

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6872479号
(P6872479)

(45) 発行日 令和3年5月19日(2021.5.19)

(24) 登録日 令和3年4月21日(2021.4.21)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 1 3 0 Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00

請求項の数 18 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-504740 (P2017-504740)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月31日 (2015.7.31)
 (65) 公表番号 特表2017-527276 (P2017-527276A)
 (43) 公表日 平成29年9月21日 (2017.9.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/067722
 (87) 国際公開番号 W02016/016449
 (87) 国際公開日 平成28年2月4日 (2016.2.4)
 審査請求日 平成30年7月17日 (2018.7.17)
 (31) 優先権主張番号 14306228.9
 (32) 優先日 平成26年7月31日 (2014.7.31)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 511244322
 アソシアション・アンスティテュ・ドゥ・
 ミオロジー
 ASSOCIATION INSTITU
 T DE MYOLOGIE
 フランス国、エフー75013 パリ、ブ
 ールヴァール・ドゥ・ロピタル 47、バ
 ティマン・バピンスキー
 (73) 特許権者 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
 サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
 ディカル
 フランス国、エフー75013 パリ、リ
 ユ・ドゥ・トルビアック 101

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋萎縮性側索硬化症の処置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト SOD1 プレ mRNA に標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは該プレ mRNA 内でエキソンススキッピングを誘発するように適合されており、該アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 1 又は配列番号 4 を含む、該アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

該アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 1 及び配列番号 4 を含む、請求項 1 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、U7 核内低分子 RNA などの核内低分子 RNA により改変されている、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 5】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードしているウイルスベクターである、請求項 4 記載のベクター。

【請求項 6】

前記ウイルスベクターが AAV ベクターである、請求項 5 記載のベクター。

【請求項 7】

前記ウイルスベクターが、AAV9又はAAV10ベクターである、請求項6記載のベクター。

【請求項 8】

前記ベクターはさらに、ヒトSOD1タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有している発現カセットを含み、該ヌクレオチド配列は、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが該ヌクレオチド配列によってコードされるプレmRNA内でエキソスキッピングを誘発することができないように設計されている、請求項4～7のいずれか一項記載のベクター。

【請求項 9】

筋萎縮性側索硬化症の処置法に使用するための、請求項1～3のいずれか一項記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は請求項4～7のいずれか一項記載のベクター。

10

【請求項 10】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチド又は前記ベクターが、静脈内及び/又は脳室内経路を介しての投与用である、請求項9記載の使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド又はベクター。

【請求項 11】

配列番号11又は12に示される配列を含む核酸分子。

【請求項 12】

請求項11の核酸分子を含む発現カセット。

20

【請求項 13】

請求項11の核酸分子又は請求項12の発現カセットを含むベクター。

【請求項 14】

前記ベクターがプラスミド又はウイルスベクターである、請求項13記載のベクター。

【請求項 15】

請求項14記載のベクターを用いて形質転換された宿主細胞。

【請求項 16】

前記細胞が真核細胞又は原核細胞である、請求項15記載の宿主細胞。

【請求項 17】

哺乳動物細胞、ヒト細胞、又は非ヒト細胞である、請求項15記載の宿主細胞。

30

【請求項 18】

前記細胞がヒト細胞である場合、該細胞はヒト胚性幹細胞ではない、請求項17記載の宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の処置法に関する。具体的には、本発明は、ヒトSOD1プレmRNA内で選択的スプライシングを起こして、その結果、細胞機構によりスキッピングされたmRNAの破壊をもたらすように適合されているアンチセンス配列の使用を実行する。

40

【0002】

発明の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は疫学上、孤発性病型(90%～95%)と家族性病型(5%～10%)に分類される(Rosen et al., 1993)。家族性病型(fALS)の20%が、スーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)遺伝子の突然変異によって引き起こされる。SOD1金属酵素の機能は、ミトコンドリア酸化的リン酸化の毒性副産物であるスーパーオキシドを、分子状酸素又は過酸化水素へと変換することである。突然変異体SOD1は、疾患の発症機構に関与している神経毒性特性を有する(毒性機能獲得)。実際に、突然変異型のヒトSOD1遺伝子を過剰発現しているトランスジェニックマウス(例

50

えばSOD1^{G93A}マウス)はALSの大半の病理学的特徴を再現し、これはALS前臨床試験に広く使用されている(Gurney et al., 1994)。したがって、SOD1蓄積の低減は、SOD1に関連したfALSの病型を処置する論理的な戦略として出現した。アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)(Crooke, 2004)又はsiRNA(Dorn et al., 2004)若しくは合成マイクロRNA(Boudreau et al., 2011)のいずれかを用いてのRNA干渉の使用に主に基づいて、中枢神経系(CNS)内のほぼ全ての遺伝子をダウンレギュレートする魅力的な分子アプローチが開発された。

【0003】

siRNAを使用した突然変異体SOD1発現の抑制は初めて、SOD1関連ALSマウスにおいて有意な治療効力を証明した。Raoul et al.は、ヒトSOD1に対する低分子ヘアピン型RNA(shRNA)をコードしているレンチウイルスベクターの脊髄内注射が、SOD1^{G93A}マウスにおける疾患の発症及び進行を遅延させたことを示した(Raoul et al., 2005)。それとは独立して、Ralph et al.は、ヒトSOD1に対するRNAiの発現を媒介するレンチウイルスの筋肉内注射が、同じALSマウスモデルにおいて神経変性を予防しかつ生存期間を延長し、これにより、最大で77%生存期間が延長されたことを実証した(Ralph et al., 2005)。

【0004】

酵素により媒介される分解を誘発するAONの脳室内連続注入も、脳及び脊髄全体におけるSOD1のmRNAレベル及びタンパク質レベルの両方を効果的かつ幅広く低減させることを可能とし、SOD1^{G93A}突然変異によって引き起こされたALSラットモデルにおける疾患の進行を有意に緩徐化させることが報告された(Smith et al., 2006)。

【0005】

しかしながら、この方法は、浸透圧ポンプに接続された、頭蓋骨を通しての、カテーテルの手術による埋め込みを必要とし、その治療効力は限られていた(65歳で処置を開始して9.1%の生存期間の延長)(Smith et al., 2006)。この発見に基づいて、ALSの患者の脳脊髄液(CSF)へのAONの注入の多施設臨床試験がアイシス・ファーマシューティカルズ(Isis Pharmaceuticals)によって開始され、処置の実現可能性と有害作用がないことが示された(Miller et al., 2013)。より最近になって、野生型マウスのCNS内のマウスSod1レベルを低減させる代替的な方法として、立体障害を起こすAONも使用することにより、異常なエキソスキッピング(及び中途終止コドンを含む)を促進された(Ward et al., 2014)。しかしながら、マウスSod1pre-mRNAに標的化する2'-MOE AONの脳室内(ICV)注射は、脳及び脊髄内のSod1エキソン2及びエキソン3の弱いスキッピングしか引き起こさず、これにより、Sod1レベルは25~50%減少し、これはSOD1^{G93A}ラットにおいて同じ用量の以前に使用されたRNAseH依存性2'-MOEギャップマーAONを用いて達成されたレベルと似ていた(Smith et al., 2006)。これらの結果から、生存期間の改善は、RNAi又はギャップマー戦略などの酵素により媒介される戦略を用いて得られるものとせいぜい同等であると予想されただろう。

【0006】

さらに、SOD1抑制に基づいたfALS療法に直面している差し当たりの難問は、全ての罹患細胞へのサイレンシング指示の広範囲におよぶ送達である。2007年には、本発明者らは、血液脳関門にも関わらず、血清型9の自己相補性アデノ随伴ウイルスベクター(scAAV9)の全身送達が、マウス及びネコのCNS及び末梢細胞の両方(ALSを発症していることが疑われる細胞型を含む)(神経、星状膠細胞、及び筋肉細胞)の形質導入を可能としたことを発見した(Duque et al., 2009)(欧州特許第2212424号)。より最近になって、rh10血清型(AAV10)もまた、マウス及びマーモセットへの静脈内注射後のCNS及び末梢組織の全身性形質導入にとって効率的であることが判明した(Hu et al., 2010; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2011)。

【0007】

最近になって、ALSに対するAAVに基づいた遺伝子療法戦略の効率が、SOD1レ

10

20

30

40

50

ベルを低減させるRNA干渉を使用する2つの試験において実証された。Foust et al.は初めて、SOD1を標的化するAAV9-shRNAを新生仔に静脈内(IV)注射した後に、ALSマウスにおいて38%の生存期間の延長を得た(Foust et al., 2013)。さらに、症候発生後の55日令のSOD1マウスへのAAV10-shRNA-SOD1のくも膜下腔内(IT)注射により、ALSマウスの生存期間は22%延長された(Wang et al., 2013)。

【0008】

これらの以前の研究で報告された僅かな治療成果を考慮すると、ALS生物療法のための技術的改善が依然として必要とされる。

【0009】

発明の要約

本発明は、ヒトSOD1プレmRNA内でエキソンスキッピングを誘発するように適合されているアンチセンスオリゴヌクレオチドをマウスに投与した場合に、ALSマウスモデルの生存期間が、先行技術のALS治療戦略と比較して、大きく改善され得るという予想外の発見から始まる。

