

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-516186
(P2025-516186A)

(43)公表日 令和7年5月27日(2025.5.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 7
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	未請求 (全66頁) 最終頁に続く

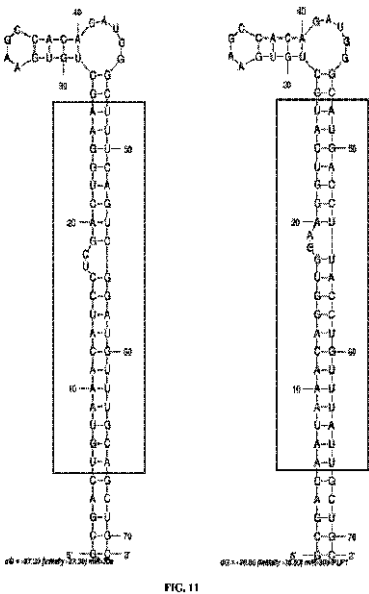
(21)出願番号	特願2024-563225(P2024-563225)	(71)出願人	524391138
(86)(22)出願日	令和5年4月24日(2023.4.24)		マーテル インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年11月7日(2024.11.7)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066117		8 8 0, ウェークフィールド, エッジ
(87)国際公開番号	WO2023/212521		ウォーター プレイス 3 0 1, スー
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)		ト 3 3 0
(31)優先権主張番号	63/363,529	(74)代理人	110002077
(32)優先日	令和4年4月25日(2022.4.25)		園田・小林弁理士法人
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	レイヤー, リチャード
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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	(72)発明者	7 5 2, マールボロ, シンプソン ロード 2 0 0
	最終頁に続く		バイケット, マーク
			アメリカ合衆国 メイン 0 3 9 1 1,
			ヨーク ハーバー, ピー・オー・ボック
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ミエリンの障害の治療

(57)【要約】

本開示は、ミエリンの欠乏又は機能不全に関連する疾患及び障害の治療に使用するためのRNA分子、組換え核酸、及び遺伝子治療ベクターに関する。

【選択図】図11



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

乏突起膠細胞において標的遺伝子の発現を低減する、又はミエリンの遺伝性若しくは後天性障害を治療する方法であって、

前記乏突起膠細胞の細胞表面に対する優先的な指向性を有するアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子を用意することであって、前記 AAV 粒子が、5' から 3' に、

5' 逆方向末端反復（ITR）、

プロモーター配列領域、

前記標的遺伝子を標的とする pri-又は pre-miRNA をコードするポリヌクレオチド、及び

3' ITR を含む、核酸をカプシド化する、用意することと、

前記 AAV 粒子を前記乏突起膠細胞と接触させることと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記核酸が、前記ポリヌクレオチドと前記 3' ITR との間に、転写後調節エレメント及び poly A シグナル配列領域のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 pri-又は pre-miRNA が、

（a）pri-又は pre-miRNA 足場、

（b）異種ガイド鎖、及び

（c）異種パッセンジャー鎖、を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 pri-又は pre-miRNA 足場が、ヒト miRNA に由来するヒト pri-又は pre-miRNA 足場である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

ヒトマイクロRNA が、ヒト mir-16-1、miR-21、miR-23a、miRNA-30a、miR-31、miR-122、miR-155、又は miR-451 に由来する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ヒト pri-又は pre-miRNA 足場が、前記ヒト miRNA の天然ガイド鎖の天然配列及び天然パッセンジャー鎖の天然配列を含まない、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記異種ガイド鎖が、前記天然ガイド鎖の前記天然配列の置き換えとして、前記ヒト pri-又は pre-miRNA 足場に挿入される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記異種ガイド鎖が、前記標的遺伝子の mRNA に相補的である、請求項 3～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

細胞質ヌクレアーゼによって前記 pri-又は pre-miRNA を処理すると、前記異種ガイド鎖が RISC 複合体に組み込まれて、前記 RISC 複合体が前記標的遺伝子の前記 mRNA を標的とし、前記標的遺伝子の発現を下方調節することを可能にする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記異種ガイド鎖が、タンパク質の mRNA に相補的であり、その排除が、前記ミエリンの遺伝性又は後天性障害の治療転帰を改善する、請求項 3～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記ミエリンの遺伝性又は後天性障害が、ペリツェウス・メルツバッハー病である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記タンパク質が、PLP1 である、請求項 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記異種ガイド鎖が、配列番号 42～80 のうちの 1 つに対して少なくとも 90 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ミエリンの遺伝性又は後天性障害が、多系統萎縮症である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

