイルスベクターは、トランスフェクションに容易には適さない細胞への s i R N A 分子の侵入を促進するように操作および最適化される。また、幾つかの合成ウイルスベクターは s h R N A を細胞ゲノムに組み込む能力を有し、それにより安定した s i R N A 発現および標的遺伝子の長期ノックダウンがもたらされる。このように、ウイルスベクターは、野生型ウイルスに見られる有害な複製および／または組み込み特徴を欠きながらも、特異的送達媒体として操作される。

【0391】

一部の実施形態において、細胞としては、限定はされないが、哺乳類起源の細胞、ヒト起源の細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、神経幹細胞、および神経前駆細胞を挙げることができる。

【0392】

医薬組成物および製剤

医薬組成物に加えて、例えば、本明細書で提供される、送達しようとする s i R N A 二重鎖（ウイルス、例えば A A V などのコードプラスミドまたは発現ベクターを含む）は、原理的にヒトへの投与に好適な医薬組成物に関し、当業者であれば、かかる組成物は、一般に、任意の他の動物への、例えば非ヒト動物、例えば非ヒト哺乳類への投与に好適であることを理解するであろう。組成物を種々の動物への投与に好適にするための、ヒトへの投与に好適な医薬組成物の修飾については十分に理解されており、獣医薬理学の当業者は、あったとしても通常どおりに過ぎない実験をもって、かかる修飾を設計および／または実施することができる。医薬組成物の投与が企図される対象としては、限定はされないが、ヒトおよび／または他の霊長類；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス、および／またはラットなど、商業的に関連性のある哺乳類を含めた哺乳類；および／または、家禽、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、および／またはシチメンチョウなど、商業的に関連性のある鳥類を含めた鳥類が挙げられる。

【0393】

一部の実施形態において、組成物は、ヒト、ヒト患者または対象に投与される。本開示の目的では、「活性成分」という語句は一般に、合成 s i R N A 二重鎖、または s i R N A 二重鎖を保持するウイルスベクター、または本明細書に記載されるとおりのウイルスベクターによって送達される s i R N A 分子のいずれかを指す。

【0394】

本明細書に記載される医薬組成物の製剤は、薬理学の技術分野において公知のまたは今後開発される任意の方法によって調製されてもよい。一般に、かかる調製方法は、活性成分を賦形剤および／または1つ以上の他の補助成分と合わせる工程、および次に、必要であればおよび／または望ましい場合には、生成物を所望の単回または複数回用量単位に分割、付形および／または包装する工程を含む。

【0395】

10

20

30

40

50

本開示に係る医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容可能な賦形剤、および／または任意の追加成分の相対量は、治療対象のアイデンティティ、サイズ、および／または状態に応じて、更には組成物が投与される経路に応じて異なることになる。

【0396】

それらをコードする siRNA 二重鎖またはウイルスベクターは、1つ以上の賦形剤を使用して製剤化することにより、(1) 安定性を増加させる；(2) 細胞トランスフェクションまたは形質導入を増加させる；(3) 持続または遅延放出を可能にする；または(4) 体内分布を変化させる（例えば、ウイルスベクターを脳および運動ニューロンなどの特異的組織または細胞型に標的化すること）ができる。

【0397】

本開示の製剤は、限定なしに、生理食塩水、リポドイド、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポブレックス、コアシェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、ウイルスベクターをトランスフェクトした細胞（例えば、対象への移植用）、ナノ粒子模倣体およびこれらの組合せを含むことができる。更に、本開示のウイルスベクターは、自己集合性核酸ナノ粒子を使用して製剤化されてもよい。

【0398】

本明細書に記載される医薬組成物の製剤は、薬理学の技術分野において公知のまたは今後開発される任意の方法によって調製されてもよい。一般に、かかる調製方法は、活性成分を賦形剤および／または1つ以上の他の補助成分と合わせる工程を含む。

【0399】

本開示に係る医薬組成物は、バルクで、単回単位用量として、および／または複数の単回単位用量として調製、包装、および／または販売されてもよい。本明細書で使用される時、「単位用量」は、所定量の活性成分を含む医薬組成物の個別的な量を指す。活性成分の量は、概して対象に投与されるであろう活性成分の投薬量に等しく、および／またはかかる投薬量の好都合な一部、例えばかかる投薬量の2分の1または3分の1である。

【0400】

本開示に係る医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容可能な賦形剤、および／または任意の追加成分の相対量は、治療下の対象のアイデンティティ、サイズ、および／または状態に応じて、更には組成物が投与される経路に応じて異なり得る。例えば、組成物は、0.1%～99% (w/w) の活性成分を含み得る。例として、組成物は、0.1%～100%、例えば0.5～50%、1～30%、5～80%、少なくとも80% (w/w) の活性成分を含み得る。

【0401】

一部の実施形態において、本明細書に記載される製剤は、少なくとも1つのSOD1ターゲットポリヌクレオチドを含んでもよい。非限定的な例として、製剤は、SOD1遺伝子を異なる部位に標的化する1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのポリヌクレオチドを含んでもよい。

【0402】

一部の実施形態において、薬学的に許容可能な賦形剤は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の純度であってもよい。一部の実施形態において、賦形剤はヒトへの使用および動物への使用が承認されている。一部の実施形態において、賦形剤は米国食品医薬品局によって承認されていてもよい。一部の実施形態において、賦形剤は医薬品グレードであってもよい。一部の実施形態において、賦形剤は、米国薬局方 (USP)、欧州薬局方 (EP)、英国薬局方、および／または国際薬局方の規格に適合し得る。

【0403】

賦形剤には、本明細書で使用されるとき、限定はされないが、所望の特定の剤形に適するとおりのあらゆる溶媒、分散媒、希釈剤、または他の液体媒体、分散液または懸濁液助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、保存剤などが含まれる。医薬組成物を製剤化するための種々の賦形剤および組成物の調製技法は当該技術分野において公知である

10

20

30

40

50

（「レミントン：薬学の科学と実践（Remington: The Science and Practice of Pharmacy）」、第21版、A・R・ジェンナロ（A・R・Gennaro）著、リップピンコット・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス（Lippincott, Williams & Wilkins）、メリーランド州ボルチモア（Baltimore）、2006年を参照のこと；全体として参照により本明細書に援用される）。従来の賦形剤媒体の使用は本開示の範囲内に企図され得るが、但し、任意の望ましくない生物学的効果を生じたり、またはその他、医薬組成物の任意の他の1つまたは複数の成分と有害な形で相互作用したりするなどにより、任意の従来の賦形剤媒体が物質またはその誘導体と不適合である場合は除く。

【0404】

例示的希釈剤としては、限定はされないが、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、スクロース、セルロース、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、コーンスターチ、粉末糖等、および／またはこれらの組合せが挙げられる。

【0405】

一部の実施形態において、製剤は少なくとも1つの非活性成分を含み得る。本明細書で使用されるとき、用語「非活性成分」は、製剤に含まれる1つ以上の非活性薬剤を指す。一部の実施形態において、本開示の製剤に使用し得る非活性成分は、全てが米国食品医薬品局（FDA）によって承認されているか、いずれも承認されていないか、または一部が承認されているものであり得る。

【0406】

本明細書で開示されるSOD1ターゲティングポリヌクレオチドを保持するウイルスベクターの製剤としては、カチオンまたはアニオンを挙げることができる。特定の実施形態において、製剤は、限定はされないが、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{+} およびこれらの組合せなど、金属カチオンを含む。

【0407】

本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容可能な塩」は、開示される化合物の誘導体を指し、ここで親化合物は、既存の酸または塩基部分からその塩形態への変換（例えば、遊離塩基を好適な有機酸と反応させることによる）によって修飾される。薬学的に許容可能な塩の例としては、限定はされないが、アミン類などの塩基性残基の鉱酸塩または有機酸塩；カルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩などが挙げられる。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、酢酸、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、カンファール酸塩、カンファールスルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなど、ならびに非毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミン陽イオン、例えば、限定はされないが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどが挙げられる。本開示の薬学的に許容可能な塩には、例えば非毒性無機酸または有機酸から形成される親化合物の従来の非毒性塩が含まれる。本開示の薬学的に許容可能な塩は、従

10

20

30

40

50

来の化学的方法により塩基または酸部分を含有する親化合物から合成することができる。概して、かかる塩は、遊離酸または塩基形態のこれらの化合物と、水中または有機溶媒中、またはこれら2つの混合物中（概して、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、またはアセトニトリルなどの非水性媒体が好ましい）にある化学量論量の適切な塩基または酸とを反応させることにより調製し得る。好適な塩の一覧については、「レミントンの薬学科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」、第17版、マック・パブリッシング・カンパニー（Mack Publishing Company）、ペンシルベニア州イーストン（Easton）、1985年、p. 1418、「薬学的塩：特性、選択、および使用（Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use）」、P・H・シュタールおよびC・G・ウェルムス（P. H. Stahl and C. G. Wermuth）編、ワイリー・ブライザー・エイチ（Wiley-VCH）、2008年、およびベルジュラ（Berger et al.），Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19, 1977が参照される；この各々の内容は全体として参照により本明細書に援用される。

【0408】

用語「薬学的に許容可能な溶媒和物」は、本明細書で使用されるとき、好適な溶媒の分子が結晶格子に取り込まれている本開示の化合物を意味する。好適な溶媒は、投与される投薬量で生理学的に忍容可能である。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水、またはこれらの混合物を含む溶液から結晶化、再結晶化、または沈殿によって調製されてもよい。好適な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一水和物、二水和物、および三水和物）、N-メチルピロリジノン（NMP）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N, N'-ジメチルホルムアミド（DMF）、N, N'-ジメチルアセトアミド（DMAC）、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（DMEU）、1, 3-ジメチル-3, 4, 5, 6-テトラヒドロ-2-(1H)-ピリミジノン（DMPU）、アセトニトリル（ACN）、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、2-ピロリドン、安息香酸ベンジルなどである。水が溶媒であるとき、その溶媒和物は「水合物」と称される。

【0409】

本開示によれば、SOD1ターゲティングポリヌクレオチドまたはそれを含むAAVベクターは、CNS送達用に製剤化されてもよい。脳血液関門を通過する薬剤が使用されてもよい。例えば、脳血液関門内皮をsiRNA分子の標的とし得る、一部の細胞透過性ペプチドを使用して、SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖を製剤化してもよい（例えば、マスパラ（Mathupala），Expert Opin Ther Pat., 2009, 19, 137-140；この内容は全体として参照により本明細書に援用される）。

【0410】

特定の実施形態において、本開示のAAV粒子は、エチレンオキシド／プロピレンオキシドコポリマー（プルロニック（登録商標）またはポロキサマーとしても知られている）と組み合わせて、PBSで製剤化され得る。

【0411】

特定の実施形態において、本開示のAAV粒子は、約7.0のpHにて、0.001%プルロニック酸（F-68）（ポロキサマー188）を有するPBSで製剤化され得る。

特定の実施形態において、本開示のAAV粒子は、約7.3のpHにて、0.001%プルロニック酸（F-68）（ポロキサマー188）を有するPBSで製剤化され得る。

【0412】

特定の実施形態において、本開示のAAV粒子は、約7.4のpHにて、0.001%プルロニック酸（F-68）（ポロキサマー188）を有するPBSで製剤化され得る。

特定の実施形態において、本開示のAAV粒子は、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウムおよびエチレンオキシド／プロピレンオキシドコポリマーを含む溶液で製剤化され得る。

【0413】

特定の実施形態において、本開示のAAV粒子は、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム二塩基性、リン酸ナトリウム一塩基性およびポリキサマー188／プルロニック酸（F-68）を含む溶液で製剤化され得る。

【0414】

投与

本開示のSOD1ターゲティングポリヌクレオチドは、治療上有効な結果をもたらす任意の経路によって投与し得る。経路としては、限定はされないが、以下のものが挙げられる：実質内（脳組織の中）、実質内（脊髄）、実質内（CNS）、経腸（腸の中）、胃腸、硬膜外（硬膜の中）、経口（口を経由して）、経皮的、硬膜上、脳内（大脳の中）、脳室内（脳室の中）、上皮性（皮膚への塗布）、皮内（皮膚そのもの内への）、皮下（皮膚の下）鼻投与（鼻を介して）、静脈内（静脈内への）静脈内ボラス、静脈内点滴、動脈内（動脈の中）、筋肉内（筋肉の中）、心臓内（心臓の中）、骨内注入（骨髄の中）、髄腔内（脊柱管の中）、腹腔内（腹膜への注入または注射）、膀胱内注入、硝子体内（目を通じて）、海綿体内注射（病的腔の中）、腔内（陰茎の基部の中）、腔内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身分布のためのインタクトな皮膚を通じた拡散）、径粘膜（粘膜を通じた拡散）、経腔、インサフレーション（鼻から吸い込む）、舌下、唇下、浣腸、点眼薬（結膜上）、点耳薬で、耳介（耳内または耳を介して）、頬側（頬の方に向けて）、結膜、皮膚、歯（1本または複数の歯に対して）、電気浸透、子宮頸管内、副鼻腔内、気管内、体外、血液透析、浸潤、間質内、腹腔内、羊膜内、関節内、胆管内、気管支内、嚢内、軟骨内（軟骨の範囲内）、仙骨内（馬尾（*cauda equine*）の範囲内）、大槽内（大槽小脳延髄の範囲内）、角膜内（角膜の範囲内）、歯冠内、冠内（冠動脈の範囲内）、海綿体内（*intracorporus cavernosum*）（陰茎核海綿体（*corpus cavernosa*）の可膨張性腔の範囲内）、椎間板内（椎間板の範囲内）、管内（腺管の範囲内）、十二指腸内（十二指腸の範囲内）、硬膜内（硬膜の範囲内または真下）、表皮内（表皮に対して）、食道内（食道に対して）、胃内（胃の範囲内）、歯肉内（歯肉の範囲内）、回腸内（小腸の遠位部分の範囲内）、病巣内（局所病変の範囲内、またはそこに直接導入される）、管腔内（管の管腔の範囲内）、リンパ内（リンパの範囲内）、髄内（骨の髄腔の範囲内）、髄膜内（髄膜の範囲内）、眼内（眼の範囲内）、卵巣内（卵巣の範囲内）、心膜内（心膜の範囲内）、胸膜内（胸膜の範囲内）、前立腺内（前立腺の範囲内）、肺内（肺、またはその気管支の範囲内）、洞内（鼻洞または眼窩周囲洞の範囲内）、脊髄内（脊柱の範囲内）、滑液嚢内（関節の滑膜腔の範囲内）、腱内（腱の範囲内）、精巣内（睾丸の範囲内）、髄腔内（脳脊髄軸の任意のレベルにおける脳脊髄液の範囲内）、胸腔内（胸郭の範囲内）、細管内（臓器の細管の範囲内）、腫瘍内（腫瘍の範囲内）、鼓室内（中耳（*aurus media*）の範囲内）、血管内（1つまたは複数の血管の範囲内）、脳室内（脳室の範囲内）、イオントフォoresis（電流を用いるもので、可溶性塩のイオンが体の組織に移動する）、灌注（開放創または体腔を浸すまたはフラッシュする）、喉頭（喉頭に対して直接）、経鼻胃（鼻を通じて胃内の中に）、密封包帯療法（局所経路投与、これは次に包帯で覆われ、包帯がその範囲を閉塞する）、眼（外眼部に対して）、中咽頭（口および咽頭に対して直接）、非経口、経皮、関節周囲、硬膜外、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器（局所または全身作用のため経口的または経鼻的に吸入することにより気道の範囲内に）、球後（橋の後ろまたは眼球の後ろ）、軟部組織、くも膜下、結膜下、粘膜下、局所、経胎盤（胎盤を通じてまたは越えて）、経気管（気管の壁を通じて）、経鼓室（鼓室を越えてまたは通じて）、尿管（尿管に対して）、尿道（尿道に対して）、腔、仙骨ブロック、診断的、神経ブロック、胆管灌注、心灌注、フォトフェーシス、線条体内（線条体の範囲内）または脊髄。

【0415】

具体的な実施形態において、少なくとも1つのSOD1ターゲティングポリヌクレオチドを含むAAVベクターを含む組成物は、それらが中枢神経系に侵入し、運動ニューロンに入り込むことが可能になるように投与してもよい。

【0416】

一部の実施形態において、本開示の療法剤は、筋肉注射によって投与してもよい。リズバノブら (Rizvanov et al.) は、突然変異体ヒト SOD1 mRNA を標的とする siRNA 分子は、SOD1^{G93A} トランスジェニック ALS マウスでは、坐骨神経によって取り込まれ、運動ニューロンの周核体に逆行的に輸送され、突然変異体 SOD1 mRNA を阻害することを初めて示した (リズバノブ エーエーら (Rizvanov AA et al.), Exp. Brain Res., 2009, 195 (1), 1-4; この内容は全体として参照により本明細書に援用される)。また、別の研究は、突然変異体 SOD1 遺伝子に対する低分子ヘアピン RNA (shRNAs) を発現する AAV の筋肉送達、筋肉ならびに神経支配運動ニューロンにおける著しい突然変異体 SOD1 ノックダウンに結び付いたことを示した (タウン シーら (Towne C et al.), Mol Ther., 2011; 19 (2): 274-283; この内容は全体として参照により本明細書に援用される)。

10

【0417】

一部の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖を発現する AAV ベクターは、末梢注射および／または鼻腔内送達によって対象に投与されてもよい。当該技術分野では、siRNA 二重鎖の AAV ベクターの末梢投与が中枢神経系まで、例えば運動ニューロンまで輸送され得ることが開示された (例えば、米国特許出願公開第 20100240739 号明細書; および同第 20100130594 号明細書; この各々の内容は全体として参照により本明細書に援用される)。

【0418】

20

他の実施形態において、本開示の siRNA 二重鎖を含む組成物は、頭蓋内送達によって対象に投与されてもよい (例えば、米国特許第 8, 119, 611 号明細書を参照のこと; この内容は全体として参照により本明細書に援用される)。

【0419】

本開示の SOD1 ターゲティングポリヌクレオチドは任意の好適な形態で、液体溶液または懸濁液、液体溶液または液体溶液中の懸濁液に好適な固体形態のいずれとして投与されてもよい。SOD1 ターゲティングポリヌクレオチドは、任意の適切なかつ薬学的に許容可能な賦形剤と共に製剤化されてもよい。

【0420】

本開示の SOD1 ターゲティングポリヌクレオチドは、「治療上有効な」量、すなわち、疾患に関連する少なくとも 1 つの症状を軽減および／または予防するのに十分な、または対象の状態の改善をもたらすのに十分な量で投与されてもよい。

30

【0421】

一部の実施形態において、本開示の医薬組成物は、実質内注射または注入によって投与されてもよい。本明細書で使用されるとき、「注射」および「注入」は同義的に使用され、同じことを示し得る。非限定的な例として、本開示の医薬組成物は、実質内注射によって対象に投与されてもよい。特定の実施形態において、実質内注射は、脊髄実質内注射であってもよく、その場合、医薬組成物は、脊髄の組織に直接投与されてもよい。特定の実施形態において、実質内注射は、CNS (中枢神経系) 実質内注射であってもよく、その場合、医薬組成物は、CNS の組織に直接投与されてもよい。

40

【0422】

特定の実施形態において、本開示の医薬組成物は、脊髄運動ニューロンおよび／またはアストロサイトに形質導入するため、治療有効量で大槽に投与されてもよい。

特定の実施形態において、本開示の医薬組成物は、線条体内注入によって投与されてもよい。

【0423】

一部の実施形態において、本開示の医薬組成物は、実質内注射によって、ならびに本明細書に記載される別の投与経路によって投与されてもよい。

一部の実施形態において、本開示の医薬組成物は、実質内注射によって、CNS、脳、および／または脊髄に投与されてもよい。

50

【0424】

一部の実施形態において、本開示の医薬組成物は、実質内注射および髄腔内注射によって投与されてもよい。特定の実施形態において、本開示の医薬組成物は、実質内注射および線条体内注射によって投与されてもよい。