【0010】

Ward et al. (上記に引用)は、エキソンスキッピング戦略を使用したSOD1の発現の低減が、ギャップマー、すなわち、ナンセンス変異依存mRNA分解機構によってではなくRNaseH機構を通してSOD1のレベルを低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて得られた低減とせいぜい同等であろうと報告した。Ward et al.に報告されたSOD1のmRNA及びタンパク質のレベルの低減も、RISC機構の関与する戦略(例えばRNAi及びshRNAを使用する戦略)を用いて得られたものと同等であった。したがって、当業者は、SOD1エキソンスキッピング戦略を使用して得られる生存期間の改善は、以前の研究で報告されたのと同様であろうと予想したのである。本発明者らは予想外にも、最大134%及びさらにそれ以上の生存期間の延長が、ヒトSOD1プレmRNA内でエキソンスキッピングを誘発するように適合されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与からもたらされ得ることを示した。この生存期間の延長は、SOD1関連ALSマウスにおいて現在までに報告されているものの中で最高であり、以前のSOD1サイレンシング戦略(最大で38%の生存期間の延長と報告されている)よりもはるかにより効率的であり、この分子アプローチの独創性及び卓越性を示し、これは以前に報告された研究からは予想されなかった。

【0011】

したがって、本明細書に開示されるのは、ヒトSOD1プレmRNA内でエキソンスキッピングを誘発するように適合されているアンチセンスオリゴヌクレオチドをそれを必要とする被験者に投与し、これにより生じたスキッピングされたヒトSOD1コーディングmRNAの分解が誘発される工程を含む、ALSの処置法である。

【0012】

本明細書に開示された別の対象は、ヒトSOD1プレmRNA配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、該プレmRNA内でエキソンのスキッピングを誘発するように適合されている。

【0013】

本明細書に開示された別の対象は、ALSの処置法に使用するためのヒトSOD1プレmRNA配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、該プレmRNA内でエキソンのスキッピングを誘発するように適合されている。

【0014】

発明の詳細な説明

本発明は、ALSを患っているヒト被験者を処置するのに有用であるアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)に関する。被験者は、SOD1遺伝子又は他のALS関連遺伝子、例えばSOD1mRNAレベルの上昇をもたらすALS関連遺伝子の突然変異によ

10

20

30

40

50

て引き起こされた孤発性又は家族性の病型のALSを患う(ALSオンラインデータベースALSOD、<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>, April 2014)。被験者は、疾患の症候発生前であっても、症候性段階であってもよい。

【0015】

本出願における「アンチセンスオリゴヌクレオチド」すなわち「AON」は、SOD1タンパク質をコードしているプレmRNAの一部に相補的である、DNA又はRNAのいずれかの一本鎖核酸配列を示す(Chan et al., 2006)。特に、本発明のAONは、スプライサクセプター(SA)部位、及び/又はエキソンスプライシングエンハンサー(ESE)、及び/又はSOD1プレmRNA内の分岐点、及び/又はプレmRNAスプライシングを調節することのできる任意の配列を遮断するように設計され、すなわち、それはSA、ESE、分岐点配列、又はプレmRNAスプライシングを調節することのできる任意の配列を含むSOD1プレmRNAの一部に対して相補的であるように設計されている(Cartegni et al., 2002; Reed and Maniatis, 1988)。

10

【0016】

AONは、SOD1プレmRNA内でエキソンスキッピングを誘発するために使用され、これにより、フレームシフトが起こり、これにより生じたmRNA内に中途終止コドンを含む切断短縮されたcDNAが生成される。したがって、この戦略は、ALSの発症機構に関与するさもなくば神経毒性のあるタンパク質のレベルの低減を可能とする。

【0017】

ヒトSOD1遺伝子(hSOD1)は十分に特徴付けられている。その配列は(遺伝子ID: 6647; NCBI参照配列、アクセッション番号NM_000454.4; 配列番号10)に報告されている。

20

【0018】

本発明に記載のAONは、ヒトSOD1プレmRNA内でエキソンスキッピングを誘発する種類のものである。例えば、実行されたAONは、エキソン2、エキソン3、又はエキソン4のスキッピングを特異的に誘発するように設計され得る。特定の実施態様では、本発明のAONは、ヒトSOD1mRNA内への中途終止コドンの包含を誘発することができる。好ましくは、AONは、エキソン2のスキッピングを誘発するように適合されている。実施例に提供されているように、エキソン2のスキッピングはフレームシフトを誘発し、これによりエキソン4内に中途終止コドンをもたらされる。

30

【0019】

関心対象のプレmRNA内のSA、ESE、及び分岐点の配列を同定するためのツールが利用可能である。当業者には周知であるように、SAは保存配列であり、それらはイントロンの3'末端にあり、ほぼ不変なAG配列でイントロンを終結させる。さらに、ESEfinderソフトウェアツール(http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi?process=home)を使用して、スキッピングしようとするエキソン配列上のESEモチーフを予測し得る。その後、AONの設計は、Aartsma-Rus et al. (Aartsma-Rus et al., 2009)に公表されている原則に従って行なわれ得る。

【0020】

本発明のAONは、標的化エキソンの正しいスプライシングに必要とされるヒトSOD1(hSOD1)プレmRNA内の適切な配列に対して相補的となるように設計され、これにより、標的化エキソンを成熟mRNAに組み込むであろうスプライシング反応は遮断される。

40

【0021】

本発明のAONは、任意の適切な種類であってもよい。代表的なAONの種類としては、オリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、モルホリノ、トリシクロ-DNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリシクロ-ホスホリチオエートDNAオリゴヌクレオチド、LNA、核内低分子RNAにより改変された、例えばU7、U1、若しくはU6を用いて改変されたAON(又は他のUsnRNP)、又はそのコンジュゲ

50

ト産物、例えばペプチドにコンジュゲートしたAON若しくはナノ粒子と複合体を形成したAONが挙げられる。

【0022】

本発明の実施に使用されたAONは、一般的に、約10～約30ヌクレオチド長であり、ヒトSOD1プレmRNA内の標的化配列及びAONの化学に依存して、例えば、約10、又は約15、又は約20、又は約30、又は約40若しくはそれ以上のヌクレオチド長であり得る。

【0023】

本発明の実施のための代表的なAONを表1に列挙する：

【0024】

【表1】

AON1	5' CCCACACCUUCACUGGUCCA 3'	配列番号:1
AON2	5' GGCCUUCAGUCAGUCCUUUA 3'	配列番号:2
AON3	5' CUGGUCCAUUACUUUCCUUU 3'	配列番号:3
AON4	5' CCAUGCAGGCCUUCAGUCAG 3'	配列番号:4

【0025】

特定の実施態様では、本発明の実施のためのAONは、配列番号1及び4から選択される。さらなる実施態様では、配列番号1及び4に示された両方の配列が、本発明のAONに含まれる。

【0026】

インピボでの使用のために、AONを、例えばリン酸骨格の改変を介して安定化させることができる。例えば、本発明の安定化したAONは、改変された骨格を有し得、例えばホスホロチオエート結合を有する。他の可能な安定化させる改変としては、ホスホジエステル改変、ホスホジエステル及びホスホロチオエートの改変の組合せ、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、p-エトキシ、及びその組合せが挙げられる。化学的に安定化した改変型のAONとしてはまた、「モルホリノ」(ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー、PMO)、2'-O-メチルオリゴマー、トリシクロ-DNA、トリシクロ-DNA-ホスホロチオエートAON分子(国際公開公報第2013/053928号)、又はU核内低分子(sn)RNAが挙げられる。この趣旨で使用され得る後者の型のAONを、特に、レンチウイルス、レトロウイルス、又はアデノ随伴ウイルスに基づくがこれらに限定されないウイルス導入法と組み合わせ、U1、U6、又はU7(又は他のUsnRNP)などの核内低分子RNAに結合させることができる。特定の実施態様では、本発明に使用されるAONは、配列番号1及び配列番号4の両方の配列を含む。さらに、さらに特定の実施態様では、AONは、核内低分子、例えばU1、U6、又はU7(又は他のUsnRNP)、特にU7を含み、かつ配列番号1及び配列番号4に示された配列を含む。このようなAONは配列番号9に示されている。

【0027】

特に血液脳関門を通した、安定かつ効率的なインピボでの送達のために、AONはまた、任意の細胞透過性ペプチド及びタンパク質分泌を媒介するシグナルペプチドと融合させても、又はそれらと共投与してもよい。細胞透過性ペプチドは、RVGペプチド(Kumar et al., 2007)、PiP(Betts et al., 2012)、P28(Yamada et al., 2013)、又はTATのようなタンパク質形質導入ドメイン(Malhotra et al., 2013)、又はVP22(Lundberg et al., 2003)であり得る。

【0028】

本発明のアンチセンス配列は、インピボで単独で又はベクターと会合させて送達され得る。その最も広義な意味において、「ベクター」は、細胞、好ましくはSOD1を発現している細胞への、アンチセンス配列の導入を促進することのできる任意のビヒクルである

10

20

30

40

50

。好ましくは、該ベクターは、ベクターの非存在下で生じるであろう分解度と比較して低減した分解度で細胞にアンチセンス配列を輸送する。一般的に、本発明において有用なベクターとしては、AON配列の挿入若しくは組込みによって操作された、プラスミド、ファージミド、ウイルス、及びウイルス源若しくは細菌源に由来する他のビヒクルが挙げられるがこれらに限定されない。ウイルスベクターが好ましい種類のベクターであり、これは、以下のウイルスに由来する核酸配列を含むがこれらに限定されない：レンチウイルス、例えばHIV-1、レトロウイルス、例えばモロニー Maus 白血病ウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)；SV40型ウイルス；ヘルペスウイルス、例えばHSV-1及びワクシニアウイルス。命名されていないが当技術分野において公知である他のベクターも容易に使用することができる。臨床適用のために検証されかつアンチセンス配列を送達するのに使用することのできるベクターの中で、レンチウイルス、レトロウイルス、及びAAVが、エキソンスキッピング戦略に対するより大きな可能性を示した。

