

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-542211

(P2023-542211A)

(43)公表日 令和5年10月5日(2023.10.5)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A 4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/53	
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全153頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-518391(P2023-518391)
 (86)(22)出願日 令和3年9月21日(2021.9.21)
 (85)翻訳文提出日 令和5年5月19日(2023.5.19)
 (86)国際出願番号 PCT/US2021/071534
 (87)国際公開番号 WO2022/061378
 (87)国際公開日 令和4年3月24日(2022.3.24)
 (31)優先権主張番号 63/080,925
 (32)優先日 令和2年9月21日(2020.9.21)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)
 (31)優先権主張番号 63/121,152
 (32)優先日 令和2年12月3日(2020.12.3)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)
 (31)優先権主張番号 63/139,410

最終頁に続く

(71)出願人 520375033
 アスクレピオス バイオフィーマシュー
 ティカル, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27
 709, リサーチ トライアングル パ
 ーク, ティー.ダブリュー. アレクサ
 ンダー ドライブ 20, スイート 110
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経疾患を処置するための方法

(57)【要約】

本開示の態様は、神経疾患および障害を処置するために有用な組成物および方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、干渉核酸（例えば、人工miRNA）を含むウイルスベクター、およびCYP46A1タンパク質を含むウイルスベクターの両方の投与を含む、神経疾患または障害の処置のための方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、ハンチンチン遺伝子（HTT）を標的にする干渉核酸（例えば、人工miRNA）を含むウイルスベクター、およびCYP46A1タンパク質を含むウイルスベクターの両方の投与を含む、ハンチントン病の処置のための方法を提供する。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、例えばCNSまたはPNSにおける細胞を優先的に標的にするための、改変されたウイルスカプシドを含む。

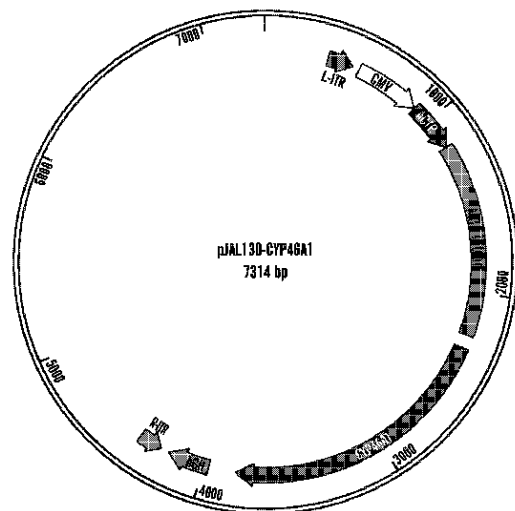


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

処置を必要とする対象における神経疾患または障害を処置するための方法であって、前記方法が、治療有効量の

(a) 1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸、および

(b) CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸

を、前記神経疾患または障害を有するか、またはそれを発生するリスクがある対象に投与することを含む、方法。

【請求項 2】

処置を必要とする対象における神経疾患または障害を処置するための方法であって、前記方法が、治療有効量の

(a) (i) 第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復配列(ITR)またはそのバリエーションを含む第1の領域、および(ii) 1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子を含む第2の領域を含む単離された核酸を含む組換えウイルスベクター、ならびに

(b) CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む組換えウイルスベクター

を、前記神経疾患または障害を有するか、またはそれを発生するリスクがある対象に投与することを含む、方法。

【請求項 3】

前記神経疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナバン病、リー病、脊髄性大脳性運動失調症、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、クラッペ病、バッテン病、レフサム病、トゥレット症候群、原発性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、進行性筋萎縮症、ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ピンスワンガー病、神経障害性疼痛、脊髄および頭部傷害に起因する外傷、眼疾患および障害、テイ-サックス病、レッシュ-ナイハン症候群、てんかん、脳梗塞、うつ病、双極性感情障害、持続性感情障害、続発性気分障害、統合失調症、薬物依存症、神経症、精神病、認知症、妄想症、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛性障害、摂食または体重障害である、請求項1~2のいずれかに記載の方法。

【請求項 4】

前記神経疾患または障害が、中枢神経系(CNS)疾患または障害である、請求項1~3のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記CNS疾患または障害が、ハンチントン病、アルツハイマー病、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、筋萎縮性側索硬化症およびパーキンソン病から選択される、請求項1~4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記CNS疾患または障害が、アルツハイマー病であり、少なくとも1つのmiRNAが、アミロイド前駆体タンパク質(APP)、プレセニリン1、プレセニリン2、ABCA7、SORL1、およびそれらの疾患関連対立遺伝子に相補的なシード配列を含む、請求項1~5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記CNS疾患または障害が、パーキンソン病であり、少なくとも1つのmiRNAが、SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、GBA1、およびそれらの疾患関連対立遺伝子に相補的なシード配列を含む、請求項1~5のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記CNS疾患が、ハンチントン病であり、少なくとも1つのmiRNAが、配列番号

10

20

30

40

50

4に相補的なシード配列を含むか、または少なくとも1つのmiRNAが、miRNA骨格配列に隣接した配列番号6～17、40～44、もしくは50～66のうちのいずれか1つの配列を含む、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記CNS疾患が、ハンチントン病であり、少なくとも1つのmiRNAが、配列番号6～17、40～44、または50～66のうちのいずれか1つの配列を含む、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

前記miRNAのうちの少なくとも1つが、ヒトハンチンチンとハイブリダイズし、その発現を阻害する、請求項8～9のいずれかに記載の方法。

10

【請求項11】

前記対象が、36よりも多くのCAGリピート、40よりも多くのリピート、または100よりも多くのリピートを有するハンチンチン遺伝子を含む、請求項8～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

前記対象が、20歳未満である、請求項8～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記組換えウイルスベクターが、AAVベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ボックスウイルスベクター、パキユロウイルスベクター、およびキメラウイルスベクターからなる群から選択される、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

20

【請求項14】

(a)を含む前記組換えウイルスベクターが、(b)を含む前記組換えウイルスベクターと同じである、請求項2～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

(a)および(b)の前記単離された核酸が、別々の組換えウイルスベクターに含まれる、請求項1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

(a)および(b)の前記単離された核酸が、同じ組換えウイルスベクターに含まれる、請求項1～14のいずれかに記載の方法。

30

【請求項17】

(a)および(b)が、実質的に同じ時に投与される、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

(a)および(b)が、異なる時点で投与される、請求項1～13および15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記異なる時点が、少なくとも1分、少なくとも1時間、少なくとも1日、少なくとも1週間、少なくとも1か月、少なくとも1年、またはそれよりも長く離れている、請求項18に記載の方法。

40

【請求項20】

(a)が、(b)の投与の前に投与される、請求項18～19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】

(b)が、(a)の投与の前に投与される、請求項18～19のいずれかに記載の方法。

【請求項22】

(a)、(b)、または(a)および(b)の前記投与が、少なくとも1回繰り返される、請求項1～21のいずれかに記載の方法。

【請求項23】

50

前記導入遺伝子が、イントロンに隣接する2つのmiRNAをタンデムで含む、請求項1～22のいずれかに記載の方法。

【請求項24】

前記隣接しているイントロンが、同一である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記隣接しているイントロンが、同じ種由来である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記隣接しているイントロンが、hCGイントロンである、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記導入遺伝子が、プロモーターを含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法 10

【請求項28】

前記プロモーターが、シナプシン(Syn1)プロモーター、または表10～13のプロモーターである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記1つまたは複数のmiRNAが、前記導入遺伝子の非翻訳部分に位置する、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記非翻訳部分が、イントロンである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記非翻訳部分が、タンパク質をコードする核酸配列の最後のコドンとポリAテール配列との間、またはプロモーター配列の最後のヌクレオチド塩基とポリAテール配列との間にある、請求項30に記載の方法。 20

【請求項32】

第2のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復配列(ITR)、またはそのバリエーションを含む第3の領域をさらに含む、請求項1～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

前記ITRバリエーションが、機能的末端分離部位(TRS)を欠き、必要に応じて前記ITRバリエーションが、ATRS ITRである、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項34】

前記投与が、前記ウイルスベクターまたは単離された核酸の前記対象の中枢神経系(CNS)への送達をもたらす、請求項1～33のいずれかに記載の方法。

【請求項35】

前記投与が、注射、必要に応じて静脈内注射または線条体内注射による、請求項1～34のいずれかに記載の方法。

【請求項36】

前記ウイルスベクターが、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12、またはそれらのキメラである、請求項2～35のいずれかに記載の方法。 40

【請求項37】

前記ウイルスベクターが、AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12、またはそれらのキメラ由来のカプシドタンパク質を含む、請求項2～36のいずれかに記載の方法。

【請求項38】

前記カプシドタンパク質が、AAV9カプシドタンパク質である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記ウイルスベクターが、自己相補的AAV(scAAV)である、請求項2～38の 50

いずれかに記載の方法。

【請求項 40】

前記ウイルスベクターが、中枢神経系（CNS）への送達のために製剤化されている、請求項 2～39 のいずれかに記載の方法。

【請求項 41】

(a) 1つまたは複数の miRNA をコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸、および

(b) CYP46A1 タンパク質をコードする単離された核酸を含む組成物または組合せ。

【請求項 42】

(a) (i) 第 1 のアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復配列（ITR）またはそのバリエーションを含む第 1 の領域、および (ii) 1つまたは複数の miRNA をコードする導入遺伝子を含む第 2 の領域を含む単離された核酸を含む組換えウイルスベクター、ならびに

(b) CYP46A1 タンパク質をコードする単離された核酸を含む組換えウイルスベクター

を含む組成物または組合せ。

【請求項 43】

処置を必要とする対象における神経疾患または障害を処置するための方法における使用のための請求項 41～42 のいずれかに記載の組成物または組合せであって、前記方法が、治療有効量の前記組成物または組合せを、前記神経疾患または障害を有するか、またはそれを発生するリスクがある対象に投与することを含む、組成物または組合せ。

【請求項 44】

前記神経疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナバン病、リー病、脊髄性大脳性運動失調症、クラッペ病、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、バッテン病、レフサム病、トゥレット症候群、原発性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、進行性筋萎縮症、ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ピンスワンガー病、神経障害性疼痛、脊髄および頭部傷害に起因する外傷、眼疾患および障害、テイ-サックス病、レッシュ-ナイハン症候群、てんかん、脳梗塞、うつ病、双極性感情障害、持続性感情障害、続発性気分障害、統合失調症、薬物依存症、神経症、精神病、認知症、妄想症、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛性障害、摂食または体重障害である、請求項 43 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 45】

前記神経疾患または障害が、中枢神経系（CNS）疾患または障害である、請求項 44 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 46】

前記 CNS 疾患または障害が、ハンチントン病、アルツハイマー病、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、筋萎縮性側索硬化症およびパーキンソン病から選択される、請求項 45 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 47】

少なくとも 1 つの miRNA が、アミロイド前駆体タンパク質（APP）、プレセニン 1、プレセニン 2、ABCA7、SORL1、およびそれらの疾患関連対立遺伝子に相補的なシード配列を含む、請求項 41～46 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 48】

少なくとも 1 つの miRNA が、SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PIN1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、GBA1、およびそれらの疾患関連対立遺伝子に相補的なシード配列を含む、請求項 41～46 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 49】

少なくとも 1 つの miRNA が、配列番号 4 に相補的なシード配列を含むか、または少

10

20

30

40

50

なくとも1つのmiRNAが、miRNA骨格配列に隣接した配列番号6～17、40～44、もしくは50～66のうちのいずれか1つの配列を含む、請求項41～46のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項50】

なくとも1つのmiRNAが、配列番号6～17、40～44、または50～66のうちのいずれか1つの配列を含む、請求項41～46のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項51】

前記miRNAのうちの少なくとも1つが、ヒトハンチンチンとハイブリダイズし、その発現を阻害する、請求項49～50のいずれかに記載の組成物または組合せ。

10

【請求項52】

前記対象が、36よりも多くのCAGリピート、40よりも多くのリピート、または100よりも多くのリピートを有するハンチンチン遺伝子を含む、請求項49～51のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項53】

前記対象が、20歳未満である、請求項49～52のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項54】

前記組換えウイルスベクターが、AAVベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、およびキメラウイルスベクターからなる群から選択される、請求項42～53のいずれかに記載の組成物または組合せ。

20

【請求項55】

(a)を含む前記組換えウイルスベクターが、(b)を含む前記組換えウイルスベクターと同じである、請求項42～54のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項56】

(a)および(b)の前記単離された核酸が、別々の組換えウイルスベクターに含まれる、請求項41～54のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項57】

(a)および(b)の前記単離された核酸が、同じ組換えウイルスベクターに含まれる、請求項41～55のいずれかに記載の組成物または組合せ。

30

【請求項58】

(a)および(b)が、実質的に同じ時に投与される、請求項41～57のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項59】

(a)および(b)が、異なる時点で投与される、請求項41～54および56のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項60】

前記異なる時点が、少なくとも1分、少なくとも1時間、少なくとも1日、少なくとも1週間、少なくとも1か月、少なくとも1年、またはそれよりも長く離れている、請求項59に記載の組成物または組合せ。

40

【請求項61】

(a)が、(b)の投与の前に投与される、請求項59～60のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項62】

(b)が、(a)の投与の前に投与される、請求項59～60のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項63】

(a)、(b)、または(a)および(b)の投与が、少なくとも1回繰り返される、

50

請求項 59 ~ 60 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 64】

前記導入遺伝子が、イントロンに隣接する 2 つの miRNA をタンデムで含む、請求項 41 ~ 65 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 65】

前記隣接しているイントロンが、同一である、請求項 64 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 66】

前記隣接しているイントロンが、同じ種由来である、請求項 64 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 67】

前記隣接しているイントロンが、hCG イントロンである、請求項 64 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 68】

前記導入遺伝子が、プロモーターを含む、請求項 41 ~ 67 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 69】

前記プロモーターが、シナプシン (Syn1) プロモーター、または表 10 ~ 13 のプロモーターである、請求項 68 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 70】

前記 1 つまたは複数の miRNA が、前記導入遺伝子の非翻訳部分に位置する、請求項 41 ~ 69 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 71】

前記非翻訳部分が、イントロンである、請求項 70 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 72】

前記非翻訳部分が、タンパク質をコードする核酸配列の最後のコドンとポリ A テール配列との間、またはプロモーター配列の最後のヌクレオチド塩基とポリ A テール配列との間にある、請求項 70 に記載の組成物または組合せ。

【請求項 73】

第 2 のアデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復配列 (ITR)、またはそのバリエーションを含む第 3 の領域をさらに含む、請求項 41 ~ 72 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 74】

前記 ITR バリエーションが、機能的末端分離部位 (TRS) を欠き、必要に応じて前記 ITR バリエーションが、ATRS ITR である、請求項 41 ~ 73 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 75】

前記投与が、前記ウイルスベクターまたは単離された核酸の前記対象の中樞神経系 (CNS) への送達をもたらす、請求項 41 ~ 74 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 76】

前記投与が、注射、必要に応じて静脈内注射または線条体内注射による、請求項 41 ~ 75 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 77】

前記ウイルスベクターが、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはそれらのキメラである、請求項 42 ~ 76 のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項 78】

前記ウイルスベクターが、AAV 血清型 AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくは AAV12、またはそれらのキメラ由来のカプシドタンパク質を含む、請求項 42 ~ 7

10

20

30

40

50

7のいずれかに記載の組成物。

【請求項79】

前記カプシドタンパク質が、AAV9カプシドタンパク質である、請求項78に記載の組成物または組合せ。

【請求項80】

前記ウイルスベクターが、自己相補的AAV(scAAV)である、請求項42～79のいずれかに記載の組成物または組合せ。

【請求項81】

前記ウイルスベクターが、中枢神経系(CNS)への送達のために製剤化されている、請求項42～80のいずれかに記載の組成物または組合せ。

10

【請求項82】

CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む組成物であって、前記核酸が、配列番号110に対して少なくとも80%同一、または配列番号111に対して少なくとも80%同一、または配列番号153に対して少なくとも80%同一の配列を含む、組成物。

【請求項83】

CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む組換えウイルスベクターを含む組成物であって、前記核酸が、配列番号110に対して少なくとも80%同一、または配列番号111に対して少なくとも80%同一、または配列番号153に対して少なくとも80%同一の配列を含む、組成物。

20

【請求項84】

処置を必要とする対象における神経疾患または障害を処置するための方法であって、前記方法が、治療有効量の請求項82または83に記載の組成物を、前記神経疾患または障害を有するか、またはそれを発生するリスクがある対象に投与することを含む、方法。

【請求項85】

前記神経疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナバン病、リー病、脊髄性大脳性運動失調症、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、クラッペ病、バッテン病、レフサム病、トゥレット症候群、原発性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、進行性筋萎縮症、ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ピンスワンガー病、神経障害性疼痛、脊髄および頭部傷害に起因する外傷、眼疾患および障害、テイ-サックス病、レッシュ-ナイハン症候群、てんかん、脳梗塞、うつ病、双極性感情障害、持続性感情障害、統合失調症、統合失調症、薬物依存症、神経症、精神病、認知症、妄想症、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛性障害、摂食または体重障害である、請求項84に記載の方法。

30

【請求項86】

前記神経疾患または障害が、中枢神経系(CNS)疾患または障害である、請求項84～85のいずれかに記載の方法。

【請求項87】

前記CNS疾患または障害が、ハンチントン病、アルツハイマー病、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、筋萎縮性側索硬化症およびパーキンソン病から選択される、請求項84～86のいずれかに記載の方法。

40

【請求項88】

前記組換えウイルスベクターが、AAVベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ボックスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、およびキメラウイルスベクターからなる群から選択される、請求項83～87のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項89】

前記投与が、少なくとも1回繰り返される、請求項84～88のいずれかに記載の方法

50

【請求項 90】

前記投与が、前記ウイルスベクターまたは単離された核酸の前記対象の中樞神経系（CNS）への送達をもたらす、請求項 84～89 のいずれかに記載の方法。

【請求項 91】

前記投与が、注射、必要に応じて静脈内注射または線条体内注射による、請求項 84～90 のいずれかに記載の方法。

【請求項 92】

前記ウイルスベクターが、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12、またはそれらのキメラである、請求項 83～91 のいずれかに記載の組成物または方法 10

【請求項 93】

ウイルスベクターが、AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12、またはそれらのキメラ由来のカプシドタンパク質を含む、請求項 83～92 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 94】

前記カプシドタンパク質が、AAV9カプシドタンパク質である、請求項 93 に記載の組成物または方法。

【請求項 95】

前記ウイルスベクターが、自己相補的AAV（scAAV）である、請求項 83～94 のいずれかに記載の組成物または方法。 20

【請求項 96】

前記ウイルスベクターが、中樞神経系（CNS）への送達のために製剤化されている、請求項 83～95 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 97】

前記核酸が、配列番号 110 に対して少なくとも 90% 同一の配列を含む、請求項 82～96 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 98】

前記核酸が、配列番号 110 に対して少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 82～96 のいずれかに記載の組成物または方法。 30

【請求項 99】

前記核酸が、配列番号 110 と同一の配列を含む、請求項 82～96 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 100】

前記ウイルスベクターが、改変されたウイルスカプシドを含む、請求項 2～40、42～81、83～99 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 101】

前記ウイルスベクターが、ウイルスカプシドに対する改変を含む、請求項 2～40、42～81、83～99 のいずれかに記載の組成物または方法。 40

【請求項 102】

前記改変が、前記ウイルスカプシドの化学的改変、非化学的改変またはアミノ酸改変である、請求項 100 または 101 に記載の組成物または方法。

【請求項 103】

前記カプシド改変のうちの少なくとも 1 つが、CNS または PNS における細胞を優先的に標的にする、請求項 100 または 101 に記載の組成物または方法。

【請求項 104】

化学的改変が、共有結合的に連結された単糖または多糖部分を含むように改変された化学的に改変されたチロシン残基を含む、請求項 100 または 101 に記載の組成物または方法。 50

【請求項 105】

前記化学的に改変されたチロシン残基が、ガラクトース、マンノース、N - アセチルガラクトサミン、架橋 Gal Na c、およびマンノース - 6 - リン酸から選択される単糖を含む、請求項 104 に記載の組成物または方法。

【請求項 106】

化学的改変が、- C S N H - 結合を介してカプシドポリペプチドの第 1 級アミノ基に共有結合的に連結されたりガンドを含む、請求項 100 または 101 に記載の組成物または方法。

【請求項 107】

前記リガンドが、前記リガンドに共有結合したアリーレンまたはヘテロアリーレンラジカルを含む、請求項 106 に記載の組成物または方法。 10

【請求項 108】

前記改変されたウイルスカプシドが、キメラカプシドまたは単数体カプシドである、請求項 100 ~ 107 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 109】

前記改変されたウイルスカプシドが、単数体カプシドである、請求項 100 ~ 107 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 110】

前記改変されたウイルスカプシドが、改変をさらに含むキメラカプシドまたは単数体カプシドである、請求項 100 ~ 107 のいずれかに記載の組成物または方法。 20

【請求項 111】

前記改変されたウイルスカプシドが、A A V 血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 3 b、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、またはそれらの突然変異改変形態、キメラ、モザイク、もしくは有理単数体由来である、請求項 100 ~ 110 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 112】

前記改変が、改変されていないウイルスカプシドと比較して、前記改変されたウイルスカプシドの抗原性プロファイルを変化させる、請求項 100 ~ 111 のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項 113】

前記改変されたウイルスカプシドが、反復投与のために使用され得る、請求項 100 ~ 112 のいずれかに記載の組成物または方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2020年9月21日に出願された米国仮出願第63/080,925号、2020年12月3日に出願された米国仮出願第63/121,152号、2021年1月20日に出願された米国仮出願第63/139,410号、2021年1月22日に出願された米国仮出願第63/140,440号、2021年4月27日に出願された米国仮出願第63/180,407号に基づき、米国特許法第119条(e)項の下での利益を主張し、それらのそれぞれの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。 40

【0002】

技術分野

本明細書に記載される技術は、神経疾患または障害、例えば、ハンチントン病を処置するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

ハンチントン病（HD）は、ハンチンチン遺伝子のエクソン1におけるCAGリピート領域の伸長によって引き起こされる破壊的な遺伝性神経変性疾患である。ハンチンチンタンパク質（HTT）は、身体全体にわたって発現されるが、ポリグルタミン伸長タンパク質は、線条体における中型有棘ニューロンおよびそれらの皮質接続に対して特に毒性である。患者は、うつおよび不安を含む情動性症状ならびに特徴的な運動障害および舞踏病と戦っている。現在、ハンチントン病に対する治療法は存在せず、治療選択肢は、疾患症状を改善することに限定されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

要旨

本明細書に提供される一態様は、処置を必要とする対象における神経疾患または障害を処置するための方法であって、方法が、治療有効量の（a）少なくとも1つのmiRNAをコードする核酸、および（b）CYP46A1タンパク質をコードする核酸を、神経疾患または障害を有するか、またはそれを発生するリスクがある対象に投与することを含む、方法を記載する。

【0005】

一態様では、（a）1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸、および（b）CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む組成物または組合せが本明細書に記載される。一態様では、（a）（i）第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復配列（ITR）またはそのバリエーションを含む第1の領域、および（ii）1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子を含む第2の領域を含む単離された核酸を含む組換えウイルスベクター、ならびに（b）CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む組換えウイルスベクターを含む組成物または組合せが本明細書に記載される。

【0006】

一態様では、処置を必要とする対象における神経疾患または障害を処置するための方法であって、方法が、治療有効量の（a）1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸、および（b）CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を、神経疾患または障害を有するか、またはそれを発生するリスクがある対象に投与することを含む、方法が本明細書に記載される。一態様では、処置を必要とする対象における神経疾患または障害を処置するための方法であって、方法が、治療有効量の（a）（i）第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復配列（ITR）またはそのバリエーションを含む第1の領域、および（ii）1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子を含む第2の領域を含む単離された核酸を含む組換えウイルスベクター、ならびに（b）CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む組換えウイルスベクターを、神経疾患または障害を有するか、またはそれを発生するリスクがある対象に投与することを含む、方法が本明細書に記載される。

【0007】

一部の実施形態では、神経疾患または障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナバン病、リー病、脊髄性大脳性運動失調症、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、クラッペ病、パッテン病、レフサム病、トゥレット症候群、原発性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、進行性筋萎縮症、ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ピンスワンガー病、神経障害性疼痛、脊髄および頭部傷害に起因する外傷、眼疾患および障害、テイ・サックス病、レッシュ・ナイハン症候群、てんかん、脳梗塞、うつ病、双極性感情障害、持続性感情障害、続発性気分障害、統合失調症、薬物依存症、神経症、精神病、認知症、妄想症、注意欠陥障害、精神学的障害、睡眠障害、疼痛性障害、摂食または体重障害である。一部の実施形態では、神経疾患または障害は、中枢神経系（CNS）疾患または障害である。一部の実施形態では、CNS疾患または障害は、ハンチントン病、アルツハイマー病、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、筋萎

10

20

30

40

50

縮性側索硬化症およびパーキンソン病から選択される。

【0008】

一部の実施形態では、CNS疾患または障害は、アルツハイマー病であり、少なくとも1つのmiRNAは、アミロイド前駆体タンパク質（APP）、プレセニリン1、プレセニリン2、ABCA7、SORL1、およびそれらの疾患関連対立遺伝子に相補的なシード配列を含む。

【0009】

一部の実施形態では、CNS疾患または障害は、パーキンソン病であり、少なくとも1つのmiRNAは、SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、GBA1、およびそれらの疾患関連対立遺伝子に相補的なシード配列を含む。

【0010】

一部の実施形態では、CNS疾患は、ハンチントン病であり、少なくとも1つのmiRNAは、配列番号4に相補的なシード配列を含むか、または少なくとも1つのmiRNAは、miRNA骨格配列に隣接した配列番号6~17、40~44、もしくは50~66のうちのいずれか1つの配列を含む。一部の実施形態では、CNS疾患は、ハンチントン病であり、少なくとも1つのmiRNAは、配列番号6~17、40~44、または50~66のうちのいずれか1つの配列を含む。一部の実施形態では、miRNAのうちの少なくとも1つは、ヒトハンチンチンとハイブリダイズし、その発現を阻害する。一部の実施形態では、対象は、36よりも多くのCAGリピート、40よりも多くのリピート、または100よりも多くのリピートを有するハンチンチン遺伝子を含む。一部の実施形態では、対象は、20歳未満である。

【0011】

一部の実施形態では、組換えウイルスベクターは、AAVベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、およびキメラウイルスベクターからなる群から選択される。

【0012】

一部の実施形態では、(a)を含む組換えウイルスベクターは、(b)を含む組換えウイルスベクターと同じである。一部の実施形態では、(a)および(b)の単離された核酸は、別々の組換えウイルスベクターに含まれる。一部の実施形態では、(a)および(b)の単離された核酸は、同じ組換えウイルスベクターに含まれる。

【0013】

一部の実施形態では、(a)および(b)は、実質的に同じ時に投与される。一部の実施形態では、(a)および(b)は、異なる時点で投与される。一部の実施形態では、異なる時点は、少なくとも1分、少なくとも1時間、少なくとも1日、少なくとも1週間、少なくとも1か月、少なくとも1年、またはそれよりも長く離れている。一部の実施形態では、(a)は、(b)の投与の前に投与される。一部の実施形態では、(b)は、(a)の投与の前に投与される。一部の実施形態では、(a)、(b)、または(a)および(b)の投与は、少なくとも1回繰り返される。

【0014】

一部の実施形態では、導入遺伝子は、イントロンに隣接する2つのmiRNAをタンデムで含む。一部の実施形態では、隣接しているイントロンは、同一である。一部の実施形態では、隣接しているイントロンは、同じ種由来である。一部の実施形態では、隣接しているイントロンは、hCGイントロンである。

【0015】

一部の実施形態では、導入遺伝子は、プロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、シナプシン(Syn1)プロモーター、または表10~13のプロモーターである。

【0016】

一部の実施形態では、1つまたは複数のmiRNAは、導入遺伝子の非翻訳部分に位置する。一部の実施形態では、非翻訳部分は、イントロンである。一部の実施形態では、非翻訳部分は、タンパク質をコードする核酸配列の最後のコドンとポリAテール配列との間、またはプロモーター配列の最後のヌクレオチド塩基とポリAテール配列との間にある。一部の実施形態では、非翻訳部分は、5'非翻訳領域(5'UTR)である。

【0017】

一部の実施形態では、核酸またはウイルスベクターは、第2のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復配列(ITR)、またはそのバリエーションを含む第3の領域をさらに含む。

【0018】

一部の実施形態では、ITRバリエーションは、機能的末端分離部位(TRS)を欠き、必要に応じてITRバリエーションは、ATRS ITRである。

【0019】

一部の実施形態では、投与は、ウイルスベクターまたは単離された核酸の対象の中樞神経系(CNS)への送達をもたらす。一部の実施形態では、投与は、注射、必要に応じて静脈内注射または線条体内注射による。

【0020】

一部の実施形態では、ウイルスベクターは、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12、またはそれらのキメラである。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12、またはそれらのキメラ由来のカプシドタンパク質を含む。一部の実施形態では、カプシドタンパク質は、AAV9カプシドタンパク質である。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、自己相補的AAV(scAAV)である。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、中樞神経系(CNS)への送達のために製剤化されている。

【0021】

態様のいずれかの一部の実施形態では、ウイルスベクターは、改変されたウイルスカプシドを含む。

【0022】

態様のいずれかの一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ウイルスカプシドに対する改変を含む。

【0023】

態様のいずれかの一部の実施形態では、改変は、ウイルスカプシドの化学的改変、非化学的改変またはアミノ酸改変である。

【0024】

態様のいずれかの一部の実施形態では、カプシド改変のうちの少なくとも1つは、CNSまたはPNSにおける細胞を優先的に標的にする。

【0025】

態様のいずれかの一部の実施形態では、化学的改変は、共有結合的に連結された単糖または多糖部分を含むように改変された化学的に改変されたチロシン残基を含む。

【0026】

態様のいずれかの一部の実施形態では、化学的に改変されたチロシン残基は、ガラクトース、マンノース、N-アセチルガラクトサミン、架橋Galnac、およびマンノース-6-リン酸から選択される単糖を含む。

【0027】

態様のいずれかの一部の実施形態では、化学的改変は、-CSNH-結合を介してカプシドポリペプチドの第1級アミノ基に共有結合的に連結されたリガンドを含む。

【0028】

態様のいずれかの一部の実施形態では、リガンドは、リガンドに共有結合したアリーレ

10

20

30

40

50

ンまたはヘテロアリーレンラジカルを含む。

【0029】

態様のいずれかの一部の実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、キメラカプシドまたは単数体カプシドである。

【0030】

態様のいずれかの一部の実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、単数体カプシドである。

【0031】

態様のいずれかの一部の実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、改変をさらに含むキメラカプシドまたは単数体カプシドである。

10

【0032】

態様のいずれかの一部の実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはそれらの突然変異改変形態、キメラ、モザイク、もしくは有理単数体 (rational haploid) である。

【0033】

態様のいずれかの一部の実施形態では、改変は、改変されていないウイルスカプシドと比較して、改変されたウイルスカプシドの抗原性プロファイルを変化させる。

【0034】

態様のいずれかの一部の実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、反復投与のために使用され得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、pJAL130-CYP46A1、7314bpのHDプラスミドマップを示す概略図であり、例えば、配列番号111および表16を参照されたく、これは、プラスミドからCYP46パリアント配列 (例えば、配列番号110を参照されたい) のITR-ITR配列を示す。

【0036】

【図2】図2は、脳室内 (ICV) および静脈内 (IV) 注射によって送達されたCNS-1 (例えば、配列番号112を参照されたい)、CNS-2 (例えば、配列番号113を参照されたい)、CNS-3 (例えば、配列番号114を参照されたい)、CNS-4 (例えば、配列番号115を参照されたい)、CNS-5 (例えば、配列番号122を参照されたい)、CNS-6 (例えば、配列番号123を参照されたい)、CNS-7 (例えば、配列番号124を参照されたい) およびCNS-8 (例えば、配列番号125を参照されたい)、ならびに対照プロモーターhSyn1 (例えば、配列番号152を参照されたい) の制御下の導入遺伝子GFPの矢状断面における頭蓋内の生体内分布を示す。スケールバーは1mmである。

30

【0037】

【図3A】図3A~3Bは、冠状脳断面の画像を示す。図3Aは、ICVによって送達されたCNS-1 (例えば、配列番号112を参照されたい)、CNS-2 (例えば、配列番号113を参照されたい)、CNS-3 (例えば、配列番号114を参照されたい) およびCNS-4 (例えば、配列番号115を参照されたい) の制御下の導入遺伝子GFPの冠状断面における頭蓋内の生体内分布を示す。スケールバーは1mmである。図3Bは、ICVによって送達されたCNS-5 (例えば、配列番号122を参照されたい)、CNS-6 (例えば、配列番号123を参照されたい)、CNS-7 (例えば、配列番号124を参照されたい) およびCNS-8 (例えば、配列番号125を参照されたい)、ならびに対照プロモーターhSyn1 (例えば、配列番号152を参照されたい) の制御下の導入遺伝子GFPの冠状断面における頭蓋内の生体内分布を示す。スケールバーは1mmである。

40

【図3B】図3A~3Bは、冠状脳断面の画像を示す。図3Aは、ICVによって送達さ

50

れた CNS - 1 (例えば、配列番号 1 1 2 を参照されたい)、CNS - 2 (例えば、配列番号 1 1 3 を参照されたい)、CNS - 3 (例えば、配列番号 1 1 4 を参照されたい) および CNS - 4 (例えば、配列番号 1 1 5 を参照されたい) の制御下の導入遺伝子 GFP の冠状断面における頭蓋内の生体内分布を示す。スケールバーは 1 mm である。図 3 B は、ICV によって送達された CNS - 5 (例えば、配列番号 1 2 2 を参照されたい)、CNS - 6 (例えば、配列番号 1 2 3 を参照されたい)、CNS - 7 (例えば、配列番号 1 2 4 を参照されたい) および CNS - 8 (例えば、配列番号 1 2 5 を参照されたい)、ならびに対照プロモーター hSyn1 (例えば、配列番号 1 5 2 を参照されたい) の制御下の導入遺伝子 GFP の冠状断面における頭蓋内の生体内分布を示す。スケールバーは 1 mm である。

10

【0038】

【図 4 - 1】図 4 は、CNS 1 ~ 8 (例えば、配列番号 1 1 2 ~ 1 1 5、1 2 2 ~ 1 2 5 を参照されたい) またはシナプシン - 1 (例えば、配列番号 1 5 2 を参照されたい) によって駆動された GFP の ICV または IV 送達後の異なる脳領域における GFP 免疫反応性パーセンテージを示す。データは、皮質、海馬、線条体、中脳および小脳における限界値分析による GFP 染色強度の 10 の非重複 RGB 画像の定量的測定によって得られた (平均 ± SEM)。画像は、一定の設定を保って別個の脳領域にわたり、40 倍の倍率で取得した。フォアグラウンド免疫染色を、最高のシグナルおよび最低のシグナルの平均によって定義した。データを、目的のそれぞれの領域についての 1 視野あたりの免疫反応性の領域の平均パーセンテージとして表す (n = 3)。ICV 送達により、発現は、皮質および海馬の脳領域において最も高い。CNS 1 ~ 8 (例えば、配列番号 1 1 2 ~ 1 1 5、1 2 2 ~ 1 2 5 を参照されたい) は、hSyn1 対照よりも、海馬においてより高い発現を示す。CNS - 1 (例えば、配列番号 1 1 2 を参照されたい) は、ICV 送達による hSyn1 と比較して、海馬、中脳および小脳においてより高い発現を示す。

20

【図 4 - 2】図 4 は、CNS 1 ~ 8 (例えば、配列番号 1 1 2 ~ 1 1 5、1 2 2 ~ 1 2 5 を参照されたい) またはシナプシン - 1 (例えば、配列番号 1 5 2 を参照されたい) によって駆動された GFP の ICV または IV 送達後の異なる脳領域における GFP 免疫反応性パーセンテージを示す。データは、皮質、海馬、線条体、中脳および小脳における限界値分析による GFP 染色強度の 10 の非重複 RGB 画像の定量的測定によって得られた (平均 ± SEM)。画像は、一定の設定を保って別個の脳領域にわたり、40 倍の倍率で取得した。フォアグラウンド免疫染色を、最高のシグナルおよび最低のシグナルの平均によって定義した。データを、目的のそれぞれの領域についての 1 視野あたりの免疫反応性の領域の平均パーセンテージとして表す (n = 3)。ICV 送達により、発現は、皮質および海馬の脳領域において最も高い。CNS 1 ~ 8 (例えば、配列番号 1 1 2 ~ 1 1 5、1 2 2 ~ 1 2 5 を参照されたい) は、hSyn1 対照よりも、海馬においてより高い発現を示す。CNS - 1 (例えば、配列番号 1 1 2 を参照されたい) は、ICV 送達による hSyn1 と比較して、海馬、中脳および小脳においてより高い発現を示す。

30

【図 4 - 3】図 4 は、CNS 1 ~ 8 (例えば、配列番号 1 1 2 ~ 1 1 5、1 2 2 ~ 1 2 5 を参照されたい) またはシナプシン - 1 (例えば、配列番号 1 5 2 を参照されたい) によって駆動された GFP の ICV または IV 送達後の異なる脳領域における GFP 免疫反応性パーセンテージを示す。データは、皮質、海馬、線条体、中脳および小脳における限界値分析による GFP 染色強度の 10 の非重複 RGB 画像の定量的測定によって得られた (平均 ± SEM)。画像は、一定の設定を保って別個の脳領域にわたり、40 倍の倍率で取得した。フォアグラウンド免疫染色を、最高のシグナルおよび最低のシグナルの平均によって定義した。データを、目的のそれぞれの領域についての 1 視野あたりの免疫反応性の領域の平均パーセンテージとして表す (n = 3)。ICV 送達により、発現は、皮質および海馬の脳領域において最も高い。CNS 1 ~ 8 (例えば、配列番号 1 1 2 ~ 1 1 5、1 2 2 ~ 1 2 5 を参照されたい) は、hSyn1 対照よりも、海馬においてより高い発現を示す。CNS - 1 (例えば、配列番号 1 1 2 を参照されたい) は、ICV 送達による hSyn1 と比較して、海馬、中脳および小脳においてより高い発現を示す。

40

50

【 0 0 3 9 】

【図 5 A】図 5 A ~ 5 B は、CNS - 5、CNS - 5__v 2、CNS - 2、CNS - 3 および CNS - 4 由来の CRE / 近位プロモーターが設計された *f a f 1* および *p i t x 3* 遺伝子についての組織発現パターンを示す。図 5 A は、単一細胞トランスクリプトミクスデータ (Zeisel et al., 2018) からのマウス PNS ニューロンにおける *f a f 1* 遺伝子の発現パターンを示す。濃い灰色は、高い発現を示し、白色は、発現なしを示し、薄い灰色は、低い発現を示す。*f a f 1* は、多くの PNS ニューロンにおいて発現される。図 5 B は、単一細胞トランスクリプトミクスデータ (Zeisel et al., 2018) からの PNS ニューロンにおける *p i t x 3* 遺伝子の発現パターンを示す。濃い灰色は、高い発現を示し、白色は、発現なしを示し、薄い灰色は、低い発現を示す。*p i t x 3* は、交感神経 PNS ニューロンにおいて発現される。*f a f 1* は、多くの PNS ニューロンにおいて発現され、したがって、*f a f 1* 遺伝子から設計された CRE または近位プロモーターを含む合成プロモーター、例えば、CNS - 5 および CNS - 5__v 2 は、PNS における強い発現を有すると予想される。*p i t x 3* は、交感神経 PNS ニューロンにおいて発現され、したがって、*p i t x 3* 遺伝子から設計された CRE を含む合成プロモーター、例えば、CNS - 2、CNS - 3 または CNS - 4 は、PNS 交感神経ニューロンにおける発現を有すると予想される。*l m x 1 b* および *p i t x 2* についての類似の分析は、分析 (0.95 未満の *t r i n i z a t i o n* スコア; データを示さない) について、カットオフスコアを上回る PNS における発現を見せず、したがって、CNS - 1、CNS - 6、CNS - 6__v 2、CNS - 7、CNS - 7__v 2、CNS - 8 および CNS - 8__v 2 は、PNS ニューロンにおいて活性であるとは予想されない。

10

20

【図 5 B】図 5 A ~ 5 B は、CNS - 5、CNS - 5__v 2、CNS - 2、CNS - 3 および CNS - 4 由来の CRE / 近位プロモーターが設計された *f a f 1* および *p i t x 3* 遺伝子についての組織発現パターンを示す。図 5 A は、単一細胞トランスクリプトミクスデータ (Zeisel et al., 2018) からのマウス PNS ニューロンにおける *f a f 1* 遺伝子の発現パターンを示す。濃い灰色は、高い発現を示し、白色は、発現なしを示し、薄い灰色は、低い発現を示す。*f a f 1* は、多くの PNS ニューロンにおいて発現される。図 5 B は、単一細胞トランスクリプトミクスデータ (Zeisel et al., 2018) からの PNS ニューロンにおける *p i t x 3* 遺伝子の発現パターンを示す。濃い灰色は、高い発現を示し、白色は、発現なしを示し、薄い灰色は、低い発現を示す。*p i t x 3* は、交感神経 PNS ニューロンにおいて発現される。*f a f 1* は、多くの PNS ニューロンにおいて発現され、したがって、*f a f 1* 遺伝子から設計された CRE または近位プロモーターを含む合成プロモーター、例えば、CNS - 5 および CNS - 5__v 2 は、PNS における強い発現を有すると予想される。*p i t x 3* は、交感神経 PNS ニューロンにおいて発現され、したがって、*p i t x 3* 遺伝子から設計された CRE を含む合成プロモーター、例えば、CNS - 2、CNS - 3 または CNS - 4 は、PNS 交感神経ニューロンにおける発現を有すると予想される。*l m x 1 b* および *p i t x 2* についての類似の分析は、分析 (0.95 未満の *t r i n i z a t i o n* スコア; データを示さない) について、カットオフスコアを上回る PNS における発現を見せず、したがって、CNS - 1、CNS - 6、CNS - 6__v 2、CNS - 7、CNS - 7__v 2、CNS - 8 および CNS - 8__v 2 は、PNS ニューロンにおいて活性であるとは予想されない。

30

40

【 0 0 4 0 】

【図 6 A】図 6 A は、成体マウスの脳からの矢状断面における *H T T* 遺伝子の発現パターンを示す (Allen Mouse brain atlas から取得; mouse.brain-map.org)。H T T (ハンチンチン) は、脳全体にわたって高度に発現される。

【 0 0 4 1 】

【図 6 B】図 6 B は、成体マウスの脳からの冠状断面における *C Y P 4 6 A 1* 遺伝子の発現パターンを示す (Allen Mouse brain atlas から取得; mouse.brain-map.org)。C Y P 4 6 A 1 は、脳において広く発現される。

【 0 0 4 2 】

50

【図 7 A】図 7 A は、神経芽細胞腫由来 SH - SY 5 Y 細胞における対照プロモーター CAG と比べた、合成 NS 特異的プロモーターの SP 0 0 1 3、SP 0 0 1 4、SP 0 0 3 0、SP 0 0 3 1、SP 0 0 3 2、SP 0 0 1 9、SP 0 0 2 0、SP 0 0 2 1、SP 0 0 2 2、SP 0 0 1 1、SP 0 0 3 4、SP 0 0 3 5、SP 0 0 3 6、および対照プロモーターのシナプシン - 1 の GFP 発現中央値を示す。NTC は、トランスフェクトされていない細胞を示す。データは、3 つの生物学的反復から収集し、それらのそれぞれは、2 つの技術的反復の平均である。エラーバーは標準誤差である。

【 0 0 4 3 】

【図 7 B】図 7 B は、GFP に作動可能に連結された、合成 NS 特異的プロモーターの SP 0 0 1 3、SP 0 0 1 4、SP 0 0 3 0、SP 0 0 3 1、SP 0 0 3 2、SP 0 0 1 9、SP 0 0 2 0、SP 0 0 2 1、SP 0 0 2 2、SP 0 0 1 1、SP 0 0 3 4、SP 0 0 3 5、SP 0 0 3 6、または対照プロモーターのシナプシン - 1 および CAG をトランスフェクトされた場合の神経芽細胞腫由来 SH - SY 5 Y 細胞におけるトランスフェクション効率を示す。NTC は、トランスフェクトされていない細胞を示す。データは、3 つの生物学的反復から収集し、それらのそれぞれは、2 つの技術的反復の平均である。エラーバーは標準誤差である。GFP 陽性 % は、GFP 陽性であったすべての細胞の % を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 4 】

詳細な説明

本発明の態様は、対象に送達された場合に、対象における病原遺伝子の発現を低減するのに有効である干渉 RNA (例えば、人工 miRNA などの miRNA)、および CYP 4 6 A 1 タンパク質をコードする核酸の両方の投与に関する。したがって、本開示によって記載される方法および組成物は、一部の実施形態では、神経疾患または障害の処置のために、有用である。

20

処置方法

【 0 0 4 5 】

核酸および / または導入遺伝子 (例えば、miRNA などの阻害性 RNA、および / または CYP 4 6 A 1 をコードする核酸) を対象に送達するための方法が、本開示によって提供される。方法は、典型的には、有効量の、標的遺伝子、例えば、神経疾患または障害 (例えば、ハンチンチン (htt) タンパク質) に関連する病原遺伝子の発現を低減することができる少なくとも 1 つの干渉 RNA をコードする核酸 / 阻害性核酸、および CYP 4 6 A 1 をコードする核酸を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、核酸の一方または両方は、ウイルスベクター中、および / またはウイルス粒子、例えば、rAAV 中で提供される。

30

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される場合、「神経疾患または障害」は、神経系に影響を及ぼすか、またはそれに関連する任意の疾患、障害または状態、すなわち、中枢神経系 (脳および脊髄) および末梢神経系 (PNS; 例えば、末梢神経および脳神経)、ならびに自律神経系 (中枢神経系および末梢神経系の両方に位置するその部分) に影響を及ぼすものを指し得る。600 よりも多くの神経疾患が、ヒトにおいて特定されている。非限定的な例では、神経疾患または障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナパン病、リー病、脊髄性大脳性運動失調症、ポリグルタミンリピート脊髄小脳失調症、クラッペ病、バッテン病、レフサム病、トゥレット症候群、原発性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、進行性筋萎縮症、ピック病、ニーマン - ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ピンスワンガー病、脊髄および頭部傷害に起因する外傷、眼疾患および障害、テイ - サックス病、レット症候群、神経障害性疼痛、レッシュ - ナイハン症候群、てんかん、脳梗塞、うつ病、双極性感情障害、持続性感情障害、続発性気分障害、統合失調症、薬物依存症、神経症、精神病、認知症、妄想症、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛性障害、および / または摂食もしくは体重障害であり得る。一部の実施形態では、神経疾患または障害は、中枢神経系 (CNS) 疾患または障害、例えば、ハンチン

40

50

トン病、パーキンソン病またはアルツハイマー病である。

【0047】

本明細書で使用される場合、「ハンチントン病」または「HD」は、病原性突然変異体ハンチンチンタンパク質（HTT、またはmHTT）の産生をもたらすHTT遺伝子におけるトリヌクレオチドリPEAT伸長（例えば、CAG、これはポリグルタミントラクトまたはポリQトラクトに翻訳される）によって引き起こされる、進行的に悪化する運動、認知および行動の変化によって特徴付けられる神経変性疾患を指す。

【0048】

本明細書で使用される場合、「HTT」または「ハンチンチン」は、ハンチンチンタンパク質をコードする遺伝子を指す。正常なハンチンチンタンパク質は、神経細胞において機能し、正常なHTT遺伝子は、通常、5'末端に約7～約35のCAGリピートを有する。HTT遺伝子は、多くの場合、ハンチントン病を有するか、またはハンチントン病を発生するリスクがある患者において突然変異している。一部の実施形態では、突然変異体ハンチンチンタンパク質は、脳のある特定の領域における神経細胞死の速度を速める。一般に、HDの重症度は、対象におけるトリヌクレオチドリPEAT伸長のサイズと相関する。例えば、36～39の間のリピートを含むCAGリピート領域を有する対象は、「低浸透」HDを有するとして特徴付けられる一方、40よりも多くのリピートを有する対象は、「完全浸透」HDを有するとして特徴付けられる。そのため、一部の実施形態では、HDを有するか、またはそれを有するリスクがある対象は、約36～約39の間のCAGリピート（例えば、36、37、38または39のリピート）を含むHTT遺伝子を有する。一部の実施形態では、HDを有するか、またはHDを有するリスクがある対象は、40またはそれよりも多くの（例えば、40、45、50、60、70、80、90、100、200、またはそれよりも多くの）CAGリピートを含むHTT遺伝子を有する。一部の実施形態では、100よりも多くのCAGリピートを含むHTT遺伝子を有する対象は、100よりも少ないCAGリピートを有する対象よりも、より早くHDを発生する。一部の実施形態では、100よりも多くのCAGリピートを含むHTT遺伝子を有する対象は、約20歳の前にHD症状を発生することがあり、若年性HD（無動-固縮HD、またはWestphalバリエーションHDとも称される）を有すると称される。対象のHTT遺伝子の対立遺伝子におけるCAGリピートの数は、当技術分野で公知の任意の好適なモダリティによって決定することができる。例えば、核酸（例えば、DNA）を、対象の生体試料（例えば、血液）から単離することができ、HTT対立遺伝子のCAGリピートの数を、PCRまたは核酸シーケンシング（例えば、Illuminaシーケンシング、サンガーシーケンシング、SMRTシーケンシングなど）などのハイブリダイゼーションに基づく方法によって決定することができる。HTT遺伝子の配列は、いくつかの種、例えば、ヒトHTT（NCBI遺伝子ID：3064）のmRNA配列（NCBI参照配列：NM_002111.8、配列番号4）およびタンパク質配列（NCBI参照配列：NP_002101.2、配列番号5）において公知である。したがって、ハンチントン病の処置に関する一部の実施形態では、1つまたは複数の阻害性核酸（例えば、miRNA）は、HTTとハイブリダイズすることができ、および/またはその発現を低減することができる。

【0049】

本明細書で使用される場合、「アルツハイマー病」または「AD」は、進行的に悪化する記憶、失見当識、気分変動、ならびに言語、動機づけおよびセルフケアでの増加する困難さによって特徴付けられる神経変性疾患を指す。アミロイド前駆体タンパク質（APP；NCBI遺伝子ID：351）、プレセニン1（PSEN1；NCBI遺伝子ID 5663）、プレセニン2（PSEN2；NCBI遺伝子ID 5664）、ATP結合カセットサブファミリーAメンバー7（ABCA7；NCBI遺伝子ID 10347）、およびソテイリン関連受容体1（SORL1；NCBI遺伝子ID 6653）を含むいくつかの遺伝子が、ADに寄与し得るか、またはそのリスクを増加させ得る。そのようなAD関連遺伝子の配列は、いくつかの種において公知であり、例えば、ヒトのmR

10

20

30

40

50

NAおよびタンパク質配列は、提供される遺伝子ID番号を使用して、NCBIデータベースにおいて利用可能である。これらのAD関連遺伝子および他のもの、ならびにそのAD関連対立遺伝子（例えば、突然変異体、SNPなど）は、当技術分野において公知であり、例えば、Sims et al. *Nature Neuroscience* 2020 23:311-22; Bellenquez et al. *Current Opinion in Neurobiology* 2020 61:40-48; Tabuas-Pereira et al. 2020 *Neurogenetics and Psychiatric Genetics* 8:1-16; およびPorter et al. "Neurodegeneration and Alzheimer's Disease" 2019のChapter 15にさらに記載されており、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。したがって、アルツハイマー病の処置に関する一部の実施形態では、1つまたは複数の阻害性核酸（例えば、miRNA）は、APP、PSEN1、PSEN2、ABCA7、および/もしくはSORL1とハイブリダイズすることができ、ならびに/またはその発現を低減することができる。

10

【0050】

本明細書で使用される場合、「パーキンソン病」または「PD」は、進行的に悪化する揺れおよび硬直、ならびにバランス、歩行および協調での増加する問題によって特徴付けられる神経変性疾患を指す。シヌクレインアルファ（SNCA; NCBI遺伝子ID: 6622）、ロイシンリッチリピートキナーゼ2（LRRK2/PARK8; NCBI遺伝子ID 120892）、グルコシルセラミダーゼベータ（GBA1; NCBI遺伝子ID 2629）、パーキンRBR E3ユビキチン（PRKN; NCBI遺伝子ID 5071）、PTEN誘導キナーゼ1（PINK1; NCBI遺伝子ID 65018）、パーキンソニズム関連デグリカーゼ（DJ1/PARK7; NCBI遺伝子ID 11315）、VPS35レトロマー複合体構成要素（VPS35; NCBI遺伝子ID 55737）、真核生物翻訳開始因子4ガンマ1（EIF4G1; NCBI遺伝子ID 1981）、DnaJ熱ショックタンパク質ファミリーメンバーC13（DNAJC13; NCBI遺伝子ID 23317）、コイルドコイルヘリックス-コイルドコイルヘリックスドメイン含有2（CHCHD2; NCBI遺伝子ID 51142）、および/またはユビキチンC末端ヒドロラーゼL1（UCHL1; NCBI遺伝子ID 7345）を含むいくつかの遺伝子が、PDに寄与し得るか、またはそのリスクを増加させ得る。そのようなPD関連遺伝子の配列は、いくつかの種において公知であり、例えば、ヒトのmRNAおよびタンパク質配列は、提供される遺伝子ID番号を使用して、NCBIデータベースにおいて利用可能である。これらのPD関連遺伝子および他のもの、ならびにそのPD関連対立遺伝子（例えば、突然変異体、SNPなど）は、当技術分野において公知であり、例えば、D'Souza et al. *Acta Neuropsychiatrica* 2020 32:10-22; Sardi et al. *Parkinsonism & Related Disorders* 2019 59:32-38; Hardy et al. *Current Opinion in Genetics & Development* 2009 19:254-65; Ferreria et al. *Neurologica* 2017 135:273-84; Jain et al. *Clinical Science* 2005 109:355-64; Fagan et al. *European Journal of Neurology* 2017 24:561-e20; Campelo et al. *Parkinson's Disease* 2017 4318416; およびPorter et al. "Neurodegeneration and Alzheimer's Disease" 2019のChapter 15にさらに記載されており、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。したがって、パーキンソン病の処置に関する一部の実施形態では、1つまたは複数の阻害性核酸（例えば、miRNA）は、SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、および/もしくはGBA1とハイブリダイズすることができ、ならびに/またはその発現を低減することができる。

20

30

40

【0051】

物質の「有効量」は、所望の効果を生じるのに十分な量である。一部の実施形態では、単離された核酸の有効量は、対象の標的組織の十分な数の標的細胞にトランスフェクトする（またはrAAV媒介送達の文脈では感染させる）のに十分な量である。一部の実施形

50

態では、標的組織は、中枢神経系（CNS）組織（例えば、脳組織、脊髄組織、脳脊髄液（CSF）など）である。一部の実施形態では、単離された核酸（例えば、rAAVを介して送達され得るもの）の有効量は、対象において治療利益を有する、例えば、病原遺伝子またはタンパク質（例えば、HTT）の発現を低下させる、対象の寿命を延長させる、対象において疾患の1つまたは複数の症状（例えば、ハンチントン病の症状）を改善するなど十分な量であり得る。有効量は、例えば、対象の種、年齢、体重、健康、および標的にされる組織などの各種の因子に依存し、そのため、本開示の他の箇所に記載されるように、対象および組織の間で変化し得る。

阻害性RNA

【0052】

一部の態様では、本開示は、標的、例えば、ヒトハンチンチンmRNA（例えば、配列番号4）の少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはそれよりも多く）の連続する塩基に特異的に結合する（例えば、それとハイブリダイズする）阻害性核酸、例えば、miRNAを提供する。一部の実施形態では、本開示は、ヒトハンチンチンmRNAのエクソン1（例えば、配列番号3）の少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはそれよりも多く）の連続する塩基に特異的に結合する（例えば、それとハイブリダイズする）阻害性核酸、例えば、miRNAを提供する。本明細書で使用される場合、「連続する塩基」は、互いに（例えば、核酸分子の一部として）共有結合する（例えば、1つまたは複数のホスホジエステル結合など）2つまたはそれよりも多くのヌクレオチド塩基を指す。一部の実施形態では、少なくとも1つのmiRNAは、標的、例えば、配列番号3または4の2つまたはそれよりも多くの（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはそれよりも多くの）連続するヌクレオチド塩基に対して約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%または約100%同一である。一部の実施形態では、阻害性RNAは、配列番号6～17、40～44または50～66のうちのいずれか1つに示される配列を含むか、またはそれによってコードされるmiRNAである。

【0053】

一部の態様では、神経疾患または障害の処置のために使用することができる阻害性RNAが本明細書に記載される。態様のいずれかの一部の実施形態では、阻害性RNAの核酸配列は、配列番号6～17、40～44もしくは50～66、または配列番号3もしくは4と同じ機能（例えば、HTT阻害）を維持する配列番号6～17、40～44もしくは50～66のうちの少なくとも1つの配列に対して少なくとも95%（例えば、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%）同一である配列のうちの1つを含む。

【0054】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、少なくとも1つのmiRNAを含み、それぞれのmiRNAは、配列番号6～17、40～44または50～66のうちのいずれか1つに示される配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、少なくとも1つのmiRNAを含み、それぞれのmiRNAは、miRNA骨格配列に隣接した配列番号6～17、40～44または50～66のうちのいずれか1つに示される配列を含む。

【0055】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、少なくとも1つのmiRNAを含み、それぞれのmiRNAは、配列番号3、4、18～39、または46～49のうちの1つに相補的なシード配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、少なくとも1つのmiRNAを含み、それぞれのmiRNAは、miRNA骨格配列に隣接した配列番号3、4、18～39、または46～49のうちの1つに相補的な

10

20

30

40

50

シード配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、少なくとも1つのmiRNAを含み、それぞれのmiRNAは、配列番号3、4、18~39、または46~49のうちの1つに実質的に相補的なシード配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、少なくとも1つのmiRNAを含み、それぞれのmiRNAは、miRNA骨格配列に隣接した配列番号3、4、18~39、または46~49のうちの1つに実質的に相補的なシード配列を含む。

【0056】

【表1】

表1:配列番号4に実質的に相補的な第1のRNA配列

miRNA 配列	配列番号
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGA-3'	6
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAA-3'	7
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAG-3'	8
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAGG-3'	9
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGC-3'	10