標的とされる前記タンパク質が、アルファシヌクレインである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記異種ガイド鎖が、配列番号 122～161 のうちの 1 つに対して少なくとも 90 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記ミエリンの遺伝性又は後天性障害が、基底核及び小脳萎縮を伴う低髄鞘形成症（H-ABC）である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

標的とされる前記タンパク質が、微小管関連タンパク質チューブリンベータ-4a である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記異種ガイド鎖が、配列番号 204～244 のうちの 1 つに対して少なくとも 90 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ヌクレオチド配列が、21～30 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 13、16、及び 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

第 1 の RNA 配列及び第 2 の RNA 配列を含む RNA 分子であって、前記第 1 及び第 2 の RNA 配列が実質的に相補的であり、前記第 1 の RNA 配列が、少なくとも 19 ヌクレオチドの配列長を有し、配列番号 2～40、82～121、及び 163～203 からなる群から選択される 1 つに少なくとも 90 % 相補的である、RNA 分子。

【請求項 22】

pre-miRNA 足場又は pri-miRNA 足場に含まれる、請求項 21 に記載の RNA 分子。

【請求項 23】

前記 pri-又は pre-miRNA 足場が、ヒトマイクロ RNA に由来するヒト pri-又は pre-miRNA 足場である、請求項 22 に記載の RNA 分子。

【請求項 24】

前記ヒトマイクロ RNA が、ヒト mir-16-1、mir-21、mir-23a、miRNA-30a、mir-31、mir-122、mir-155、又は mir-451 である、請求項 23 に記載の RNA 分子。

【請求項 25】

前記ヒト pri-又は pre-miRNA 足場が、前記ヒトマイクロ RNA の天然ガイド鎖の天然配列及び天然パッセンジャー鎖の天然配列を含まない、請求項 24 に記載の RNA 分子。

【請求項 26】

第 1 の鎖が、前記天然ガイド鎖の前記天然配列の置き換えとして、前記ヒト pri-又は pre-miRNA 足場に挿入される異種ガイド鎖である、請求項 25 に記載の RNA 分子。

【請求項 27】

請求項 21～26 のいずれか一項に記載の RNA 分子をコードする、ポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

請求項 27 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現カセット又は発現ベクター。

【請求項 29】

5' から 3' に、

5' 逆方向末端反復 (ITR)、

プロモーター配列領域、

転写後調節エレメント、

poly A シグナル配列領域、及び

3' ITR のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 28 に記載の発現カセット又は発現ベクター。

10

【請求項 30】

ウイルスベクターである、請求項 29 に記載の発現ベクター。

【請求項 31】

前記ウイルスベクターが、AAV ベクターである、請求項 30 に記載の発現ベクター。

【請求項 32】

前記 AAV ベクターが、乏突起膠細胞に対する優先的な指向性を有する、請求項 31 に記載の発現ベクター。

【請求項 33】

前記 AAV ベクターが、AAV-Olig001、AAV-Olig002、AAV-Olig003、又は AAV9 である、請求項 32 に記載の発現ベクター。

20

【請求項 34】

請求項 27 に記載のポリヌクレオチド、又は請求項 28 ～ 33 のいずれか一項に記載の発現カセット若しくは発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 35】

請求項 21 に記載の RNA 分子、又は請求項 27 に記載のポリヌクレオチド、又は請求項 28 ～ 33 のいずれか一項に記載の発現カセット若しくは発現ベクター、又は請求項 34 に記載の宿主細胞と、

薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項 36】

ミエリンの遺伝性又は後天性障害を治療する方法であって、それを必要とする対象に、請求項 21 に記載の RNA 分子、又は請求項 27 に記載のポリヌクレオチド、又は請求項 28 ～ 33 のいずれか一項に記載の発現カセット若しくは発現ベクター、又は請求項 34 に記載の宿主細胞、又は請求項 35 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

30

【請求項 37】

前記対象が、ヒトである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記投与が、注射を介してである、請求項 36 又は 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記 RNA 分子、又は前記ポリヌクレオチド、又は前記発現カセット、又は前記発現ベクター、又は前記宿主細胞、又は前記医薬組成物が、脳実質、脊柱管、くも膜下腔、脳の脳室、大槽、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される中枢神経系の領域に投与される、請求項 36 ～ 38 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記 RNA 分子、又は前記ポリヌクレオチド、又は前記発現カセット、又は前記発現ベクター、又は前記宿主細胞、又は前記医薬組成物が、実質内投与、髄腔内投与、脳室内投与、大槽内投与、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される方法によって投与される、請求項 36 ～ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記障害が、アレキサンダー病、ミッチェル病、自律神経系疾患を伴う常染色体顕性白質ジストロフィー (ADLD)、中枢性髄鞘形成不全白質ジストロフィー、ワーデンブル