10

【0029】

複製欠損である(すなわち、所望のAONの合成を指令することはできるが、感染性粒子を生成することはできない)レトロウイルスに基づいた及びレンチウイルスに基づいたベクターが、ヒト遺伝子療法試験に承認された。それらは、標的細胞ゲノムに組み込む特性を有し、したがって、標的細胞及びその子孫における持続的な導入遺伝子の発現を可能とする。

【0030】

20

好ましい実施態様では、AONは、AAVベクターを使用して送達される。ヒトパルボウイルスアデノ随伴ウイルス(AAV)は、感染細胞のゲノムに組み込んで潜伏感染を確立することのできる天然的に複製欠損であるディペンドウイルスである。最後の特性は、哺乳動物ウイルスの中でも独特のようである。なぜなら、組込みが、第19番染色体(19q13.3-qter)に位置する、AAVS1と呼ばれるヒトゲノム内の特定の部位で起こるからである。AAVに基づいた組換えベクターはRepタンパク質を欠失し、低い効率で組込み、標的細胞内で数か月間及びおそらく数年間存続することのできる安定な環状エピソームとして主に存在する。それ故、AAVは、ヒト遺伝子療法のための有望なベクターとしてかなりの関心を集めた。ウイルスの好ましい特性の中には、あらゆるヒト疾患を併発しないこと、及び、様々な組織に由来する幅広い細胞株に感染することができることである。実際に12個のAAV血清型(AAV1~12)及び最大で120個の変異体が公知であり(Gao et al., 2004; Gao et al., 2002)、各々が異なる組織指向性を有する。したがって、本発明は、ヒトSOD1プレmRNAに標的化しかつ該ヒトSOD1プレmRNA内でエキソンスキッピングを誘発するように適合されている、上記のAONを含むAAVベクターに関する。特定の実施態様によると、AAVゲノムは、AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10(例えばカニクイザルAAV10又はアカゲザルAAVrh10)、11、又は12血清型に由来する。好ましい実施態様では、AAVキャプシドは、AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10(例えばカニクイザルAAV10又はAAVrh10)、11、12血清型、又はAAV変異体に由来する。さらなる特定の実施態様では、AAVベクターはシュードタイプ化ベクターであり、すなわち、そのゲノム及びキャプシドは、血清型の異なるAAVに由来する。例えば、シュードタイプ化AAVベクターは、そのゲノムがAAV2血清型に由来し、そのキャプシドがAAV1、3、4、5、6、7、8、9、10(例えばカニクイザルAAV10又はAAVrh10)、11、12血清型又はAAV変異体に由来するベクターであり得る。さらに、AAVベクターのゲノムは、一本鎖又は自己相補的二本鎖ゲノムのいずれかであり得る(McCarty et al., 2001)。自己相補的二本鎖AAVベクターは、AAV末端反復配列の1つから末端分離部位(terminal resolution site)(trs)を欠失させることによって生成される。その複製ゲノムの長さが野生型AAVゲノムの半分である、これらの改変されたベクターは、DNA二量体をパッケージングする傾向を有する。

30

40

【0031】

50

好ましくは、本発明の実施に実行されるAAVベクターは、CNS神経(脳、脳幹、及び脊髄内の運動神経及びグリア細胞を含む)及び筋肉細胞を標的化するベクターである(Llieva et al., 2009)。好ましい実施態様では、AAVベクターは、AAV1、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh39、AAVrh43、AAV2、AAV5、AAV8、AAV9、又はAAV10キャプシドを有し、このベクターは場合によりシュードタイプ化されている。特定の実施態様では、AAVベクターは、AAV9又はAAV10(例えばカニクイザルAAV10又はAAVrh10)キャプシドを有し、これは場合によりシュードタイプ化されている。

【0032】

特定の実施態様では、上記のようなAONは、核内低分子RNA、例えばU1、U2、U6、U7若しくは任意の他の核内低分子RNA、又はキメラ核内低分子RNAに連結される(Cazzella et al., 2012; De Angelis et al., 2002)。U7による改変に関する情報は特に、Goyenvalle, et al. (Goyenvalle et al., 2004); 国際公開公報第11113889号; 及び国際公開公報第06021724号に見られ得る。特定の実施態様では、D. Schumperliによって記載されたU7カセットが使用される(Schumperli and Pillai, 2004)。それは天然のU7プロモーター(-267位から+1位)、U7smOpt snRNA、及び116位に至るまでの下流配列を含む。U7smOpt内のヒストンブレムRNAに対して相補的な18塩基の天然配列を、例えば、すでに記載(Goyenvalle et al., 2004)されているようなPCR媒介突然変異誘発を使用して、1つ若しくは2つ(同じ配列を2回使用するか、又は2つの異なる配列を使用するかのいずれか)又はそれ以上繰り返される選択されたAON配列によって置き換える。

【0033】

特定の実施態様では、核内低分子RNAにより改変されたAON、特にU7により改変されたAONは、ウイルスペクター、より特定するとAAVベクターにベクター化される。

【0034】

典型的には、前記ベクターはまた、コードされたAONの発現を可能とする調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー内部リボソーム進入部位(IRES)、タンパク質形質導入ドメイン(PTD)をコードする配列などを含んでいてもよい。これに関して、該ベクターは最も好ましくは、AONの発現を引き起こすか又は改善させる、コード配列に作動可能に連結された、プロモーター領域を含む。このようなプロモーターは、遍在性、組織特異性、強力、弱い、調節性、キメラなどであり得、これにより、AONの効率的かつ適切な生成が可能となる。該プロモーターは、細胞性、ウイルス性、真菌性、植物性、又は合成プロモーターであり得る。本発明に使用するのに最も好ましいプロモーターは、神経細胞及び筋肉細胞において、より好ましくは運動神経及びグリア細胞において機能するものであろう。プロモーターは、核内低分子RNAプロモーター、例えばU1、U2、U6、U7、若しくは他の核内低分子RNAプロモーター、又はキメラ核内低分子RNAプロモーターから選択され得る。他の代表的なプロモーターとしては、RNAポリメラーゼIII依存性プロモーター、例えばH1プロモーター、又はRNAポリメラーゼII依存性プロモーターが挙げられる。調節性プロモーターの例としては、Tetオン/オフ配列含有プロモーター、ラパマイシン誘発性プロモーター、及びメタロチオネインプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。運動神経に対して特異的なプロモーターの例としては、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)、又はホメオボックス9(HB9)のプロモーターが挙げられる。運動神経において機能的な他のプロモーターとしては、神経特異的なプロモーター、例えば神経特異的なエノラーゼプロモーター(NSE)、シナプシンプロモーター、又は遍在性プロモーター、例えば神経特異的なサイレンサー配列(NRSE)が挙げられる。グリア細胞に特異的なプロモーター、例えばグリア線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーターも使用することができる。遍在性プロモーターの例としては、ウイルスペクター、特にCMVプロモーター、RSVプロモーター、SV40プロモーター、ハイブリッドCBA(

ニワトリ アクチン / C M V) プロモーターなど、及び細胞性プロモーター、例えば P G K (ホスホグリセリン酸キナーゼ) 又は E F 1 (伸張因子 1) プロモーターが挙げられる。

【 0 0 3 5 】

特定の実施態様では、本発明に使用される A O N は、ウイルスベクター、特に A A V ベクター、より特定すると A A V 9 又は A A V 1 0 (例えばカニクイザル A A V 1 0 又は A A V r h 1 0) ベクターにベクター化され、そして配列番号 1 及び配列番号 4 の両方の配列を含む。さらに、さらなる特定の実施態様では、ベクター化 A O N は、核内低分子、例えば U 1、U 6 又は U 7 (又は他の U s n R N P)、特に U 7 を含み、そして配列番号 1 及び配列番号 4 に示される配列を含む。このような A O N は配列番号 9 に示される。