10

【0057】

【表2】

表2:表1に提供される1つまたは複数の第1のRNA配列に実質的に相補的な第2のRNA配列

20

miRNA 配列	配列番号
5'-UCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	11
5'-UUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	12
5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	13
5'-CCUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	14
5'-GCCUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	15
5'-CUUCGAGUCUCAAGUCCUU-3'	16
5'-ACGAGUCCCUCAAGUCCUC-3'	17

30

【0058】

【表3 - 1】

表3 表1および2によって提供されるmiRNAによって標的にされるヒトHTT遺伝子のエクソン1における標的配列

標的配列	配列番号
aaggacuuga gggacucgaa	18
tccaagatgg acggccgctc a	19
ccaagatgga cggccgctca g	20
agatggacgg ccgctcaggt t	21
atggacggcc gctcaggttc t	22
gacggccgct caggttctgc t	23
cggccgctca ggttctgctt t	24
gtgctgagcg gcgcccgcgag t	25
cgccgcgagt cggcccgcagg c	26
accgccatgg cgaccctgga a	27
ccgccatggc gaccctgga a	28
gaaggccttc gagtccctca a	29
cttcgagtcc ctcaagtcct t	30
ccgcccgcgc ctctcagct t	31
gcccctctct cagcttctct a	32

40

50

【表 3 - 2】

tcagccgccg ccgcaggcac a	33
gccgcaggca cagccgctgc t	34
ggcacagccg ctgctgcctc a	35
gccgctgctg cctcagccgc a	36
cggcccggct gtggctgagg a	37
ctgtggctga ggagccgctg c	38
tgtggctgag gagccgctgc a	39

【 0 0 5 9 】

10

一部の実施形態では、miRNAは、配列番号6および11、配列番号7および12、配列番号8および11、配列番号8および16、配列番号8および17、配列番号9および14、または配列番号10および15を含む。

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態では、ベクターは、配列番号40または41の配列を有するpre-miRNAを含む。これらのpre-miRNAは、配列番号8を含むスキファールドを含む。本明細書に開示される代替の第1のRNA配列は、配列番号40および41のいずれかにおいて、配列番号8と置換され得る。

【 0 0 6 1 】

20

一部の実施形態では、ベクターは、配列番号42または43の配列を有するpri-miRNAを含む。配列番号42のpri-miRNAは、配列番号8および16を含むスキファールドを含む。本明細書に開示される代替のRNA配列は、配列番号42において、配列番号8および16と置換され得る。配列番号43および44のpri-miRNAは、配列番号8および17を含むスキファールドを含む。本明細書に開示される代替のRNA配列は、配列番号43および44のいずれかにおいて、配列番号8および17と置換され得る。

【 0 0 6 2 】

【表 4 - 1】

表4:表1および2に提供されるmiRNAを含むpre-miRNAおよびpri-miRNA

30

名称	配列	配列番号
Pre-miR451a	5'- CUUGGAAUGGCAAGGAAGGACUUGAGGGACUCGAAGACGA GUCCUCAAGUCCUCUCUUGCUAUACCCAGA-3'	40
Pre-miR155	5'-UGCUGAAGGACUUGAGGGACUCGAAGGUUUUGGCCACUGACU GACCUUCGAGUCUCAAGUCCUUCAGGA-3'	41
	gcuaagcacu ucguggccgu cgaucguuua aagggaggua gugagucgac caguggaucc uggaggcuug cugaaggcug uaugcugaag gacuugaggg acucgaaggu uuuggccacu gacugaccuu cgagucuaa guccuucagg acacaaggcc uguuacuagc acucacaugg aacaaauggc ccagaucugg ccgcacucga gauaucuaga cccagcuuuc uuguacaaag ugguugauuu agagggcccc egguucgucg au	42
	gcuccugggc aacgugcugg uuauugugcu gucucaucau uuuggcaaag aaauaagggc gaauucgagc ucgguaccuc gcgaaugcau cuagauaucg gcgcuaugcu uccugugccc ccaguggggc ccuggcuggg auuucucau auacuguaag uuugcgauga gacacuaacag uauagaugau guacuagucc gggcaccccc agcucuggag ccugacaagg aggacaggag agaugcugca agcccaagaa gcucucugcu cagccuguca caaccuacug acugccaggg cacuugggaa uggcaaggaa ggacuugagg gacucgaaga cgaguccuc aaguccucuc uugcuauacc cagaaaacgu gccaggaaga gaacucagga ccgugaagca gcacuagga agggagacuc cagcucaaac aaggcagggg uggggcgug ggauuggggg uaggggaggg aaugauaca uuuucuuuu ccuguuguaa agaaauaaag auaagccagg cacaguggcu cacgccugua aucccaccac uuucagaggc caaggcgcug gaucagauuc ucgagcgccc	43

40

50

【表 4 - 2】

	gccccg					44
	agucucgugc	agauggacag	caccgcugag	caauggaagc	ggguaggccu	
	uuggggcagc	ggccaauagc	agcuuugcuc	cuucgcuuuc	ugggcucaga	
	ggcugggaag	gggugggucc	gggggcgggc	ucaggggagg	gcucaggggc	
	ggggcgggag	cccgaagguc	cuccggaggc	ccggcauucu	gcacgcuuca	
	aaagcgcacg	ucugccgcgc	uguucuccuc	uuccucaucu	ccgggccuuu	
	cgacccggau	cccccgggcu	gcaggaaauuc	gagcucggua	ccucgcgaau	
	gcaucuagau	aucggcgcu	ugcuuccugu	gccccagug	gggccucggc	
	ugggauuuca	ucauauacug	uaaguuugcg	augagacacu	acaguauaga	
	ugauguacua	guccggggcac	ccccagcucu	ggagccugac	aaggaggaca	
	ggagagaugc	ugcaagccca	agaagcucuc	ugcucagccu	gucacaaccu	
	acugacugcc	agggcacuug	ggaauaggcaa	ggaaggacuu	gagggacucg	
	aagagaaguc	ccucaagucc	ucucuugcua	uaccagaaa	acgugccagg	
	aagagaacuc	aggaccucga	agcagacuac	uggaaggag	acuccagcuc	
	aaacaaggca	gggguggggg	cgugggguug	gggguagggg	agggauaga	
	uacauuuucu	cuuuccuguu	guaaagaaau	aaagauaagc	caggcacagu	
	ggcucacgcc	uguaauccca	ccacuuucag	aggccaaggc	gcuggaucca	
	gaucucgagc	ggccgcccg				

10

【0063】

一部の実施形態では、阻害性核酸は、国際特許公開第WO2017/201258号の配列番号1～102および/または103～249のうちの一つまたは複数を含むことができる。一部の実施形態では、阻害性核酸は、国際特許公開第WO2017/201258号の表3～5に提供される国際特許公開第WO2017/201258号の配列番号1～249から選択される二重組合せのうちの一つまたは複数を含むことができる。一部の実施形態では、ベクターは、国際特許公開第WO2017/201258号の表9に提供されるpri-miRNAまたは表10に提供されるpri-raiRNAのうちの一つまたは複数を含むことができる。国際特許公開第WO2017/201258号の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0064】

一部の実施形態では、阻害性核酸は、国際特許公開第WO2018/204803号の配列番号914～1013および/または1014～1160のうちの一つまたは複数を含むことができる。一部の実施形態では、阻害性核酸は、国際特許公開第WO2018/204803号の表4～6に提供される国際特許公開第WO2018/204803号の配列番号914～1160から選択される二重組合せのうちの一つまたは複数を含むことができる。国際特許公開第WO2018/204803号の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0065】

一部の実施形態では、阻害性核酸は、国際特許公開第WO2018/204797号の配列番号916～1015および/または1016～1162のうちの一つまたは複数を含むことができる。一部の実施形態では、阻害性核酸は、国際特許公開第WO2018/204797号の配列番号916～1015、1016～1162、1164～1332および/または1333～1501のうちの一つまたは複数を含むことができる。一部の実施形態では、阻害性核酸は、国際特許公開第WO2018/204797号の表4～6に提供される国際特許公開第WO2018/204797号の配列番号916～1162から選択される二重組合せのうちの一つまたは複数を含むことができる。一部の実施形態では、阻害性核酸は、国際特許公開第WO2018/204797号の表9に提供される国際特許公開第WO2018/204797号の配列番号1164～1501から選択される二重組合せのうちの一つまたは複数を含むことができる。国際特許公開第WO2018/204797号の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0066】

一部の実施形態では、阻害性核酸は、機能獲得突然変異体ハンチンタンパク質をコードする遺伝子内のヘテロ接合性SNPに相補的なまたは実質的に相補的な配列を標的に

50

することができる、例えば、それを含むことができる。一部の実施形態では、SNPは、試料集団において少なくとも10%の対立遺伝子頻度を有する。一部の実施形態では、SNPは、RS362331、RS4690077、RS363125、RS363075、RS362268、RS362267、RS362307、RS362306、RS362305、RS362304、RS362303、およびRS7685686からなる群から選択されるゲノム部位に存在する。そのようなSNPは、例えば、米国特許第9,343,943号においてより詳細に記載されており、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号45~49のうちの一つである。一部の実施形態では、阻害性核酸配列は、配列番号50~61のうちの一つまたは複数を含む。一部の実施形態では、阻害性核酸配列は、例えば二重鎖で、少なくとも配列番号50および51を含む。一部の実施形態では、阻害性核酸配列は、例えば二重鎖で、少なくとも配列番号52および53を含む。一部の実施形態では、阻害性核酸配列は、例えば二重鎖で、少なくとも配列番号54および55を含む。一部の実施形態では、阻害性核酸配列は、例えば二重鎖で、少なくとも配列番号56および57を含む。一部の実施形態では、阻害性核酸配列は、例えば二重鎖で、少なくとも配列番号58および59を含む。一部の実施形態では、阻害性核酸配列は、例えば二重鎖で、少なくとも配列番号60および61を含む。

10

【0067】

【表5】

表5

20

標的配列	配列番号
ccacgccugc uccucaucc acugugugca cuucauccug	45
ccacgccugc uccucaucu acugugugca cuucauccug	46
uaagagaugg ggacaguaa ucaacgcuag aagaaca	47
uaagagaugg ggacaguacu ucaacgcuag aagaaca	48
cagatgcc atggcctgtct gggccag	49

【0068】

【表6】

表6:ヒトHTT遺伝子におけるSNPを標的にするセンスおよびアンチセンス(または第1および第2のRNA配列)

30

センス配列	配列番号	アンチセンス配列	配列番号
uccucaucc acugugugaa c	50	gcacacagug gaugagggag c	51
uccucaucu acugugugaa c	52	cgaggagua gaugacacac g	53
gggacaguaa uucaacgcu c	54	agcguugaau uacugucgcc a	55
gggacaguac uucaacgcu c	56	acccuguca ugaaguugcg a	57
ugccauggcc ugugcugguc c	58	cccagcacag gccauaggca c	59
ugccauggca ugugcugguc c	60	cccagcacau gccuaggcau c	61

【0069】

一部の実施形態では、阻害性核酸、例えば、miRNAは、本明細書に開示される遺伝子のうちの一つにおける多型、突然変異体またはSNPに特異的にハイブリダイズすることができるか、またはそれを標的にすることができる。HTT遺伝子における多型、例えば、SNPを標的にする阻害性核酸配列を選択する方法は、当技術分野において公知である。例えば、そのような方法は、米国特許第8,679,750号および同第7,947,658号に開示されており、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、阻害性核酸は、配列、例えば、米国特許第8,679,750号または同第7,947,658号の配列番号1~342のうちの一つまたは複数を含むことができる。

40

【0070】

一部の実施形態では、阻害性核酸は、配列番号62~66のうちの一つまたは複数を含

50

むことができる。

【 0 0 7 1 】

【 表 7 】

表7.一部の実施形態では、大文字は2'-O-(2-メトキシ)エチル改変を含む。

	配列番号
5'-CTCAGtaacattgacACCAC-3'	62
5'-CTCGActaaagcaggATTTC-3'	63
5'-CCTTCcctgaaggttCCTCC-3'	64
5'-GCAGGggttaccgccaTCCCC-3'	65
5'-CGAGAcagtcgcttcCACTT-3'	66

10

【 0 0 7 2 】

さらに好適な配列は、当技術分野において、例えば、米国特許第 7,951,934 号、Miniarikova et al. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2015 5:e 297; および Kordasiweicz et al. *Neuron* 2012 74:1031-1044 において公知であり、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 7 3 】

態様のいずれかの一部の実施形態では、阻害性 RNA (例えば、miRNA) は、標的の 5' 非翻訳領域 (UTR) に結合するか、および / またはそれを標的にする。態様のいずれかの一部の実施形態では、阻害性 RNA (例えば、miRNA) は、標的の 1 つもしくは複数のエクソンに結合するか、および / またはそれを標的にする。態様のいずれかの一部の実施形態では、阻害性 RNA (例えば、miRNA) は、HTT の 5' UTR、エクソン 1、CAG リピート、CAG 5' - ジャンパー、もしくは CAG 3' ジャンパーに結合するか、および / またはそれを標的にする。

20

【 0 0 7 4 】

一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 67 ~ 73 のいずれかの配列を含まない。一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 67 ~ 73 のいずれかと 80 % よりも高い、85 % よりも高い、90 % よりも高い、95 % よりも高い、または 98 % よりも高い配列同一性を有する配列を含まない。

30

【 0 0 7 5 】

一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 67 ~ 73 のいずれかの配列を含まない。一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 135 ~ 151 のいずれかの配列を含まない。一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 67 ~ 73 のいずれかと 80 % よりも高い、85 % よりも高い、90 % よりも高い、95 % よりも高い、または 98 % よりも高い配列同一性を有する配列を含まない。一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 135 ~ 151 のいずれかと 80 % よりも高い、85 % よりも高い、90 % よりも高い、95 % よりも高い、または 98 % よりも高い配列同一性を有する配列を含まない。

40

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 67 ~ 73 のいずれかの配列を含む。一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 67 ~ 73 のいずれかと 80 % よりも高い、85 % よりも高い、90 % よりも高い、95 % よりも高い、または 98 % よりも高い配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 7 7 】

一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 67 ~ 73 または 135 ~ 151 のいずれかの配列を含む。一部の実施形態では、阻害性 RNA および / またはベクターは、配列番号 67 ~ 73 または 135 ~ 151 のいずれかと 80 % より

50

も高い、85%よりも高い、90%よりも高い、95%よりも高い、または98%よりも高い配列同一性を有する配列を含む。例えば、国際特許出願第WO2021/127455号を参照されたく、この内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0078】

【表8】

表8

	配列番号
CGAGGCCGGGGCGGGGCACA	67
CGGGGCGGGGCCGTGGAGGG	68
ACTGTGCCACTATGTTTTCA	69
GCCTTCATCAGCTTTTCCAG	70
GCTGCTGCTGCTGCTGCTGC	71
TGCTGGAAGGACTTGAGGGA	72
TGTTGCTGCTGCTGCTGCTG	73
TGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	135
GGCGGCGGCGGCGGCGGCGG	136
GAGGGGTGGGGAGGCTGGGG	137
TCCTTGACCTGCTGCTGCAG	138
CCTTCCACTGGCCATGATGC	139
ACTGTGCCACTATGTTTTCA	140
TGAGGTATCAGATTGTCTAG	141
AAAttAATCTCTTACCTGAT	142
CCCAGGGCTAGCAAGGAACA	143
AATTCAGTAGCTTCCCTTAA	144
CTGGGCCCGCAGCGGAAGGG	145
TTATTGCTGTCTACTATCCG	146
TCAGTCCTTCCCAAAGCTCT	147
TAATCTCTTACTGATATAA	148
TCAGCAGTGTTATTCTTAC	149
AAACCGttACCAttACTgAGtt	150
AAAtCGCtGAtttGtGtAGtC	151

10

20

30

【0079】

A Dおよび/またはPD関連標的を標的にする阻害性核酸(例えば、miRNA)における使用のための好適な配列は、当技術分野において公知であり、例えば、国際特許公開第WO2011/133890号、同第WO2012/036433号、同第WO2013/007874号;米国特許出願公開第US2016/0264965号;米国特許第7,829,694号、同第8,415,319号、同第10,125,363号、同第10,011,835号を参照されたい。前述の参考文献の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0080】

態様のいずれかの一部の実施形態では、神経疾患または障害を処置する薬剤は、阻害性核酸であるか、またはそれを含む。態様のいずれかの一部の実施形態では、所与の遺伝子の発現の阻害剤は、阻害性核酸であり得る。本明細書で使用される場合、「阻害性核酸」は、標的、例えば、二本鎖RNA(dsRNA)、阻害性RNA(iRNA)などの発現を阻害することができる核酸分子を指す。

40

【0081】

二本鎖RNA分子(dsRNA)は、RNA干渉(RNAi)として公知の高度に保存された調節メカニズムにおいて遺伝子発現を遮断することが示されている。本明細書に記載される阻害性核酸は、30ヌクレオチド長またはそれ未満、すなわち、15~30ヌクレオチド長、一般に、19~24ヌクレオチド長である領域を有するRNA鎖(アンチセンス鎖)を含み得、この領域は、少なくとも部分的に標的化されたmRNA転写物に実質

50

的に相補的である。これらの iRNA の使用は、mRNA 転写物の標的化された分解を可能にし、標的の発現および / または活性の減少をもたらす。

【0082】

本明細書で使用される場合、「iRNA」という用語は、RNA (または本明細書で下に記載される改変された核酸) を含有し、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) 経路を介する RNA 転写物の標的化された切断を媒介する薬剤を指す。態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載される iRNA は、標的の発現および / または活性の阻害をもたらす。態様のいずれかの一部の実施形態では、細胞を阻害剤 (例えば、iRNA) と接触させることで、iRNA が存在しない細胞において見られる標的 mRNA レベルの少なくとも約 5%、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 99%、100% を含んで最大で 100% まで、細胞における標的 mRNA レベルの減少をもたらす。態様のいずれかの一部の実施形態では、阻害剤 (例えば、iRNA) を対象に投与することで、iRNA が存在しない対象において見られる標的 mRNA レベルの少なくとも約 5%、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 99%、100% を含んで最大で 100% まで、対象における標的 mRNA レベルの減少をもたらすことができる。

10

【0083】

態様のいずれかの一部の実施形態では、iRNA は、dsRNA であり得る。dsRNA は、dsRNA が使用される条件下、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成するのに十分に相補的である 2 本の RNA 鎖を含む。dsRNA のうちの一方の鎖 (アンチセンス鎖) は、標的配列に対して、実質的に相補的であり、一般に、完全に相補的である相補性の領域を含む。標的配列は、標的の発現の間に形成される mRNA の配列に由来し得、例えば、これは、1 つまたは複数のイントロン境界に及び得る。他方の鎖 (センス鎖) は、2 本の鎖がハイブリダイズし、好適な条件下で組み合わせられた場合に二重鎖構造を形成するように、アンチセンス鎖に相補的である領域を含む。一般に、二重鎖構造は、包含的に 15 ~ 30 塩基対の間の長さ、より一般に、包含的に 18 ~ 25 塩基対の間の長さ、さらにより一般に、包含的に 19 ~ 24 塩基対の間の長さ、最も一般に、包含的に 19 ~ 21 塩基対の間の長さである。同様に、標的配列に相補性の領域は、包含的に 15 ~ 30 塩基対の間の長さ、より一般に、包含的に 18 ~ 25 塩基対の間の長さ、さらにより一般に、包含的に 19 ~ 24 塩基対の間の長さ、最も一般に、包含的に 19 ~ 21 塩基対の間の長さのヌクレオチドの長さである。態様のいずれかの一部の実施形態では、dsRNA は、包含的に 15 ~ 20 ヌクレオチドの間の長さであり、他の実施形態では、dsRNA は、包含的に 25 ~ 30 ヌクレオチドの間の長さである。当業者が認識するように、切断のために標的にされる RNA の、標的にされる領域は、ほとんどの場合、より大きな RNA 分子、多くの場合は mRNA 分子の一部である。関連する場合、mRNA 標的の「一部」は、RNAi 指向性切断 (すなわち、RISC 経路を通じた切断) のための基質であるのに十分な長さの mRNA 標的の連続配列である。9 塩基対程度の長さの二重鎖を有する dsRNA は、一部の状況下で、RNAi 指向性 RNA 切断を媒介することができる。ほとんどの場合、標的は、少なくとも 15 ヌクレオチドの長さ、好ましくは、15 ~ 30 ヌクレオチドの長さである。阻害性核酸の種類の実施形態としては、例えば、siRNA、shRNA、miRNA、および / または amiRNA が挙げられ得、これらは、当技術分野において周知である。

20

30

40

【0084】

態様のいずれかの一部の実施形態では、阻害性 RNA は、miRNA である。マイクロ RNA (miRNA) は、17 ~ 25 ヌクレオチドの小型 RNA であり、これは、真核生物において遺伝子発現の調節因子として機能する。「マイクロ RNA」または「miRNA」は、転写のまたは翻訳後の遺伝子サイレンシングを媒介することができる小型のノンコーディング RNA 分子である。典型的には、miRNA は、ヘアピンまたはステムループ (例えば、自己相補的な一本鎖骨格を有する) 二重鎖構造として転写され、一次 miRNA

50

NA (pri-miRNA) と称され、これは、pre-miRNA に酵素的にプロセシングされる (例えば、Drosha、DGCR8、Pasha などによって)。二重鎖構造は、a) 標的配列に実質的に相補的であり、一般に、完全に相補的である相補性の領域の第1のRNA配列、ならびにb) 2本の配列がハイブリダイズし、好適な条件下で組み合わされた場合に二重鎖構造を形成するように、第1のRNA配列鎖に相補的である第2のRNA配列領域を含む。標的配列は、標的の発現の間に形成されるmRNAの配列に由来し得、例えば、これは、1つまたは複数のイントロン境界に及び得る。一般に、二重鎖構造は、包含的に15~30塩基対の間の長さ、より一般に、包含的に18~25塩基対の間の長さ、さらにより一般に、包含的に19~24塩基対の間の長さ、最も一般に、包含的に19~21塩基対の間の長さである。

10

【0085】

miRNAは、一次miRNA (pri-miRNA) と呼ばれる長い一次転写物の一部として、核において最初に発現される。pri-miRNAの長さは変わり得る。一部の実施形態では、pri-miRNAは、約100~約5000塩基対 (例えば、約100、約200、約500、約1000、約1200、約1500、約1800、または約2000塩基対) の長さの範囲である。一部の実施形態では、pri-miRNAは、200塩基対よりも長い長さ (例えば、2500、5000、7000、9000、またはそれよりも長い塩基対の長さ) である。

【0086】

核の内側で、pri-miRNAは、酵素Droshaによって部分的に消化されて、65~120ヌクレオチド長のヘアピン前駆体miRNA (pre-miRNA) を形成し、これは、Dicerによる、活性分子であるより短い成熟miRNAへのさらなるプロセシングのために細胞質に輸送される。動物では、これらの短いRNAは、miRNAの標的mRNAの3'非翻訳領域 (3'-UTR) に対する対形成特異性の一次決定因子であると考えられる5'近位「シード」領域 (2~8ヌクレオチド) を含む。ヘアピンまたはステムループ二重鎖構造によっても特徴付けられるpre-miRNAもその長さが変わり得る。一部の実施形態では、pre-miRNAは、約40塩基対の長さ~約500塩基対の長さのサイズの範囲である。一部の実施形態では、pre-miRNAは、約50~100塩基対の長さのサイズの範囲である。一部の実施形態では、pre-miRNAは、約50~約90塩基対の長さ (例えば、約50、約52、約54、約56、約58、約60、約62、約64、約66、約68、約70、約72、約74、約76、約78、約80、約82、約84、約86、約88、または約90塩基対の長さ) のサイズの範囲である。

20

30

【0087】

一般に、pre-miRNAは、細胞質に輸送され、Dicerによって酵素的にプロセシングされて、最初に不完全なmiRNA/miRNA*二重鎖、および次いで一本鎖の成熟miRNA分子を生成し、これは、その後、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) にロードされる。典型的には、成熟miRNA分子は、約19~約30塩基対の長さのサイズの範囲である。一部の実施形態では、成熟miRNA分子は、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または30塩基対の長さである。一部の実施形態では、本開示の単離された核酸は、配列番号6~17、40~44または50~66のうちのいずれか1つに示される配列を含むpri-miRNA、pre-miRNA、または成熟miRNAをコードする配列を含む。

40

【0088】

本発明の文脈では、miRNA分子またはその等価体もしくは模倣体もしくはisomiRは、合成または天然または組換えまたは成熟のmiRNAもしくはヒトmiRNAまたは成熟のmiRNAもしくはヒトmiRNAの一部であってもよく、あるいは一般定義を提供する部分においてさらに定義されるヒトmiRNAに由来していてもよい。ヒトmiRNA分子は、ヒトの細胞、組織、器官または体液において見られるmiRNA分子 (すなわち、内因性ヒトmiRNA分子) である。ヒトmiRNA分子はまた、ヌクレオチ

50

ドの置換、欠失および/または付加によって内因性ヒトmiRNA分子に由来するヒトmiRNA分子であってもよい。miRNA分子、またはその等価体もしくは模倣体は、一本鎖または二本鎖RNA分子であってもよい。好ましくは、miRNA分子、またはその等価体もしくは模倣体は、6~30ヌクレオチドの長さ、好ましくは12~30ヌクレオチドの長さ、好ましくは15~28ヌクレオチドの長さであり、より好ましくは、前記分子は、少なくとも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、またはそれよりも長い長さを有する。

【0089】

好ましい実施形態では、miRNA分子、またはその等価体、模倣体もしくはisomiRは、前記miRNA分子、またはその等価体もしくは模倣体もしくはisomiRのシード配列中に存在する7ヌクレオチドのうち少なくとも6ヌクレオチドを含む。好ましくは、この実施形態では、miRNA分子、またはその等価体もしくは模倣体もしくはisomiRは、6~30ヌクレオチドの長さであり、より好ましくは、前記miRNA分子またはその等価体のシード配列中に存在する7ヌクレオチドのうち少なくとも6ヌクレオチドを含む。さらにより好ましくは、miRNA分子、またはその等価体もしくは模倣体もしくはisomiRは、15~28ヌクレオチドの長さであり、より好ましくは、シード配列中に存在する7ヌクレオチドのうち少なくとも6ヌクレオチドを含み、さらにより好ましくは、miRNA分子は、少なくとも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、またはそれよりも長い長さを有する。

【0090】

したがって、好ましいmiRNA分子、またはその等価体もしくは模倣体もしくはisomiRは、配列番号6~17、40~44または50~66中においてまたはそれらとして特定されるシード配列中に存在する7ヌクレオチドのうち少なくとも6ヌクレオチドを含み、より好ましくは、少なくとも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、またはそれよりも長い長さを有する。

【0091】

miRNAのための送達ビヒクルとしては、以下に限定されるものではないが、リポソーム、ポリマーナノ粒子、ウイルス系、脂質または受容体結合分子のコンジュゲーション、エキソソーム、およびバクテリオファージが挙げられ、例えば、Baumann and Winkler, miRNA-based therapies: Strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents, Future Med Chem. 2014, 6(17): 1967-1984; 米国特許第8,900,627号; 米国特許第9,421,173号; 米国特許第9,555,060号; WO2019/177550号を参照されたく、これらのそれぞれの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0092】

マイクロRNA配列は、「シード」領域、すなわち、成熟マイクロRNAの2~8位の領域の配列を含み、この配列は、核酸のmiRNA標的配列に対する完全なワトソン-クリック型の相補性を有する。一実施形態では、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、変化させる、または除去するように工学的に操作されていてもよい。

【0093】

実質的な相補性という用語は、完全に相補的である第1および第2のRNA配列を有すること、または完全に相補的である第1のRNA配列および参照もしくは標的配列(例えば、配列番号3または4)を有することを必要としないことを意味する。一実施形態では、RNA配列と標的との間の実質的な相補性は、ミスマッチを有さないこと、1つのミスマッチしたヌクレオチドを有すること、または2つのミスマッチしたヌクレオチドを有す

ることからなる。1つのミスマッチしたヌクレオチドとは、標的と塩基対形成するRNA配列の長さ全体にわたって、1つのヌクレオチドが、標的と塩基対形成しないことを意味することが理解される。ミスマッチを有さないとは、すべてのヌクレオチドが標的と塩基対形成することを意味し、2つのミスマッチを有するとは、2つのヌクレオチドが標的と塩基対形成しないことを意味する。

【0094】

miRNAおよび/または1つまたは複数のmiRNAを含む導入遺伝子は、スキヤフォールド配列中に提供され得るか、またはそれを含ま得る。本明細書で使用される場合、「スキヤフォールド」は、成熟二重鎖構造の外側にあるmiRNAコード配列の部分を指す。例えば、スキヤフォールドは、ループおよび/またはステム領域を含むことができる。したがって、スキヤフォールドは、本明細書に記載されるmiRNAを生成し、コードし、および/または発現するのに有用である。本明細書に記載される組成物および方法で使用されるスキヤフォールドは、内因性および/または天然に存在するmiRNAスキヤフォールド、例えば、ヒトmiRNAの配列であり得るか、それから得られ得るか、および/またはそれに由来し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法において使用して得られるスキヤフォールド配列は、1つまたは複数のNSおよび/またはCNS疾患において過剰発現されるmiRNAの内因性および/または天然に存在するmiRNAスキヤフォールドの配列であり得るか、それから得られ得るか、および/またはそれに由来し得る。

核酸

【0095】

一部の態様では、本開示は、病原遺伝子(例えば、HTT)の発現を低減する(例えば、阻害する)ために有用であり、および/またはCYP46A1をコードする、単離された核酸を提供する。「核酸」配列は、DNAまたはRNAの配列を指す。一部の実施形態では、本開示のタンパク質および核酸は、単離されている。本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、人工的に生成したことを意味する。核酸に関して本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、(i) *in vitro*で、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された、(ii)クローニングによって組換え的に生成された、(iii)切断およびゲル分離によってのように精製された、または(iv)例えば、化学合成によって合成されたことを意味する。単離された核酸は、当該技術分野において周知の組換えDNA技法によって容易に操作可能であるものである。そのため、5'および3'制限部位が公知であるか、またはそれについてのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマー配列が開示されているベクター中に含有されるヌクレオチド配列は、単離されたと考えられるが、その天然宿主中にネイティブ状態で存在する核酸配列はそうではない。単離された核酸は、実質的に精製されていてもよいが、その必要がなくともよい。例えば、クローニングまたは発現ベクター内で単離された核酸は、それが存在する細胞中で、ほんのわずかなパーセンテージの物質しか含まないことがあるという点で純粋ではない。しかしながら、この用語が当業者に公知の標準技法によって容易に操作可能であるという理由で、本明細書で使用されるので、そのような核酸は単離されている。タンパク質またはペプチドに関して本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、その天然の環境から単離されたか、または人工的に生成した(例えば、化学合成によって、組換えDNA技術によってなど)タンパク質またはペプチドを指す。

【0096】

当業者は、保存的アミノ酸置換が、カプシドタンパク質の機能的に等価なバリエーションまたはホモログを提供するために行われてもよいことも認識するであろう。一部の態様では、本開示は、保存的アミノ酸置換をもたらす配列の変更を包含する。本明細書で使用される場合、保存的アミノ酸置換は、アミノ酸置換が行われるタンパク質の相対的電荷またはサイズ特徴を変更しないアミノ酸置換を指す。バリエーションは、当業者に公知のポリペプチド配列を変更するための方法、例えば、そのような方法を編集する参照文献、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds.,

10

20

30

40

50

Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989、またはCurrent Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに見られる方法に従って調製することができる。アミノ酸の保存的置換としては、以下の群内のアミノ酸の中で行われる置換が挙げられる：(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；および(g) E、D。したがって、本明細書に開示されるタンパク質およびポリペプチドのアミノ酸配列に対して保存的アミノ酸置換を行うことができる。

【0097】

本発明の単離された核酸は、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(rAAVベクター)であってもよい。一部の実施形態では、本開示によって記載される単離された核酸は、第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復配列(ITR)またはそのバリエーションを含む領域(例えば、第1の領域)を含む。単離された核酸(例えば、組換えAAVベクター)は、カプシドタンパク質にパッケージングされ、対象に投与されてもよく、および/または選択される標的細胞に送達されてもよい。「組換えAAV(rAAV)ベクター」は、典型的には、最小限の導入遺伝子およびその調節配列、ならびに5'および3' AAV逆位末端反復配列(ITR)から構成される。導入遺伝子は、本明細書の他の箇所に開示されるように、対象の内因性mRNAを標的にする核酸を含む1つまたは複数の阻害性RNA(例えば、miRNA)をコードする1つまたは複数の領域を含んでいてもよい。導入遺伝子はまた、本開示の他の箇所に記載されるように、例えば、タンパク質をコードする領域、および/または発現制御配列(例えば、ポリAテール)を含んでいてもよい。

【0098】

一般に、ITR配列は、約145bpの長さである。好ましくは、ITRをコードする配列の実質的に全体が、分子中で使用されるが、これらの配列のいくらかの度合いのマイナーな改変は許容される。これらのITR配列を改変する能力は、当技術分野の技能内である(例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); およびK. Fisher et al., J Virol., 70:520-532 (1996)などのテキストを参照されたい)。本発明で用いられるそのような分子の例は、導入遺伝子を含有する「シス作用性」プラスミドであり、ここで、選択される導入遺伝子配列および関連する調節エレメントは、5'および3' AAV ITR配列に隣接している。AAV ITR配列は、本発明によって特定された哺乳動物AAV型を含む、任意の公知のAAVから得てもよい。一部の実施形態では、単離された核酸(例えば、rAAVベクター)は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびそれらのバリエーションから選択される血清型を有する少なくとも1つのITRを含む。一部の実施形態では、単離された核酸は、AAV2 ITRをコードする領域(例えば、第1の領域)を含む。

【0099】

一部の実施形態では、単離された核酸は、第2のAAV ITRを含む領域(例えば、第2の領域、第3の領域、第4の領域など)をさらに含む。一部の実施形態では、第2のAAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびそれらのバリエーションから選択される血清型を有する。一部の実施形態では、第2のITRは、機能的末端分離部位(TRS)を欠く突然変異体ITRである。「末端分離部位を欠く」という用語は、ITRの末端分離部位(TRS)の機能を無効にする突然変異(例えば、非同義突然変異などのセンス変異、またはミスセンス突然変異)を含むAAV ITR、または機能的TRSをコードする核酸配列を欠くトランケートされたAAV ITR(例えば、ATRS ITR)を指し得る。任意の特定の理論に縛られることを望まないが、機能的TRSを欠くITRを含むrAAVベクターは、例えば、McCarthy (2008) Molecular Therapy 1

6(10): 1648-1656によって記載される自己相補的 r A A V ベクターを生成する。本明細書に開示される態様のいずれかの一部の実施形態では、少なくとも1つまたは複数の I T R は、145bpの長さ未満、例えば、130bpの長さである。

【0100】

組換え A A V ベクターについて上記で特定された主要なエレメントに加えて、ベクターは、ベクターをトランスフェクトされたか、または本発明によって生成したウイルスに感染した細胞中で、その転写、翻訳および/または発現を可能にする様式で、導入遺伝子のエレメントと作動可能に連結される従来の制御エレメントも含む。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」配列は、目的の遺伝子と連続している発現制御配列および目的の遺伝子を制御するためにトランスまたは遠くで作用する発現制御配列の両方を含む。発現制御配列は、適切な転写開始配列、停止配列、プロモーター配列およびエンハンサー配列；スプライシングシグナルおよびポリアデニル化（ポリA）シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を増強する配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を増強する配列；ならびに所望の場合に、コードされた産物の分泌を増強する配列を含む。ネイティブの、構成的な、誘導性のおよび/または組織特異的であるプロモーターを含むいくつかの発現制御配列が、当技術分野において公知であり、利用され得る。

10

【0101】

本明細書で使用される場合、核酸配列（例えば、コード配列）および調節配列は、核酸配列の発現または転写を調節配列の影響下または制御下に置くような方法で、それらが共有結合的に連結される場合に、作動可能に連結されたと言われる。核酸配列が機能的タンパク質に翻訳されることが望ましい場合、2つのDNA配列は、5'調節配列におけるプロモーターの誘導がコード配列の転写をもたらす場合、および2つのDNA配列間の連結の性質が（1）フレームシフト突然変異の導入をもたらさない、（2）プロモーター領域のコード配列の転写を指示する能力を妨げない、または（3）対応するRNA転写物のタンパク質に翻訳される能力を妨げない場合に、作動可能に連結されたと言われる。そのため、プロモーター領域は、得られる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳され得るように、プロモーター領域がそのDNA配列の転写をもたらすことができる場合に、核酸配列に作動可能に連結されているであろう。同様に、2つまたはそれよりも多くのコード領域は、共通のプロモーターからのそれらの転写がインフレームで翻訳されている2つまたはそれよりも多くのタンパク質の発現をもたらすような方法で、それらが連結されている場合に、作動可能に連結されている。一部の実施形態では、作動可能に連結されたコード配列は、融合タンパク質をもたらす。一部の実施形態では、作動可能に連結されたコード配列は、機能的RNA（例えば、miRNA）をもたらす。

20

30

【0102】

一部の態様では、本開示は、導入遺伝子を含む単離された核酸であって、導入遺伝子が、1つまたは複数のマイクロRNA（例えば、miRNA）をコードする核酸配列を含む、単離された核酸を提供する。

【0103】

単離された核酸またはベクター（例えば、r A A V ベクター）が、一部の実施形態では、2つ以上の（例えば、複数の、例えば、2、3、4、5、10、またはそれよりも多くの）miRNAをコードする核酸配列を含むことが認識されるべきである。一部の実施形態では、2つ以上のmiRNAのそれぞれは、同じ標的遺伝子（例えば、それぞれのmiRNAがHTT遺伝子を標的にする場合、3つの固有のmiRNAをコードする単離された核酸）を標的にする（例えば、それにハイブリダイズするか、または特異的に結合する）。一部の実施形態では、2つ以上のmiRNAのそれぞれは、異なる標的遺伝子を標的にする（例えば、それにハイブリダイズするか、または特異的に結合する）。

40

【0104】

一部の態様では、本開示は、1つまたは複数の人工miRNAをコードする単離された核酸およびベクター（例えば、r A A V ベクター）を提供する。本明細書で使用される場

50

合、「人工miRNA」または「amiRNA」は、例えば、Eamens et al. (2014), Methods Mol. Biol. 1062:211-224に記載されるように、miRNAおよびmiRNA* (例えば、miRNA二重鎖のパスセンジャー鎖)配列が、標的化遺伝子の非常に効率的なRNAサイレンシングを指示する、対応するamiRNA/amiRNA*配列で置き換えられている、内因性pri-miRNAまたはpre-miRNA (例えば、機能的成熟miRNAを生成することができる前駆体miRNAであるmiRNA骨格)を指す。例えば、一部の実施形態では、人工miRNAは、成熟HTT特異的miRNA (例えば、配列番号6~17、40~44または50~66のうちのいずれか1つ)をコードする配列が、内因性miR-155成熟miRNAコード配列の代わりに挿入されているmiR-155 pri-miRNA骨格を含む。一部の実施形態では、本開示によって記載されるmiRNA (例えば、人工miRNA)は、miR-155骨格配列、miR-30骨格配列、mir-64骨格配列、またはmiR-122骨格配列を含む。

10

【0105】

導入遺伝子を含む領域 (例えば、第2の領域、第3の領域、第4の領域など)は、単離された核酸の任意の好適な場所に配置されてもよい。領域は、例えば、イントロン、5'または3'非翻訳領域などを含む核酸の任意の非翻訳部分に配置されてもよい。

【0106】

一部の 경우에는、領域 (例えば、第2の領域、第3の領域、第4の領域など)を、タンパク質をコードする核酸配列 (例えば、タンパク質コード配列)の最初のコドンの上流に配置することが望ましくあり得る。例えば、領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと最初のコドンの2000ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと最初のコドンの1000ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと最初のコドンの500ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと最初のコドンの250ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと最初のコドンの150ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。一部の 경우에는 (例えば、導入遺伝子がタンパク質コード配列を欠く場合)、領域 (例えば、第2の領域、第3の領域、第4の領域など)を導入遺伝子のポリAテールの上流に配置することが望ましくあり得る。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と最初の塩基の2000ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、ポリAテールの最初の塩基と最初の塩基の1000ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、ポリAテールの最初の塩基と最初の塩基の500ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、ポリAテールの最初の塩基と最初の塩基の250ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、ポリAテールの最初の塩基と最初の塩基の150ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、ポリAテールの最初の塩基と最初の塩基の100ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。領域は、ポリAテールの最初の塩基と最初の塩基の50ヌクレオチド上流との間に配置されてもよい。一部の 実施形態では、領域は、プロモーター配列の最後のヌクレオチド塩基とポリAテール配列の最初のヌクレオチド塩基との間に配置される。

20

30

40

【0107】

一部の 경우에는、領域は、導入遺伝子のポリAテールの最後の塩基の下流に配置されてもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と最後の塩基の2000ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と最後の塩基の1000ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と最後の塩基の500ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と最後の塩基の250ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と最後の塩基の150ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。

50

【 0 1 0 8 】

導入遺伝子が2つ以上のmiRNAをコードする場合に、それぞれのmiRNAが導入遺伝子内の任意の好適な場所に配置されてもよいことが認識されるべきである。例えば、第1のmiRNAをコードする核酸は、導入遺伝子のイントロン中に配置されてもよく、第2のmiRNAをコードする核酸配列は、別の非翻訳領域（例えば、タンパク質コード配列の最後のコドンと導入遺伝子のポリAテールの最初の塩基との間）に配置されてもよい。

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態では、導入遺伝子は、1つまたは複数の発現制御配列（例えば、プロモーターなど）をコードする核酸配列をさらに含む。発現制御配列は、適切な転写開始配列、停止配列、プロモーター配列およびエンハンサー配列；スプライシングシグナルおよびポリアダニル化（ポリA）シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を増強する配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を増強する配列；ならびに所望の場合に、コードされた産物の分泌を増強する配列を含む。ネイティブの、構成的な、誘導性のおよび/または組織特異的であるプロモーターを含む多数の発現制御配列が、当技術分野において公知であり、利用され得る。

【 0 1 1 0 】

「プロモーター」は、遺伝子の特異的転写を開始するために必要な、細胞の合成機構によって認識されるか、または合成機構に導入されるDNA配列を指す。「動作可能に配置される」、「制御下」または「転写制御下」という語句は、プロモーターが、RNAポリメラーゼの開始および遺伝子の発現を制御するために核酸に関して正しい位置および方向にあることを意味する。

【 0 1 1 1 】

タンパク質をコードする核酸について、ポリアダニル化配列は、一般に、導入遺伝子配列の後、および3'AAV ITR配列の前に挿入される。本開示において有用なrAAV構築物は、プロモーター/エンハンサー配列と導入遺伝子の間に位置することが望ましいイントロンも含有し得る。1つの可能なイントロン配列は、SV-40に由来し、SV-40 Tイントロン配列と称される。使用され得る別のベクターエレメントは、配列内リボソーム進入部位（IRES）である。IRES配列は、単一の遺伝子転写物から2つ以上のポリペプチドを生成するために使用される。IRES配列は、2つ以上のポリペプチド鎖を含有するタンパク質を生成するために使用されるであろう。これらのおよび他の一般的なベクターエレメントの選択は従来のものであり、多くのそのような配列が利用可能である[例えば、Sambrook et al.、およびその中の例えば、3.18 3.26および16.17 16.27頁で引用された参考文献、ならびにAusubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989を参照されたい]。一部の実施形態では、口蹄疫ウイルス2A配列は、ポリタンパク質に含まれ、これはポリタンパク質の切断を媒介することが示されている小型ペプチド（およそ18アミノ酸の長さ）である（Ryan, M D et al., *EMBO*, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., *J Virology*, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 864-873; およびHalpin, C et al., *The Plant Journal*, 1999; 4: 453-459)。2A配列の切断活性は、プラスミドおよび遺伝子治療ベクター（AAVおよびレトロウイルス）を含む人工系において以前に実証されている（Ryan, M D et al., *EMBO*, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., *J Virology*, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 864-873; およびHalpin, C et al., *The Plant Journal*, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., *Gene Therapy*, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., *Human Gene Therapy*, 2000; 11: 1921-1931.; ならびにKlump, H et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 811-817)。

10

20

30

40

50

【0112】

構成的プロモーターの例としては、限定されないが、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター(必要に応じて、RSVエンハンサーを伴う)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(必要に応じて、CMVエンハンサーを伴う)[例えば、Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)を参照されたい]、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、およびEF1 α プロモーター[Invitrogen]が挙げられる。一部の実施形態では、プロモーターは、増強されたニワトリ β -アクチンプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、U6プロモーターである。

10

【0113】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外因的に供給される化合物、温度などの環境因子、もしくは特定の生理学的状態、例えば、急性期の存在、細胞の特定の分化状態によって、または複製細胞においてのみ、調節され得る。誘導性プロモーターおよび誘導性系は、限定されないが、Invitrogen、ClontechおよびAriadを含む各種の商業的供給源から入手可能である。多くの他の系が記載されており、当業者によって容易に選択することができる。外因的に供給されるプロモーターによって調節される誘導性プロモーターの例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン(MT)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導性マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系(WO 98/10088号);エクダイソン昆虫プロモーター(No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996))、テトラサイクリン抑制系(Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992))、テトラサイクリン誘導系(Gossen et al., Science, 268:1766-1769 (1995))、またHarvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)も参照されたい)、RU486誘導系(Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)およびWang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997))およびラパマイシン誘導系(Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997))が挙げられる。この文脈において有用であり得るさらに他の種類の誘導性プロモーターは、特定の生理学的状態、例えば、温度、急性期、細胞の特定の分化状態によって、または複製細胞中のみにおいて、調節されるものである。

20

30

【0114】

別の実施形態では、導入遺伝子についてのネイティブのプロモーターが使用される。ネイティブプロモーターは、導入遺伝子の発現がネイティブ発現を模倣すべきことが望まれる場合に、好ましくあり得る。ネイティブプロモーターは、導入遺伝子の発現が、時間的にもしくは発生的に、または組織特異的な様式で、または特定の転写刺激にตอบสนองして、調節されなければならない場合に、使用され得る。さらなる実施形態では、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位またはコザックコンセンサス配列などの他のネイティブ発現制御エレメントも、ネイティブ発現を模倣するために使用され得る。

一部の実施形態では、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能力を付与する。一部の場合では、組織特異的調節配列は、組織特異的な様式で、転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。そのような組織特異的調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)は、当技術分野において周知である。例示的な組織特異的調節配列としては、以下の組織特異的プロモーターに限定されるものではないが、肝臓特異的サイロキシン結合性グロブリン(TBG)プロモーター、インスリンプロモーター、グルカゴンプロモーター、ソマトスタチンプロモーター、膵臓ポリペプチド(PPY)プロモーター、シナプシン-1(Syn)プロモーター、クレアチンキナーゼ(MCK)プロモーター、哺乳動物デスミン(DES)プロモーター、 α -ミオシン重鎖(α -MHC)プロモーター、または心トロポニンT(cTnT)プロモーターが挙げられる。他の例示的なプロモーターとしては、当業者に明らかであろう中でも、 β -アクチンプロモーター、B型肝炎ウイルスコ

40

50

アプロモーター、Sandig et al., Gene Ther., 3: 1002-9 (1996); アルファ-フェトプロテイン (AFP) プロモーター、Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7: 1503-14 (1996)、骨オステオカルシンプロモーター (Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24: 185-96 (1997)); 骨シアロタンパク質プロモーター (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11: 654-64 (1996)); CD2 プロモーター (Hansal et al., J. Immunol., 161: 1063-8 (1998)); 免疫グロブリン重鎖プロモーター; T細胞受容体 α -鎖プロモーター、ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) プロモーターなどのニューロンプロモーター (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)); 神経フィラメント軽鎖遺伝子プロモーター (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991))、およびニューロン特異的 $v g f$ 遺伝子プロモーター (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)) が挙げられる。本方法および本組成物における使用のために企図される NS 特異的プロモーターとしては、2020年9月4日に出願された特許出願第GB2013940.8号および2020年4月20日に出願された第GB2005732.9号に記載されるものも挙げられ、これらは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、NS 特異的プロモーターは、表10のプロモーター、または表10のプロモーターに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の同一性を有するプロモーターである。一部の実施形態では、NS 特異的プロモーターは、表10のプロモーター、または表10のプロモーターに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の同一性を有し、表10のプロモーターのNS 特異的プロモーター活性を保持するプロモーターである。

【0115】

本方法および本組成物における使用のために企図される CNS 特異的プロモーターとしては、2021年4月19日に出願された国際特許出願第PCT/GB2021/050939号に記載されるものも挙げられ、この内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、CNS 特異的プロモーターは、表11~13のプロモーター、または表11~13のプロモーターに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の同一性を有するプロモーターである。一部の実施形態では、CNS 特異的プロモーターは、表11~13のプロモーター、または表11~13のプロモーターに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の同一性を有し、表11~13のプロモーターのCNS 特異的プロモーター活性を保持するプロモーターである。

【0116】

一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数のCREを含む。一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数のNS 特異的CREまたはCNS 特異的CREを含む。一部の実施形態では、核酸は、表13~15の1つもしくは複数のCRE、または表13~15のCREに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の同一性を有するCREを含む。一部の実施形態では、CREは、表13~15のCRE、または表13~15のCREに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の同一性を有し、表13~15のCREの活性を保持するCREである。

【0117】

一部の実施形態では、CREは、当技術分野において公知の1つまたは複数のCREを含むことができる。例えば、一実施形態では、1つまたは複数のCREは、2020年9月4日に出願された特許出願第GB2013940.8号の配列番号19~24、27、28、37、38から選択されてもよい。例えば、一実施形態では、1つまたは複数のCREは、WO2019/199867A1号の配列番号1~8、WO2020/076614A1号の配列番号1~7、およびWO2020/097121号の配列番号25~5

1、177～178、188から選択されてもよい。前述の参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0118】

【表10-1】

表10- NS特異的プロモーター

名称	配列	長さ
SP0013 (配列番号 74)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTCTGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCCGCCGCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGA GAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCCA GGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGA AGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGAGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCA CCGACCCCTCACCCACCGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCT AGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGG ACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAA GGCGGAGCTGGGTTTTCGGATCCCACGGTTCCCGGCGGGGCGGGCCCCGGTC GCCCCTCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTGGGAACT	795

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

	CCCGA		
SP0014 (配列番号 75)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTCCGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCC GCCCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGCGGTGGA GAACAAGGCTCTATTAGCCTGTGCCAGGAAAAGGGGATCAGGGGATGCCCA GGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGA AGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGATGCGGCGAGGGCGGTGCGCACTGC CAGCTTCAAGCACCGCGGACAGTGCCTTCCGCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCAC CGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCGCAAAAC TCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCCGCTCCGCGCCGCGCCGGCCAGCCGGAC CGACCACGCGAGGCGGAGATAGGGGGGACGGGCGCGACCATCTGCGCTG CGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTC GTGTCGTGCTGAGAGCGCAG	810	10
SP0026 (配列番号 76)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTCCGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCC GCCCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGCGGTGGA GAACAAGGCTCTATTAGCCTGTGCCAGGAAAAGGGGATCAGGGGATGCCCA GGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGA AGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGAAAGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGA GGAAGCTCCTGGGCGCGTACAGCCGCGCTATTCTCAGCGTCTCTCCTTTTATG GCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGCTGGCACTGGGCTAGGCC TGCGCACCCACCCACCGACCCCTACCCACCGACCCGTCACCCACCGACCAAG GGCACCCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCTCCTGCCTCTGGC AGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAGTTTCT ACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGGCGATCCACGGTTCCCGGGGG GCGGGGCCGGTCCGCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGC ATTGTGGGAAACTCCCGA	916	20
SP0027 (配列番号 77)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTCCGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCC GCCCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGCGGTGGA GAACAAGGCTCTATTAGCCTGTGCCAGGAAAAGGGGATCAGGGGATGCCCA GGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGA AGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGAAAGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGA GGAAGCTCCTGGGCGCGTACAGCCGCGCTATTCTCAGCGTCTCTCCTTTTATG GCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGCTGGCACTTGCGGCGAGG CGCGTGGCACTGCCAGCTTACGACCCGCGGACAGTGCCTTCCGCCCGCCTG CGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGTGCAGTCACTCGCC GGTCCCCCGCAAACCTCCCCCTCCCGCCACCTTGGTCCGCTCCGCGCCGCCGC CGGCCAGCCGACCGCACCGCGAGGCGGAGATAGGGGGGACGGGCGC GACCATCTGCGTGCGGCGCCGCGGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGG CAGCGGAGGAGTCTGCTGCTGCTGAGAGCGCAG	931	30
SP0030 (配列番号 78)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTCCGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCC GCCCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA	617	40

【表 1 0 - 3】

	GCAGCACGGGCTAGGCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGACCC GTCACCCACCGACCAAGGGGACCCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGAC CCGCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTC TCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGGCGATC CCACGGTTCCCGGGGGGGGGCCCGTGCCTCCCTCCCGCCCTCC TGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTGGGAAACTCCCGA		
SP0031 (配列番号 79)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCGAGGCCTCCTTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTGCGGGTGGGCACAGTGC TGCTTCCCGCCGACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCAGCACTGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGTTCAGCACCGCGGACAG TGCCTTCGCCCGCCTGGCGGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGC GCGCTGACGTACTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGT CGCGTCCGCGCCGCGCCGGCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGA TAGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCT GCCTCAGTCTGCGGTGGGCGAGGAGTCTGTGCTGCTGAGAGCGCAG	632	10
SP0032 (配列番号 80)	TTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGAC CCCATGGCTGCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGT GAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCT TCCTCACATTCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCA CTGGAGTCAGCCTCGTGAAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCTTTGTGGG AGAAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTTCTGGAATGACCCCTTCCACCCCT GACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGA GTTTGTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGGGCTAGGCCTGCGCA CCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGCGTACCCACCGACCAAGGGGCAC CCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCTCCTGCCTTGGCAGTCCC AGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTG GATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGGCGATCCCACGGTCCCGGGGGGGGGGG CCCGTCCGCCCTCCCTCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTG GAAACTCCCGA	701	20
SP0033 (配列番号 81)	TTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGAC CCCATGGCTGCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGT GAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCT TCCTCACATTCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCA CTGGAGTCAGCCTCGTGAAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCTTTGTGGG AGAAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTTCTGGAATGACCCCTTCCACCCCT GACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGA GTTTGTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAATGCGGCGAGGCGCGTG CGCACTGCCAGTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCTGGCGGG CGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGTACGTCACTCGCCGGTCCC CCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCCGCTCCGCGCCGCCGCGGCC AGCCGGACCGCACACGCGAGGCGGAGATAGGGGGGACGGGCGCGACCAT CTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGACGCG AGGAGTCTGTGCTGCTGAGAGCGCAG	716	30
SP0019 (配列番号 82)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCGTT TGACAAGGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCACGAC CCAAGCCCTGACCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAAC AGGAAAGGCAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTGCTACAACAGAA GCTTTTTGTCTCTTCTCACATTCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGT GGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACC GTCTTTTGTGGGAGAAAAACAATGTTGCTGCCAGGCCTTTCTGGAATGACCC TTCCACCCCTGACCAGCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGAT TGGAGCCAAGAGTTTGTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGAC TGAAGAAGATCTTAACAGAAGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCT CACCCACCGACCGTCAACCCACCGACCAAGGGGACCCCTGGCCTAGAGGGGA TGCTGAGCGGGACCCGCTCCTGCCTTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACC CCGAGTTGCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCT	792	40

【表 10 - 4】

	GGGTTTGC GGATCCCACGGTTCCCGGGCGGGGCGGGCCCGGTCGCCCCCTCCCC CTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATIGTGGGAAACTCCCCGA	
SP0020 (配列番号 83)	CTTCCTCTTATATTTTACCAAGACTCAGTTTCTGAGCAAGAAACCACAGGCAC AGCAAGTGCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTTACACTCCAAT CTCCACTTCTTCTCAAGGCCTCAAAAAAAGTTGAAAAATGAAAACAAAAGCC CTGCTGTGTGAGCTGGGCTCTGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGG TGCTCCTGCTCTGCCCCGGCTCAGCTCATGCTGGGCTGCACCTTCTGGAAGGG AGCATGGACTTTGGAATGACTGGTTAGAACCCAAATGAATTAATGGAATTTGA CATAGTTCAAAAATAAAAAATGTGATACCCATGAAATGCTGATATTCTGCCT TAATTTGCCAGATTGGGGGCCGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCC TCACCCACCGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGG ATGCTGAGCGGGACCCGCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTTGGAC CCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAG CTGGCTTTGCGGATCCCACGGTTCCCGGGCGGGGCGGGGCCCGGTCGCCCCCTC CCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTGGGAAACTCCCCGA	686
SP0021 (配列番号 84)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCTGTT TGACAAGGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCAC CCAAGCCCTGACCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAAC AGGAAAGGCAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAA GCTTTTTGTCTCTTCTCATTCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGT GGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACC GTCTTTTGTGGGAGAAAAAATGTTGCTGCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCC TTCCCACCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGAT TGGAGCCAAGAGTTTGTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGAC TGAAGAAGATCTTAAACAGAATGCGGCGAGGCGCGTGGCAGTCCAGCTTCA GCACCGGGACAGTGCCTTTCGCCCCGCTGGCGGCGCGGCCACCGCCGCT CAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCCCCTC CCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCGCGCCGCCCGGCCAGCCGGACCGCACCCAC GCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCG GCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCTGTC CTGAGAGCGCAG	807
SP0022 (配列番号 85)	CTTCCTCTTATATTTTACCAAGACTCAGTTTCTGAGCAAGAAACCACAGGCAC AGCAAGTGCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTTACACTCCAAT CTCCACTTCTTCTCAAGGCCTCAAAAAAAGTTGAAAAATGAAAACAAAAGCC CTGCTGTGTGAGCTGGGCTCTGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGG TGCTCCTGCTCTGCCCCGGCTCAGCTCATGCTGGGCTGCACCTTCTGGAAGGG AGCATGGACTTTGGAATGACTGGTTAGAACCCAAATGAATTAATGGAATTTGA CATAGTTCAAAAATAAAAAATGTGATACCCATGAAATGCTGATATTCTGCCT TAATTTGCCAGATTGGGGGCCGCGGCGAGGCGCGTGGCAGTCCAGCTTCA GCACCGGGACAGTGCCTTTCGCCCCGCTGGCGGCGCGGCCACCGCCGCT CAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCCCCTC CCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCGCGCCGCCCGGCCAGCCGGACCGCACCCAC GCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCG GCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCTGTC CTGAGAGCGCAG	701
SP0028 (配列番号 86)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCTGTT TGACAAGGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCAC CCAAGCCCTGACCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAAC AGGAAAGGCAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAA GCTTTTTGTCTCTTCTCATTCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGT GGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACC GTCTTTTGTGGGAGAAAAAATGTTGCTGCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCC TTCCCACCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGAT TGGAGCCAAGAGTTTGTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGAC TGAAGAAGATCTTAAACAGAAAGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTC CTGGGCGCGTACAGCCGCGCTATTCTCAGCGTCTCTCCTTTATGGCTCCGGA AGTGAGCTGGGGTGTGTCAGCGCTGGCTGGCACTGGGCTAGGCCTGCGCACCC CACCCACCGACCCCTACCCACCGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCC TGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGACCCGCTCCTGCTCTGGCAGTCCCAG	913