【0425】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、1 uLよりも多くの容積で、脊髄の任意のレベルの単一部位または複数部位に実質内（IPa）注入することにより投与される。特定の実施形態において、1 uL～100 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～240 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～240 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～220 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～200 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～180 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～160 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～150 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～140 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～130 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～120 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～110 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～90 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～80 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～70 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～60 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～50 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～40 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～30 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、1 uL～20 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、5 uL～60 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、5 uL～240 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、10 uL～20 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、10 uL～30 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、10 uL～40 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、10 uL～50 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、10 uL～60 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、10 uL～80 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、10 uL～90 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～240 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～200 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～180 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～150 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～120 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～100 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～80 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～60 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～50 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～40 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、20 uL～30 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、50 uL～200 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、50 uL～180 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、50 uL～150 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、50 uL～100 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、50 uL～80 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、50 uL～70 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、100 uL～240 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、100 uL～200 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、100 uL～180 uLの容積が投与される。特定の実施形態において、100 uL～150 uLの容積が投与される。

【0426】

脊髄は脊柱内に位置する。脊柱は、一連の椎骨分節で構成される。7個の頸部（C1～C7）、12個の胸部（T1～T12）、5個の腰部（L1～L5）、および5個の仙骨

10

20

30

40

50

(S1～S5) 椎骨分節が存在する。本明細書に記載されるAAV粒子の脊髄への実質内注射または注入は、これらの椎骨分節のうちの1つまたは複数で生じ得る。例えば、本明細書に記載されるAAV粒子の脊髄への実質内注射または注入は、1、2、3、4、5部位、または5部位よりも多くの箇所が生じ得る。実質内注射または注入部位は、頸部脊髄、胸部脊髄、腰部脊髄、および仙骨脊髄から独立に選択される1つ以上の領域であってもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において脊髄へと実質内(IPa)注入により投与される。

【0427】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、およびC7から選択される1つ以上の部位（例えば、2、3、4または5つの部位）に実質内(IPa)注入により投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、およびC7から選択される2つの部位に実質内(IPa)注入により投与されてもよい。

10

【0428】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、およびT12から選択される1つ以上の部位（例えば、2、3、4または5つの部位）に実質内(IPa)注入により投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、およびT12から選択される2つの部位に実質内(IPa)注入により投与されてもよい。

20

【0429】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、L1、L2、L3、L4、およびL5から選択される1つ以上の部位（例えば、2、3、4または5つの部位）に実質内(IPa)注入により投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、L1、L2、L3、L4、およびL5から選択される2つの部位に実質内(IPa)注入により投与されてもよい。

【0430】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、S1、S2、S3、S4、およびS5から選択される1つ以上の部位（例えば、2、3、4または5つの部位）に実質内(IPa)注入により投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、S1、S2、S3、S4、およびS5から選択される2つの部位に実質内(IPa)注入により投与されてもよい。

30

【0431】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4、L5、S1、S2、S3、S4、およびS5から選択される1つ以上の部位（例えば、2、3、4または5つの部位）において実質内(IPa)注入により投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4、L5、S1、S2、S3、S4、およびS5から選択される2つの部位において実質内(IPa)注入により投与されてもよい。

40

【0432】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4、およびL5から選択される1つ以上の部位（例えば、2、3、4または5つの部位）に投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4、およびL5から選択される2つの部位において実質内(IPa)

50

注入により投与されてもよい。

【0433】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、およびT12から選択される1つ以上のレベル（例えば、2、3、または4つの部位）に投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、およびT12から選択される2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。非限定的な例として、2つの部位は、頸部脊髓領域（例えば、C1～C7）から1つの部位および胸部脊髓領域（例えば、T1～T12）から1つの部位を含み得る。

10

【0434】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、L1、L2、L3、L4、およびL5から選択される1つ以上のレベル（例えば、2、3、または4つの部位）に投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、L1、L2、L3、L4、およびL5から選択される2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。非限定的な例として、2つの部位は、頸部脊髓領域（例えば、C1～C7）から1つの部位および腰部脊髓領域（例えば、L1～L5）から1つの部位を含み得る。

20

【0435】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4、およびL5から選択される1つ以上のレベル（例えば、2、3、または4つの部位）に投与されてもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4、およびL5から選択される2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。非限定的な例として、2つの部位は、胸部脊髓領域（例えば、T1～T12）から1つの部位および腰部脊髓領域（例えば、L1～L5）から1つの部位を含み得る。

30

【0436】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、および／またはL1において実質内（IPa）注入により投与される。

【0437】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1において実質内（IPa）注入により投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C2において実質内（IPa）注入により投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C3において実質内（IPa）注入により投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C4において実質内（IPa）注入により投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C5において実質内（IPa）注入により投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C6において実質内（IPa）注入により投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C7において実質内（IPa）注入により投与される。

40

【0438】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1およびC2において実質内（IPa）注入により投与される。特定の実施形態において、本明細書に記載されるAAV粒子は、C1およびC3において実質内

50

【 0 4 3 9 】

10

20

30

40

【 0 4 4 4 】

【 0 4 4 5 】

50

、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60分、または60分超にわたってもよい。非限定的な例として、注入は10分間にわたる。非限定的な例として、注入は11分間にわたる。非限定的な例として、注入は12分間にわたる。非限定的な例として、注入は13分間にわたる。非限定的な例として、注入は14分間にわたる。非限定的な例として、注入は15分間にわたる。

【0446】

実質内（IPa）注入、例えば脊髄注入は、独立に、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、80、120、240 uLまたは240 uL超の用量容積であってもよい。非限定的な例として、用量容積は約20 uLである。非限定的な例として、用量容積は約25 uLである。非限定的な例として、用量容積は約30 uLである。非限定的な例として、用量容積は約35 uLである。非限定的な例として、用量容積は約40 uLである。非限定的な例として、用量容積は約45 uLである。非限定的な例として、用量容積は約50 uLである。非限定的な例として、用量容積は約60 uLである。非限定的な例として、用量容積は約80 uLである。非限定的な例として、用量容積は約120 uLである。非限定的な例として、用量容積は約240 uLである。

【0447】

特定の実施形態において、用量容積は、投与の1部位当たり5 uL～60 uLである。別の実施形態において、用量容積は、投与の1部位当たり25 uL～40 uLである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3、C5、C6、またはC7への投与の場合、5 uL～60 uLである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、5 uL～60 uLである。別の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC5への投与の場合、5 uL～60 uLである。さらに別の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量容積は、脊髄のレベルC5への投与の場合、5 uL～60 uLである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3、C5、C6、またはC7への投与の場合、25 uL～40 uLである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、25 uL～40 uLである。別の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC5への投与の場合、25 uL～40 uLである。さらに別の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、25 uL～40 uLであり、脊髄のレベルC5への投与の用量容積は、25 uL～40 uLである。

【0448】

実質内（IPa）注入、例えば脊髄注入は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 uL／分、または15 uL／分超の注射速度であってもよい。非限定的な例として、注射速度は、5 uL／分である。

【0449】

実質内（IPa）注入、例えば脊髄注入は、約 1×10^6 VG～約 1×10^{16} VGの用量であってもよい。一部の実施形態において、送達は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 2.1×10^{11} 、 2.2×10^{11} 、 2.3×10^{11} 、 2.4×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 2.6×10^{11} 、 2.7×10^{11} 、 2.8×10^{11} 、 2.9×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 4.1×10^{11} 、 4.2×10^{11} 、 4.3×10^{11} 、 4.4×10^{11} 、 4.5

$\times 10^{11}$ 、 4.6×10^{11} 、 4.7×10^{11} 、 4.8×10^{11} 、 4.9×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 6.1×10^{11} 、 6.2×10^{11} 、 6.3×10^{11} 、 6.4×10^{11} 、 6.5×10^{11} 、 6.6×10^{11} 、 6.7×10^{11} 、 6.8×10^{11} 、 6.9×10^{11} 、 7×10^{11} 、 7.1×10^{11} 、 7.2×10^{11} 、 7.3×10^{11} 、 7.4×10^{11} 、 7.5×10^{11} 、 7.6×10^{11} 、 7.7×10^{11} 、 7.8×10^{11} 、 7.9×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.1×10^{12} 、 1.2×10^{12} 、 1.3×10^{12} 、 1.4×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 1.6×10^{12} 、 1.7×10^{12} 、 1.8×10^{12} 、 1.9×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 8.1×10^{12} 、 8.2×10^{12} 、 8.3×10^{12} 、 8.4×10^{12} 、 8.5×10^{12} 、 8.6×10^{12} 、 8.7×10^{12} 、 8.8×10^{12} 、 8.9×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 6.7×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 、または 1×10^{16} VG の組成物濃度を含み得る。非限定的な例として、用量は、 4.4×10^{10} VG である。非限定的な例として、用量は、 1.4×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 4.1×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 4.4×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 5.0×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 5.1×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 6.6×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 7.2×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 8.0×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 8.1×10^{11} VG である。非限定的な例として、用量は、 1.0×10^{12} VG である。非限定的な例として、用量は、 1.1×10^{12} VG である。非限定的な例として、用量は、 1.2×10^{12} VG である。非限定的な例として、用量は、 1.3×10^{12} VG である。非限定的な例として、用量は、 1.0×10^{10} vg $\sim 1.0 \times 10^{12}$ VG である。非限定的な例として、用量は、 5.0×10^{11} vg $\sim 8.0 \times 10^{11}$ VG である。

【0450】

特定の実施形態において、実質内 (IPA) 注入、例えば脊髄注入は、約 1.0×10^{13} VG/ml $\sim$ 約 3×10^{13} VG/ml であってもよい。別の実施形態において、実質内 (IPA) 注入、例えば脊髄注入は、 1.5×10^{13} VG/ml $\sim 3.0 \times 10^{13}$ VG/ml である。さらに別の実施形態において、実質内 (IPA) 注入、例えば脊髄注入は、 1.8×10^{13} VG/ml $\sim 2.5 \times 10^{13}$ VG/ml である。特定の実施形態において、実質内 (IPA) 注入、例えば脊髄注入は、 1.8×10^{13} VG/ml、 1.85×10^{13} VG/ml、 1.9×10^{13} VG/ml、 1.95×10^{13} VG/ml、 2×10^{13} VG/ml、 2.01×10^{13} VG/ml、 2.02×10^{13} VG/ml、 2.03×10^{13} VG/ml、 2.04×10^{13} VG/ml、 2.05×10^{13} VG/ml、 2.06×10^{13} VG/ml、 2.07×10^{13} VG/ml、 2.08×10^{13} VG/ml、 2.09×10^{13} VG/ml、または 2.10×10^{13} VG/ml である。

【0451】

特定の実施形態において、用量容積は、投与の1部位当たり 5 μ L $\sim$ 60 μ L であり、用量は、 1.0×10^{10} VG $\sim 1.0 \times 10^{12}$ VG である。特定の実施形態において、用量容積は、投与の1部位当たり 5 μ L $\sim$ 60 μ L であり、用量は、 5.0×10^{11} VG $\sim 8.0 \times 10^{11}$ VG である。別の実施形態において、用量容積は、投与の1部位当たり 25 μ L $\sim$ 40 μ L であり、用量は、 1.0×10^{10} VG $\sim 1.0 \times 10^{12}$ VG である。

ある。別の実施形態において、用量容積は、投与の1部位当たり25 uL～40 uLであり、用量は、 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3、C5、C6、またはC7への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VGである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3、C5、C6、またはC7への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量は、 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VGである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量は、 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。別の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC5への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VGである。別の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC5への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量は、 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。さらに別の実施形態では：i) 用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VG、例えば 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGであり、ii) 用量容積は、脊髄のレベルC5への投与の場合、5 uL～60 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VG、例えば 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3、C5、C6、またはC7への投与の場合、25 uL～40 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VGである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3、C5、C6、またはC7への投与の場合、25 uL～40 uLであり、用量は、 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、25 uL～40 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VGである。特定の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、25 uL～40 uLであり、用量は、 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。別の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC5への投与の場合、25 uL～40 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VGである。別の実施形態において、用量容積は、脊髄のレベルC5への投与の場合、25 uL～40 uLであり、用量は、 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。さらに別の実施形態では：i) 用量容積は、脊髄のレベルC3への投与の場合、25 uL～40 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VG、例えば 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGであり、ii) 脊髄のレベルC5への投与の用量容積は、25 uL～40 uLであり、用量は、 1.0×10^{10} VG～ 1.0×10^{12} VG、例えば 5.0×10^{11} VG～ 8.0×10^{11} VGである。

【0452】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じまたは異なる容積（単回）で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じまたは異なる容積（複数回）で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じまたは異なる注入速度で送達されてもよい。

【0453】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ容積で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ用量で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ注入速度で送達されてもよい。

【0454】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる容積で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる容積

10

20

30

40

50

で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる注入速度で送達されてもよい。

【0455】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ容積で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる用量で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる注入速度で送達されてもよい。

【0456】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ容積で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる用量で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ注入速度で送達されてもよい。

10

【0457】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ容積で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ用量で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる注入速度で送達されてもよい。

【0458】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる容積で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ用量で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ注入速度で送達されてもよい。

20

【0459】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる容積で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる用量で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ注入速度で送達されてもよい。

【0460】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、2つの部位において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる容積で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に同じ用量で送達されてもよい。AAV粒子は、両方の部位に異なる注入速度で送達されてもよい。

30

【0461】

特定の実施形態において、siRNA分子をコードする本明細書に記載されるAAV粒子は、C3およびC5において実質内（IPa）注入により投与されてもよい。C3での注入の場合、容積は25uLであってもよく、用量は 4.1×10^{11} vgであってもよい。C5での注入の場合、容積は40uLであってもよく、用量は 6.6×10^{11} vgであってもよい。両注入の注射速度は、約13分間にわたって5uL／分であってもよい。

【0462】

一部の実施形態において、IPa注入（例えば、脊髄）は、脊髄の吻側－尾側軸の長さに沿った医薬組成物（つまり、AAV粒子）の送達をもたらす。一部の実施形態において、IPa注入（例えば、脊髄）は、AAV粒子伝搬の吻側尾側勾配をもたらす。一部の実施形態において、IPa注入（例えば、脊髄）は、注射部位から遠位にある領域への医薬組成物の送達をもたらす。理論により束縛されることは望まないが、本開示のAAV粒子は、特定の部位でのIPa注入後、脊髄の吻側尾側軸の長さを移動し得る。言い換えれば、AAV粒子は、注射部位の近傍に局限されなくともよい。非限定的な例として、AAV粒子は、経シナプス（シナプスを越える）機序によって輸送され得る。この経シナプス機序は、脊髄の吻側－尾側軸に沿って存在する路またはチャネルを追従し得る。

40

【0463】

デバイス

本明細書で使用されるとき、用語「デバイス」は、対象への医薬組成物の送達または対

50

象における投与された医薬組成物の検出を促進するなど、特定の目的に適合するように構築または改変されている任意の物品を指す。

【0464】

一部の実施形態において、デバイスは、医薬組成物を実質内注射するために利用され得る。デバイスは、医薬組成物を脊髄へと投与するためにも使用されてもよい。

一部の実施形態において、デバイスは、特注のフローティングカニューレであってもよい。特定の実施形態において、小さな直径を有する特注の注入カニューレが、注射に使用される。カニューレは、可変長の30ゲージ可撓性サイラスティック管材に接続されている固定長の30ゲージ斜角針を含み得る。遠位端部にはハミルトンルアーロックを装着することができ、ハミルトンルアーロックには、ひいては微量注入器ポンプを取り付けることができる。近位サイラスティック管材は、注射針フランジの近位端部に据え付けられている24ゲージ剛性外側カニューレ内に鞘収され得る。フランジは、外側カニューレに着座し、注射針の深さ止めとしての役目を果たすことができる。

10

【0465】

特定の実施形態において、デバイスは、脊髄内カニューレであってもよい。脊髄内カニューレは、近位注射器接続部および遠位先端を含み得る。近位注射器接続部は、保護シースを有する3〜20'カニューレに接続され得るメスルアーロック注射器コネクタを備える。カニューレは、遠位先端から注射器までの単一内部管腔を含み得る。カニューレは、遠位先端付近に4〜6'可撓性部分を含み得る。遠位先端は、フランジ／深さ止めおよび平坦剛性先端を含む。また、脊髄内カニューレは、対象に取り付けるための機構を含み得る。

20

【0466】

特定の実施形態において、デバイスは、複雑な定位フレームであってもよい。

特定の実施形態において、デバイスは、簡易な定位フレームであってもよい。

特定の実施形態において、医薬組成物は、フレームを用いずに送達されてもよい。

【0467】

特定の実施形態において、デバイスは、磁気共鳴撮像装置であってもよい。かかる撮像装置は、ガドリニウムなどの造影剤と共に使用される場合、対象における投与された医薬組成物を検出することができる。

【0468】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるデバイスはいずれも、投与された医薬組成物を送達および／または検出するために組み合わせることができる。

30

用量設定

本開示の医薬組成物は、SOD1関連の障害（例えば、ALS）を予防および治療するのに有効な任意の量を用いて対象に投与されてもよい。必要となる正確な量は、対象の種、年齢、および全身状態、疾患の重症度、詳細な組成物、その投与様式、その活性様式などに応じて対象毎に異なることになる。

【0469】

本開示の組成物は典型的には、投与の簡便性および投薬量の均一性のため、単位剤形で製剤化される。しかしながら、本開示の組成物の1日の総使用量は主治医が妥当な医学的判断の範囲内で決定し得ることは理解されるであろう。任意の特定の患者に対する具体的な治療有効性は、治療下の障害および障害の重症度；用いられる具体的な化合物の活性；用いられる具体的な組成物；患者の年齢、体重、全般的な健康、性別および食事；投与時間、および投与経路；治療継続期間；用いられる具体的な化合物と併用してまたは同時に使用される薬物；および医学分野で周知の同様の要因を含めた種々の要因に依存することになる。

40

【0470】

一部の具体的な実施形態において、本開示のsiRNA二重鎖を送達するためのAAVベクターの用量は、疾患の状態、対象および治療戦略などに応じて適合され得る。典型的には、1用量当たり約 10^5 、 10^6 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 〜 10^{16}

50

ウイルスゲノム（単位）が投与されてもよい。

【0471】

所望の投薬量は、1日3回、1日2回、1日1回、1日おき、3日に1回、週1回、2週に1回、3週に1回または4週に1回送達されてもよい。

特定の実施形態において、所望の投薬量は、複数回の投与（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14回、またはそれ以上の投与）を用いて送達されてもよい。複数回の投与が利用される場合、本明細書に記載されるような分割用量投与レジメンが用いられてもよい。本明細書で使用されるとき、「分割用量」は、単一単位用量または総1日用量を2つ以上の用量に分割するもの、例えば単一単位用量の2回以上の投与である。本明細書で使用されるとき、「単一単位用量」は、1用量／1回／単一の経路／単一の接触点、すなわち単一の投与イベントで投与される任意の調節性ポリヌクレオチド治療薬の用量である。本明細書で使用されるとき、「総1日用量」は、24時間に与えられるまたは処方される量である。これは単一単位用量として投与されてもよい。特定の実施形態において、本開示のSOD1ターゲティングポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは分割用量で対象に投与される。それらの用量は、緩衝液のみに、または本明細書に記載される製剤に製剤化されてもよい。