10

【 0 0 3 6 】

以下の実験章で「消去 - 置換」と称される、本発明の特定の実施態様では、上記の A O N は、野生型 S O D 1 タンパク質、特にヒト S O D 1 タンパク質をコードしている遺伝子を含む含有している発現カセットと会合させて投与するためのものである。S O D 1 タンパク質の外因性発現を与えることにより、突然変異型のヒト S O D 1 m R N A を特異的に標的としないで野生型タンパク質のサイレンシングを誘発する可能性がある A O N の送達から生じる、内因性野生型 S O D 1 m R N A の欠失を場合により補うことができる。この実施態様では、野生型 S O D 1 タンパク質 (優先的には野生型ヒトタンパク質) をコードしている遺伝子は、対応する m R N A への該 A O N のハイブリダイゼーションを損ない、これにより、該外因性 S O D 1 m R N A 内でのエキソスキッピングを回避するであろうサイレント突然変異 (すなわち、S O D 1 タンパク質のアミノ酸一次配列に影響を及ぼさない突然変異) を含むように設計されている。それ故、その態様の 1 つにおいて、本発明は、この遺伝子によってコードされる m R N A に対する本発明の A O N のハイブリダイゼーションを損なうサイレント突然変異を含むように設計された、野生型 S O D 1 タンパク質、例えばヒト野生型 S O D 1 タンパク質をコードしている遺伝子に関する。特定の実施態様では、野生型 S O D 1 タンパク質をコードしている遺伝子は、上記に提供されているようなサイレント突然変異を用いて改変されているヒト S O D 1 配列である配列番号 1 1 に示される配列を含む (特に、この配列は開始コドン及び終止コドンを含まない)。配列番号 1 1 の配列はさらに、配列番号 1 2 に示される配列におけるような開始コドン及び終止コドンを含んでいてもよい。さらに、該遺伝子は、タグ化野生型 S O D 1 タンパク質、例えば F l a g でタグ化された S O D 1 タンパク質をコードしていてもよく、該タグは、S O D 1 タンパク質の N 末端又は C 末端のいずれかに与えられる。F l a g - h S O D 1 又は h S O D 1 - F l a g をコードしているこのような遺伝子を配列番号 1 3 及び 1 4 に示す。発現カセットは、コードされた外因性 S O D 1 タンパク質の発現を可能とする調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー内部リボソーム進入部位 (I R E S)、タンパク質形質導入ドメイン (P T D) をコードしている配列などを含んでいてもよい。これに関して、該ベクターは最も好ましくは、タンパク質の発現を引き起こすか又は改善させる、コード配列に作動可能に連結された、プロモーター領域を含む。このようなプロモーターは、遍在性、組織特異性、強力、弱い、調節性、キメラなどであり得、これにより、タンパク質の効率的かつ適切な生成が可能となる。該プロモーターは、細胞性、ウイルス性、真菌性、植物性、又は合成プロモーターであり得る。本発明に使用するのに最も好ましいプロモーターは、神経細胞及び筋肉細胞において、より好ましくは運動神経及びグリア細胞において機能するものである。調節性プロモーターの例としては、T e t オン / オフ配列含有プロモーター、ラパマイシン誘発性プロモーター、及びメタロチオネインプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。運動神経に対して特異的なプロモーターの例としては、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (C G R P)、コリンアセチルトランスフェラーゼ (C h A T)、又はホメオボックス 9 (H B 9) のプロモーターが挙げられる。運動神経において機能的な他のプロモーターとしては、神経特異的なプロモーター、例えば神経特異的なエノラーゼプロモーター (N S E)、シナプシンプロモーター、又は遍在性プロモーター、例えば神経特異的なサイレンサー配列 (N R S E) が挙げられる。グリア細胞に

20

30

40

50

特異的なプロモーター、例えばグリア線維酸性タンパク質（GFAP）プロモーターも使用することができる。遍在性プロモーターの例としては、ウイルスプロモーター、特にCMVプロモーター、RSVプロモーター、SV40プロモーター、ハイブリッドCBA（ニワトリアクチン/CMV）プロモーターなど、及び細胞性プロモーター、例えばPGK（ホスホグリセリン酸キナーゼ）又はEF1（伸張因子1）プロモーターが挙げられる。発現カセットは、上記のベクターなどの適切なベクターに含められ得る。特定の実施態様では、発現カセットを含有しているベクターは、ウイルスベクター、特に、上記のような運動神経及び筋肉細胞を形質導入することのできるウイルスベクター、特に例えばAAVベクター、特にAAV9又はAAV10（例えばカニクイザルAAV10又はAAVrh10）キャプシドを含むAAVベクターである。この実施態様の変化形において、AON及び外因性SOD1遺伝子、特にヒトSOD1をコードしているカセットは、両方共、同じベクターに、特にウイルスベクターに、特に上記のような運動神経及び筋肉細胞を形質導入することのできるウイルスベクターに、特に例えばAAVベクターに、特にAAV9又はAAV10（例えばカニクイザルAAV10又はAAVrh10）キャプシドを含むAAVベクターに含有される。

10

【0037】

本発明はまた、AON若しくはそれを含むベクター、及び/又は外因性SOD1cDNA若しくは上記のような外因性SOD1タンパク質をコードしている発現カセットを含むベクターを、薬学的に許容される担体を含む組成物に関する。AON又はベクターの他に、本発明の医薬組成物はまた、薬学的に又は生理学的に許容される担体、例えば食塩水、リン酸ナトリウムなどを含み得る。該組成物は一般的に液体の形状であるが、これは常にそうである必要はない。適切な担体、賦形剤、及び希釈剤としては、乳糖、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水性シロップ、メチルセルロース、メチル及びプロピルヒドロキシベンゾエート、鉱油などが挙げられる。製剤はまた、潤滑剤、湿潤剤、乳化剤、保存剤、緩衝化剤などを含み得る。特に、本発明はAONの投与を含み、したがって遺伝子療法に幾分似ている。当業者は、核酸がしばしば脂質（例えば陽イオン性脂質又は中性脂質、又はこれらの混合物）と併せて、頻繁にはリポソーム又は他の適切なマイクロ若しくはナノ構造の物質（例えばミセル、リポ複合体、デンドリマー、エマルション、立法相など）の形態で送達される。

20

30

【0038】

本発明の組成物は一般的に、経腸又は非経口経路を介して、例えば静脈内（i.v.）、動脈内、皮下、筋肉内（i.m.）、脳内、脳室内（i.c.v.）、くも膜下腔内（i.t.）、腹腔内（i.p.）で投与されるが、他の種類の投与も除外されない（例えば吸入、鼻腔内、局所、経口、直腸、骨内、点眼薬、又は点耳薬の投与などを介して）。

【0039】

特定の実施態様では、本発明のAAVベクターは、国際公開公報第2013/190059号に記載されているように、患者の脳脊髄液（CSF）内への投与と血中への投与を組み合わせることによって投与される。この実施態様の変化形において、哺乳動物のCSF内へのウイルスベクターの投与は、脳室内（i.c.v.すなわちICV）注射、くも膜下腔内（i.t.すなわちIT）注射、又は大槽内注射によって行なわれ、血中への投与は好ましくは、非経口送達、例えば静脈内（すなわちIV）注射、筋肉内注射、動脈内注射、腹腔内注射、皮下注射、皮内注射、鼻腔内送達、経皮送達（例えばパッチ）、又は腸への送達（経口又は経腸）によって行なわれる。特定の実施態様では、AAVベクターは、脳室内（又はくも膜下腔内）経路及び静脈内（又は筋肉内）経路の両方を介して投与される。

40

【0040】

注射製剤、例えば無菌注射水性又は油性懸濁液は、適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を使用して公知の技術に従って製剤化され得る。無菌注射製剤はまた、無毒性の非経口

50

的に許容される希釈剤又は溶媒中の、例えば 1, 3 - ブタンジオール溶液としての、無菌注射溶液又は懸濁液であり得る。送達が局所的（すなわちインサイト、筋肉組織などの組織に直接）又は全身性のいずれかであり得る場合、通常、送達は、罹患した筋肉組織、例えば骨格筋、平滑筋、心筋などに局所的であろう。投与される AON の剤形及び標的化される組織又は細胞型に依存して、電気穿孔法、ソノポレーション、「遺伝子銃」（核酸でコーティングされた金粒子を送達）などの技術が使用され得る。

【0041】

当業者は、投与しようとする AON、又は AON 及び/若しくは外因性 SOD1 タンパク質を含有若しくは発現しているベクターの量は、望ましくない ALS の症状の寛解を誘発するのに十分な量であろうことを認識しているだろう。このような量は、とりわけ、患者の性別、年齢、体重、全般的な身体状態などの因子に依存して変更され得、個々の場合に応じて決定され得る。量はまた、処置プロトコルの他の要素（例えば他の薬物の投与など）に応じて変更され得る。一般的に、適切な用量は、約 1 mg/kg から約 100 mg/kg、より通常では約 2 mg/kg/日から約 10 mg/kg の範囲内である。ウイルスに基づいた AON の送達を選択される場合、適切な用量は、使用されるウイルス、送達経路（筋肉内、静脈内、動脈内、又はその他）などの様々な因子に依存するであろうが、典型的には 10^9 から 10^{15} 個のウイルス粒子/kg の範囲であり得る。当業者は、このようなパラメーターが通常、臨床試験中にうまくいくことを認識しているだろう。さらに、当業者は、疾患の症状が、本明細書に記載の処置によって完全に軽減される可能性があるが、完全に軽減される必要はないことを認識しているだろう。症状の部分的又は断続的な緩和さえも、レシピエントにとって非常に有益であり得る。さらに、患者の処置は 1 回の事象（改変された AON 又は AAV ベクターを用いての）であってもよいか、又は患者は AON を複数回投与され、それは得られる結果に応じて、数日間間隔を置いて、数週間間隔を置いて、又は数か月間隔を置いて、又はさらには数年間隔を置いてもよい。

【0042】

本発明の方法は、いくつかの異なる方法のいずれかで実行され得る。例えば、本発明の AON は、他のエキソンを除去するように設計された AON、又は siRNA、又は miRNA と一緒に投与されてもよい（例えば、1 つの混合物中で、又は別々の混合物であるが、時間間隔をあまりおかずに、例えば一方を他方の直後に任意の順番で、僅か数分間又は数時間の投与間隔で投与する）。それらはまた、上記のように、外因性 SOD1 タンパク質、優先的にはヒト SOD1 タンパク質をコードしているベクターと一緒に投与されてもよく、そのコード配列は、そのコードされる mRNA が、AON により誘発されるエキソンスキッピングに抵抗性となるように設計されている。

【0043】

さらなる態様では、本発明は、細胞分裂阻害療法において同時に、別々に、又は順次使用するための、

- 本発明の AON、又は上記のような該 AON をコードしているベクター；及び
 - 野生型 SOD1 タンパク質をコードしているベクター（例えば野生型ヒト SOD1 タンパク質、そのコード配列は、そのコードされる mRNA が、AON により誘発されるエキソンスキッピングに抵抗性となるように設計されている）
- を含む、部品キットに関する。

【0044】

本発明のさらなる態様及び利点は以下の実験章に開示され、これは単なる説明と考えられ、本出願の範囲を制限するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図 1】ESEfinder によって予測されるエキソン 2 - hSOD1 内の有望な ESE モチーフのグラフ表示。閾値はソフトウェアによって規定されるデフォルトである。SRF1 (SF2 / ASF) : 1.956 ; SRF1 (IgM - BRCA1) : 1.867 ; SRF2 (SC35) : 2.382 ; SRF5 (SRp40) : 2.67 ; SRF6

10

20

30

40

50

(SRp55) : 2.676.