10

20

30

40

【表 10 - 5】

	ATGGGACTTGGACCCCGAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGA TCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGGCGATCCCACGGTTCCCGGGGGGGGGGGCC GGTCGCCCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTGGGA AACTCCCCGA		
SP0029 (配列番号 87)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCGTT TGACAAGGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCAC CCAAGCCCTGACCCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAAC AGGAAAGGCAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAA GCTTTTTGTCTCTTCTCATTCTTTAGAACACAAGCCTCTTTTCTGCCTGT GGCCATCGGTACTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACC GTCCTTTGTGGGAGAAAAACAATGTTGCTGCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCC TTCCCACCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGAT TGGAGCCAAGAGTTTGTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGAC TGAAGAAGATCTTAACAGAAAGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTC CTGGGCGCGTACAGCCGCGTATTCTCAGCGTCTCTCTTTTATGGCTCCGGA AGTGGACTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGCTGGCACTTGCGGCGAGGGCGCGTGC CACTGCCAGCTTACGACCCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCTGGCGGGCG CGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGGCGCGTACGCTACTCGCCGGTCCCC GCAAATCCCCCTCCGGCCACCTTGGTGCCTCCGCGCCCGCCGGCCAG CCGGACCGCACCACGCGAGGCGGAGATAGGGGGCACGGGCGCGACCATCT GCGCTGCGGGCGCGGCGACTCAGCGTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGA GGAGTCGTGCTGCTGAGAGCGCAG	928	10
SP0011 (配列番号 88)	CTAGCCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGCTCATTGGA CCAACCCGAAACTGTTCAAGGAAGATCAGGGAAATCAACTCAGTTACAAATG GGATAATCATGCCAGTAAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTG TTCCATCTTAGGTCACTATGCAGAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAA AGAGGGTGGCCCTCCTAGCTGGGAACAGTCAACCTTAGGAACTAGACTGT CAACACATCAGCCAGCCAGAGACAAGGGAAACCGTGGCAACCAAGTGTGCT GGCACATTGTGAGGTGGTATGGGAAGTGCAGAGGCCCTGCACAGCATGCTA ATGAGCCAGGCAAAACATGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCAAACCC ACCCCTCAGGCTATGCCAGGGGTGTTGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAG TCTAGCCACTCCTTCATAAAGCCCTCGCATCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGA GC	529	20
SP0034 (配列番号 89)	TCCAAAGAAAAGCCAGATAAAGTAGCTGATTATTGCATAGAGCTGACAGTATCA CAGGAAGATCAGTAGTAGCAGCTCAAGTACAAAAAGGTTAATTAGCAATACT TAATAAGAAAAACTACCTCTGGCAGGTGAAGAGTTAATCCCTGGTCAATTTA AGCTACTCTGCTGAGAGTACTAATAAGTGTAGGGGTTGGAGCCAATGAGGGTG ACCCCTTCTTATGATGGGAACAGTCAATCCCTTAGGAACTGCCCTGGAAAGCATC AGCCAGCCAGAAAAACAGGGAAAGAGGCTGAGAAACCGTGGTAACCAAGTTTT GCTGGCACTTTGTAATAAGTAACTGCAACTGCCGAGGCTGTGCAGAGAATGC TAATAAGCCTAGGACAACTGTAAAGAGTGGACCTAGAAAATGTCCACCCGCT AGAGAGAGGGGAGCGAGCATGTGCGATGAGCAATAGCTGTGGACCTTACAGTT GCTGCTAACTGCCCTGGTGTGTGTGAGGGAGAGAGGGGAGGGAGGGAGAGA GAGCGCGCTAGCGCGAGAGAGCGAGTGTGAGCAAGCGAGCAGAAAAGAGGTGG AGAGGGGGGAATAAGAAAAGAGAGAGAAGGAAAGGAGAGAAGGCAGGAAG AAGGCAAGGGACGAGACAA	646	30
SP0035 (配列番号 90)	CTAGCCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGCTCATTGGA CCAACCCGAAACTGTTCAAGGAAGATCAGGGAAATCAACTCAGTTACAAATG GGATAATCATGCCAGTAAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTG TTCCATCTTAGGTCACTATGCAGAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAA AGAGGGTGGCCCTCCTAGCTGGGAACAGTCAACCTTAGGAACTAGACTGT CAACACATCAGCCAGCCAGAGACAAGGGAAACCGTGGCAACCAAGTGTGCT GGCACATTGTGAGGTGGTGTGATGGAACTGCAGAGGCCCTGCACAGCATGCTA ATGAGCCAGGCAAAACATCGCTAGAGAGAGGGAGCGAGCATGTGCGATGAGC AATAGCTGTGGACCTTACAGTTGCTGCTAACTGCCCTGGTGTGTGTGAGGGAG AGAGAGGGGAGGGGAGAGAGAGCGCGCTAGCGGAGAGAGCGAGTGAGC AAGCGAGCAGAAAAGAGGTGGAGAGGGGGGAATAAGAAAAGAGAGAGAAG GAAAGGAGAGAAAGCAGGAAGAAGGCAAGGGACGAGACAA	614	
SP0036	CTAGCCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTG	695	40

【表 10 - 6】

(配列番号 154)	<p>CTCATTGGACCAACCCGAAACTGTTTCAGGGAAGATCAGGGAAT CAACTCAGTTACAAATGGGATAATCATGCCAGTAAAACTACC TGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTGTTCCATCTTAGGTCATAT GCAGAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAAAGAGGGTGG CCCCTCCCTAGCTGGGAACAGTCAACCCTTAGGAACTAGACTGT CAACACATCAGCCAGCCAGAGACAAGGGAAACCGTGGCAACCA AGTGTGCTGGCACATTGTGAGGTGGTGTGGGAACTGCAGAGG CCCTGCACAGCATGCTAATGAGCCCAGGCAAACATTCGAGTTGG CTGGACAAGGTTATGAGCATCCGTGTACTTATGGGGTTGCCAGC TTGGTCCTGGATCGCCCGGGCCCTTCCCCACCCGTTCCGGTCCC CACCACCACCCGCGCTCGTACGTGCGTCTCCGCCTGCAGCTCTTG ACTCATCGGGGCCCCCGGGTACATGCGCTCGCTCGGCTCTAT AGGCGCCGCCCCCTGCCACCCCGCCGCGCTGGGAGCCGCA GCCGCCGCCACTCCTGCTCTCTGCGCCGCCCGTCCACCACCG CCACCGCCACCGGCTGAGTCTGCAGTCTCGAG</p>		10
CNS-1 (配列番号 91)	<p>CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGT GCTTCCTGGGCGCCTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCC CTGTCTGGGAGATGAGCATTTAGGAATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGG GAGGGCCGGGGTGGAGGGCGCATCCCCACGGGGAGATTGGATGGAA ATGGCCTGCCAGTGTGTGTGTGAGTGTGCGCCTGTGGCAGCAGCAGAG TAAACAGCCGCTGCCCTGTCTCTGCGGCCGTGGCCAGGTACACAG GCCTGTTTGGACAGCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGG CTGATAGATGGGGATGGGCGGACTGTTAACCCCTCGTTGCCTGCACTG CTATGTGCTTCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGTAGCCAGAAGGTG GTCTGGCTGTGCCCCAGCTCCTCTTAGGGGGGAAAACCTCTAGTTCT GAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGGGCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCT CCTCCCCGACCAGGGAGCCAAGGACAGAGGAGAAGGGGGTCTTCCC CAGTGGTACTAGGGGCAGAATATGTCTCTGAGTGAGTGTCTGGAGCC CTCCTCACCCCAACACCATGGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGC CATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG</p>	696	20
CNS-2 (配列番号 92)	<p>GGTGTGTGGAAGGGTGAGAGGCACACACAGACACTGAAAGAATCC TAGGCCTGGTAGGCACTTAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTA TTGCTGTTAGAGACCCAAGCCCTCATAGGAACAGTGAGAAACAGGTG CAGAAAGGCGGAGTAACCTTTATCTAAAGTCATAGGCTCCCTGAATAGC AGAGCTGACACCTACAAGGAAGCGTTGGAGACCAGATCTACCAGTA GCCTCCCTGAGACCACGAGGTGGCGCCGACGACCCGCTGTGGCCGAT GCCAGCCAGGTAGCCGGTTTCCCACGTCCCCCGCACGCACGCACCTCT TTGCTGCAGGAATCCCGGGCTGCCCGACCTGGAGTAGGGGGGGTGGT GAGTGGGACTGAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCTCACTTCGTTCCCTGTA CATCCAGCTCGCCTGTAGACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGAGGAC TCAAGCGCAACTTTGAATCATACGCCTTCGACAGTCCGCGCACGTTTA TTTCATTTATCTTTGAAAACGAGGGAGGGGAAGCCTGGAGAAGGCGGG ATGGGCCAAGGGTGAGTTGGCCCCGGGAGCTGGTCCCTGTTCCCTGG CTTTAGTCCCAGGGGCGCGTCTGTGTGTAGGGCGGGCTGGGCATAAA AGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG</p>	709	30
CNS-3 (配列番号 93)	<p>TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGC GG GCTGGACATGAGCAGCGGCTGCCGGTCTGGGACTAGGCCCCGCCATT TTGGATCCGCTGACAGGTCAGCGAAGTCTTTCCTAGAGTTCGGTGTG GTGAAGGCCGCCCTGACATCGCAATAGGGAATAGTGGGAAGGGCCCT TAAATTGGGCGAGCCAAGGTGGGGGGAGGATTGGAACAGAGACAAA GGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAAATCGGCGAAACTTG AGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCCGCGGCCCGTGC GCCTT</p>		40

【表 1 0 - 8】

	<p>agatagcaatagacactgactgtggctttgtgtgatgtccagtgftttcctgacataatftaagacataataaaaaccag cagcatcttccctcttgagaagcftaatgccaatattattgtctccaggggaagatcatgtatgctcataatcgggtgcta atftccaccagtagcctcatgttttaggcattaggcactataaactgtaaattgagccttcttgattgattcatgcaagcctc atctcggctcctgaggggaagtcacccggctgacccttttactactaaaagaagagatttgttcttctttccacctgg aacatcaaaattgactgaataatctgtaatacattagtgctgacattgttagggagaattaacaagacacagtaatcatt cccagaataaaaattgtttgatttccagcagagtcttaftaaaggaggacagaatctgtctctccaagtgggaaa atcgtgaatattccctgcaltaatgaaccaagtaacacttaattgctatagaaccgagttctccaatgacagcattaaa agatagggaggctctgatttaTGGTCAACACAGATTTGTAACCC</p>		
<p>CNS-7 (配列番号 97)</p>	<p>TCAACATGGATAACCAAAGTTCTTaaaactacgcttcaatgaacacatatccttgagcaagact aataatgaggaaatgggagccagctcctgtgatattatgcaactactaaattctcactgaagcaatgggagttgcttac glaagggctgcaaaactttagcctccagagattaaggggaaaaaaactcttaaactcttcaacattaatattgctgtaa ggatccagccatgacctaagccatggagcttctgaacctagcaagtagaagggtaacagtaaacaccagttatftt aagcacaatctaactagagtcaatgagaagcaatattatattgatcttaaggtattaacttgtatatactatttagac atctttatgtatgctcattatccaaacaatggcttaagtctgtggtattfaataatcaagttccatggccgtgagactgagt gggagtggggatgaagcctttttctcatttttttctcagggtcaattctgtgtaataataagagaagtgtggcctcctt ctcatagcactaaaagtgagataatccctgtgtaagaaatcagtaagtagcggctctgcttaactctagcccagtggaac tgttgacattgtctttttctatcattatgtgactggcctgtttgtgctgattaggcacaatctcctatgagcagcatt ggcatgtactagtagttaacttcaataaatgtatgaagaaaatgtaatccatgacaagggaagcaagaaaagtatttt ttttttttctctcccaaatcctttggaatgagtaatttcaacattttatgfttgatttatatttacaattcaacttcata gtgatattaaaaagaactttggcaaatgctgcaaaaaacacacctttacaattttaaagtgtattactgatggcca gaactgttaaacatagtaggaatfaaataatttattcatcttattcattttcagggccgtaaagcctcctctgagtcattcc caataacaagaatttctaccagtaaagctattaacaggcatcaaatagggagtgctaaattaagatgagattgtaa agcaataagaacatacgcagactgcatagagtgcaaatgacgtttctgattgaaatgtttatagctaaatgatttg gctgaattaaacacaatgttccaaagataagccgtagctggctctctttttctgttttttaagctgcttacagacgaa aatggaactatatttgaacaatgctttctgtttttccatactatgatatttgggaaagtcacaaaatggcctaagggaagc taagctgcccccaagcagtggtcacttacaagtaactttgtactctgtactcctgtcacatttggggcatcagagcaaca gctgggagacttttcaacaagatgagtgtagataatcctgatgagattccacatccaacatctttgtaattatgtca cattcagctgtaatggaataattcaagctgaaagaacaagctttgatccttttaaaccttccctgtggactggctatcta aaagattaaagatatttctgttacagatctagtttctcagagaagctatgcttctgaagcatcgtgatctacaagaa caatatcaagtttccaacacatttctgaaagcatcgtgtttggggggaggggtgtattaatgaagatatcaataata tgctatgcttcaatttctaggtgatcaagattctttctgtctgcatcacaataggcagacagaaaagtattgaa atacattaTGGAGATGTGTCATTGCACA</p>	<p>1941</p>	<p>10 20</p>
<p>CNS-8 (配列番号 98)</p>	<p>GCTGGTGCTTCTTTTTCTGTTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATG GAACTATATTTGGAACAATGCTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTG TGGAAAGTCACAAAATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAG TGGTCACTTACAAGTACTTTTGTACTCTGTACTCCTGTACATTTGGGC GATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTTCAACAAAGATGAGTGTGAG ATAATCCTGATGAGATTCCACATCCAACATCTTTTGTAAATTATGTCACA TTCAGCTGTAATGGAATAATTCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGATCCT TTCTTAAACCTTTCCCTGTGGACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATAT TTCTGTTACAAGATCTAGTGTTCCTCAGAGAAGTCATGCTTCTGAAGC ATCGTGATCTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATTTCTGAA AGCATCGTGTTTTGGGGGGAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCAATA ATATGC</p>	<p>540</p>	<p>30 40</p>

【 0 1 1 9】

【表 1 1 - 1】

表11- CNS特異的プロモーター

名称	配列	長さ
CNS-1 (配列番号 112)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGT GCTTCCTGGGCGCCTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCC CTGTCTGGGAGATGAGCATTAGGAATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGG GAGGGGCCGGGGTGGAGGGCGCATCCCCACGGGGAGATTGGATGGAA ATGGCCTGCCAGTGTGTGTGTGAGTGTGCGCCTGTGGCAGCAGCAGAG	696

【表 1 1 - 2】

10

	TAAACAGCCGCTGCCCTGTCTCTGCGGCCGTGGCCAGGTACACAG GCCTGTTTGGACAGCTGCCCTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGG CTGATAGATGGGGATGGGCGGACTGTTAACCCCTCGTTGCCTGCACTG CTATGTGCTTCCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGTAGCCAGAAGGTG GTCTGGCTGTGCCCCAGCTCCTCTAGGGGGGAAAACCTCTAGTTCT GAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCT CCTCCCGCACCTACAAGGAAGCGTTGGAGAGAGAAGGGGGTCTTCCC CAGTGGTGACTIONGGGAGAAATATGTCTCTGAGTGTGTCTGGAGCC CTCCTACCCCAACACCATGGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGC CATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	
CNS-2 (配列番号 113)	GGTGTGTGGAAGGGTGAGAGGCACACACAGACACTGAAAGAATCC TAGGCCTGGTAGGCACTTAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTTA TTGCTGTTAGAGACCCAAGCCCCCTCATAGGAACAGTGAGAAACAGGTG CAGAAAGGCGGAGTAACCTTATCTAAAGTCATAGGCTCCCTGAATAGC AGAGCTGACACCTACAAGGAAGCGTTGGAGACCAGATCTACCAGCTA GCCTCCCTGAGACCACGAGGTGGCGCCGACGACCCGGCTGTGGCCGAT GCCAGCCAGGTAGCCGGTTTCCCACGTCCCCCGCACGCACGCACCTCT TTGCTGCAGGAATCCCGGGCTGCCCCGACCTGGAGTAGGGGGGGTGGT GAGTGGGACTGAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCTCACTTCGTTCCCTGTA CATCCAGCTCGCCTGTAGACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGAGGAC TCAAGCGCAACTTTGAATCATCACGCCTTCGACAGTCCGCGCACGTTTA TTTCATTTATCTTTGAAAACGAGGGAGGGGAAGCCTGGAGAAGGCGGG ATGGGCCAAGGGTGAGTTGGCCCCGGGGAGCTGGTCCCTGTTCCCTGG CTTTAGTCCAGGGGCGCGGTCTGTGTGTAGGGCGGGCTGGGCATAAA AGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	709
CNS-3 (配列番号 114)	TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGGCG GCTGGACATGAGCAGCGGCTGCCGGTCTGGGACTAGGCCCCGCCATT TTGGATCCGCTGACAGGTCAGCGAAGTCTTCTCTAGAGTTCCGGTGTCT GTGAAGGCCGCCCTGACATCGCAATAGGGAATTAGTGGGAAGGGCCCT TAAATTGGGCGAGCCAAGGTGGGGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAA GGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAAATCGGCGAAAATTG AGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCGTGCCTT CCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCTCGGGGTAGCGGCCCAACCCACT TCGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTTACT CTCGCCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTG CCACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTG GCCAGAGGGCGGGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCCCTCCCTCA AAGGCGGGCCTGGAGATCCACAGCTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCA GGGCAGCTGGAAAGGGGCGGGCCTGACGCGCGGGCTCGCCGCGGC GGGCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGGCTGG GGTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAGCG CC	
CNS-4 (配列番号 115)	AAGGAGAATGGTAAACAGCAGGAGCGAAGCGGCTGAGGAGAAAAGAA GAGGAAAAGAAAGGCGAGACGTGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAG GGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAAATCGGCGAAAATTGA GTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCGTGGCGCTTC CCACCTGGCGCCGATCCACTTTCTCGGGGTAGCGGCCCAACCCACTT CGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTTACTC TCGCCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGC CACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGG CCAGAGGGCGGGGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCCCTCCCTCAA AGGCGGGCCTGGAGATCCACAGCTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAG GGCAGCTGGAAAGGGGCGGGCCTGACGCGCGGGCTCGCCGCGGGC GGCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGGCTGG	

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

	GGTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAGCGC CCGAGCGGAGAGGCGGCCCGGAGCAGGGGGCGGCCCCACTCCGG CCGGGTGCCCGGCCCTGGCCCCTGCCTGCCCTCTAGATCGCCGCGC AGCCGCCGCTACTGGGAGTCTG	
CNS-5_v2 (配列番号 116)	ttgtAATGGGAATAAGGGCAGGA Ctcctgggtataagtagctcagctgatccaccctgctctatgt gtaattcatttattcattcaacaagcattgtgaaatgctcttggctcaggctcagcaggagcagtggaataaa atggtgaaacaagaagactcggggttctcatctatgffgatgtctgcagagaacagatcagcctctaggaagttgt aatcagatacattgtagagagatactatctagtaaatcctactatcctataaaggctcaaaaacaatgcctctatgaaa ccttccgtgatccctcaggcagagtaagagcttcttctggcctctatctctcattagfataaactgfttacca gtttccctctagactaaatttctcaaaagagagaatgaggctcttctcagctcttcttcaactgaaactgctgggtcc cagcctgttggatgaaagaacaagaactgatacaagccacagcccctggcaaaaaagatacccaatagcaatg gcaatgtaaaatcagtttagtaaatgaaatcaagaattctgatgctttagggaagtaagtgaacctggcaccattaaca aattcagaactcttctcttaggagctcttaactgaacagacagaggatgtcaaccctaattcagcttgatctatct cagcaactacatttaagtagacagtgaggaaaaagagagctgtccacfttaaatcagatatttcaactaaacaatggc aatggctaatactttaaagcctattctctcaagaactgcaatggaacatttagacttgggaaagagattagtgatt tacattgctatctcactgatttaalltaaatgctcttcaaaaacaaacacatgtgccgaagaggctactaagaaacca acatgcagagttctctataagtcagccgacagtgtagctgaaactaaactggaaatccaggccataatgcacaat atcaagcaataaaacggcatctcttggcaatfttafttaaaaaagaagaagagacagcggaagatcaggcactgt ctgtttggaggatcaaccattctgacattcaaaagcattggctcctgcaatccaggctactgtctagaactctgactatt atatcgcagttgtgagaggagggcaaatggtttactcagtgattaggcccttagaataagcctctagctcctaga gagacagctcaccacttattcattggccaattcacaagcctaggaaatataacatccatgctgagaaagacaagc gaatgcagacggtgaaaaagaaataaaaatttfaaaaactctgagatgactcattattttccacaaggaactttag gaaagtgttttagtagagaaaaaccattgacctctctaaaccctaattcttcttgggctgactgctttgtgtgt aagcactggctcgcctcgcctcttctcactggaaactgagagaaaaagactctggagaaacagtttctgtccag ggacacaaacctgacactgtaaacatgagatgccaggaaaacacactfaaaaaaaaattccacttaagctttag gactgaatgtgagaaaggagatgataaaaagagtatcacaGAGAATCTTCAGGCTGTGGG	1744
CNS-6_v2 (配列番号 117)	TTTGGCACTGTGAGCAGTTTACTtgacaaattctgcaaatattgcttctgaaatctcgagaattgg ttgaatataattgacttaattgctcaaaataataaatatggactaaggacgttctatcattatttgcagaaaagaga gttgcattctgaaaatttaattgcaaggctctattccaatagcaagggagcactattgctaataagactcagagctt gaaaataaataaatttggaaactgctgacatcttgggggtgacattgacagctctttatagcacagaacgaaaca gtttgtgagctggaattcaattgtggcgtattgcttctcagctcattatccctgctgattgacaggtgaaaattggtt acgttaagtattcaatgattatattggctgacatttggcctgctcttctgctcaatatttggtaagatctccagctttag agatagcaatagacactgactgtgcttfttggatgttccaggttttctcagataaatttaagacataaaaaaccag cagcatcttccctctgagaagcctaatgccaatattatgtctcaggggaagatcatgtatctcataatcgggtgcta atttccaccagtagcctcatttaggcaatagcactataactgtaaaattgagccttctgattgattcagcagcctc atctcggctcctgaggggaagtcatcggctgacccttttacactaaaagaaagatttggcttcttcttccactgg aacatcaaatgactgaataaactgtaatacattagtgctgacattgttagggagaaataaacagacacagtaatcatt cccagaataaaaattgtgttattccagcagagcttcaaaagggagacagaatctgtcttcccaagggtgaaa atcgtgaataatccctgcattaatgaaccaagttaacacttaattgcttatagaaccgagttctccaatgacagcattaa agataggaggctctgatttaTGGTCAACACAGATTTGTAAACC	1104
CNS-7_v2 (配列番号 118)	TCAACATGGATAACCAAGTTCTTaaaactacgtttcaatgaacacatactctttagcaagact aataatgaggaaatgggagccagctcctgtgatattatgcaactactaaattcactgaagcaatgggagtttgccttac gtaaggctgcaaaacttagcctccagagattaaaggggaaaaaatccttaactcttcaacattaatattgctgtaa ggaaaccagccatgacctagccatggagcttctgaaactagcaagtagaagggtaaacagtaaacaccagtaattt aagcacaatctaatcagagttcaatgagaagcaatataattgacactaaggtatataacttgatatactatttagac atctttatgtagccattatccaaacaatggcctaagctctgtgtatttaataatcaagttcctgctgagactgagf gggagtgaggatgaagccttttctcaatttttctcaggtgcaattctgtgtaataaagaagaagtgggccttctct ctcatagcactaaaagtgagataatccctgtgtaagaatcagtaagtacggctcttaactctagctccagtgtaaac tgtgacattgttcttctatcattatgtagctggcctgtttgtgctgalltaggcacaaatctcctatgcagcactt ggcatgtactagtgtaactcaataatgtagaagaaaatgtaacatgacaaggagcaaaagaaaagtattt tttttttttcttctccaaactccttgaatgagtaattatcaactttatgtttgatgtatatttacaattcaactccata gtgatatttaaaaagaaacttggcaaatgcttgcaaaaacacactttcaaattttaaatgtgattactgagtgcca gaactgttaaacatagtaggaaatataattatctatcttcttctcagggcgttaaacgctcctctgagctatcc caatacaagaatttctaccagtaagcttaaacaggcatcaaaaataggggagtgctaaaatgagatgagattgtaa	1941

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

	agcaataagaacatacgcagactcgcataaggagtgcaaatgacgtttctgattgaaatgffatagctaaatgagttg gctgaattaacacacaatgtccaaagataagccgtagctggtctcttttctgttttaagctgtttacagacgaa aatggaactatattggaacaatgctttctgttttccatactattgattgtggaagtcacaaaatggcctaagggaagc taagctcgcaccaagcagtggtcacttacaagactttgtactctgtactcctgtcacattggcgatcagagcaaca gctggggagacttttcaacaagaatgagtgatcagataatcctgatgagattccacatcaacatctttgtaattatgca cattcagctgtaatggaataaactaagctgaagaacaagcttgatccttttaaacctttccctgtggactggctatcta aaagattaaagataattctgttacaagatctagtttccagagaagctgcttctgaagcatcgtgactacaagaa caatatcaagttgccaacacattctgaagcatcgtgtttggggggagggtgtatttaagaagatatcaataata tgctatgcttcaatttcatctagctgacgaagattcatttctgtctcatcaaataggcagacagaaaagtgattgaa atacattaTGGAGATGTGTCATTGCACA		
CNS- 8_v2 (配列番号 119)	GCTGGTGCTTCTTTTTTCTGTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATG GAACTATATTTGGAACAATGCTTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTG TGGAAAGTCACAAAATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAG TGGTCACTTACAAGTACTTTTGTACTCTGTACTCCTGTACATTTGGGC GATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTTCAACAAGATGAGTGTGAG ATAATCCTGTATGAGATCCACATCCAACATCTTTTGTAAATTATGTGACA TTCAGTGTAAATGGAATAAATCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGATCCT TTCTTAAACCTTTCCCTGTGGACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATAT TTCTGTTACAAGATCTAGTGTTCCTCAGAGAAGTCATGCTTCTGAAGC ATCGTGTACTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATTTCTGAA AGCATCGTGTTTGGGGGGAGGGGTGTATTTAATGAAGATATCAATA ATATGC	540	10
CNS-1 + CMV- IE UTR および イントロン (配列番号 120)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGT GCTTCTGGGGCGCTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCC CTGTCTGGGAGATGAGCATTTAGGAATCTGCTTGTGCAAGGGTGGTGG GAGGGGCCGGGTGGAGGGCGCATCCCCACGGGGAGATTGGATGGAA ATGGCCTGCCAGTGTGTGTGTGAGTGTGCGCCTGTGGCAGCAGCAGAG TAAACAGCCGCTGCCCTGTCTCTGCGGCCGTGGCCAGGTACACAG GCCTGTTTGACAGCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGG CTGATAGATGGGGATGGGGCGGACTGTTAACCCCTCGTTGCCTGCACTG CTATGTGCTTCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGTAGCCAGAAGGTG GTCTTGGCTGTGCCCCAGCTCCTCTAGGGGGGAAACCTCTAGTTCT GAGTCAGGGACAGAGTGAAGAGGGCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCT CCTCCCCGCACCAGGGAGCCAAGGACAGAGGAGAAGGGGGTCTTCCC CAGTGGTGAAGTGGGGCAGAATATGTCCTCTGAGTGAAGTGTCTGGAGCC CTCCTCACCCCAACACCATGGGGCTGGGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGC CATCTATTGCTTACATTTGTGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTG TTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCG GGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGAAGTAAAG TACCGCTATAGACTCTATAGGCACACCCCTTTGGCTCTTATGCATGAA CGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCG CCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCCCTTCCATGG GTCTTTTCTGCAGATGCCACC	982	20
CNS-4+ CMV- IE UTR および イントロン (配列番号 121)	AAGGAGAATGGTAAACAGCAGGAGCGAAGCGGCTGAGGAGAAAAGAA GAGGAAAAGAAAGGCGAGACGTGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAG GGAGGAGAGACGGACAGCAGCAAGTGGAGAAAATCGGCGAAAATTGA GTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGCGGCCCGTGCCTTTC CCACCTGGCGCCGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGCCCAACCCACTT CGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCTACTC TCGCCCACTTGGCTCTGCCAAGCGTCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGC CACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTTG CCAGAGGGGCGGGTCTTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCCCTCCCTCAA AGGCGGGGCTGGAGATCCAAGCTGGAAGGGGCGGAGCCCCAGCAG GGCAGCTGGAAGGGGCGGGCCCTGACGCGCGGGCTCGCCGCGGGC	876	30
			40

【表 1 1 - 6】

CNS-8 (配列番号 125)	GCTGGTGCTTCTTTTTCTGTTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATG GAACTATAATTTGGAACAATGCITTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTG TGGAAAGTCACAAAATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAG TGGTCACTTACAAGTACTTTTGTACTCTGTACTCCTGTACACATTTGGGC GATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTTCAACAAAGATGAGTGTGAG ATAATCCTGATGAGATTCCACATCCAACATCTTTTGTAAATTATGTCACA TTCAGCTGTAATGGAATAATTCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGATCCT TTCTTAAACCTTTCCCTGTGGACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATAT TTCTGTTACAAGATCTAGTGTTCCTCAGAGAAGTCATGCTTCTGAAGC ATCGTGATCTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATTTCTGAA AGCATCGTGTTTTGGGGGGAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCAATA ATATGCGGGCTGGGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTAC ATTTGCTTCTG	593
------------------------	--	-----

10

【 0 1 2 0 】

【表 1 2】

表12-表11のプロモーターに含まれるミニマル/近位プロモーター

名称	配列
SYN_P_CRE151 (配列番号 126)	GGGCTGGGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG
CRE0001v1_Pitx 3 (配列番号 127)	GGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGG AGAAAATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCG GCCCCGTGCGCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGCC AACCCACTTTCGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCTA CTCTCGCCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTCCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCAC GTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGG CGGGGTTCTTGGCGTCTCGCCGCGCCAGACCCCTCCCTCAAAGGCGGGGCTGGA GATCCACAGCTGGAAGGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCAGCTGGAAGGGGCGG GGCCTGACGCGCGCGGCTCGCCGCGGCGGGCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATA AAGTGAATGGGCGCCGGCTGGGGGTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCC GAGAGTCCAGGAGCGCC

20

30

【 0 1 2 1 】

40

50

【表 1 3】

表 13-合成 CNS 特異的プロモーターの概説

プロモーター名称	ミニマル/近位プロモーター	CRE	UTR
CNS-1	SYNP_CRE151	CRE0004_Lmx1b	
CNS-2	SYNP_CRE151	CRE0003_Pitx3	
CNS-3	CRE0001v1_Pitx3	CRE0002_Gbf1	
CNS-4	CRE0001_Pitx3		
CNS-5_v2	CRE0005_faf1		
CNS-6_v2	CRE0006_Pitx2		
CNS-7_v2	CRE0007_Pitx2		
CNS-8_v2	CRE0008_Pitx2		
CNS-1 + CMV-IE UTR およびイントロン	SYNP_CRE151	CRE0004_Lmx1b	CMV-IE UTR および イントロン
CNS-4 + CMV-IE UTR およびイントロン	CRE0001_Pitx3		CMV-IE UTR および イントロン
CNS-5	SYNP_CRE151	CRE0005_faf1_short	
CNS-6	SYNP_CRE151	CRE0006_Pitx2_short	
CNS-7	SYNP_CRE151	CRE0007_Pitx2_short	
CNS-8	SYNP_CRE151	CRE0008_Pitx2_short	

10

【 0 1 2 2 】

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表14-例示的なCRE

名称	配列
CRE0006_GFP (配列番号 99)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAAGGGCTCCTCTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCCGCCGCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCA
CRE0008_GFP (配列番号 100)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAAGGGCTCCTCTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCCGCCGCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCACCGGGCTGGAGAACAGGCTCTATTAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGA TCAGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCT GTCTGTCTCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGA
CRE0006_AQP4 (配列番号 101)	CTAGCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGCTCATTGGA CCAACCCGAAACTGTTTCAGGGAAGATCAGGGAAATCAACTCAGTTACAAATG GGATAATCATGCCAGTAAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTG TTCCATCTTAGGTCACTATGCAGAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAA AGAGGGTGGCCCCCTCCCTAGCTGGGAACAGTCAACCCTTAGGAACTAGACTGT CAACACATCAGCCAGCCAGAGACAAGGGAAAACCGTGGCAACCAAGTGTGCT GGCACATTGTGAGGTGGTGTATGGGAAGTGCAGAGGCCCTGCACAGCATGCTA ATGAGCCCAGGCAAACAT
CRE0008_AQP4 (配列番号 102)	TCCAAAGAAAAGCCAGATAAGTAGCTGATTATTGCATAGAGCTGACAGTATCA CAGGAAGATCAGTAGTAGCAGCTCAAGTACAAAAAGGTTAATTAGCAATACT TAATAAGAAAAACTACCTCTGGCAGGTGAAGAGTTAATCCCTGGTCAATTTTA AGCTACTCTGCTGAGAGTACTAATAAGTGTAGGGGTTGGAGCCAATGAGGGTG ACCCCTTCTTGATGGGAACAGTCATCCCTTAGGAACTGCCTGGAAAAGCATC AGCCAGCCAGAAAACAGGGAAAGAGGCTGAGAAAACCGTGGTAACCAAGTTTT GCTGGCACTTTGTAAAAATGGTAACTGCAACTGCCGAGGCTGTGCAGAGAAATGC TAATAAGCCTAGGACAACCTGTAAAGAGTGGACCTAGAAAATGTCCACC
CRE0005_GFP (配列番号 103)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAAGGGCTCCTCTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCCGCCGCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGGGCTGGGA GAACAAGGCTCTATTAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCCA GGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGTCTCCAGA AGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGA
CRE0007_GFP (配列番号 104)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGC CTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCCTTGTCTGCA AGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAAGGGCTCCTCTTCATGCC CAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCC TGCTTCCCGCCGCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGA GCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAA GCAGCAC
CRE0012_Arc (配列番号 105)	AGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGCGCGTACAGCCGCG CTATTCTCAGCTCTCTCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTGTGGC AGCCTGGCTGGCACT

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

<p>CRE0001 - S100B (配列番号 106)</p>	<p>CTTCCTCTTATATTTACCAAGACTCAGTTCCTGAGCAAGAAACCACAGGCAC AGCAAAGTGCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTTCACACTCCAAT CTCCACTTCCTTCTCAAGGCCTCAAAAAAAGTTGAAAAATGAAAACAAAAGCC CTGCTGTGTTGAGCTGGGCTCTGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGG TGCTCCTGCTCTGCCCCCGGCTCAGCTCATGCTGGGCCTGCACTTCTGGAAGGG AGCATGGACTTTGGAATGACTGGTTAGAACCCAAATGAATTAATGGAATTTGA CATAGTTCAAAAATAATAAAATGTGATACCCATGAAATGCTGATAATTCTGCCT TAATTTGCCAGATTGGGGGCC</p>
<p>CRE0009 - S100B (配列番号 107)</p>	<p>TTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGAC CCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGT GAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCT TCCTCACATTCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCA CTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGG AGAAAACAATGTTGCTGCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCT GACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGA GTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAA</p>
<p>CRE0002 - S100B (配列番号 108)</p>	<p>TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCGTT TGACAAGGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCAC CCAAGCCCTGACCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAAC AGGAAAGGCAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAA GCTTTTTGTCTCTTCTCACATTCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGT GGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACC GTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCC TTCCCACCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGAT TGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGAC TGAAGAAGATCTTAACAGAA</p>

10

20

30

40

50

【 0 1 2 3】

【表 15 - 1】

表15. 表11のプロモーターに含まれるシス調節エレメント(CRE)

名称	配列
CRE0004_Lmx1 b (配列番号 128)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTC CTGGGCGCCTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCCCTGTCTGGGA GATGAGCATTAGGAATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGGCCGGGGTG GAGGGCGCATCCCCACGGGAGATTGGATGGAAATGGCCTGCCAGTGTGTGT GTGAGTGTGCGCCTGTGGCAGCAGCAGAGTAAACAGCCGCTGCCCTGTCTCT CTGCGGCCGTGGCCAGGTACACAGGCCTGTTTGGACAGCTGCCTTGTCTGTCC GTCTGTTTGGGAGATGCTGGCTGATAGATGGGGATGGGCGGACTGTAAACCCC TCGTTGCCTGCACTGCTATGTGCTTCCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGTAGC CAGAAGGTGGTCCTGGCTGTGCCCCAGCTCCTCTCTAGGGGGGAAACCTCTA GTTCTGAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGGGCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCT CCTCCCCGCACCAGGGAGCCAAGGACAGAGGAGAAGGGGGTCTTCCCCAGTG GTGACTAGGGGCAGAATATGTCTCTGAGTGAGTGTCTGGAGCCCTCCTCACCC CAACACCATG
CRE0003_Pitx3 (配列番号 129)	GGTGTGTGGAAGGGTGAGAGGCACACACACAGACACTGAAAGAATCCTAGGC CTGGTAGGCACTTAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTTATTGCTGTTAG AGACCCAAGCCCCTCATAGGAACAGTGAGAAACAGGTGCAGAAAGGCGGAGT AACTTTATCTAAAGTCATAGGCTCCCTGAATAGCAGAGCTGACACCTACAAGG AAGCGTTGGAGACCAGATCTACCAGCTAGCCTCCCTGAGACCACGAGGTGGC GCCGCAGCACC GGCTGTGGCCGATGCCAGCCAGGTAGCCGGTTTCCCACGTCC CCCGCACGCACGCACCTCTTTGCTGCAGGAATCCCGGGCTGCCCCGACCTGGA GTAGGGGGGGTGGTGTGAGTGGGACTGAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCTCACTTC GTTCTGTACATCCAGCTCGCCTGTAGACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGA GGACTCAAGCGCAACTTTGAATCATCACGCCTTCGACAGTCCGCGCACGTTTA TTTCATTTATCTTTGAAAACGAGGGAGGGGAAGCCTGGAGAAGGCGGGATGG GCCAAGGGTGAGTTGGCCCCCGGGAGCTGGTCCCTGTTCTGGCTTTAGTCC CAGGGGCGCGGTCTGTGTGTAGGGC
CRE0002_Gbf1	TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGCGGGCTGG

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 2】

(配列番号 130)	ACATGAGCAGCGGCTGCCGGTCTGGGACTAGGCCCGCCATTTGGATCCGC TGACAGGTCAGCGAAGTCTCTCCTAGAGTTCGGGTGTCGTGAAGGCCGCCCT GACATCGCAATAGGGAATTAGTGGGAAGGGCCCTTAAATTGGGCGAGCCAAG GTGGG	
CRE0005_faf1_s hort (配列番号 131)	GGAACATTTAGACTTTGGGAAAGAGATTAGTGATTTACATTGCTATCTCACTG ATTTAATTTAAATGCTCTTCCAAACCAACACACATGTGCCGAAGAGGCTACT AAGAAACCCAACATGCAGAGTTCCTATAAGTGCAGCCGACAGTGTGACTGA AACTAAACTTGGAAATCCAGGGCACTAATGCACAATATCAAGCAATAAAACG GCATCTCTTTGGCAATATTTAATTTAAAAAAGAAGAAAGAGACAGGCGAAGA TCAGGCACTGTCTGTTTTGGAGGATCAACCATTCTGCATTTCAAAGCATTGGTC CCTGCAATATCCAGGTTACTGTGCTAGAATCTCGACTATTATATCGCAGTTGTG AGAGGGAGGGCAAAGATGTGTTTACTCAGTGATTAGGCCCTTAGAATAAGCCT CTAGTCTCTAGAGAGACAGCTCACCATTATTCAATTTGGGCCAATTCACAAAG CCTAGGAAGATTAACATCCATGCTGAGAAGACAAGCGAATGCAGACGGTGA AAAAGAAATAAAAATCTTTAAAAACTCTGAGATGACTTCATTATTTTTCCAC AAGGAAACTTTAGGAAAGTGTTAGTTAGAGAAAAACCCACATTGACCTCTCT CTAAACCTTAATCTTTCTTTGTGGTGGCACTGCTTTGTGGTAAGCGACTGGC TCGCCTCGCCCTCTTTTCACTGGAAGCTGAGAGAAAAAAGACTCTGGAGAAA CAGTTTTCGTTCCAGGGACACAAACCCCTGACACTGTAA	10
CRE0006_Pitx2_ short (配列番号 132)	GAAAATTTAATGTCATTGAAGCTCTATTTCCAATAGCAAAGGAGCACTATTGC TAATAGACTTCAGAGCTTGAAATAAATAAATCTTTGGAATCCTGTTGCATCTCT TGGGGTGTGACATTTGACAGTCTTTTATAGCACAGAACGAAACAAGTTTGTGA GCTGGAATTC AATTGTGGCGTATTGATTCCTTGCATCAGTCATTATTCCTGCT GATTGACAGGTGAAAATTGGTTACGTTAAGTATTTTATATGTTAATTGGCTGA CATTTGCTTGCCTGCTCTTGTGTCAATATTGTTGTAAGATCTCCAGCTTTATG AGATAGCAATAGACACTGACTGTGGCTTTTGTGTGATGTTCCAGTGTTTTCT GACATAATTTAAGACATATTA AAAACCAGCAGCATCTTCCCTCTTGAGAAGCT TAATGCCAATATTATTGCTTCCAGGGGAAGATCATGTATGCTCATAATCGGG TGCTAATTTCCACCAGTACGCTCATGTTTAGGCATTAGGCACTATAACTGTA ATTGAGCCTTCTTGATTGATTCATGTCAAGCCTCATCTCGGCTCCTGCAGGGGA AGTCATCCGGCTGACCCTTTTTACACTAAAAGAAGAGATTTGTGTTCTTTCTT TCACCTGGAACCATCAAATTGACTGAATAATCTGTAATACATTAGTGCTGACA TTTGTTAGGGAGAATTAACAAGACACAGTAATCATTTCCCAGAATAAAAAATT GTGTTTGAT	20
CRE0007_Pitx2_ short (配列番号 133)	TGAGACTGAGTGGGAGTGGGGATGAAGCCTTTTTTCTTCATTTTTTTTCTCA GGTGCAATTCGTGTTAATATAAGAGAAGTGTGGCCTTCTCTCATAGCACTA AAAGTGAGATAATCCCTGTGTAAGAAATCAGTAAGTACGGTCTGCTTAATCTA GTCCCAGTGTGAAACTGTTGACATTTGTTCTTTTTTCTATCATTATGTGACTG GCCTGTTTTGTGCTGGATTAGGCACAAATCTCCTATGCAGCACATTTGGCATGT TACTAGTAGTTAACTTCATTAATAATGTATGAAGAAAATGTAATCCATGACA AGGAAGCAAAGAAAAGTATTTTTTTTTTTTTTCTCTCCAAATCCTTTGGA ATGAGTAATTATTCAACATTTTATGTTTGATGTTATATTTTACAATTCAACTTCC ATA	30
CRE0008_Pitx2_ short (配列番号 134)	GCTGGTGCTTCTTTTTCTGTTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGA ACT ATATTTGGAACAATGCTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTGTGAAAGT ACAAAATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAG TACTTTTTGACTCTGTACTCCTGTACATTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGG GAGACTTTTTCAACAAAGATGAGTGTGAGATAATCCTGATGAGATTCCACATC CAACATCTTTTGAATTATGTCACATTCAGCTGTAATGGAATAATTCAAGCTGA AAGAACAAGCTTTGATCCTTTCTTAAACCTTTCCCTGTGGACTGGCTATCTAAA AGTTTTAAAGATATTTCTGTTACAAGATCTAGTGTTCCTCAGAGAAGTCATGC TTCTGAAGCATCGTGATCTACAAGAAACAATATCAAGTTTTGCCAAACACATTC TGAAAGCATCGTGTTTTGGGGGAGGGTGTATTTAATGAAGATATCAATAA TATGC	40

【 0 1 2 4】

本開示の態様は、2つ以上のプロモーター（例えば、2、3、4、5、またはそれよりも多くのプロモーター）を含む単離された核酸に関する。例えば、タンパク質をコードする第1の領域および阻害性RNA（例えば、miRNA）をコードする第2の領域を含む導入遺伝子を有する構築物の文脈では、第1のプロモーター配列（例えば、タンパク質コード領域に作動可能に連結された第1のプロモーター配列）を使用して、タンパク質コード領域の発現を駆動すること、および第2のプロモーター配列（例えば、阻害性RNAコード領域に作動可能に連結された第2のプロモーター配列）を有する阻害性RNAコード領域の発現を駆動することが望ましくあり得る。一般に、第1のプロモーター配列および

第2のプロモーター配列は、同じプロモーター配列または異なるプロモーター配列であり得る。一部の実施形態では、第1のプロモーター配列（例えば、タンパク質コード領域の発現を駆動するプロモーター）は、RNAポリメラーゼIII（pol III）プロモーター配列である。pol IIIプロモーター配列の非限定的な例としては、U6およびH1プロモーター配列が挙げられる。一部の実施形態では、第2のプロモーター配列（例えば、阻害性RNAの発現を駆動するプロモーター配列）は、RNAポリメラーゼII（pol II）プロモーター配列である。pol IIプロモーター配列の非限定的な例としては、T7、T3、SP6、RSV、およびサイトメガロウイルスプロモーター配列が挙げられる。一部の実施形態では、pol IIIプロモーター配列は、阻害性RNA（例えば、miRNA）コード領域の発現を駆動する。一部の実施形態では、pol IIプロモーター配列は、タンパク質コード領域の発現を駆動する。

10

【0125】

一部の実施形態では、核酸は、タンパク質をコードする導入遺伝子を含む。タンパク質は、治療用タンパク質（例えば、哺乳動物対象における疾患状態の処置または防止に有用なペプチド、タンパク質、またはポリペプチド）またはリポータータンパク質であり得る。一部の実施形態では、タンパク質は、CYP46A1である。一部の実施形態では、タンパク質は、ヒトCYP46A1である。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号2、または配列番号2を含むタンパク質をコードする。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号2に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の配列同一性を有するタンパク質をコードする。一部の実施形態では、治療用タンパク質は、ハンチントン病の処置または防止に有用であり、例えば、Marelli et al. (2016) Orphanet Journal of Rare Disease 11:24; doi: 10.1186/s13023-016-0405-3に記載される、ポリグルタミン結合ペプチド1（QBP1）、PTD-QBP1、ED11、C4イントラボディ、VL12.3イントラボディ、MW7イントラボディ、Happ1抗体、Happ3抗体、mEM48イントラボディ、ある特定のモノクローナル抗体（例えば、1C2）およびペプチドP42、ならびにそれらのバリエーションである。一部の実施形態では、治療用タンパク質は、野生型ハンチンチンタンパク質（例えば、36未満のリピートを含むPolyQリピート領域を有するハンチンチンタンパク質）である。

20

CYP46A1

30

【0126】

コレステロール24ヒドロキシラーゼは、CYP46A1遺伝子によってコードされるニューロン酵素である。これは、コレステロールを24-ヒドロキシコレステロールに変換し、脳からのコレステロールの流出における重要な役割を有する（Dietschy, J. M. et al., 2004）。脳コレステロールは、in situで、本質的に産生されるが、分解できず、無傷の血液脳関門は、脳からのコレステロールの直接輸送を制限する（Dietschy, J. M. et al., 2004）。24-ヒドロキシコレステロールは、形質膜および血液脳関門を通過することができ、それが分解される肝臓に達する。

【0127】

CYP46A1は、HDの細胞モデルにおいて神経保護的である（例えば、WO2012/049314号を参照されたい）。また、R6/2トランスジェニックHDマウスモデルの疾患におけるより脆弱な脳構造である線条体において、CYP46A1 mRNAの低減が存在する。

40

【0128】

ADの早期ステージの間に、24-ヒドロキシコレステロール濃度は、CSFおよび末梢循環において高い。ADの後期ステージでは、24-ヒドロキシコレステロールの濃度は、ニューロン喪失を反映して低下する可能性があり得る（Kolsch, H. et al., 2004）。CYP46A1は、AD患者の脳における老人斑のアミロイドコアの周辺で発現される（Brown, J., 3rd et al., 2004）。

【0129】

50

CYP46A1によってコードされるコレステロール24-ヒドロキシラーゼのアゴニズムは、神経病理の著しい減少、およびCNS疾患のマウスモデルにおける認知障害の改善を提供した。例えば、ハンチントン病モデルにおけるExpHttとのCYP46A1の共発現は、ExpHtt凝集体の形成の強く有意な減少を促進した(58%対27.5%) (WO2012/049314号) (国際特許公開第WO2009/034127号も参照されたい;これはその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。本明細書に記載される方法は、ある特定の他の標的を標的にするmiRNAの投与と組み合わせたCYP46A1のアゴニズムに関連する。例えば、方法は、神経疾患または障害の処置のためのウイルスベクターの投与に関連し得、ここで、ベクターは、中枢神経系の細胞においてCYP46A1を発現する。

10

【0130】

一部の実施形態では、神経疾患または障害を処置するためのウイルスベクターであって、このベクターが、コレステロール24-ヒドロキシラーゼをコードする核酸を含む、ウイルスベクターが本明細書に記載される。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号2に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、またはそれよりも高い配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号1に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、またはそれよりも高い配列同一性を有する配列を含む。一部の

20

【0131】

CYP46A1およびその治療的使用(例えば、アルツハイマー病、ALS、および運動失調のため)のさらなる記載は、当技術分野において、例えば、WO2012/049314号、WO2009/034127号、WO2018/138371号、およびWO2020/089154号に記載されている。そこに記載される配列、方法および組成物は、本明細書に記載される方法および組成物において利用することができる。前述の参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。「遺伝子」という用語は、転写または翻訳された後に特定のポリペプチドまたはタンパク質をコードすることができる少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含有するポリヌクレオチドを指す。

30

【0132】

「コード配列」または「特定のタンパク質をコードする配列」という用語は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合に、*in vitro*または*in vivo*でポリペプチドに転写(DNAの場合)および翻訳(mRNAの場合)される核酸配列を示す。コード配列の境界は、5'(アミノ)末端の開始コドンおよび3'(カルボキシ)末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列としては、限定されるものではないが、原核生物または真核生物mRNA由来のcDNA、原核生物または真核生物DNA由来のゲノムDNA配列、およびさらに合成DNA配列が挙げられ得る。

【0133】

CYP46A1についてのcDNA配列は、Genbankアクセス番号NM_006668(配列番号1)に開示されている。アミノ酸配列を配列番号2に示す。本発明は、神経疾患または障害の処置のための配列番号1の配列またはそのバリエーションを含む核酸構築物の使用をなす。バリエーションとしては、例えば、個体間の対立遺伝子変異(例えば、多型)に起因する天然に存在するバリエーション、選択的スプライシング形態などが挙げられる。バリエーションという用語は、他の起源または生物由来のCYP46A1遺伝子配列も含む。バリエーションは、好ましくは、配列番号1および/または2に対して実質的に相同である、すなわち、配列番号1または2と、典型的には、少なくとも約75%、好ましくは、少なくとも約85%、より好ましくは、少なくとも約90%、より好ましくは、少なくとも約95%のヌクレオチド配列同一性を示す。一部の実施形態では、核酸構築物は、配列番

40

50

号 1 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有し、配列番号 1 または 2 の活性（例えば、コレステロールを 24 - ヒドロキシコレステロールに変換する能力）を保持する配列を含む。CYP46A1 遺伝子のバリエーションは、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件下で上記に定義される配列（またはその相補鎖）にハイブリダイズする核酸配列も含む。典型的なストリンジントなハイブリダイゼーション条件は、30 を上回る、好ましくは、35 を上回る、より好ましくは、42 を超える温度、および/または約 500 mM 未満、好ましくは、200 mM 未満の塩分を含む。ハイブリダイゼーション条件は、温度、塩分、および/または SDS、SSC などの他の試薬の濃度を改変することにより、当業者によって調整され得る。

【0134】

本明細書の使用のために企図される例示的な CYP46A1 バリエーションは、配列番号 109 および 110 に提供される。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号 109 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号 109 に対して少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、またはそれよりも高い配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号 110 の核酸配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号 110 の配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、またはそれよりも高い配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0135】

一態様では、配列番号 110 に対して少なくとも 80% 同一、例えば、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99% または 100% 同一の配列を含む単離された核酸を含む組成物が本明細書に提供される。一態様では、配列番号 110 に対して少なくとも 80% 同一、例えば、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99% または 100% 同一の配列を含む単離された核酸を含む組換えウイルスベクターを含む組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、CYP46A1 タンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号 1 と比較して、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、または少なくとも 15 の突然変異を含む。一部の実施形態では、突然変異は、配列番号 1 に示される配列と比較して、少なくとも 1 つの核酸の欠失および/または付加および/または置換を含む。突然変異は、例えば、細菌配列の除去、および/または代替リーディングフレームの除去、および/または CpG の除去、および/または制限酵素部位の除去をもたらし得る。いくつかの実施形態では、前述の組成物は、例えば、本明細書に記載される神経疾患または障害を処置するための投与される miRNA の非存在下で使用することができる。さまざまな実施形態では、前述の組成物は、例えば、本明細書に記載される神経疾患または障害を処置するための投与される miRNA の存在下で使用することができる。一部の実施形態では、配列番号 110 に示される単離された核酸を含む組換えウイルスベクター、例えば、組換え AAV は、CYP46A1 タンパク質を発現するため、および/または本明細書に記載される神経疾患または障害を処置するために、処置を必要とする対象に投与される。一部の実施形態では、配列番号 110 に対して少なくとも 80% 同一、例えば、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99% または 100% 同一の単離された核酸配列を含む組換えウイルスベクター、例えば、組換え AAV は、CYP46A1 タンパク質を発現するため、および/または本

10

20

30

40

50

明細書に記載される神経疾患または障害を処置するために、処置を必要とする対象に投与される。

【 0 1 3 6 】

【 化 1 - 1 】

配列番号 1 CYP46A1 mRNA

atg agc ccc ggg ctg ctg ctg ctc ggc agc gcc gtc ctg ctc gcc ttc	48
ggc ctc tgc tgc acc ttc gtg cac cgc gct cgc agc cgc tac gag cac	96
atc ccc ggg ccc ccc cgg ccc agt ttc ctt cta gga cac ctc ccc tgc	144
ttt tgg aaa aag gat gag gtt ggt ggc cgt gtg ctc caa gat gtg ttt	192
ttg gat tgg gct aag aag tat gga cct gtt gtg cgg gtc aac gtc ttc	240
cac aaa acc tca gtc atc gtc acg agt cct gag tgc gtt aag aag ttc	288
ctg atg tca acc aag tac aac aag gac tcc aag atg tac cgt gcg ctc	336
cag act gtg ttt ggt gag aga ctc ttc ggc caa ggc ttg gtg tcc gaa	384
tgc aac tat gag cgc tgg cac aag cag cgg aga gtc ata gac ctg gcc	432
ttc agc cgg agc tcc ttg gtt agc tta atg gaa aca ttc aac gag aag	480
gct gag cag ctg gtg gag att cta gaa gcc aag gca gat ggg cag acc	528
cca gtg tcc atg cag gac atg ctg acc tac acc gcc atg gac atc ctg	576
gcc aag gca gct ttt ggg atg gag acc agt atg ctg ctg ggt gcc cag	624
aag cct ctg tcc cag gca gtg aaa ctt atg ttg gag gga atc act gcg	672
tcc cgc aac act ctg gca aag ttc ctg cca ggg aag agg aag cag ctc	720
cgg gag gtc cgg gag agc att cgc ttc ctg cgc cag gtg ggc agg gac	768
tgg gtc cag cgc cgc cgg gaa gcc ctg aag agg ggc gag gag gtt cct	816
gcc gac atc ctc aca cag att ctg aaa gct gaa gag gga gcc cag gac	864

10

20

【 化 1 - 2 】

gac gag ggt ctg ctg gac aac ttc gtc acc ttc ttc att gct ggt cac	912
gag acc tct gcc aac cac ttg gcg ttc aca gtg atg gag ctg tct cgc	960
cag cca gag atc gtg gca agg ctg cag gcc gag gtg gat gag gtc att	1008
ggt tct aag agg tac ctg gat ttc gag gac ctg ggg aga ctg cag tac	1056
ctg tcc cag gtc ctc aaa gag tgc ctg agg ctg tac cca cca gca tgg	1104
ggc acc ttt cgc ctg ctg gaa gag gag acc ttg att gat ggg gtc aga	1152
gtc ccc ggc aac acc ccc ctc ttg ttc agc acc tat gtc atg ggg cgg	1200
atg gac aca tac ttt gag gac ccc ctg act ttc aac ccc gat cgc ttc	1248
ggc cct gga gca ccc aag cca cgg ttc acc tac ttc ccc ttc tcc ctg	1296
ggc cac cgc tcc tgc atc ggg cag cag ttt gct cag atg gag gtg aag	1344
gtg gtc atg gca aag ctg ctg cag agg ctg gag ttc cgg ctg gtg ccc	1392
ggg cag cgc ttc ggg ctg cag gag cag gcc aca ctc aag cca ctg gac	1440
ccc gtg ctg tgc acc ctg cgg ccc cgc ggc tgg cag ccc gca ccc cca	1488
cca ccc ccc tgc tga gggggcctcc aggcaggacg agactcctcg ggcaagggcc	1543
gtgcccgcgc acctctgctg cccacggcca cccacccttc tcccctgccc cgtcccctgg	1603
gccacccttc acgctggctt ccagcgggcc ctctgccgac cgcctgcttc acaccctca	1663
gcgctcccctg tcgctgcgg actccatggc ccttcctgga ctggcccttg cccaactccc	1723
agccaccacc actgtcccta ccaactgagcc cttgcacagg ccacttgctc agaogagaca	1783
ccctaactct tgctcactcc ctaaagccct cttcaggggt cacctcctcc aagaagccct	1843
ccttgccacc ccccgcgggc aggggcccct cctctgtgct cctcgggtea cctgtgetac	1903
ctctaacacc aactgacca cactgtatcg tgagtgtccg ttgacgtgac caattgccc	1963
gccaggetgt cagcgcctca agggtagggc ctgcgtgtga tttgtctctg agccccctgt	2023
gcccaccag ggcccggcac agagtcatg ctcaataaat gtgtgttgac tgcaaaaaaa	2083
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa	2138