【0472】

A L Sを含む脊髄に関連する障害を治療する方法

本開示では、本明細書に記載されるSOD1ターゲティングポリヌクレオチドを細胞へと導入する方法であって、ポリヌクレオチドのいずれかを、標的SOD1 mRNAの分解が生じるのに十分な量で前記細胞へと導入することを含む方法が提供される。一部の態様において、細胞は、幹細胞、運動ニューロンなどのニューロン、筋細胞およびアストロサイトなどのグリア細胞であってもよい。

【0473】

本明細書には、限定はされないが、運動ニューロン疾患（例えば、A L S）など、脊髄に関連する障害を治療するために、A A V粒子を脊髄へと送達する方法が記載される。特定の実施形態において、これらの方法は、経シナプス伝搬をもたらす。

【0474】

また、本明細書には、治療を必要としている対象における異常なSOD1機能に関連するA L Sを治療するための方法が開示される。本方法は、任意選択で、対象に、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのs i R N A二重鎖を含むかまたはコードする組成物の治療有効量を投与することを含む。前記s i R N A二重鎖は、A L Sを治療的に処置するように、対象におけるSOD1遺伝子の発現をサイレンシングし、SOD1タンパク質の産生を阻害し、A L Sの1つ以上の症状を軽減するであろう。

【0475】

一部の実施形態において、本開示のSOD1ターゲティングポリヌクレオチドまたは含むかもしくはコードする組成物は、対象の中枢神経系に投与される。他の実施形態において、本開示のs i R N A二重鎖またはそれを含む組成物は、対象の筋肉に投与される。

【0476】

特に、SOD1ターゲティングポリヌクレオチドは、運動ニューロンを含む特定のタイプの標的細胞；オリゴデンドロサイト、アストロサイトおよびミクログリアを含むグリア細胞；ならびに／またはT細胞など、ニューロンを取り囲む他の細胞へと送達されてもよい。ヒトA L S患者および動物SOD1 A L Sモデルにおける研究は、グリア細胞が、A L Sニューロンの機能不全および死に早期の役割を果たすことを示唆した。突然変異体のSOD1が、運動ニューロン内に存在してもなお、周囲の保護的グリア細胞内の正常なSOD1は、運動ニューロンが、死滅することを防止し得る（例えば、その内容が、参照によりその全体において本明細書に援用される、フィリップスおよびロートシュタイン（Philips and Rothstein），Exp. Neurol.，2014，May 22. pii：S0014-4886（14）00157-5により総説されている）。

【0477】

一部の具体的な実施形態において、ALSの療法として使用される、SOD1遺伝子を標的とする少なくとも1つのsiRNA二重鎖は、AAVベクターなどのウイルスベクターに挿入される。

【0478】

一部の実施形態において、本組成物は、ALSを治療するための単剤療法剤または組合せ療法剤として投与される。

SOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖を含むかまたはコードするウイルスベクターは、1つ以上の他の治療剤と組み合わせて使用され得る。「～と組み合わせて」とは、その薬剤を同時に投与しなければならない、かつ／または併せた送達のために製剤化されなければならないことを含意するように意図するものではないが、これらの送達方法も、本開示の範囲内にある。組成物は、1つ以上の他の所望の治療剤または医療手技と共時的に、この前に、またはこの後で投与することができる。一般に、各薬剤は、この薬剤について決定された用量および／またはタイムスケジュールで投与されることになる。

【0479】

本開示のSOD1ターゲティングポリヌクレオチドと組み合わせて使用され得る治療剤は、抗酸化剤である低分子化合物、抗炎症性薬剤、抗アポトーシス薬剤、カルシウム調節剤、抗グルタミン酸作動性薬剤、構造的タンパク質阻害剤、および金属イオンの調節に関与する化合物であり得る。

【0480】

ALSを治療するために組み合わせて使用される化合物としては、限定はされないが、以下のものを挙げるることができる：フリーラジカスカルベンジャーまたはラジカヴァ（エダラボン）などの酸化ストレスを低減する薬剤、抗グルタミン作動剤：リルゾール、トピラマート、タランパネル、ラモトリジン、デキストロメトルファン、ガバペンチンおよびAMPAアンタゴニスト；抗アポトーシス剤：ミノサイクリン、フェニル酪酸ナトリウムおよびアリモクロモール；抗炎症剤：ガングリオシド、セレコキシブ、シクロスポリン、アザチオプリン、シクロホスファミド、血漿分離交換法、酢酸グラチラメルおよびサリドマイド；セフトリアキソン（ベリーら（Berry et al.）, Plos One, 2013, 8（4））；ペーターラクタム抗生物質；プラミベキソール（ドーパミンアゴニスト）（ワンら（Wang et al.）, Amyotrophic Lateral Scler., 2008, 9（1）, 50-58）；米国特許出願公開第20060074991号明細書におけるニメスリド；米国特許出願公開第20130143873号明細書において開示されているジアゾキシド；米国特許出願公開第20080161378号明細書において開示されているピラゾロン誘導体；プロモクリプチンなど、酸化ストレス誘導性細胞死を阻害するフリーラジカスカルベンジャー（米国特許出願公開第20110105517号明細書）；国際公開第2013100571号パンフレットにおいて論じられているフェニルカルバメート化合物；米国特許第6,933,310号明細書および同第8,399,514号明細書ならびに米国特許出願公開第20110237907号明細書および同第20140038927号明細書において開示されている神経保護化合物；ならびに米国特許出願公開第20070185012号明細書において教示されている糖ペプチド；それらの各々の内容は、参照により全体として本明細書に援用される。

【0481】

本開示のSOD1遺伝子を標的とするsiRNA二重鎖との組合せ療法において使用され得る治療剤は、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）またはその断片など、ニューロンの喪失を保護し得るホルモンまたはバリエーション（例えば、米国特許出願公開第20130259875号明細書）；エストロゲン（例えば、米国特許第6,334,998号明細書および同第6,592,845号明細書）であり得る。これらの各々の内容は、参照により全体として本明細書に援用される。

【0482】

A L Sを治療するために、本開示のS O D 1遺伝子を標的とするs i R N A二重鎖との組合せ療法において、神経栄養因子を使用してもよい。一般に、神経栄養因子は、ニューロンの生存、成長、分化、増殖、および／もしくは成熟を促進するか、またはニューロンの活性の増大を刺激する物質として規定される。一部の実施形態において、本方法は、1つ以上の栄養因子の、治療を必要とする対象への送達を更に含む。栄養因子は、限定はされないが、I G F - I、G D N F、B D N F、C T N F、V E G F、コリベリン、キサリプロデン、サイトロロフィン放出ホルモン、およびA D N F、ならびにこれらのバリエーションを含み得る。

【0483】

一態様において、S O D 1遺伝子を標的とする、少なくとも1つのs i R N A二重鎖を含むA A Vベクターを、A A V - I G F - I（その内容が、参照によりその全体において本明細書に援用される、ビンセントら（V i n c e n t e t a l . ），N e u r o m o l e c u l a r M e d i c i n e，2004，6，79-85）およびA A V - G D N F（その内容が、参照によりその全体において本明細書に援用される、ワンら（W a n g e t a l . ），J N e u r o s c i .，2002，22，6920-6928）などの神経栄養因子を発現させるA A Vベクターと共に共投与してもよい。

【0484】

一部の実施形態において、A L Sを治療するための本開示の組成物を、それを必要とする対象に、静脈内投与、筋内投与、皮下投与、腹腔内投与、髄腔内投与、実質内（C N S、脳および／または脊髄）および／または脳室内投与し、s i R N A分子またはs i R N A分子を含むベクターは、血液脳関門および血液脊髄関門の一方または両方を通過することを可能にする。一部の態様において、本方法は、S O D 1遺伝子を標的とする少なくとも1つのs i R N A二重鎖、またはA L Sが治療的に処置されるように、対象においてS O D 1遺伝子を標的とし、S O D 1遺伝子発現をサイレンシング／抑制し、およびA L Sの1つ以上の症状を軽減する少なくとも1つのs i R N A二重鎖を含むA A Vベクターを含む組成物の治療有効量を、対象の中樞神経系（C N S）に（例えば、注入ポンプおよび／または送達足場を使用して）直接投与（例えば、実質内投与、脳室内投与および／または髄腔内投与）することを含む。

【0485】

一部の実施形態において、A L Sを治療するための本開示の組成物を、それを必要とする対象に、実質内（C N S、脳および／または脊髄）投与し、s i R N A分子またはs i R N A分子を含むベクターが、血液脳関門および血液脊髄関門の一方または両方を通過することを可能とする。

【0486】

ある特定の態様において、運動ニューロンの変性、筋力低下、筋萎縮、筋肉の硬直、呼吸困難、発話の不明瞭、線維束性攣縮の発症、前頭側頭型認知症、および／または若年死を含むA L Sの症状は、治療される対象において改善される。他の態様において、本開示の組成物を、脳および脊髄の一方または両方へと適用する。他の態様において、筋肉の協調運動および筋肉の機能の一方または両方を改善する。他の態様において、対象の生存を延長する。

【0487】

定義

特に明記しない限り、以下の用語および語句は以下に説明する意味を有する。これらの定義は、本質的に限定するよう意図するものでなく、本開示の特定の態様のより明確な理解を提供するために供される。

【0488】

本明細書で使用されるとき、用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含有する）、またはポリリボヌクレオチド（D-リボースを含有する）のいずれか、またはプリンもしくはピリミジン塩基、または修飾プリンもしくはピリミジン塩基のNグリコシドであ

10

20

30

40

50

る任意の他のタイプのポリヌクレオチドで構成される任意の核酸ポリマーを指す。用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」の間で長さに意図される違いはなく、これらの用語は同義的に用いられ得る。これらの用語は分子の一次構造のみを指す。したがって、これらの用語には、二本鎖および一本鎖DNA、ならびに二本鎖および一本鎖RNAが含まれる。

【0489】

本明細書で使用されるとき、用語「RNA」または「RNA分子」または「リボ核酸分子」は、リボヌクレオチドのポリマーを指す；用語「DNA」または「DNA分子」または「デオキシリボ核酸分子」は、デオキシリボヌクレオチドのポリマーを指す。DNAおよびRNAは、例えばそれぞれDNA複製およびDNAの転写により、天然で合成されることもでき；または化学的に合成されることもできる。DNAおよびRNAは、一本鎖（すなわち、それぞれssRNAまたはssDNA）または多重鎖（例えば、二本鎖、すなわち、それぞれdsRNAおよびdsDNA）であり得る。用語「mRNA」または「メッセンジャーRNA」は、本明細書で使用されるとき、1つ以上のポリペプチド鎖のアミノ酸配列をコードする一本鎖RNAを指す。

【0490】

本明細書で使用されるとき、用語「RNA干渉」または「RNAi」は、対応するタンパク質コード遺伝子の発現の阻害または干渉または「サイレンシング」をもたらすRNA分子によって媒介される配列特異的調節機構を指す。RNAiは、植物、動物および真菌を含めた多くの種類の生物で観察されている。RNAiは細胞において天然で外来性RNA（例えばウイルスRNA）を除去するために起こる。天然RNAiは、遊離dsRNAから切断された、分解機構を他の類似のRNA配列に仕向ける断片によって進行する。RNAiはRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）によって制御され、細胞質において短鎖／低分子dsRNA分子によって開始され、そこでdsRNA分子は触媒RISC成分アルゴノートと相互作用する。dsRNA分子は細胞に外因的に導入されることができ。外因性dsRNAはリボヌクレアーゼタンパク質ダイサーを活性化させることによってRNAiを開始し、ダイサーはdsRNAに結合してそれを切断することにより、数個の対を成さないオーバハング塩基を各末端に有する21～25塩基対の二本鎖断片を生じさせる。これらの短鎖二本鎖断片は低分子干渉RNA（siRNA）と呼ばれる。

【0491】

本明細書で使用されるとき、用語「短鎖／低分子干渉性RNA」または「siRNA」は、RNAiを誘導または媒介する能力を有する約5～60ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を含むRNA分子（またはRNA類似体）を指す。好ましくは、siRNA分子は、約15～30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、より好ましくは約16～25ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、更により好ましくは約18～23ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、および更により好ましくは約19～22ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）（例えば、19、20、21または22ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体）を含む。用語「短鎖」siRNAは、5～23ヌクレオチド、好ましくは21ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、例えば、19、20、21または22ヌクレオチドを含むsiRNAを指す。用語「長鎖」siRNAは、24～60ヌクレオチド、好ましくは約24～25ヌクレオチド、例えば、23、24、25または26ヌクレオチドを含むsiRNAを指す。短鎖siRNAは、一部の例では、19ヌクレオチド未満、例えば、16、17または18ヌクレオチド、または僅か5ヌクレオチドを含んでもよく、但し、これらの短いsiRNAはRNAiを媒介する能力を保持しているものとする。同様に、長鎖siRNAは、一部の例では、26ヌクレオチド超、例えば、27、28、29、30、35、40、45、50、55、または更には60ヌクレオチドを含んでもよく、但し、これらの長いsiRNAは、短鎖siRNAへの更なるプロセッシング、例えば酵素的プロセッシングがない限りRNAiまたは翻訳抑制を媒介する能力を保持しているものとする。siRNAは、一本鎖RNA分子（ss-siRNA）またはハイブリダイズしてsiRNA二重鎖と呼ばれる二重鎖構造を形成するセンス

鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖RNA分子（dsRNA）であってもよい。本開示によれば、組換えAAVベクターは、siRNA、shRNA、マイクロRNAまたはそれらの前駆体など、1つ以上のRNAi分子をコードし得る。

【0492】

本明細書で使用されるとき、siRNA分子の「アンチセンス鎖」または「第1鎖」または「ガイド鎖」という用語は、サイレンシングの標的となる遺伝子のmRNAの約10～50ヌクレオチド、例えば、約15～30、16～25、18～23または19～22ヌクレオチドの一部分と実質的に相補的な鎖を指す。アンチセンス鎖または第1鎖は、標的特異的サイレンシングを誘導するのに所望の標的mRNA配列と十分に相補的な、例えば、RNAi機構または過程によって所望の標的mRNAの破壊を引き起こすのに十分に相補的な配列を有する。

10

【0493】

本明細書で使用されるとき、siRNA分子の「センス鎖」または「第2鎖」または「パッセンジャー鎖」という用語は、アンチセンス鎖または第1鎖と相補的な鎖を指す。siRNA分子のアンチセンス鎖とセンス鎖とはハイブリダイズして二重鎖構造を形成する。本明細書で使用されるとき、「siRNA二重鎖」は、サイレンシングの標的となる遺伝子のmRNAの約10～50ヌクレオチドの一部分と十分な相補性を有するsiRNA鎖と、siRNA鎖と二重鎖を形成するのに十分な相補性を有するsiRNA鎖とを含む。本開示によれば、組換えAAVベクターは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖をコードし得る。

20

【0494】

本明細書で使用されるとき、用語「相補」は、ポリヌクレオチドが互いに塩基対を形成する能力を指す。塩基対は、典型的には逆平行ポリヌクレオチド鎖におけるヌクレオチド単位間の水素結合によって形成される。相補ポリヌクレオチド鎖は、ワトソン・クリック方式（例えば、AとT、AとU、CとG）、または二重鎖の形成を可能にする任意の他の方式で塩基対を形成することができる。当業者は認識しているとおり、DNAと対照的にRNAを使用するとき、チミンでなくウラシルがアデノシンと相補的と見なされる塩基である。しかしながら、本開示の文脈でUと表記されるとき、特に指定されない限り、Tに置き換え可能であることが含意される。完全な相補性または100%の相補性とは、一方のポリヌクレオチド鎖の各ヌクレオチド単位が第2のポリヌクレオチド鎖のヌクレオチド単位と水素結合を形成することができる状況を指す。完全でない相補性とは、2本の鎖の全てではないものの一部のヌクレオチド単位が互いに水素結合を形成することができる状況を指す。例えば、2本の20merについて、各鎖の2個の塩基対のみが互いに水素結合を形成することができる場合、このポリヌクレオチド鎖は10%の相補性を呈する。同じ例で、各鎖の18個の塩基対が互いに水素結合を形成することができる場合、このポリヌクレオチド鎖は90%の相補性を呈する。

30

【0495】

本明細書で使用されるとき、「ターゲティング」は、標的核酸にハイブリダイズして所望の効果を誘導するであろう核酸配列の設計および選択過程を意味する。

用語「遺伝子発現」は、核酸配列が首尾よく転写およびほとんどの場合に翻訳を受けてタンパク質またはペプチドを産生する過程を指す。明確にするため、「遺伝子発現」の測定に言及するとき、それは、測定が核酸転写産物、例えばRNAもしくはmRNAの測定またはアミノ酸翻訳産物、例えばポリペプチドもしくはペプチドの測定であり得ることを意味するものと理解されなければならない。RNA、mRNA、ポリペプチドおよびペプチドの量またはレベルの測定方法は当該技術分野において周知である。

40

【0496】

本明細書で使用されるとき、用語「突然変異」は、後続の世代に伝達され得る変異型（「突然変異型」とも称される）をもたらす遺伝子の構造の任意の変化を指す。遺伝子の突然変異は、DNAにおける一塩基の変化、または遺伝子もしくは染色体のより大きい一部分の欠失、挿入、もしくは再配列によって引き起こされ得る。

50

【0497】

本明細書で使用されるとき、用語「ベクター」は、本開示のSOD1ターゲティングポリヌクレオチドなどの異種分子を輸送し、形質導入し、またはその他担体として働く任意の分子または部分を意味する。「ウイルスベクター」は、目的の分子、例えば、トランス遺伝子をコードするか、もしくは含む、1つ以上のポリヌクレオチド領域、ポリペプチドもしくはマルチポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または低分子干渉RNA (siRNA) などの調節性核酸を含むベクターである。ウイルスベクターは一般に、遺伝物質を細胞に送達するのに使用される。ウイルスベクターは、具体的適用のために修飾されることが多い。ウイルスベクターの種類は、レトロウイルスのベクター、レンチウイルスのベクター、アデノウイルスのベクター、およびアデノ随伴ウイルスのベクターを含む。

10

【0498】

用語「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」もしくは「AAVベクター」は、本明細書で使用されるとき、アデノ随伴ベクターの成分を含む、またはそれに由来する任意のベクターを指し、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞を感染させるのに好適である。用語AAVベクターは、典型的には、siRNA二重鎖をコードする核酸分子を含むAAV型ウイルス粒子またはビリオンを意味する。AAVベクターは、血清型の組合せ（すなわち「シールドタイプ」AAV）を含めた様々な血清型または様々なゲノム（例えば一本鎖または自己相補的）に由来し得る。加えて、AAVベクターは複製欠損型および／またはターゲット型であってもよい。

【0499】

本明細書で使用されるとき、語句「遺伝子の発現を阻害する」は、遺伝子の発現産物量の減少を生じさせることを意味する。発現産物は、遺伝子から転写されたRNA分子（例えば、mRNA）または遺伝子から転写されたmRNAから翻訳されたポリペプチドであり得る。典型的には、mRNAのレベルが減少することにより、そこから翻訳されるポリペプチドのレベルが減少することになる。発現レベルは標準的なmRNAまたはタンパク質測定技法を用いて決定し得る。

20

【0500】

本明細書で使用されるとき、用語「インビトロ」は、生物（例えば、動物、植物、または微生物）の中でなく、むしろ人工環境、例えば試験管または反応槽、細胞培養物、ペトリ皿等で起こるイベントを指す。

30

【0501】

本明細書で使用されるとき、用語「インビボ」は、生物（例えば、動物、植物、または微生物またはその細胞もしくは組織）の中で起こるイベントを指す。

本明細書で使用されるとき、用語「修飾された」は、本開示の分子の変化した状態または構造を指す。分子は、化学的、構造的、および機能的に修飾することを含め、多くの方法で修飾し得る。

【0502】

本明細書で使用されるとき、用語「合成」は、人間の手で作製、調製、および／または製造されることを意味する。本開示のポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたは他の分子の合成は化学的または酵素的であってもよい。