【図2】AONでトランスフェクトされた293T細胞に関するRT-PCR。

【図3】スキッピング形のシーケンス。

【図4】トランスフェクトされた細胞における完全長hSOD1 mRNAの発現。未処置細胞と比較した、各々のAONのhSOD1低減率：AON1：85%；AON2：55%；AON3：75%；AON4：81%。データは平均値+/-標準偏差(n=3)である。* * P < 0.01、* * * P < 0.005、未処置細胞と比較して学生t検定によって決定。

【図5】脊髄(SC)に 4.7×10^{12} vg/kgのAAV10-U7-hSOD1又はAAV10-U7-CTRを直接注射されたSOD1^{G93A}マウスの脊髄(SC)抽出物に関するRT-PCR。

10

【図6】SCに直接注射されたSOD1^{G93A}マウスのSC抽出物中の完全長hSOD1 mRNAに関するQ-RT-PCR。2匹のマウスに 4.7×10^{12} vg/kgのAAV10-U7-CTRを注射した：2番及び5番；3匹のマウスに同じ用量のAAV10-U7-hSOD1を注射した：6番、8番、及び9番。

【図7】(a) SCに 4.7×10^{12} vg/kgのAAV10-U7-hSOD1 (n=3) 及び同じ用量のAAV10-U7-CTR (n=3) を注射されたSOD1^{G93A}マウスにおけるhSOD1タンパク質発現のウェスタンブロット分析。チューブリンをローディング対照として使用した。(b) タンパク質レベルの濃度測定分析。データは平均値+/-標準偏差(n=3)である。* * P < 0.01、AAV10-U7-CTRに感染させた脊髄と比較して学生t検定によって決定。

20

【図8】生誕時に側脳室(ICV)及び側頭静脈(IV)に 6×10^{14} vg/kgのAAV10-U7-hSOD1を注射されたSOD1^{G93A}マウスの代表的な写真。年齢相応の(191日令)野生型(WT)マウスが対照として示されている。

【図9】(a) U7-hSOD1アンチセンスオリゴヌクレオチド(U7プロモーター制御下)と、Flag-hSOD1 opt又はhSOD1 opt-Flag (PGKプロモーター制御下)とを同時に発現している「消去-置換」AAVベクターの図解：AAV-U7-hSOD1-Flag-hSOD1 opt又はAAV-U7-hSOD1-hSOD1 opt-Flag。(b) AAV-U7-hSOD1-GFP対照ベクターでトランスフェクトしてから48時間後のGFP免疫蛍光による処置された代表的なHEK-293T培養細胞(右)。左パネルは、細胞の位相差画像を示す。(c) AAV-U7-CTR-Flag-hSOD1 opt、AAV-U7-hSOD1-Flag-hSOD1 opt、又は対照AAV-U7-hSOD1-GFP対照ベクターを用いてトランスフェクトしてから48時間後のHEK-293細胞、及び非トランスフェクト細胞における、Flagタグのウェスタンブロット分析。アクチンをローディング対照として使用した。

30

【0046】

実施例

実施例1：ALSマウスにおけるhSOD1のサイレンシング及び生存期間の改善

材料及び方法

マウス株(動物)、インピボでの電気穿孔、及びアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)

40

動物の管理は、欧州の実験動物の管理と使用に関する指針に従った。高コピーSOD1^{G93A}マウスのB6SJL-Tg(SOD1^{*G93A})1Gur/J(JACKSON番号SN2726)はJackson Laboratories(バーハーバー、メイン州)から購入した。

【0047】

細胞

HEK-293T細胞を、10%ウシ胎児血清(FBS)と1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有しているダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中、37℃で、5%CO₂中で培養した。2'-O-メチルホスホロチオエート(2'OMePS)AONはEurogentecから購入し、最終濃度1 µg/µlでH₂ORNa seフリー水に再懸濁した。

50

各々のAON 5 µgを、製造業者の説明書に従ってオリゴフェクトアミン (Invitrogen) を用いてトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、細胞をRNA抽出のために収集した。

【0048】

RNA抽出、逆転写、RT-PCR、及びqRT-PCR

全RNAを細胞から又は新しく凍結させた脊髄からRNA抽出キットNucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel) を用いて製造業者のプロトコールにより抽出した。iScript cDNA合成キットプロトコール (Biorad) に従って、オリゴ(dT)プライマー及びランダムヘキサマープライマーを使用して、全RNA 1 µgからcDNAを合成した。ヒトSOD1 mRNA内のエキソン2の存在を調べるために、RT-PCR分析を、以下のプライマーを使用して、cDNA 200 ngから行なった：

正方向プライマー1、ヒトSOD1エキソン1に一致：5' -CTAGCGAGTTATGGCGAC-3' (配列番号5)；逆方向プライマー4/5、ヒトSOD1 (エキソン4とエキソン5の境界) に一致：5' -GCCAATGATGCAATGGTCTC-3' (配列番号6)。

【0049】

TaqmanリアルタイムPCR (Q-RT-PCR) を、DNA Engine Opticon 2システム (Biorad) を使用して行なった。cDNA 100 ngを、Taqman Universal PCR Master Mix 2X (Life technologies) 10 µl中で、ヒトSOD1 FAM Taqman Gene expression assay (Hs00533490m1, Life technologies) 1 µl及びヒトGAPDH VIC Taqman Gene expression assay (Hs03929097_g1, Life technologies) 1 µl、又はインビボ分析では内因性対照としてのマウスIpo8 (Mm01255158_m1, Life Technologies) を用いて増幅した。反応液を60 °Cで1分間、95 °Cで10分間インキュベートし、その後、95 °Cで15分間と60 °Cで1分間のサイクルを39回行なった。hSOD1コピー数を、デルタCt /デルタCt法を使用して計算した。分析は、DNA Engine Opticon (登録商標) 2システム (Biorad) を用いて行なわれた。

【0050】

ベクター

最も出来栄の良い2つのAONに相当するDNA配列を、すでに記載されているように (Goyenvalle et al., 2004)、PCR媒介突然変異誘発を使用して、pAAVsc_U7DTex23 (親切にもGENETHON、イブリー、フランスによって提供された) にクローニングした。ウイルス粒子のscAAV血清型10を、Dominguez et al. (Dominguez et al., 2011) に以前に記載されているように、トリトランスフェクション法を使用して生成した。ベクター力価をITRのQ-RT-PCRによって決定し；力価はウイルスゲノム (vg) /mlとして表現した。

【0051】

注射

成体マウスの脊髄への注射のために、50日令のマウスを使用した。マウスを、ケタミン/キシラジン混合物の腹腔内注射 (100 mg/kgのケタミン、16 mg/kgのキシラジン；体重10 gあたり0.1 ml) を用いて麻酔した。注射はRaoul et al. 2005 (Raoul et al., 2005) に報告されているように行なわれた。各ベクターを 9.5×10^{10} vg (4.7 × 10¹² vg/Kg) 含有している総容量10 µl (一部位あたり5 µl) を各マウスに注射した。

【0052】

新生仔マウスへの注射のために、生後1日目の仔を使用した。注射は、脳室内注射 (ICV) と静脈内注射 (IV) を組み合わせることによって行なわれた (Barkats, Voit、国際公開公報第2013190059 (A1) 号 - 2013年12月27日の特許に記載の通り)。7.6 × 10¹¹ vg (6 × 10¹⁴ vg/kg) を含有している総容量80 µlを各マウスに注射した。ウイルス溶液 10 µlを側脳室に直接注射し、70 µlを前頭側頭静脈に送達した。

【0053】

10

20

30

40

50

ウェスタンブロット分析

新しく凍結させた脊髄をホモジナイズし、プロテアーゼ阻害剤混液 (Complete Mini, Roche Diagnostics) を供給された溶解緩衝液 (150mM NaCl、50mM トリス-HCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、1% NP40、1% SDS) を使用して、タンパク質溶解液を調製した。タンパク質抽出物を DC タンパク質アッセイ (BioRad) によって定量した。30 µg を、12% ポリアクリルアミドゲル (Criterion XT 10% ビス-トリス, Biorad) 上で分離し、以下の抗体を用いてウェスタンブロットによって分析した: 抗-チューブリン抗体 (T5168, Sigma Aldrich); 抗ヒト SOD1 抗体 (sc-8636, Santa Cruz Biotechnology)。マウス及びウサギ Ig に対するペルオキシダーゼにコンジュゲートさせた抗血清は Amersham Pharmacia Biotech から購入した。ウェスタンブロットを、SuperSignal West Dura キット (ThermoScientific) を使用して展開した。濃度測定分析を、ImageJ ソフトウェアを使用して行なった。