30

40

【 0 1 3 7 】

【化 2 - 1】

配列番号 2 CYP46A1 アミノ酸配列

Met Ser Pro Gly Leu Leu Leu Leu Gly Ser Ala Val Leu Leu Ala Phe
 1 5 10 15

Gly Leu Cys Cys Thr Phe Val His Arg Ala Arg Ser Arg Tyr Glu His
 20 25 30

Ile Pro Gly Pro Pro Arg Pro Ser Phe Leu Leu Gly His Leu Pro Cys
 35 40 45

Phe Trp Lys Lys Asp Glu Val Gly Gly Arg Val Leu Gln Asp Val Phe
 50 55 60

Leu Asp Trp Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Val Val Arg Val Asn Val Phe
 65 70 75 80

His Lys Thr Ser Val Ile Val Thr Ser Pro Glu Ser Val Lys Lys Phe
 85 90 95

Leu Met Ser Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ser Lys Met Tyr Arg Ala Leu
 100 105 110

Gln Thr Val Phe Gly Glu Arg Leu Phe Gly Gln Gly Leu Val Ser Glu
 115 120 125

Cys Asn Tyr Glu Arg Trp His Lys Gln Arg Arg Val Ile Asp Leu Ala
 130 135 140

Phe Ser Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu Met Glu Thr Phe Asn Glu Lys
 145 150 155 160

Ala Glu Gln Leu Val Glu Ile Leu Glu Ala Lys Ala Asp Gly Gln Thr
 165 170 175

10

20

30

40

50

【化 2 - 2】

Pro Val Ser Met Gln Asp Met Leu Thr Tyr Thr Ala Met Asp Ile Leu 180 185 190	
Ala Lys Ala Ala Phe Gly Met Glu Thr Ser Met Leu Leu Gly Ala Gln 195 200 205	
Lys Pro Leu Ser Gln Ala Val Lys Leu Met Leu Glu Gly Ile Thr Ala 210 215 220	
Ser Arg Asn Thr Leu Ala Lys Phe Leu Pro Gly Lys Arg Lys Gln Leu 225 230 235 240	
Arg Glu Val Arg Glu Ser Ile Arg Phe Leu Arg Gln Val Gly Arg Asp 245 250 255	10
Trp Val Gln Arg Arg Arg Glu Ala Leu Lys Arg Gly Glu Glu Val Pro 260 265 270	
Ala Asp Ile Leu Thr Gln Ile Leu Lys Ala Glu Glu Gly Ala Gln Asp 275 280 285	
Asp Glu Gly Leu Leu Asp Asn Phe Val Thr Phe Phe Ile Ala Gly His 290 295 300	
Glu Thr Ser Ala Asn His Leu Ala Phe Thr Val Met Glu Leu Ser Arg 305 310 315 320	
Gln Pro Glu Ile Val Ala Arg Leu Gln Ala Glu Val Asp Glu Val Ile 325 330 335	20
Gly Ser Lys Arg Tyr Leu Asp Phe Glu Asp Leu Gly Arg Leu Gln Tyr 340 345 350	
Leu Ser Gln Val Leu Lys Glu Ser Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp 355 360 365	
Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Glu Thr Leu Ile Asp Gly Val Arg 370 375 380	
Val Pro Gly Asn Thr Pro Leu Leu Phe Ser Thr Tyr Val Met Gly Arg 385 390 395 400	
Met Asp Thr Tyr Phe Glu Asp Pro Leu Thr Phe Asn Pro Asp Arg Phe 405 410 415	30
Gly Pro Gly Ala Pro Lys Pro Arg Phe Thr Tyr Phe Pro Phe Ser Leu 420 425 430	
Gly His Arg Ser Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Glu Val Lys 435 440 445	
Val Val Met Ala Lys Leu Leu Gln Arg Leu Glu Phe Arg Leu Val Pro 450 455 460	
Gly Gln Arg Phe Gly Leu Gln Glu Gln Ala Thr Leu Lys Pro Leu Asp 465 470 475 480	
Pro Val Leu Cys Thr Leu Arg Pro Arg Gly Trp Gln Pro Ala Pro Pro 485 490 495	40

【化 2 - 3】

Pro Pro Pro Cys
500

ベクター

【0138】

任意の特定の理論に縛られることを望まないが、病原遺伝子、例えば、突然変異体ハンチンチン（HTT）の対立遺伝子特異的サイレンシングは、野生型の発現および機能が細胞において保存されているので、非対立遺伝子特異的サイレンシング（例えば、野生型お

よび突然変異体 H T T 対立遺伝子の両方のサイレンシング)と比較して、対象における安全性プロファイルの改善を提供し得る。例えば、本発明の態様は、硬化した (h a r d e n e d) 野生型 H T T 遺伝子 (m i R N A によって標的にされない野生型 H T T 遺伝子)の発現を駆動しながら、非対立遺伝子特異的な様式で、H T T 遺伝子を標的にする1つまたは複数の阻害性 R N A (例えば、m i R N A) 配列を組み込む単離された核酸およびベクターが、例えば、野生型 H T T の増加した発現を有する C N S 組織において、付随する突然変異体 H T T ノックダウンを達成することができるという本発明者らの認識および理解に関する。一般に、内因性野生型および突然変異体 H T T m R N A をコードする核酸、ならびに「硬化した」野生型 H T T m R N A をコードする導入遺伝子の核酸の配列は十分に異なっており、その結果、「硬化した」野生型 H T T 導入遺伝子の m R N A は、1つまたは複数の阻害性 R N A (例えば、m i R N A) によって標的にされない。これは、例えば、1つまたは複数のサイレント突然変異を H T T 導入遺伝子配列に導入することによって達成され得、その結果、内因性野生型 H T T 遺伝子と同じタンパク質をコードするが、異なる核酸配列を有する。この場合では、外因性 m R N A は、「硬化した」と称され得る。あるいは、阻害性 R N A (例えば、m i R N A) は、内因性野生型 H T T m R N A の 5' および / または 3' 非翻訳領域を標的にすることができる。次いで、これらの 5' および / または 3' 領域は、導入遺伝子の m R N A が1つまたは複数の阻害性 R N A によって標的にされないように、導入遺伝子の m R N A において、除去または置き換えることができる。

10

【0139】

20

導入遺伝子中に提供され得るレポーター配列 (例えば、レポータータンパク質をコードする核酸配列)としては、限定されないが、-ラクタマーゼ、-ガラクトシダーゼ (L a c Z)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T)、ルシフェラーゼ、および当技術分野において周知の他のものをコードする D N A 配列が挙げられる。それらの発現を駆動する調節エレメントに関連する場合、レポーター配列は、酵素的アッセイ、X線撮影アッセイ、比色アッセイ、蛍光アッセイまたは他の分光学的アッセイ、蛍光標識細胞分取アッセイ、ならびに酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A) および免疫組織化学的検査を含む免疫学的アッセイを含む従来の手段によって検出可能なシグナルを提供する。例えば、マーカー配列が L a c Z 遺伝子である場合、シグナルを運ぶベクターの存在は、-ガラクトシダーゼ活性についてのアッセイによって検出される。導入遺伝子が緑色蛍光タンパク質またはルシフェラーゼである場合、シグナルを運ぶベクターは、発光光度計における色または光の生成によって視覚的に測定されてもよい。そのようなレポーターは、例えば、核酸の組織特異的標的化能力および組織特異的プロモーター調節活性を検証するのに有用であり得る。組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V)。

30

【0140】

一部の実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) または組換え A A V である。一部の態様では、本開示は、単離された A A V を提供する。A A V に関して本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、人工的に生成されたまたは得られた A A V を指す。単離された A A V は、組換え方法を使用して生成されてもよい。そのような A A V は、本明細書において、「組換え A A V」と称される。組換え A A V (r A A V) は、好ましくは、組織特異的標的化能力を有し、その結果、r A A V のヌクレアーゼおよび / または導入遺伝子は、1つまたは複数の所定の組織に特異的に送達される。A A V カプシドは、これらの組織特異的標的化能力を決定するのに重要なエレメントである。そのため、組織が標的にされるのに適切なカプシドを有する r A A V を選択することができる。

40

【0141】

所望のカプシドタンパク質を有する組換え A A V を得るための方法は、当技術分野において周知である (例えば、U S 2 0 0 3 / 0 1 3 8 7 7 2 号を参照されたく、この内容は

50

、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)。典型的には、方法は、AAVカプシドタンパク質をコードする核酸配列；機能的rep遺伝子；AAV逆位末端反復配列（ITR）および導入遺伝子から構成される組換えAAVベクター；ならびに組換えAAVベクターのAAVカプシドタンパク質へのパッケージングを可能にするのに十分なヘルパー機能を含む宿主細胞を培養することを含む。一部の実施形態では、カプシドタンパク質は、AAVのcap遺伝子によってコードされる構造的タンパク質である。AAVは、ビリオンタンパク質1～3（VP1、VP2およびVP3と名付けられる）の3つのカプシドタンパク質を含み、これらのすべては、選択的スプライシングを介して単一のcap遺伝子から転写される。一部の実施形態では、VP1、VP2およびVP3の分子量は、それぞれ、約87kDa、約72kDaおよび約62kDaである。一部の実施形態では、翻訳の際に、カプシドタンパク質は、ウイルスゲノムの周囲に球状の60merのタンパク質シェルを形成する。一部の実施形態では、カプシドタンパク質の機能は、ウイルスゲノムを保護すること、ゲノムを送達すること、および宿主と相互作用することである。一部の態様では、カプシドタンパク質は、組織特異的な様式で、ウイルスゲノムを宿主に送達する。

10

【0142】

一部の実施形態では、組換えAAV（rAAV）は、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAVrh8、AAVrh10、AAV2G9、AAV2.5G9、AAV9、およびAAV10からなる群から選択されるAAVカプシドタンパク質を含む。一部の実施形態では、組換えAAVカプシド（rAAV）タンパク質は、非ヒト霊長類に由来する血清型、例えば、AAVrh10血清型のものである。一部の実施形態では、rAAVは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる米国公開および米国登録特許第US20170166926A1号、US9585971号、US10301360号、US9957303号、US10202425号、US10519198号、US20190292230A1号、US20200087353A1号に記載されるように、AAVPhP.eBまたはAAVPhP.Bである。一部の実施形態では、rAAVは、その全体が参照により組み込まれる国際公開第WO201912635号に記載される表面結合ペプチド、例えば、PB5-3、PB5-5、PB5-14を含むAAVを含む。一部の実施形態では、rAAVは、AAV9血清型である。一部の実施形態では、rAAVは、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、もしくはAAV13血清型、またはそれらのキメラである。一部の実施形態では、rAAVは、血清型AAV1、AAV2、AAV3a、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV2G9、AAV2.5G9、AAVrh8、AAVrh10、AAVrh74、AAV10、もしくはAAV11、またはそれらのキメラ由来のカプシドタンパク質を含む。ある特定の実施形態では、rAAVは、WO2017/212019号に開示される化学的に改変されたカプシドを含み、例えば、マンノースリガンドが、AAV2に化学的にカップリングされる。WO2017/212019号に開示される化学的に改変されたカプシドを有するrAAVは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。さらなる実施形態として、rAAVは、それらが、参照により組み込まれるPCT/US18/22725号、PCT/US2018/044632号、またはUS10,550,405号に記載される単一のAAVビリオン中の2つ以上のAAV血清型由来のVP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質を含み得る点で、倍数体（単数体、または有理単数体、または有理倍数体（rational polyloid）とも称される）であり得る本発明のAAVカプシドタンパク質を含む。一部の実施形態では、rAAVは、表17にリストされるAAV血清型から選択されるカプシドタンパク質を含む。

20

30

40

【0143】

50

【表 17 - 1】

表 17: AAV 血清型および例示的な公開された対応するカプシド配列

血清型、およびカプシド配列が公開されている場所	血清型、およびカプシド配列が公開されている場所
AAV3.3b (参照:US20030138772 における配列番号 72)	AAV3-3 (参照:US20150315612 における配列番号 200)
AAV3-3 (参照:US20150315612 における配列番号 217)	AAV3a ((参照:US6156303 における配列番号 5)
AAV3a (参照:US6156303 における配列番号)	AAV3b (参照:US6156303 における配列番号 6)
AAV3b (参照:US6156303 における配列番号 10)	AAV3b (参照:US6156303 における配列番号 1)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 17)	AAV4 ((参照:US20140348794 における配列番号 5)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 3)	AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 14)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 15)	AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 19)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 12)	AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 13)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 7)	AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 8)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 9)	AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 2)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 10)	AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 11)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 18)	AAV4 (参照:US20030138772 における配列番号 63) および US20160017295 配列
ID NO: (参照:US20140348794 における配列番号 4)	AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 16)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 20)	AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 6)
AAV4 (参照:US20140348794 における配列番号 1)	AAV42.2 (参照:US20030138772 における配列番号 9)
AAV42.2 (参照:US20030138772 における配列番号 102)	AAV42.3b (参照:US20030138772 における配列番号 36)
AAV42.3B (参照:US20030138772 における配列番号 107)	AAV42.4 (参照:US20030138772 における配列番号 33)
AAV42.4 (参照:US20030138772 における配列番号 88)	AAV42.8 (参照:US20030138772 における配列番号 27)
AAV42.8 (参照:US20030138772 における配列番号 85)	AAV43.1 (参照:US20030138772 における配列番号 39)
AAV43.1 (参照:US20030138772 における配列番号 92)	AAV43.12 (参照:US20030138772 における配列番号 41)

10

20

30

40

50

【表 17 - 2】

AAV43.12 (参照:US20030138772 における配列番号 93)	AAV8 (参照:US20150159173 における配列番号 15)	
AAV8 (参照:US20150376240 における配列番号 7)	AAV8 (参照:US20030138772 における配列番号 4;US20150315612 配列)	
番号 182	AAV8 (参照:US20030138772 における配列番号 95), US20140359799 配列	
AAV8 (参照:US20150159173 における配列番号 31)	AAV8 (参照:例えば、US20160017295 における配列番号 8 または US7198951 における配列番号 7 または US20150315612 における配列番号 223)	10
AAV8 (参照:US20150376240 における配列番号 8)	AAV8 (参照:US20150315612 における配列番号 214)	
AAV-8b (参照:US20150376240 における配列番号 5)	AAV-8b (参照:US20150376240 における配列番号 3)	
AAV-8h (参照:US20150376240 における配列番号 6)	AAV-8h (参照:US20150376240 における配列番号 4)	
AAV9 (参照:US20030138772 における配列番号 5)	AAV9 (参照:US7198951 における配列番号 1)	
AAV9 (参照:US20160017295 における配列番号 9)	AAV9 (参照:US20030138772 における配列番号 100), US7198951 における配列番号 2	
	AAV9 (参照:US7198951 における配列番号 3)	20
AAV9 (AAVhu.14) (参照:US20150315612 における配列番号 3)	AAV9 (AAVhu.14) (参照:US20150315612 における配列番号 123)	
AAVA3.1 (参照:US20030138772 における配列番号 120)	AAVA3.3 (参照:US20030138772 における配列番号 57)	
AAVA3.3 (参照:US20030138772 における配列番号 66)	AAVA3.4 (参照:US20030138772 における配列番号 54)	
AAVA3.4 (参照:US20030138772 における配列番号 68)	AAVA3.5 (参照:US20030138772 における配列番号 55)	
AAVA3.5 (参照:US20030138772 における配列番号 69)	AAVA3.7 (参照:US20030138772 における配列番号 56)	30
AAVA3.7 (参照:US20030138772 における配列番号 67)	AAV29. (参照:(AAVbb.1) 161 US20030138772 における配列番号 11)	
AAVC2 (参照:US20030138772 における配列番号 61)	AAVCh.5 (参照:US20150159173 における配列番号 46); US20150315612 配列	
番号 234	AAVcy.2 (AAV13.3) (参照:US20030138772 における配列番号 15)	
AAV24.1 (参照:US20030138772 における配列番号 101)	AAVcy.3 (AAV24.1) (参照:US20030138772 における配列番号 16)	
AAV27.3 (参照:US20030138772 における配列番号 104)	AAVcy.4 (AAV27.3) (参照:US20030138772 における配列番号 17)	40

【表 17 - 3】

AAVcy.5 (参照:US20150315612 における配列番号 227)	AAV7.2 (参照:US20030138772 における配列番号 103)
AAVcy.5 (AAV7.2) (参照:US20030138772 における配列番号 18)	AAV16.3 (参照:US20030138772 における配列番号 105)
AAVcy.6 (AAV16.3) (参照:US20030138772 における配列番号 10)	AAVcy.5 (参照:US20150159173 における配列番号 8)
AAVcy.5 (参照:US20150159173 における配列番号 24)	AAVCy.5R1 (参照:US20150159173 における配列番号)
AAVCy.5R2 (参照:US20150159173 における配列番号)	AAVCy.5R3 (参照:US20150159173 における配列番号)
AAVCy.5R4 (参照:US20150159173 における配列番号)	AAVDJ (参照:US20140359799 における配列番号 3)および US7588772 における配列番号 2)
	AAVDJ (参照:US20140359799 における配列番号 2)および US7588772 における配列番号 1)
	AAVDJ-8 (参照:US7588772; Grimm et al 2008 における配列番号)
AAVDJ-8 (参照:US7588772; Grimm et al 2008 における配列番号)	AAVF5 (参照:US20030138772 における配列番号 110)
AAVH2 (参照:US20030138772 における配列番号 26)	AAVH6 (参照:US20030138772 における配列番号 25)
AAVhE1.1 (参照:US9233131 における配列番号 44)	AAVhErl.14 (参照:US9233131 における配列番号 46)
AAVhErl.16 (参照:US9233131 における配列番号 48)	AAVhErl.18 (参照:US9233131 における配列番号 49)
AAVhErl.23 (AAVhEr.2.29) (参照:US9233131 における配列番号 53)	AAVhErl.35 (参照:US9233131 における配列番号 50)
AAVhErl.36 (参照:US9233131 における配列番号 52)	AAVhErl.5 (参照:US9233131 における配列番号 45)
AAVhErl.7 (参照:US9233131 における配列番号 51)	AAVhErl.8 (参照:US9233131 における配列番号 47)
AAVhEr.2.16 (参照:US9233131 における配列番号 55)	AAVhEr.2.30 (参照:US9233131 における配列番号 56)
AAVhEr.2.31 (参照:US9233131 における配列番号 58)	AAVhEr.2.36 (参照:US9233131 における配列番号 57)
AAVhEr.2.4 (参照:US9233131 における配列番号 54)	AAVhEr.3.1 (参照:US9233131 における配列番号 59)
AAVhu.1 (参照:US20150315612 における配列番号 46)	AAVhu.1 (参照:US20150315612 における配列番号 144)
AAVhu.IO (AAV16.8) (参照:US20150315612 における配列番号 56)	AAVhu.IO (AAV16.8) (参照:US20150315612 における配列番号 156)

10

20

30

40

50

【表 17 - 4】

AAVhu.11 (AAV16.12) (参照:US20150315612 における配列番号 57)	AAVhu.11 (AAV16.12) (参照:US20150315612 における配列番号 153)
AAVhu.12 (参照:における配列番号 59)	AAVhu.12 (参照:US20150315612 における配列番号 154)
AAVhu.13 (参照:US2015015917 における配列番号 16 および US20150315612 における配列番号 71)	
AAVhu.13 (参照:US20150159173 における配列番号 32 および US20150315612 における配列番号 129)	
AAVhu.136.1 (参照:US20150315612 における配列番号 165)	AAVhu.140.1 (参照:US20150315612 における配列番号 166)
AAVhu.140.2 (参照:US20150315612 における配列番号 167)	AAVhu.145.6 (参照:US20150315612 における配列番号 178)
AAVhu.15 (参照:US20150315612 における配列番号 147)	AAVhu.15 (AAV33.4) (参照:US20150315612 における配列番号 50)
AAVhu.156.1 (参照:US20150315612 における配列番号 179)	AAVhu.16 (参照:US20150315612 における配列番号 148)
AAVhu.16 (AAV33.8) (参照:US20150315612 における配列番号 51)	AAVhu.17 (参照:US20150315612 における配列番号 83)
AAVhu.17 (AAV33.12) (参照:US20150315612 における配列番号 4)	AAVhu.172.1 (参照:US20150315612 における配列番号 171)
AAVhu.172.2 (参照:US20150315612 における配列番号 172)	AAVhu.173.4 (参照:US20150315612 における配列番号 173)
AAVhu.173.8 (参照:US20150315612 における配列番号 175)	AAVhu.18 (参照:US20150315612 における配列番号 52)
AAVhu.18 (参照:US20150315612 における配列番号 149)	AAVhu.19 (参照:US20150315612 における配列番号 62)
AAVhu.19 (参照:US20150315612 における配列番号 133)	AAVhu.2 (参照:US20150315612 における配列番号 48)
AAVhu.2 (参照:US20150315612 における配列番号 143)	AAVhu.20 (参照:US20150315612 における配列番号 63)
AAVhu.20 (参照:US20150315612 における配列番号 134)	AAVhu.21 (参照:US20150315612 における配列番号 65)
AAVhu.21 (参照:US20150315612 における配列番号 135)	AAVhu.22 (参照:US20150315612 における配列番号 67)
AAVhu.22 239 (参照:US20150315612 における配列番号 138)	AAVhu.23 (参照:US20150315612 における配列番号 60)
AAVhu.23.2 (参照:US20150315612 における配列番号 137)	AAVhu.24 (参照:US20150315612 における配列番号 66)
AAVhu.24 (参照:US20150315612 における配列番号 136)	AAVhu.25 (参照:US20150315612 における配列番号 49)

10

20

30

40

50

【表 17 - 5】

AAVhu.25 (参照:US20150315612 における配列番号 146)	AAVhu.26 (参照:US20150159173 における配列番号 17 および US20150315612 における配列番号 61)
	AAVhu.26 (参照:US20150159173 における配列番号 33), US20150315612 配列
	AAVhu.27 (参照:US20150315612 における配列番号 64)
AAVhu.27 (参照:US20150315612 における配列番号 140)	AAVhu.28 (参照:US20150315612 における配列番号 68)
AAVhu.28 (参照:US20150315612 における配列番号 130)	AAVhu.29 (参照:US20150315612 における配列番号 69)
AAVhu.29 (参照:US20150159173 における配列番号 42 および US20150315612 における配列番号 132)	
AAVhu.29 (参照:US20150315612 における配列番号 225)	AAVhu.29R (参照:US20150159173 における配列番号)
AAVhu.3 (参照:US20150315612 における配列番号 44)	AAVhu.3 (参照:US20150315612 における配列番号 145)
AAVhu.30 (参照:US20150315612 における配列番号 70)	AAVhu.30 (参照:US20150315612 における配列番号 131)
AAVhu.31 (参照:US20150315612 における配列番号 1)	AAVhu.31 (参照:US20150315612 における配列番号 121)
AAVhu.32 (参照:US20150315612 における配列番号 2)	AAVhu.32 (参照:US20150315612 における配列番号 122)
AAVhu.33 (参照:US20150315612 における配列番号 75)	AAVhu.33 (参照:US20150315612 における配列番号 124)
AAVhu.34 (参照:US20150315612 における配列番号 72)	AAVhu.34 (参照:US20150315612 における配列番号 125)
AAVhu.35 (参照:US20150315612 における配列番号 73)	AAVhu.35 (参照:US20150315612 における配列番号 164)
AAVhu.36 (参照:US20150315612 における配列番号 74)	AAVhu.36 (参照:US20150315612 における配列番号 126)
AAVhu.37 (参照:US20150159173 における配列番号 34 および US20150315612 における配列番号 88)	
AAVhu.37 (AAV106.1) (参照:US20150315612 における配列番号 10 および US20150159173 における配列番号 18)	
AAVhu.38 (参照:US20150315612 における配列番号 161)	AAVhu.39 (参照:US20150315612 における配列番号 102)
AAVhu.39 (AAV1G-9) (参照:US20150315612 における配列番号 24)	AAVhu.4 (参照:US20150315612 における配列番号 47)

10

20

30

40

50

【表 17 - 6】

AAVhu.4 (参照:US20150315612 における配列番号 141)	AAVhu.40 (参照:US20150315612 における配列番号 87)
AAVhu.40 (AAV114.3) (参照:US20150315612 における配列番号 11)	AAVhu.41 (参照:US20150315612 における配列番号 91)
AAVhu.41 (AAV127.2) (参照:US20150315612 における配列番号 6)	AAVhu.42 (参照:US20150315612 における配列番号 85)
AAVhu.42 (AAV127.5) (参照:US20150315612 における配列番号 8)	AAVhu.43 (参照:US20150315612 における配列番号 160)
AAVhu.43 (参照:US20150315612 における配列番号 236)	AAVhu.43 (AAV128.1) (参照:US20150315612 における配列番号 80)
AAVhu.44 (参照:US20150159173 における配列番号 45 および US20150315612 における配列番号 158)	
AAVhu.44 (AAV128.3) (参照:US20150315612 における配列番号 81)	AAVhu.44R1 (参照:US20150159173 における配列番号)
AAVhu.44R2 (参照:US20150159173 における配列番号)	AAVhu.44R3 (参照:US20150159173 における配列番号)
AAVhu.45 (参照:US20150315612 における配列番号 76)	AAVhu.45 (参照:US20150315612 における配列番号 127)
AAVhu.46 (参照:US20150315612 における配列番号 82)	AAVhu.46 (参照:US20150315612 における配列番号 159)
AAVhu.46 (参照:US20150315612 における配列番号 224)	AAVhu.47 (参照:US20150315612 における配列番号 77)
AAVhu.47 (参照:US20150315612 における配列番号 128)	AAVhu.48 (参照:US20150159173 における配列番号 38)
AAVhu.48 (参照:US20150315612 における配列番号 157)	AAVhu.48 (AAV130.4) (参照:US20150315612 における配列番号 78)
AAVhu.48R1 (参照:US20150159173 における配列番号)	AAVhu.48R2 (参照:US20150159173 における配列番号)
AAVhu.48R3 (参照:US20150159173 における配列番号)	AAVhu.49 (参照:US20150315612 における配列番号 209)
AAVhu.49 (参照:US20150315612 における配列番号 189)	AAVhu.5 (参照:US20150315612 における配列番号 45)
AAVhu.5 (参照:US20150315612 における配列番号 142)	AAVhu.51 (参照:US20150315612 における配列番号 208)
AAVhu.51 (参照:US20150315612 における配列番号 190)	AAVhu.52 (参照:US20150315612 における配列番号 210)
AAVhu.52 (参照:US20150315612 における配列番号 191)	AAVhu.53 (参照:US20150159173 における配列番号 19)
AAVhu.53 (参照:US20150159173 における配列番号 35)	AAVhu.53 (AAV145.1) (参照:US20150315612 における配列番号 176)

10

20

30

40

50

【表 17 - 7】

AAVhu.54 (参照:US20150315612 における配列番号 188)	AAVhu.54 (AAV145.5) (参照:US20150315612 における配列番号 177)
AAVhu.55 (参照:US20150315612 における配列番号 187)	AAVhu.56 (参照:US20150315612 における配列番号 205)
AAVhu.56 (AAV145.6) (参照:US20150315612 における配列番号 168)	AAVhu.56 (AAV145.6) (参照:US20150315612 における配列番号 192)
AAVhu.57 (参照:US20150315612 における配列番号 206)	AAVhu.57 (参照:US20150315612 における配列番号 169)
AAVhu.57 (参照:US20150315612 における配列番号 193)	AAVhu.58 (参照:US20150315612 における配列番号 207)
AAVhu.58 (参照:US20150315612 における配列番号 194)	AAVhu.6 (AAV3.1) (参照:US20150315612 における配列番号 5)
AAVhu.6 (AAV3.1) (参照:US20150315612 における配列番号 84)	AAVhu.60 (参照:US20150315612 における配列番号 184)
AAVhu.60 (AAV161.10) (参照:US20150315612 における配列番号 170)	AAVhu.61 (参照:US20150315612 における配列番号 185)
AAVhu.61 (AAV161.6) (参照:US20150315612 における配列番号 174)	AAVhu.63 (参照:US20150315612 における配列番号 204)
AAVhu.63 (参照:US20150315612 における配列番号 195)	AAVhu.64 (参照:US20150315612 における配列番号 212)
AAVhu.64 (参照:US20150315612 における配列番号 196)	AAVhu.66 (参照:US20150315612 における配列番号 197)
AAVhu.67 (参照:US20150315612 における配列番号 215)	AAVhu.67 (参照:US20150315612 における配列番号 198)
AAVhu.7 (参照:US20150315612 における配列番号 226)	AAVhu.7 (参照:US20150315612 における配列番号 150)
AAVhu.7 (AAV7.3) (参照:US20150315612 における配列番号 55)	AAVhu.71 (参照:US20150315612 における配列番号 79)
AAVhu.8 (参照:US20150315612 における配列番号 53)	AAVhu.8 (参照:US20150315612 における配列番号 12)
AAVhu.8 (参照:US20150315612 における配列番号 151)	AAVhu.9 (AAV3.1) (参照:US20150315612 における配列番号 58)
AAVhu.9 (AAV3.1) (参照:US20150315612 における配列番号 155)	AAV-LK01 (参照:US20150376607 における配列番号 2)
AAV-LK01 (参照:US20150376607 における配列番号 29)	AAV-LK02 (参照:US20150376607 における配列番号 3)
AAV-LK02 (参照:US20150376607 における配列番号 30)	AAV-LK03 (参照:US20150376607 における配列番号 4)

10

20

30

40

50

【表 17 - 8】

AAV-LK03 (参照:WO2015121501 における配列番号 12 および US20150376607 における配列番号 31)	
AAV-LK04 (参照:US20150376607 における配列番号 5)	AAV-LK04 (参照:US20150376607 における配列番号 32)
AAV-LK05 (参照:US20150376607 における配列番号 6)	AAV-LK05 (参照:US20150376607 における配列番号 33)
AAV-LK06 (参照:US20150376607 における配列番号 7)	AAV-LK06 (参照:US20150376607 における配列番号 34)
AAV-LK07 (参照:US20150376607 における配列番号 8)	AAV-LK07 (参照:US20150376607 における配列番号 35)
AAV-LK08 (参照:US20150376607 における配列番号 9)	AAV-LK08 (参照:US20150376607 における配列番号 36)
AAV-LK09 (参照:US20150376607 における配列番号 10)	AAV-LK09 (参照:US20150376607 における配列番号 37)
AAV-LK10 (参照:US20150376607 における配列番号 11)	AAV-LK10 (参照:US20150376607 における配列番号 38)
AAV-LK11 (参照:US20150376607 における配列番号 12)	AAV-LK11 (参照:US20150376607 における配列番号 39)
AAV-LK12 (参照:US20150376607 における配列番号 13)	AAV-LK12 (参照:US20150376607 における配列番号 40)
AAV-LK13 (参照:US20150376607 における配列番号 14)	AAV-LK13 (参照:US20150376607 における配列番号 41)
AAV-LK14 (参照:US20150376607 における配列番号 15)	AAV-LK14 (参照:US20150376607 における配列番号 42)
AAV-LK15 (参照:US20150376607 における配列番号 16)	AAV-LK15 (参照:US20150376607 における配列番号 43)
AAV-LK16 (参照:US20150376607 における配列番号 17)	AAV-LK16 (参照:US20150376607 における配列番号 44)
AAV-LK17 (参照:US20150376607 における配列番号 18)	AAV-LK17 (参照:US20150376607 における配列番号 45)
AAV-LK18 (参照:US20150376607 における配列番号 19)	AAV-LK18 (参照:US20150376607 における配列番号 46)
AAV-LK19 (参照:US20150376607 における配列番号 20)	AAV-LK19 (参照:US20150376607 における配列番号 47)
AAV-PAEC (参照:US20150376607 における配列番号 1)	AAV-PAEC (参照:US20150376607 における配列番号 48)
AAV-PAEC11 (参照:US20150376607 における配列番号 26)	AAV-PAEC11 (参照:US20150376607 における配列番号 54)

10

20

30

40

50

【表 17 - 9】

AAV-PAEC 12 (参照:US20150376607 における配列番号 27)	AAV-PAEC 12 (参照:US20150376607 における配列番号 51)
AAV-PAEC 13 (参照:US20150376607 における配列番号 28)	AAV-PAEC 13 (参照:US20150376607 における配列番号 49)
AAV-PAEC2 (参照:US20150376607 における配列番号 21)	AAV-PAEC2 (参照:US20150376607 における配列番号 56)
AAV-PAEC4 (参照:US20150376607 における配列番号 22)	AAV-PAEC4 (参照:US20150376607 における配列番号 55)
AAV-PAEC6 (参照:US20150376607 における配列番号 23)	AAV-PAEC6 (参照:US20150376607 における配列番号 52)
AAV-PAEC7 (参照:US20150376607 における配列番号 24)	AAV-PAEC7 (参照:US20150376607 における配列番号 53)
AAV-PAEC8 (参照:US20150376607 における配列番号 25)	AAV-PAEC8 (参照:US20150376607 における配列番号 50)
AAVpi.1 (参照:US20150315612 における配列番号 28)	AAVpi.1 (参照:US20150315612; AAVpi.2 408 における配列番号 93, 参照:US20150315612 における配列番号 30)
AAVpi.2 (参照:US20150315612 における配列番号 95)	AAVpi.3 (参照:US20150315612 における配列番号 29)
AAVpi.3 (参照:US20150315612 における配列番号 94)	AAVrh.10 (参照:US20150159173 における配列番号 9)
AAVrh.10 (参照:US20150159173 における配列番号 25)	AAV44.2 (参照:US20030138772 における配列番号 59)
AAVrh.10 (AAV44.2) (参照:US20030138772 における配列番号 81)	AAV42.1B (参照:US20030138772 における配列番号 90)
AAVrh.12 (AAV42.1b) (参照:US20030138772 における配列番号 30)	AAVrh.13 (参照:US20150159173 における配列番号 10)
AAVrh.13 (参照:US20150159173 における配列番号 26)	AAVrh.13 (参照:US20150315612 における配列番号 228)
AAVrh.13R (参照:US20150159173 における配列番号)	AAV42.3A (参照:US20030138772 における配列番号 87)
AAVrh.14 (AAV42.3a) (参照:US20030138772 における配列番号 32)	AAV42.5A (参照:US20030138772 における配列番号 89)
AAVrh.17 (AAV42.5a) (参照:US20030138772 における配列番号 34)	AAV42.5B (参照:US20030138772 における配列番号 91)
AAVrh.18 (AAV42.5b) (参照:US20030138772 における配列番号 29)	AAV42.6B (参照:US20030138772 における配列番号 112)
AAVrh.19 (AAV42.6b) (参照:US20030138772 における配列番号 38)	AAVrh.2 (参照:US20150159173 における配列番号 39)

10

20

30

40

50

【表 17 - 10】

AAVrh.2 (参照:US20150315612 における配列番号 231)	AAVrh.20 (参照:US20150159173 における配列番号 1)
AAV42.10 (参照:US20030138772 における配列番号 106)	AAVrh.21 (AAV42.10) (参照:US20030138772 における配列番号 35)
AAV42.11 (参照:US20030138772 における配列番号 108)	AAVrh.22 (AAV42.11) (参照:US20030138772 における配列番号 37)
AAV42.12 (参照:US20030138772 における配列番号 113)	AAVrh.23 (AAV42.12) (参照:US20030138772 における配列番号 58)
AAV42.13 (参照:US20030138772 における配列番号 86)	AAVrh.24 (AAV42.13) (参照:US20030138772 における配列番号 31)
AAV42.15 (参照:US20030138772 における配列番号 84)	AAVrh.25 (AAV42.15) (参照:US20030138772 における配列番号 28)
AAVrh.2R (参照:US20150159173 における配列番号)	AAVrh.31 (AAV223.1) (参照:US20030138772 における配列番号 48)
AAVC1 (参照:US20030138772 における配列番号 60)	AAVrh.32 (AAVC1) (参照:446 US20030138772 における配列番号 19)
AAVrh.32/33 (参照:US20150159173 における配列番号 2)	AAVrh.51 (AAV2-5) (参照:US20150315612 における配列番号 104)
AAVrh.52 (AAV3-9) (参照:US20150315612 における配列番号 18)	AAVrh.52 (AAV3-9) (参照:US20150315612 における配列番号 96)
AAVrh.53 (参照:US20150315612 における配列番号)	AAVrh.53 (AAV3-11) (参照:US20150315612 における配列番号 17)
AAVrh.53 (AAV3-11) (参照:US20150315612 における配列番号 186)	AAVrh.54 (参照:US20150315612 における配列番号 40)
AAVrh.54 (参照:US20150159173 における配列番号 49 および US20150315612 における配列番号 116)	
AAVrh.55 (参照:US20150315612 における配列番号 37)	AAVrh.55 (AAV4-19) (参照:US20150315612 における配列番号 117)
AAVrh.56 (参照:US20150315612 における配列番号 54)	AAVrh.56 (参照:US20150315612 における配列番号 152)
AAVrh.57 (参照:497 US20150315612 配列番号 26 における配列番号)	AAVrh.57 (参照:US20150315612 における配列番号 105)
AAVrh.58 (参照:US20150315612 における配列番号 27)	AAVrh.58 (参照:US20150159173 における配列番号 48 および US20150315612 における配列番号 106)
	AAVrh.58 (参照:US20150315612 における配列番号 232)
AAVrh.59 (参照:US20150315612 における配列番号 42)	AAVrh.59 (参照:US20150315612 における配列番号 110)
AAVrh.60 (参照:US20150315612 における配列番号 31)	AAVrh.60 (参照:US20150315612 における配列番号 120)
AAVrh.61 (参照:US20150315612 における配列番号 107)	AAVrh.61 (AAV2-3) (参照:US20150315612 における配列番号 21)
AAVrh.62 (AAV2-15) (参照:US20150315612 における配列番号 33)	AAVrh.62 (AAV2-15) (参照:US20150315612 における配列番号 114)
AAVrh.64 (参照:US20150315612 における配列番号 15)	AAVrh.64 (参照:US20150159173 における配列番号 43 および US20150315612 における配列番号 99)
	AAVrh.64 (参照:US20150315612 における配列番号 233)
AAVRh.64R1 (参照:US20150159173 における配列番号)	AAVRh.64R2 (参照:US20150159173 における配列番号)

10

20

30

40

50

【表 17 - 11】

AAVrh.65 (参照:US20150315612 における配列番号 35)	AAVrh.65 (参照:US20150315612 における配列番号 112)	
AAVrh.67 (参照:US20150315612 における配列番号 36)	AAVrh.67 (参照:US20150315612 における配列番号 230)	
AAVrh.67 (参照:US20150159173 における配列番号 47 および US20150315612 における配列番号 47)		
AAVrh.68 (参照:US20150315612 における配列番号 16)	AAVrh.68 (参照:US20150315612 における配列番号 100)	
AAVrh.69 (参照:US20150315612 における配列番号 39)	AAVrh.69 (参照:US20150315612 における配列番号 119)	
AAVrh.70 (参照:US20150315612 における配列番号 20)	AAVrh.70 (参照:US20150315612 における配列番号 98)	
AAVrh.71 (参照:US20150315612 における配列番号 162)	AAVrh.72 (参照:US20150315612 における配列番号 9)	10
AAVrh.73 (参照:US20150159173 における配列番号 5)	AAVrh.74 (参照:US20150159173 における配列番号 6)	
AAVrh.8 (参照:US20150159173 における配列番号 41)	AAVrh.8 (参照:US20150315612 における配列番号 235)	
AAVrh.8R (参照:US20150159173, WO2015168666 における配列番号 9)	AAVrh.8R A586R 変異体(参照:WO2015168666 における配列番号 10)	
AAVrh.8R R533A 変異体(参照:WO2015168666 における配列番号 11)	BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 8)	
BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 10)	BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 4)	
BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 2)	BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 6)	
BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 1)	BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 5)	20
BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 3)	BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 11)	
BAAV (ウシ AAV) (参照:US7427396 における配列番号 5)	BAAV (ウシ AAV) (参照:US7427396 における配列番号 6)	
BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 7)	BAAV (ウシ AAV) (参照:US9193769 における配列番号 9)	
BNP61 AAV (参照:US20150238550 における配列番号 1)	BNP61 AAV (参照:US20150238550 における配列番号 2)	
BNP62 AAV (参照:US20150238550 における配列番号 3)	BNP63 AAV (参照:US20150238550 における配列番号 4)	
ヤギ AAV (参照:US7427396 における配列番号 3)	ヤギ AAV (参照:US7427396 における配列番号 4)	
真型 AAV (ttAAV) (参照:WO2015121501 における配列番号 2)	AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 12)	
AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 2)	AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 6)	30
AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 4)	AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 8)	
AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 14)	AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 10)	
AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 15)	AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 5)	
AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 9)	AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 3)	
AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 7)	AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 11)	
AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号)	AAAV (トリ AAV) (参照:US9238800 における配列番号 1)	
AAV シャッフル 100-1 (参照:US20160017295 における配列番号 23)	AAV シャッフル 100-1 (参照:US20160017295 における配列番号 11)	40

【表 17 - 12】

AAV シャッフル 100-2 (参照: US20160017295 における配列番号 37)	AAV シャッフル 100-2 (参照: US20160017295 における配列番号 29)	
AAV シャッフル 100-3 (参照: US20160017295 における配列番号 24)	AAV シャッフル 100-3 (参照: US20160017295 における配列番号 12)	
AAV シャッフル 100-7 (参照: US20160017295 における配列番号 25)	AAV シャッフル 100-7 (参照: US20160017295 における配列番号 13)	
AAV シャッフル 10-2 (参照: US20160017295 における配列番号 34)	AAV シャッフル 10-2 (参照: US20160017295 における配列番号 26)	
AAV シャッフル 10-6 (参照: US20160017295 における配列番号 35)	AAV シャッフル 10-6 (参照: US20160017295 における配列番号 27)	
AAV シャッフル 10-8 (参照: US20160017295 における配列番号 36)	AAV シャッフル 10-8 (参照: US20160017295 における配列番号 28)	
AAV SM 100-10 (参照: US20160017295 における配列番号 41)	AAV SM 100-10 (参照: US20160017295 における配列番号 33)	10
AAV SM 100-3 (参照: US20160017295 における配列番号 40)	AAV SM 100-3 (参照: US20160017295 における配列番号 32)	
AAV SM 10-1 (参照: US20160017295 における配列番号 38)	AAV SM 10-1 (参照: US20160017295 における配列番号 30)	
AAV SM 10-2 (参照: US20160017295 における配列番号 10)	AAV SM 10-2 (参照: US20160017295 における配列番号 22)	
AAV SM 10-8 (参照: US20160017295 における配列番号 39)	AAV SM 10-8 (参照: US20160017295 における配列番号 31)	
AAV CBr-7.1 (参照: WO2016065001 における配列番号 4)	AAV CBr-7.1 (参照: WO2016065001 における配列番号 54)	
AAV CBr-7.10 (参照: WO2016065001 における配列番号 11)	AAV CBr-7.10 (参照: WO2016065001 における配列番号 61)	20
AAV CBr-7.2 (参照: WO2016065001 における配列番号 5)	AAV CBr-7.2 (参照: WO2016065001 における配列番号 55)	
AAV CBr-7.3 (参照: WO2016065001 における配列番号 6)	AAV CBr-7.3 (参照: WO2016065001 における配列番号 56)	
AAV CBr-7.4 (参照: WO2016065001 における配列番号 7)	AAV CBr-7.4 (参照: WO2016065001 における配列番号 57)	
AAV CBr-7.5 (参照: WO2016065001 における配列番号 8)	AAV CHt-6.6 (参照: WO2016065001 における配列番号 35)	
AAV CHt-6.6 (参照: WO2016065001 における配列番号 85)	AAV CHt-6.7 (参照: WO2016065001 における配列番号 36)	
AAV CHt-6.7 (参照: WO2016065001 における配列番号 86)	AAV CHt-6.8 (参照: WO2016065001 における配列番号 37)	30
AAV CHt-6.8 (参照: WO2016065001 における配列番号 87)	AAV CHt-P1 (参照: WO2016065001 における配列番号 29)	
AAV CHt-P1 (参照: WO2016065001 における配列番号 79)	AAV CHt-P2 (参照: WO2016065001 における配列番号 1)	
AAV CHt-P2 (参照: WO2016065001 における配列番号 51)	AAV CHt-P5 (参照: WO2016065001 における配列番号 2)	
AAV CHt-P5 (参照: WO2016065001 における配列番号 52)	AAV CHt-P6 (参照: WO2016065001 における配列番号 30)	
AAV CHt-P6 (参照: WO2016065001 における配列番号 80)	AAV CHt-P8 (参照: WO2016065001 における配列番号 31)	40

10

20

30

40

50

【表 17 - 13】

AAV CHt-P8 (参照: WO2016065001 における配列番号 81)	AAV CHt-P9 (参照: WO2016065001 における配列番号 3)
AAV CHt-P9 (参照: WO2016065001 における配列番号 53)	AAV CKd-1 (参照: US8734809 における配列番号 57)
AAV CKd-1 (参照: US8734809 における配列番号 131)	AAV CKd-10 (参照: US8734809 における配列番号 58)
AAV CKd-10 (参照: US8734809 における配列番号 132)	AAV CKd-2 (参照: US8734809 における配列番号 59)
AAV CKd-2 (参照: US8734809 における配列番号 133)	AAV CKd-3 (参照: US8734809 における配列番号 60)
AAV CKd-3 (参照: US8734809 における配列番号 134)	AAV CKd-4 (参照: US8734809 における配列番号 61)
AAV CKd-4 (参照: US8734809 における配列番号 135)	AAV CKd-6 (参照: US8734809 における配列番号 62)
AAV CKd-6 (参照: US8734809 における配列番号 136)	AAV CKd-7 (参照: US8734809 における配列番号 63)
AAV CKd-7 (参照: US8734809 における配列番号 137)	AAV CKd-8 (参照: US8734809 における配列番号 64)
AAV CKd-8 (参照: US8734809 における配列番号 138)	AAV CKd-B 1 (参照: US8734809 における配列番号 73)
AAV CKd-B 1 (参照: US8734809 における配列番号 147)	AAV CKd-B2 (参照: US8734809 における配列番号 74)
AAV CKd-B2 (参照: US8734809 における配列番号 148)	AAV CKd-B3 (参照: US8734809 における配列番号 75)
AAV CKd-B3 (参照: US8734809 における配列番号 149)	AAV CKd-B3 (参照: US8734809 における配列番号 149)
AAV CLv-1 (参照: US8734809 における配列番号 65)	AAV CLv-1 (参照: US8734809 における配列番号 139)
AAV CLv1-1 (参照: US8734809 における配列番号 171)	AAV Civ 1-10 (参照: US8734809 における配列番号 178)
AAV CLv1-2 (参照: US8734809 における配列番号 172)	AAV CLv-12 (参照: US8734809 における配列番号 66)
AAV CLv-12 (参照: US8734809 における配列番号 140)	AAV CLv1-3 (参照: US8734809 における配列番号 173)
AAV CLv-13 (参照: US8734809 における配列番号 67)	AAV CLv-13 (参照: US8734809 における配列番号 141)
AAV CLv1-4 (参照: US8734809 における配列番号 174)	AAV Civ 1-7 (参照: US8734809 における配列番号 175)
AAV Civ 1-8 (参照: US8734809 における配列番号 176)	AAV Civ 1-9 (参照: US8734809 における配列番号 177)

10

20

30

40

50

【表 17 - 14】

AAV CLv-2 (参照:US8734809 における配列番号 68)	AAV CLv-2 (参照:US8734809 における配列番号 142)	
AAV CLv-3 (参照:US8734809 における配列番号 69)	AAV CLv-3 (参照:US8734809 における配列番号 143)	
AAV CLv-4 (参照:US8734809 における配列番号 70)	AAV CLv-4 (参照:US8734809 における配列番号 144)	
AAV CLv-6 (参照:US8734809 における配列番号 71)	AAV CLv-6 (参照:US8734809 における配列番号 145)	
AAV CLv-8 (参照:US8734809 における配列番号 72)	AAV CLv-8 (参照:US8734809 における配列番号 146)	10
AAV CLv-D1 (参照:US8734809 における配列番号 22)	AAV CLv-D1 (参照:US8734809 における配列番号 96)	
AAV CLv-D2 (参照:US8734809 における配列番号 23)	AAV CLv-D2 (参照:US8734809 における配列番号 97)	
AAV CLv-D3 (参照:US8734809 における配列番号 24)	AAV CLv-D3 (参照:US8734809 における配列番号 98)	
AAV CLv-D4 (参照:US8734809 における配列番号 25)	AAV CLv-D4 (参照:US8734809 における配列番号 99)	
AAV CLv-D5 (参照:US8734809 における配列番号 26)	AAV CLv-D5 (参照:US8734809 における配列番号 100)	20
AAV CLv-D6 (参照:US8734809 における配列番号 27)	AAV CLv-D6 (参照:US8734809 における配列番号 101)	
AAV CLv-D7 (参照:US8734809 における配列番号 28)	AAV CLv-D7 (参照:US8734809 における配列番号 102)	
AAV CLv-D8 (参照:US8734809 における配列番号 29)	AAV CLv-D8 (参照:US8734809 における配列番号 103); AAV CLv-K1 762, 参照:WO2016065001 における配列番号 18)	
AAV CLv-K1 (参照:WO2016065001 における配列番号 68)	AAV CLv-K3 (参照:WO2016065001 における配列番号 19)	30
AAV CLv-K3 (参照:WO2016065001 における配列番号 69)	AAV CLv-K6 (参照:WO2016065001 における配列番号 20)	
AAV CLv-K6 (参照:WO2016065001 における配列番号 70)	AAV CLv-L4 (参照:WO2016065001 における配列番号 15)	
AAV CLv-L4 (参照:WO2016065001 における配列番号 65)	AAV CLv-L5 (参照:WO2016065001 における配列番号 16)	
AAV CLv-L5 (参照:WO2016065001 における配列番号 66)	AAV CLv-L6 (参照:WO2016065001 における配列番号 17)	
AAV CLv-L6 (参照:WO2016065001 における配列番号 67)	AAV CLv-MI (参照:WO2016065001 における配列番号 21)	40

【表 17 - 15】

AAV CLv-MI (参照: WO2016065001 における配列番号 71)	AAV CLv-MII (参照: WO2016065001 における配列番号 22)	
AAV CLv-MI 1 (参照: WO2016065001 における配列番号 72)	AAV CLv-M2 (参照: WO2016065001 における配列番号 23)	
AAV CLv-M2 (参照: WO2016065001 における配列番号 73)	AAV CLv-M5 (参照: WO2016065001 における配列番号 24)	
AAV CLv-M5 (参照: WO2016065001 における配列番号 74)	AAV CLv-M6 (参照: WO2016065001 における配列番号 25)	10
AAV CLv-M6 (参照: WO2016065001 における配列番号 75)	AAV CLv-M7 (参照: WO2016065001 における配列番号 26)	
AAV CLv-M7 (参照: WO2016065001 における配列番号 76)	AAV CLv-M8 (参照: WO2016065001 における配列番号 27)	
AAV CLv-M8 (参照: WO2016065001 における配列番号 77)	AAV CLv-M9 (参照: WO2016065001 における配列番号 28)	
AAV CLv-M9 (参照: WO2016065001 における配列番号 78)	AAV CLv-RI (参照: US8734809 における配列番号 30)	
AAV CLv-RI (参照: US8734809 における配列番号 104)	AAV CLv-R2 (参照: US8734809 における配列番号 31)	20
AAV CLv-R2 (参照: US8734809 における配列番号 105)	AAV CLv-R3 (参照: US8734809 における配列番号 32)	
AAV CLv-R3 (参照: US8734809 における配列番号 106)	AAV CLv-R4 (参照: US8734809 における配列番号 33)	
AAV CLv-R4 (参照: US8734809 における配列番号 107)	AAV CLv-R5 (参照: US8734809 における配列番号 34)	
AAV CLv-R5 (参照: US8734809 における配列番号 108)	AAV CLv-R6 (参照: US8734809 における配列番号 35)	
AAV CLv-R6 (参照: US8734809 における配列番号 109); AAV CLv-R7 802 (参照: US8734809 における配列番号 36)	AAV CLv-R7 (参照: US8734809 における配列番号 110)	30
AAV CLv-R8 (参照: US8734809 における配列番号 37)	AAV CLv-R8 (参照: US8734809 における配列番号 111)	
AAV CLv-R9 (参照: US8734809 における配列番号 38)	AAV CLv-R9 (参照: US8734809 における配列番号 112)	
AAV CSp-1 (参照: US8734809 における配列番号 45)	AAV CSp-1 (参照: US8734809 における配列番号 119)	
AAV CSp-10 (参照: US8734809 における配列番号 46)	AAV CSp-10 (参照: US8734809 における配列番号 120)	
AAV CSp-11 (参照: US8734809 における配列番号 47)	AAV CSp-11 (参照: US8734809 における配列番号 121)	40

【表 17 - 16】

AAV CSp-2 (参照:US8734809 における配列番号 48)	AAV CSp-2 (参照:US8734809 における配列番号 122)	
AAV CSp-3 (参照:US8734809 における配列番号 49)	AAV CSp-3 (参照:US8734809 における配列番号 123)	
AAV CSp-4 (参照:US8734809 における配列番号 50)	AAV CSp-4 (参照:US8734809 における配列番号 124)	
AAV CSp-6 (参照:US8734809 における配列番号 51)	AAV CSp-6 (参照:US8734809 における配列番号 125)	
AAV CSp-7 (参照:US8734809 における配列番号 52)	AAV CSp-7 (参照:US8734809 における配列番号 126)	10
AAV CSp-8 (参照:US8734809 における配列番号 53)	AAV CSp-8 (参照:US8734809 における配列番号 127)	
AAV CSp-8.10 (参照:WO2016065001 における配列番号 38)	AAV CSp-8.10 (参照:WO2016065001 における配列番号 88)	
AAV CSp-8.2 (参照:WO2016065001 における配列番号 39)	AAV CSp-8.2 (参照:WO2016065001 における配列番号 89)	
AAV CSp-8.4 (参照:WO2016065001 における配列番号 40)	AAV CSp-8.4 (参照:WO2016065001 における配列番号 90)	
AAV CSp-8.5 (参照:WO2016065001 における配列番号 41)	AAV CSp-8.5 (参照:WO2016065001 における配列番号 91)	20
AAV CSp-8.6 (参照:WO2016065001 における配列番号 42)	AAV CSp-8.6 (参照:WO2016065001 における配列番号 92)	
AAV CSp-8.7 (参照:WO2016065001 における配列番号 43)	AAV CSp-8.7 (参照:WO2016065001 における配列番号 93)	
AAV CSp-8.8 (参照:WO2016065001 における配列番号 44)	AAV CSp-8.8 (参照:WO2016065001 における配列番号 94)	
AAV CSp-8.9 (参照:WO2016065001 における配列番号 45)	AAV CSp-8.9 (参照:WO2016065001 における配列番号 95)	
AAV CSp-9 842 (参照:US8734809 における配列番号 54)	AAV CSp-9 (参照:US8734809 における配列番号 128)	30
AAV.hu.48R3 (参照:US8734809 における配列番号 183)	AAV.VR-355 (参照:US8734809 における配列番号 181)	
AAV3B (参照:WO2016065001 における配列番号 48)	AAV3B (参照:WO2016065001 における配列番号 98)	
AAV4 (参照:WO2016065001 における配列番号 49)	AAV4 (参照:WO2016065001 における配列番号 99)	
AAV5 (参照:WO2016065001 における配列番号 50)	AAV5 (参照:WO2016065001 における配列番号 100)	
AAVF1/HSC1 (参照:WO2016049230 における配列番号 20)	AAVF1/HSC1 (参照:WO2016049230 における配列番号 2)	40

10

20

30

40

50

【表 17 - 17】

AAVF11/HSC11 (参照: WO2016049230 における配列番号 26)	AAVF11/HSC11 (参照: WO2016049230 における配列番号 4)	
AAVF12/HSC12 (参照: WO2016049230 における配列番号 30)	AAVF12/HSC12 (参照: WO2016049230 における配列番号 12)	
AAVF13/HSC13 (参照: WO2016049230 における配列番号 31)	AAVF13/HSC13 (参照: WO2016049230 における配列番号 14)	
AAVF14/HSC14 (参照: WO2016049230 における配列番号 32)	AAVF14/HSC14 (参照: WO2016049230 における配列番号 15)	10
AAVF15/HSC15 (参照: WO2016049230 における配列番号 33)	AAVF15/HSC15 (参照: WO2016049230 における配列番号 16)	
AAVF16/HSC16 (参照: WO2016049230 における配列番号 34)	AAVF16/HSC16 (参照: WO2016049230 における配列番号 17)	
AAVF17/HSC17 (参照: WO2016049230 における配列番号 35)	AAVF17/HSC17 (参照: WO2016049230 における配列番号 13)	
AAVF2/HSC2 (参照: WO2016049230 における配列番号 21)	AAVF2/HSC2 (参照: WO2016049230 における配列番号 3)	20
AAVF3/HSC3 (参照: WO2016049230 における配列番号 22)	AAVF3/HSC3 (参照: WO2016049230 における配列番号 5)	
AAVF4/HSC4 (参照: WO2016049230 における配列番号 23)	AAVF4/HSC4 (参照: WO2016049230 における配列番号 6)	
AAVF5/HSC5 (参照: WO2016049230 における配列番号 25)	AAVF5/HSC5 (参照: WO2016049230 における配列番号 11)	30
AAVF6/HSC6 (参照: WO2016049230 における配列番号 24)	AAVF6/HSC6 (参照: WO2016049230 における配列番号 7)	
AAVF7/HSC7 (参照: WO2016049230 における配列番号 27)	AAVF7/HSC7 (参照: WO2016049230 における配列番号 8)	
AAVF8/HSC8 (参照: WO2016049230 における配列番号 28)	AAVF8/HSC8 (参照: WO2016049230 における配列番号 9)	
AAVF9/HSC9 (参照: WO2016049230 における配列番号 10)	AAVF9/HSC9 882 (参照: WO2016049230 における配列番号 29)	40