40

【0503】

本明細書で使用されるとき、用語「トランスフェクション」は、外因性核酸を細胞に導入する方法を指す。トランスフェクション方法としては、限定はされないが、化学的方法、物理的处理およびカチオン性脂質または混合が挙げられる。細胞にトランスフェクトし得る薬剤の一覧は広範であり、限定はされないが、siRNA、センスおよび／またはアンチセンス配列、AAVベクターまたはAAV粒子、1つ以上の遺伝子をコードし、かつ発現プラスミドに編成されるDNA、タンパク質、タンパク質断片などが含まれる。

【0504】

本明細書で使用されるとき、「オフターゲット」は、任意の1つ以上の標的、遺伝子、または細胞転写物に対する任意の意図しない効果を指す。

50

本明細書で使用されるとき、語句「薬学的に許容可能」は、本明細書では、妥当な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激作用、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症のない、妥当なリスク対効果比に相応の、ヒトおよび動物の組織との接触における使用に好適な化合物、材料、組成物、および／または剤形を指して用いられる。

【0505】

本明細書で使用されるとき、薬剤の「有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果、例えば臨床結果を生じさせるのに十分な量であり、そのため「有効量」は、それが適用されるコンテキストに依存する。例えば、ALSを治療する薬剤を投与する文脈では、薬剤の有効量は、例えば、薬剤の投与を伴わずに得られる応答と比較して、本明細書に規定される、ALSの治療を達成するのに十分な量である。

10

【0506】

本明細書で使用されるとき、用語「治療有効量」は、送達される薬剤（例えば、核酸、薬物、治療用薬剤、診断用薬剤、予防用薬剤等）についての、感染、疾患、障害、および／または病態に罹患しているまたはそれに罹り易い対象に投与したとき感染、疾患、障害、および／または病態を治療し、その症状を改善し、それを診断し、予防し、および／またはその発症を遅延させるのに十分な量を意味する。

【0507】

本明細書で使用されるとき、用語「対象」または「患者」は、例えば実験的、診断的、予防的、および／または治療的目的で本開示に係る組成物を投与し得る任意の生物を指す。典型的な対象としては、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、チンパンジーならびに他の類人猿およびサル種などの非ヒト霊長類、およびヒトなど、哺乳類）および／または植物が挙げられる。

20

【0508】

本明細書で使用されるとき、用語「予防する」または「予防」は、数週間、数カ月間、または数年間を含めたある期間にわたり病態または疾患の発生、展開または進行を遅延させるまたは未然に防ぐことを指す。

【0509】

用語「治療」または「治療する」は、本明細書で使用されるとき、疾患の治療または改善に用いられる1つ以上の特定の手順の適用を指す。特定の実施形態において、特定の手順は1つ以上の医薬品の投与である。本開示の文脈では、特定の手順は、SOD1遺伝子を標的とする1つ以上のsiRNA二重鎖またはdsRNAの投与である。

30

【0510】

本明細書で使用されるとき、用語「改善」または「改善する」は、病態または疾患の少なくとも1つの指標の重症度を低下させることを指す。例えば、神経変性障害のコンテキストでは、改善には、ニューロン喪失の低減が含まれる。

【0511】

本明細書で使用されるとき、用語「投与する」は、対象に医薬品または組成物を提供することを指す。

本明細書で使用されるとき、用語「神経変性」は、神経細胞死をもたらす病的状態を指す。多数の神経障害が共通の病的状態として神経変性を共有する。例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、および筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、いずれも慢性神経変性を引き起こし、慢性神経変性は数年の期間にわたる緩慢な進行性の神経細胞死によって特徴付けられる一方、急性神経変性は、脳卒中などの虚血、または外傷性脳傷害などの外傷の結果としての、または例えば脊髄損傷もしくは多発性硬化症によって引き起こされる脱髄または外傷による軸索切断の結果としての、神経細胞死の突発的な発生によって特徴付けられる。一部の神経障害では、例えばALSにおける運動ニューロン変性など、主に1つのタイプのニューロン細胞が変性する。

40

【0512】

（実施例）

実施例1. SOD1ターゲティングポリヌクレオチド設計（siRNA）

50

s i R N A 設計を実施して、ヒト S O D 1 遺伝子を標的とする s i R N A を同定する。設計には、それぞれ、ヒト (G e n B a n k アクセション番号 N M _ 0 0 0 4 5 4 . 4 (配列番号 1 0)) 、カニクイザル (G e n B a n k アクセション番号 N M _ 0 0 1 2 8 5 4 0 6 . 1 (配列番号 1 1)) 、アカゲザル S O D 1 転写物 (G e n B a n k アクセション番号 N M _ 0 0 1 0 3 2 8 0 4 . 1 (配列番号 1 1)) 、およびスース・スクロファ (S u s s c r o f a) (G e n B a n k アクセション番号 N M _ 0 0 1 1 9 0 4 2 2 . 1 (配列番号 1 2)) に由来する S O D 1 転写物を使用する (表 1 0) 。 s i R N A 二重鎖は、アンチセンス鎖の 2 ~ 1 8 位がヒト S O D 1 転写物に対して 1 0 0 % 同一性を有し、アンチセンス鎖の 2 ~ 1 8 位が非ヒト S O D 1 転写物に対して部分的または 1 0 0 % 同一性を有するように設計する。全ての s i R N A 二重鎖において、アンチセンス鎖の 1 位は、U を有するように操作し、センス鎖の 1 9 位は、この位置で二重鎖と対合しないようにするために、C を有するように操作する。

【 0 5 1 3 】

【表 1 1 - 1】

表 10. SOD1 遺伝子配列

SOD1 転写物	アクセッション番号	配列番号	配列
ヒト (ホモ・サピエンス) SOD1 cDNA (981bp)	NM_000454.4	10	GTTTGGGGCCAGAGTGGGCGAGGCGCGGAGGTCTGGCC TATAAAGTAGTCGCGGAGACGGGGTGTGGTTTGCCTCG TAGTCTCCTGCAGCGTCTGGGGTTTCCGTTGCAGTCCTCG GAACCAGGACCTCGGCGTGGCCTAGCGAGTTATGGCGA CGAAGGCCGTGTGCGTGTCTGAAGGGCGACGGCCCACTG CAGGGCATCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAAAGTAATGG ACCAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATTAAAGGACTGACTG AAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATGAGTTTGGAGATA ATACAGCAGGCTGTACCAGTGCAGGTCCTCACTTTAATC CTCTATCCAGAAAACACGGTGGGCCAAAGGATGAAGAG AGGCATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGCTGACAA AGATGGTGTGGCCGATGTGTCTATTGAAGATTCTGTGAT CTCACCTCAGGAGACCATTGCATCATTGGCCGCACACT GGTGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGCAAAGGTG GAAATGAAGAAAGTACAAAGACAGGAAACGCTGGAAGT CGTTTGGCTTGTGGTGTAATTGGGATCGCCCAATAACA TTCCCTTGGATGTAGTCTGAGGGCCCCTTAACCTATCTGTT ATCCTGCTAGCTGTAGAAATGTATCCTGATAAACATTAA AACTGTAACTTTAAAAGTGAATTGTGTGACTTTTTCA GAGTTGCTTTAAAAGTACCTGTAGTGAGAAACTGATTTAT GATCACTTGAAGATTTGTATAGTTTTATAAACTCAGT TAAAATGTCTGTTTCAATGACCTGTATTTTGCCAGACTTA AATCACAGATGGGTATTAACTTGTGAGAATTTCTTTGT CATTCAAGCCTGTGAATAAAAACCCTGTATGGCACTTAT TATGAGGCTATTAAGAAGATCCAAATTCAACTAAAAA AAAAAAAAAAAAAA
カニクイザル (マカカ・ファンキュリス (Macaca fascicularis)) SOD1 cDNA (465bp)	NM_001285406.1	11	ATGGCGATGAAGGCCGTGTGCGTGTGAAGGGCGACAG CCCAGTGCAGGGCACCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAAA GTAATGGACCACTGAAGGTGTGGGGAAGCATTACAGGA TTGACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATCAGTTT GGAGATAATACACAAGGCTGTACCAGTGCAGGTCCTCA CTTTAATCCTCTATCCAGACAACACGGTGGGCCAAAGGA TGAAGAGAGGCATGTTGGAGACCTGGGCAATGTGACTG CTGGCAAAGATGGTGTGGCCAAGGTGTCTTTCGAAGATT

【 0 5 1 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

			CTGTGATCTCGCTCTCAGGAGACCATTCATCATTGGCC GCACATTGGTGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGC AAAGGTGGAAATGAAGAAAGTAAAAAGACAGGAAACG CTGGAGGTCTGCTGGCTTGTGGTGTAAATGGGATCGCCC AATAA
アカゲザル (マカカ・ ムラッタ (Macaca mulatta)) SOD1 cDNA (465bp)	NM_001 032804.1	11	ATGGCGATGAAGGCCGTGTGCGTGTGAAGGGCGACAG CCCAGTGCAGGGCACCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAAA GTAATGGACCAAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATTACAGGA TTGACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATCAGTTT GGAGATAATACACAAGGCTGTACCAGTGCAGGTCTCTCA CTTTAATCCTCTATCCAGACAACACGGTGGGCCAAAGGA TGAAGAGAGGCATGTTGGAGACCTGGGCAATGTGACTG CTGGCAAAGATGGTGTGGCCAAGGTGTCTTTCAAGATT CTGTGATCTCGCTCTCAGGAGACCATTCATCATTGGCC GCACATTGGTGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGC AAAGGTGGAAATGAAGAAAGTAAAAAGACAGGAAACG CTGGAGGTCTGCTGGCTTGTGGTGTAAATGGGATCGCCC AATAA
ブタ(スース・ スクロファ) SOD1 cDNA (658 bp)	NM_001 190422.1	12	CGTCGGCGTGTACTGCGGCCTCTCCGCTGCTTCTGGTA CCCTCCCAGCCCGGACCGGAGCGCGCCCCGCGAGTCAT GGCGACGAAGGCCGTGTGTGTGCTGAAGGGCGACGGCC CGGTGCAGGGCACCATCTACTTCGAGCTGAAGGGAGAG AAGACAGTGTTAGTAACGGGAACCATTAAGGACTGGC TGAAGGTGATCATGGATTCCATGTCCATCAGTTTGGAGA TAATACACAAGGCTGTACCAGTGCAGGTCCCTCACTTCAA TCCTGAATCCAAAAACATGGTGGGCCAAAGGATCAAG AGAGGCACGTTGGAGACCTGGGCAATGTGACTGCTGGC AAAGATGGTGTGGCCACTGTGTACATCGAAGATTCTGTG ATCGCCCTCTCGGGAGACCATTCATCATTGGCCGCACA ATGGTGGTCCATGAAAAACCAGATGACTTGGGCAGAGG TGGAATGAAGAAAGTACAAAGACGGGAAATGCTGGAA GTCGTTTGGCCCTGTGGTGTAAATGGGATCACCCAGTAAA CATTCCTCATGCCATGGTCTGAATGCCAGTAACTCATC TGTTATCTTGCTAGTTGTAGTTGTAGAAATTTAACTTGAT AAACATTAAACACTGTAACCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA

10

20

実施例 2 . 脊髄への AAV の実質内送達

30

髄腔内投与または静脈内投与など、AAV 送達の従来経路は、大型哺乳類の頸部脊髄および胸部脊髄の口バストな形質導入をもたらさない。したがって、AAV 送達の新しいルート（実質内注射）を、頸部脊髄形質導入効率の向上について評価した。ウイルスゲノムの生体内分布および SOD1 mRNA ノックダウンを、頸部レベルを含む、脊髄の複数レベルの前角において評価した。

【0515】

最初の実験では、各々体重が 14 ~ 20 kg である 3 頭のゲッチング成体（6 か月齢）雌ミニブタを研究に利用した。動物は、AAV に対する中和抗体をプレスクリーニングしなかった。C3 と C5 との間で 4 ~ 5 cm の椎弓切除を実施し、注射間に 3 cm の余裕をとった。H1 プロモータと SOD1 を標的とする siRNA を含む調節性ポリヌクレオチド（配列番号 6）とを含む、配列番号 9 の ITR ~ ITR 配列を有する自己相補的（sc）AAV ベクター（scAAV）を、AAVrh10 にパッケージングした（scAAV-miRSOD1）。

40

【0516】

scAAV-miRSOD1（力価 2.03×10^{13} vg/mL）の 2 回注射を、 1.3×10^{12} vg の合計用量／動物で投与した。椎弓切除の吻側端部において、つまり、脊髄のレベル C3 において、単一 25 μ L（ 5.1×10^{11} vg）容積を脊髄の前角内へと注射した。椎弓切除の尾側端部において、つまり、脊髄のレベル C5 において、単一 40 μ L（ 8.1×10^{11} vg）容積を対側の前角内へと注射した。注射は両方とも 5 μ L／分の速度で投与し、およそ 13 分間の合計注入時間がもたらされた。この手順の

50

4週間後に動物を犠牲にし、脊髄組織を分析のために収集した。

【0517】

s c A A V - m i R S O D 1 の実質内投与が、脊髄の形質導入および S O D 1 m R N A のノックダウンに結び付くか否かを決定するため、前角パンチを、S O D 1 m R N A のレベルを定量化するための分岐 DNA (b DNA) 法によって分析し、ベータアクチン (A C T B) m R N A レベル、T A T A ボックス結合タンパク質 (T B P) m R N A レベルおよびペプチジルプロリルイソメラーゼ A (P P I A) m R N A レベルの幾何平均に対して正規化した。次に、これらの正規化 S O D 1 m R N A レベルを、同じ動物に由来する脊髄の腰部領域 (L 1 ~ L 3) に由来する前角パンチの正規化 S O D 1 m R N A レベルと比べて表した。

【0518】

L 1 ~ L 3 に由来する前角パンチの S O D 1 m R N A レベルと比べて、有意な S O D 1 m R N A ノックダウンが、C 1 から T 7 ~ T 1 0 までの前角パンチで明らかだった。脊髄の両側に由来する前角パンチの S O D 1 m R N A レベルは同様だった。一元配置 A N O V A およびダネット検定は、脊髄の各レベルにて有意な S O D 1 m R N A ノックダウンを示した (C 1 ~ T 5 $p < 0.0001$; T 7 ~ T 1 0 $p < 0.05$)。表 1 1 に示されるように、注射に最も近い脊髄分節は、最も大きな S O D 1 m R N A ノックダウンを呈した。脊髄分節 C 1 ~ C 8 は、S O D 1 m R N A のロバストで有意なノックダウンを示した (およそ 5 0 ~ 7 5 % ノックダウン)。ベクター注射の部位から離れた脊髄分節 T 5 でさえ、S O D 1 m R N A の有意なノックダウンが観察された ($32.6 \pm 5.1\%$ ノックダウン)。

【0519】

【表 1 2】

表 11. L1~L3と比べたSOD1 mRNAレベル

脊髄分節	幾何平均 (ACTB、TBPおよびPPIA) に対して正規化されたSOD1 mRNAレベル (L1〜L3に対する、%)						
	ブタ #301		ブタ #302		ブタ #303		平均±標準誤差
	前角1	前角2	前角1	前角2	前角1	前角2	
C1	47.2	49.9	43.2	48.7	48.3	44.8	47.0±1.0
C2	39.9	41.3	42.3	41.0	49.6	46.5	43.4±1.5
C3—吻側	25.1	28.2	18.1	15.0	22.6	32.5	23.6±2.6
C3—尾側	14.0	17.0	33.1	35.7	29.7	21.3	25.1±3.7
C5—吻側	21.4	19.0	14.6	21.0	36.1	35.3	24.6±3.7
C5—尾側	25.4	26.6	38.2	33.8	31.7	32.8	31.4±2.0
C7	31.9	15.6	53.6	48.9	44.1	39.2	38.9±5.6
C8	50.1	45.1	50.5	48.7	36.7	42.8	45.7±2.2
T1-T2	54.0	77.7	55.6	56.0	55.3	55.2	59.0±3.8
T5	65.3	53.1	63.0	58.0	84.9	80.2	67.4±5.1
T7-T10	84.6	81.5	83.0	68.0	94.3	93.1	84.1±3.9
L1-L3	98.2	93.8	102.0	96.8	105.2	103.9	100.0±1.8

また、A A V 粒子で処置したブタに由来する前角パンチの正規化 S O D 1 m R N A レベルを、単一未感作ブタの脊髄に由来する前角パンチの正規化 S O D 1 m R N A レベルと比べて表した。S O D 1 m R N A レベルを、ベータアクチン (A C T B) m R N A レベル、T A T A ボックス結合タンパク質 (T B P) m R N A レベルおよびペプチジルプロリルイソメラーゼ A (P P I A) m R N A レベルの幾何平均に対して正規化した。次に、処置ブタの各頸部分節に由来する S O D 1 m R N A レベルを、未感作ブタに由来する C 2 S O D 1 m R N A レベルを使用して正規化された S O D 1 m R N A レベルと比べて表した。胸部 S O D 1 m R N A レベル (処置ブタ) を、T 2 S O D 1 m R N A レベル (未感作ブタ) を使用して正規化し、腰部 S O D 1 m R N A レベル (処置ブタ) を、未感作ブタに由来する L 2 S O D 1 m R N A レベルを使用して正規化した。未感作ブタ脊髄に

由来する前角パンチを、C2、T2およびL2レベルから収集した。表12に示されるように、scAAV-miR SOD1を投与したブタの前角パンチのSOD1 mRNAレベルは、試験したすべての脊髄レベルにおいて、未感作ブタと比べて有意なノックダウンを示した（一元配置ANOVAおよびダネット検定； $p < 0.0001$ ）。同様のSOD1 mRNAレベルが、脊髄の両側に由来する前角パンチで観察された。SOD1 mRNAノックダウンは、C3およびC5注射部位付近で最も強力だった（79～84%ノックダウン）。AAV注射の部位から離れた脊髄レベルでさえ、前角パンチは、有意なSOD1 mRNAノックダウンを呈した。T5、T7～T10、およびL1脊髄レベルにおいて、前角パンチは、それぞれSOD1 mRNAの有意な $55.1 \pm 3.4\%$ 、 $44.0 \pm 2.6\%$ および $33.4 \pm 1.2\%$ ノックダウンを示した。

【0520】

【表13】

表12. 未感作対照と比べたSOD1 mRNAレベル

脊髄分節	幾何平均(ACTB、TBPおよびPP1A)に対して正規化されたSOD1 mRNAレベル (未感作対照に対する、%)						
	ブタ #301		ブタ #302		ブタ #303		平均±標準誤差
	前角 パンチ1	前角 パンチ2	前角 パンチ1	前角 パンチ2	前角 パンチ1	前角 パンチ2	
C1	31.5	33.2	28.8	32.4	32.1	29.8	31.3±0.7
C2	26.6	27.5	28.2	27.3	33.0	30.9	28.9±1.0
C3—吻側	16.7	18.8	12.1	10.0	15.0	21.6	15.7±1.8
C3—尾側	9.3	11.3	22.0	23.8	19.8	14.2	16.7±2.4
C5—吻側	14.3	12.6	9.7	14.0	24.0	23.5	16.4±2.4
C5—尾側	16.9	17.7	25.5	22.5	21.1	21.8	20.9±1.3
C7	21.2	10.4	35.7	32.6	29.3	26.1	25.9±3.7
C8	33.3	30.0	33.6	32.4	24.5	28.5	30.4±1.4
T1-2	36.0	51.7	37.0	37.3	36.8	36.8	39.3±2.5
T5	43.5	35.3	41.9	38.6	56.5	53.4	44.9±3.4
T7-10	56.4	54.2	55.3	45.2	62.8	62.0	56.0±2.6
L1	65.4	62.5	67.9	64.5	70.1	69.2	66.6±1.2