50

グ症候群、又はヒルシュスブルング病、成人ポリグルコサン小体病（ＡＰＢＤ）、スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症、又はエカルディ・グティエール症候群である、請求項１０に記載の方法。

【請求項４２】

前記障害が、カナバン病、クラッペ病、グロバイド細胞白質ジストロフィー、Ｘ連鎖性副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、低髄鞘性白質ジストロフィーー２、ニーマン・ピック病Ｃ型、４Ｈ白質ジストロフィー／Ｐｏｌ　Ｉ　Ｉ　Ｉ関連白質ジストロフィー、ゼルウェガースペクトラム障害、中枢神経系髄鞘低下を伴う小児期運動失調、脳腱黄色腫症、ＳＯＸ１０関連末梢脱髄性ニューロパシー、成人レフサム病、自閉症スペクトラム障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、脆弱Ｘ症候群、統合失調症、多発性硬化症、視神経脊髄炎、進行性多巣性白質脳症、脳脊髄炎、橋中心髄鞘崩壊症、副腎白質ジストロフィー、ワーラー変性、視神経炎、横断性脊髄炎、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、脊髄損傷、外傷性脳損傷、放射線後損傷、化学療法の神経学的合併症、脳卒中、急性虚血性視神経障害、ビタミンＥ欠乏症、ビタミンＥ単独欠乏症候群、バッセン・コーンツヴァイク症候群、マルキアファーク・ビニャミ症候群、異染性白質ジストロフィー、三叉神経痛、急性播種性脳炎、ギリアン・バレー症候群、マリー・シャルコー・トウース病、又はベル麻痺である、請求項１０に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

20

関連出願の相互参照

本出願は、２０２２年４月２５日に提出された米国仮出願第６３／３６３，５２９号の優先権を主張する。この出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

配列表の参照

本出願は、２０２３年４月１９日に作成され、２５８，２１０バイトを含むファイルSequence_Listing_323429-00201.xmlとしてコンピュータ可読形式で提出された配列表を、参照により組み込む。

【０００３】

本開示は、ミエリンの遺伝性及び／又は後天性障害を治療するための組成物及び方法に関する。

30

【背景技術】

【０００４】

脳及び脊髄を含むヒト中枢神経系（ＣＮＳ）は、ニューロン及びグリアの２つのタイプの細胞で構成される。ニューロンは、核（細胞の遺伝子が位置する場所）を保持する細胞体、細胞体から離れて伸びる軸索（軸索末端で終わる）、及び細胞体から分岐し、他のニューロンからの軸索末端と接続する樹状突起を有する。ニューロンは、細胞体及び樹状突起（他のニューロンから）で情報を受け、この情報をその軸索に沿って他のニューロンに送る。情報は、活動電位として既知の電気信号の形態で軸索の長さを進む。軸索の末端では、活動電位は、神経伝達物質の放出（神経伝達物質が移動する細胞間の小さい空間であるシナプスへ）を誘発する。中枢神経系の全ての活動、すなわち、思考、感覚情報の処理、記憶の格納、並びに筋肉及び腺の制御は、相互に接続されたニューロンのネットワークによって行われる。

40

【０００５】

ＣＮＳのグリア細胞は、ニューロンの機能を支援する。これらの細胞には、アストロサイト、ミクログリア、及び乏突起膠細胞が含まれる。アストロサイトは、血液脳関門（ＢＢＢ）を構成し、ニューロンに栄養素を供給し、細胞外イオンバランス及び神経伝達物質レベルを維持する。ミクログリアは、ＣＮＳを通して遊走し、損傷した又は不要な物質を除去するマクロファージに類似する貪食細胞である。乏突起膠細胞は、中枢神経系のミエリン産生細胞である。