【0144】

AAVキャプシド中に rAAVベクターをパッケージングするために宿主細胞中で培養される構成要素は、トランスで宿主細胞に提供されてもよい。あるいは、必要とされる構成要素（例えば、組換えAAVベクター、rep配列、cap配列、および/またはヘルパー機能）のうちのいずれか1つまたは複数は、当業者に公知の方法を使用して、必要とされる構成要素のうちの1つまたは複数を含むように工学的に操作された安定な宿主細胞によって提供され得る。最も好適には、そのような安定な宿主細胞は、誘導性プロモーターの制御下で、必要とされる構成要素を含む。しかしながら、必要とされる構成要素は、構成的プロモーターの制御下にあってもよい。好適な誘導性プロモーターおよび

構成的プロモーターの例は、導入遺伝子を伴う使用に好適な調節エレメントの議論において、本明細書に提供される。さらに別の代替では、選択される安定な宿主細胞は、構成的プロモーターの制御下の選択される構成要素、および1つまたは複数の誘導性プロモーターの制御下の他の選択される構成要素を含有してもよい。例えば、293細胞（構成的プロモーターの制御下のE1ヘルパー機能を含む）に由来するが、誘導性プロモーターの制御下のrepおよび/またはcapタンパク質を含有する、安定な宿主細胞が作成され得る。さらに他の安定な宿主細胞は、当業者によって作成され得る。一部の実施形態では、本開示は、タンパク質（例えば、野生型ハンチンチンタンパク質、必要に応じて、「硬化した」野生型ハンチンチンタンパク質）をコードするコード配列を含む核酸を含有する宿主細胞に関する。一部の実施形態では、本開示は、上記に記載される宿主細胞を含む組成物に関する。一部の実施形態では、上記の宿主細胞を含む組成物は、凍結保存剤をさらに含む。

10

【0145】

組換えAAVベクター、rep配列、cap配列、および本開示のrAAVを生成するために必要とされるヘルパー機能は、任意の適切な遺伝エレメント（ベクター）を使用してパッケージングする宿主細胞に送達されてもよい。選択される遺伝エレメントは、本明細書に記載されるものを含む任意の好適な方法によって送達されてもよい。本開示の任意の実施形態を構築するために使用される方法は、核酸操作における当業者に公知であり、遺伝子工学的操作、組換え的な工学的操作および合成技法を含む。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照されたい。同様に、rAAVピリオンを作成する方法は、周知であり、好適な方法の選択は、本開示に関する限定ではない。例えば、K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993)および米国特許第5,478,745号を参照されたい。

20

【0146】

一部の実施形態では、組換えAAVは、三重トランスフェクション方法（米国特許第6,001,650号に詳細に記載される）を使用して生成されてもよい。典型的には、組換えAAVは、宿主細胞を、AAV粒子にパッケージングされる組換えAAVベクター（導入遺伝子を含む）、AAVヘルパー機能ベクター、およびアクセサリ機能ベクターをトランスフェクトすることによって生成される。AAVヘルパー機能ベクターは、「AAVヘルパー機能」配列（すなわち、repおよびcap）をコードし、これは、生成的AAV複製およびカプシド形成についてトランスで機能する。好ましくは、AAVヘルパー機能ベクターは、任意の検出可能な野生型AAVピリオン（すなわち、機能的repおよびcap遺伝子を含むAAVピリオン）を作成することなく、効率的なAAVベクター生成をサポートする。本開示による使用に好適なベクターの非限定的な例としては、両方の全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,001,650号に記載されるpHLP19および米国特許第6,156,303号に記載されるpRep6cap6ベクターが挙げられる。アクセサリ機能ベクターは、AAVが複製に依存する非AAV由来ウイルスおよび/または細胞機能（すなわち、「アクセサリ機能」）についてのヌクレオチド配列をコードする。アクセサリ機能としては、限定されないが、AAV遺伝子転写、段階特異的なAAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、cap発現産物の合成、およびAAVカプシドアセンブリの活性化に関与する部分を含む、AAV複製に必要とされるこれらの機能が挙げられる。ウイルスに基づくアクセサリ機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス1型以外）、およびワクシニアウイルスなどの公知のヘルパーウイルスのいずれかに由来し得る。

30

40

【0147】

一部の態様では、本開示は、トランスフェクトされた宿主細胞を提供する。「トランスフェクション」という用語は、細胞による外来DNAの取り込みを指すために使用され、細胞は、外因性DNAが細胞膜の内側に導入された場合に「トランスフェクト」されている。いくつかのトランスフェクション技法が、一般に、当技術分野において公知である。

50

例えば、Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York、Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier、およびChu et al. (1981) *Gene* 13: 197を参照されたい。そのような技法を使用して、ヌクレオチド組込みベクターおよび他の核酸分子などの1つまたは複数の外因性核酸を、好適な宿主細胞に導入することができる。

【0148】

「宿主細胞」は、目的の物質を保有するか、またはそれを保有することができる任意の細胞を指す。宿主細胞は、多くの場合、哺乳動物細胞である。宿主細胞は、AAVヘルパー構築物、AAVミニ遺伝子プラスミド、アクセサリ機能ベクター、または組換えAAVの生成に関連する他のトランスファーDNAのレシピエントとして使用されてもよい。この用語は、トランスフェクトされた元の細胞の子孫を含む。そのため、「宿主細胞」は、本明細書で使用される場合、外因性DNA配列をトランスフェクトされた細胞を指していてもよい。単一の親細胞の子孫は、自然の、偶発的な、または計画的な突然変異に起因して、形態または遺伝子またはDNA相補体全体において、必ずしも元の親と完全に同一でなくてもよいことが理解される。

10

【0149】

本明細書で使用される場合、「細胞系」という用語は、*in vitro*での連続的なまたは長期にわたる成長および分裂が可能な細胞の集団を指す。多くの場合、細胞系は、単一の前駆細胞に由来するクローン集団である。自発的なまたは誘導される変化が、そのようなクローン集団の保存または移入の間に核型において生じ得ることが当技術分野においてさらに公知である。したがって、言及される細胞系に由来する細胞は、祖先の細胞または培養物と正確に同一でなくてもよく、言及される細胞系は、そのようなバリエーションを含む。

20

【0150】

本明細書で使用される場合、「組換え細胞」という用語は、生物学的に活性なポリペプチドの転写またはRNAなどの生物学的に活性な核酸の産生をもたらすDNAセグメントなどの外因性DNAセグメントが導入されている細胞を指す。

【0151】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、任意の遺伝エレメント、例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、人工染色体、ウイルス、ピリオンなどを含み、これは、適当な制御エレメントと関連した場合に複製が可能であり、細胞間で遺伝子配列を移入することができる。そのため、この用語は、クローニングおよび発現ビヒクル、ならびにウイルスベクターを含む。ベクターの一種は「プラスミド」であり、これは、そこに追加のDNAセグメントがライゲーションされる環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターは、追加のDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲーションされるウイルスベクターである。ある特定のベクターは、そこにそれらが導入される宿主細胞において、自己複製が可能である（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。また、ある特定のベクターは、それらが動作可能に連結している遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技法において有用性の発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般に使用される形態であるので、互換的に使用される。しかしながら、本発明は、等価な機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの発現ベクターのそのような他の形態を含むことを意図する。

30

40

【0152】

クローニングベクターは、自発的に複製することができるか、または宿主細胞のゲノム中に組み込まれるものであり、これは、ベクターが決定可能な様式で切断され得、所望のDNA配列が、新しい組換えベクターが宿主細胞において複製するその能力を保持するよ

50

うにライゲーションされ得る、1つまたは複数のエンドヌクレアーゼ制限部位によってさらに特徴付けられる。プラスミドの場合では、所望の配列の複製は、プラスミドが、宿主細菌などの宿主細胞内でコピー数を増加させるように多数回起こり得るか、または宿主が有糸分裂によって再生する前に宿主ごとに一回だけ起こり得る。ファージの場合では、複製は、溶解段階の間に能動的に、または溶原段階の間に受動的に起こり得る。

【0153】

発現ベクターは、所望のDNA配列が、制限およびライゲーションによって挿入され得、その結果、それが、調節配列に作動可能に接合され、RNA転写物として発現され得るものである。ベクターは、ベクターで形質転換されたもしくはトランスフェクトされたか、または形質転換されていないもしくはトランスフェクトされていない、細胞の特定における使用に好適な1つまたは複数のマーカー配列をさらに含有することができる。マーカーは、例えば、抗生物質または他の化合物に対する耐性もしくは感受性のいずれかを増加または減少させるタンパク質をコードする遺伝子、その活性が当技術分野において公知の標準アッセイによって検出可能である酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼまたはアルカリホスファターゼ）をコードする遺伝子、および形質転換されたまたはトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニーまたはプラークの表現型に視覚的影響を及ぼす遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で使用されるベクターは、それらが作動可能に接合しているDNAセグメントに存在する構造遺伝子産物の自己複製および発現が可能である。

【0154】

一部の実施形態では、有用なベクターは、転写される核酸セグメントがプロモーターの転写制御下に置かれるこれらのベクターであることが企図される。コード配列が機能的タンパク質に翻訳されることが望ましい場合、2つのDNA配列は、5'調節配列におけるプロモーターの誘導がコード配列の転写をもたらす場合、および2つのDNA配列間の連結の性質が（1）フレームシフト突然変異の導入をもたらさない、（2）プロモーター領域のコード配列の転写を指示する能力を妨げない、または（3）対応するRNA転写物のタンパク質に翻訳される能力を妨げない場合に、作動可能に接合されたと言われる。そのため、プロモーター領域は、プロモーター領域が、得られる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳され得るように、そのDNA配列の転写をもたらすことができる場合に、コード配列に作動可能に接合されているであろう。

【0155】

「プロモーター」は、遺伝子の特異的転写を開始するために必要な、細胞の合成機構によって認識されるか、または合成機構に導入されるDNA配列を指す。本明細書に記載されるポリペプチドのいずれかをコードする核酸分子が細胞中で発現される場合、各種の転写制御配列（例えば、プロモーター/エンハンサー配列）を使用して、その発現を指示することができる。プロモーターは、ネイティブプロモーター、すなわち、遺伝子の発現の正常な調節を提供する、その内因的状況における遺伝子のプロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターは構成的であり得る、すなわち、プロモーターは、調節されず、その関連する遺伝子の継続的な転写を可能にする。各種の条件付きプロモーター、例えば、分子の存在または非存在によって制御されるプロモーターを使用することもできる。

【0156】

遺伝子発現のために必要な調節配列の正確な性質は、種または細胞型間で変わり得るが、一般に、必要により、それぞれ、転写および翻訳の開始に関与する5'非転写配列および5'非翻訳配列、例えば、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などを含み得る。特に、そのような5'非転写調節配列は、作動可能に接合した遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。調節配列はまた、所望により、エンハンサー配列または上流のアクチベーター配列を含むこともできる。本発明のベクターは、必要に応じて、5'リーダー配列またはシグナル配列を含んでいてもよい。適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および裁量内である。

【0157】

発現のためにすべての必要なエレメントを含有する発現ベクターは、市販されており、当業者に公知である。例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照されたい。細胞は、異種DNA (RNA) の細胞への導入によって遺伝子工学的に操作される。この異種DNA (RNA) は、宿主細胞において異種DNAの発現を可能にする転写エレメントの作動可能な制御下に置かれる。

【0158】

「動作可能に配置される」、「制御下」または「転写制御下」という語句は、プロモーターが、RNAポリメラーゼの開始および遺伝子の発現を制御するために核酸に関して正しい位置および方向にあることを意味する。「発現ベクターまたは構築物」という用語は、核酸コード配列の一部またはすべてを転写することができる核酸を含有する任意の種類の遺伝子構築物を意味する。一部の実施形態では、発現は、例えば、転写された遺伝子から生物学的に活性なポリペプチド産物または機能的RNA (例えば、ガイドRNA) を生じさせる核酸の転写を含む。

10

【0159】

本開示のrAAVを生成するために所望のAAVカプシドに組換えベクターをパッケージングするための前述の方法は限定することを意味するものではなく、他の好適な方法は、当業者に明らかであろう。

【0160】

一部の実施形態では、配列表に提供される配列を含む、本明細書に提供される配列中のいずれか1つまたは複数のチミジン (T) ヌクレオチドまたはウリジン (U) ヌクレオチドは、アデノシンヌクレオチドと塩基対形成するために (例えば、ワトソン-クリック型の塩基対を介して) 好適な任意の他のヌクレオチドで置き換えられてもよい。例えば、一部の実施形態では、配列表に提供される配列を含む、本明細書に提供される配列中のいずれか1つまたは複数のチミジン (T) ヌクレオチドは、ウリジン (U) ヌクレオチドで好適に置き換えられてもよく、逆もまた同様である。

20

【0161】

態様のいずれかの一部の実施形態では、核酸 (例えば、miRNA) は、安定性または他の有益な特徴を増強するように化学的に改変される。本明細書に記載される核酸は、参照により本明細書にこれにより組み込まれる "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されるものなどの当技術分野において十分に確立された方法によって、合成および/または改変されてもよい。改変としては、例えば、(a) 末端の改変、例えば、5'末端の改変 (リン酸化、コンジュゲーション、逆連結など)、3'末端の改変 (コンジュゲーション、DNAヌクレオチド、逆連結など)、(b) 塩基の改変、例えば、安定化塩基、不安定化塩基、またはパートナーの広範囲のレパートリーと塩基対形成する塩基による置き換え、塩基の除去 (無塩基ヌクレオチド)、またはコンジュゲートされた塩基、(c) 糖の改変 (例えば、2'位または4'位で) または糖の置き換え、ならびに (d) ホスホジエステル連結の改変または置き換えを含む骨格改変が挙げられる。本明細書に記載される実施形態において有用な核酸化合物の具体例としては、限定されるものではないが、改変された骨格を含有するか、または天然のヌクレオシド間連結を含有しない核酸が挙げられる。改変された骨格を有する核酸としては、とりわけ、骨格中にリン原子を有さないものが挙げられる。本明細書の目的のために、および当技術分野において参照される場合があるように、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有さない改変された核酸は、オリゴヌクレオシドであると見なすこともできる。態様のいずれかの一部の実施形態では、改変された核酸は、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を有する。

30

40

【0162】

改変された核酸骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエー

50

ト、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキルホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルホスホネートおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに通常の3'-5'連結を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'連結アナログ、ならびにヌクレオシド単位の隣接対が3'-5'から5'-3'にまたは2'-5'から5'-2'に連結している逆極性を有するものが挙げられ得る。さまざまな塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。その中にリン原子を含まない改変された核酸骨格は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、または1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子性もしくは複素環式ヌクレオシド間連結によって形成される骨格を有する。これらとしては、モルホリノ連結（一部分では、ヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサ骨格；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；混合されたN、O、SおよびCH₂の構成要素部分を有する他のもの、ならびにヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオシド、ならびに特に、 $-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [メチレン(メチルイミノ)またはMMI骨格として公知]、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ および $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ [式中、ネイティブホスホジエステル骨格は、 $-O-P-O-CH_2-$ と表される] を有するものが挙げられる。

【0163】

他の核酸模倣体では、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間連結の両方、すなわち骨格は、新規の基で置き換えられる。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。1つのそのようなオリゴマー化合物である、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているRNA模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物では、RNAの糖骨格は、アミド含有骨格、特に、アミノエチルグリシン骨格で置き換えられる。核酸塩基は、保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的にまたは間接的に結合する。

【0164】

核酸は、1つまたは複数のロックド核酸(LNA)を含むように改変することもできる。ロックド核酸は、リボース部分が、2'および4'炭素を接続する余分な架橋を含む、改変されたリボース部分を有するヌクレオチドである。この構造は、3'-エンド構造コンフォメーションにおいてリボースを有効に「ロックする」。ロックド核酸のsiRNAへの付加は、血清中のsiRNAの安定性を増加させ、オフターゲット効果を低減することが示されている(Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol. Canc. Ther.* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193)。

【0165】

改変された核酸は、1つまたは複数の置換された糖部分を含有することもできる。本明細書に記載される核酸は、2'位に以下のうちの1つを含むことができる：OH；F；O-、S-、もしくはN-アルキル；O-、S-、もしくはN-アルケニル；O-、S-もしくはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、ここで、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または無置換の、C₁~C₁₀アルキル、またはC₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルであり得る。例示的な好適な改変としては、O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]

2 が挙げられ、ここで、n および m は、1 ~ 約 10 である。態様のいずれかの一部の実施形態では、核酸は、2' 位に以下のうちの 1 つを含む：C 1 ~ C 10 の低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラキル、O - アルカリルもしくは O - アラキル、S H、S C H₃、O C N、C l、B r、C N、C F₃、O C F₃、S O C H₃、S O₂ C H₃、O N O₂、N O₂、N₃、N H₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA 切断基、レポーター基、インターカレーター、核酸の薬物動態学的特性を改善するための基、または核酸の薬力学的特性を改善するための基、および類似の特性を有する他の置換基。態様のいずれかの一部の実施形態では、改変としては、2' - メトキシエトキシ (2' - O - - C H C H₂ O C H₃、2' - O - (2 - メトキシエチル) または 2' - M O E としても公知) (Martini 10 et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504)、すなわち、アルコキシ - アルコキシ基が挙げられる。別の例示的な改変は、2' - ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、本明細書の下記の実施例に記載される 2' - D M A O E としても公知の O (C H₂)₂ O N (C H₃)₂ 基、および本明細書の下記の実施例にも記載される 2' - ジメチルアミノエトキシエトキシ (2' - O - ジメチルアミノエトキシエチルまたは 2' - D M A E O E としても当技術分野においても公知)、すなわち、2' - O - - C H₂ - - O - - C H₂ - - N (C H₂)₂ である。

【0166】

他の改変としては、2' - メトキシ (2' - O C H₃)、2' - アミノプロポキシ (2' - O C H₂ C H₂ C H₂ N H₂) および 2' - フルオロ (2' - F) が挙げられる。類似の改変はまた、核酸における他の位置、特に、3' 末端のヌクレオチドにおける糖の 3' 位、または 2' - 5' 連結した dsRNA および 5' 末端のヌクレオチドの 5' 位で行われ得る。核酸はまた、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分などの糖模倣体を有してもよい。

【0167】

核酸は、核酸塩基 (当技術分野において単に「塩基」と称される場合が多い) の改変または置換を含むこともできる。本明細書で使用される場合、「改変されていない」または「天然の」核酸塩基としては、プリン塩基のアデニン (A) およびグアニン (G)、ならびにピリミジン塩基のチミン (T)、シトシン (C) およびウラシル (U) が挙げられる。改変された核酸塩基としては、限定されるものではないが、5 - メチルシトシン (5 - m e - C)、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの 6 - メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの 2 - プロピルおよび他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび 2 - チオシトシン、5 - ハロウラシルおよびシトシン、5 - プロピニルウラシルおよびシトシン、6 - アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル (シュードウラシル)、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシルおよび他の 8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - ハロ、特に 5 - プロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の 5 - 置換ウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニンおよび 7 - メチルアデニン、8 - アザグアニンおよび 8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび 7 - デアザアデニン、ならびに 3 - デアザグアニンおよび 3 - デアザアデニンを含む他の合成および天然の核酸塩基が挙げられ得る。これらの核酸塩基のうちのある特定のものは、本発明の特色である阻害性核酸の結合親和性を増加させるのに特に有用である。これらとしては、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、ならびに 2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび 5 - プロピニルシトシンを含む N - 2、N - 6 および 0 ~ 6 置換プリンが挙げられる。5 - メチルシトシン置換は、核酸の二重鎖安定性を 0.6 ~ 1.2 増加させることが示されており (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、さらにより詳細には、2' - O - メトキシエチル糖改変と組み合わせた場合に、例示的な塩基置換である。態様のいずれかの一部の実施形態では、改変された核酸塩基は、d 5 S I C S および 50

d N A Mを含むことができ、これらは、塩基対として別々にまたは一緒に使用することができる非天然核酸塩基の非限定的な例である（例えば、Leconte et al. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 7, 2336-2343; Malyshev et al. PNAS. 2012, 109 (30) 12005-12010を参照されたい）。態様のいずれかの一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドタグ（例えば、Oligopaint）は、当技術分野において公知の任意の改変された核酸塩基、すなわち、改変されていないおよび/または天然の核酸塩基から改変されている任意の核酸塩基を含む。

【0168】

上記に記載される改変された核酸、骨格、および核酸塩基の調製は、当技術分野において周知である。

【0169】

本発明における特色である核酸の別の改変は、核酸の活性、細胞分布、薬物動態学的特性、または細胞取込みを増強する1つもしくは複数のリガンド、部分、またはコンジュゲートへの核酸に対する化学的連結を含む。そのような部分としては、限定されるものではないが、コレステロール部分（Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556）、コール酸（Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060）、チオエーテル、例えば、ペリル-S-トリチルチオール（Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770）、チオコレステロール（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基（Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54）、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-ホスホネート（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973）、またはアダマンタン酢酸（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654）、パルミチル部分（Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分（Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937）などの脂質部分が挙げられる。

【0170】

態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、pEMBLである。態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、pEMBL-D(+)-Syn1である。態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、pEMBL-D(+)-Syn1-hCGイントロンのみである。態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、pEMBL-D(+)-Syn1-hCGin-2x制御pre-miRである。態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、pEMBL-D(+)-Syn1-CYP46A1-hCGin-2x人工pre-miRである。態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、pEMBL-D(+)-Syn1-luc-HTT-3'UTR/突然変異体である。態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、以下のうちの少なくとも1つを含む：少なくとも1つの（例えば、2つの）ITR; Syn1プロモーター; 少なくとも1つの（例えば、2つの）hCGイントロン; pre-miRの少なくとも1つの（例えば、2つの）コピー（例えば、制御pre-miR; 人工pre-miR; 配列番号6~17、40~44または50~66）; 小ポリA; CYP46A1; ルシフェラーゼ; HTT標的化配列; および/またはHTT-3'UTR

10

20

30

40

50

ノ突然変異体。一部の実施形態では、ベクターは、表10～13から選択されるニューロン特異的合成プロモーター、および/または表13～15から選択されるCREを含む。実施形態のある特定の態様では、miRNAは、野生型HTT対立遺伝子を標的にする。実施形態の他の態様では、miRNAは、突然変異体HTT対立遺伝子を標的にする。さらに別の実施形態では、miRNAは、野生型および突然変異体HTT対立遺伝子の両方を標的にする。さらに別の実施形態では、miRNAは、任意のHTT mRNAを標的にする。

【0171】

一部の実施形態では、組換的に発現された遺伝子のうちの1つまたは複数は、細胞のゲノム中に組み込まれ得る。

【0172】

特許請求の範囲に記載される発明の酵素をコードする核酸分子は、当技術分野において標準的な方法および技法を使用して、1つまたは複数の細胞に導入することができる。例えば、核酸分子は、化学的形質転換および電気穿孔、形質導入、微粒子銃などを含む形質転換などの標準プロトコールによって導入することができる。特許請求の範囲に記載される発明の酵素をコードする核酸分子の発現はまた、核酸分子をゲノムに組み込むことによって達成されてもよい。

【0173】

一部の実施形態では、プロモーターは、シナプシン(Syn1)プロモーター(例えば、配列番号152を参照されたい)である。一態様では、プロモーターは、配列番号152に対して少なくとも80%同一、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一の核酸配列を含む。一態様では、配列番号152に対して少なくとも80%同一、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一の核酸配列を含むプロモーターを含む組換えウイルスベクターを含む組成物が本明細書に提供される。

【0174】

【化3-1】

シナプシン-1(配列番号 152)

GAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGT
GCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCAATCCCAAATT
GCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCAC

【化3-2】

TGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGGCCACCGCC
GCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGAAACTCCCCTTCCCG
GCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCCGCCGCGCCAGCCGGACCGCACCCACGCGAGGCGC
GAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCC
TCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCTGCTGCTGAGAGCGCAGTCG

【0175】

一態様では、配列番号111に対して少なくとも80%同一、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一の配列を含む単離された核酸を含む組成物が本明細書に提供される。一態様では、配列番号111に対して少なくとも80%同一、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一の配列を含む単離された核酸を含む組換えウイルスベクターを含む組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、ベクター(例えば、rAAV)は、プロモーター(

10

20

30

40

50

例えば、合成神経系特異的プロモーター；例えば、表10～13を参照されたい)もしくはその断片、ならびに/またはエンハンサー、ならびに/または配列番号111のプロモーターおよび/もしくはエンハンサーを置き換えるシス調節エレメント(CRE；例えば、表13～15を参照されたい)を含む。一部の実施形態では、ベクター(例えば、rAAV)は、配列番号110に対して少なくとも80%同一、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一の配列を含む単離された核酸を含み、プロモーター(例えば、合成神経系特異的プロモーター；例えば、表10～13を参照されたい)もしくはその断片、および/またはエンハンサー、および/またはシス調節エレメント(CRE；例えば、表13～15を参照されたい)をさらに含む。一部の実施形態では、エンハンサーは、CMVエンハンサーである。一部の実施形態では、プロモーターは、ACTB近位プロモーターである。一部の実施形態では、ベクターは、イントロンをさらに含む。一部の実施形態では、イントロンは、ACTBイントロン/キメラACTB-HBB2イントロンを含む。例えば、配列番号111、表16を参照されたい。いくつかの実施形態では、前述の組成物は、例えば、本明細書に記載される神経疾患または障害を処置するための投与されるmiRNAの非存在下で使用することができる。さまざまな実施形態では、前述の組成物は、例えば、本明細書に記載される神経疾患または障害を処置するための投与されるmiRNAの存在下で使用することができる。一部の実施形態では、配列番号111に対して少なくとも80%同一、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一の単離された核酸配列を含む組換えウイルスベクター、例えば、組換えAAVは、CYP46A1タンパク質を発現するため、および/または本明細書に記載される神経疾患または障害を処置するために、処置を必要とする対象に投与される。一部の実施形態では、配列番号111の単離された核酸配列を含む組換えウイルスベクター、例えば、組換えAAVは、CYP46A1タンパク質を発現するため、および/または本明細書に記載される神経疾患または障害を処置するために、処置を必要とする対象に投与され、ここで、CMVエンハンサー、および/またはACTB近位プロモーター、および/または配列番号111のキメラACTB-HBB2イントロンは、表10～13から選択される合成神経系特異的プロモーターもしくはその断片、および/またはエンハンサー、および/または表13～15から選択されるシス調節エレメント(CRE)のうちの1つまたは複数によって置き換えられる。

10

20

30

【0176】

CYP46A1バリエーション配列を含む、配列番号111、4036bpのITR-ITR配列(例えば、配列番号110を参照されたい)。

【0177】

太字のテキスト(例えば、配列番号111のヌクレオチド(nt)1～130)は、左ITRを示す。

【0178】

イタリック体のテキスト(例えば、配列番号111のnt182～436)は、エンハンサーを示す。

【0179】

太字のイタリック体のテキスト(例えば、配列番号111のnt550～804)は、プロモーターを示す。

40

【0180】

二重下線付きのテキスト(例えば、配列番号111のnt824～1892)は、イントロンを示す。

【0181】

太字の二重下線付きのテキスト(例えば、配列番号111のnt1966～3465)は、CYP46A1バリエーション配列(例えば、配列番号110を参照されたい)のコード配列(CDS)を示す。

【0182】

50

【化 4 - 2】

accttcgtgcaccgcgctcgcagccgctacgagcacatccccgggcccgcgcccagtttcocttctaggacac
ctccccctgcttttgaaaaaggatgaggttggtggccgtgtgctccaagatgtgtttCtAgattgggctaagaag
tatggacctgtAgtgcggtcaacgtcttccacaaaacctcagtoatogtoacgagtccctgagtcgggtaagaag
ttcctgatgtcaaccaagtacaacaaggactccaagatgtaccgtccgctccagactgtgtttggtgagagactc
ttcgccaaggcttgggtgtccgaatgcaactatgagcgtggcacaagcagcggagagtGatagacctggccttc
agccggagctccttggttagcttaatggaaacattcaacgaAaaggctgagcagctgggtggagattctagaagcc
aaggcagatgggcagacccccTgtGAGCatgacagacatgctgacctacaccgccatggacatcctggccaaggca
gcttttggtgagaccagtatgctgctgggtgccagaagcctctgtcccaggcagtgaaacttagtttggag
ggaatcactgcgtcccgaacactctggcaaaagtctctgccagggaaagaggaagcagctccgggaggtccgggag
agcattcgcttcttgcgccaggtgggcagggactgggtccagcgcgcggggaagccctgaagaggggagagag
gttctgccgacatcctcacacagattctgaaagctgaagagggagcccaggacgacgagggctctgctggacaac
ttcgtcaccttcttcattgctgggtcacgagacctctgccaaccacttggcgttcacagtgatggagctgtctcgc
cagccagagatcgtggcaaggctgcagggccaggtggatgaAgtGattggttctaagaggtacctggatttcgag
gacctgggagactgcagctacctgtcccaggtcctcaaagagtcgctgaggtctgtaccccaccagcatggggcacc
tttAGGctgctggaagaggagaccttgattgatgggggtGagagctccccggcaacaccccgcctctgttcaagcacc
tagtGatggggcggatggacacatactttgaggaccgctgactttcaaccccgatcgttccggccctggagca
ccaagccacggttcacctacttccccttctccctggggccaccgctcctgcatcgggcagcagtttgctcagatg
gaggatgaaggtggtcatggcaaaagctgctgagagggctggagttccggctgggtgcccgggcagcgttccgggctg
caggagcagggccacactcaagccactggaccccgtgctgtgcacctgcggccccgcggctggcagcccgcacccc
ccaccacccccctgctgagtgatagcttggtaaccgagctcgatccaattgcaatgatcatcatgacagatctgcg
cgcatcgatcagcgcctttaaatttgcgcatgcagctatagttctagagggccctattctatagtggtcaccta
aatgctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtttgtttgccctccccgctg
ccttcccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaattgcacgcgattgtctg
agtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcagg
catgctgggatgcggtgggctctatgggtttaaacGCGGCCGCTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATT
ACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAC
CAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

10

20

30

(配列番号111)

【 0 1 8 4 】

40

50

【表 16】

表 16

特色	配列番号 111 中の 場所		修飾語句
misc_特色	1	130	/label=L-ITR
エンハンサー	182	548	/label=CMVe /label=CMVenhancer /note="GenBank: KX529075.1"
プロモーター	550	823	/label=ACTBp /label=ACTB proximal promoter
misc_特色	824	1892	/label=chimeric ACTB-HBB2 intron
CDS	1966	3468	/codon_start=1 /product=">NM_006668.2 Homo sapiens cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1 (CYP46A1), mRNA"
ポリ A_シグナル	3629	3853	/label=bGH polyA /label=bGH\poly(A)\signal /note="Bovine growth hormone gene, complete cds. GenBank: M57764.1 ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M57764.1"
misc_特色	3907	4036	/label=R-ITR

10

20

30

40

50

【0185】

一態様では、配列番号 153 に対して少なくとも 80% 同一、例えば、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99% または 100% 同一の配列を含む単離された核酸を含む組成物が本明細書に提供される。一態様では、配列番号 153 に対して少なくとも 80% 同一、例えば、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99% または 100% 同一の配列を含む単離された核酸を含む組換えウイルスベクターを含む組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、ベクター（例えば、rAAV）は、プロモーター（例えば、合成神経系特異的プロモーター；例えば、表 10 ~ 13 を参照されたい）もしくはその断片、ならびに / またはエンハンサー、ならびに / または配列番号 153 のプロモーターおよび / もしくはエンハンサーを置き換えるシス調節エレメント（CRE；例えば、表 13 ~ 15 を参照されたい）を含む。

【化 5 - 1】

配列番号 153

```

1 tctagagcta gcatatggat ccatcgattt agggataaca gggtaattat cagcacacaa
61 ttgcccatta tacgcgcgta taatggacta ttgtgtgctg atatctgtac acttaagggc
121 tagatccttag cttacgtcac tagaggggtcc acgttttagtt tttaaagatcc attgatctcc
181 taaacgctgc aagattcgca acctgggata cttagcctag gcgctaggtc ctagtgcage
241 gggacttttt ttctaaagtc gttgagagga ggagtcgtca gaccagatag ctttgatgtc
301 ctgatcggaa ggatcgttgg cccccctgca ggcagctggt aattaactgc gcgctcgcctc
361 gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgctggggc acctttggtc gcccggcctc
421 agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggccaaactcc atcaactaggg gttccttgta
481 gttaatgatt aaccgcctat gctactttatc tacggcgcgc cacgcgtgac tagttattaa
541 tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa
601 cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata
661 atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag
721 tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc
781 cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgaacctta
841 tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag
901 gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg
961 tatttattta ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg ggggggcgcg
1021 cgccaggcgg ggcgggggcg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg
1081 cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttccctttat ggcgagggcg cggcggcggc
1141 ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc ctctgccccg
1201 tgccccgctc cgccgcgcgc tcgcgcgcgc cgcgccgct ctgactgacc gcgttactcc
1261 cacaggtgag cgggcgggac ggcccttctc ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat
1321 gacggcttgt ttcttttctg tggctgcgtg aaagccttga ggggctccgg gagggcctt
1381 tgtgcggggg gagcggctcg gggggtgctg gcgtgtgtgt gtgctgggg agcgcgcgct
1441 gcggctccgc gctgcccggc ggctgtgagc gctgcggggc cggcggggg ctttgtgcgc
1501 tccgcagtgt gcgcgagggg agcgcggcgc ggggcgggtc cccgcgggtc ggggggggct

```

10

20

30

40

50

【化 5 - 2】

1561 gcgaggggaa caaaggctgc gtgcggggtg tgtgcgtggg ggggtgagca gggggtgtgg
1621 ggcgctcggg ogggctgcaa cccccctgc acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc
1681 cggcttcggg tgcggggctc cgtacggggc gtggcgcggg gctcgcctgt ccgggcgggg
1741 ggtggcgcca ggtgggggtg ccgggcgggg cggggccggc tcgggcccgg gagggtcctg
1801 gggagggggc cggcgcccc cggagcgcgc cggctgtctg aggcgcggcg agccgcagcc
1861 attgcctttt atggtaatcg tgcgagagg cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg
1921 cggagccgaa atctgggagg cgcgcgcgca cccctctag cgggcgcggg gogaagcgg
1981 gcggcgcgg caggaaggaa atgggcgggg agggccttcg tgcgtcgcgg cgcgcgcgct
2041 cccttctccc tctccagcct ctcgccttcg gctctgctg cgcgggggga cggctgcctt cgggggggac
2101 ggggcagggc ggggttcggc gctctgctg tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc
2161 atgttcatgc cttcttcttt ttctacagc tctggggcaa cgtgctgggt attgtgctgt
2221 ctcatcattt tggcaagaa ttgattaatt cggcgaacg cgtcagagtc ctcggtacga
2281 tttaaattga attccttaag ctatcatagg aatgagcccc gggctgctgc tgctcggtag
2341 cgcctcctcg actgccttcg gctctgctg cacttctgt caccgcgctc gcagccgcta
2401 cgagcacatc cccgggccc cgcggcccag ttctcttcta ggacacctcc cctgcttttg
2461 gaaaaaggat gagggtggtg gccgtgtgct ccaagatgtg tttctagatt gggctaagaa
2521 gtatggacct gtatgcggg tcaacgtctt ccaaaaaacc tcagtcctgc tcacgagtc
2581 tgagtcgggt aagaagtcc tgatgtcaac caagtacaac aaggactcca agatgtaccg
2641 tcgctcctcg actgtgtttg gtgagagact cttcggccaa ggcttgggtg ccgaaagcaa
2701 ctatgagcgc tggcacaagc agcggagagt gatagacctg gccttcagcc ggagctcctt
2761 ggttagctta atggaacat tcaacgaaaa gctgagcag ctggtggaga ttctagaagc
2821 caaggcagat gggcagacct ctgtgagcat gcaggacatg ctgacctaca ccgccatgga
2881 ctcctcctgg aaggcagctt ttgggatgga gaccagtatg ctgctgggtg ccgaaagcc
2941 tctgtcccag gcagtgaac ttatgttggg gggaaactact gcgtcccga acactctggc
3001 aaagtctctg ccagggaaga ggaagcagct ccgggaggtc cgggagagca ttcgcttct
3061 ggcgcagggt ggcagggact ggtccagcg ccgcccggaa gccctgaaga ggggcagga
3121 ggttcctgcc gacatcctca cacagattct gaaagctgaa gaggagccc aggcagca
3181 gggctcgtcg gacaacttcg tcaccttctt cattgctggt cagcagacct ctgccaacca
3241 cttggcgctc acagtgatgg agctgtctcg ccagccagag atcgtggcaa ggctgcaggc
3301 cgaggtggat gaagtgattg gttctaagag gtacctggat ttcgaggacc tggggagact
3361 gcagtcacct tcccaggtcc tcaaagagtc gctgaggctg taccaccag catggggcac
3421 ctttaggctg ctggaagagg agacctgat tgatggggtg agagtcccc gcaacacccc
3481 gctcttgttc agcacctatg tgatggggcg gatggacaca tactttgagg acccgtgac
3541 tttcaacccc gatcgtctcg gccctggagc acccaagcca cggttacctt acttcccctt
3601 ctcccggggc caccgctcct gcatcgggca gcagtttctc cagatggagg tgaagtggt
3661 catggcaaa cgtcgtcaga ggctggagtt ccggtggtg cccgggcagc gcttcgggct
3721 cgaggagcag gccacactca agccactgga ccccgctgct tgcaacctgc ggcctcggg
3781 ctggcagccc gcacccccac cccccctg ctgagtata gcttgggtacc gactcagtc
3841 caattgcaat gatcatcatg acagatctgc gcgcgacga tatcagcgtc ttaaatttgc
3901 gcagtcagct atagttctag agggccctat tctatagtg cacctaaatg ctagagctcg
3961 ctgactcagc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgce cctccccctg
4021 gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat
4081 tgcactcgc tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtg ggcaggacag
4141 caagggggag gattgggaag acaatagcag gcagctggtg gatgcgggtg gctctatggg
4201 tttaaacgcg gcccgctaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta caaggaaacc
4261 ctagtgatgg agttggccac tccctctctg ccgctcgtct cgctcactga ggcggggcga
4321 ccaaaggctc cccgacgccc gggctttgce cgggcggcct cagtgcgca gcgagcgcg
4381 agttaattaa ggcgccttag gccgacctt agactctgta ctcagttcta taaacgagcc
4441 attggatacg agatccgtag attgataagg gacacggaat atccccggac gcaatagaca
4501 ccggtggaca gcttgggtat ctgagcacag tgcgcgctcc gaatctagct ctactttaga
4561 ggcctcggat tctgatggtc gttagaccga gaaccgattg ggggatgag atctactagt
4621 tctcagcaca caattgcccc ttatacgcgc gtataatgga ctattgtgtg ctgatatagg
4681 gataacaggg taattctaga gctagcatat ggatccatcg atttgatgcg gtattttctc
4741 cttacgcate tgtgcggtat ttcacaccgc atacgtcaa gcaaccatag tacgcgccct
4801 gtacggcgc attaagcgcg ggggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacactg
4861 ccagcgcctc agcgcgcgct ccttctcctt tcttcccttc ctttctcggc agttcggccg
4921 gctttcccc tcaagctcta aatgggggce tccctttagg gttccgattt agtgccttac
4981 ggcacctcga ccccaaaaaa cttgatttgg gtgatggtc acgtagtggt ccatcgcctt
5041 gatagcgggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt ctttaaatag ggactcttgt
5101 tccaaactgg aacaacactc aactctatct cgggctattc ttttgattta taagggattt

10

20

30

40

【化5-3】

```

5161 tgccgatttc ggtctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaaattt aacgcgaatt
5221 ttaacaaaaat attaacgttt acaattttat ggtgcactct cagtacaatc tgcctotgatg
5281 ccgcatagtt aagccagccc cgacaccggc caacaccggc tgaocggccc tgaocgggctt
5341 gtctgctccc ggcacccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccggggagc tgcattgtgtc
5401 agaggttttc accgtcatca ccgaaacggc cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat
5461 ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg
5521 gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc
5581 tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagcc
5641 atattcaacg ggaaacgtcg aggccgcatg taaattccaa catggatgct gatttatatg
5701 ggtataaatg ggctcgcgat aatgtcgggc aatcagggtgc gacaatctat cgcttgtatg
5761 ggaagcccga tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg
5821 ttacagatga gatggtcaga ctaaactggc tgacgggaatt tatgcctctt ccgaccatca
5881 agcattttat ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgatc cccggaaaaa
5941 cagcattcca ggtattagaa gaatatcctg attcagggtga aaatattgtt gatgcgctgg
6001 cagtgttccct gcgcgggttg ccttcgatcc ctggttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc
6061 gcgtatttcg tctcgtcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg
6121 attttgatga cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac
6181 ttttgccatt ctaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta
6241 tttttgacga ggggaaatta ataggttgta ttgatgttg acgagtcgga atcgcagacc
6301 gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtg gttttctcct tcattacaga
6361 aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt
6421 tgatgctcga tgagtttttc taagcgtata atggctctaga gctagcatat ggatccatcg
6481 attccattat acgcctgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac
6541 ttcattttta atttaaaagg atctagggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa
6601 tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat
6661 cttcttgaga tctttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc
6721 taccagcggg ggtttggttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg
6781 gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg ttcttctagt gtagecgtag ttaggccacc
6841 acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtctt gctaactcctg ttaccagtg
6901 ctgctgccag tggcgataag tctgtcttta ccgggttgga ctcaagacga tagttaaccg
6961 ataaggcaga gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa
7021 cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcggc acgcttcccg
7081 aaggagaaaa ggccgacagg tatccggtaa gcggcagggt ccggaacagga gatgcgacga
7141 gggagcttcc agggggaac gcctggatc tttatagtc tgtcgggttt ccgccctct
7201 gacttgagcg tcgattttg tgatgctcgt cagggggcg gagcctatgg aaaaacgcca
7261 gcaacgggc ctttttacgg ttccctggct tttgctggcc ttttgcctac atgt

```

(配列番号153)

10

20

30

【0186】

本明細書に提供される態様の一部は、配列番号153に示される核酸配列であり、細菌配列を欠くrAAVを製造するために使用される。一部の実施形態では、rAAVは、例えば、配列番号111に示されるように、プラスミドDNA鋳型から製造される。一部の実施形態では、rAAVは、例えば、配列番号153または配列番号111に示されるように、末端が閉じた線状の二重鎖DNAから製造される。

変更されたカプシド

【0187】

一実施形態では、本明細書に記載されるカプシドは、CNSに対する向性を増加させるようにさらに変更される。ペイロードを含む変更されたウイルスカプシドを含む組成物であって、ペイロードが、調節配列、および中枢神経系障害を標的にする逆位末端反復配列(ITR)に隣接した核酸配列を含み、変更が、化学的変更、非化学的変更またはアミノ酸変更である、組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、ペイロードの核酸配列は、(a)1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸、および(b)CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む。一部の実施形態では、ペイロードの核酸配列は、1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸を含む。一部の実施形態では、ペイロードの核酸配列は、CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む。

40

【0188】

50

(a) 第 1 のペイロードを含む第 1 の改変されたウイルスカプシド、および (b) 第 2 のペイロードを含む少なくとも第 2 の改変されたウイルスカプシドを含む組成物であって、ペイロードが、調節配列、および中枢神経系障害を標的にする逆位末端反復配列 (I T R) に隣接した核酸配列を含み、第 1 および少なくとも第 2 の改変されたウイルスカプシドが、同じであり、第 1 および第 2 のペイロードが、異なり、改変が、化学的改変、非化学的改変またはアミノ酸改変である、組成物が本明細書にさらに提供される。一部の実施形態では、第 1 または第 2 のペイロードの核酸配列は、1 つまたは複数の m i R N A をコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸を含む。一部の実施形態では、第 1 または第 2 のペイロードの核酸配列は、C Y P 4 6 A 1 タンパク質をコードする単離された核酸を含む。

10

【 0 1 8 9 】

(a) 第 1 のペイロードを含む第 1 の改変されたカプシド、および (b) 第 2 のペイロードを含む少なくとも第 2 の改変されたカプシドを含む組成物であって、ペイロードが、調節配列、および中枢神経系障害を標的にする逆位末端反復配列 (I T R) に隣接した核酸配列を含み、第 1 および少なくとも第 2 の改変されたカプシドが、異なり、第 1 および第 2 のペイロードが、同じまたは異なり得、改変が、化学的改変、非化学的改変またはアミノ酸改変である、組成物が本明細書にさらに提供される。一部の実施形態では、第 1 または第 2 のペイロードの核酸配列は、1 つまたは複数の m i R N A をコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸を含む。一部の実施形態では、第 1 または第 2 のペイロードの核酸配列は、C Y P 4 6 A 1 タンパク質をコードする単離された核酸を含む。

20

【 0 1 9 0 】

ある特定の実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、C N S または P N S のその優先的な標的化をもたらす改変を含む。例えば、改変されたウイルスカプシドは、C N S に対する増加した向性、および / または少なくとも第 2 の場所、例えば、肝臓に対する減少した向性を有する。C N S の優先的な標的化は、他の部位への標的化を排除しないが、むしろ、別の部位と比較して、それが C N S に対してより高く標的にされることを示す。

【 0 1 9 1 】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、C N S または P N S のその標的化をもたらす改変を含む。例えば、典型的には、非 C N S 部位 (例えば、肝臓) を標的にするカプシドへの改変は、C N S 部位および非 C N S 部位の両方を直ちに標的にするようにカプシドを再指示することができる。そのような実施形態では、C N S 標的化は、優先的である必要はない。

30

【 0 1 9 2 】

一実施形態では、カプシドに対する改変は、アミノ酸改変、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、または置換である。一実施形態では、アミノ酸改変は、C N S または P N S に対する向性を増加させる。一実施形態では、アミノ酸改変は、C N S または P N S に改変されたカプシドを標的化する。

【 0 1 9 3 】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、その内容が、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第 1 6 / 5 1 1 , 9 1 3 号の配列番号 1 ~ 4 に対して 9 0 % 同一である核酸配列を有するか、またはそれからなるか、またはそれから本質的になる。この米国特許出願は、乏突起膠細胞に対する優性の向性を示すキメラ A A V カプシド配列を記載し、対象の C N S における乏突起膠細胞に形質導入する A A V ベクターを作出するために使用することができる。

40

【 0 1 9 4 】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、1 つまたは複数のアミノ酸置換を含む A A V カプシドタンパク質であり、ここで、置換は、A A V カプシドタンパク質に新たなグリカン結合部位を導入する。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、A A V 2 におけるアミノ酸 2 6 6、アミノ酸 4 6 3 ~ 4 7 5、およびアミノ酸 4 9 9 ~ 5 0 2、または A A V 1、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8 もしくは A A V

50

10における対応するアミノ酸位置にある。そのようなAAVカプシドタンパク質は、例えば、米国特許出願第16/110,773号にさらに記載されており、この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0195】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、新たなグリカン結合部位を導入する1つまたは複数のアミノ酸置換を含むAAV 2.5カプシドタンパク質（国際特許出願第PCT/US2020/029493号の配列番号1；この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるAAVカプシドタンパク質である。そのようなアミノ酸置換は、ニューロンおよびグリア細胞、例えば、アストロサイトにカプシドを標的化し得る。国際特許出願第PCT/US2020/029493号に記載されるカプシドタンパク質、カプシド、ウイルスベクターおよび方法の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸置換は、A267S、SQA G ASDIRDQSR464-476SX₁AGX₂SX₃X₄X₅X₆QX₇R（ここで、X₁~₇は、任意のアミノ酸であり得る）、およびEYSW 500~503EX₈X₉W（ここで、X₈~₉は、任意のアミノ酸であり得る）を含む。本明細書に記載されるカプシドタンパク質、カプシド、ウイルスベクターおよび方法の実施形態では、X₁は、Vもしくはその保存的置換であり；X₂は、Pもしくはその保存的置換であり；X₃は、Nもしくはその保存的置換であり；X₄は、Mもしくはその保存的置換であり；X₅は、Aもしくはその保存的置換であり；X₆は、Vもしくはその保存的置換であり；X₇は、Gもしくはその保存的置換であり；X₈は、Fもしくはその保存的置換であり；および/またはX₉は、Aもしくはその保存的置換である。本明細書に記載されるカプシドタンパク質、カプシド、ウイルスベクターおよび方法の実施形態では、X₁は、Vであり、X₂は、Pであり、X₃は、Nであり、X₄は、Mであり、X₅は、Aであり、X₆は、Vであり、X₇は、Gであり、X₈は、Fであり、およびX₉は、Aであり、ここで、新たなグリカン結合部位は、ガラクトース結合部位である。そのようなAAVカプシドタンパク質は、例えば、国際特許出願第PCT/US2020/029493号にさらに記載されており、この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0196】

一実施形態では、例えば、米国特許出願第16/956,306号に記載されるように、改変されたウイルスカプシドは、表面結合ペプチドを含むAAVカプシドタンパク質粒子であり、ここで、AAV粒子の表面に結合したペプチドは、Angiopеп-2、GSH、HIV-1TAT(48~60)、ApoE(159~167)2、レプチン30(61~90)、THR、PB5-3、PB5-5、PB5-14、またはそれらの任意の組合せであり、この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのようなAAVカプシドは、血液脳関門を通過して、例えば、ペイロードの送達を可能にする。

【0197】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、AAVカプシドタンパク質（例えば、AAV1、AAV5、またはAAV6カプシドタンパク質）であり、ここで、カプシドタンパク質のVP3領域は、改変（例えば、チロシン残基の非チロシン残基による置き換え、および/またはトレオニン残基の非トレオニン残基による置き換え）を、野生型AAV1カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号1；この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）のY705、Y731、およびT492のうちの一つもしくは複数、またはそのそれぞれ；野生型AAV5カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号2）のY436、Y693、およびY719のうちの一つもしくは複数、またはそのそれぞれ；あるいは野生型AAV6カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号3）のY705、Y731、およびT492のうちの一つもしくは複数、またはそのそれぞれに対応する位置を含む。そのようなAAVカプシドは、ニューロンおよびアストロサイトを標的にする。

10

20

30

40

50

【0198】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、カプシドのVP3領域におけるYからFへの（チロシンからフェニルアラニンへの）改変またはTからVへの（トレオニンからバリンへの）改変を、野生型AAV1カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号1）のY705F、Y731F、およびT492Vのうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれ；野生型AAV5カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号2）のY436F、Y693F、およびY719Fのうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれ；あるいは野生型AAV6カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号3）のY705F、Y731F、およびT492Vのうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれに対応する位置に含む、AAVカプシドタンパク質（例えば、AAV1、AAV5、またはAAV6カプシドタンパク質）である。そのようなAAVカプシドは、ニューロンおよびアストロサイトを標的にする。

10

【0199】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、AAVカプシドタンパク質（例えば、AAV1、AAV5、またはAAV6カプシドタンパク質）であり、ここで、カプシドタンパク質のVP3領域は、改変（例えば、チロシン残基の非チロシン残基による置き換え、および/またはトレオニン残基の非トレオニン残基による置き換え）を、野生型AAV1カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号1）のY705、Y731、およびT492のうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれ；野生型AAV5カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号2）のY436、Y693、およびY719のうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれ；あるいは野生型AAV6カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号3）のY705、Y731、およびT492のうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれに対応する位置に含む。そのようなAAVカプシドは、ニューロンおよびアストロサイトを標的にする。

20

【0200】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、カプシドタンパク質のVP3領域におけるYからFへの（チロシンからフェニルアラニンへの）改変またはTからVへの（トレオニンからバリンへの）改変を、野生型AAV1カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号1）のY705F、Y731F、およびT492Vのうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれ；野生型AAV5カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号2）のY436F、Y693F、およびY719Fのうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれ；あるいは野生型AAV6カプシドタンパク質（例えば、米国特許出願第16/565,191号の配列番号3）のY705F、Y731F、およびT492Vのうちの1つもしくは複数、またはそのそれぞれに対応する位置に含む、AAVカプシドタンパク質（例えば、AAV1、AAV5、またはAAV6カプシドタンパク質）である。そのようなAAVカプシドは、ニューロンおよびアストロサイトを標的にする。

30

【0201】

一実施形態では、アミノ酸改変は、改変されたカプシドが、例えば同じ血清型のウイルスベクターに対して、例えば生じる中和抗体を回避することを可能にする。一実施形態では、アミノ酸改変は、改変されたカプシドを、反復投与のために使用することを可能にし、例えば、改変は、再投与の際に、カプシドが治療効果を有することを可能にする。

40

【0202】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、キメラカプシドである。「キメラ」カプシドタンパク質は、本明細書で使用される場合、野生型と比べて、カプシドタンパク質のアミノ酸配列における1つまたは複数の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10などの）アミノ酸残基の置換、ならびに野生型と比べて、アミノ酸配列における1つまたは複数の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10などの）アミノ酸残基

50

の挿入および/または欠失によって改変された A A V カプシドタンパク質（例えば、V P 1、V P 2 または V P 3 のうちのいずれか 1 つまたは複数）を意味する。一部の実施形態では、1 つの A A V 血清型由来の完全なまたは部分的なドメイン、機能的領域、エピトープなどは、任意の組合せで、異なる A A V 血清型の対応する野生型ドメイン、機能的領域、エピトープなどを置き換えて、本発明のキメラカプシドタンパク質を生成することができる。キメラカプシドタンパク質の生成は、当技術分野において周知のプロトコールに従って行うことができ、本発明のカプシドに含まれ得るかなりの数のキメラカプシドタンパク質は、文献および本明細書に記載されている。

【0203】

一実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、単数体カプシドである。本明細書で使用される場合、「単数体 A A V」という用語は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる国際出願第 W O 2 0 1 8 / 1 7 0 3 1 0 号または米国出願第 U S 2 0 1 8 / 0 3 7 1 4 9 号に記載される A A V を意味するものとする。一部の実施形態では、ビリオンの集団は、ビリオン粒子を構築することができる単数体 A A V 集団であり、ここで、A A V カプシドタンパク質である V P 1、V P 2 および V P 3 からなる群由来の少なくとも 1 つのウイルスタンパク質は、A A V ゲノムを封入することができるビリオン粒子を形成するために必要とされる、他のウイルスタンパク質のうちの少なくとも 1 つとは異なる。存在するそれぞれのウイルスタンパク質（V P 1、V P 2、および/または V P 3）について、そのタンパク質は、同じ種類（例えば、すべて A A V 2 V P 1）である。一例では、ウイルスタンパク質の少なくとも 1 つは、キメラウイルスタンパク質であり、他の 2 つのウイルスタンパク質の少なくとも 1 つは、キメラではない。一実施形態では、V P 1 および V P 2 は、キメラであり、V P 3 のみが、キメラではない。例えば、キメラ A A V 2 / 8（A A V 2 の N 末端および A A V 8 の C 末端）由来の V P 1 / V P 2 から構成されるウイルス粒子のみが、A A V 2 由来の V P 3 のみと対形成するか、またはキメラ V P 1 / V P 2 2 8 m - 2 P 3（V P 3 開始コドンの突然変異を有さない A A V 8 由来の N 末端および A A V 2 由来の C 末端）のみが、A A V 2 由来の V P 3 のみと対形成した。別の実施形態では、V P 3 のみが、キメラであり、V P 1 および V P 2 は、キメラではない。別の実施形態では、ウイルスタンパク質のうちの少なくとも 1 つは、完全に異なる血清型由来である。例えば、キメラ V P 1 / V P 2 2 8 m - 2 P 3 のみが、A A V 3 にのみ由来の V P 3 と対形成した。別の例では、キメラタンパク質は存在しない。

【0204】

本明細書に記載される技術の一部の実施形態では、改変されたウイルスカプシドは、1 つまたは複数の改変、例えば、カプシドに対する化学的改変、非化学的改変、またはアミノ酸改変を含む。そのような改変は、例えば、数ある中でも、改変されたカプシドの組織型向性または細胞型向性を改変することができる。

【0205】

改変は、受容体結合などの生化学的特性を含むカプシドの特性を直接的に変更することができ、その結果、改変それ自身が、カプシドの挙動を変更するか、または所望の様式でカプシドの挙動を次に改変するリガンドの付着などの更なる改変を可能にし得る。

【0206】

一実施形態では、天然に存在し得るか、またはカプシドポリペプチドコード配列の遺伝子改変によって導入され得るシステイン残基の化学的改変は、ジスルフィド結合形成を介してリガンドの共有結合的付着を可能にする（例えば、W O 2 0 0 5 / 1 0 6 0 4 6 号を参照されたく、この内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。

【0207】

限定されるものではないが、例えば、標的細胞によって発現された細胞表面タンパク質を標的にする抗体またはその抗原結合性断片を含むさまざまなリガンドが企図される（例えば、W O 2 0 0 0 / 0 0 2 6 5 4 号を参照されたく、これは、参照により本明細書に組み込まれる）。

【0208】

10

20

30

40

50

その内容も参照により本明細書に組み込まれるWO2015/062516号は、カプシド遺伝子の遺伝子改変によるアジド基を含むアミノ酸の挿入と、それに続くアジド基を介したリガンドの化学的コンジュゲーションを記載している。

【0209】

糖化、または糖部分の化学的コンジュゲーションによるAAVカプシド向性の改変は、Horowitz et al., Bioconjugate Chem. 22: 529-532 (2011)によって記載されている。この手法および類似の手法は、本明細書に記載されるカプシドの改変のために企図される。

【0210】

他の実施形態では、ウイルスカプシドのポリエチレングリコール(PEG)またはポリ-(N-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(pHPMA)などのポリマーによるコーティングが、具体的に企図される。そのような改変は、例えば、非標的組織との特異的なおよび非特異的な相互作用を低減することができる。