【0054】

結果

1) AON 設計

ヒト SOD1 遺伝子内でのエキソンスキッピングを誘発するために、本発明者らは、ヒト SOD1 プレ mRNA のスプライスアクセプター部位 (SA) と又はエキソンスプライシングエンハンサー (ESE) 配列とに干渉する RNA-AON を設計した。ヒト SOD1 遺伝子は 5 つのエキソンから構成され、本発明者らは、エキソン 2 のスキッピングの誘発を計画した。実際に、SOD1 プレ mRNA からエキソン 2 をスキッピングすると、フレームシフトが誘発され、これにより切断短縮された cDNA が生成され、これによりエキソン 4 内に中途終止コドン (TGA) が生じる。エキソン 2 のスキッピングを最適化するために、本発明者らは、イントロン 1 内の SA 配列に標的化する AON 配列を設計し、そして ESE 配列の標的化は、SA を上回る利点を示す可能性があることが報告されていたので (Goyenvalle et al., 2004)、本発明者らはまた、エキソン 2 の ESE 配列を標的化する AON も設計した。ESE は、Ser-Arg-リッチ (SR) タンパク質に結合することによってスプライシングを促進するエキソン内部配列である (Cartegni et al., 2002)。これらの配列を決定するために、本発明者らは、4 つの最も豊富な SR タンパク質 (SF2/ASF、SC35、SRp40、及び SRp55) に対する結合部位を予測する ESEfinder ソフトウェアを使用した。図 1 に、エキソン 2 内の有望な ESE 配列が示されている。

【0055】

推定標的配列が一旦同定されると、本発明者らは、Aartsma-Rus et al. (Aartsma-Rus et al., 2009) によって公表された特殊な原則に従って、ヒト SOD1 エキソン 2 を特異的にスキップする 4 つの AON を設計した。したがって、各 AON (表 1) は 20 ヌクレオチド長となるように設計され、本発明者らは、最も高い Tm を有する AON を選択し、本発明者らは、RNAstructure 5.3 ソフトウェアを使用して、AON と標的化エキソンの両方の予測される二次構造の自由エネルギーを評価した。本発明者らはまた、陰性対照 (AON-CTR) としての混合 AON 配列も選択した。配列対照: 5' GCUCAUUCGCUUUC AUUCUU 3' (配列番号 7)。

【0056】

2) インビトロでの AON の選択

本発明者らは、HEK-293T 細胞へのトランスフェクション後、hSOD1 mRNA レベルを低減させるその効力に基づいて最適な AON を選択した。細胞トランスフェクションを最適化するために、本発明者らは、化学的に改変された 2'-O-メチルホスホロチオエート (2'-OMePS) AON (Eurogentec) を使用した。なぜなら、この改変は、ヌクレアーゼ及び RNase H による分解に対するかなりの抵抗性を付与するからである (Aartsma-Rus et al., 2009)。対照として本発明者らは、各実験でトランスフェクション効率の対照としても使用されていた、混合した蛍光 (FAM) 標識された AON を使用した。RT-PCR 分析後、本発明者らは、全試料においてヒト SOD1 mRNA 完

10

20

30

40

50

全長(355bp)に相当する、PCR産物を観察した。SOD1-AONでトランスフェクトされた細胞において、本発明者らは、スキッピングされたエキソン2の形態に相当する、追加の258bpの産物を観察した(図2)。PCR産物をシーケンスした後、本発明者らは、小さな258bpのバンドに相当する、ヒトSOD1-mRNA内でのエキソン2のスキッピングと(図3)、エキソン4の中途終止コドンの発生を確認した。本発明者らは、選択されたAONが、ヒトSOD1エキソン2のスキッピングを誘発することができたと結論付けた。

【0057】

ヒトSOD1 mRNAレベルの低減に関して最も効果的な配列を同定するために、完全長SOD1 mRNAの発現を、Taqman法を使用してリアルタイムPCRによって定

10

【0058】

AON1及びAON4は、ヒトSOD1 mRNA低減に関して最も高い効率を示した(それぞれ85%及び81%)。したがって、本発明者らは、これらの2つのAONを選択して、U7 snRNA配列と融合させて一緒にscAAV骨格へとクローニングした。U7プロモーターに付加された配列は、CCCACACCTTCACTGGTCCACCATGCAGGCCTTCAGTCAG(配列番号8)である。

【0059】

U7+アンチセンスの完全配列は：

【表2】

TAACAACATAGGAGCTGTGATTGGCTGTTTTTCAGCCAATCAGCACTGACTCATTT
GCATAGCCTTTACAAGCGGTCACAACTCAAGAAACGAGCGGTTTTAATAGTCTT
TTAGAATATTGTTTATCGAACCGAATAAGGAACTGTGCTTTGTGATTCACATATC
AGTGGAGGGGTGTGGAAATGGCACCTTGATCTCACCTCATCGAAAGTGGAGTTG
ATGTCCTTCCCTGGCTCGCTACAGACGCACTTCCGCAAGCCCACACCTTCACTGGT
CCACCATGCAGGCCTTCAGTCAGAATTTTTGGAGCAGGTTTTCTGACTTCGGTCG
GAAAACCCCTCCCAATTTCACTGGTCTACAATGAAAGCAAACAGTTCTCTTCCC
CGCTCCCCGGTGTGTGAGAGGGGCTTTGATCCTTCTCTGGTTTTCTAGGAAACGC
GTATGTG (配列番号:9).

20

30

である。

【0060】

3) scAAV10-U7-hSOD1の生成

U7 snRNAは、通常、ヒストンプレmRNA 3'末端プロセッシングに関与しているが、これをSm/Lsmタンパク質の結合部位(U7 smOpt)における小さな変化によるスプライシング調節のための万能ツールへと変換することができる(Schumperli and Pillai, 2004)。それ故、snRNP粒子に包埋されたアンチセンス配列は分解から保護され、核内に蓄積し、そこでスプライシングが起こる。SOD1^{G93A}マウスにAONを送達するために、本発明者らは、D.Schumperli(Schumperli and Pillai, 2004)によって記載されたU7カセットを使用した。それは、天然U7プロモーター(-267位から+1位)、U7 smOpt snRNA、及び116位に至るまでの下流配列からなる。このカセットをscAAV骨格の逆位末端配列(ITR)間に配置し、U7 smOpt内のヒストンプレmRNAに対して相補的な18塩基の天然配列を、2つの選択された20塩基のAON配列(及び対照配列、CTR; Pietri-Rouxel, 2009 et al.によって記載)によって置き換え、本発明者ら是对応するウイルス粒子(すなわち、AAV10-U7-CTR及びAAV10-U7-hSOD1)を作製した。

40

50

【0061】

4) インビボでの SOD1^{G93A} マウスにおける hSOD1 エキシソンのスキッピング
hSOD1 RNA レベルを低減させるその効力を分析するために、AAV10-U7-CTL 及び AAV10-U7-hSOD1 を、50 日令の SOD^{G93A} マウスの脊髄に直接注射した (AAV10-U7-hSOD1 では n = 3、AAV10-U7-CTR では n = 2)。注射から 4 週間後、脊髄を取り出し、SOD mRNA を、RT-PCR を使用してエキソン 2 のスキッピングについて分析した (図 5)。ヒト SOD1 発現もまた、以前のインビトロでの実験に記載されているようにリアルタイム PCR 分析によって評価した (図 6)。予想された通り、エキソン 2 のスキッピングされた形態が、AAV10-U7-hSOD1 を注射された動物の脊髄においてのみ観察され (図 5)、完全長の hSOD1 mRNA は 80% 超低減した (図 6)。

10

【0062】

RNA 分析と同様に、エキソン 2 のスキッピングの効果をさらに、SOD^{G93A} マウスの脊髄への対照及び U7-hSOD1 AAV ベクターの注射から 1 か月後にタンパク質レベルで分析した (各群において n = 3)。ウェスタンブロット分析は、3 匹の AAV10-U7-hSOD1 の注射されたマウスの脊髄において、対照と比較して、hSOD1 タンパク質の 70% の低減を示した (図 7)。

【0063】

その後、ALS マウスにおける AAV10-U7-hSOD1 ベクターの有望な治療効果を、中枢性及び全身性の hSOD1 の低減の両方を達成するために、症候発生前の SOD^{G93A} マウスへの静脈内注射 (IV) と脳室内注射 (ICV) の併用によって調べた (P1 での注射; n = 4 は 6×10^{14} vg/kg の AAV10-U7-hSOD1 を用いて、n = 3 は同じ用量の AAV10-U7-CTR を用いる)。

20

【0064】

4 匹の AAV10-U7-hSOD1 を注射されたマウスの生存期間は、対照を注射されたマウスと比較して有意に延長され、平均生存期間は 260 日間であり、これに対して注射されていない対照では 128 日間であった (図 7)。この生存期間の延長 (最大 134%) は、SOD1 関連 ALS マウスにおいて現在までに報告されている中で最も高く、このことは本発明者らの分子アプローチの独創性及び卓越性を示唆する。

【0065】

結論

本研究は、家族性筋萎縮性側索硬化症のための非常に効果的な遺伝子療法処置を同定することを目指した橋渡しプロジェクトである。血流及び CNS への scAAV10 の共送達 (Co-IV/ICV) は、広範な脊髄及び全身への遺伝子送達のための強力なアプローチである。Co-IV/ICV AAV10 遺伝子導入と効果的なエキソンスキッピング戦略の組合せは、hSOD1 の強力なサイレンシングを可能とし、そして ALS げっ歯類において現在までに報告されている中で最も高い生存期間の延長を媒介する。比較すると、ASO の脳灌流を使用したクリーブランド / アイシス臨床試験は、ラット生存期間の 9.1% の延長に基づき (Smith et al., 2006)、38% の生存期間の延長が近年、AAV9-shRNA を使用して Kaspar のチームによって公表された (Foust et al., 2013)。

30

40

【0066】

これらの予備調査結果は、ALS マウス生存期間をさらにもっと延長させるための新たな現実的な場所を開拓し、次の将来における臨床開発へと直接橋渡しされ得る。

【0067】

実施例 1 に提示された結果は、AAV10-U7-hSOD1 の注射が、hSOD1 をサイレンス状態とすることによって SOD1^{G93A} マウスにかなりの治療利点を提供することを示した。