表13に示されるように、デジタル液滴PCRによるベクターゲノム生体内分布の分析は、注射部位に最も近い頸部脊髄の前角パンチにおける1二倍体細胞当たりのベクターゲノムコピー数が高いことを示した。ベクターゲノムコピー数は、C3からC2脊髄レベルへとおよびC7からC8脊髄レベルへと急激に低下した（>10倍）。AAV注射のC3～C5部位から離れた脊髄レベルでさえ、前角パンチは、有意なベクターゲノムコピーを呈した。T5、T7～T10、およびL1～L3脊髄レベルにおいて、前角パンチは、それぞれ有意な 1.7 ± 1.2 、 0.2 ± 0.0 、および 0.5 ± 0.2 の1二倍体細胞当たりのベクターゲノムコピーを示した。

【0521】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表13. ベクターゲノム定量化

脊髄分節	ベクターゲノム/二倍体細胞(vg/dc)						平均±標準誤差
	ブタ#301		ブタ#302		ブタ#303		
	前角 パンチ1	前角 パンチ2	前角 パンチ1	前角 パンチ2	前角 パンチ1	前角 パンチ2	
C1	4.4	4.8	10.7	7.2	4.7	3.1	5.8±1.1
C2	14.1	6.6	25.4	32.1	19.8	13.2	18.5±3.8
C3—吻側	763.1	1305.8	618.1	62.2	798.4	286.2	638.9±177.3
C3—尾側	147.3	837.6	1445.7	79.5	185.4	817.1	585.4±221.0
C5—吻側	677.7	448.0	1703.8	41.1	70.5	138.2	513.2±278.7
C5—尾側	644.3	60.7	564.6	70.2	78.0	174.7	265.4±109.0
C7	29.4	1225.7	5.5	6.1	24.4	9.3	216.7±201.8
C8	12.0	22.4	4.2	1.7	7.7	11.6	9.9±3.0
T1-T2	6.7	0.4	1.3	1.6	3.3	1.9	2.5±0.9
T5	0.6	7.7	0.6	0.5	0.4	0.2	1.7±1.2
T7-T10	0.3	0.3	0.3	0.4	0.1	0.2	0.2±0.0
L1-L3	0.5	0.4	0.3	0.1	1.4	0.2	0.5±0.2

ベクターゲノム分布は、両分析において、つまり、SOD1ノックダウンをL1～L3と比較した場合($r^2=0.26$ 、 $p<0.0001$)および未感作対照と比較した場合($r^2=0.26$ 、 $p<0.0001$)において、SOD1 mRNAノックダウンのレベルと線形相関性を示した。平均で1二倍体細胞当たり0.2または0.5ベクターゲノムコピーなど、1二倍体細胞当たりの低ベクターゲノムコピー数($<1\text{vg/dc}$)は、依然として実質的なSOD1 mRNAノックダウンをもたらした。

【0522】

第2の実験では、各々体重が15～30kgの6頭のゲッチング成体(>9か月齢)雌および雄ミニブタを利用した。動物は、AAVに対する中和抗体をプレスクリーニングしなかった。C3～C5レベルにて多レベル椎弓切除を実施して脊髄に接近し、注射間に3cmの余裕をもたせた。

【0523】

第1の群の3頭のブタには、scAAV-miRSOD1(力価 $2.03\times 10^{13}\text{vg/mL}$)の2回注射を、 $1.6\times 10^{12}\text{vg}$ の合計用量/動物で投与した。椎弓切除の吻側端部において、単一40μL($8.1\times 10^{11}\text{vg}$)容積を、右側の吻側C3の前角内へと注射した。椎弓切除の尾側端部において、単一40μL($8.1\times 10^{11}\text{vg}$)容積を、左側の尾側C5の前角内へと注射した。注射は両方とも5μL/分の速度で投与し、およそ16分間の合計注入時間をもたらされた。第2の群の3頭のブタには、同じ投薬パラダイムで媒体を注射した。この手順の4週間後に動物を犠牲にし、脊髄組織を分析のために収集した。

【0524】

前角パンチを、SOD1 mRNAをノックダウンするための分岐DNA(bDNA)法によって分析し、ベータアクチン(ACTB) mRNAレベル、TATAボックス結合タンパク質(TBP) mRNAレベルおよびペプチジルプロリルイソメラーゼA(PPIA) mRNAレベルの幾何平均に対して正規化し、媒体処置動物の同じ脊髄レベルに由来する前角パンチの正規化SOD1 mRNAレベルと比べて表した。有意なSOD1 mRNAノックダウンは、C1～T12に由来する左前角から採取したパンチ、およびC1～L1に由来する右前角から採取したパンチで明らかであり、脊髄の両側に由来する前角パンチのSOD1 mRNAレベルは同様だった。二元配置ANOVAおよびシダック多重

比較検定では、媒体対照群と比べて、脊髄の各レベルにおいて有意な SOD1 mRNA ノックダウンが示された（左側：C1～T7 $p < 0.0001$ ；T10 $p < 0.001$ 、T12 $p < 0.01$ ；右側：C1～T10 $p < 0.0001$ ；T12 $p < 0.001$ 、L1 $p < 0.01$ ）。表14に示されるように、注射に最も近い脊髄分節が、最も大きな SOD1 mRNA ノックダウンを呈し、SOD1 mRNA ノックダウンは C5 で最大だった。脊髄分節 C1～T5 は、SOD1 mRNA のロバストで有意なノックダウンを示した（50～82% ノックダウン）。ベクター注射の部位から離れた左側の脊髄分節 T12 および右側の脊髄分節 L1 でさえ、SOD1 mRNA の有意なノックダウンが観察された（それぞれ、 $35.22 \pm 2.76\%$ ノックダウン； $29.14 \pm 10.36\%$ ノックダウン）。

【0525】

【表15】

表14. 媒体群と比べた SOD1 mRNA レベル

脊髄分節	ハウスキーピング遺伝子 ACTB、TBP および PPIA の幾何平均に対して正規化された SOD1 mRNA レベル (媒体対照に対する、%)							
	左前角							
	媒体				AAV			
	ブタ #1001	ブタ #1002	ブタ #1003	平均±標準誤差	ブタ #1005	ブタ #1004	ブタ #1006	平均±標準誤差
C1	101.66	91.48	106.86	100±4.52	38.45	32.18	37.13	35.92±1.91
C2	79.26	103.29	117.45	100±11.15	27.49	30.11	35.06	30.88±2.22
C3	110.32	107.20	82.48	100±8.81	35.71	41.30	34.96	37.32±2.00
C5-吻側	98.87	122.26	78.86	100±12.54	11.33	14.71	28.73	18.26±5.33
C5-尾側	99.80	91.21	108.99	100±5.13	21.56	20.63	15.97	19.39±1.73
C7	99.00	96.50	104.49	100±2.36	22.55	23.66	26.87	24.36±1.30
C8	106.34	92.34	101.31	100±4.09	23.27	32.11	29.59	28.32±2.63
T1	89.95	92.54	117.51	100±8.78	30.34	41.09	35.28	35.57±3.11
T4	84.33	100.11	115.56	100±9.02	40.53	45.11	41.78	42.47±1.37
T5	100.90	97.81	101.30	100±1.10	44.22	43.50	41.29	43.00±0.88
T7	91.75	102.39	105.85	100±4.24	63.00	49.46	49.49	53.98±4.51
T10	88.91	111.54	99.55	100±6.54	62.41	50.33	61.55	58.10±3.89
T12	87.58	107.32	105.09	100±6.24	60.37	64.13	69.85	64.78±2.76
L1	102.65	104.40	92.95	100±3.56	65.43	58.89	107.53	77.29±15.24
脊髄分節	右前角							
	媒体				AAV			
	ブタ #1001	ブタ #1002	ブタ #1003	平均±標準誤差	ブタ #1005	ブタ #1004	ブタ #1006	平均±標準誤差
C1	93.18	91.40	115.42	100±7.73	56.06	33.77	41.78	43.87±6.52
C2	100.83	91.11	108.07	100±4.91	31.20	31.88	39.79	34.29±2.76
C3	115.93	96.42	87.65	100±8.36	27.03	18.23	33.33	26.20±4.38
C5-吻側	81.86	99.31	118.83	100±10.68	23.50	13.53	30.29	22.44±4.87
C5-尾側	106.72	92.42	100.86	100±4.15	32.02	18.18	19.09	23.10±4.47
C7	108.37	88.48	103.15	100±5.95	31.51	27.44	24.66	27.87±1.99
C8	107.49	86.23	106.29	100±6.90	23.05	26.39	33.22	27.55±2.99
T1	87.95	96.86	115.19	100±8.02	46.68	38.91	37.15	40.91±2.93
T4	93.02	99.40	107.57	100±4.21	41.22	41.82	47.36	43.47±1.96
T5	90.86	99.08	110.06	100±5.56	55.96	45.69	42.32	47.99±4.10
T7	89.52	99.61	110.87	100±6.17	52.97	51.09	53.84	52.63±0.81
T10	98.17	92.35	109.47	100±5.03	55.06	54.18	61.05	56.76±2.16
T12	86.00	102.54	111.46	100±7.46	57.66	55.25	70.35	61.09±4.69
L1	96.12	94.31	109.57	100±4.81	67.49	54.85	90.26	70.86±10.36

表15に示されるように、デジタル液滴PCRによるベクターゲノム生体内分布の分析は、注射部位に最も近い頸部脊髄の前角パンチにおける、1二倍体細胞あたりのベクターゲノムコピー数が高いことを示した。ベクターゲノムコピー数は、C3からC2脊髄レベ

ルへとおよび C 5 から C 7 脊髄レベルへと急激に低下した (> 10 倍)。しかしながら、AAV 注射の C 3 ~ C 5 部位から離れた脊髄レベルでさえ、前角パンチは、バックグラウンドレベルを大きく超えるベクターゲノムコピーを呈した。T 5、T 7、T 10、T 12、および L 1 脊髄レベルにおいて、前角パンチは、それぞれ 0.73 ± 0.18 、 0.35 ± 0.03 、 0.27 ± 0.04 、 0.25 ± 0.03 、および 0.38 ± 0.19 の 1 二倍体細胞当たりのベクターゲノムコピーを示した。

【0526】

【表 16】

表 15. ベクターゲノム定量化

脊髄分節	ベクターゲノム/二倍体細胞 (vg/dc)							
	左前角				右前角			
	ブタ #1005	ブタ #1004	ブタ #1006	平均± 標準誤差	ブタ #1005	ブタ #1004	ブタ #1006	平均± 標準誤差
C1	1.74	3.02	1.16	1.97 ± 0.55	2.59	2.12	1.29	2.00 ± 0.38
C2	9.57	9.73	4.52	7.94 ± 1.71	10.69	14.29	4.42	9.80 ± 2.88
C3	29.66	35.55	27.98	31.06 ± 2.29	585.67	633.71	28.65	416.01 ± 194.17
C5-吻側	92.67	187.13	439.19	239.66 ± 103.42	45.37	201.47	554.95	267.27 ± 150.74
C5-尾側	3029.44	760.00	332.53	1373.99 ± 836.88	132.37	960.73	290.71	461.27 ± 253.88
C7	18.39	28.38	56.81	34.53 ± 11.51	9.52	27.43	41.11	26.02 ± 9.14
C8	5.15	6.82	11.99	7.98 ± 2.06	3.57	10.37	15.65	9.86 ± 3.50
T1	2.03	4.03	7.06	4.37 ± 1.46	2.66	4.40	5.83	4.30 ± 0.92
T4	0.51	0.52	0.84	0.63 ± 0.11	0.63	1.15	0.95	0.91 ± 0.15
T5	0.43	1.54	0.58	0.85 ± 0.35	0.35	0.92	0.55	0.60 ± 0.17
T7	0.23	0.42	0.31	0.32 ± 0.06	0.40	0.41	0.32	0.38 ± 0.03
T10	0.13	0.27	0.36	0.25 ± 0.07	0.26	0.36	0.24	0.29 ± 0.04
T12	0.21	0.17	0.28	0.22 ± 0.03	0.27	0.22	0.38	0.29 ± 0.05
L1	1.32	0.16	0.12	0.53 ± 0.39	0.25	0.30	0.13	0.22 ± 0.05

ベクターゲノム分布は、媒体対照と比較して、SOD1 mRNA ノックダウンのレベルと線形相関性を示した ($r^2 = 0.15$ 、 $p = 0.0002$)。50% SOD1 ノックダウンが、注射部位の尾側約 30 cm の前角パンチにおいて、平均して 0.2 または 0.5 の 1 二倍体細胞当たりのベクターゲノムコピーなど、低い 1 二倍体細胞当たりのベクターゲノムコピー ($< 1 \text{ vg/dc}$) で達成された。

【0527】

実施例 3：組織および細胞における SOD1 低減

SOD1 mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーション研究を、実質内送達研究 (実施例 2) で使用した動物の脊髄の前角に由来する組織切片を使用して実施した。

【0528】

scAAV-miR SOD1 粒子を注射したブタ 302 の C 6 および T 5 脊髄分節の前角は、SOD1 mRNA 特異的染色をほとんどまたはまったく示さず、SOD1 がノックダウンされたことを示した。大きな運動ニューロンでは、内因性 SOD1 mRNA 発現の実質的な低減が吻側尾側勾配で観察され、低減は頸部領域で最も強力だった。scAAV 粒子を注射したブタ 302 の L 1 ~ L 3 脊髄分節では、SOD1 mRNA 特異的染色が観察された。これは、L 1 ~ L 3 の bDNA 法データと一致し、L 1 ~ L 3 脊髄分節における SOD1 のノックダウンが限定的だったことを示す。予想の通り、未感作未注射ブタの脊髄分節 L 2 の前角は、SOD1 mRNA の強い染色を示した。

【0529】

SOD1 mRNA レベルを、レーザー捕捉によって脊髄分節 T 13 から単離された運動ニューロンプールにおいて、実施例 2 に記載される研究に由来する枯渴灰白質または脊髄分節全体の断面において測定した。また、運動ニューロン細胞質マーカであるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) のレベルを測定して、単離運動ニューロン試料中

の運動ニューロンの濃縮を確認した。結果は表16aに示されている。表中、VHは前角を示し、MNは運動ニューロンを示し、DGMは枯渇灰白質を示し、左／右は、試料が得られた脊髄の側を示す。表16aのSOD1倍数変化値は、媒体群と比べたものであり、ChAT濃縮は、脊髄全体の媒体T13断面と比べて測定した。値は、平均±標準誤差として表されている。

【0530】

【表17】

表16a. 運動ニューロンにおける相対的SOD1 mRNAレベルおよびChAT濃縮

試料および脊髄の側	SOD1 mRNA		ChAT(倍)
	媒体	AAV	
VH MN左	1.00±0.05	0.71±0.09	36.03±3.14
VH MN右	1.00±0.10	0.72±0.05	31.14±2.73
DGM左	1.00±0.04	0.92±0.02	17.39±3.59
DGM右	1.00±0.06	0.83±0.05	18.24±4.54
T13脊髄断面	1.02±0.25	0.95±0.09	1.16±0.57

左前角および右前角の両方から得られた単離運動ニューロンは、SOD1 mRNAレベルの有意な低減を示した ($p < 0.05$ 、二元配置ANOVA、一致媒体対照と比較したシダック検定)。これらの結果は、同じブタに由来するT12およびL1分節におけるSOD1 mRNAレベル (bDNAアッセイ) と類似している。ChAT濃縮は、単離運動ニューロンでは観察されたが、T13脊髄断面試料では観察されなかった。

【0531】

SOD1 mRNAレベルを、レーザー捕捉によって脊髄分節C4から単離した運動ニューロンにおいて、および実施例2に記載される研究に由来する枯渇灰白質において測定した。結果は表16bに示されている。表中、VHは前角を示し、MNは運動ニューロンを示し、DGMは枯渇灰白質を示し、左／右は、試料が得られた脊髄の側を示す。表16bのSOD1倍数変化値は、媒体群と比べたものであり、媒体C4断面と比べて測定された。値は、平均±標準誤差として表されている。

【0532】

【表18】

表16b. 運動ニューロンにおける相対的SOD1 mRNAレベル

試料および脊髄の側	SOD1 mRNA	
	媒体	AAV
VH MN左	1.00±0.07	0.03±0.00
VH MN右	1.00±0.04	0.03±0.00
DGM左	1.04±0.19	0.32±0.05
DGM右	1.01±0.08	0.28±0.02

C4における単離運動ニューロンおよび運動ニューロン枯渇灰白質 (DGM) は両方とも、SOD1 mRNAレベルの有意な低減を示す ($p < 0.05$ 、二元配置ANOVA、一致媒体対照と比較したシダック検定)。これらのデータは、C3およびC5におけるSOD1 mRNAレベルと一致する (bDNAアッセイ)。また、これらのデータは、灰白質と比較して、運動ニューロンではSOD1 mRNAの観察された低減がさらに特異的に増加し、頸部脊髄運動ニューロンにおけるSOD1 mRNAのほぼ完全な抑制 (97%ノックダウン) がもたらされることを実証する。

【0533】

舌下神経核および疑核は、ALSによって影響を受け得る脳幹核の領域である。舌下神経核は、舌の筋肉に行き渡っている大きな運動ニューロンの顕著なクラスターを含み、疑核は、発話と嚥下と強く関連する大きな運動ニューロンを含む。SOD1 mRNAの *in situ* ハイブリダイゼーションを、scAAV-miR SOD1を脊髄に実質内注射

したブタの脳幹に由来する組織切片を使用して実施した。SOD1 mRNAレベルは、*in situ*ハイブリダイゼーションで測定したところ、媒体処置群およびSOD1 AAV粒子処置群において類似していることが見出された。AAV粒子の実質内脊髄投与が、脳幹の形質導入およびSOD1 mRNAのノックダウンに結び付いたか否かを決定するため、左右の尾側脳幹試料も分岐DNA (bDNA) 法で分析した。mRNAレベルを、ベータアクチン (ACTB) mRNAレベル、TATAボックス結合タンパク質 (TBP) mRNAレベルおよびペプチジルプロリルイソメラーゼA (PPIA) mRNAレベルの幾何平均に対して正規化した。正規化SOD1 mRNAレベルは、媒体対照で処置した動物に由来する脳幹における正規化SOD1 mRNAレベルと比べて表されている (表17)。ベクターゲノム生体内分布を、scAAV-miRSOD1の両用量について、デジタル液滴PCRによって測定し、ベクターゲノム数/二倍体細胞を測定した (表17)。表17において、BLLQは、「定量化の下限未満」を表し、40 ngのテンプレート入力ではおよそ 0.005 vg/dc である。

【0534】

【表19】

表17. 脳幹におけるSOD1 mRNAおよびベクターゲノム分布

パラメータ	尾側				吻側			
	左側		右側		左側		右側	
	媒体	AAV	媒体	AAV	媒体	AAV	媒体	AAV
SOD1 mRNA	100±3.03	83.16±1.51	100±4.89	78.22±1.65	100±4.62	95.46±1.72	100±4.85	89.41±9.82
ベクターゲノム/ 二倍体細胞	BLLQ	0.46±0.17	BLLQ	0.63±0.22	BLLQ	0.29±0.05	BLLQ	0.25±0.06

統計的に有意なSOD1 mRNAノックダウンが、尾側脳幹の左側および右側において、それぞれ p 値 <0.01 および p 値 <0.001 で観察された (一元配置ANOVAおよびダネット多重比較検定)。IPa投薬後、脊髄分節T5~L1において観察されたものと同様のレベルのベクターゲノムが脳幹領域において検出された。