【0211】

他の実施形態では、カルボジイミドカップリングが、具体的に企図される。例えば、Joo et al. ACS Nano 5、タイトル"Enhanced Real-time Monitoring of Adeno-Associated Virus Trafficking by Virus-Quantum Dot Conjugates" (2011)を参照されたい。

【0212】

他の実施形態では、ウイルスカプシドは、例えば、WO2017/212019号に記載されるように改変することができ、また米国国内段階USN16/308,740号も参照されたく、これらの内容は、参照により本明細書にそれぞれ組み込まれる。そこに記載される手法は、-CSNH-および芳香族部分を含む結合を介してウイルスカプシドをリガンドにカップリングする。遺伝子改変されたウイルスカプシドは、この手法によってさらに改変することができるが、そこに記載される改変は、ウイルスカプシドの遺伝子改変を必要としない。そこに記載されるリガンドとしては、例えば、標的化剤、中和抗体相互作用を回避するための立体遮蔽剤、標識剤、または磁気剤が挙げられる。そこに記載される標的化リガンドとしては、例えば、細胞型特異的リガンド、タンパク質、単糖または多糖、ステロイドホルモン、RGDモチーフペプチド(例えば、細胞接着タンパク質を模倣し、インテグリンに結合することができる細胞接着モチーフであるArg-Gly-Asp)、ビタミン、および小分子が挙げられる。

【0213】

一実施形態では、本発明の化学的改変は、国際特許出願第PCT/EP2017/064089号に記載される改変であり、この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

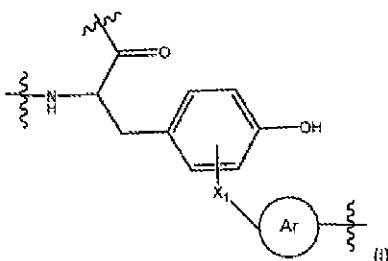
【0214】

一実施形態では、本発明の化学的改変は、国際特許出願第PCT/EP2020/069554号に記載される改変であり、この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0215】

一実施形態では、カプシドは、そのカプシド中に少なくとも1つの化学的に改変されたチロシン残基を有し、ここで、前記化学的に改変されたチロシン残基は、式(I)：

【化6】



10

20

30

40

50

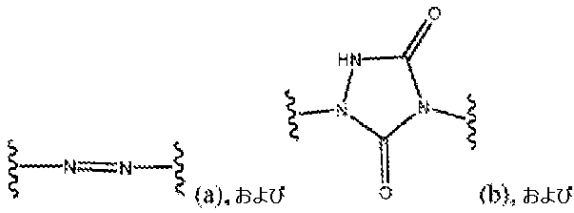
【 0 2 1 6 】

[式中、

【 0 2 1 7 】

- X 1 は、

【 化 7 】



10

からなる群から選択され、

【 0 2 1 8 】

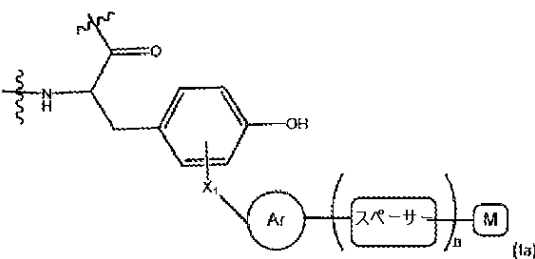
- A r は、必要に応じて置換されたアリールまたはヘテロアリール部分である]

のものである。

【 0 2 1 9 】

一実施形態では、カプシドは、式 (I a) :

【 化 8 】



20

【 0 2 2 0 】

[式中、

【 0 2 2 1 】

- X i および A r は、上記の本明細書に定義される通りであり、

30

【 0 2 2 2 】

- スペーサーは、「 A r 」基を機能性部分「 M 」に連結するための基であり、これは、最大で 1 0 0 0 個の炭素原子を含み、好ましくは、必要に応じてヘテロ原子および / または環状部分を含む化学鎖の形態であり、

【 0 2 2 3 】

- n は、0 または 1 であり、

【 0 2 2 4 】

- M は、立体剤、標識剤、細胞型特異的リガンドまたは薬物部分を含む機能性部分である]

である少なくとも 1 つの化学的に改変されたチロシン残基を有する。

40

【 0 2 2 5 】

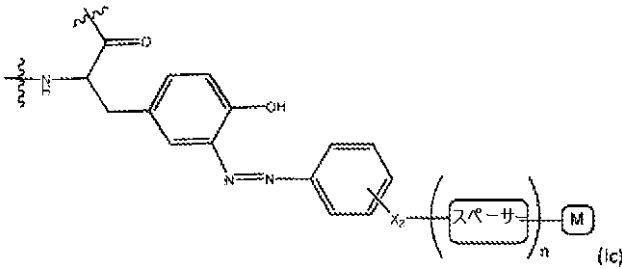
一実施形態では、X i は、式 (a) のものであり、および / または「 A r 」は、置換または無置換のフェニル、ピリジル、ナフチル、およびアントラセニルから選択される。

【 0 2 2 6 】

一実施形態では、カプシドは、式 (I c) :

50

【化 9】



【 0 2 2 7 】

[式中、

【 0 2 2 8 】

- X₂ は、 - C (= O) - NH、 - C (= O) - O、 - C (= O) - O - C (= O) - 、 O - (C = O) - 、 NH - C (= O) - 、 NH - C (= O) - NH、 - O - C = O - O - 、 O、 NH、 - NH (C = S) - 、または - (C = S) - NH - 、好ましくは、 - (C = O) - NH - または - (C = O) - O - であり、

【 0 2 2 9 】

- X₂ は、フェニル基の、パラ、メタまたはオルト位に、好ましくは、パラ位にあり、

【 0 2 3 0 】

- スペース、 n および M は、上記の本明細書に定義される通りである]

である少なくとも 1 つの化学的に改変されたチロシンを有する。

【 0 2 3 1 】

一実施形態では、「スペース」は、存在する場合、必要に応じて置換された飽和または不飽和の直鎖状または分枝状の C₂ ~ C₄₀ 炭化水素鎖、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、pHPMA (N - (2 - ヒドロキシプロピル) メタクリルアミドのポリマー)、ポリ乳酸 - c o - グリコール酸 (PLGA)、アルキルジアミンのポリマー、およびそれらの組合せからなる群から選択され、ならびに / または、

【 0 2 3 2 】

「 M 」は、細胞型標的化リガンド、好ましくは、単糖もしくは多糖、ステロイドホルモンを含むホルモン、ペプチド、例えば、RGD ペプチド (例えば、細胞接着タンパク質を模倣し、インテグリンに結合することができる細胞接着モチーフである Arg - Gly - Asp)、筋肉標的化ペプチド (MTP) もしくは Angi o p e p - 2、タンパク質もしくはその断片、膜受容体もしくはその断片、アプタマー、重鎖抗体を含む抗体およびその断片、例えば、抗原結合性断片 (Fab)、Fab ' (遊離スルフヒドリル基をさらに含む抗原結合性断片である)、および VHH、一本鎖可変断片 (ScFv)、spiegelmer、ペプチドアプタマー、ビタミン、ならびに薬物、例えば、カンナビノイド受容体 1 (CB1) および / またはカンナビノイド受容体 2 (CB2) リガンドから選択される細胞型標的化リガンドを含むか、あるいはそれからなる。

【 0 2 3 3 】

一実施形態では、「スペース」 (存在する場合) は、直鎖状または分枝状の C₂ ~ C₂₀ アルキル鎖、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、pHPMA、PLGA、アルキルジアミンのポリマー、およびそれらの組合せからなる群から選択され、前記ポリマーは、2 ~ 20 のモノマーを有し、ならびに / あるいは、「 M 」は、トランスフェリン、上皮増殖因子 (EGF)、および塩基性線維芽細胞増殖因子 13 FGF、1 つまたはいくつかのガラクトース、マンノース、N - アセチルガラクトサミン残基、架橋 GalNa c もしくはマンノース - 6 - リン酸を含む単糖もしくは多糖、配列番号 1 ~ 配列番号 7 から選択される MTP、およびビタミン、例えば、葉酸から選択されるタンパク質に由来する細胞型特異的リガンドを含むか、またはそれからなる。

【 0 2 3 4 】

一実施形態では、カプシドは、カプシド中に少なくとも 1 つの追加の化学的に改変され

10

20

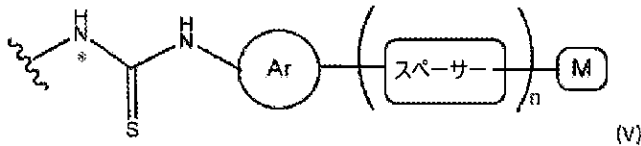
30

40

50

たアミノ酸残基をさらに有し、これは、チロシン残基とは異なり、前記アミノ酸残基は、好ましくは、式(V)：

【化10】



【0235】

[式中、

【0236】

- N* は、アミノ酸残基、例えば、リシン残基またはアルギニン残基のアミノ基の窒素であり、

【0237】

- Ar、スペーサー、nおよびMは、請求項2の式(II)のAr、スペーサー、nおよびMと同じ定義を有する]

の基で化学的に改変されたアミノ基を持つ。

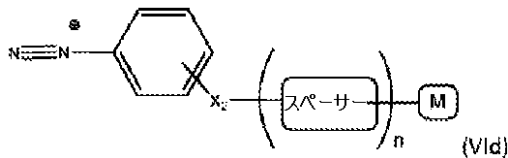
【0238】

一実施形態では、カプシドは、アリアルジアゾニウムおよび4-フェニル-1,2,4-トリアゾール-3,5-ジオン(PTAD)部分から選択される反応性基を持つ化学試薬と、共有結合を形成するように前記反応性基をカプシド中に存在するチロシン残基と反応させるために貢献する条件下でインキュベートされる。

【0239】

一実施形態では、カプシドは、式VI dの化学試薬とともにインキュベートされて、式I c

【化11】



のカプシド中の少なくとも1つの化学的に改変されたチロシン残基が得られる。

投与

【0240】

本開示のrAAVは、当技術分野において公知の任意の適切な方法に従って、組成物中で対象に送達されてもよい。例えば、rAAV、好ましくは、生理学的に適合する担体に懸濁されたrAAV(すなわち、組成物中)は、対象、すなわち、宿主動物、例えば、ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、モルモット、ハムスター、ニワトリ、シチメンチョウ、または非ヒト霊長類(例えば、マカク)に投与されてもよい。一部の実施形態では、宿主動物は、ヒトを含まない。

【0241】

哺乳動物対象へのrAAVの送達は、例えば、筋肉内注射によって、または哺乳動物対象の血流への投与によってであってもよい。血流への投与は、静脈、動脈、または任意の他の血管導管への注射によってであってもよい。一部の実施形態では、rAAVは、外科手術の技術分野において周知の技法である、分離式肢灌流によって、血流に投与され、この方法は、本質的に、当業者が、rAAVビリオンの投与前に体循環から四肢を分離することを可能にする。米国特許第6,177,403号に記載される分離式肢灌流技法のバリエーションはまた、ビリオンを分離された四肢の血管に投与して、筋肉細胞または組織への形質導入を潜在的に増強するために、当業者によって用いられ得る。また、ある特定の例では、ビリオンを対象のCNSに送達することが望ましくあり得る。「CNS」とは、脊

10

20

30

40

50

椎動物の脳および脊髄のすべての細胞および組織を意味する。そのため、この用語は、限定されるものではないが、神経細胞、グリア細胞、アストロサイト、脳脊髄液（CSF）、間質腔、骨、軟骨などを含む。組換えAAVは、例えば、心室領域への注射によってCNSまたは脳に、ならびに定位注射によってなどの、当技術分野において公知の神経外科的技法を使用して、ニードル、カテーテルまたは関連するデバイスを用いて、線条体（例えば、線条体の尾状核または被殻）、脊髄および神経筋接合部、または小脳小葉に、直接的に送達されてもよい（例えば、Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; およびAlisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11 :2315-2329, 2000を参照されたい）。一部の実施形態では、本開示に

10

【0242】

組成物の哺乳動物対象への送達は、例えば、所望の部位、例えば、CNSへの送達の任意の公知の手段によってであってもよい。組成物が対象のCNSに送達されることが望ましくあり得る。「CNS」とは、脊椎動物の脳および脊髄のすべての細胞および組織を意味する。そのため、この用語は、限定されるものではないが、神経細胞、グリア細胞、アストロサイト、脳脊髄液（CSF）、間質腔、骨、軟骨などを含む。本明細書に記載される任意の組成物は、例えば、心室領域への注射によってCNSまたは脳に、ならびに定位注射によってなどの、当技術分野において公知の神経外科的技法を使用して、ニードル、カテーテルまたは関連するデバイスを用いて、線条体（例えば、線条体の尾状核または被殻）、脊髄および神経筋接合部、または小脳小葉に、直接的に送達されてもよい（例えば、Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; およびAlisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11 :2315-2329, 2000を参照されたい）。一部の実施形態では、本開示に記載される組成物は、静脈内注射

20

30

【0243】

CNSとしては、限定されるものではないが、CNSのある特定の領域、神経経路、体性感覚系、視覚系、聴覚系、神経、神経内分泌系、神経血管系、脳神経伝達物質系、および硬膜髄膜系が挙げられる。

40

【0244】

CNSの例示的な領域としては、限定されるものではないが、髄脳；延髄；延髄錐体；オリブ体；下オリブ核；吻側延髄腹外側野；尾側延髄腹外側野；孤束核（孤束の核）；呼吸中枢-呼吸群、背側呼吸群；腹側呼吸群または持続性吸息中枢プレベツインガー複合体；ポツインガー複合体；レトロ台形核；顔面神経核後核；後疑核；傍疑核；正中傍網様体核；巨大細胞性網様核；傍顔面帯；楔状束核；薄束核；舌下神経周囲核；介在核；前位核；舌下核；最後野；延髄脳神経核；下唾液核；疑核；迷走神経の背核；舌下神経核；化学受容器引金帯；後脳；脳橋；橋核；橋脳神経核；三叉神経感覚核の主核または橋核；三叉神経のための運動核；外転神経核（VI）；顔面神経核（VII）；内耳神経核

50

(前庭神経核および蝸牛神経核)(V I I I) ; 上唾液核 ; 橋被蓋 ; 橋排尿中枢(パーリントン核) ; 青斑核 ; 大脳脚橋核 ; 背外側被蓋核 ; 被蓋橋網様核 ; 挿入核 ; 傍小脳脚領域 ; 内側結合腕傍核 ; 外側結合腕傍核 ; 結合腕傍下核(ケリカー-布施核) ; 橋呼吸群 ; 上オリーブ複合体 ; 内側上オリーブ ; 外側上オリーブ ; 台形体の内側核 ; 傍正中橋網様体 ; 小細胞性網様核 ; 尾側橋網様核 ; 小脳脚 ; 上小脳脚 ; 中小脳脚 ; 下小脳脚 ; 第4脳室 ; 小脳の小脳虫部 ; 小脳半球 ; 前葉 ; 後葉 ; 片葉小節葉 ; 小脳核 ; 室頂核 ; 挿入核 ; 球状核 ; 栓状核 ; 齒状核 ; 中脳(中頭) ; 蓋、四丘体 ; 下丘 ; 上丘 ; 視蓋前野 ; 被蓋、中脳水道周囲灰白質 ; 内側縦束の吻側間質核 ; 中脳網様体形成 ; 背側縫線核 ; 赤核 ; 腹側被蓋野 ; 傍小脳脚色素核 ; 傍黒質核 ; 吻側被蓋核 ; 尾側線状核 ; 縫線の吻側線状核 ; 束間核 ; 黒質 ; 緻密部 ; 網様部 ; 脚間核 ; 大脳脚(Cerebral peduncle) ; 大脳脚(Crus cerebri) ; 中脳の脳神経核 ; 動眼神経核(I I I) ; エディングー-ウェストファル核 ; 滑車神経核(I V) ; 中脳管(中脳水道、シルビウス水道) ; 前脳(Forebrain)(前脳(prosencephalon)) ; 間脳 ; 視床上部 ; 松果体(松果腺) ; 手綱核 ; 髓条 ; 視床ヒモ ; 第3脳室 ; 交連下器官 ; 視床 ; 前核群 ; 前腹側核(Anteroventral nucleus)(別名前腹側核(ventral anterior nucleus)) ; 前背側核 ; 前内側核 ; 中核群 ; 中背核 ; 正中核群 ; 紐傍核 ; 結合核 ; 菱形核 ; 髄板内核群 ; 正中中心核 ; 束傍核 ; 中心傍核 ; 外側中心核 ; 外側核群 ; 背外側核 ; 後外側核 ; 視床枕 ; 腹側核群、前腹側核 ; 外側腹側核 ; 後腹側核 ; 腹側後外側核 ; 腹側後内側核 ; 視床後部 ; 内側膝状体 ; 外側膝状体 ; 視床網様核 ; 視床下部(辺縁系)(HPA軸) ; 視索前野の前内側域部 ; 内側視索前核I N A H 1 ; I N A H 2 ; I N A H 3 ; I N A H 4 ; 正中視索前核 ; 視交叉上核 ; 視床下部傍室核 ; 視索上核(主に) ; 前視床下部核 ; 外側野 ; 視索前野の一部 ; 外側視索前核 ; 外側核の前部 ; 視索上核の一部 ; 視索前野の他の核 ; 正中視索前核 ; 脳室周囲視束前核 ; 隆起内側域 ; 視床下部背内側核 ; 腹内側核 ; 弓状核 ; 外側核の外側野隆起部 ; 外側隆起核 ; 後内側域乳頭核(乳頭体の一部) ; 後核 ; 外側核の外側野後部 ; 表面正中隆起 ; 乳頭体 ; 下垂体茎(漏斗状器官) ; 視交叉 ; 脳弓下器官 ; 周室核 ; 灰白隆起 ; 隆起核 ; 隆起乳頭体核 ; 隆起部 ; 乳頭核 ; 視床腹部(HPA軸) ; 視床下核 ; 不確帯 ; 脳下垂体(HPA軸) ; 神経性下垂体 ; 中間部(中葉) ; 腺下垂体 ; 終脳(大脳) ; 大脳半球 ; 白質 ; 半卵円中心 ; 放線冠 ; 内包 ; 外包 ; 極包 ; 皮質下 ; 海馬(側頭葉内側部) ; 齒状回 ; アンモン角(CA野) ; アンモン角域1(CA1) ; アンモン角域2(CA2) ; アンモン角域3(CA3) ; アンモン角域4(CA4) ; 扁桃体(辺縁系)(辺縁葉) ; 中心核(自律神経系) ; 内側核(副嗅覚系) ; 皮質核および内側基底核(主嗅覚系) ; 外側核および基底外側核(前頭側頭皮質系) ; 扁桃体延長部 ; 分界条の分界条床核 ; 前障 ; 基底核 ; 線条体、背側線条体(別名新線条体) ; 被殻 ; 尾状核 ; 腹側線条体 ; 側坐核 ; 嗅結節 ; 淡蒼球(被殻とともにレンズ核を形成する) ; 腹側淡蒼球 ; 視床下核 ; 前脳基底部 ; 前有孔質 ; 無名質 ; 基底核 ; プローク対角帯 ; 中隔核 ; 内側中隔核 ; 終板 ; 終板脈管器官 ; 嗅脳(旧皮質) ; 嗅球 ; 嗅索 ; 前嗅核 ; 梨状皮質 ; 前交連 ; 鉤 ; 扁桃体周囲皮質 ; 大脳皮質(新皮質) ; 前頭葉 ; 皮質一次運動野(中心前回、M1) ; 補助運動野 ; 運動前野 ; 前頭前野 ; 眼窩前頭皮質 ; 背外側前頭前皮質 ; 上前頭回 ; 中前頭回 ; 下前頭回 ; ブロードマン野 : 4、6、8、9、10、11、12、24、25、32、33、44、45、46、47 ; 頭頂葉皮質一次体性感覚皮質(S1) ; 二次体性感覚皮質(S2) ; 後頭頂葉皮質 ; 中心後回(一次体性感覚野) ; ブロードマン野1、2、3(一次体性感覚野) ; 5、7、23、26、29、31、39、40 ; 後頭葉皮質一次視覚野(V1)、V2、V3、V4、V5 / MT ; 外側後頭回 ; ブロードマン野17(V1、一次視覚野) ; 18、19 ; 側頭葉皮質一次聴覚皮質(A1) ; 二次聴覚皮質(A2) ; 下側頭皮質 ; 後下側頭皮質 ; 上側頭回 ; 中側頭回 ; 下側頭回 ; 嗅内皮質 ; 鼻周囲皮質 ; 海馬傍回 ; 紡錘状回 ; ブロードマン野 : 20、21、22、27、34、35、36、37、38、41、42 ; 島皮質 ; 帯状皮質前帯状回 ; 後帯状回 ; 脳梁膨大後部皮質 ; 灰白層 ; 膝下域25 ; ブロードマン野23、24 ; 26、29、30(脳梁膨大後部域) ; 31、および32が挙げられる。

【0245】

10

20

30

40

50

例示的な神経経路としては、限定されるものではないが、上縦束、弓状束；鉤状束；貫通線維路；視床皮質放線；脳梁；前交連；扁桃体遠心路；視床間橋；後交連；手綱交連；脳弓；乳頭被蓋束；線維束 (fasciculus)；不確帯 - 視床下部経路 (Incerto hypothalamic pathway)；大脳脚；内側前脳束；内側縦束；ミオクローヌス三角；孤束；ドーパミン作動性細胞群からの主要ドーパミン作動性経路；中脳皮質神経路；中脳辺縁系経路；黒質線条体路；隆起漏斗経路；縫線核のセロトニン作動性経路；青斑核および他のノルアドレナリン細胞群のノルエピネフリン経路；アドレナリン作動性細胞群からのエピネフリン経路；メソポンチン核からのグルタミン酸およびアセチルコリン経路；運動系 / 下行線維；錐体外路；錐体路；皮質脊髄路；または脳脊髄線維；外側皮質脊髄路；前皮質脊髄路；皮質橋核路線維；前頭橋線維；側頭橋線維；皮質延髄路；皮質中脳路；視蓋脊髄路；間質核脊髄路；赤核脊髄路；赤核オリーブ路；オリーブ小脳路；オリーブ脊髄路；前庭脊髄路；外側前庭脊髄路；内側前庭脊髄路；網様体脊髄路；外側縫線核脊髄路；アルファ系；およびガンマ系が挙げられる。

10

【0246】

例示的な体性感覚系としては、限定されるものではないが、脊柱 - 内側毛帯経路薄束；楔状束；内側毛帯；脊髄視床路；外側脊髄視床路；前脊髄視床路；脊髄中脳路；脊髄小脳路；オリーブ脊髄路；および脊髄網様体路が挙げられる。

【0247】

例示的な視覚系としては、限定されるものではないが、視索；視放線；および網膜視床下部路が挙げられる。

20

【0248】

例示的な聴覚系としては、限定されるものではないが、第4脳室の髄条；台形体；および外側毛帯が挙げられる。

【0249】

例示的な神経としては、限定されるものではないが、脳幹脳神経末端 (0)；嗅神経 (I)；視神経 (II)；動眼神経 (III)；滑車神経 (IV)；三叉神経 (V)；外転神経 (VI)；顔面神経 (VII)；内耳神経 (VIII)；舌咽神経 (IX)；迷走神経 (X)；副神経 (XI)；および舌下神経 (XII) が挙げられる。

【0250】

例示的な神経内分泌系としては、限定されるものではないが、視床下部 - 下垂体ホルモン；HPA軸；HPG軸；HPT軸；およびGHRH - GHが挙げられる。

30

【0251】

例示的な神経血管系としては、限定されるものではないが、中大脳動脈；後大脳動脈；前大脳動脈；椎骨動脈；脳底動脈；ウィリス動脈輪 (動脈系)；血液脳関門；グリーンパティック系；静脈系；および脳室周囲器官が挙げられる。

【0252】

例示的な脳神経伝達物質系；ノルアドレナリン系；ドーパミン系；セロトニン系；コリン作動系；GABA；神経ペプチド、オピオイドペプチド；エンドルフィン；エンケファリン；ダイノルフィン；オキシトシン；およびサブスタンスP。

【0253】

例示的な硬膜髄膜系としては、限定されるものではないが、脳脊髄液関門；髄膜被覆硬膜；くも膜；軟膜；硬膜上腔；硬膜下腔；くも膜下腔、くも膜中隔；上槽；終板の槽；交叉槽；脚間槽；橋槽；大槽；脊髄くも膜下腔；脳室系；脳脊髄液；第3脳室；第4脳室；側脳室角束；前角；側脳室体；下角；後角、鳥距；および脳室下帯が挙げられる。

40

【0254】

一実施形態では、AAVは、PNSに投与される。「PNS」は、脳および脊髄の外側の神経および神経節を指す。PNSの主な機能は、CNSを手足および器官に接続することであり、本質的に、脳および脊髄と身体の残部との間の中継としての機能を果たす。CNSとは異なって、PNSは、脊柱および頭蓋によって、または血液脳関門によって保護されておらず、これは、例えば、毒素および機械的傷害に対して無防備のままである。

50

【 0 2 5 5 】

PNSは、体性神経系および自律神経系に分けられる。体性神経系では、脳神経は、網膜と一緒に、視神経（脳神経ⅠⅠ）を除いて、PNSの一部である。第2脳神経は、真の末梢神経ではないが、間脳の路である。脳神経節は、CNSが起源である。しかしながら、残りの10の脳神経軸索は、脳を超えて広がっており、したがって、PNSの一部と考えられる。自律神経系は、平滑筋および腺に対して不随意性の制御を発揮する。CNSと器官との間の接続は、系が、2つの異なる機能状態：交感神経および副交感神経であることを可能にする。

【 0 2 5 6 】

体性神経系は、随意制御下にあり、脳から筋肉などの末端器官にシグナルを伝達する。感覚神経系は、体性神経系の一部であり、味覚および触覚（繊細な触覚および粗野な触覚を含む）などの感覚から脊髄および脳にシグナルを伝達する。自律神経系は、「自己調節性」系であり、これは、心拍などの随意制御外の器官の機能、または消化系の機能に影響を及ぼす。

【 0 2 5 7 】

PNSは、頸髄神経（C1～C4）を含むさまざまなセクションに記載され得る。最初の4つの頸髄神経C1～C4は、分割および再結合して、頸部および後頭部で機能する各種の神経を生じる。脊髄神経C1は、後頭下神経と呼ばれ、これは、頭蓋底で筋肉に対する運動神経支配を提供する。C2およびC3は、頸部の多くの神経を形成し、感覚および運動の制御の両方を提供する。これらとしては、後頭部に感覚を提供する大後頭神経、耳の後ろの領域に感覚を提供する小後頭神経、大耳介神経および小耳介神経が挙げられる。横隔神経は、神経根C3、C4およびC5から生じる我々の生存に必須の神経である。これは、胸部横隔膜を供給し、呼吸を可能にする。脊髄がC3の上で切断されると、自発呼吸は不可能である。腕神経叢（C5～T1）。最後の4つの頸髄神経C5～C8、および最初の胸部脊髄神経T1は、組み合わせられて、絡まった数々の神経である腕神経叢（*brachial plexus*または*plexus brachialis*）を形成し、分割、結合および再結合して、上肢および上背を援助する神経を形成する。腕神経叢は絡まって見え得るが、これは、非常に組織化されており、予測可能であり、人々の間で変化は少ない。腰仙骨神経叢（L1-C01）。腰神経、仙骨神経、および尾骨神経の前方部分は、腰仙骨神経叢を形成し、最初の腰神経は、第12胸郭からの分岐によって頻繁に接合されている。説明の目的のために、この叢は、通常、3つの部分：腰神経叢、仙骨神経叢、および陰部神経叢に分けられる。自律神経系。例示的な自律神経系としては、交感神経系、副交感神経系および腸神経系が挙げられる。

【 0 2 5 8 】

一実施形態では、投与は、改変されたカプシドの対象のCNSまたはPNSへの送達をもたらす。一実施形態では、投与は、ペイロードの対象のCNSまたはPNSへの送達をもたらす。一実施形態では、投与は、改変されたウイルスカプシドのCNSまたはPNS細胞集団への送達をもたらす。一実施形態では、投与は、ペイロードのCNSまたはPNS細胞集団への送達をもたらす。例示的なCNS細胞集団としては、限定されるものではないが、ニューロン、乏突起膠細胞、アストロサイト、ミクログリア細胞、上皮細胞、放射状グリア細胞、および下垂体細胞が挙げられる。当業者は、標準技法を使用して、例えば、公知の細胞マーカーについて細胞集団を評価して、特定のCNS細胞集団を特定することができる。一実施形態では、投与は、改変されたカプシドの、CNSが起源である細胞型、例えば、CNSが起源であるが、そこから離れて広がっている細胞、例えば、神経への送達をもたらす。一実施形態では、投与は、ペイロードの、CNSが起源である細胞型、例えば、CNSが起源であるが、そこから離れて広がっている細胞、例えば、神経への送達をもたらす。

【 0 2 5 9 】

一実施形態では、本発明の組成物が、例えば、カテーテル、カニューレなどを介して、CNSまたはPNSに局所的に投与される場合、投与は、投与の開始部位から少なくとも

10

20

30

40

50

0.5インチ広がっている組成物の分布をもたらす。一実施形態では、投与は、投与の開始部位から、少なくとも1インチ、少なくとも1.5インチ、少なくとも2インチ、少なくとも2.5インチ、少なくとも3インチ、少なくとも3.5インチ、少なくとも4インチ、少なくとも4.5インチ、少なくとも5インチ、少なくとも5.5インチ、少なくとも6インチ、少なくとも6.5インチ、少なくとも7インチ、少なくとも7.5インチ、少なくとも8インチ、少なくとも8.5インチ、少なくとも9インチ、少なくとも9.5インチ、少なくとも10インチ、またはそれよりも広く広がっている組成物の分布をもたらす。すなわち、組成物の改変されたウイルスカプシドは、投与の開始部位から、少なくとも0.5インチ、少なくとも1インチ、少なくとも1.5インチ、少なくとも2インチ、少なくとも2.5インチ、少なくとも3インチ、少なくとも3.5インチ、少なくとも4インチ、少なくとも4.5インチ、少なくとも5インチ、少なくとも5.5インチ、少なくとも6インチ、少なくとも6.5インチ、少なくとも7インチ、少なくとも7.5インチ、少なくとも8インチ、少なくとも8.5インチ、少なくとも9インチ、少なくとも9.5インチ、少なくとも10インチ、またはそれよりも広くにある細胞（すなわち、それが形質導入する細胞）において検出可能である。

10

【0260】

一実施形態では、本発明の組成物が、例えば、カテーテル、カニューレなどを介して、CNSまたはPNSに局所的に投与される場合、投与は、CNSまたはPNSの少なくとも1つの細胞型における改変されたカプシド、ウイルスベクター、および/またはペイロードの発現をもたらす。一実施形態では、本発明の組成物が、例えば、カテーテル、カニューレなどを介して、CNSまたはPNSに局所的に投与される場合、投与は、CNSまたはPNSの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれよりも多くの細胞型における改変されたカプシド、ウイルスベクター、および/またはペイロードの発現をもたらす。ある特定の実施形態では、少なくとも2つの細胞型が、CNSまたはPNSにおいて互いに隣接している。あるいは、少なくとも細胞型は、互いに隣接している必要はない。

20

【0261】

本開示の態様は、カプシドタンパク質、および導入遺伝子をコードする核酸を含む組換えAAVを含む組成物であって、導入遺伝子が、1つまたは複数のmiRNAをコードする核酸配列を含む、組成物に関する。一部の実施形態では、それぞれのmiRNAは、配列番号6~17、40~44または50~66のうちのいずれか1つに示される配列を含む。一部の実施形態では、核酸は、AAV ITRをさらに含む。一部の実施形態では、ITRは、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはAAV13 ITRである。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。本開示の組成物は、rAAVを、単独で、または1つもしくは複数の他のウイルス（例えば、1つまたは複数の異なる導入遺伝子を有してコードする第2のrAAV）との組合せで含んでいてもよい。一部の実施形態では、組成物は、1つまたは複数の異なる導入遺伝子をそれぞれ有する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多くの異なるrAAVを含む。

30

40

【0262】

好適な担体は、rAAVが対象とする指示を考慮して、当業者によって容易に選択され得る。例えば、ある好適な担体としては、食塩水が挙げられ、これは、各種の緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）とともに製剤化されてもよい。他の例示的な担体としては、滅菌食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油、および水が挙げられる。担体の選択は、本開示を限定するものではない。

【0263】

必要に応じて、本開示の組成物は、rAAVおよび担体に加えて、保存剤、または化学安定剤などの他の従来の医薬成分を含有していてもよい。好適な例示的な保存剤としては

50

、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルパニリン、グリセリン、フェノール、およびパラクロロフェノールが挙げられる。好適な化学安定剤としては、ゼラチンおよびアルブミンが挙げられる。

【0264】

rAAVは、所望の組織の細胞にトランスフェクトし、過度な有害効果なしで、十分なレベルの遺伝子の移入および発現を提供するのに十分な量で投与される。従来のおよび薬学的に許容される投与の経路としては、限定されるものではないが、選択された器官への直接送達（例えば、肝臓への門脈内送達）、経口、吸入（鼻腔内および気管内送達を含む）、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腫瘍内、および他の投与の非経口経路が挙げられる。所望により、投与の経路は組み合わせられてもよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される核酸配列のすべて、またはそのうちの少なくとも1つは、少なくとも1つのDD-ITRを含む非ウイルスDNA構築物を介して送達される。例えば、WO2019/246554号に記載される非ウイルスDNA構築物を利用して、本明細書に記載される核酸のうちの1つまたは複数を送達することができる。WO2019/246554号は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0265】

特定の「治療効果」を達成するために必要なrAAVビリオンの用量、例えば、体重1キログラムあたりのゲノムコピー数(GC/kg)での用量の単位は、限定されるものではないが、rAAVビリオン投与の経路、治療効果を達成するのに必要とされる遺伝子またはRNAの発現のレベル、処置される具体的な疾患または障害、および遺伝子またはRNA産物の安定性を含むいくつかの因子に基づいて変わる。当業者であれば、前述の因子、および当技術分野において周知の他の因子に基づいて、特定の疾患または障害を有する患者を処置するためのrAAVビリオンの用量範囲を容易に決定することができる。

20

【0266】

rAAVの有効量は、動物を標的にし、感染し、所望の組織を標的にするのに十分な量である。一部の実施形態では、rAAVの有効量は、安定な体細胞トランスジェニック動物モデルを生成するのに十分な量である。有効量は、対象の種、年齢、体重、健康、および標的にされる組織などの因子に主に依存し、そのため、動物および組織の間で変化し得る。例えば、rAAVの有効量は、一般に、約 10^9 ~ 10^{16} ゲノムコピーを含有する、約1ml~約100mlの溶液の範囲内である。一部の 경우에는、約 10^{11} ~ 10^{13} のrAAVゲノムコピーの間の投薬量が適切である。ある特定の実施形態では、 10^{12} または 10^{13} のrAAVゲノムコピーが、CNS組織を標的にするのに有効である。一部の 경우에는、安定なトランスジェニック動物は、複数用量のrAAVによって生成される。

30

【0267】

一部の実施形態では、rAAVの用量は、暦日（例えば、24時間の期間）あたり1回以下で対象に投与される。一部の実施形態では、rAAVの用量は、2、3、4、5、6または7暦日あたり1回以下で対象に投与される。一部の実施形態では、rAAVの用量は、暦週（例えば、7暦日）あたり1回以下で対象に投与される。一部の実施形態では、rAAVの用量は、2週間に1回以下（例えば、2暦週の期間に1回）で対象に投与される。一部の実施形態では、rAAVの用量は、暦月あたり1回以下（例えば、30暦日に1回）で対象に投与される。一部の実施形態では、rAAVの用量は、6暦月あたり1回以下で対象に投与される。一部の実施形態では、rAAVの用量は、暦年（例えば、365日またはうるう年では366日）あたり1回以下で対象に投与される。

40

【0268】

一部の実施形態では、rAAV組成物は、特に、高濃度のrAAVが存在する（例えば、 10^{13} GC/mlまたはそれよりも多い）場合に、組成物中のAAV粒子の凝集を低減するために製剤化される。rAAVの凝集を低減するための方法は、当技術分野において周知であり、例えば、界面活性剤の添加、pH調整、塩濃度調整などが挙げられる（例えば、Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178

50

を参照されたく、この内容は、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0269】

薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の製剤は、好適な投与レジメンおよび処置レジメンの開発が、各種の処置レジメンにおいて本明細書に記載される特定の組成物を使用するためのものである。当業者に周知である。

【0270】

典型的には、これらの製剤は、少なくとも約0.1%の活性化合物またはそれよりも多くを含有していてもよいが、活性成分のパーセンテージは、当然ながら変化してもよく、好都合には、総製剤重量または体積の約1%または2%~約70%もしくは80%の間またはそれよりも大きくてもよい。本来、それぞれ治療上有益な組成物中の活性化合物の量は、好適な投薬量が、化合物の任意の所与の単位用量で得られるような方法で、調製され得る。溶解度、生物学的利用率、生物学的半減期、投与の経路、製品有効期間などの因子、および他の薬理学的考慮事項は、そのような医薬製剤を調製する当業者によって企図され、そのようにして、各種の投薬レジメンおよび処置レジメンが望ましくあり得る。

【0271】

ある特定の状況では、本明細書に開示される好適に製剤化された医薬組成物中のrAAVに基づく治療用構築物を、皮下、臍臓内、鼻腔内、非経口、静脈内、筋肉内、髄腔内、または経口、腹腔内、または吸入によってのいずれかで、送達することが望ましい。一部の実施形態では、米国特許第5,543,158号、同第5,641,515号および同第5,399,363号(その全体が参照により本明細書にそれぞれ具体的に組み込まれる)に記載される投与モダリティを使用して、rAAVを送達してもよい。一部の実施形態では、好ましい投与の様式は、門脈注射による。

【0272】

注射可能な使用に好適な医薬形態としては、無菌水溶液または分散液、および無菌注射用溶液または分散液の即時調製のための無菌粉末が挙げられる。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中、ならびに油中で調製されてもよい。保管および使用の通常の条件下、これらの調製物は、微生物の成長を防止する保存剤を含有する。多くの場合に、この形態は、無菌であり、容易な注射性が存在する程度に流体である。これは、製造および保管の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、それらの好適な混合物、および/または植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。例えば、適当な流動性は、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合では必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の防止は、さまざまな抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされ得る。多くの場合では、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物中での使用によってもたらされ得る。

【0273】

注射用水溶液の投与のために、例えば、溶液は、必要により、好適に緩衝されていてもよく、液体希釈剤は、最初に、十分な生理食塩水またはグルコースで等張にされる。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に好適である。これに関連して、用いることができる無菌水性媒体は、当業者に公知である。例えば、1投薬量は、1mlの等張なNaCl溶液中に溶解され、1000mlの皮下注入液に添加されてもよく、または注入の計画部位に注射されてもよい(例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580を参照されたい)。投薬量におけるいくつかの変形形態は、宿主の状態に応じて必然的に生じる。投与の責任者は、いずれにしても、個々の宿主についての適切な用量を決定する

【0274】

無菌注射用溶液は、活性 r A A V を、本明細書に列挙される各種の他の成分とともに、適切な溶媒に必要な量で組み込み、必要により、それに続いて濾過滅菌することによって調製される。一般に、分散液は、さまざまな滅菌された活性成分を、基礎分散媒および上記に列挙されたものからの必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合では、好ましい調製の方法は、あらかじめその滅菌濾過された溶液から活性成分と任意の追加の所望の成分の粉末を得る真空乾燥技法および凍結乾燥技法である。

【0275】

本明細書に開示される r A A V 組成物はまた、中性形態または塩形態で製剤化されていてもよい。薬学的に許容される塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と形成される）が挙げられ、これらは、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成される。遊離カルボキシル基と形成される塩はまた、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来し得る。製剤化されると、溶液は、投薬製剤と適合し、そのような量が治療上有効である様式で投与される。製剤は、各種の剤形、例えば、注射用溶液、薬物放出カプセル剤などで容易に投与される。

【0276】

本明細書で使用される場合、「担体」としては、ありとあらゆる溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁剤、コロイドなどが挙げられる。薬学的に活性な物質についてのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において周知である。補助活性成分を、組成物に組み込むこともできる。「薬学的に許容される」という語句は、宿主に投与された場合に、アレルギー反応または類似する不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。

【0277】

送達ビヒクル、例えば、リポソーム、ナノカプセル、マイクロ粒子、マイクロスフェア、脂質粒子、ベシクルなどは、本開示の組成物の好適な宿主細胞への導入のために使用されてもよい。特に、r A A V ベクターが送達する導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、ベシクル、ナノスフェア、またはナノ粒子などに封入されて、送達のために製剤化されていてもよい。

【0278】

そのような製剤は、本明細書に開示される核酸または r A A V 構築物の薬学的に許容される製剤の導入のために好ましくあり得る。リポソームの形成および使用は、一般に、当業者に公知である。最近、血清安定性および循環半減期が改善されたリポソームが開発された（米国特許第 5,741,516 号）。さらに、潜在的な薬物担体としてのリポソームおよびリポソーム様調製物のさまざまな方法が記載されている（米国特許第 5,567,434 号；同第 5,552,157 号；同第 5,565,213 号；同第 5,738,868 号および同第 5,795,587 号）。

【0279】

リポソームは、通常、他の手順によるトランスフェクションに抵抗性であるいくつかの細胞型で成功裏に使用されている。加えて、リポソームは、ウイルスに基づく送達系に典型的である DNA 長の制約がない。リポソームは、遺伝子、薬物、放射性療法剤、ウイルス、転写因子およびアロステリックエフェクターを、各種の培養細胞系および動物に導入するのに有効に使用されている。加えて、リポソーム媒介薬物送達の有効性を調べるいくつかの成功裏の臨床試験が完了している。

【0280】

リポソームは、水性媒体に分散されているリン脂質から形成され、多重層同心二重層ベ

10

20

30

40

50

シクル（多重層ベシクル（MLV）とも称される）を自発的に形成する。MLVは、一般に、25 nm ~ 4 μmの直径を有する。MLVの超音波処理は、コア中に水溶液を含有する200 ~ 500 の範囲の直径を有する小さな単層ベシクル（SUV）の形成をもたらす。

【0281】

あるいは、rAAVのナノカプセル製剤を使用してもよい。ナノカプセルは、一般に、安定な再生可能な方法で物質を捕捉することができる。細胞内ポリマーの過剰ローディングに起因する副作用を回避するために、そのような超微粒子（おおよそ0.1 μmのサイズ）は、in vivoで分解され得るポリマーを使用して設計されるべきである。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキル-シアノアクリレートナノ粒子が使用のために企

10

【0282】

上記に記載される送達の方法に加えて、以下の技法も、rAAV組成物を宿主に送達する代替方法として企図される。循環系へのおよび循環系を通じた薬物の浸透の速度および効率を増強するためのデバイスとして、ソノフォレーシス（すなわち、超音波）が使用されており、米国特許第5,656,016号に記載されている。企図される他の薬物送達の代替手段は、骨内注射（米国特許第5,779,708号）、マイクロチップデバイス（米国特許第5,797,898号）、眼科用製剤（Bourlais et al., 1998）、経皮マトリックス（米国特許第5,770,219号および同第5,783,208号）ならびにフィードバック制御送達（米国特許第5,697,899号）である。

20

【0283】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、神経疾患もしくは障害、例えば、ハンチントン病を有するか、またはそれを有すると診断された対象を、本明細書に記載される核酸で処置することに関する。神経疾患または障害、例えば、ハンチントン病を有する対象は、そのような疾患および障害を診断する現在の方法を使用して医師によって特定され得る。例えば、これらの状態を特徴付け、診断を助けるハンチントン病の症状および/または合併症は、当技術分野において周知であり、限定されるものではないが、うつおよび不安が挙げられ、そして、特徴的な運動障害および舞踏病を伴う。ハンチントン病の診断の助けとなり得る検査としては、例えば、限定されるものではないが、遺伝子検査が挙げられる。ハンチントン病の家族歴もまた、対象がハンチントン病を有する可能性があるかを決定する際に、またはハンチントン病の診断を行う際に助けとなり得る。

30

【0284】

本明細書に記載される組成物および方法は、神経疾患もしくは障害を有するか、またはそれを有すると診断された対象に投与することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、有効量の核酸を、神経疾患または障害の症状を軽減するために、対象に投与することを含む。本明細書で使用される場合、「症状を軽減すること」は、神経疾患または障害に関連する任意の状態または症状を改善することである。同等の未処置対照と比較した場合、そのような低減は、任意の標準技法によって測定される場合に、少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%またはそれよりも高い。

40

【0285】

有効量、毒性、および治療有効性は、例えば、最小有効用量および/または最大耐用量を決定するために、細胞培養または実験動物において、標準的な薬学的手順によって決定することができる。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与の経路に応じて変わり得る。治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初に推定することができる。また、用量は、最小有効用量と最大耐用量との間の投薬量範囲を達成するために、動物モデルにおいて処方され得る。任意の特定の投薬量の効果は、好適なバイオアッセイ、例えば、とりわけ、ニューロンの分解または機能性についてのアッセイによってモニターすることができる。投薬量は、医師によって決定され、必要により、観察された処置の効果に合わせて調整することができる。

50

免疫モジュレーター

【0286】

一部の実施形態では、本明細書に記載される神経疾患または障害を処置するための方法および組成物は、免疫モジュレーターを投与することをさらに含む。一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、rAAVベクターの投与の時、rAAVベクターの投与前、またはrAAVベクターの投与後に投与することができる。

【0287】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、Ide S、Ide Z、Ide S/Z、Endo S、またはそれらの機能的バリエーションなどの免疫グロブリン分解酵素である。そのような免疫グロブリン分解酵素およびそれらの使用の参照文献の非限定的な例は、US 7,666,582号、US 8,133,483号、US 20180037962号、US 20180023070号、US 20170209550号、US 8,889,128号、WO 2010057626号、US 9,707,279号、US 8,323,908号、US 20190345533号、US 20190262434号、およびWO 2020016318号に記載されており、これらのそれぞれは、それらの全体が参照により組み込まれる。

10

【0288】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、プロテアソーム阻害剤である。ある特定の態様では、プロテアソーム阻害剤は、ボルテゾミブである。実施形態の一部の態様では、免疫モジュレーターは、ボルテゾミブおよび抗CD20抗体のリツキシマブを含む。実施形態の他の態様では、免疫モジュレーターは、ボルテゾミブ、リツキシマブ、メトトレキサート、および静脈内ガンマグロブリンを含む。プロテアソーム阻害剤、ならびにそれらのリツキシマブ、メトトレキサートおよび静脈内ガンマグロブリンとの組合せを開示するそのような参照文献の非限定的な例は、US 10,028,993号、US 9,592,247号、およびUS 8,809,282号に記載されており、これらのそれぞれは、それらの全体が参照により組み込まれる。

20

【0289】

代替の実施形態では、免疫モジュレーターは、NF-kB経路の阻害剤である。実施形態のある特定の態様では、免疫モジュレーターは、ラパマイシン、または機能的バリエーションである。ラパマイシンおよびその使用を開示する参照文献の非限定的な例は、US 10,071,114号、US 20160067228号、US 20160074531号、US 20160074532号、US 20190076458号、US 10,046,064号に記載されており、これらは、それらの全体が本明細書に組み込まれる。実施形態の他の態様では、免疫モジュレーターは、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアである。免疫抑制剤、合成ナノキャリアにカップリングされた免疫抑制剤、ラパマイシンを含む合成ナノキャリア、および/または免疫寛容原性合成ナノキャリア、それらの用量、投与および使用の参照文献の非限定的な例は、US 20150320728号、US 20180193482号、US 20190142974号、US 20150328333号、US 20160243253号、US 10,039,822号、US 20190076522号、US 20160022650号、US 10,441,651号、US 10,420,835号、US 20150320870号、US 2014035636号、US 10,434,088号、US 10,335,395号、US 20200069659号、US 10,357,483号、US 20140335186号、US 10,668,053号、US 10,357,482号、US 20160128986号、US 20160128987号、US 20200038462号、US 20200038463号に記載されており、これらのそれぞれは、それらの全体が参照により組み込まれる。

30

40

【0290】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、US 20200038463号、米国特許第9,006,254号に開示されているラパマイシンを含む合成ナノキャリア(Im m T O R (商標)ナノ粒子)(Kishimoto, et al., 2016, Nat Nanotechnol,

50

11(10): 890-899; Maldonado, et al., 2015, PNAS, 112(2): E156-165)であり、これらのそれぞれは、その全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、工学的に操作された細胞、例えば、WO 2017192786号に開示されるSQZ技術を使用して改変された免疫細胞であり、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0291】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、ポリ-ICLC、1018 ISS、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870, 893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、モノホスホリルリピドA、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PEPTEL、ベクター系、PLGAマイクロ粒子、レシキモド、SRL172、ピロソームおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、ベータ-グルカン、Pam3Cys、ならびにAquila's QS21 stimulonからなる群から選択される。別のさらなる実施形態では、免疫モジュレーターまたはアジュバントは、ポリ-ICLCである。

【0292】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、クロロキン(TLRシグナル伝達阻害剤)および2-アミノプリン(PKR阻害剤)などの細胞において自然免疫応答を阻害する小分子であり、本明細書に開示される少なくとも1つのrAAVを含む組成物と組み合わせて投与することもできる。市販のTLRシグナル伝達阻害剤のいくつかの非限定的な例としては、BX795、クロロキン、CLI-095、OxPAPC、ポリミキシンB、およびラバマイシン(すべてINVIVOGEN(商標)から購入可能)が挙げられる。加えて、2-アミノプリン、BX795、クロロキン、およびH-89などのパターン認識受容体(PRR)(自然免疫シグナル伝達に關与する)の阻害剤も、本明細書に開示されるin vivoタンパク質発現のために、本明細書に開示される少なくとも1つのrAAVベクターを含む組成物および方法において使用することができる。

【0293】

一部の実施形態では、rAAVベクターは、NLRX1などの自然免疫の負の調節因子をコードすることもできる。したがって、一部の実施形態では、rAAVベクターは、NLRX1、NS1、NS3/4A、またはA46Rのうちの一つもしくは複数、またはその任意の組合せを必要に応じてコードすることもできる。加えて、一部の実施形態では、本明細書に開示される少なくとも1つのrAAVベクターを含む組成物は、組織または対象によって生じる自然免疫応答を回避するために、自然免疫系の阻害剤をコードする合成の改変されたRNAを含むこともできる。

【0294】

一部の実施形態では、本明細書に開示される投与方法における使用のための免疫モジュレーターは、免疫抑制剤である。本明細書で使用される場合、「免疫抑制剤または免疫抑制剤」という用語は、正常な免疫機能を阻害または妨げる医薬品を含むことを意図する。本明細書に開示される方法に好適な免疫抑制剤の例としては、米国特許公開第2002/0182211号に開示されるCTLA4およびB7経路を介したT細胞およびB細胞のカップリングを妨げる薬剤などの、T細胞/B細胞共刺激経路を阻害する薬剤が挙げられる。一実施形態では、免疫抑制剤は、シクロスポリンAである。他の例としては、ミオフェニレートモフェチル、ラバマイシン、および抗胸腺細胞グロブリンが挙げられる。一実施形態では、免疫抑制剤は、本明細書に開示される少なくとも1つのrAAVベクターを含む組成物中で投与されるか、または別々の組成物中であるが、本明細書に開示されている投与の方法に従って、少なくとも1つのrAAVベクターを含む組成物の投与と同時に、もしくはその前に、もしくはその後投与することができる。免疫抑制剤は、投与の経

10

20

30

40

50

路に適合する製剤中で投与され、所望の治療効果を達成するのに十分な投薬量で対象に投与される。一部の実施形態では、免疫抑制薬は、本明細書に開示される r A A V ベクターに対する耐容性を誘導するのに十分な時間、一時的に投与される。

【 0 2 9 5 】

本明細書に開示される方法および組成物の任意の実施形態では、本明細書に開示される r A A V ベクターまたは r A A V ゲノムを投与される対象は、免疫抑制剤も投与される。A A V を投与される患者の免疫応答の免疫抑制をもたらすさまざまな方法が公知である。当技術分野において公知の方法は、患者に、免疫抑制剤、例えば、プロテアソーム阻害剤を投与することを含む。例えば、両方とも参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 9, 1 6 9, 4 9 2 号および米国特許出願第 1 5 / 7 9 6, 1 3 7 号に開示される当技術分野において公知の 1 つのそのようなプロテアソーム阻害剤は、ボルテゾミブである。一部の実施形態では、免疫抑制剤は、例えば、抗体産生細胞の排除または抑制により、免疫応答を抑制することができるポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、s c f v または他の抗体由来の分子を含む抗体であり得る。さらなる実施形態では、免疫抑制エレメントは、低分子ヘアピン型 RNA (s h RNA) であり得る。そのような実施形態では、s h RNA のコード領域は、r A A V カセットに含まれ、一般に、ポリ A テールの 3 ' の下流に位置する。s h RNA は、サイトカイン、増殖因子 (トランスフォーミング増殖因子 1 および 2、TNF、ならびに公知である他のものを含む) などの免疫刺激剤の発現を低減または排除するために、標的化され得る。

10

【 0 2 9 6 】

そのような免疫モジュレート剤の使用は、数か月および / または数年にわたって、複数回の投薬 (例えば、複数回の投与) を使用する者のための能力を促進する。これは、下記で議論される複数の薬剤、例えば、r A A V ベクターをコードする複数の遺伝子の使用、または対象への複数回の投与を可能にする。

20

キット

【 0 2 9 7 】

一態様では、本開示は、(i) 1 つまたは複数の阻害性核酸 (例えば、m i RNA)、および (i i) C Y P 4 6 A 1 タンパク質をコードする核酸を含む、核酸または組換えウイルスベクターに関する。一態様では、本開示は、(i) 1 つまたは複数の阻害性核酸 (例えば、m i RNA)、および (i i) C Y P 4 6 A 1 タンパク質をコードする核酸の組合せに関する。(i) および (i i) の組合せでは、2 つまたはそれよりも多くのエレメントが、混合物または単一の製剤において提供され得る。あるいは、2 つまたはそれよりも多くのエレメントは、セットまたはキットとして包装または提供される別々の製剤において提供され得る。

30

【 0 2 9 8 】

本明細書に記載される薬剤、例えば、ウイルスベクターは、一部の実施形態では、治療適用、診断適用または研究適用におけるそれらの使用を容易にするために、医薬キットまたは診断キットまたは研究キットに集合されてもよい。キットは、本開示の構成要素および使用説明書を収容する 1 つまたは複数の容器を含んでもよい。具体的には、そのようなキットは、本明細書に記載される 1 つまたは複数の薬剤を、意図される適用およびこれらの薬剤の適切な使用を記載する説明書と一緒に含んでもよい。ある特定の実施形態では、キット中の薬剤は、医薬製剤中に存在していてもよく、特定の適用および薬剤の投与の方法に好適な投薬量であってもよい。研究目的のキットは、さまざまな実験を実行するのに適切な濃度または量で構成要素を含有していてもよい。

40

【 0 2 9 9 】

一部の実施形態では、本開示は、r A A V を生成するためのキットであって、キットが、

a) m i RNA、例えば、配列番号 6 ~ 1 7、4 0 ~ 4 4 もしくは 5 0 ~ 6 6 のうちのいずれか 1 つに示される配列を含む、もしくはそれによってコードされるか、または配列番号 4、1 8 ~ 3 9、もしくは 4 6 ~ 4 9 に相補的なシード配列を含む m i RNA を含む単

50

離された核酸；

b) 1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子を含む単離された核酸を含む組換えウイルスベクターであって、

例えば、ここで、それぞれのmiRNAが、配列番号4に相補的なシード配列を含むか、またはそれぞれのmiRNAが、miRNA骨格配列に隣接した配列番号6～17、40～44、もしくは50～66のうちのいずれか1つに示される配列を含む、

組換えウイルスベクター；

c) CYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸を含む組換えウイルスベクター；および/あるいは

d) 1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子を含む核酸を含む組換えウイルスベクターであって、

例えば、ここで、それぞれのmiRNAが、配列番号4に相補的なシード配列を含むか、またはそれぞれのmiRNAが、miRNA骨格配列に隣接した配列番号6～17、40～44、もしくは50～66のうちのいずれか1つに示される配列を含む、組換えウイルスベクター；ならびに

CYP46A1タンパク質をコードする核酸

のうちの1つまたは複数を含む容器を含む、キットに関する。一部の実施形態では、キットは、AAVカプシドタンパク質、例えば、AAV9カプシドタンパク質をコードする単離された核酸を含む容器をさらに含む。

【0300】

キットは、研究者による本明細書に記載される方法の使用を容易にするように設計されてもよく、多くの形態をとることができる。キットの組成物のそれぞれは、適用可能な場合、液体形態（例えば、溶液中）、または固体形態（例えば、乾燥粉末）で提供されてもよい。ある特定の場合では、組成物の一部は、例えば、キットとともに提供されてもよく、または提供されなくてもよい好適な溶媒または他の種（例えば、水または細胞培養培地）の添加によって、構成可能であるか、またはそうでなければ処理可能（例えば、活性形態に）であり得る。本明細書で使用される場合、「説明書」は、説明書および/またはプロモーションの構成要素を規定することができ、典型的には、本開示の包装に対するか、またはそれに関連する書面の説明書に関する。説明書は、使用者が、説明書がキットに関連すること、例えば、視聴覚による伝達（例えば、ビデオテープ、DVDなど）、インターネットによる伝達、および/またはウェブに基づく伝達などであることを明確に認識するような任意の様式で提供される、任意の口頭による説明書または電子的説明書も含み得る。書面の説明書は、医薬製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形態であってもよく、この説明書は、動物への投与のための製造、使用または販売の機関による承認も反映し得る。

【0301】

キットは、1つまたは複数の容器に、本明細書に記載される構成要素のうちのいずれか1つまたは複数を含む含有していてもよい。例として、一実施形態では、キットは、キットの1つもしくは複数の構成要素を混合するため、ならびに/または試料を単離および混合するため、ならびに対象に適用するための説明書を含んでいてもよい。キットは、本明細書に記載される薬剤を収容する容器を含んでいてもよい。薬剤は、液体、ゲルまたは固体（粉末）の形態であってもよい。薬剤は、無菌で調製され、シリンジに包装され、冷蔵で輸送されてもよい。あるいは、これは、保管のためにバイアルまたは他の容器に収容されていてもよい。第2の容器は、無菌で調製された他の薬剤を有していてもよい。あるいは、キットは、シリンジ、バイアル、管、または他の容器中でプレミックスされ、輸送される活性薬剤を含んでいてもよい。