【0068】

実施例 2: 「消去 - 置換」戦略

50

AAV10-U7-hSOD1送達の治療利点を、野生型hSOD1タンパク質のさらなる発現によって改善することができる。実際に、突然変異型のヒトSOD1 mRNAに特異的に標的化しないAAV10-U7-hSOD1の送達は、内因性野生型SOD1タンパク質のサイレンシングも誘発する可能性があり、これにより、副作用がトリガーされる可能性がある。AAV10-U7-hSOD1による内因性野生型SOD1のサイレンシングは、このベクターに、エキソンのスキッピングを回避するための「サイレント」突然変異を含む野生型SOD1配列を導入することによって補うことができる。

【0069】

以下の章は、これに関するデータを提示する。

【0070】

材料及び方法
ベクター

N末端又はC末端にflagタグを有するhSOD1optをコードしているDNA配列をGene Art (Life technologies) によって合成し、そしてまず、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーター、キメラ グロビンイントロン、独特な制限酵素部位NheI、及びサルウイルス40 (SV40) 転写終結シグナルを有する、本発明者らの研究室で入手できる、空のpAAVベクターに酵素的消化によってクローニングした。PGKプロモーター制御下にあるhSOD1optを含有しているカセットを、PCRによって、pAAV-U7-SOD1ベクター又はpAAV-U7-CTRに、U7プロモーターの前にそして2つの方向でクローニングした。同じ方法を用いて、研究室で入手可能なプラスミドから増幅させたPGK-GFPを、対照として、各々のpAAV-U7に挿入した。

【0071】

ベクターの命名法は以下の表に提供されている：

【0072】

【表3】

ベクター名	説明
消去／置換戦略用のベクター	
pAAV-U7-hSOD1-Flag-hSOD1opt	N末端にFlagを有するPGK-hSOD1optを共発現しているAAV-U7-hSOD1
pAAV-U7-hSOD1-hSOD1opt-Flag	C末端にFlagを有するPGK-hSOD1optを共発現しているAAV-U7-hSOD1
対照ベクター	
pAAV-U7-CTR-Flag-hSOD1opt	N末端にFlagを有するPGK-hSOD1optを共発現しているAAV-U7-CTRベクター
pAAV-U7-CTR-hSOD1opt-Flag	C末端にFlagを有するPGK-hSOD1optを共発現しているAAV-U7-CTR
pAAV-U7-hSOD1-GFP	PGK-GFPを共発現しているAAV-U7-hSOD1
pAAV-U7-hSOD1-GFP	PGK-GFPを共発現しているAAV-U7-CTR

【0073】

細胞

各プラスミド 2 µgを、FBSを含まないOPTIMEM (Life technologies) 培地中でリポフェクトアミン及びPlus試薬 (Life technologies) を用いてトランスフェクトした (製造業者の説明書に従って)。37 °Cで5% CO₂ 中で3時間後、トランスフェクションを、10% FBSを含むDMEMの添加により停止した。

【0074】

ウェスタンブロット分析

細胞をトランスフェクションから48時間後に収集した; タンパク質溶解液を実施例1に記載のように調製した。ウェスタンブロットを、以下の抗体を用いて行なった: 抗Flag M2抗体 (Sigma) 及び抗アクチン抗体 (Sigma)。マウス及びウサギIgGに対するペルオキシダーゼにコンジュゲートさせた抗血清はAmersham Pharmacia Biotechから購入した。ウェスタンブロットを、SuperSignal West Duraキット (Thermoscientific) を使用して展開した。

【0075】

結果

毒性を有する突然変異型のhSOD1の抑制及び機能的hSOD1タンパク質の発現の両方を得るために、本発明者らは、「消去 - 置換」戦略を考え、ここではサイレンシング用のpAAV-U7-hSOD1ベクターを、野生型SOD1発現のための外因性hSOD1 cDNAと共に提供した。野生型hSOD1コード配列 (hSOD1 opt) は、U7アンチセンス作用に対して不応性とするためにアンチセンス配列に対して最大数の mismatchesを有するように設計された (GeneArt, Life technologies)。外因性hSOD1タンパク質の同定を可能とするために、Flag-タグペプチドをcDNAに融合させた。FlagのC末端又はN末端の位置は、hSOD1 opt発現及び/又は機能に対して影響を及ぼす可能性があるため、これをタンパク質のN末端 (Flag-hSOD1 opt) 又はC末端 (hSOD1 opt-Flag) のいずれかに付加した。配列をホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーターの制御下に、U7プロモーターと同じ方向に又は逆の方向に配置した。最後の治療用AAVベクターのAAV-U7-hSOD1-Flag-hSOD1 opt及びAAV-U7-hSOD1-Flagを図9に示す。PGKプロモーターの制御下に置かれた緑蛍光タンパク質 (GFP) をコードしている配列も、対照としてのpAAV-U7ベクターに挿入した (pAAV-U7-hSOD1-GFP)。

【0076】

これらの新規なAAV-U7サイレンシングベクターがhSOD1の発現を同時に誘発することができるかどうかを調べるために、ヒト胚性腎臓 (HEK-293T) 細胞をまず、pAAV-U7-hSOD1-GFPを用いてトランスフェクトし、GFPの発現を48時間後に落射蛍光顕微鏡を用いてのライブイメージングによって調べた (図9b)。GFP蛍光の結果は、U7分子 (U7-SOD1又はU7-CTR) とGFP発現カセットの両方を有する2つのベクターが、タンパク質の生成にとって効率的であることを示した。さらに、hSOD1 optの発現を、トランスフェクションから48時間後に細胞溶解液中でflagタグについてウェスタンブロット分析によって評価し (図9c)、これによりタグ化されたhSOD1 optタンパク質の効率的な合成が判明した。

【0077】

要するに、これらのデータは、突然変異型のhSOD1 mRNA内でのエキソンスキッピングを誘発するAONは、hSOD1タンパク質レベルを強く低減させるように設計され得、外因性hSOD1タンパク質の同時発現は、最適化コード配列を使用して行なうことができることを示した。

【0078】

参考文献

10

20

30

40

【表 4】

Aartsma-Rus, A., van Vliet, L., Hirschi, M., Janson, A.A., Heemskerk, H., de Winter, C.L., de Kimpe, S., van Deutekom, J.C., t Hoen, P.A., and van Ommen, G.J. (2009). Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther* 17, 548-553.

Betts, C., Saleh, A.F., Arzumanov, A.A., Hammond, S.M., Godfrey, C., Coursindel, T., Gait, M.J., and Wood, M.J. (2012). Pip6-PMO, A New Generation of Peptide-oligonucleotide

Conjugates With Improved Cardiac Exon Skipping Activity for DMD Treatment. *Molecular therapy Nucleic acids* 1, e38.

Boudreau, R.L., Rodriguez-Lebron, E., and Davidson, B.L. (2011). RNAi medicine for the brain: progresses and challenges. *Hum Mol Genet* 20, R21-27.

Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285-298.

Cazzella, V., Martone, J., Pinnaro, C., Santini, T., Twayana, S.S., Sthandier, O., D'Amico, A., Ricotti, V., Bertini, E., Muntoni, F., et al. (2012). Exon 45 skipping through U1-snRNA antisense molecules recovers the Dys-nNOS pathway and muscle differentiation in human DMD myoblasts. *Mol Ther* 20, 2134-2142.

10

Chan, J.H., Lim, S., and Wong, W.S. (2006). Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 33, 533-540.

Crooke, S.T. (2004). Antisense strategies. *Current molecular medicine* 4, 465-487.

De Angelis, F.G., Sthandier, O., Berarducci, B., Toso, S., Galluzzi, G., Ricci, E., Cossu, G., and Bozzoni, I. (2002). Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9456-9461.

20

Dominguez, E., Marais, T., Chatauret, N., Benkhalifa-Ziyyat, S., Duque, S., Ravassard, P., Carcenac, R., Astord, S., Pereira de Moura, A., Voit, T., et al. (2011). Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum Mol Genet* 20, 681-693.

Dorn, G., Patel, S., Wotherspoon, G., Hemmings-Mieszczyk, M., Barclay, J., Natt, F.J., Martin, P., Bevan, S., Fox, A., Ganju, P., et al. (2004). siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res* 32, e49.

30

Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.A., and Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 17, 1187-1196.

Foust, K.D., Salazar, D.L., Likhite, S., Ferraiuolo, L., Ditsworth, D., Ilieva, H., Meyer, K., Schmelzer, L., Braun, L., Cleveland, D.W., et al. (2013). Therapeutic AAV9-mediated Suppression of Mutant SOD1 Slows Disease Progression and Extends Survival in Models of Inherited ALS. *Mol Ther*.

40

Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78, 6381-6388.

Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854-11859.

Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796-1799.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.

Hu, C., Busuttil, R.W., and Lipshutz, G.S. (2010). RH10 provides superior transgene expression in mice when compared with natural AAV serotypes for neonatal gene therapy. *The journal of gene medicine* 12, 766-778.

Ilieva, H., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187, 761-772.

Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P., and Manjunath, N. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448, 39-43.

Lundberg, M., Wikstrom, S., and Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther* 8, 143-150.

Malhotra, M., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Kahouli, I., and Prakash, S. (2013). Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. *International journal of nanomedicine* 8, 2041-2052.

McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8, 1248-1254.

Miller, T.M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S.H., Andres, P.L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., et al. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet neurology* 12, 435-442.