【0535】

scAAV-miRSOD1または媒体対照を注射したブタの血漿中の血清中和抗体レベルを測定した。中和抗体状態とSOD1 mRNAまたはウイルスゲノムのレベルとの間に、相関性は観察されなかった。これらの結果は、中和抗体が、観察されたSOD1 mRNAレベルに影響を及ぼさないことを示唆する。

【0536】

実施例4: *in vitro*におけるSOD1 siRNAの効果

SOD1を標的とするEmiR788.2 siRNAを、HuH-7細胞における内因性ヒトSOD1発現の阻害についてアッセイした。様々な用量のsiRNAによるHuH-7のトランスフェクションを、製造業者の使用説明書に従って、リポフェクタミン2000 (インビトロゲン/ライフ・テクノロジーズ社 (Invitrogen/Life Technologies)) を用いて実施した。bDNA (分岐DNA) アッセイを使用して、ヒトSOD1 mRNAレベルおよびGAPDH (対照) mRNAレベルの定量化を実施した。ヒトSOD1 mRNA発現レベルのパーセントが図1に示されている。図1に示されるように、siRNAの濃度が増加すると共に、相対的ヒトSOD1 mRNA発現レベルが減少した。IC50は、図1の点線によって示されるように、50%ヒトSOD1 mRNA発現レベルを達成するために必要なsiRNAの濃度である。

【0537】

miR788.2が、ヒトSOD1に対して選択的であるか否かを試験するため、アンチセンス鎖のバイオインフォマティクス分析を使用して、9つの潜在的ヒトオフターゲット遺伝子を同定した。これらの遺伝子には、スリットガイダンスリガンド2 (SLIT2

、Slit Guidance Ligand 2)、核内受容体コアクチベーター2 (NCOA2)、ホスホリパーゼC Eta1 (PLCH1)、BRD4相互作用クロマチンリモデリング複合体関連タンパク質様 (BICRAL)、プロモドメイン含有1 (BRD1)、Scm様4Mbtドメイン1 (SFMBT1、Scm Like With Four Mbt Domains 1)、ダイニン軸糸重鎖7 (DNAH7、Dynein Axonemal Heavy Chain 7)、ジンクフィンガーマトリン3型 (ZMAT3、Zinc Finger Matrin-Type 3) およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼ1B (MDH1B) が含まれていた。ヒトSOD1およびこれらの潜在的オフターゲットのうちの1つを両方とも発現する細胞株を選択し、miR788.2のガイド鎖を含むSOD1 siRNAをトランスフェクトし、SOD1 mRNA発現、潜在的オフターゲットmRNA発現およびグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA発現のレベルを評価した。任意の所与のオンターゲットまたはオフターゲットに対するmiR788.2のガイド鎖を含むSOD1 siRNAの活性を、対照ウェル全体のオンターゲットmRNAレベルまたはオフターゲットmRNAレベル (GAPDH mRNAに対して正規化した) と比べた、処置細胞におけるオンターゲットmRNAレベルまたはオフターゲットmRNAレベル (GAPDH mRNAに対して正規化した) のパーセントとして表した。miR788.2のガイド鎖を含むSOD1 siRNAによるSOD1ノックダウンのIC₅₀値は、Huh-7細胞では<0.02 nMであり、C42細胞では<0.15 nMだった。これは、強力なオンターゲットノックダウンを示す。対照的に、miR788.2のガイド鎖を含むSOD1 siRNAの0.1 pM~24 nMの濃度範囲では、どの潜在的オフターゲットのIC₅₀値も算出することができなかった。これらの結果は、9つの潜在的オフターゲットの場合、オンターゲット (ヒトSOD1) mRNA抑制のIC₅₀対オフターゲットmRNA抑制のIC₅₀には、少なくとも160倍の分離があることを示す。したがって、miR788.2のガイド鎖は、最も近い予測潜在的オフターゲットよりも少なくとも160倍、SOD1に対して選択的である。

【0538】

実施例5. SOD1を標的とするAAV-miRNAベクターのin vitro活性
miRNA発現ベクターは、2つの異なるフィラー配列のうちの1つを含むITR~ITR配列、すなわち、レンチウイルス由来フィラーを有するITR~ITR (配列番号9) またはアルブミンフィラーを有するITR~ITR (配列番号25) を含むITR~ITR配列内の、SOD1を標的とするVOYSOD1miR104-788.2 (調節性ポリヌクレオチド配列番号6) を操作することによって設計した。ITR~ITR配列をAAVrh10にパッケージングして、それぞれ、scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ) コンストラクトまたはscAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン) コンストラクトを生成した。本明細書で使用されるとき、コンストラクト名の括弧内に示される「レンチ」という用語は、コンストラクトがレンチウイルス由来フィラー配列を含むことを示し、コンストラクト名の括弧内に示される「アルブミン」という用語は、コンストラクトがアルブミン遺伝子由来フィラー配列を含むことを意味する。HEK293T、およびローラーボトルを使用したトリプルトランスフェクション (TT) 法を使用して、AAV粒子を作製した。粒子をHEK293T細胞に感染させた。緑色蛍光タンパク質 (GFP) 導入遺伝子を有するAAVrh10を含むベクターを、陰性対照として使用した。HEK293T細胞を96ウェルプレートに播種し (100 μL細胞培養培地中2.0×10⁴細胞/ウェル)、1.52×10³~1×10⁷の範囲の9つの異なる感染多重度 (MOI) で感染させ、1条件当たり三重重複のウェルを使用した。感染の48時間後、細胞を回収して、直ちに細胞溶解した。細胞溶解物を定量的RT-PCRに使用して、ヒトSOD1 mRNAレベルならびにハウスキーピング遺伝子のmRNAレベルを定量化した。ヒトSOD1 mRNAレベルを、アラニル-tRNA合成酵素 (AARS) mRNAレベルおよびグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNAレベルの幾何平均に対して正規化し、次にGFP対

10

20

30

40

50

照群に対してさらに正規化して、相対的ヒトSOD1 mRNAレベルを得た。試験した両ベクターのMOI、ならびにAARSおよびGAPDHの幾何平均に対して正規化した相対的ヒトSOD1 mRNAレベル（GFP対照と比べた、%）を表18に示す。

【0539】

【表20】

表18. 異なる用量のAAV-miRSOD1ベクターによるヒトSOD1 mRNAレベル

MOI	相対的残存ヒトSOD1 mRNA(平均±標準誤差)	
	scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ)	scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン)
1.00E+07	5.7±0.2	5.8±0.3
3.33E+06	6.0±0.4	6.6±0.5
1.11E+06	7.9±0.3	9.9±0.4
3.70E+05	17.8±0.8	24.9±1.8
1.23E+05	37.7±2.3	46.4±1.3
4.12E+04	61.8±6.4	71.3±3.3
1.37E+04	79.6±3.9	79.6±2.9
4.57E+03	88.9±5.6	92.2±3.0
1.52E+03	91.5±3.7	97.7±3.3
0	95.3±4.4	100.9±4.3

10

20

HEK293T細胞において、ヒトSOD1 mRNAの用量依存的ノックダウンが、ベクターscAAVrh10.H1.mir104-788.2（レンチ）およびscAAVrh10.H1.mir104-788.2（アルブミン）の両方で観察された。また、ヒトSOD1の相対的mRNA値を曲線にフィッティングした。値は表19に示されている。

【0540】

【表21】

表19. AAV-miRSOD1の最良フィット値

最良 フィット値	scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ)	scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン)
底部	4.08	1.99
上部	94.13	99.58
ヒル勾配	1.02	0.86
IC50	7.18E+04	9.62E+04
logIC50	4.86	4.98
p値	0.08	

30

表19に示されるように、同様の効力が両ベクターで観察され、p値は0.08だった。IC50値も同様であり、両ベクターとも10⁴の範囲だった。

【0541】

ウイルスゲノムおよびカプシドタンパク質を、精製AAV調製物から独立に抽出した。変性ゲルを使用してゲノム完全性を評価し、変性ゲルでは約3kbのバンドが検出された。ポリアクリルアミドゲル電気泳動でのカプシドタンパク質の銀染色を使用してカプシド完全性を測定し、銀染色では、75kDa範囲に3つのバンドが示された。

【0542】

実施例6. トランスジェニックマウスモデルにおけるin vivoヒトSOD1ノックダウン

SOD1を標的とし、実施例4に記載される通りのITR~ITR内に異なるフィラー配列を含むsiRNAコンストラクト（VOYSOD1mir104-788.2）を有する自己相補的（sc）AAVベクター（scAAV）をAAVrh10にパッケージン

50

グし、0.001% F-68を有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で製剤化した。ヒトSOD1を発現する14~30週齢の雌または雄Tg (SOD1) 3Cje/Jマウス (ジャクソンラボラトリー社 (Jackson Laboratory)、メイン州バーハーバー (Bar Harbor) 所在) は、scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ)、scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン)、または媒体 (1群当たりnが3~5) の両側線条体内注入 (0.5 μ L/分で5 μ L) を受けた。scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ) の場合、ベクター濃度は、 1.5×10^{13} 、 3.0×10^{12} 、 5.6×10^{11} または 1.9×10^{11} vg/mLであった。これは、 7.5×10^{10} 、 1.5×10^{10} 、 2.8×10^9 または 9.4×10^8 vgの総用量に対応する。scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン) の場合、ベクター濃度は、 1.5×10^{13} 、 3.0×10^{12} 、 5.7×10^{11} または 1.9×10^{11} vg/mLであった。これは、 7.6×10^{10} 、 1.5×10^{10} 、 2.9×10^9 または 9.5×10^8 vgの総用量に対応する。投薬の4週間後、動物を安楽死させ、脳を摘出し、左右の線条体領域を切除し、瞬間冷凍した。各動物の線条体試料全体を、qRT-PCRによってヒトSOD1 mRNA抑制について評価した。製造業者のプロトコール (キアゲン社 (QIAGEN)) に従ってRNeasyミニキットを使用して、線条体組織試料から全RNAを抽出した。高容量cDNA逆転写キット (アプライド・バイオシステムズ社 (Applied Biosystems)) を使用した逆転写によって、相補的DNA合成を実施した。すべてのTaqManアッセイおよびマスターミックスは、テイフ・テクノロジーズ社 (Life Technologies) に注文し、製造業者の推奨に従って使用した。qRT-PCRは、CFX384リアルタイムシステム (バイオラッド社 (BIO-RAD)) を使用して実施し、データを $\Delta\Delta CT$ 法で分析した。ヒトSOD1 mRNAレベルを、マウスGAPDH (mGAPDH) mRNAレベルに対して正規化し、次に媒体対照群に対してさらに正規化した。これらの群平均を算出して、群 (処置) 平均を得た。qRT-PCR mRNAの結果は、下記の表20に示されている。ヒトSOD1 mRNAレベルは、平均パーセント $\pm$ 標準偏差 (SD) として表されている。

【0543】

【表22】

表20. 野生型ヒトSOD1トランスジェニックマウス線条体におけるヒトSOD1 mRNA抑制

群	用量 (vg/5 μ L)	正規化ヒトSOD1 mRNA
媒体	0	100 $\pm$ 29.4
scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ)	9.4×10^8	39.65 $\pm$ 12.63
	2.8×10^9	51.86 $\pm$ 39.68
	1.5×10^{10}	36.36 $\pm$ 18.11
scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン)	9.5×10^8	33.93 $\pm$ 22.20
	2.9×10^9	40.10 $\pm$ 8.90
	1.5×10^{10}	29.78 $\pm$ 11.95
	7.6×10^{10}	21.27 $\pm$ 5.46

ヒトSOD1トランスジェニックマウス線条体において、scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ) は、1線条体当たり 9.4×10^8 vg~ 1.5×10^{10} vgの線条体内注入の約28日後に、約48%~64%のヒトSOD1 mRNAのサイレンシングを引き起こした。scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン) は、1線条体当たり 1.0×10^9 vg~ 8.0×10^{10} vgの線条体内注入の約28日後に、約60%~79%のヒトSOD1 mRNAサイレンシングを引き起こした。scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン) 8.0×10^{10} 用量のウイルスゲノム (vg) / 5 μ Lで、79%の最大ノックダウンが観察された。試験したいずれの最低用量のベクターでも、実質的なノックダウンが観察された。

【0544】

線条体内注入によって投与されたAAVベクターの耐容性を、ヒトSOD1トランスジェニックマウスで調査した。媒体、scAAVrh10.H1.mir104-788.2（レンチ）、またはscAAVrh10.H1.mir104-788.2（アルブミン）の投薬前後で体重を記録した。各群で得られた体重変化を、投薬前に測定した体重のパーセンテージとして表21に示す。

【0545】

【表23】

表21. ヒトSOD1トランスジェニックマウス線条体の体重変化

群	用量 (vg/5 μ L)	体重変化(投薬前の%)
媒体	0	-1.28 $\pm$ 2.93
scAAVrh10.H1.mir104-788.2（レンチ）	9.4×10^8	2.23 $\pm$ 3.34
	2.8×10^9	4.54 $\pm$ 5.35
	1.5×10^{10}	-14.92 $\pm$ 8.86
scAAVrh10.H1.mir104-788.2（アルブミン）	9.5×10^8	3.24 $\pm$ 3.93
	2.9×10^9	1.30 $\pm$ 6.17
	1.5×10^{10}	-2.04 $\pm$ 3.90
	7.6×10^{10}	-22.87 $\pm$ 11.62

一元配置ANOVA、ダネット検定を使用してp値を算出した。最高用量 $1.60E+10$ (vg/5 μ L) のscAAVrh10.H1.mir104-788.2（レンチ）ベクターで、 <0.05 のp値が得られ、最高用量 $8.00E+10$ (vg/5 μ L) のscAAVrh10.H1.mir104-788.2（アルブミン）ベクターで、 <0.001 のp値が得られた。これは、最高用量のベクターで有意な体重喪失が生じたことを示唆する。病的状態は、より高用量の群でも観察された。 $1.60E+10$ (vg/5 μ L) の用量では、scAAVrh10.H1.mir104-788.2（アルブミン）群の2/6マウス、およびscAAVrh10.H1.mir104-788.2（レンチ）群の5/5マウスは、注射後4週目までに死亡していることが見出されたかまたは安楽死させたかのいずれかだった。最高用量（ $8.00E+10$ ）のscAAVrh10.H1.mir104-788.2（アルブミン）群の2/5マウスは、それぞれ2日および3.5週で死亡していることが見出された。死後分析により、死亡は、クレブシエラ・オキシトカ（*Klebsiella oxytoca*）感染またはクレブシエラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）感染によるものであり得ることが明らかになった。

【0546】

実施例7. in vitroにおけるSOD1 siRNAの効果

VOYSOD1mir104-788.2、VOYSOD1mir127-860、VOYSOD1mir114-806およびVOYSOD1mir114-861を、CBAプロモータを有するscAAVDJベクターへと操作した。ブタ上皮細胞株SK-RSTをin vitroで培養し、3つの異なるMOIで、すなわち $4.00E+03$ 、 $2.00E+04$ 、および $1.00E+05$ で、記載のベクターで感染させた。対照cAAVDJ.EGFPベクターも、これらのMOIで評価した。SOD1 mRNAの発現を測定し、ブタGAPDH mRNAに対して正規化した。図2には、相対的SOD1 mRNAレベルが、GFP発現%と比べて示されている。VOYSOD1mir104-788.2は、最も強力な用量依存性ノックダウンを示した。

【0547】

実施例8. 脊髄へのSOD1 siRNAの実質内送達

ウイルスゲノムの生体内分布およびSOD1 mRNAノックダウンを、ブタの頸部レベルを含む、脊髄の複数レベルの前角において評価した。

【0548】

各々体重が14～20 kgである3頭のゲッチング成体（6か月齢）雌ミニブタを、この研究の群の各々に利用した。動物は、AAVに対する中和抗体をプレスクリーニングしなかった。C3とC5との間で4～5 cmの椎弓切除を実施し、注射間に3 cmの余裕をとった。SOD1を標的とするsiRNAを含む調節性ポリヌクレオチド（配列番号6）およびアルブミン由来フィラー配列を含む（配列番号25）のITR～ITR配列を有する自己相補的（sc）AAVベクター（scAAV）を、AAVrh10ベクターにパッケージングして、scAAVrh10.H1.mir104-788.2（アルブミン）を生成した。

【0549】

高用量の場合、scAAV（力価 $1.73 \times 10^{13} \text{ vg/mL}$ ）の2回注射を投与した。椎弓切除の吻側端部（rostral end）において、つまり、脊髄のレベルC3において、単一40 μL （ $6.9 \times 10^{11} \text{ vg/注射}$ ）容積を脊髄の前角内へと注射した。椎弓切除の尾側端部（caudal end）において、つまり、脊髄のレベルC5において、単一40 μL （ $6.9 \times 10^{11} \text{ vg/注射}$ ）容積を対側の脊髄の前角内へと注射した。総用量は $1.38 \times 10^{12} \text{ vg}$ だった。2回の用量のうち低い方の場合、scAAV（力価 $5.8 \times 10^{11} \text{ vg/mL}$ ）の2回注射を投与した（高用量の1/30）。椎弓切除の吻側端部において、つまり、脊髄のレベルC3において、単一40 μL （ $2.3 \times 10^{10} \text{ vg/注射}$ ）容積を脊髄の前角内へと注射した。椎弓切除の尾側端部において、つまり、脊髄のレベルC5において、単一40 μL （ $2.3 \times 10^{10} \text{ vg/注射}$ ）容積を対側の脊髄の前角内へと注射した。総用量は $4.6 \times 10^{10} \text{ vg}$ だった。注射はすべて、5 $\mu\text{L/分}$ の速度で投与し、およそ13分間の合計注入時間がもたらされた。この手順の4週間後に動物を犠牲にし、脊髄組織を分析のために収集した。

【0550】

AAV粒子の実質内投与が、脊髄の形質導入およびSOD1 mRNAのノックダウンに結び付いたか否かを決定するため、前角パンチを、分岐DNA（bDNA）法によって分析した。SOD1 mRNAのmRNAレベルを、ベータアクチン（ACTB）mRNAレベル、TATAボックス結合タンパク質（TBP）mRNAレベルおよびペプチジルプロリルイソメラーゼA（PPIA）mRNAレベルの幾何平均に対して正規化した。正規化SOD1 mRNAレベルは、媒体対照で処置した動物に由来する前角パンチにおける正規化SOD1 mRNAレベルと比べて表されている。

【0551】

$6.9 \times 10^{11} \text{ vg/注射}$ で処置したブタのC1～L1に由来する前角パンチにおいて、有意なSOD1 mRNAノックダウンが明らかであった。mRNAノックダウンを、媒体対照処置動物に由来する前角パンチにおけるSOD1 mRNAレベルと比べて評価した。結果は表22aに示されている。同様のSOD1 mRNAレベルが、脊髄の両側に由来する前角パンチで得られた。一元配置ANOVAおよびシダック多重比較検定は、脊髄の各レベルにおいて有意なSOD1 mRNAノックダウンを示した（C1～T5左側 $p < 0.0001$ ；T2右側 $p < 0.001$ ；L1 $p < 0.01$ ）。表22aに示されるように、注射に最も近い脊髄分節は、最も大きなSOD1 mRNAノックダウンを呈した。脊髄分節C1～T12は、SOD1 mRNAのロバストで有意なノックダウンを示した（およそ50～75%ノックダウン）。ベクター注射の部位から離れた脊髄分節L1でさえ、SOD1 mRNAの有意なノックダウンが観察された（およそ30%ノックダウン）。

【0552】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表22a. 媒体群と比べたSOD1 mRNAレベル(高用量群)(%)