【0302】

本発明の例示的な実施形態を、以下の実施例によってより詳細に記載する。これらの実施形態は、本発明の例示であり、当業者は、例示の実施形態に限定されないことを認識するであろう。

定義

【0303】

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用される一部の用語および語句の意味を下記に提供する。他に明記されない限り、または文脈から暗示されない限り、以下の用語および語句は、下記に提供される意味を含む。定義は、特定の実施形態を記載するのを助けるために提供され、本発明の範囲が特許請求の範囲によってのみ限定されるので、定義は、特許請求の範囲に記載された発明を限定することを意図するものではない。他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。当技術分野における用語の使用と本明細書で提供されるその定義との間に明らかな矛盾が存在する場合、本明細書内で提供される定義が有効であるものとする。

10

【0304】

便宜上、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において、本明細書で用いられるある特定の用語を、ここに集める。

【0305】

「減少させる」、「低減された」、「低減」、または「阻害する」という用語はすべて、統計学的に有意な量での減少を意味するために、本明細書で使用される。一部の実施形態では、「低減する」、「低減」または「減少させる」または「阻害する」は、典型的には、参照レベル（例えば、所与の処置または薬剤の非存在）と比較して、少なくとも10%の減少を意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれよりも大きな減少を含み得る。本明細書で使用される場合、「低減」または「阻害」は、参照レベルと比較して、完全な阻害または低減を包含しない。「完全な阻害」は、参照レベルと比較して、100%の阻害である。減少は、好ましくは、所与の障害を有さない個体についての正常な範囲内として許容されるレベルへの低下であり得る。

20

【0306】

「増加した」、「増加する」、「増強する」、または「活性化する」という用語はすべて、統計学的に有意な量での増加を意味するために、本明細書で使用される。一部の実施形態では、「増加した」、「増加する」、「増強する」、または「活性化する」という用語は、参照レベルと比較して、少なくとも10%の増加、例えば、参照レベルと比較して、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、または100%を含んで最大で100%の増加、または10~100%の間の任意の増加、あるいは参照レベルと比較して、少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増加、または2倍~10倍もしくはそれよりも大きな倍数の間の任意の増加を意味し得る。マーカーまたは症状の文脈では、「増加」は、そのようなレベルの統計学的に有意な増加である。

30

40

【0307】

本明細書で使用される場合、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、霊長類、げっ歯動物、家畜動物、または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルが挙げられる。げっ歯動物としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターが挙げられる。家畜動物および狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ科の種、例えば、イエネコ、イヌ科の種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類の種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚類

50

、例えば、マス、ナマズおよびサケが挙げられる。一部の実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。「個体」、「患者」および「対象」という用語は、本明細書で互換的に使用される。

【0308】

好ましくは、対象は、哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、ハンチントン病の動物モデルを表す対象として有利に使用することができる。対象は、雄または雌であり得る。

【0309】

対象は、処置を必要とする状態（例えば、ハンチントン病）またはそのような状態に関連する1つもしくは複数の合併症を有すると以前に診断されているか、あるいはそれを持っているまたは有すると特定された対象であり得、必要に応じて、状態または状態に関連する1つもしくは複数の合併症に対する処置を既に受けている。あるいは、対象はまた、状態または状態に関連する1つもしくは複数の合併症を有するとして以前に診断されていない対象であり得る。例えば、対象は、状態または状態に関連する1つもしくは複数の合併症についての1つまたは複数のリスク因子を示す対象、あるいはリスク因子を示さない対象であり得る。

10

【0310】

特定の状態に対する処置を「必要とする対象」は、その状態を有するか、その状態を有すると診断されたか、またはその状態を発生するリスクがある対象であり得る。

20

【0311】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、隣接する残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合によって互いに接続された、一連のアミノ酸残基を示すために、本明細書において互換的に使用される。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、そのサイズまたは機能にかかわらず、改変されたアミノ酸（例えば、リン酸化、糖化、グリコシル化など）およびアミノ酸アナログを含む、アミノ酸のポリマーを指す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は、多くの場合、比較的大きなポリペプチドに関して使用される一方で、「ペプチド」という用語は、多くの場合、小さいポリペプチドに関して使用されるが、これらの用語の使用は、当技術分野において重複している。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、遺伝子産物およびその断片に言及する場合、本明細書において互換的に使用される。そのため、例示的なポリペプチドまたはタンパク質は、遺伝子産物、天然に存在するタンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片および他の等価物、前述のもののバリエーション、断片、ならびにアナログを含む。

30

【0312】

バリエーションアミノ酸またはDNA配列は、ネイティブ配列または参照配列に対して、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、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%、またはそれよりも高く同一であり得る。ネイティブ配列と突然変異体配列の間の相同性（同一性パーセント）の度合いは、例えば、ワールドワイドウェブにおいてこの目的で一般に用いられる無料で利用可能なコンピュータープログラム（例えば、デフォルト設定を用いるBLASTpまたはBLASTn）を使用して2つの配列を比較することによって、決定することができる。

40

【0313】

ネイティブアミノ酸配列の変更は、当業者に公知のいくつかの技法のいずれかによって達成することができる。突然変異は、例えば、ネイティブ配列の断片へのライゲーションを可能にする制限部位に隣接した突然変異体配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することによって、特定の遺伝子座で導入することができる。ライゲーション後、得られる再構築された配列は、所望のアミノ酸の挿入、置換、または欠失を有するアナログをコードする。あるいは、オリゴヌクレオチド指向性部位特異的突然変異誘発の手順を用いて、

50

必要とされる置換、欠失、または挿入により変更された特定のコードンを有する変更されたヌクレオチド配列を提供することができる。そのような変更を行うための技法は、非常によく確立されており、例えば、Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); ならびに米国特許第4,518,584号および同第4,737,462号によって開示されるものが挙げられ、これらは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。ポリペプチドの適切なコンフォメーションを維持することに関与しない任意のシステイン残基を、一般にセリンで置換して、分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防止することもできる。逆に、システイン結合を、ポリペプチドに付加して、その安定性を改善するか、またはオリゴマー化を容易にすることができる。

【0314】

本明細書で使用される場合、「核酸」または「核酸配列」という用語は、リボ核酸、デオキシリボ核酸またはそれらのアナログの単位を組み込む、任意の分子、好ましくは、ポリマー分子を指す。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。一本鎖核酸は、変性した二本鎖DNAの1つの核酸鎖であり得る。あるいは、これは、任意の二本鎖DNAに由来しない一本鎖核酸であり得る。一態様では、核酸は、DNAであり得る。別の態様では、核酸は、RNAであり得る。好適なDNAとしては、例えば、ゲノムDNAまたはcDNAが挙げられ得る。好適なRNAとしては、例えば、mRNA、miRNAが挙げられ得る。

【0315】

態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド、核酸または細胞は、工学的に操作することができる。本明細書で使用される場合、「工学的に操作された」は、人間の手によって操作されている態様を指す。例えば、ポリペプチドは、ポリペプチドの少なくとも1つの態様、例えば、その配列が、人間の手によって、それが天然に存在する態様とは異なるように操作されている場合に、「工学的に操作された」と考えられる。通常の実施であるように、および当業者によって理解されるように、工学的に操作された細胞の子孫は、典型的には、実際の操作が以前において実体で行われたとしても、「工学的に操作された」と依然として称される。

【0316】

バリエーションアミノ酸またはDNA配列は、ネイティブ配列または参照配列に対して、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、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%、またはそれよりも高く同一であり得る。ネイティブ配列と突然変異体配列の間の相同性(同一性パーセント)の度合いは、例えば、ワールドワイドウェブにおいてこの目的で一般に用いられる無料で利用可能なコンピュータープログラム(例えば、デフォルト設定を用いるBLASTpまたはBLASTn)を使用して2つの配列を比較することによって、決定することができる。

【0317】

態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるmiRNAは、外因性である。態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるmiRNAは、異所性である。態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるmiRNAは、内因性ではない。

【0318】

「外因性」という用語は、そのネイティブ起源以外の細胞に存在する物質を指す。「外因性」という用語は、本明細書で使用される場合、それが通常見出されず、核酸またはポリペプチドをそのような細胞または生物に導入しようとする、細胞または生物などの生物システムに、人間の手を含むプロセスによって導入された核酸(例えば、ポリペプチドをコードする核酸)またはポリペプチドを指し得る。あるいは、「外因性」は、それが比較的低い量で見出され、細胞または生物中の核酸またはポリペプチドの量を増加させようと

10

20

30

40

50

する、例えば、異所発現またはレベルを作出しようとする、細胞または生物などの生物システムに、人間の手を含むプロセスによって導入された核酸またはポリペプチドを指し得る。対照的に、「内因性」という用語は、生物システムまたは細胞に対してネイティブである物質を指す。本明細書で使用される場合、「異所性」は、普通ではない場所および/または量で見出される物質を指す。異所性の物質は、所与の細胞において通常見出されるが、非常に低い量および/または異なる時に見られる物質であり得る。異所性はまた、天然で見出されないか、またはその天然環境において所与の細胞において発現されない、ポリペプチドまたは核酸などの物質も含む。

【0319】

「ベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、宿主細胞への送達のため、または異なる宿主細胞間での移入のために設計された核酸構築物を指す。本明細書で使用される場合、ベクターは、ウイルスまたは非ウイルスであり得る。「ベクター」という用語は、適切な制御エレメントに関連する場合に複製が可能であり、遺伝子配列を細胞に移入することができる、任意の遺伝エレメントを包含する。ベクターとしては、限定されるものではないが、クローニングベクター、発現ベクター、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどが挙げられ得る。

【0320】

態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、組換えであり、例えば、これは、少なくとも2つの異なる起源が起源である配列を含む。態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、少なくとも2つの異なる種が起源である配列を含む。態様のいずれかの一部の実施形態では、ベクターは、少なくとも2つの異なる遺伝子が起源である配列を含み、例えば、これは、融合タンパク質、または少なくとも1つの非ネイティブ（例えば、異種）遺伝制御エレメント（例えば、プロモーター、サプレッサー、アクチベーター、エンハンサー、応答エレメントなど）に作動可能に連結した発現産物をコードする核酸を含む。

【0321】

態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターまたは核酸は、コドン最適化されており、例えば、核酸配列のネイティブ配列または野生型配列は、変更または工学的に操作された核酸が、ネイティブ/野生型配列と同じポリペプチド発現産物をコードするが、所望の発現系において改善された効率で転写および/または翻訳されるように、代替のコドンを含むように変更または工学的に操作されている。態様のいずれかの一部の実施形態では、発現系は、ネイティブ/野生型配列の起源以外の生物（またはそのような生物から得られる細胞）である。態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターおよび/または核酸配列は、哺乳動物または哺乳動物細胞、例えば、マウス、マウス細胞、またはヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターおよび/または核酸配列は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターおよび/または核酸配列は、酵母または酵母細胞における発現のためにコドン最適化されている。態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターおよび/または核酸配列は、細菌細胞における発現のためにコドン最適化されている。態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターおよび/または核酸配列は、E. coli細胞における発現のためにコドン最適化されている。

【0322】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からRNAまたはポリペプチドの発現を指示するベクターを指す。発現される配列は、必ずしもそうではないが、細胞に対して異種である場合が多い。発現ベクターは、追加のエレメントを含んでいてもよく、例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有していてもよく、このようにして、これが、2つの生物において、例えば、発現のためのヒト細胞において、ならびにクローニングおよび増幅のための原核生物宿主におい

10

20

30

40

50

て、維持されることを可能にする。

【0323】

本明細書で使用される場合、「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つのエレメントを含み、ウイルスベクター粒子にパッケージングされる能力を有する、核酸ベクター構築物を指す。ウイルスベクターは、非必須ウイルス遺伝子の代わりに、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸を含有することができる。ベクターおよび/または粒子は、*in vitro*または*in vivo*のいずれかで、任意の核酸を細胞に移入する目的で利用されてもよい。多数の形態のウイルスベクターが当技術分野において公知である。本発明のウイルスベクターの非限定的な例としては、AAVベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、およびキメラウイルスベクターが挙げられる。

10

【0324】

本明細書に記載されるベクターは、一部の実施形態では、他の好適な組成物および治療と組み合わせることができることが理解されるべきである。一部の実施形態では、ベクターは、エピソームである。好適なエピソームベクターの使用は、対象における目的のヌクレオチドを、高コピー数の染色体外DNAにおいて維持する手段を提供し、それによって、染色体への組み込みの潜在的効果を排除する。

【0325】

本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置」、「処置すること」、または「改善」という用語は、治療的処置を指し、ここで、その目的は、疾患または障害、例えば、ハンチントン病に関連する状態の進行または重症度を、反転、軽減、改善、阻害、遅くするまたは停止することである。「処置すること」という用語は、状態、疾患または障害の少なくとも1つの有害な効果または症状を低減することまたは軽減することを含む。処置は、一般に、1つまたは複数の症状または臨床マーカーが低減される場合に、「有効」である。あるいは、処置は、疾患の進行が低減されるか、または中断される場合に、「有効」である。すなわち、「処置」は、症状またはマーカーの改善だけではなく、処置の非存在下で予想されるであろうものと比較して、症状の進行または悪化の中止、またはその少なくとも減速を含む。有益な臨床結果または所望される臨床結果としては、限定されるものではないが、検出可能または検出不能にかかわらず、1つもしくは複数の症状の軽減、疾患の程度の減弱、疾患の安定化した（すなわち悪化していない）状態、疾患進行の遅延もしくは減速、疾患状態の改善もしくは緩和、寛解（部分的または全体的にかかわらない）、および/または死亡率の減少が挙げられる。疾患の「処置」という用語は、疾患の症状または副作用からの解放（緩和処置を含む）を提供することも含む。

20

30

【0326】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、薬学的に許容される担体、例えば、製薬業界において一般に使用される担体と組み合わせた活性薬剤を指す。「薬学的に許容される」という語句は、正当な医学的判断の範囲内で、妥当な利益/リスク比にふさわしい、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症がなく、人間および動物の組織と接触して使用するのに好適である、これらの化合物、材料、組成物、および/または剤形を指すために本明細書で用いられる。態様のいずれかの一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、水以外の担体であり得る。態様のいずれかの一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、クリーム、エマルジョン、ゲル、リポソーム、ナノ粒子、および/または軟膏であり得る。態様のいずれかの一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、人工的なまたは工学的に操作された担体、例えば、活性成分が天然に存在すると見出されないであろう担体であり得る。

40

【0327】

本明細書で使用される場合、「投与すること」という用語は、薬剤の所望の部位での少なくとも部分的な送達をもたらす方法または経路による、本明細書に開示される化合物の対象への配置を指す。本明細書に開示される化合物を含む医薬組成物は、対象における有

50

効な処置をもたらす任意の適切な経路によって投与され得る。一部の実施形態では、投与は、物理的なヒトの活動、例えば、注射、摂取の行動、適用の行動、および/または送達デバイスもしくは機械の操作を含む。そのような活動は、例えば、医療専門家および/または処置される対象によって行うことができる。

【0328】

本明細書で使用される場合、「接触させること」は、薬剤を少なくとも1つの細胞に送達するか、または曝露するための任意の好適な手段を指す。例示的な送達方法としては、限定されるものではないが、細胞培養培地への直接送達、灌流、注射、または当業者に周知の他の送達方法が挙げられる。一部の実施形態では、接触させることは、物理的なヒト活動、例えば、注射；分注、混合、および/もしくはデカンテーションする行動；ならびに/または送達デバイスもしくは機械の操作を含む。

10

【0329】

「統計学的に有意な」または「有意に」という用語は、統計学的有意性を指し、一般に、2標準偏差(2SD)またはより大きな差を意味する。

【0330】

操作例以外に、または他に示される場合、本明細書で使用される成分または反応条件の量を表すすべての数は、すべての例において、「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。「約」という用語は、パーセンテージと併せて使用される場合、±1%を意味し得る。

【0331】

本明細書で使用される場合、「含む(comprising)」という用語は、表される定義された要素に加えて、他の要素も存在し得ることを意味する。「含む(comprising)」の使用は、限定よりもむしろ包含を示す。

20

【0332】

「からなる(consisting of)」という用語は、本明細書に記載される組成物、方法、およびそれらのそれぞれの構成要素を指し、実施形態のその記載において列挙されていないすべての要素を除外する。

【0333】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる(consisting essentially of)」という用語は、所与の実施形態に必要とされるこれらの要素を指す。この用語は、本発明の実施形態の基本的なおよび新規のまたは機能的な特徴に実質的に影響を及ぼさない追加の要素の存在を許容する。

30

【0334】

本明細書で使用される場合、「に対応する」という用語は、第1のポリペプチドもしくは核酸において列挙された位置のアミノ酸もしくはヌクレオチド、または第2のポリペプチドもしくは核酸において列挙されたアミノ酸もしくはヌクレオチドと同等であるアミノ酸もしくはヌクレオチドを指す。同等の列挙されたアミノ酸またはヌクレオチドは、当技術分野において公知の相同性プログラム、例えば、BLASTの度合いを使用して、候補配列のアライメントによって決定することができる。

【0335】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」という用語は、第1の実体が第2の実体に結合し、標的ではない第3の実体にそれが結合するよりも高い特異性および親和性で実体を標的にする、2つの分子、化合物、細胞および/または粒子の間の化学的相互作用を指す。一部の実施形態では、特異的結合は、第3の非標的実体に対する親和性よりも、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、またはそれより高い倍数である、第1の実体の第2の標的実体に対する親和性を指し得る。所与の標的に対して特異的な試薬は、利用されるアッセイの条件下で、その標的に対して特異的結合を示す試薬である。

40

【0336】

「a」、「an」、および「the」という単数形の使用は、文脈が他に明確に示さな

50

い限り、複数の指示対象を含む。同様に、「または」という語は、文脈が他に明確に示さない限り、「および」を含むことを意図する。本明細書に記載されるものに類似のそれと同等の方法および材料は、本開示の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料を、下記に記載する。略語の「例えば (e.g.)」は、ラテン語の例えば (exempli gratia) に由来し、非限定的な例を示すために本明細書で使用される。そのため、略語の「例えば (e.g.)」は、「例えば (for example)」という用語と同義である。

【0337】

本明細書に開示される本発明の代替の要素または実施形態のグループ分けは、限定として解釈されるべきではない。それぞれの群のメンバーは、個々に、またはその群の他のメンバーもしくは本明細書に見出される他の要素との任意の組合せで、言及し、特許請求の範囲に記載することができる。群の1つまたは複数のメンバーは、便宜上および/または特許性の理由のために、群に含めることができ、または群から削除することができる。任意のそのような包含または削除が生じる場合、本明細書は、ここで、改変された群を含有すると見なされ、そのため、添付の特許請求の範囲において使用されるすべてのマーカッシュ群の書面の記載を満たす。

10

【0338】

本明細書で他に定義されない限り、本出願と併せて使用される科学用語および技術用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって通常理解される意味を有するものとする。本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコール、および試薬などに限定されず、それ自体変更することができることが理解されるべきである。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態のみを記載する目的のものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、これは、特許請求の範囲によってのみ定義される。免疫学および分子生物学における一般用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 20th Edition, Merck Sharp & Dohme Corp., 2018 (ISBN 0911910190, 978-0911910421)によって公開; Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908)によって公開; および Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)によって公開; Immunology by Werner Luttmann, Elsevier, 2006によって公開; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), W. W. Norton & Company, 2016 (ISBN 0815345054, 978-0815345053); Lewin's Genes XI, Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055)によって公開; Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385); Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; および Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)、WO 2018/057855 A号、US 10,457,940号に見ることができ、これらのそれぞれの内容は、それ

20

30

40

50

らの全体が参照により本明細書にすべて組み込まれる。

【0339】

態様のいずれかの一部の実施形態では、本明細書に記載される開示は、人間をクローニングするためのプロセス、人間の生殖細胞系列の遺伝的同一性を改変するためのプロセス、産業もしくは商業目的でのヒトの胚の使用、または人もしくは動物に対して任意の実質的な医学的利益なしに、動物に罹患を引き起こす可能性がある、動物の遺伝的同一性を改変するためのプロセス、およびそのようなプロセスから得られる動物に、関係しない。

【0340】

他の用語は、本発明のさまざまな態様の記載内で、本明細書で定義される。

【0341】

本出願全体を通して引用される、参照文献、発行された特許、公開された特許出願、および同時係属の特許出願を含むすべての特許および他の刊行物は、例えば、本明細書に記載される技術と併せて使用され得るそのような刊行物に記載される方法論を記載および開示する目的で、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。これらの刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示を提供するだけである。このことについて、本発明者らが、先行発明によってまたは任意の他の理由で、そのような開示に先行する権利を与えられないことの自認として、解釈されるべきではない。日付についてのすべての陳述またはこれらの文書の内容についての表明は、出願人らに利用可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確性について任意の自認を構成しない。

【0342】

本開示の実施形態の記載は、排他的であること、または開示される正確な形態に本開示を限定することを意図しない。本開示の具体的な実施形態およびそれについての例は、例示目的で本明細書に記載されており、関連する技術分野における当業者が認識するように、さまざまな同等の改変が本開示の範囲内で可能である。例えば、方法のステップまたは機能は、所与の順序で表されるが、代替の実施形態は、異なる順序で機能を行ってもよく、または機能は、実質的に同時に行われてもよい。本明細書に提供される本開示の教示は、必要に応じて、他の手順または方法に適用することができる。本明細書に記載されるさまざまな実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。本開示の態様は、必要により、上記の参考文献および出願の組成物、機能および概念を用いるように改変して、本開示のまたさらなる実施形態を提供することができる。これらのおよび他の変更は、詳細な説明を考慮して、本開示に対して行うことができる。すべてのそのような改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。

【0343】

前述の実施形態のいずれかの具体的な要素は、他の実施形態における要素と組み合わせることができ、またはそれを置換することができる。さらにまた、本開示のある特定の実施形態に関連する利点は、これらの実施形態に照らして記載されているが、他の実施形態が、そのような利点を示してもよく、また、すべての実施形態が、本開示の範囲内に含まれるためにそのような利点を必ず示す必要はない。

【0344】

本明細書に記載される技術を、さらなる限定であるとして決して解釈されるべきではない以下の実施例によってさらに説明する。

【0345】

本明細書に記載される技術の一部の実施形態は、以下の番号付き段落のいずれかにより定義することができる。

【実施例】

【0346】

(実施例1)

一態様では、ハンチントン病の処置のために使用することができる阻害性RNAが本明細書に記載される。態様のいずれかの一部の実施形態では、阻害性RNAの核酸配列は、配列番号6~17、40~44もしくは50~66、または配列番号6~17、40~4

10

20

30

40

50

4もしくは50～66と同じ機能(例えば、HTT阻害)を維持する配列番号6～17、40～44もしくは50～66のうちの少なくとも1つの配列に対して少なくとも95%(例えば、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%)同一である配列のうちの1つを含む。

【0347】

人工miRNAを含む構築物が本明細書に記載される。pEMBL-D(+)-Syn1-hCGイントロンは、対照ベクターであり、これは、空のヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)イントロン(hCGin)を挿入され、シナプシンプロモーターで駆動される。対照miRNA前駆体(ランダム配列または非機能的突然変異体)の2つのコピーを、ベクターpEMBL-D(+)-Syn1-hCGin-2x対照pre-miR中のhCGinに挿入する。人工pre-miR(約100～150bpの隣接する上流および下流の配列を含む、3'-UTR標的化配列と完全一致)の2つのコピーは、hCGイントロン間にクローニングされる。ベクターpEMBL-D(+)-Syn1-CYP46A1-hCGin-2x人工pre-miRは、コンボ構築物であり、これは、CYP46A1および人工miRNAの両方を同じ時に産生することができる。pre-miRNAが、成熟miRNAにプロセッシングされ、成熟miRNAと完全に相補的であるCAG伸長を含むHTT標的化配列と組み合わせられ得るかどうかを特定するために、これを、ルシフェラーゼ遺伝子の後に挿入する。パッケージサイズの制限のために、小ポリAを、構築物において使用する。Syn1は、CMVエンハンサー、および/またはACTB近位プロモーター、および/またはキメラACTB-HBB2イントロンのいずれか、ならびに表10～13から選択される合成神経系特異的プロモーターもしくはその断片、および/またはエンハンサー、および/または表13～15から選択されるシス調節エレメント(CRE)のうちの1つまたは複数によって置き換えることができる。

【0348】

以下の配列は、当技術分野において公知である：pEMBL；シナプシンプロモーター(Syn1)；ITR(例えば、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはAAV13由来)；hCGイントロン；小ポリA；CYP46A1；ルシフェラーゼ；HTT標的化配列；および/またはHTT-3'UTR突然変異体。

【0349】

シナプシン-1(Syn1)は、シナプシン遺伝子ファミリーのメンバーである。シナプシンは、シナプス小胞の細胞質表面と会合するニューロンリントタンパク質をコードする。ファミリーのメンバーは、共通のタンパク質ドメインによって特徴付けられ、それらは、シナプス形成および神経伝達物質放出のモジュレーションに関わり、いくつかの神経精神病的疾患における潜在的な役割を示唆する。Syn1は、軸索形成およびシナプス形成の調節において役割を果たす。Syn1タンパク質は、いくつかの異なるプロテインキナーゼに対する基質としての役割を果たし、リン酸化は、神経末端におけるこのタンパク質の調節において機能し得る。この遺伝子における突然変異は、レット症候群などの主に神経変性を伴うX連鎖性障害に関連し得る。あるいは、異なるアイソフォームをコードするスプライシングされた転写物バリエーションが特定されている。態様のいずれかの一部の実施形態では、Syn1プロモーターは、ヒトプロモーターSyn1(例えば、NCBI参照番号NG_008437.1 RefSeq Gene範囲5001～52957；NM_006950.3；NP_008881.2；NM_133499.2；NP_598006.1に関連するSyn1プロモーターを参照されたい)を含むことができる。

【0350】

CYP46A1は、酵素のチトクロムP450スーパーファミリーのメンバーである。チトクロムP450タンパク質は、薬物代謝、ならびにコレステロール、ステロイドおよび他の脂質の合成に参与する多くの反応を触媒するモノオキシゲナーゼである。この小胞体タンパク質は、脳において発現され、そこで、コレステロールを24S-ヒドロキシコレステロールに変換する。コレステロールは、血液脳関門を通過することができないが、

24S-ヒドロキシコレステロールは、脳において循環に分泌されて、異化のために肝臓に戻ることができる。態様のいずれかの一部の実施形態では、CYP46A1は、ヒトCYP46A1（例えば、NCBI参照番号NG_007963.1 RefSeq Gene範囲4881~47884；NM_006668.2；NP_006659.1を参照されたい）を含むことができる。コレステロール分解のための律速酵素であるCYP46A1は、ハンチントン病において神経保護的である（例えば、Boussicault et al., CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease, Brain. 2016 Mar, 139(Pt 3):953-70；Kacher et al., CYP46A1 gene therapy deciphers the role of brain cholesterol metabolism in Huntington's disease, Brain. 2019 Aug 1;142(8):2432-2450を参照されたい；これらのそれぞれの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。 10

【0351】

態様のいずれかの一部の実施形態では、miRNAは、miRNA骨格配列に隣接した配列番号3または4に示される配列の少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25）の連続する塩基に相補的な配列を含む。態様のいずれかの一部の実施形態では、miRNAは、miRNA骨格配列に隣接したHTT（例えば、NCBI遺伝子ID：3064；例えば、配列番号4を参照されたい）に関連する、非翻訳領域（例えば、5'UTR、3'UTR）、エクソン、CAGリピート、またはCAG 20ジャンパー（例えば、CAG5'ジャンパー、CAG3'ジャンパー）の配列の少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25）の連続する塩基に相補的な配列を含む。

【0352】

1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸およびCYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸は、同じ患者に投与されると、いずれかが単独で投与されるよりも改善された治療効果を提供することができる。1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸およびCYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸は、同じ患者に投与されると、いずれか 30が単独で投与されるよりも相乗的に（相加的よりもむしろ）改善された治療効果を提供することができる。1つまたは複数のmiRNAをコードする導入遺伝子をコードする単離された核酸およびCYP46A1タンパク質をコードする単離された核酸は、本明細書に記載される方法のいずれかに従って、対象に連続してまたは同時に投与することができる。CYP46A1バリエーションCDS（配列番号110に示される通り）を含むrAAVは、例えば、配列番号1に示されるCYP46A1非バリエーション配列を含むrAAVを投与された場合よりも、神経疾患、例えば、ハンチントン病を処置するより良好な治療効果を提供すると予想される。同様に、miRNA（例えば、配列番号6~17または40~44または50~66から選択される1つまたは複数）を含むrAAVは、例えば、配列番号1に示されるCYP46A1非バリエーション配列と一緒にそれが投与される場合よりも、 40CYP46A1バリエーションCDS（配列番号110に示される通り）と一緒にそれが投与される場合に、神経疾患、例えば、ハンチントン病を処置するより良好な治療効果を提供すると予想される。

【0353】

【化 1 2 - 1】

配列番号 3 ヒトHTT遺伝子のエクソン1

uugcugugug aggcagaacc ugcgggggca ggggcgggcu gguucccugg ccagccauug	60
gcagaguccg caggcuaggg cugucaauca ugcuggccgg cguggccccg ccuccgccgg	120
cggggccccg ccuccgccgg cgcacgucug ggacgcaagg cgcggugggg gcugccggga	180
cggguccaag auggacggcc gcucagguuc ugcuuuuacc ugcggcccag agccccauuc	240
auugccccg ugcugagcgg cgcgcgagag cggccccgagg ccuccgggga cugccgugcc	300
gggcgggaga ccgccauggc gacccuggaa aagcugauga aggccuucga gucccucaag	360
uccuuccagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	420
cagcagcagc aacagccgcc accgccgccg ccgccgccgc cgcuccuca gcuuccucag	480
ccgccgccgc aggcacagcc gcugcugccu cagccgcagc cgcccccgcc gccgccccg	540
ccgccacccg gcccggcugu ggcugaggag ccgcugcacc gaccgugagu uugggccccg	600

10

【化 1 2 - 2】

ugcagcuccc uguc 614

【 0 3 5 4 】

20

30

40

50

【化 1 3 - 1】

配列番号 4: 　　ヒトHTT mRNA配列

1 gctgccggga cgggtccaag atggacggcc gctcaggttc tgcttttacc tgccggccag
 61 agccccattc attgccccgg tgctgagcgg cgccgcgagt cggccccagg cctccgggga
 121 ctgccgtgcc gggcgggaga ccgccatggc gaccctggaa aagctgatga aggccttcga
 181 gtccctcaag tccttccagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca
 241 gcagcagcag cagcagcagc aacagccgcc accgccgccg ccgccgccgc cgctctctca
 301 gcttctctcag ccgccgccgc aggcacagcc gctgctgcct cagccgcagc cccccgcc
 361 gccgcccccg ccgccaccgc gcccggtgt ggctgaggag ccgctgcacc gaccaaagaa
 421 agaactttca gtaccaaga aagaccgtgt gaatcattgt ctgacaatat gtgaaaacat
 481 agtggcacag tctgtcagaa attctccaga atttcagaaa cttctgggca tcgctatgga
 541 actttttctg ctgtgcagtg atgaocgaga gtcagatgtc aggatggtgg ctgacgaatg
 601 cctcaacaaa gttatcaaag ctttgatgga ttctaattctt ccaaggttac agctcgagct
 661 ctataaggaa attaaaaaga atggtgcccc tcggagtttg cgtgctgcc tgtggagggt
 721 tgctgagctg gctcacctgg ttcggcctca gaaatgcagg ccttacctgg tgaaccttct
 781 gccgtgcctg actcgaacaa gcaagagacc cgaagaatca gtccaggaga ccttggctgc
 841 agctgttccc aaaattatgg cttcttttgg caattttgca aatgacaatg aaattaaggt
 901 tttgttaaag gccttcatag cgaacctgaa gtcaagctcc cccaccattc ggcggacagc
 961 ggctggatca gcagtgagca tctgccagca ctcaagaagg acacaatatt tctatagttg
 1021 gctactaaat gtgctcttag gcttactcgt tctgtctgag gatgaacact cactctgct
 1081 gattcttggc gtgctgctca ccctgaggta tttggtgcc ttgctgcagc agcagggtcaa
 1141 ggacacaagc ctgaaaggca gcttcggagt gacaaggaaa gaaatggaag tctctcttct
 1201 tgagagcag cttgtccagg ttatgaact gacgttacat catacacagc accaagacca
 1261 caatgttgtg accggagccc tggagctggt gcagcagctc ttcagaacgc ctcccaccga
 1321 gcttctgcaa accctgaccg cagtccgggg cattgggcag ctcaaccgctg ctaaggagga
 1381 gtctggtggc cgaagccgta gtgggagtat tgtggaactt atagctggag ggggttctct
 1441 atgcagccct gtctttcaa gaaaacaaaa aggcaaagtg ctcttaggag aagaagaagc
 1501 cttggaggat gactctgaat cgagatcgga tgtcagcagc tctgccttaa cagcctcagt
 1561 gaaggatgag atcagtggag agctggctgc ttcttcaggg gtttccactc cagggtcagc
 1621 aggtcatgac atcatcacag aacagccacg gtcacagcac aactgcagg cggactcagt
 1681 ggatctggcc agctgtgact tgacaagctc tgccactgat ggggatgagg aggatatctt
 1741 gagccacagc tccagccagg tcagcgccgt ccatctgac cctgccatgg acctgaatga
 1801 tgggaccag gcctcgtcgc ccatcagcga cagctcccag accaccaccg aagggcctga
 1861 ttcagctggt accccttcag acagttctga aattgtgtta gacggtaacc acaaccagta
 1921 tttgggctg cagattggac agccccagga tgaagatgag gaagccacag gtattcttcc
 1981 tgatgaagcc tcggaggcct tcaggaactc ttccatggcc cttcaacagg cacatattatt
 2041 gaaaaacatg agtcaactgca ggcagccttc tgacagcagt gttgataaat ttgtgttgag
 2101 agatgaagct actgaaccgg gtgatcaaga aaacaagcct tgccgatca aaggtgacat

10

20

30

40

50

【化 1 3 - 2】

2161 tggacagtcc actgatgatg actctgcacc tcttgtccat tgtgtccgcc ttttatctgc
 2221 ttcgtttttg ctaacagggg gaaaaaatgt gctggttccg gacagggatg tgagggtcag
 2281 cgtgaaggcc ctggccctca gctgtgtggg agcagctgtg gccctccacc cggaaatcttt
 2341 cttcagacaa ctctataaag ttctcttga caccacggaa taccctgagg aacagtatgt
 2401 ctcagacatc ttgaactaca tcgatcatgg agaccacag gttcaggagg ccaactgccat
 2461 tctctgtggg accctcatct gctccatcct cagcaggtcc cgcttccacg tgggagattg
 2521 gatgggcacc attagaacct tcacaggaaa tacattttct ttggcggatt gcattccttt
 2581 gctgcggaaa acactgaagg atgagtcttc tgttacttgc aagttagctt gtacagctgt
 2641 gaggaactgt gtcatgagtc tctgcagcag cagctacagt gagttaggac tgcagctgat 10
 2701 catcgatgtg ctgactctga ggaacagttc ctattggctg gtgaggacag agcttctgga
 2761 aacccttgca gagattgact tcaggctggt gagctttttg gaggcaaaag cagaaaactt
 2821 acacagaggg gctcatcatt atacagggct tttaaaactg caagaacgag tgctcaataa
 2881 tgttgtcatc catttgcctt gagatgaaga cccaggggtg cgacatggtt ccgcagcatc
 2941 actaattagg cttgtcccaa agctgtttta taaatgtgac caaggacaag ctgatccagt
 3001 agtggccgtg gcaagagatc aaagcagtgt ttacctgaaa cttctcatgc atgagacgca
 3061 gcctccatct catttctccg tcagcacaat aaccagaata tatagaggct ataacctact
 3121 accaagcata acagacgtca ctatggaaaa taacctttca agagttattg cagcagtttc
 3181 tcatgaacta atcacatcaa ccaccagagc actcacattt ggatgctgtg aagctttgtg
 3241 tcttctttcc actgccttcc cagtttgcac ttggagttha ggttggcact gtggagtgcc 20
 3301 tccactgagt gctcagatg agtctaggaa gagctgtacc gttgggatgg ccacaatgat
 3361 tctgacctg ctctcgtcag cttggttccc attggatctc tcagcccatc aagatgcttt
 3421 gattttggcc ggaaacttgc ttgcagccag tgcctccaaa tctctgagaa gttcatgggc
 3481 ctctgaagaa gaagccaacc cagcagccac caagcaagag gaggtctggc cagccctggg
 3541 ggaccgggcc ctgggtccca tgggtggagca gctcttctct cacctgctga aggtgattaa
 3601 catttgtgcc cacgtcctgg atgacgtggc tccctggacc gcaataaagg cagccttgcc
 3661 ttctctaaca aacccccctt ctctaagtcc catccgacga aaggggaagg agaaagaacc
 3721 aggagaacaa gcatctgtac cgttgagtcc caagaaaggc agtgaggcca gtgcagcttc
 3781 tagacaatct gatacctcag gtccctgttac aacaagtaaa tccctcatcac tggggagtth
 3841 ctatcatctt ccttcatacc tcaaactgca tgatgtcctg aaagctacac acgctaacta 30
 3901 caaggtcacg ctggatcttc agaacagcac ggaaaagtth ggagggtthc tccgctcagc
 3961 cttggatgth ctttctcaga tactagagct ggccacactg caggacattg ggaagtgtgt
 4021 tgaagagatc ctaggatacc tgaatcctg ctttagtoga gaaccaatga tggcaactgt
 4081 ttgtgttcaa caattgttga agactctctt tggcacaac ttggcctccc agtttgatgg
 4141 cttatcttcc aaccccagca agtcacaagg ccgagcacag cgccttggct cctccagtgt
 4201 gaggccaggc ttgtaccact actgcttcat ggccccgtac acccaactca cccaggccct
 4261 cgctgacgcc agcctgagga acatggtgca ggcggagcag gagaacgaca cctcgggatg
 4321 gtttgatgtc ctccagaaag tgtctacca gttgaagaca aacctcacga gtgtcacaaa
 4381 gaaccgtgca gataagaatg ctattcataa tcacattcgt ttgthtgaac ctcttgttat
 4441 aaaagcttht aaacagtaca cgactacaac atgtgtgcag ttacagaagc aggtthttaga
 4501 tthgtggcg cagctgthc agttacgggt taattactgt cttctggatt cagatcaggt 40

【化 1 3 - 3】

4561 gtttattggc tttgtattga aacagtttga atacattgaa gtgggccagt tcaggaatc
 4621 agaggcaatc attccaaaca tctttttctt cttggtatta ctatcttatg aacgctatca
 4681 ttcaaaacag atcattggaa ttctaaaat cattcagctc tgtgatggca tcatggccag
 4741 tgaaggaag gctgtgacac atgccatacc ggctctgcag cccatagtcc acgacctctt
 4801 tgtattaaga ggaacaaata aagctgatgc aggaaaagag cttgaaaccc aaaaagaggt
 4861 ggtggtgtca atgttactga gactcatcca gtaccatcag gtgttgaga tgttcatctt
 4921 tgtcctgcag cagtgccaca aggagaatga agacaagtgg aagcgactgt ctcgacagat
 4981 agctgacatc atcctcccaa tgttagccaa acagcagatg cacattgact ctcatgaagc
 5041 ccttgagtg ttaatacat tatttgagat tttggccctt tctccctcc gtccggtaga 10
 5101 catgcttcta cggagtatgt tcgtcactcc aaacacaatg gcgtccgtga gcactgttca
 5161 actgtggata tcgggaattc tggccatctt gagggttctg atttcccagt caactgaaga
 5221 tattgttctt tctcgtattc aggagctctc cttctctccg tatttaactc cctgtacagt
 5281 aattaatagg ttaagagatg gggacagtac ttcaacgcta gaagaacaca gtgaagggaa
 5341 acaataaag aatttgccag aagaaacatt ttcaaggttt ctattacaac tggttggtat
 5401 tcttttagaa gacattgtta caaacagct gaaggtggaa atgagtgagc agcaacatac
 5461 tttctattgc caggaactag gcacactgct aatgtgtctg atccacatct tcaagtctgg
 5521 aatgttccgg agaatcacag cagctgccac taggctgttc cgcagtgatg gctgtggcgg
 5581 cagtttctac accctggaca gcttgaactt gcgggctcgt tccatgatca ccacccacc
 5641 ggccctggtg ctgctctggt gtcagatact gctgcttgtc aaccacaccg actaccgctg 20
 5701 gtgggcagaa gtgcagcaga ccccgaaaag acacagtctg tccagcaca agttacttag
 5761 tccccagatg tctggagaag aggaggattc tgacttgcca gccaaacttg gaatgtgcaa
 5821 tagagaaata gtacgaagag gggctctcat tctctctgt gattatgtct gtcagaacct
 5881 ccatgactcc gagacttaa cgtggctcat tgtaaatcac attcaagatc tgatcagcct
 5941 ttcccacgag cctccagtac aggacttcat cagtgcctt catcggaact ctgctgccag
 6001 cggcctgttc atccaggcaa ttcagtctcg ttgtgaaaac ctttcaactc caaccatgct
 6061 gaagaaaact cttcagtgtc tggaggggat ccatctcagc cagtccggag ctgtgtcac
 6121 gctgtatgtg gacaggcttc tgtgcacccc tttccgtgtg ctggctcgca tggctgacat
 6181 ccttgcttgt cgcgggtgag aaatgcttct ggctgcaaat ttacagagca gcatggccca
 6241 gttgccaatg gaagaactca acagaatcca ggaatacctt cagagcagcg ggctcgtc
 6301 gagacaccaa aggtctctatt ccctgtgga caggtttctg ctctccacca tgcaagactc 30
 6361 acttagtccc tctctccag tctcttccca cccgctggac ggggatgggc acgtgtcact
 6421 ggaacagtg agtccggaca aagactggtc cgttcatctt gtcaaatccc agtgttgac
 6481 caggtcagat tctgcaactg tggaggtgac agagctggtg aatcggattc ctgtgaaga
 6541 tatgaatgcc ttcattgatga actcggagtt caacctaagc ctgctagctc catgcttaag
 6601 cctagggatg agtgaaatct ctggtggcca gaagagtgcc ctttttgaag cagcccgatg
 6661 ggtgactctg gccctgtgta gcggcaccgt gcagcagctc cctgctgtcc atcatgtctt
 6721 ccagcccag ctgctcgcag agccggcggc ctactggagc aagttgaatg atctgtttgg
 6781 ggatgctgca ctgtatcagt ccctgccac tctggcccg gcctggcac agtacctggt
 6841 ggtggtctcc aaactgcca gtcatttga ccttctctc gagaaagaga aggacattgt
 6901 gaaattcgtg gtggcaaccc ttgaggcct gtctggcat ttgatccatg agcagatccc 40

【化 1 3 - 4】

6961 gctgagtctg gatctccagg cagggctgga ctgctgctgc ctggccctgc agctgcctgg
 7021 cctctggagc gtggctcctt ccacagagtt tgtgacccac gcctgctccc tcatctactg
 7081 tgtgcacttc atcctggagg ccgttgcaat gcagcctgga gagcagcttc ttagtccaga
 7141 aagaaggaca aataccccaa aagccatcag cgaggaggag gaggaagtag atccaaacac
 7201 acagaatcct aagtatatca ctgcagcctg tgagatgggt gcagaaatgg tggagtctct
 7261 gcagtcgggt ttggccttgg gtcataaaaag gaatagcggc gtgccggcgt ttctcacgcc
 7321 attgctaagg aacatcatca tcagcctggc ccgctgccc cttgtcaaca gctacacacg
 7381 tgtgccccca ctgggtgga agcttggatg gtcacccaaa ccgggagggg attttggcac
 7441 agcattccct gagatccccg tggagttcct ccaggaaaag gaagtcttta aggagtctat 10
 7501 ctaccgcac aacacactag gctggaccag tctactcag tttgaagaaa cttggggccc
 7561 cctccttggg gtctctggtg cgcagcccct cgtgatggag caggaggaga gccaccaga
 7621 agaagacaca gagaggacc agatcaacgt cctggccgtg caggccatca cctcactggt
 7681 gctcagtgca atgactgtgc ctgtggccgg caaccagct gtaagctgct tggagcagca
 7741 gccccggaac aagcctctga aagctctcga caccaggttt gggaggaagc tgagcattat
 7801 cagagggatt gtggagcaag agattcaagc aatggtttca aagagagaga atattgccac
 7861 ccatcattta tatcaggcat gggatcctgt ccttctctg tctccggcta ctacaggtgc
 7921 cctcatcagc cagcagaagc tgctgctaca gatcaacccc gagcgggagc tggggagcat
 7981 gagctacaaa ctccggccagg tgtccataca ctccgtgtgg ctggggaaca gcatcacacc
 8041 cctgagggag gaggaatggg acgaggaaga ggaggaggag gccgacgcc ctgcacctc 20
 8101 gtcaccaccc acgtctccag tcaactccag gaaacaccgg gctggagttg acatccactc
 8161 ctgttcgcag tttttgcttg agttgtacag ccgctggatc ctgccgtcca gctcagccag
 8221 gaggaccccc gccatcctga tcagttaggt ggtcagatcc cttctagtgg tctcagactt
 8281 gttcaccogag cgcaaccagt ttgagctgat gtatgtgacg ctgacagaac tgcaaggggt
 8341 gcacccttca gaagacgaga tcctcgtcca gtacctggtg cctgccacct gcaaggcagc
 8401 tgccgtcctt gggatggaca aggccgtggc ggagcctgct agccgcctgc tggagagcac
 8461 gctcaggagc agccacctgc ccagcagggt tggagccctg cacggcgtcc tctatgtgct
 8521 ggagtgcgac ctgctggagc aactgccaa gcagctcatc ccggtcatca ggcactatct
 8581 cctctccaac ctgaaagga tcgccactg cgtgaacatt cacagccagc agcacgtact
 8641 ggtcatgtgt gccactgcgt tttacctcat tgagaactat cctctggagc tagggccgga
 8701 attttcagca tcaataatac agatgtgtgg ggtgatgctg tctggaagtg aggagtccac 30
 8761 cccctccatc atttaccact gtgccctcag aggcctggag cgcctcctgc tctctgagca
 8821 gctctcccgc ctggatgcag aatcgctggt caagctgagt gtggacagag tgaacgtgca
 8881 cagcccgcac cgggcatggt cggctctggg cctgatgctc acctgcatgt acacaggaaa
 8941 ggagaaagtc agtccgggta gaacttcaga ccctaactct gcagccccg acagcagtc
 9001 agtgattggt gctatggagc gggatctgt tcttttgat aggatcagga aaggcttcc
 9061 ttgtgaagcc agagtgggtg ccaggatcct gccccagttt ctgacgact tcttcccacc
 9121 ccaggacatc atgaacaaag tcatcgaga gtttctgtcc aaccagcagc cataccccc
 9181 gttcatggcc accgtgggtg ataagggtgt tcagactctg cacagcaccg ggcagtcgtc
 9241 catggtcggt gactgggtca tgctgtccct ctccaacttc acgcagaggg ccccggtcgc
 9301 catggccacg tggagcctct cctgcttctt tgtcagcggc tccaccagcc cgtgggtcgc 40

【化 1 3 - 5】

9361 ggcgatcctc ccacatgtca tcagcaggat gggcaagctg gagcagggtg acgtgaacct
 9421 tttctgectg gtgccacag acttctacag acaccagata gaggaggagc tcgaccgcag
 9481 ggccttcocag tctgtgcttg aggtggttgc agccccagga agcccatatc accggctgct
 9541 gacttgttta cgaaatgtcc acaaggtcac cacctgctga gcgccatggt gggagagact
 9601 gtgaggcggc agctggggcc ggagcctttg gaagtctgcg cccttggtcc ctgcctccac
 9661 cgagccagct tggtcctat ggcttccgc acatgccgcg ggcggccagg caacgtgctg
 9721 gtctctgcca tgtggcagaa gtgctctttg tggcagtggc caggcaggga gtgtctgcag
 9781 tcctgggtgg gctgagcctg aggccttcca gaaagcagga gcagctgtgc tgcaccccat
 9841 gtgggtgacc aggtcctttc tcctgatagt cacctgctgg ttgttgccag gttgcagctg 10
 9901 ctcttgcatc tgggccagaa gtccctccc ctgcaggctg gctgttggtc cctctgctgt
 9961 cctgcagtag aaggtgctg gagcaggctt tgggaacct ggcctgggtc tcctgggtgg
 10021 ggtgtgcatg ccacgccccg tgtctggatg cacagatgcc atggcctgtg ctgggccagt
 10081 ggctgggggt gctagacacc cggcaccatt ctcccttctc tcttttctc tcaggattta
 10141 aaatttaatt atatcagtaa agagattaat tttaacgtaa ctctttctat gccctgttaa
 10201 agtatgtgaa tcgcaaggcc tgtgctgcat gcgacagcgt ccgggggtgg ggacagggcc
 10261 cccggccacg ctccctctcc tgtagccact ggcatagccc tcctgagcac ccgctgacat
 10321 tcccgttgta catgttccg tttatgcatt cacaaggatga ctgggatgta gagaggcgtt
 10381 agtgggcagg tggccacagc aggactgagg acaggcccc attatcctag ggggtgcctc
 10441 acctgcagcc cctcctctc ggcacagac gactgtcgtt ctccaccac cagtcaggga 20
 10501 cagcagcctc cctgtcactc agctgagaag gccagccctc cctggctgtg agcagcctcc
 10561 actgtgtcca gagacatggg cctcccactc ctgttctctg ctagccctgg ggtggcgtct
 10621 gcctaggagc tggctggcag gtgttgggac ctgctgctcc atggatgcat gccctaagag
 10681 tgtcactgag ctgtgttttg tctgagcctc tctcggctca cagcaaagct tgggtgtctg
 10741 gcaactgtag tgacagagcc cagcatccct tctgccccg ttccagctga catcttgac
 10801 ggtgacccct ttagtgcagg agagtgcaga tctgtgctca tcggagactg ccccacggcc
 10861 ctgtcagagc cgccactcct atccccaggc caggctcctg gaccagcctc ctgtttgacg
 10921 gccagagga gccaaatcat taaaatggaa gtggattctg gatggccggg ctgctgctga
 10981 tgtaggagct ggatttgga gctctgctg ccgactggct gtgagacgag gcaggggctc
 11041 tgcttctca gccctagagg cgagccaggc aaggttggcg actgtcatgt ggcttggtt 30
 11101 ggtcatgccc gtgatgttt tgggtattga atgtgtaag tggaggaaat gttggaactc
 11161 tgtgcagggtg ctgccttgag acccccagc ttccacctgt ccctctcta tgtggcagct
 11221 ggggagcagc tgagatgtgg acttgtatgc tgcccacata cgtgaggggg agctgaaagg
 11281 gagccctcc tctgagcagc ctctgccagg cctgtatgag gcttttcca ccagctcca
 11341 acagaggcct ccccagcca ggaccacctc gtccctcgtg cggggcagca ggagcggtag
 11401 aaaggggtcc gatgtttgag gaggccctta agggaagcta ctgaattata acacgtaaga
 11461 aatcaccat tccgtattgg ttgggggctc ctgtttctca tcctagcttt tcctggaaa
 11521 gcccgctaga aggtttggga acgaggggaa agttctcaga actgttggct gctccccacc
 11581 cgcctccgc ctccccgca ggttatgtca gcagctctga gacagcagta tcacaggcca
 11641 gatgttgctc ctggctagat gtttacattt gtaagaaata acactgtgaa tgtaaacag
 11701 agccattccc ttggaatgca tatogctggg ctcaacatag agtttgtctt cctcttgtt 40

【化 1 3 - 6】

11761 acgacgtgat ctaaaccagt ccttagcaag gggctcagaa cacccecgctc tggcagtagg
11821 tgtccccac ccccaaagac ctgctgtgt gctccggaga tgaatatgag ctcatagta
11881 aaaatgactt caccacgca tatacataaa gtatccatgc atgtgcatat agacacatct
11941 ataattttac acacacacct ctcaagacgg agatgcatgg cctctaagag tgcccgtgct
12001 ggttcttctt ggaagttgac tttccttaga cccgccaggt caagttagcc gcgtgacgga
12061 catccaggcg tgggacgtgg tcagggcagg gctcattcat tgcccactag gatcccactg
12121 gcgaagatgg tctccatata agctctctgc agaagggagg aagactttat catgttctta
12181 aaaatctgtg gcaagcacc atcgtattat ccaaattttg ttgcaaagt gattaatttg
12241 gttgtcaagt tttgggggtg ggctgtgggg agattgcttt tgttttctg ctggtaatat
12301 cgggaaagat tttaatgaaa ccagggtaga attgtttggc aatgactga agcgtgtttc
12361 tttcccaaaa tgtgcctccc ttccgctgcg ggcccagctg agtctatgta ggtgatgttt
12421 ccagctgcca agtgctcttt gttactgtcc accctcattt ctgccagcgc atgtgtcctt
12481 tcaaggggaa aatgtgaagc tgaaccccct ccagacacc agaatgtagc atctgagaag
12541 gccctgtgcc ctaaaggaca ccctcgccc ccatcttcat ggagggggtc atttcagagc
12601 cctcggagcc aatgaacagc tctcctctt ggagctgaga tgagccccac gtggagctcg
12661 ggacggatag tagacagcaa taactcgggtg tgtggccgc tggcaggtgg aacttctcc
12721 cgttgccggg tggagtgagg ttagttctgt gtgtctgggtg ggtggagtca ggcttctctt
12781 gctacctgtg agcatccttc ccagcagaca tctcatcgg gctttgtccc tccccgctt
12841 cctccctctg cggggaggac ccgggaccac agctgctggc cagggtagac ttggagctgt
12901 cctccagagg ggtcacgtgt aggagtgaga agaaggaaga tcttgagagc tgctgagga
12961 ccttgagag ctcaggatgg ctcagacgag gacactcgt tgcgggctt gggctcctg
13021 ggaaggagg agctgctcag aatgccgcat gacaactgaa ggcaacctgg aaggttcagg
13081 ggccgctctt ccccatgtg cctgtcacgc tctggtgcag tcaaaggaac gccttcccct
13141 cagttgtttc taagagcaga gtctcccgct gcaatctggg tggtaactgc cagccttggg
13201 ggatcgtggc caacgtggac ctgctacgg aggggtggct ctgaccaag tggggctcc
13261 ttgtccagg ctcactgctt tgcaccgtgg tcagagggac tgtcagctga gcttgagctc
13321 ccctggagcc agcaggctg tgatgggcca gtcccggagc cccaccaga cctgaatgct
13381 tctgagagca aaggaagga ctgacgagag atgtatattt aatttttaa ctgctgcaaa
13441 cattgtacat ccaaattaa ggaaaaaat ggaaaccatc aaaaaaaaa aaaaaaaa

10

20

30

【 0 3 5 5 】

【化 1 4 - 1】

配列番号 5 ヒトHTTタンパク質配列

1 matleklmka feslksfqqq qqqqqqqqqq qqqqqqqqqq pppppppppp pqlpqqppqa
61 qp11pqpqp pppppppppp avaeplhrp kkelsatkkd rvnhcltice nivaqsvrns
121 pefqkllgia melfl1csdd aesdvrnvad eclnkvikal mdsnlprlql elykeikkng
181 aprslraalw rfaelahlvr pqkcrpylvn llpcltrtsk rpeesvqetl aaavpkimas
241 fgnfandnei kvllkafian lkssstirr taagsavsic qhsrrtqyfy swllnvllgl
301 lvpvedehst llilgvlltl rylvp11qqq vkdtslkgsf gvtrkemevs psaeqlvqvy
361 eltlhhtqhq dhvvtgale llqqlfrtpp pellqtltav ggigqltaak eesggrsrsg
421 sive1iagg sscspvlrk qkgkvllgee ealeddesr sdvsssalta svkdeisgel
481 aassgvstpg saghdiiteq prsqhtlqad svdlascldt ssatdgdeed ilshsssqs