Pietri-Rouxel F., Gentil C, Vassilopoulos S, Baas D, Mouisel E, Ferry A, Vignaud A, Hourdé C, Marty I, Schaeffer L, Voit T, Garcia L. et al. (2009) DHPR alpha1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J* 29, 643-654.

Ralph, G.S., Radcliffe, P.A., Day, D.M., Carthy, J.M., Leroux, M.A., Lee, D.C., Wong, L.F., Bilsland, L.G., Greensmith, L., Kingsman, S.M., et al. (2005). Silencing mutant SOD1 using

10

20

30

40

RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11, 429-433.

Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensadoun, J.C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C.E., and Aebischer, P. (2005). Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11, 423-428.

Reed, R., and Maniatis, T. (1988). The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. *Genes & development* 2, 1268-1276.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.

Schumperli, D., and Pillai, R.S. (2004). The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell Mol Life Sci* 61, 2560-2570.

Smith, R.A., Miller, T.M., Yamanaka, K., Monia, B.P., Condon, T.P., Hung, G., Lobsiger, C.S., Ward, C.M., McAlonis-Downes, M., Wei, H., et al. (2006). Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 116, 2290-2296.

Wang, H., Yang, B., Qiu, L., Yang, C., Kramer, J., Su, Q., Guo, Y., Brown, R.H., Jr., Gao, G., and Xu, Z. (2013). Widespread spinal cord transduction by intrathecal injection of rAAV delivers efficacious RNAi therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*.

Ward, A.J., Norrbom, M., Chun, S., Bennett, C.F., and Rigo, F. (2014). Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 42, 5871-5879.

Yamada, T., Das Gupta, T.K., and Beattie, C.W. (2013). p28, an anionic cell-penetrating peptide, increases the activity of wild type and mutated p53 without altering its conformation. *Molecular pharmaceutics* 10, 3375-3383.

Yang, B., Li, S., Wang, H., Guo, Y., Gessler, D.J., Cao, C., Su, Q., Kramer, J., Zhong, L., Seher Ahmed, S., et al. (2014). Global CNS Transduction of Adult Mice by Intravenously Delivered rAAVrh.8 and rAAVrh.10 and Nonhuman Primates by rAAVrh.10. *Mol Ther*.

Zhang, H., Yang, B., Mu, X., Ahmed, S.S., Su, Q., He, R., Wang, H., Mueller, C., Sena-Esteves, M., Brown, R., et al. (2011). Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Mol Ther* 19, 1440-1448.

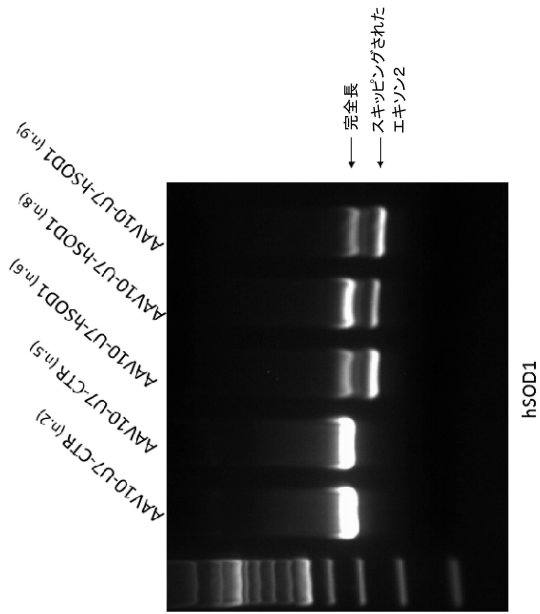
10

20

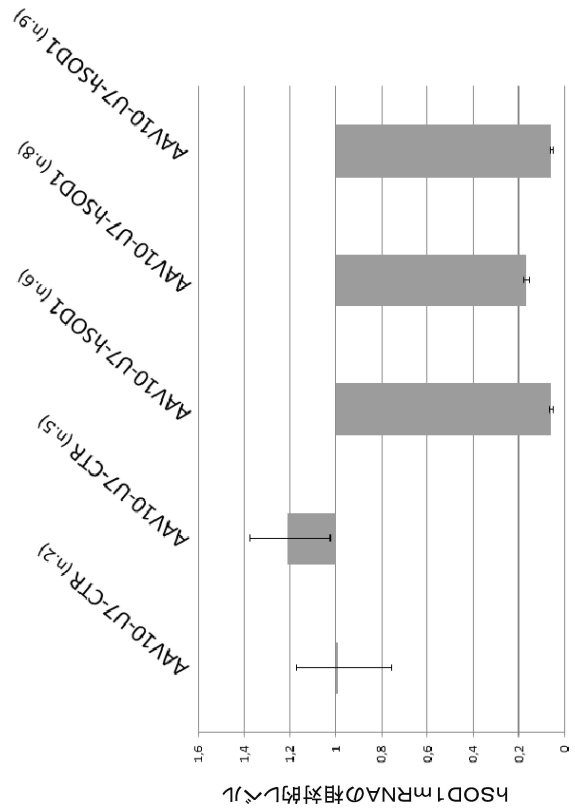
30

40

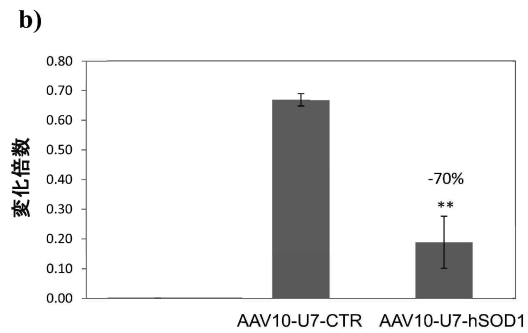
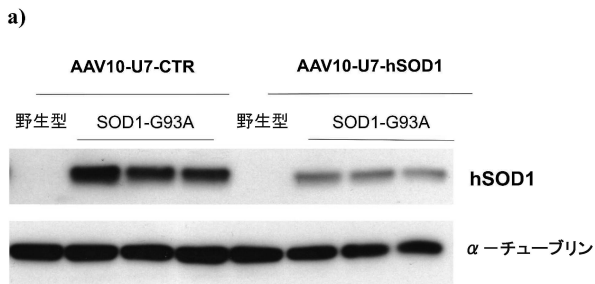
【 図 5 】



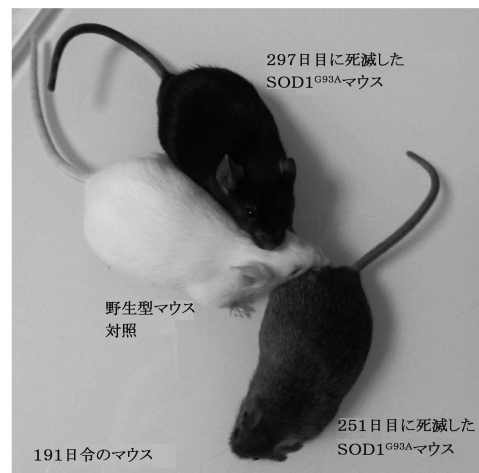
【 図 6 】



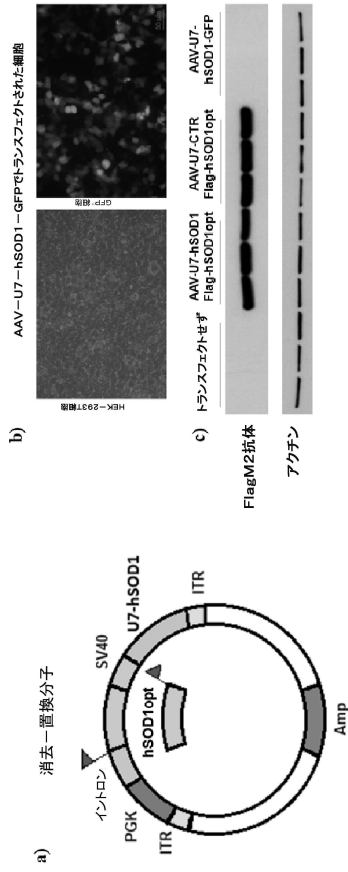
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

[0006872479000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 35/76 (2015.01)		A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)		A 6 1 K 31/7105
A 6 1 P 21/00 (2006.01)		A 6 1 P 21/00

(73)特許権者 596076573

ユニヴェルシテ・ピエール・エ・マリー・キュリー・パリ・シス
フランス国、7 5 2 3 0 ・パリ・セデクス・0 5、プラス・ジュシュー、4

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 バルカ, マルティーン

フランス国、エフ - 9 4 2 2 0 シャレントン・ル・ボン、リュ・ゲラン 2 1

(72)発明者 ビフェリ, マリア - グラジア

フランス国、エフ - 7 5 0 0 1 パリ、リュ・デ・オルフェーヴル 3

(72)発明者 ヴォワ, トマ

イギリス国、ロンドン イー 1 4 9 アールユー、サウス・クウェイ・スクエア 3、ディスカバリー・ドック・イースト 2

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 9 0 0 5 9 (W O , A 1)

Nucleic Acids Research , 2 0 1 4 年 , Vol.42, No.9 , pp.5871-5879, Supplemental 1-15

Nature , 1 9 9 3 年 , Vol.362 , pp.59-62

Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 8 3 年 , Vol.80 , pp.5465-5469

Database: GenBank [online], Accession No.NM_000454 , 2 0 0 3 年 1 2 月 2 0 日 , [retrieved on 2019.06.13], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000454.3>

Molecular Therapy , 2 0 0 9 年 , Vol.17, No.7 , pp.1234-1240

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N

A 6 1 K

A 6 1 P

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)