脊髄分節	左前角							
	媒体				scAAVrh10.H1.miR104.788.2 (高用量)			
	ブタ #1001	ブタ #1002	ブタ #1003	平均± 標準誤差	ブタ #1007	ブタ #1008	ブタ #1009	平均± 標準誤差
C1	99.52	82.32	118.16	100±10.35	28.35	35.77	36.21	33.44±2.55
C2	80.14	104.77	115.09	100±10.37	29.17	30.85	29.35	29.79±0.53
C3	113.62	104.09	82.29	100±9.27	24.00	32.45	27.66	28.04±2.45
C5-吻側	98.62	98.05	103.34	100±6.08	8.43	22.08	8.64	16.28±2.01
C5-尾側	103.97	88.05	107.97	100±1.68	20.29	13.99	14.57	13.05±4.52
C7	105.90	90.03	104.07	100±5.02	22.13	23.29	25.95	23.79±1.13
C8	102.23	91.45	106.32	100±4.44	22.93	48.48	61.17	44.20±11.25
T1	90.02	93.74	116.24	100±8.19	34.67	37.90	42.68	38.42±2.33
T4	92.86	93.95	113.19	100±6.60	44.20	34.30	47.17	41.89±3.89
T5	90.21	92.92	116.87	100±8.47	44.77	35.12	46.37	42.09±3.52
T7	91.07	99.06	109.87	100±5.45	55.20	42.85	56.77	51.61±4.40
T10	94.64	102.90	102.46	100±2.69	58.37	43.06	54.12	51.85±4.56
T12	88.93	102.39	108.69	100±5.83	63.12	23.62	59.50	48.75±12.61
L1	104.69	110.00	85.31	100±7.50	63.08	58.74	72.94	64.92±4.20
L4	103.62	98.20	98.18	100±1.81	87.88	77.19	76.96	80.68±3.60
L5	92.66	102.98	104.36	100±3.69	81.76	81.98	79.15	80.96±0.91
脊髄分節	右前角							
	媒体				scAAVrh10.H1.miR104.788.2 (高用量)			
	ブタ #1001	ブタ #1002	ブタ #1003	平均± 標準誤差	ブタ #1007	ブタ #1008	ブタ #1009	平均± 標準誤差
C1	92.12	92.70	115.18	100±7.59	37.53	44.21	48.46	43.40±3.18
C2	98.71	89.22	112.07	100±6.63	39.02	38.39	43.18	40.20±1.50
C3	113.69	100.21	86.10	100±7.96	19.00	36.45	17.37	24.27±6.11
C5-吻側	80.97	98.73	120.30	100±3.50	27.63	35.75	26.55	25.39±2.36
C5-尾側	105.99	93.87	100.14	100±11.37	29.00	20.94	26.23	29.98±2.90
C7	107.82	94.14	98.04	100±4.07	30.91	29.34	34.60	31.62±1.56
C8	101.64	96.70	101.67	100±1.65	29.67	31.25	36.78	32.57±2.15
T1	92.80	90.42	116.78	100±8.42	44.93	42.69	49.11	45.58±1.88
T4	93.18	100.01	106.81	100±3.93	53.31	44.59	58.06	51.98±3.95
T5	90.78	97.88	111.34	100±6.03	49.25	40.02	61.22	50.16±6.14
T7	86.50	109.82	103.69	100±6.98	56.43	46.52	72.73	58.56±7.64
T10	101.21	97.75	101.04	100±1.13	54.48	52.29	68.33	58.37±5.02
T12	94.32	99.59	106.08	100±3.40	57.18	53.37	82.46	64.34±9.13
L1	96.60	94.26	109.14	100±4.62	64.35	60.99	86.46	70.60±7.99
L4	103.62	90.24	106.13	100±4.93	81.26	74.38	88.89	81.51±4.19
L5	104.84	95.90	99.27	100±2.61	91.68	87.28	90.66	89.87±1.33

scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ) で得られたSOD1 mRNAレベル (表11) を、scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン) で得られたレベル (表22a) と比較することにより、同様のSOD1 mRNAノックダウンが、レンチウイルス由来フィラーを含むAAV (合計で 1.6×10^{12} vg) またはアルブミン由来フィラーを含むAAV (合計で 1.4×10^{12} vg) の両方で達成されたことが示された。

【0553】

より低用量のscAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン) を注射したブタの結果を表22bに示す。

【0554】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表22b. 媒体群と比べたSOD1 mRNAレベル(低用量群)(%)

脊髄分節	左前角							
	媒体				scAAVrh10.H1.miR104.788.2 (低用量)			
	ブタ #1001	ブタ #1002	ブタ #1003	平均± 標準誤差	ブタ #1010	ブタ #1011	ブタ #1012	平均± 標準誤差
C1	99.52	82.32	118.16	100±10.35	79.40	84.98	65.41	76.60±5.82
C2	80.14	104.77	115.09	100±10.37	70.49	79.44	56.18	68.70±6.77
C3	113.62	104.09	82.29	100±9.27	71.23	36.43	39.05	48.90±11.19
C5—吻側	98.62	98.05	103.34	100±6.08	35.41	47.21	20.12	48.19±9.61
C5—尾側	103.97	88.05	107.97	100±1.68	64.13	49.52	30.93	34.25±7.84
C7	105.90	90.03	104.07	100±5.02	77.51	77.03	59.26	71.27±6.00
C8	102.23	91.45	106.32	100±4.44	63.60	75.69	64.47	67.92±3.89
T1	90.02	93.74	116.24	100±8.19	98.42	110.11	90.03	99.52±5.82
T4	92.86	93.95	113.19	100±6.60	94.22	93.60	87.65	91.82±2.09
T5	90.21	92.92	116.87	100±8.47	92.11	90.63	76.65	86.47±4.92
T7	91.07	99.06	109.87	100±5.45	96.43	83.33	83.99	87.92±4.26
T10	94.64	102.90	102.46	100±2.69	85.88	84.50	74.36	81.58±3.63
T12	88.93	102.39	108.69	100±5.83	84.25	89.38	80.24	84.63±2.65
L1	104.69	110.00	85.31	100±7.50	88.86	111.16	87.87	95.97±7.60
脊髄分節	右前角							
	媒体				scAAVrh10.H1.miR104.788.2 (低用量)			
	ブタ #1001	ブタ #1002	ブタ #1003	平均± 標準誤差	ブタ #1010	ブタ #1011	ブタ #1012	平均± 標準誤差
C1	92.12	92.70	115.18	100±7.59	98.99	102.92	79.90	93.94±7.11
C2	98.71	89.22	112.07	100±6.63	84.94	94.50	78.86	86.10±4.55
C3	113.69	100.21	86.10	100±7.96	65.48	39.95	35.08	46.84±9.43
C5—吻側	80.97	98.73	120.30	100±3.50	42.50	38.75	38.70	49.55±5.11
C5—尾側	105.99	93.87	100.14	100±11.37	59.42	46.92	42.31	39.98±1.26
C7	107.82	94.14	98.04	100±4.07	76.81	89.17	71.36	79.11±5.27
C8	101.64	96.70	101.67	100±1.65	74.10	94.59	84.69	84.46±5.92
T1	92.80	90.42	116.78	100±8.42	96.90	110.21	87.72	98.28±6.53
T4	93.18	100.01	106.81	100±3.93	97.48	95.65	97.57	96.90±0.63
T5	90.78	97.88	111.34	100±6.03	90.17	82.25	85.27	85.90±2.31
T7	86.50	109.82	103.69	100±6.98	104.90	91.90	100.84	99.21±3.84
T10	101.21	97.75	101.04	100±1.13	99.26	98.84	96.51	98.20±0.85
T12	94.32	99.59	106.08	100±3.40	123.15	103.11	104.85	110.37±6.41
L1	96.60	94.26	109.14	100±4.62	93.11	104.16	96.39	97.89±3.27

2つの用量のうちの低い方(2.3E+10vg/注射)を注射したブタは、脊髄分節C2~C8の前角パンチにおいてSOD1 mRNAノックダウンを示した。同様のSOD1 mRNAレベルが、脊髄の両側に由来する前角パンチで得られた。二元配置ANOVAおよびシダック多重比較検定は、脊髄の各レベルにおいて有意なSOD1 mRNAノックダウンを示した(C3~C5 50%ノックダウンで $p<0.0001$)。

【0555】

6.9E+11vg/注射で得られたSOD1 mRNAレベルを、2.3E+10vg/注射で得られたSOD1 mRNAレベルと比較した。二元配置ANOVAおよびシダック多重比較検定は、SOD1 mRNAノックダウンが、以下の脊髄分節において低用量群では有意により低いことを示した：C1右側、C2右側、C7、C8右側、T1~T4、T7左側、T10右側、T12右側($p<0.0001$)；C1左側、T5($p<0.001$)；C2左側、T7右側、T12左側($p<0.01$)；C5左側、およびL1($p<0.05$)。注射部位C3~C5では、ノックダウンに有意差は観察されなかった。

【0556】

ベクターゲノム生体内分布を、scAAVrh10.H1.mir104-788.2(アルブミン)の両用量についてデジタル液滴PCRで測定した。両用量レベルの結果を、1二倍体細胞(dc)当たりのベクターゲノム(vg)の平均±平均の標準誤差(SE

M) として表 2 3 に示す。

【 0 5 5 7 】

【表 2 6】

表23. ベクターゲノム生体内分布

脊髄分節	ベクターゲノム／二倍体細胞 (vg/dc)							
	高用量 (6.9E+11vg/注射)							
	左前角				右前角			
	ブタ #1007	ブタ #1008	ブタ #1009	平均± 標準誤差	ブタ #1007	ブタ #1008	ブタ #1009	平均± 標準誤差
C1	1.21	0.60	1.57	1.13±0.28	1.04	0.63	0.95	0.87±0.12
C2	6.21	2.48	5.87	4.85±1.19	6.54	1.83	4.33	4.23±1.36
C3	62.07	8.35	31.38	33.93±15.46	265.36	18.57	349.19	211.04±99.23
C5-吻側	517.66	14.36	293.54	275.19±145.38	23.92	13.25	73.08	36.75±18.42
C5-尾側	29.57	210.86	163.63	134.69±54.30	13.47	86.29	18.31	39.36±23.51
C7	8.36	16.83	6.71	10.63±3.13	3.42	8.18	2.70	4.77±1.72
C8	2.14	5.80	0.12	2.69±1.66	1.74	3.56	2.39	2.56±0.53
T1	0.85	1.33	0.88	1.02±0.16	0.58	1.28	0.74	0.87±0.21
T4	0.20	0.28	0.20	0.23±0.03	0.17	0.29	0.19	0.22±0.04
T5	0.15	0.20	0.13	0.16±0.02	0.09	0.23	0.18	0.17±0.04
T7	0.13	0.15	0.14	0.14±0.01	0.10	0.16	0.11	0.12±0.02
T12	0.11	0.13	0.14	0.13±0.01	0.20	0.13	0.09	0.14±0.03
T10	0.13	0.09	0.09	0.10±0.01	0.07	0.13	0.08	0.09±0.02
L1	0.04	0.38	0.11	0.18±0.10	0.05	0.11	0.05	0.07±0.02
脊髄分節	低用量 (2.3E+10vg/注射)							
	左前角				右前角			
	ブタ #1010	ブタ #1011	ブタ #1012	平均± 標準誤差	ブタ #1010	ブタ #1011	ブタ #1012	平均± 標準誤差
	ブタ #1010	ブタ #1011	ブタ #1012	平均± 標準誤差	ブタ #1010	ブタ #1011	ブタ #1012	平均± 標準誤差
C1	0.20	0.14	0.23	0.19±0.03	0.04	0.07	0.12	0.08±0.02
C2	0.25	0.30	0.72	0.42±0.15	0.19	3.21	0.50	1.30±0.96
C3	0.71	2.30	2.88	1.96±0.65	0.61	5.90	10.33	5.61±2.81
C5-吻側	5.63	0.70	21.65	9.33±6.32	2.11	3.15	5.95	3.73±1.15
C5-尾側	0.72	0.65	4.58	1.98±1.30	0.45	0.85	1.11	0.80±0.19
C7	0.51	0.37	0.81	0.56±0.13	0.13	0.26	0.48	0.29±0.10
C8	0.15	0.13	0.35	0.21±0.07	0.13	0.16	0.30	0.20±0.05
T1	0.05	0.08	0.16	0.10±0.03	0.04	0.07	0.13	0.08±0.03
T4	0.03	0.04	0.10	0.06±0.02	0.02	0.02	0.05	0.03±0.01
T5	0.03	0.04	0.07	0.05±0.01	0.27	0.03	0.08	0.13±0.07
T7	0.05	0.02	0.07	0.05±0.01	0.04	0.03	0.06	0.04±0.01
T12	0.01	0.03	0.03	0.02±0.01	0.17	0.10	0.05	0.11±0.04
T10	0.02	0.11	0.02	0.05±0.03	0.04	0.06	0.31	0.14±0.09
L1	0.03	0.17	0.02	0.07±0.05	0.01	0.02	0.01	0.01±0.00

高用量 (6.9E+11vg/注射) 群では、注入部位に最も近い頸部脊髄の前角パンチにおいて1二倍体細胞当たりのベクターゲノムコピー数が高いことが示された。次いで、ベクターゲノムコピー数は、C3からC1脊髄レベルへと、およびC7からT1脊髄レベルへと急激に低下し (>10倍)、その後T4からL1までは一定に保持された。両用量群のベクターゲノムコピー数の平均の比を算出し、表24に示す。表中、VHは前角を示す。

【 0 5 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表24. 6. 9E+11vg／注射:2. 3E+10vg／注射用量群のvg／dcの平均の比

脊髄レベル	左VH	右VH	VH全体
C1	5.93	11.53	7.53
C2	11.46	3.26	5.28
C3	17.28	37.59	32.33
C5-R	29.51	9.84	23.88
C5-C	67.92	49.01	62.47
C7	18.87	16.43	18.04
C8	12.8	12.86	12.83
T1	10.55	10.81	10.67
T4	4	7.01	5.06
T5	3.43	1.31	1.88
T7	3	2.81	2.91
T10	5.43	1.31	2.05
T12	2.07	0.67	1.04
L1	2.41	5.9	2.9

10

ベクターゲノム分布レベルは、注射部位付近を除いて、脊髄の両側で類似していることが見出された。注射部位付近での高用量（6. 9 E + 1 1 v g ／注射）群と低用量（2. 3 E + 1 0 v g ／注射）群とのベクターゲノムの比は、用量の30倍の差異に類似するが、この比は、注射部位に対して遠位の領域（T5～L1）では徐々に1～3倍に減少した。

20

【0559】

表25に示されるように、scAAVrh10.H1.mir104-788.2（レンチ）およびscAAVrh10.H1.mir104-788.2（アルブミン）で同様のベクターゲノム分布が観察された。表中、VHは前角を示す。

【0560】

30

40

50

【表 28】

表 25. scAAVrh10.H1.mir104-788.2(レンチ)群および
scAAVrh10.H1.mir104-788.2(アルブミン)群の前角パンチにおけるベクターゲノムコピーの比較

脊髄分節	ベクターゲノム/二倍体細胞(vg/dc)							
	scAAVrh10.H1.mir104-788.2(アルブミン)@高用量(6.9E+11vg/注射)							
	左前角				右前角			
	ブタ #1007	ブタ #1008	ブタ #1009	平均±標準誤差	ブタ #1007	ブタ #1008	ブタ #1009	平均±標準誤差
C1	1.21	0.60	1.57	1.13±0.28	1.04	0.63	0.95	0.87±0.12
C2	6.21	2.48	5.87	4.85±1.19	6.54	1.83	4.33	4.23±1.36
C3	62.07	8.35	31.38	33.93±15.46	265.36	18.57	349.19	211.04±99.23
C5-吻側	517.66	14.36	293.54	275.19±145.38	23.92	13.25	73.08	36.75±18.42
C5-尾側	29.57	210.86	163.63	134.69±54.30	13.47	86.29	18.31	39.36±23.51
C7	8.36	16.83	6.71	10.63±3.13	3.42	8.18	2.70	4.77±1.72
C8	2.14	5.80	0.12	2.69±1.66	1.74	3.56	2.39	2.56±0.53
T1	0.85	1.33	0.88	1.02±0.16	0.58	1.28	0.74	0.87±0.21
T4	0.20	0.28	0.20	0.23±0.03	0.17	0.29	0.19	0.22±0.04
T5	0.15	0.20	0.13	0.16±0.02	0.09	0.23	0.18	0.17±0.04
T7	0.13	0.15	0.14	0.14±0.01	0.10	0.16	0.11	0.12±0.02
T12	0.11	0.13	0.14	0.13±0.01	0.20	0.13	0.09	0.14±0.03
T10	0.13	0.09	0.09	0.10±0.01	0.07	0.13	0.08	0.09±0.02
L1	0.04	0.38	0.11	0.18±0.10	0.05	0.11	0.05	0.07±0.02
脊髄分節	scAAVrh10.H1.mir104-788.2(レンチ)@8.1E+11vg/注射							
	左前角				右前角			
	ブタ #1005	ブタ #1004	ブタ #1006	平均±標準誤差	ブタ #1005	ブタ #1004	ブタ #1006	平均±標準誤差
	ブタ #1005	ブタ #1004	ブタ #1006	平均±標準誤差	ブタ #1005	ブタ #1004	ブタ #1006	平均±標準誤差
C1	1.74	3.02	1.16	1.97±0.55	2.59	2.12	1.29	2.00±0.38
C2	9.57	9.73	4.52	7.94±1.71	10.69	14.29	4.42	9.80±2.88
C3	29.66	35.55	27.98	31.06±2.29	585.67	633.71	28.65	416.01±194.17
C5-吻側	92.67	187.13	439.19	239.66±103.42	45.37	201.47	554.95	267.27±150.74
C5-尾側	3029.44	760	332.53	1373.99±836.88	132.37	960.73	290.71	461.27±253.88
C7	18.39	28.38	56.81	34.53±11.51	9.52	27.43	41.11	26.02±9.14
C8	5.15	6.82	11.99	7.98±2.06	3.57	10.37	15.65	9.86±3.50
T1	2.03	4.03	7.06	4.37±1.46	2.66	4.4	5.83	4.30±0.92
T4	0.51	0.52	0.84	0.63±0.11	0.63	1.15	0.95	0.91±0.15
T5	0.43	1.54	0.58	0.85±0.35	0.35	0.92	0.55	0.60±0.17
T7	0.23	0.42	0.31	0.32±0.06	0.4	0.41	0.32	0.38±0.03
T12	0.13	0.27	0.36	0.25±0.07	0.26	0.36	0.24	0.29±0.04
T10	0.21	0.17	0.28	0.22±0.03	0.27	0.22	0.38	0.29±0.05
L1	1.32	0.16	0.12	0.53±0.39	0.25	0.3	0.13	0.22±0.05

同様のベクターゲノム分布が観察され、scAAVrh10.H1.mir104-788.2(レンチ)でより多くのベクターゲノムが観察される傾向があった(小さいものの)。C5において2群間の最大の差異が観察され、レンチウイルス由来フィラー配列を含むベクターは、アルブミン由来フィラー配列を含むベクターよりも4~9倍高い値を示した。T4右側、T7右側およびT12右側で、2群間のベクターゲノム分布の統計的に有意差が観察された($p < 0.01$)。

【0561】

脊髄のC3注射部位に由来する組織切片のH&E染色を使用して、組織病理学的分析を実施した。媒体対照と比べた組織病理の変化を、表26に示されているすべてのコンストラクトについて評価した。試料を、以下のものの1つにグレード分けした：グレード1：コンストラクトと媒体との差異が最小限、グレード2：差異が軽度、グレード3：差異が中程度、グレード4：差異が顕著、またはグレード5：差異が重大。表26では、グレードの隣の括弧内の数字は、表記の表現型を示した標本(ブタ)の頭数を示す。