40

50

【化 1 4 - 2】

541 avpsdpamdli ndgtqasspi sdssqttteg pdsavtpsds seivldgtdn qylglqigqp
601 qdedeeatgi lpdeaseafr nssmalqqah llknmshcrq psdssvdkfv lrdeatepgd
661 qenkpcrikq digqstddds aplvhcvrll sasflltgqk nvlvpdrdvr vsvkalalsc
721 vgaavalhpe sffsklykvp ldtteypeeq yvsdilnyid hgdpgvrgat ailcgtlics
781 ilsrsrfhvg dwmgirtlt gntfsladci pllrrktlkde ssvtcklact avrncvmslc
841 sssyselglq liidvltlrn ssywlvrteletlaeidfr lvsfleakae nlhrgahhyt
901 gllklqervl nnvvihlldg edprvrhvaa aslirlvpkl fykcdqggad pvvavardqs
961 svylkllmhe tqppshfsvs titriyrgyn llpsitdvtm ennlsviaa vshelitstt
1021 raltfgceea lcllstafov ciwslgwhcg vpplsasdes rksctvqmat miltllssaw 10
1081 fpldlsahqd alilagnlla asapkslrss waseeeanpa atkqeevwa lgdralvpmv
1141 eqlfshllkv inicahvldd vapgpaikaa lpsltnppsl spirrkqkek epgegasvpl
1201 spkkgseasa asrqsdtsgp vttskssslg sfyhlpsylk lhdvdkatha nykvtdldqn
1261 stekfggflr saldvlsqil elatlqdigk cveeilgyk scfsrepmma tvcvqqlkt
1321 lfgtnlasqf dglssnpsks qgraqlgss svrpglyhyc fmapsythftq aladaslrnm
1381 vgaeqendts gwfdvlqkvs tqktnltsv tknradknai hnhirlfepl vikalkqytt
1441 ttcvqlqkqv ldllaqlvql rvnyclldsd qvfigfvkq feyievqgfr eseaiipnif
1501 fflvllsyer yhskqiigip kiiqlcdgim asgrkavtha ipalqpivhd lfvlrgrtnka
1561 dagkeletqk evvvsmlrl iqyhqvlemf ilvlqqchke nedkwkrlsr qiadiilpml
1621 akqgmhidsh ealgvntlf eilapsslrp vdmllrsmfv tpntmasvst vqlwisgila 20
1681 ilrvlisqst edivlsriqe lsfspylisc tvinrlrdgd ststleehse gkqiknlpee
1741 tfsrfillqlv gilledivtk qlkvemseqq htfcyqelgt llmclihifk sgmfrritaa
1801 atrlfrsdgc ggsfytlsl nlrarsmitt hpalvllwoc illlvnhtdy rwwaevqqtq
1861 krhslsstkl lspqmsgeee dsdlaaklgn cnreivrrga lilfcdyvcq nlhdsehlw
1921 livnhidqli slsheppvqd fisavhrnsa asglfiqaiq srcenlstpt mlkktlqcle
1981 gihlsqsgav ltlyvdrllc tpfvrarmv dilacrrvem llaanlqssm aqlpmeelnr
2041 iqeylqssgl aqrhqrlysl ldrfrlstmq dslspspvvs shpldgdghv sletvspdkd
2101 wyvhlvksqc wtrsdssalle gaelvnripa edmnafmms efnlslapc lslgmseisg
2161 gqksalfeaa revtlarvsg tvqqlpavhh vfpelpaep aaywsklndl fgdaalyqsl
2221 ptlaralaqy lvvvsklpsh lhlppeked ivkfvvatle alswhliheq ipslsdlqag 30
2281 ldccclalql pglwsvsst efvthacsli ycvhfileav avqpgqlls pertrntpk
2341 iseeeeevdp ntqnpkyita acemvaemve slqsvlalgh krnsgvpafll tpllrrniis
2401 larlplvnsy trvpllvwkl gwsppkpggdf gtafpeipve flqekevfke fiyrintlgw
2461 tsrtqfeetw atllglvtq plvmeqeesp peedtertqi nvlavqaits lvlsamtvpv
2521 agnpavscle qqprnkplka ldrfgrkls iirgiveqei qamvskreni athhlyqawd
2581 pvpslspatt galishekll lqinperelg smsyklgqvs ihsvwlgnsi tpreeeewe
2641 eeeeeadapa psspptsavn srkhragvdi hscsqfllel ysrvilpsss artrpailis
2701 evvrsllvvs dlfternqfe lmyvtlrel rvhpsedeil aqylvpatck aaavlgmdka
2761 vaepvsrlle stlrsshlp rvgalhgvlv vlecldlddt akqlipvisd yllsnlkgia
2821 hcvnihsqqh vlvmcatafy lienypldvg pefsasiiqm cgvmllgsee stpsiiyhca
2881 lrglerllls eqlsrldaes lvklsvdrvn vhsphramaa lglmltcmvt gkekvspgrt 40

【化 1 4 - 3】

2941 sdpnpaapds esvivamerv svlfdrikrq fpcearvvar ilpqfllddff ppqdimnkvi
3001 geflsnqqpy pqfmatvvyk vfqtlhstgq ssmvrwvml slsnftqrap vamatwslsc
3061 ffvsastspw vaailphvis rmgkleqvvd nlfclvatdf yrhqiieeld rrafqsvlev
3121 vaapgspyhr lltclrnvhk vttc

【 0 3 5 6 】

【化 1 5】

配列番号 109 CYP46A1 パリアント

MSPGLLLLSAVLLAFGLCCTFVHRARSRYEHIPGPPRPSFLLGH
 LPCFWKKDEVGGRVLQDVFLDWAKKYGPVVRVNVFHKTSVIVTSPESVKKFLMSTKYNK
 DSKMYRALQTVFGERLFGQLVSECNYERWHKQRRVIDLAFSRSSLVSLMETFNEKAEQ
 LVEILEAKADGQTPVSMQDMLTYTAMDILAKAAFGMETSMLLGAQKPLSQAVKLMLEGI
 TASNRTLAKFLPGKRKQLREVRESIRFLRQVGRDWVQRRREALKRGEEVPADILTQILK
 AEEGAQDDEGLLDNFVTFIAGHETSANHLAFTVMELSRQPEIVARLQAEVDEVIGSKR
 YLDFEDLGRLQYLSQVLKESLRLYPPAWGTFRLLEEETLIDGVRVPGNTPLLFSTYVMG
 RMDTYFEDPLTFNPDRFGPGAPKPRFTYFPFSLGHRSCIGQQAQMEVKVVMKLLQRL
 EFRLVPGQRFGLQEATLKPLDPVLCCLRPRGWQPAPPPPPC

10

【 0 3 5 7】

【化 1 6】

配列番号 110 CYP46A1 パリアント CDS

atgagccccgggctgctgctgctcggtagcgccgctcctgctcgccctcggcctctgctgcacctcgtgcaccgctcgcagccgct
 acgagcacatccccgggcccgcgcccagtttcttctaggacacctcccctgcttttgaaaaaggatgaggttggtggccgctgt
 gctccaagatgtgtttCtAgattgggctaagaagatggacctgtAgtgcgggtcaacgtctccacaaaacctcagtcacgtcacg
 agtctgagtcggttaagaagtctgatgtcaaccaagtacaacaaggactccaagatgtaccgtgcgctccagactgtgtttggtga
 gagactcttcggccaaggcttggtgtccgaatgcaactatgagcgctggcacaagcagcggagagtGatagacctggccttcagcc
 ggagctccttggttagcttaatgaaacattcaacgaAaaggctgagcagctggtggagattctagaagccaaggcagatgggcag
 accccTgtGAGCAtgcaggacatgctgacctacaccgccatggacatcctggccaaggcagctttgggatggagaccagtatg
 ctgctgggtgcccagaagcctctgtcccaggcagtgaaacttatgttgagggaatcactgcgctcccgaacactctggcaaagtctct
 gccaggaagaggaagcagctccgggaggtccgggagagcattcgtctcctgcgccaggtgggcagggactgggtccagcgc
 gccgggaagccctgaagagggggcgaggaggttctccgacatcctcacagattctgaaagctgaagagggagcccaggacg
 acgagggctctgctggacaactcgtcaccttctcattgctggtcacgagacctctgccaaccactggcgttcacagtgatggagctgt
 ctcgccagccagagatcgtggcaaggctgcaggccgaggtggatgaAgtGattggttctaagaggtacctggattcagggacctg
 gggagactgcagtaacctgtcccaggtcctcaagagtcgctgaggctgtaccaccagcatggggcactttAGGctgctggaag
 aggagaccttgattgatgggtGagagtccccggcaacccccgctcttctcagcacctatgtGatggggcggatggacacatact
 ttgaggaccgctgactttcaacccgatcgttcggccctggagcacccaagccacgggtcacctactccccttctcctgggccac
 cgtcctcgcagcgggcagcagtttgcagatggaggtgaaggtggtcatggcaagctgctgcagaggtggaggtccggctggtg
 cccgggcagcgttcgggctgcaggagcaggccacactcaagccactggaccccgctgctgtgcaccctgcggccccggcgtgg
 cagccccgacccccaccacccccctgc

20

30

40

(実施例 2)

【 0 3 5 8】

本発明による合成 NS 特異的プロモーターを、科学文献を検討して、NS 細胞において非常に活性である遺伝子およびそれらの個々のプロモーターを特定することにより設計した。

50

【0359】

これらのプロモーターの設計の間に、公知のNS特異的プロモーターの特定の欠点を考慮した。まず始めに、NS細胞型に特異的な公知のNS特異的プロモーター（例えば、シナプシン-1、CAMKII α およびGFAP）は、全細胞集団において発現されるわけではない（例えば、すべてのニューロン/アストロサイトにおいて発現されるわけではない）。これは、（Zhang et al., 2019）によってGFAPについて示されており、Allen brain atlasからのニューロンにおけるSyn-1の分布から見て取ることができる。第2に、公知のCRE、プロモーターエレメントおよびプロモーターの大部分は、自己相補的AAVベクター（scAAV）に含めるには大きすぎる（導入遺伝子のサイズに応じて、プロモーターのサイズは、1000bp未満、好ましくは、900bp未満、より好ましくは、800bp未満、最も好ましくは、700bp未満であることが必要であり得る）。加えて、発現は、NS全体にわたって、好適には、CNS全体または脳全体にわたって、特異的な細胞型または細胞型の組合せにおいて必要であり得る。

10

【0360】

現在公知のプロモーターは、これらの欠点に対処することができず、標的化された局在化発現を有し、かつNS全体にわたる発現も有する、短い細胞型NS特異的プロモーターを開発する必要性が遺伝子治療において存在する。例えば、NS全体（例えば、脳全体）にわたる発現のための要件は、図6Aおよび図6Bに示される成体マウスの脳におけるHTT（ハンチンチン）遺伝子およびCYP46A1遺伝子の発現パターンによって明らかにされる。HTT（ハンチンチン）遺伝子は、脳全体にわたって発現されるので、これは、任意の潜在的な発現産物が、欠陥のあるハンチンチン遺伝子を抑制する、および/または脳全体にわたって発現される欠陥のあるハンチンチンの有害な効果を弱めるもしくは軽減するのに有益であり得る。同様に、CYP46A1遺伝子は、脳全体にわたって発現されるので、これは、脳全体にわたる任意の潜在的な相補的CYP46A1発現に有益であり得る。

20

【0361】

CNSにわたるすべてのニューロンならびにアストロサイトおよび/または乏突起膠細胞における遺伝子発現は、ハンチントン病などの一部の疾患の処置において望ましくあり得る。アストロサイトおよび乏突起膠細胞における発現は、グリア細胞がハンチントン病に関わるので（Shin et al., 2005）、有益であり得る。

30

【0362】

したがって、本発明は、上記にリストされる欠点の一部に対処しながら、複数のNS細胞型において活性であるタンデムNSプロモーターを設計することを示す。例えば、プロモーター設計は、複数のNS細胞型において活性なプロモーターを作出するため、および公知のプロモーターが全細胞集団において発現されないという難点にも対処するために、個々のCRE/プロモーターエレメントと比較して、細胞向性を広げるために、プロモーターエレメントと一緒に1つまたは複数のCREの組合せを含んでいた。加えて、自己相補的AAVベクター（scAAV）などのAAVベクターに含めるには大きすぎる公知のCRE、プロモーターエレメント、およびプロモーターの難点に対処するために、本発明のCREおよびプロモーターエレメントの一部を、バイオインフォマティクス分析、文献検索、および公表されているゲノムデータベースを使用して短縮化した。これらは、活性なCREおよびプロモーターエレメントであると依然として予想される。

40

【0363】

本発明による合成NS特異的プロモーターを、CYP46A1導入遺伝子およびヒトインフルエンザ赤血球凝集素（HA）タグをコードする核酸配列に作動可能に連結し、野生型C57BL/6/Jマウスにおいて実験的に試験する。CYP46A1導入遺伝子およびHAタグをコードする核酸配列に作動可能に連結された本発明による合成NS特異的プロモーターを、ウイルスベクター中で静脈内投与する。ベクターコピー数を、内部ゲノムDNAコピー数対照に対して正規化されたウイルス導入遺伝子CYP46A1のqPCR分

50

析によって、脳および脊髄組織切片において評価して、同等の注射用量を確認する。ウエスタンブロットを行って、脳および脊髄組織におけるH Aタグ付き導入遺伝子のタンパク質発現を評価する。最後に、免疫蛍光染色を、脳および脊髄組織切片に対して行って、CNS細胞型内の導入遺伝子の発現を評価する。同様に、免疫蛍光染色を、PNS組織切片に対して行って、PNS細胞型内の導入遺伝子の発現を評価することができる。具体的には、二重染色を、CYP46A1遺伝子発現をマークするH Aタグ、ならびにニューロン、アストロサイト、乏突起膠細胞およびミクログリアに対する標準マーカーを使用して行う。

【0364】

SP0013 (配列番号74) は、ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0014 (配列番号75) は、ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0026 (配列番号76) は、興奮性ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0027 (配列番号77) は、興奮性ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0030 (配列番号78) は、ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0031 (配列番号79) は、ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0032 (配列番号80) は、ニューロン、アストロサイトおよび乏突起膠細胞において活性であると予測される。SP0033 (配列番号81) は、ニューロン、アストロサイトおよび乏突起膠細胞において活性であると予測される。SP0019 (配列番号82) は、ニューロン、アストロサイトおよび乏突起膠細胞において活性であると予測される。SP0020 (配列番号83) は、ニューロン、アストロサイトおよび乏突起膠細胞において活性であると予測される。SP0021 (配列番号84) は、ニューロン、アストロサイトおよび乏突起膠細胞において活性であると予測される。SP0022 (配列番号85) は、ニューロン、アストロサイトおよび乏突起膠細胞において活性であると予測される。SP0028 (配列番号86) は、興奮性ニューロン、アストロサイトおよび乏突起膠細胞において活性であると予測される。SP0029 (配列番号87) は、興奮性ニューロン、アストロサイトおよび乏突起膠細胞において活性であると予測される。SP0011 (配列番号88) は、ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0034 (配列番号89) は、ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0035 (配列番号90) は、ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。SP0036 (配列番号154) は、ニューロンおよびアストロサイトにおいて活性であると予測される。

【0365】

RNAシーケンシングデータのバイオインフォマティクス分析は、本発明のCREおよび/またはプロモーターエレメントに関連する遺伝子(aqp4、cend1、eno2、gfap、s100B、syn1)の一部が、後根神経節および脛骨神経において発現されると予測する。したがって、これらの遺伝子に関連するCREおよび/またはプロモーターエレメントは、PNSの細胞において発現されると予測される。CRE0001__S100B (配列番号106)、CRE0002__S100B (配列番号108)、CRE0005__GFAP (配列番号103)、CRE0007__GFAP (配列番号104)、CRE0009__S100B (配列番号107)、CRE0006__GFAP (配列番号99)、CRE0008__GFAP (配列番号100)、CRE0006__AQP4 (配列番号101)、CRE0008__AQP4 (配列番号102)、またはそれらの機能的バリエーションは、PNSの細胞において活性であると予測される。

【0366】

単一細胞RNAシーケンシングデータのバイオインフォマティクス分析は、本発明のCREおよび/またはプロモーターエレメントに関連する遺伝子(aqp4、cend1、eno2、gfap、s100B、syn1)の一部が、感覚ニューロン、PNS交感神経ニューロンおよびPNS腸ニューロンにおいて発現されると予測する。したがって、これらの遺伝子に関連するCREおよび/またはプロモーターエレメントは、感覚ニュー

10

20

30

40

50

ロン、PNS交感神経ニューロンおよびPNS腸ニューロンにおいて発現されると予測される。CRE0001__S100B(配列番号106)、CRE0002__S100B(配列番号108)、CRE0005__GFAP(配列番号103)、CRE0007__GFAP(配列番号104)、CRE0009__S100B(配列番号107)、CRE0006__GFAP(配列番号99)、CRE0008__GFAP(配列番号100)、CRE0006__AQP4(配列番号101)、CRE0008__AQP4(配列番号102)、またはそれらの機能的パリアントは、感覚ニューロン、PNS交感神経ニューロンおよび/またはPNS腸ニューロンにおいて活性であると予測される。

(実施例3)

【0367】

10

CYP46A1遺伝子を安定に組み込むように工学的に操作されたPro10/HEK293細胞からウイルスベクターを製造する方法が本明細書に記載される。

【0368】

米国特許第9,441,206号に記載される安定細胞系Pro10/HEK293は、AAVベクターのスケラブルな生成に理想的である。この細胞系を、本明細書に記載される、例えば、表10~15に記載される任意のNS特異的プロモーターに作動可能に連結されたCYP46A1遺伝子、またはそのパリアントを含む発現ベクターと接触させることができる。それらのゲノムに組み込まれたCYP46A1を有するクローン集団を、当技術分野において周知の方法を使用して選択する。CYP46A1遺伝子を安定に包含するPro10/HEK293細胞に、Rep2および血清型特異的Cap2:AAV-Rep/Capをコードするパッケージングプラスミド、ならびにAdヘルパープラスミド(XX680:アデノウイルスヘルパー配列をコードする)をトランスフェクトする。

20

【0369】

トランスフェクション。トランスフェクションの日に、細胞を、ViCell XR Viability Analyzer(Beckman Coulter)を使用してカウントし、トランスフェクションのために希釈する。トランスフェクションカクテルを混合するために、以下の試薬を、この順序でコニカル管に添加する:プラスミドDNA、OPTIMEM(登録商標)I(Gibco)もしくはOptiPro SFM(Gibco)、または他の無血清適合トランスフェクション培地、および次いで、プラスミドDNAに対する特定の比でトランスフェクション試薬。カクテルを、逆さにして混合した後、室温でインキュベートする。トランスフェクションカクテルを、フラスコにピペティングし、シェーカー/インキュベーターに戻す。すべての最適化研究を、30mL培養体積で行い、それに続いてより大きな培養体積でバリデーションを行う。細胞を、トランスフェクション48時間後に回収する。

30

【0370】

Waveバイオリアクターシステムを使用するrAAVの生成。waveバッグに、トランスフェクションの2日前に播種する。waveバッグへの播種の2日後、細胞培養物のカウントを取得し、次いで、細胞培養物を、トランスフェクション前に増殖/希釈する。次いで、waveバイオリアクターの細胞培養物に、トランスフェクトする。細胞培養物を、トランスフェクションの少なくとも48時間後に、waveバイオリアクターバッグから回収する。

40

【0371】

力価。AAV力価を、標準曲線(AAV ITR特異的)に対するqPCRおよびCYP46A1遺伝子に対して特異的なプライマーを使用して、DNase消化後に算出した。シェーカーフラスコおよび60のWaveバイオリアクターバッグからの浮遊細胞の回収。トランスフェクションの48時間後に、細胞培養物を、シェーカーフラスコからの注入、またはwaveバイオリアクターバッグからのポンピングのいずれかによって、500mLのポリプロピレンコニカル管(Corning)に収集する。次いで、細胞培養物を、Survall RC3C plus centrifugeおよびH6000A口

50

ーターを使用して、655 × gで10分間遠心分離する。上清を廃棄し、細胞を、1 × P B Sに再懸濁させ、50 mLのコニカル管に移し、655 × gで10分間遠心分離する。この時に、ペレットを、N L T - 60 で保管することができ、または精製を継続する。

【0372】

q P C Rを使用する細胞溶解物からのr A A Vの滴定。10 mLの細胞培養物を取り出し、S o r v a l l R C 3 C p l u s c e n t r i f u g eおよびH 6 0 0 0 A ローターを使用して、655 × gで10分間遠心分離する。上清を、細胞ペレットからデカンテーションする。次いで、細胞ペレットを、5 mLのD N a s e 緩衝液(5 mMのC a C l 2、5 mMのM g C l 2、50 mMのT r i s - H C l p H 8 . 0)に再懸濁させ、それに続いて超音波処理して、細胞を効率的に溶解させる。次いで、300 μ Lを取り出し、1.5 mLのマイクロフュージ管に入れる。次いで、140単位のD N a s e Iをそれぞれの試料に添加し、37 で1時間インキュベートする。D N a s e 消化の有効性を決定するために、4 ~ 5 mgのC Y P 4 6 A 1 プラスミドを、D N a s e の添加ありおよびなしで、非トランスフェクト細胞溶解物に加える。50 μ LのE D T A / サルコシル溶液(6.3%のサルコシル、62.5 mMのE D T A p H 8 . 0)をそれぞれの管に添加し、70 で20分間インキュベートする。次いで、50 μ LのプロテイナーゼK(10 mg / mL)を添加し、55 で少なくとも2時間インキュベートする。試料を、15分間沸騰させて、プロテイナーゼKを不活性化する。アリコートそれぞれの試料から取り出して、q P C Rによって分析する。どのぐらいの量のr A A Vベクターが細胞あたり生じるかを効率的に決定するために、2つのq P C R反応を行う。1つのq P C R反応は、プラスミドX X 6 8 0、p X R 2およびC Y P 4 6 A 1の骨格において相同配列に結合するように設計されたプライマーのセットを使用して構成する。第2のq P C R反応は、C Y P 4 6 A 1 遺伝子内の領域に結合および増幅するプライマーのセットを使用して構成する。q P C Rは、R o c h e 製のS y b r 緑色試薬およびL i g h t c y c l e r 4 8 0を使用して実施する。試料を、95 で10分間変性させ、それに続いて45サイクル(90 で10秒間、62 で10秒間、および72 で10秒間)および融解曲線(1サイクルが99 30秒間、65 で1分間の連続)を行う。

【0373】

粗溶解物からのr A A Vの精製。それぞれの細胞ペレットを、10 mLの最終体積に調整する。ペレットを、短くボルテックスし、1秒オン、1秒オフのバーストで、30%の収率で4分間超音波処理する。超音波処理後、550 UのD N a s eを添加し、37 で45分間インキュベートする。次いで、ペレットを、S o r v a l l R C S B c e n t r i f u g eおよびH S - 4 ローターを使用して、9400 × gで遠心分離して、細胞デブリをペレット化し、澄明化した溶解物を、T y p e 7 0 T i 遠心分離管(B e c k m a n 3 6 1 6 2 5)に移す。r A A Vの単離のために浮遊H E K 2 9 3細胞を回収および溶解することに関して、当業者は、マイクロフルイダイゼーションなどの機械的方法またはデタージェントなどの化学的方法などを使用し、それに続いて深層濾過またはタンジェンシャルフロー濾過(T F F)を使用する澄明化ステップを行うことができる。

【0374】

A A Vベクター精製。澄明化したA A V溶解物を、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる以下の原稿(Allay et al., Davidoff et al., Kaludov et al., Zolotukhin et al., Zolotukin et al.など)において当業者が認識し、それに記載されているようにして、カラムクロマトグラフィーによって精製する。

(実施例4)

【0375】

本発明によるN S特異的プロモーターの選択を、神経芽細胞腫由来S H - S Y 5 Y細胞において試験した。

材料および方法

【0376】

細胞維持およびトランスフェクション。S H - S Y 5 Y細胞を、1 mMのL - グルタミ

ン (G i b c o 1 1 7 6 5 - 0 5 4)、1 5 % の熱失活 F B S (T h e r m o F i s h e r 1 0 5 0 0 0 6 4)、1 % の非必須アミノ酸 (M e r c k M 1 7 4 5 - 1 0 0 M L)、および 1 % のペニシリン/ストレプトマイシン (T h e r m o F i s h e r 1 5 1 4 0 1 2 2) を有する H A M F 1 2 培地中で培養した。細胞を、1 : 3 ~ 1 : 4 の間で週に 2 回継代して、7 0 ~ 8 0 % の間の健康な細胞密度を維持した。細胞を、継代数を 2 0 より下に保った。トランスフェクションのために、細胞を、 10^5 個細胞/ウェルで、接着性 4 8 ウェルプレートに播種した。播種の 2 4 時間後、3 0 0 n g のプラスミドを、L i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0 試薬 (T h e r m o F i s h e r L 3 0 0 0 0 0 8) を使用して、細胞にトランスフェクトした。

【 0 3 7 7 】

S H S Y 5 Y 細胞系にトランスフェクトされたプラスミドは、G F P に作動可能に連結された S P 0 0 1 3、S P 0 0 1 4、S P 0 0 3 0、S P 0 0 3 1、S P 0 0 3 2、S P 0 0 1 9、S P 0 0 2 0、S P 0 0 2 1、S P 0 0 3 3、S P 0 0 1 1、S P 0 0 3 4、S P 0 0 3 5 または S P 0 0 3 6 を含む。

【 0 3 7 8 】

フローサイトメトリー。トランスフェクションの 4 8 時間後、S H - S Y 5 Y 細胞を、0 . 0 5 % のトリプシンによる解離の前に、P B S で洗浄した。細胞を収集し、9 0 % の P B S、1 0 % の F B S 溶液に再懸濁した。細胞の G F P 発現を、A t t u n e N x t A c o u s t i c F o c u s i n g C y t o m e t e r を使用して、フローサイトメトリーによって評価した。細胞生存率色素 7 - A A D (T h e r m o F i s h e r 0 0 - 6 9 9 3 - 5 0) を対照細胞集団と混合して、死細胞を特定し、排除した。G F P の発現を、帯域通過フィルター 5 1 0 / 1 0 n m で、青色 4 8 8 n m レーザーを使用して、生きている単一細胞集団において測定した。未トランスフェクト細胞を使用して、G F P 陰性細胞および G F P 陽性細胞についてのゲートを設定した。G F P 陽性単一細胞の数、およびすべての G F P 陽性細胞の G F P 蛍光中央値を、A t t u n e N x t ソフトウェアによって算出した。

結果

【 0 3 7 9 】

この実験の結果を図 7 A および 7 B に示す。G F P に作動可能に連結された S P 0 0 1 3、S P 0 0 1 4、S P 0 0 3 0、S P 0 0 3 1、S P 0 0 3 2、S P 0 0 1 9、S P 0 0 2 0、S P 0 0 2 1、S P 0 0 2 2、S P 0 0 1 1、S P 0 0 3 4、S P 0 0 3 5 または S P 0 0 3 6 を含む発現カセットをトランスフェクトされた神経芽細胞腫由来 S H - S Y 5 Y 細胞を、フローサイトメトリーによって、G F P 発現中央値および G F P 陽性細胞のパーセンテージについて評価した。G F P に作動可能に連結された公知プロモーターのシナプシン - 1 および C A G を含む発現カセットを、対照として使用した。すべての試験したプロモーターは、ニューロン特異的対照プロモーターのシナプシン - 1 に対して、同等のトランスフェクション効率および G F P 発現中央値を有する (図 7 A および 7 B を参照されたい)。対照プロモーター C A G は、対照プロモーターのシナプシン - 1 および試験した合成 N S 特異的プロモーター (図 7 A) と比較して、2 ~ 3 倍高いトランスフェクション効率 (図 7 B) およびおよそ 2 . 5 倍高い G F P 発現中央値を示した。

【 0 3 8 0 】

合成 N S 特異的プロモーター S P 0 0 2 8 (配列番号 8 6) は、同一のエLEMENTを両方含む合成 N S 特異的プロモーター S P 0 0 1 9 (配列番号 8 2) と類似の設計である。そのため、S P 0 0 2 8 (配列番号 8 6) は、S P 0 0 1 9 (配列番号 8 2) と同様に遂行すると予想され得る。

【 0 3 8 1 】

合成 N S 特異的プロモーター S P 0 0 2 9 (配列番号 8 7) は、同一のエLEMENTを両方含む合成 N S 特異的プロモーター S P 0 0 2 1 (配列番号 8 4) と類似の設計である。そのため、S P 0 0 2 9 (配列番号 8 7) は、S P 0 0 2 1 (配列番号 8 4) と同様に遂行すると予想され得る。

10

20

30

40

50

【 0 3 8 2 】

合成 NS 特異的プロモーター S P 0 0 2 6 (配列番号 7 6) は、同一のエレメントを両方含む合成 NS 特異的プロモーター S P 0 0 1 3 (配列番号 7 4) と類似の設計である。そのため、S P 0 0 2 6 (配列番号 7 6) は、S P 0 0 1 3 (配列番号 7 4) と同様に遂行すると予想され得る。

【 0 3 8 3 】

合成 NS 特異的プロモーター S P 0 0 2 7 (配列番号 7 7) は、同一のエレメントを両方含む合成 NS 特異的プロモーター S P 0 0 1 4 (配列番号 7 5) と類似の設計である。そのため、S P 0 0 2 7 (配列番号 7 7) は、S P 0 0 1 4 (配列番号 7 5) と同様に遂行すると予想され得る。

【 0 3 8 4 】

合成 NS 特異的プロモーター S P 0 0 3 3 (配列番号 8 1) は、同一のおよび類似のエレメントを両方含む S P 0 0 2 1 (配列番号 8 4) と類似の設計である。したがって、S P 0 0 3 3 (配列番号 8 1) は、S P 0 0 2 1 (配列番号 8 4) のより短いバージョンであり、そのため、同様に遂行すると予想され得る。

(実施例 5)

【 0 3 8 5 】

C Y P 4 6 A 1 または G F P およびベクターの共有結合的マンノシル化を含む改変されたベクターを、親の改変されていない r A A V と比較する。r A A V による C Y P 4 6 A 1 の送達は、形質導入されたニューロンからの C Y P 4 6 A 1 の豊富な分泌を駆動し、これは、免疫組織化学的検査によって視覚的に検出することができ、組織抽出物の E L I S A によって定量化することができる。例えば、米国特許出願第 1 3 / 1 4 6 , 6 4 0 号に記載される変換 - 増強送達またはサルにおけるカテテル送達による改変された A A V - C Y P 4 6 A 1 の視床への注入後、C Y P 4 6 A 1 免疫陽性染色の程度を、注入部位と同側の前頭皮質において評価する。改変されたベクターで送達された C Y P 4 6 A 1 の発現は、改変されていないベクターと比較して有意に増強され、前頭前野連合野 (皮質領域 9 および 1 0) から、前頭葉眼球運動野 (領域 8) 、運動前野 (領域 6) 、一次体性感覚皮質野 (領域 3 、 1 、 および 2) から一次運動野 (領域 4) まで有意に広がり、帯状皮質 (領域 2 3 、 2 4 、 3 2) およびブローカ野 (領域 4 4 、 4 5) における発現を含む。個々のニューロン細胞体および細胞プロセスの非常に強い染色に加えて、C Y P 4 6 A 1 染色は、同じ用量の改変されていないベクターと比較して、前頭皮質の複数の層にわたって、表層 I I I および I V において最も高い強度勾配で観察される。

【 0 3 8 6 】

親と比較した G F P を含む改変されたベクターの送達は、米国特許出願第 1 3 / 1 4 6 , 6 4 0 号に記載されるサルモデルにおいても試験する。A N 視床前核 ; M D 背内側核 ; V A 前腹側核 ; V L 外側腹側核 ; V P 後腹側核における改変されたベクターの相対量は、改変されていないベクターのものよりも有意に高い。加えて、改変されたベクターは、改変されていないベクターと比較して、皮質全体にわたって、広くおよびより効率的に分布する。陽性細胞のパーセントは、親ベクターと比較して、それぞれの領域および区域において有意に高い。表層 1 ~ 6 のより効率的な形質導入も予想される。大脳皮質または皮質領域 1 ~ 4 、 6 および 8 ~ 1 0 のすべての複数の葉への送達を達成することができる。

10

20

30

40

50

【表 A】

区域	領域
前頭前野	9/10/46
ブローカ野	44/45
前頭葉眼球運動野	8
二次運動野	6
前帯状皮質	24/32
体性感覚皮質	1.2/03
一次運動野	4
後帯状皮質	23/31

10

【0387】

外科的送達。サイトメガロウイルスプロモーターの制御下の改変されたまたは改変されていない rAAV ベクター GFP を、対流増強送達 (CED) プロトコールによって、6 頭の成体アカゲザルの右視床に注入した。すべての実験は、国立衛生研究所のガイドライン、および University of California San Francisco の Institutional Animal Care and Use Committee によって承認されたプロトコールに従って行われる。

20

【0388】

CYP46A1 (1:500、AF-212-NA、R&D Systems) および GFP (1:500、AB3080、Chemicon) に対する抗体による免疫染色を、前頭皮質全体を覆い、視床のレベルまで後部の方向に広がっている Zamboni 固定 40 μm 冠状断面において行う。CYP46A1 および GFP 免疫陽性ニューロンの局在化を、定位座標におけるアカゲザルの脳に関して分析して、皮質および視床における免疫染色の特異的領域を特定する。

30

【0389】

CYP46A1 タンパク質 ELISA。新鮮凍結組織の 3 mm の冠状ブロック由来の組織パンチを、いくつかの皮質、視床から採取する。方法および材料、ならびに改変されたベクターを注入されたサル の 線条体区域。発現した外科的送達を、市販の ELISA キット (Emax ELISA、Promega、Wis.) のヒト CYP46A1 cDNA または GFP cDNA を用いる ELISA アッセイによって定量化する。

(実施例 6)

【0390】

次に、カプシドの改変を変化させることで再投与を可能にするかを決定するために、実施例 5 の CYP46A1 を含む改変されたベクターを、実施例 5 の同じカプシドからなり、そのカプシドの同じペイロード (すなわち、CYP46A1) を含むが、異なる化学的改変を有するように再設計する。成体アカゲザルに、実施例 2 の CYP46A1 を含む第 1 の改変されたベクターを投与し、投与の 14 日後、第 2 の用量の同じベクター、または再設計された改変されたカプシドのいずれかを投与する。CYP46A1 発現を、実施例 5 において上記に記載される ELISA アッセイを使用して評価する。同じベクターの再投与が、第 1 の投与後のベクターに対して生じた中和抗体に起因する可能性がある、有意に低減された発現を有することを見出した。顕著なことに、再設計されたベクターの発現は、高くおよび広く、カプシドの改変における変更が、再設計されたベクターの発現を可能にしたことを示した。

40

50

【 図面 】
【 図 1 】

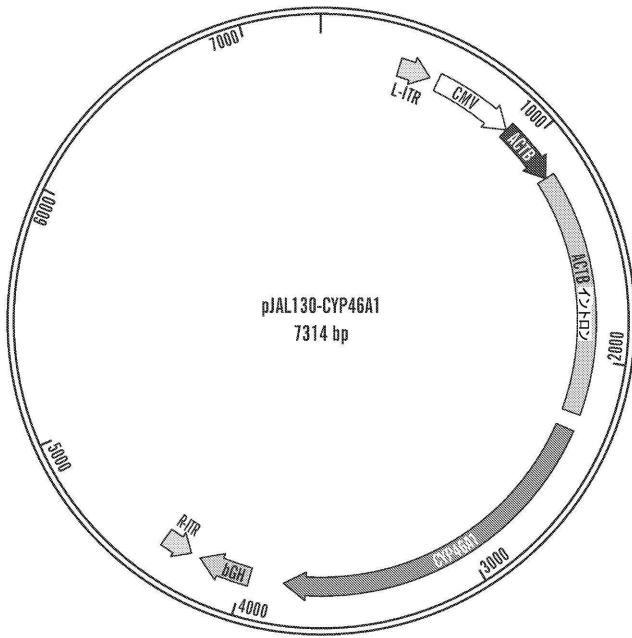


FIG. 1

【 図 2 】

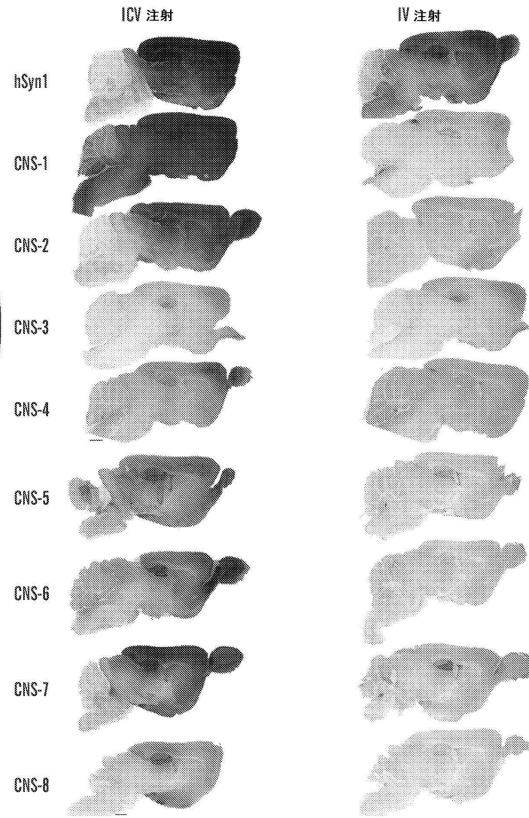


FIG. 2

10

20

30

40

50

【 図 3 A 】

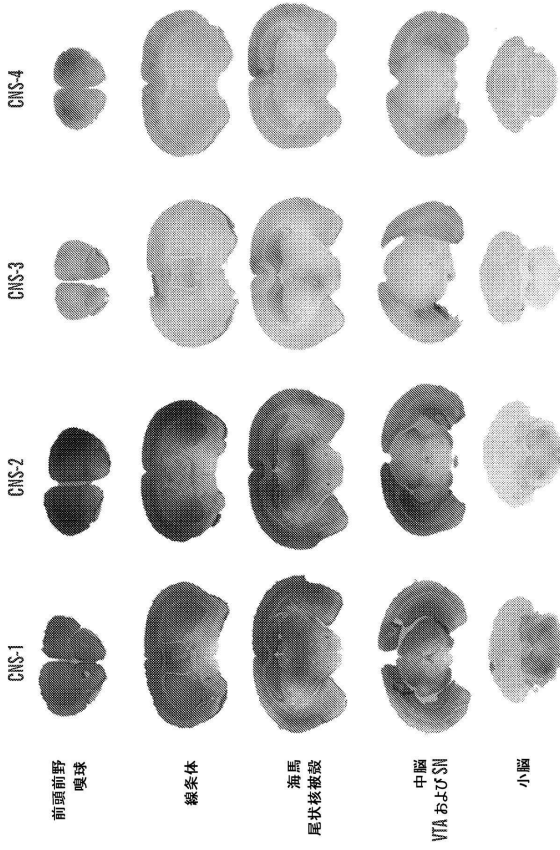


FIG. 3A

【 図 3 B 】

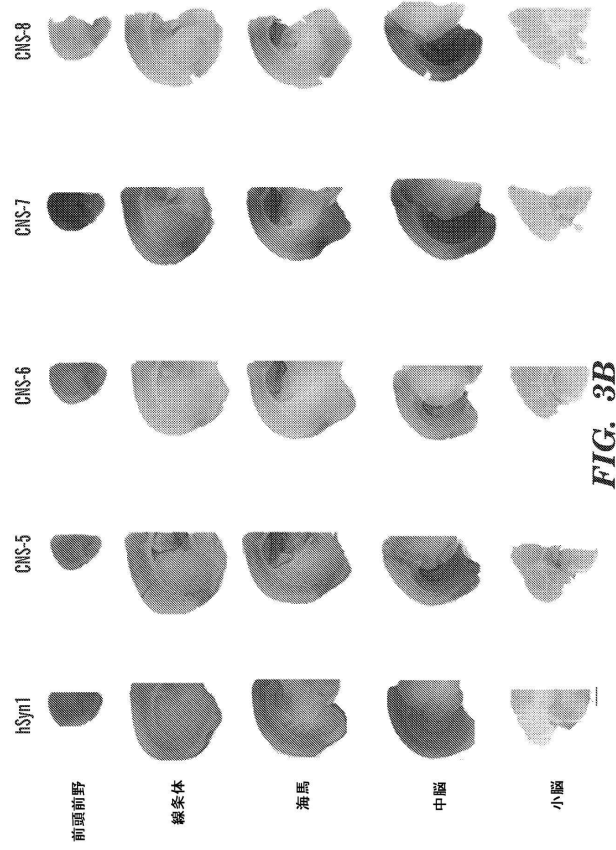


FIG. 3B

【 図 4 - 1 】

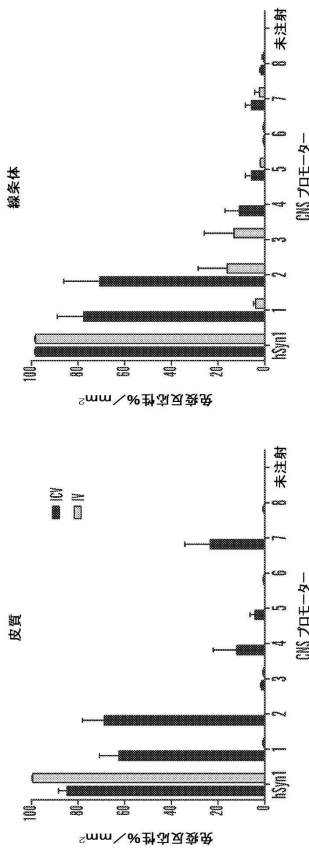


FIG. 4

【 図 4 - 2 】

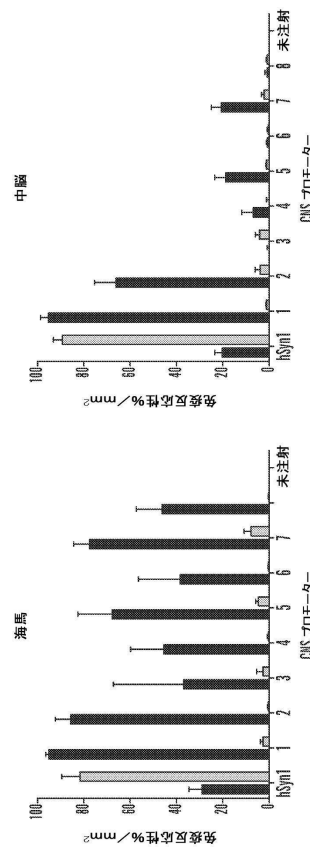


FIG. 4 (続き)

【 図 4 - 3 】

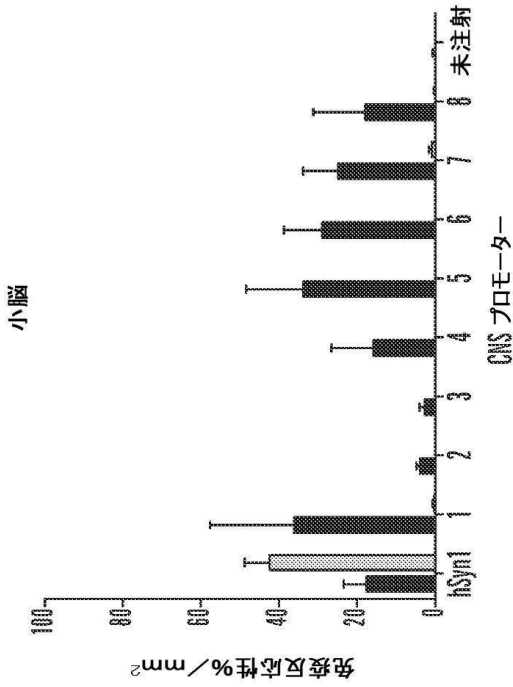


FIG. 4 (続き)

【 図 5 A 】

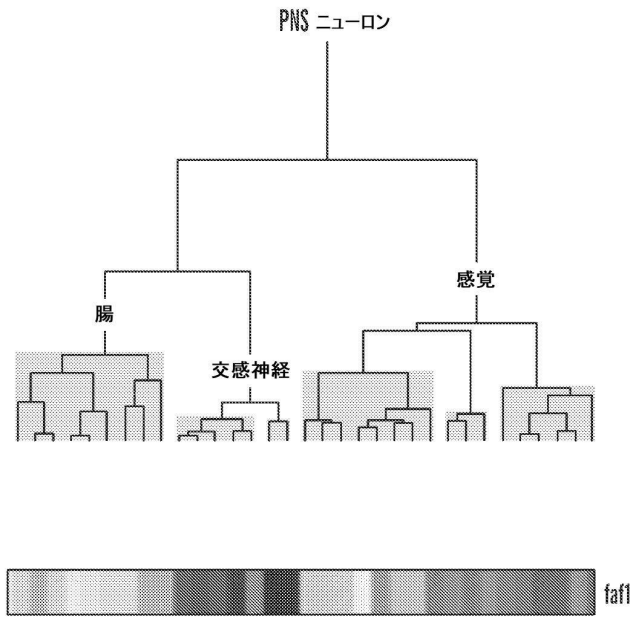


FIG. 5A

10

20

【 図 5 B 】

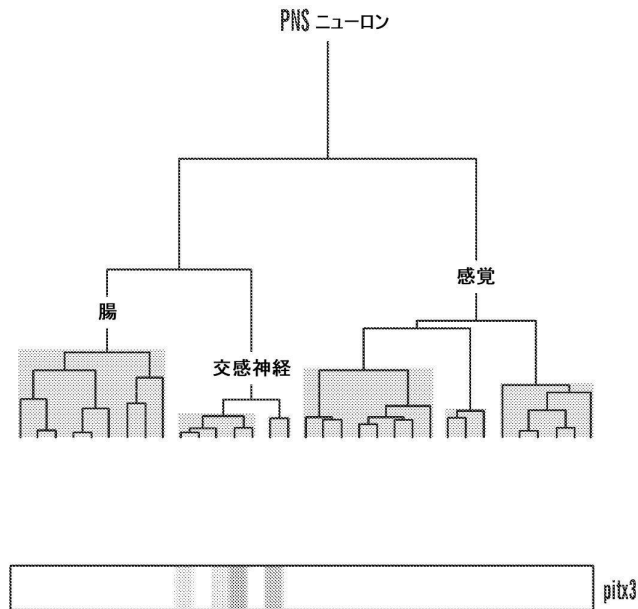


FIG. 5B

【 図 6 A 】

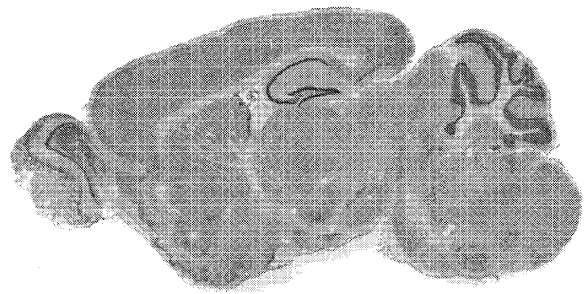


FIG. 6A

30

40

50

【 図 6 B 】

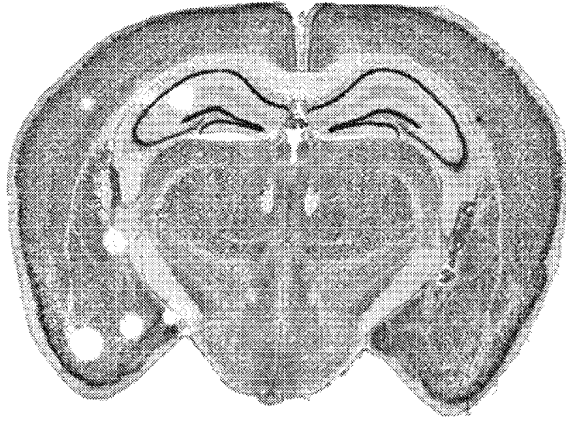


FIG. 6B

【 図 7 A 】

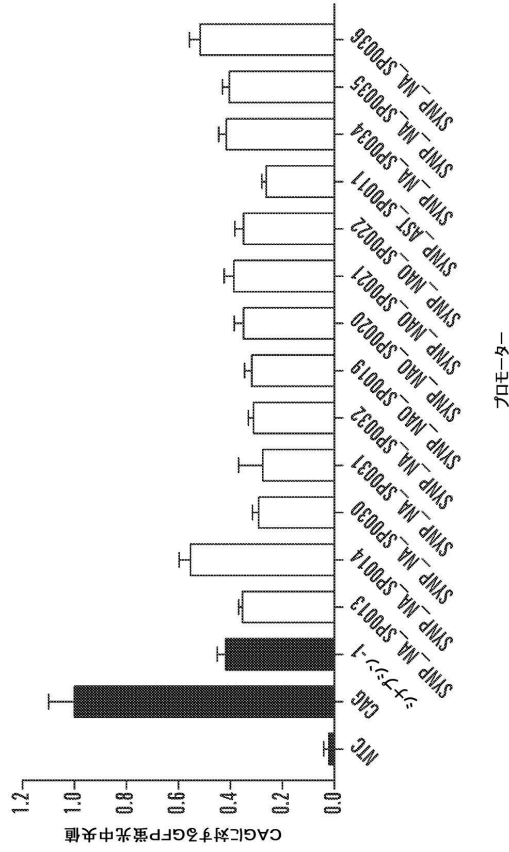


FIG. 7A

10

20

【 図 7 B 】

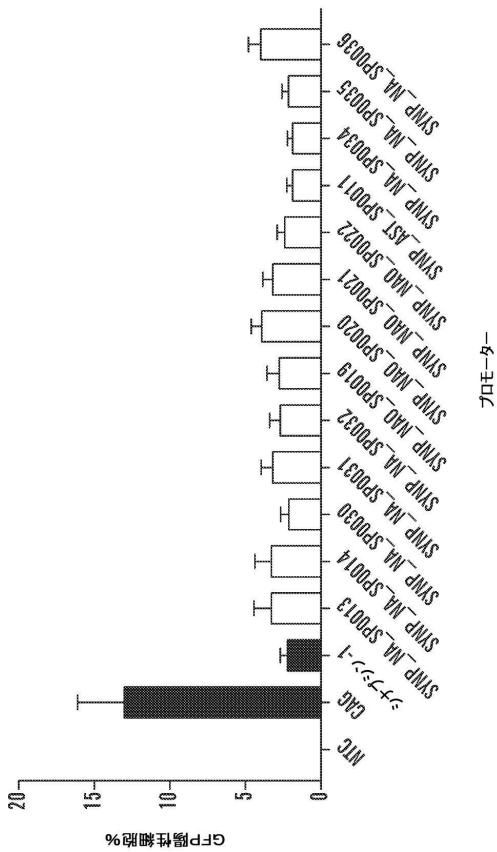


FIG. 7B

30

40

50

【配列表】

2023542211000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/71534

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 48/00; A61P 25/00; C07K 14/47 (2021.01)
CPC - A61K 48/005; A61P 25/00; C07K 14/47; A61K 48/0058; C12N 2830/008; C12N 2750/14143; A61K 48/0075; A61K 48/00; C12N 15/86; A61K 38/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2011/0034540 A1 (AUBOURG ET AL.) 10 February 2011; claims 1, 3; paragraphs 0006, 0010, 0011, 0012, 0027, 0028	82-85 — 1-3, 41-46
Y	US 2017/0166926 A1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 15 June 2017; paragraphs 0147, 0177, 0179, 0180, 0193, 0197	1-3, 41-46
Y	ANGELUCCI. "MicroRNAs in Alzheimer's Disease: Diagnostic Markers or Therapeutic Agents?" . Front. Pharmacol. Vol. 10, Article 665. Web. 18 June 2019; abstract; DOI: 10.3389/fphar.2019.00665	1-2, 41-42

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"D" document cited by the applicant in the international application	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

40

Date of the actual completion of the international search 02 February 2022 (02.02.2022)	Date of mailing of the international search report MAR 09 2022
--	--

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300
---	--

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/71534

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/71534

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 4-40, 47-81, 86-113
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I*, Claims 1-3, 41-46, 82-85 and Alzheimer's disease (neurological disease or disorder), SEQ ID NO: 110 (nucleic acid sequence)

20

30

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/71534

-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-3, 41-46, 82-85 and Alzheimer's disease (neurological disease or disorder), SEQ ID NO: 110 (nucleic acid sequence) are directed towards methods and compositions or combinations comprising CYP46A1 proteins.

10

The methods and compositions or combinations of Claims 1-2, 3 (in-part), 41-43, 44-46 (each in-part), 82-85 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass Alzheimer's disease (neurological disease or disorder), SEQ ID NO: 110 (nucleic acid sequence).

Applicant is invited to elect additional neurological disease(s) or disorder(s) and nucleic acid sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO.; such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional neurological disease(s) or disorder(s) and nucleic acid sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected neurological disease(s) or disorder(s) and nucleic acid sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. Exemplary elections would be Parkinson's disease (neurological disease or disorder) or SEQ ID NO: 111 (nucleic acid sequence).

No technical features are shared between the nucleic acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a method for treating a neurological disease or disorder in a subject in need thereof, the method comprising administering to a subject having or at risk of developing the neurological disease or disorder a therapeutically effective amount of a) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid comprising i) a first region comprising a first adeno-associated virus "AAV" inverted terminal repeat "ITR", or a variant thereof, and ii) a second region comprising a transgene encoding one or more miRNAs; and b) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid encoding the CYP46A1 protein; a composition or combination comprising: a) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid comprising i) a first region comprising a first adeno-associated virus "AAV" inverted terminal repeat "ITR", or a variant thereof, and ii) a second region comprising a transgene encoding one or more miRNAs; and b) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid encoding the CYP46A1 protein; a composition comprising a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid encoding a CYP46A1 protein, the nucleic acid comprising a sequence; a method for treating a neurological disease or disorder in a subject in need thereof, the method comprising administering to a subject having or at risk of developing the neurological disease or disorder a therapeutically effective amount of the composition; these shared technical features are previously disclosed by US 2011/0034540 A1 (Aubourg et al.) (hereinafter 'Aubourg') in view of WO 2014/039138 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) (hereinafter 'Dartmouth') as evidenced by the publication entitled 'ACAT1/SOAT1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease' by Shibuya et al. (hereinafter 'Shibuya').

20

Aubourg discloses a method for treating a neurological disease or disorder in a subject in need thereof (a method for treating Alzheimer's disease in a subject; paragraphs [0006], [0027]), the method comprising administering to a subject having or at risk of developing the neurological disease or disorder a therapeutically effective amount of (administering to a subject a therapeutically effective amount of a viral vector; paragraph [0027]) a) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid (a recombinant viral vector comprising a nucleic acid; paragraphs [0006], [0015]-[0016], [0027]) comprising i) a first region comprising a first adeno-associated virus "AAV" inverted terminal repeat "ITR", or a variant thereof (an AAV with flanking ITRs; paragraph [0018]); and b) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid (a recombinant viral vector comprising a nucleic acid; paragraphs [0006], [0015]-[0016], [0027]) encoding the CYP46A1 protein (encoding a CYP46A1 protein; paragraphs [0006], [0010], [0027]); a composition or combination (a composition; paragraph [0028]) comprising: a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid (a recombinant viral vector comprising a nucleic acid; paragraphs [0006], [0015]-[0016], [0027]) comprising i) a first region comprising a first adeno-associated virus "AAV" inverted terminal repeat "ITR", or a variant thereof (an AAV with flanking ITRs; paragraph [0018]); and b) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid (a recombinant viral vector comprising a nucleic acid; paragraphs [0006], [0015]-[0016], [0027]) encoding the CYP46A1 protein (encoding a CYP46A1 protein; paragraphs [0006], [0010], [0027]); a composition comprising a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid (a recombinant viral vector comprising a nucleic acid; paragraphs [0006], [0015]-[0016], [0027]) encoding a CYP46A1 protein (encoding a CYP46A1 protein; paragraphs [0006], [0010], [0027]), the nucleic acid comprising a sequence (the nucleic acid comprising a sequence; paragraph [0010]); a method for treating a neurological disease or disorder in a subject in need thereof (a method for treating Alzheimer's disease in a subject; paragraphs [0006], [0027]), the method comprising administering to a subject having or at risk of developing the neurological disease or disorder a therapeutically effective amount of the composition (administering to a subject a therapeutically effective amount of the viral vector composition; paragraphs [0027]-[0028]).

30

Aubourg does not disclose a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid comprising ii) a second region comprising a transgene encoding one or more miRNAs; a composition or combination comprising: a) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid comprising ii) a second region comprising a transgene encoding one or more miRNAs.

Dartmouth discloses a method for treating a neurological disease or disorder in a subject in need thereof (a method for treating Alzheimer's disease in a subject in need thereof; paragraph [0007]), the method comprising administering to a subject having or at risk of developing the neurological disease or disorder a therapeutically effective amount of (administering to a subject in need of treatment a therapeutically effective amount of an agent; paragraphs [0007], [00025]) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid (a recombinant viral vector comprising a nucleic acid; paragraph [00019]) comprising a region comprising a transgene encoding one or more miRNAs (comprising a nucleic acid encoding a transgene encoding miRNA; paragraphs [0007], [00019]); a composition or combination (a composition or combination; paragraphs [00025], [00029]) comprising: a) a recombinant viral vector comprising an isolated nucleic acid (a recombinant viral vector comprising a nucleic acid; paragraph [00019]) comprising ii) a region comprising a

40

-Continued Within the Next Supplemental Box-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/71534

Continued from previous Supplemental Box

transgene encoding one or more miRNAs (comprising a nucleic acid encoding a transgene encoding miRNA; paragraphs [0007], [0019]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the method for treating a neurological disease with a recombinant viral vector comprising an ITR, and a composition with a recombinant viral vector comprising an ITR, as previously disclosed by Aubourg, with a method for treating a neurological disease with a recombinant viral vector comprising a miRNA, and a composition comprising a recombinant viral vector comprising a miRNA, as previously disclosed by Dartmouth, to provide the advantages of using a miRNA which inhibits ACAT1 in combination with a CYP46A1 protein, where ACAT1 inhibition increases the cholesterol available to CYP46A1 (Dartmouth reference; paragraph [0007], as indicated by the Shibuya reference; abstract; page 2460, second column, first paragraph; figure 4) and enhance the treatment effect of CYP46A1.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Aubourg and Dartmouth references, unity of invention is lacking.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- | (51)国際特許分類 | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------|-----------------|-------------|
| C 1 2 N 15/864 (2006.01) | C 1 2 N 15/864 | 1 0 0 Z |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | |
| A 6 1 P 25/00 (2006.01) | A 6 1 P 25/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1 |
| A 6 1 P 25/16 (2006.01) | A 6 1 P 25/16 | |
| A 6 1 P 25/14 (2006.01) | A 6 1 P 25/14 | |
| A 6 1 P 25/28 (2006.01) | A 6 1 P 25/28 | |
| A 6 1 P 21/02 (2006.01) | A 6 1 P 21/02 | |
| A 6 1 K 35/76 (2015.01) | A 6 1 K 35/76 | |
| A 6 1 K 35/763 (2015.01) | A 6 1 K 35/763 | |
| A 6 1 K 35/761 (2015.01) | A 6 1 K 35/761 | |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | |
- (32)優先日 令和3年1月20日(2021.1.20)
- (33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 63/140,440
- (32)優先日 令和3年1月22日(2021.1.22)
- (33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 63/180,407
- (32)優先日 令和3年4月27日(2021.4.27)
- (33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
- (74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 トレチャコヴァ, アンナ
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティー・ダブリュー・アレクサンダー ドライブ 20, スイート 110, アスクレピオス バイオフィーマシューティカル, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 スアレス, レスター
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティー・ダブリュー・アレクサンダー ドライブ 20, スイート 110, アスクレピオス バイオフィーマシューティカル, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ブラーイ, アン
イギリス国 イーエイチ25 9アールジー ミッドロージアン, イースター ブッシュ キャンパス, ロスリン イノベーション センター, シンプロミクス リミテッド 気付
- (72)発明者 ロパーツ, マイケル エル.
イギリス国 イーエイチ25 9アールジー ミッドロージアン, イースター ブッシュ キャンパス, ロスリン イノベーション センター, シンプロミクス リミテッド 気付
- (72)発明者 モリエ, フィリップ
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティー・

ダブリュー．アレクサンダー ドライブ 20，スイート 110，アスクレピオス バイオフィ
ーマシューティカル，インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4C084 AA13 MA16 MA66 NA05 NA14 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA161
ZA162 ZA941 ZA942 ZC751
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 MA16 MA66 NA05 NA14 ZA01
ZA02 ZA16 ZA94 ZC75
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 MA16 MA66 NA05 NA13 NA14
ZA01 ZA02 ZA16 ZA94 ZC75