【0562】

10

20

30

40

50

【表 29】

表26. 脊髄の組織病理

測定したパラメータ	媒体	scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (レンチ) 8. 1E+11vg/注射	scAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン)	
			6. 9E+11vg /注射 高用量	2. 3E+11vg /注射 低用量
軸索変性	グレード1(2)、 グレード1-3(1)	グレード1(2)、 グレード1-2(1)	グレード1(1)、 グレード1-2(2)	グレード1(2)、 グレード1-2(1)
ジストロフィー軸索	グレード1(2)	グレード1(2)	グレード1(1)	グレード1(2)
グリオーシス	無し	グレード1(2)	グレード1(1)、 グレード2(1)	無し
浸潤	無し	グレード1(1)	グレード2(2)	無し
壊死	無し	無し	グレード2(1)	無し
神経細胞侵食	無し	グレード1(1)	グレード1(1)	グレード1(1)
染色質溶解	無し	グレード1(2)、グレード2(1)	グレード1(1)	グレード1(3)

AAV処置群において、最小限から軽度の変化が観察された。

【0563】

ブタSOD1 mRNAおよびベクターゲノムのin situハイブリダイゼーション (ISH) を、媒体またはscAAVrh10.H1.mir104-788.2 (アルブミン) で処置した動物に由来する頸部脊髄および胸部脊髄の断面に対して実施した。AAV処置動物では、前角の両側の運動ニューロンにおいてベクターゲノムシグナルが観察された。vgシグナルは、注射に最も近い側の運動ニューロンでより豊富だった。大きな運動ニューロンでは、内因性SOD1 mRNAシグナルの実質的な低減が吻側尾側勾配で観察され、低減は頸部領域で最も強力だった。AAVを注射した動物のC5脊髄分節の両側の前角の運動ニューロンにおいて、SOD1 mRNAシグナルの劇的な低減が観察された。ISHによるSOD1 mRNAの低減は、bDNAによって評価した前角パンチのSOD1 mRNAノックダウンと相関していた。

【0564】

均等物および範囲

当業者は、本明細書に記載される本開示に係る具体的な実施形態の多くの均等物を認識し、またはルーチンに過ぎない実験を用いて確かめることが可能であろう。本開示の範囲が上記の説明に限定されることは意図されず、それはむしろ添付の特許請求の範囲に示されるとおりである。

【0565】

特許請求の範囲では、「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、反する旨が示されない限り、または文脈上特に明らかでない限り、1つまたは2つ以上を意味し得る。ある群の1つ以上のメンバーの間に「または」を含むクレームまたは説明は、反する旨が示されない限り、または文脈上特に明らかでない限り、その群メンバーの1つ、2つ以上、または全てが所与の製品または方法に存在する、それに用いられる、または他の形でそれに関連する場合に満たされるものと見なされる。本開示は、群の正確に1つのメンバーが所与の製品または方法に存在する、それに用いられる、または他の形でそれに関連する実施形態を含む。本開示は、2つ以上の、または全部の群メンバーが所与の製品または方法に存在する、それに用いられる、または他の形でそれに関連する実施形態を含む。

【0566】

また、用語「～を含んでいる (comprising)」は非限定的 (open) であることが意図され、追加の要素または工程の包含を許容するが必須ではないことも注記される。用語「～を含んでいる (comprising)」が本明細書で使用されるとき、したがって用語「～からなる (consisting of)」もまた包含され、開示される。

【0567】

範囲が提供されるとき、端点は含まれる。更に、特に指示されない限り、または文脈および当業者の理解から特に明らかなでない限り、範囲として表される値は、文脈上特に明確に指示されない限り、その範囲の下限の単位の10分の1に至るまでの、本開示の種々の実施形態において明示される範囲内にある任意の具体的な値または部分的範囲を想定し得ることが理解されるべきである。

【0568】

加えて、先行技術に含まれる本開示の任意の特定の実施形態は、クレームの任意の1つ以上から明示的に除外され得ることが理解されるべきである。かかる実施形態は当業者に公知であると見なされるため、除外が本明細書に明示的に示されないとしても、それらは除外され得る。本開示の組成物の任意の詳細な実施形態（例えば、任意の抗生物質、治療薬または活性成分；任意の作製方法；任意の使用方法等）が、先行技術の存在に関係するか否かに関わらず、何らかの理由で任意の1つ以上のクレームから除外されることがある。

【0569】

使用した文言は、限定でなく、むしろ説明の文言であること、およびその広義の態様における本開示の真の範囲および趣旨から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲内で変更が行われ得ることが理解されるべきである。

【0570】

本開示をかなり詳しく、幾つかの説明される実施形態に関するある具体性をもって説明したが、それが任意のかかる具体例もしくは実施形態または任意の具体的な実施形態に限定されるべきであることを意図するものではなく、しかし先行技術を考慮してかかる特許請求の範囲の最も広義の可能な解釈を提供し、したがって本開示の意図される範囲を有効に包含するように添付の特許請求の範囲を参照して解釈されるべきである。

【0571】

引用された情報源、例えば本明細書で引用された参考文献、刊行物、データベース、データベースエントリ、および技術はすべて、たとえ引用において明示的に記載されていなくとも、参照により本出願に援用される。引用された情報源の記載と本出願の記載が矛盾する場合、本出願の記載が優先するものとする。

【0572】

セクションおよび表の見出しは、限定を意図しない。

（付記）

上記実施形態及び変更例から把握できる技術的思想について記載する。

〔項目1〕

細胞におけるSOD1遺伝子の発現を阻害するための方法であって、対象の1つ以上の部位に、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む組成物を実質内送達によって投与する工程を含み、前記AAVベクターは、細胞におけるSOD1の発現を阻害または抑制するための、2つの末端逆位反復（ITR）間に配置された核酸配列を含み、前記核酸配列は、センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含み、前記センス鎖配列は、配列番号7のヌクレオチド配列と3ヌクレオチド以下が異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖配列は、配列番号8のヌクレオチド配列と3ヌクレオチド以下が異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖配列は、少なくとも4ヌクレオチド長の相補性の領域を共有する、方法。

〔項目2〕

SOD1の発現が阻害または抑制される、項目1に記載の方法。

〔項目3〕

前記SOD1は、野生型SOD1、少なくとも1つの突然変異を有する突然変異SOD1、または野生型SOD1および少なくとも1つの突然変異を有する突然変異SOD1の両方である、項目2に記載の方法。

〔項目4〕

SOD1の発現が約20%～約100%阻害または抑制される、項目2に記載の方法。

〔項目5〕

10

20

30

40

50

前記核酸配列は、s i R N A二重鎖のセンス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含む、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

〔項目6〕

前記I T Rを含む2つの末端逆位反復（I T R）間に配置された前記核酸配列は、配列番号25からなる、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

〔項目7〕

前記相補性の領域は、少なくとも17ヌクレオチド長である、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

〔項目8〕

前記相補性の領域は、19～21ヌクレオチド長である、項目7に記載の方法。

〔項目9〕

前記相補性の領域は、19ヌクレオチド長である、項目8に記載の方法。

〔項目10〕

前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖は、独立に30ヌクレオチド以下である、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

〔項目11〕

細胞におけるS O D 1の発現を阻害または抑制するための、2つの末端逆位反復（I T R）間に配置された核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターであって、前記核酸配列は、センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含み、前記センス鎖配列は、配列番号7のヌクレオチド配列と3ヌクレオチド以下が異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖配列は、配列番号8のヌクレオチド配列と3ヌクレオチド以下が異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖配列は、少なくとも4ヌクレオチド長の相補性の領域を共有する、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター。

〔項目12〕

配列番号9を含むポリヌクレオチド配列。

〔項目13〕

配列番号25からなるポリヌクレオチド配列。

〔項目14〕

A A Vカプシドにパッケージングされた配列番号25を含むベクターゲノム配列を含む、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター。

〔項目15〕

前記A A Vカプシドの血清型は、A A V r h 1 0およびA A V 9から選択される、項目14に記載のアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター。

〔項目16〕

前記ベクターゲノムは、自己相補的（s c A A V）である、項目14に記載のアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター。

〔項目17〕

治療を必要としている対象の神経変性疾患または脊髄関連疾患を治療および／または改善する方法であって、前記対象の2つ以上の部位に、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含む治療有効量の組成物を実質内送達によって投与する工程を含み、前記A A Vベクターは、細胞における前記神経変性疾患または前記脊髄関連疾患に関連する遺伝子の発現を阻害または抑制するための、2つの末端逆位反復（I T R）間に配置された核酸配列を含み、前記核酸配列は、センス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含み、前記センス鎖配列は、少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖配列は、少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖配列は、少なくとも4ヌクレオチド長の相補性の領域を共有する、方法。

〔項目18〕

前記相補性の領域は、少なくとも17ヌクレオチド長である、項目17に記載の方法。

〔項目19〕

10

20

30

40

50

前記相補性の領域は、19～21ヌクレオチド長である、項目18に記載の方法。

〔項目20〕

前記相補性の領域は、19ヌクレオチド長である、項目19に記載の方法。

〔項目21〕

前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖は、独立に30ヌクレオチド以下である、項目17に記載の方法。

〔項目22〕

前記AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AA

10

20

30

40

50

Vhu. 39、AAVhu. 40、AAVhu. 41、AAVhu. 42、AAVhu. 43、AAVhu. 44、AAVhu. 44R1、AAVhu. 44R2、AAVhu. 44R3、AAVhu. 45、AAVhu. 46、AAVhu. 47、AAVhu. 48、AAVhu. 48R1、AAVhu. 48R2、AAVhu. 48R3、AAVhu. 49、AAVhu. 51、AAVhu. 52、AAVhu. 54、AAVhu. 55、AAVhu. 56、AAVhu. 57、AAVhu. 58、AAVhu. 60、AAVhu. 61、AAVhu. 63、AAVhu. 64、AAVhu. 66、AAVhu. 67、AAVhu. 14/9、AAVhu. t 19、AAVrh. 2、AAVrh. 2R、AAVrh. 8、AAVrh. 8R、AAVrh. 10、AAVrh. 12、AAVrh. 13、AAVrh. 13R、AAVrh. 14、AAVrh. 17、AAVrh. 18、AAVrh. 19、AAVrh. 20、AAVrh. 21、AAVrh. 22、AAVrh. 23、AAVrh. 24、AAVrh. 25、AAVrh. 31、AAVrh. 32、AAVrh. 33、AAVrh. 34、AAVrh. 35、AAVrh. 36、AAVrh. 37、AAVrh. 37R2、AAVrh. 38、AAVrh. 39、AAVrh. 40、AAVrh. 46、AAVrh. 48、AAVrh. 48. 1、AAVrh. 48. 1. 2、AAVrh. 48. 2、AAVrh. 49、AAVrh. 51、AAVrh. 52、AAVrh. 53、AAVrh. 54、AAVrh. 56、AAVrh. 57、AAVrh. 58、AAVrh. 61、AAVrh. 64、AAVrh. 64R1、AAVrh. 64R2、AAVrh. 67、AAVrh. 73、AAVrh. 74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突然変異体、AAVrh8R R533A突然変異体、AAAV、BAAV、ヤギAAV、ウシAAV、AAVhE1. 1、AAVhEr1. 5、AAVhEr1. 14、AAVhEr1. 8、AAVhEr1. 16、AAVhEr1. 18、AAVhEr1. 35、AAVhEr1. 7、AAVhEr1. 36、AAVhEr2. 29、AAVhEr2. 4、AAVhEr2. 16、AAVhEr2. 30、AAVhEr2. 31、AAVhEr2. 36、AAVhEr1. 23、AAVhEr3. 1、AAV2. 5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM10-2、AAVシャッフル100-1、AAVシャッフル100-3、AAVシャッフル100-7、AAVシャッフル10-2、AAVシャッフル10-6、AAVシャッフル10-8、AAVシャッフル100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh. 50、AAVrh. 43、AAVrh. 62、AAVrh. 48、AAVhu. 19、AAVhu. 11、AAVhu. 53、AAV4-8/rh. 64、AAVLG-9/hu. 39、AAV54. 5/hu. 23、AAV54. 2/hu. 22、AAV54. 7/hu. 24、AAV54. 1/hu. 21、AAV54. 4R/hu. 27、AAV46. 2/hu. 28、AAV46. 6/hu. 29、AAV128. 1/hu. 43、トゥルータイプAAV (ttAAV)、UPENN AAV10、ジャパニーズAAV10血清型、AAV CBr-7. 1、AAV CBr-7. 10、AAV CBr-7. 2、AAV CBr-7. 3、AAV CBr-7. 4、AAV CBr-7. 5、AAV CBr-7. 7、AAV CBr-7. 8、AAV CBr-B7. 3、AAV CBr-B7. 4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV

10

20

30

40

50

CHt-6. 1、AAV CHt-6. 10、AAV CHt-6. 5、AAV CHt-6. 6、AAV CHt-6. 7、AAV CHt-6. 8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV CLv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV CLv1-7、AAV CLv1-8、AAV CLv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8. 10、AAV CSp-8. 2、AAV CSp-8. 4、AAV CSp-8. 5、AAV CSp-8. 6、AAV CSp-8. 7、AAV CSp-8. 8、AAV CSp-8. 9、AAV CSp-9、AAV. hu. 48R3、AAV. VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8、AAVF9/HSC9、AAV-PHP. B、AAV-PHP. A、G2B-26、G2B-13、TH1. 1-32、TH1. 1-35、AAVPHP. B2、AAVPHP. B3、AAVPHP. N/PHP. B-DGT、AAVPHP. B-EST、AAVPHP. B-GGT、AAVPHP. B-ATP、AAVPHP. B-ATT-T、AAVPHP. B-DGT-T、AAVPHP. B-GGT-T、AAVPHP. B-SGS、AAVPHP. B-AQP、AAVPHP. B-QQP、AAVPHP. B-SNP (3)、AAVPHP. B-SNP、AAVPHP. B-QGT、AAVPHP. B-NQT、AAVPHP. B-EGS、AAVPHP. B-SGN、AAVPHP. B-EGT、AAVPHP. B-DST、AAVPHP. B-DST、AAVPHP. B-STP、AAVPHP. B-PQP、AAVPHP. B-SQP、AAVPHP. B-QLP、AAVPHP. B-TMP、AAVPHP. B-TTP、AAVPHP. S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5およびこれらのバリエーションからなる群から選択されるカプシド血清型を含む、項目17に記載の方法。

〔項目23〕

10

20

30

40

50

前記カプシド血清型は、AAVrh.10である、項目22に記載の方法。

〔項目24〕

前記AAVベクターはプロモータを含み、前記プロモータはH1である、項目22に記載の方法。

〔項目25〕

前記AAVは、フィラー配列を含む、項目22に記載の方法。

〔項目26〕

前記フィラー配列は、レンチウイルス由来フィラー配列およびアルブミン遺伝子由来フィラー配列から選択される、項目25に記載の方法。

〔項目27〕

実質内送達による前記投与工程は、脊髄内の2つの部位で生じる、項目1または17に記載の方法。

〔項目28〕

実質内送達による前記投与は、頸部脊髄内の2つの部位で生じる、項目1または17に記載の方法。

〔項目29〕

投与のための前記2つの部位は、脊髄のレベルC3およびC5である、項目1または17に記載の方法。

〔項目30〕

投与の容積は、脊髄のレベルC3では約5 μ L～約240 μ Lであり、脊髄のレベルC5では約5 μ L～約240 μ Lである、項目1または17に記載の方法。

〔項目31〕

投与の容積は、脊髄のレベルC3では約5 μ L～約60 μ Lであり、脊髄のレベルC5では約5 μ L～約60 μ Lである、項目1または17に記載の方法。

〔項目32〕

前記投与の容積は、脊髄のレベルC3では約25～約40 μ Lであり、脊髄のレベルC5では約25～約40 μ Lである、項目31に記載の方法。

〔項目33〕

用量は、脊髄のレベルC3では約 1×10^{10} vg～約 1×10^{12} vgであり、脊髄のレベルC5では約 1×10^{10} vg～約 1×10^{12} vgである、項目1または17に記載の方法。

〔項目34〕

前記用量は、脊髄のレベルC3では約 5×10^{11} vg～約 8×10^{11} vgであり、脊髄のレベルC5では約 5×10^{11} vg～約 8×10^{11} vgである、項目33に記載の方法。

〔項目35〕

前記用量は、脊髄のレベルC3では約 2×10^{10} vg～約 7×10^{11} vgであり、脊髄のレベルC5では約 2×10^{10} vg～約 7×10^{12} vgである、項目33に記載の方法。

〔項目36〕

注射速度は、5 μ L／分である、項目30～35のいずれか一項に記載の方法。

10

20

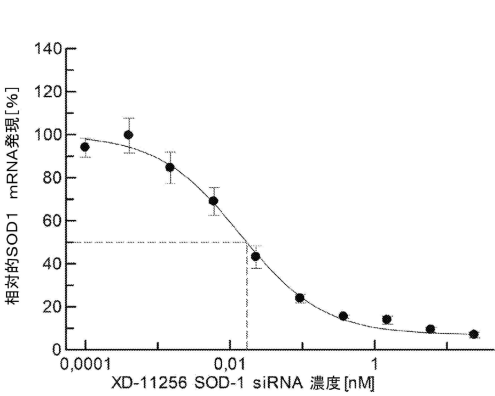
30

40

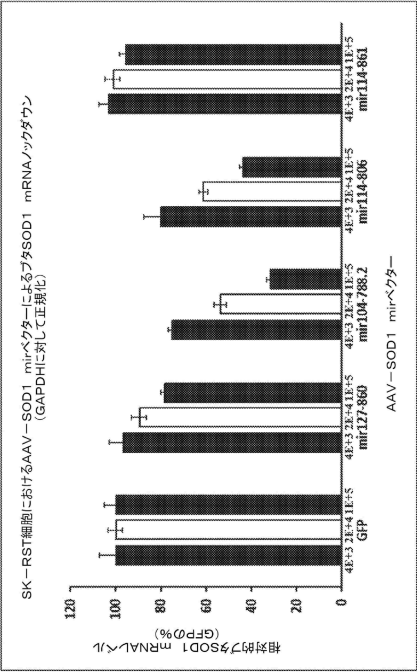
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



【配列表】

0007565218000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 21/02 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)

F I

A 6 1 K 35/76
A 6 1 P 21/02
C 1 2 N 5/10

Z N A

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

弁理士 中村 美樹

(72)発明者

サー、ディナー ウェン－イー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ シドニー ストリート 7 5 ボイ
ジャー セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者

チェン、チンミン

アメリカ合衆国 0 2 4 2 0 マサチューセッツ州 レキシントン ハードリー ロード 5

(72)発明者

キャロル ソーパー、ジェナ

アメリカ合衆国 0 1 8 9 0 マサチューセッツ州 ウィンチェスター ナサニエル ロード 3 9

(72)発明者

パツケ、ホルガー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ シドニー ストリート 7 5 ボイ
ジャー セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者

ハウ、ジンジャオ

アメリカ合衆国 0 2 4 2 0 マサチューセッツ州 レキシントン タイラー ロード 9

(72)発明者

ハーシュ、スティーブン エム.

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ シドニー ストリート 7 5 ボイ
ジャー セラピューティクス インコーポレイテッド内

審査官

藤澤 雅樹

(56)参考文献

特表 2 0 1 7 - 5 3 5 2 6 6 (J P, A)

特表 2 0 1 5 - 5 2 2 2 8 0 (J P, A)

特表 2 0 1 6 - 5 1 7 2 7 8 (J P, A)

米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 9 6 8 6 2 (U S, A 1)

特表 2 0 1 5 - 5 1 3 5 2 8 (J P, A)

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1986年, Vol.261, No.15, pp.6747-6757

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

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)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

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