50

【0006】

ミエリンは、高レベルの飽和長鎖脂肪酸、スフィンゴ糖脂質、コレステロール、及びタンパク質で構成される構造的に複雑な物質である。乏突起膠細胞は、シートのような突起を伸ばすことによってミエリンを作出し、その各々は、軸索のセグメントに接触してしっかりと複数回巻き付き、ミエリン鞘の独自のアーキテクチャを作出する。同じ軸索上で、隣接するミエリンセグメントは異なる乏突起膠細胞に属し、単一の乏突起膠細胞は最大50個の軸索セグメントを髄鞘形成することができる (Stadelmann et al., 2019)。乏突起膠細胞のミエリンは、活動電位の迅速な伝導を促進し、軸索の代謝ニーズを支援する。乏突起膠細胞はまた、細胞外液調節に関与し、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、又はインスリン様成長因子-1 (IGF-1) などの神経栄養因子の産生を通じて神経栄養支援を提供する (Bradland Lassmann, 2010)。

10

【0007】

中枢神経系は、概して、ニューロンの細胞体及び樹状突起ネットワークを含む「灰白質」、並びに乏突起膠細胞によって産生されるミエリンによって包まれる軸索束からなる「白質」に編成される。ミエリン鞘は脂質脂肪含有量が高く、白みがかった外観となっている。ミエリンは、神経伝達において重要な役割を果たしている。乏突起膠細胞の障害は、白質の完全性を破壊し、白質変性 (脱髄) 並びに脳及び脊髄内の神経伝達の喪失をもたらす。

20

【0008】

遺伝性又は後天性のミエリン関連障害は、何百万人もの人々に影響を及ぼし、罹患者及びその家族に重い負担を課す。これらの障害の多くの根底にある病理学的過程は、依然としてほとんど理解されておらず、疾患改変療法はほとんど存在しない。したがって、これらの障害を治療するための治療剤が必要である。

【発明の概要】

【0009】

本開示は、いくつかの態様において、上で言及される必要性に対処する。

【0010】

本発明の一態様は、乏突起膠細胞において遺伝子の発現を低減する方法、又はミエリンの遺伝性若しくは後天性障害を治療する方法を提供し、方法は、乏突起膠細胞の細胞表面に対する優先的な指向性を有するアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子を含む組成物を用意することを含み、AAV粒子は、ポリヌクレオチドをカプシド化し、ポリヌクレオチドは、5'逆方向末端反復 (ITR)、プロモーター配列領域、当該遺伝子を標的とするpri-又はpre-miRNAをコードするポリヌクレオチド、任意選択で転写後調節エレメント (例えば、ウッドチャック肝炎の転写後調節エレメント)、polyAシグナル配列領域、及び3'ITRを含む。

30

【0011】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ヒトmir-16-1、miR-21、miR-23a、miRNA-30a、miR-31、miR-122、miR-155、又はmiR-451に由来するpri-又はpre-miRNA足場であり、pri-又はpre-miRNA足場は、pre-miRNAのガイド鎖及びパッセンジャー鎖の天然配列を除き、異種ガイド鎖は、ガイド鎖の天然配列の置き換えとして足場に挿入され、異種ガイド鎖は、標的遺伝子のmRNAに相補的であり、細胞質ヌクレアーゼによってpri-又はpre-miRNAを処理すると、異種ガイド鎖はRISC複合体に組み込まれて、RISC複合体が標的遺伝子のmRNAを標的とし、遺伝子の発現を下方調節することを可能にする。

40

【0012】

ある特定の実施形態では、異種ガイド鎖は、タンパク質のmRNAに相補的であり、その排除は、ミエリンの遺伝性又は後天性障害、例えば、ペリツェウス・メルツバッハー病、多系統萎縮症、又は基底核及び小脳萎縮を伴う低髄鞘形成症の治療転帰を改善する。

50

【0013】

一態様では、本開示は、乏突起膠細胞において標的遺伝子の発現を低減する方法、又はミエリンの遺伝性若しくは後天性障害を治療する方法を提供する。方法は、(1) 乏突起膠細胞の細胞表面に対する優先的な指向性を有するAAV粒子を用意することであって、AAV粒子が、5'から3'に、5' ITR、プロモーター配列領域、当該標的遺伝子を標的とするpri-又はpre-miRNAをコードするポリヌクレオチド、及び3' ITRを含む核酸をカプシド化する、用意することと、(2) AAV粒子を乏突起膠細胞と接触させることとを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリヌクレオチドと3' ITRとの間に、転写後調節エレメント及びpolyAシグナル配列領域のうちの1つ以上を更に含み得る。pri-又はpre-miRNAは、(a) pri-又はpre-miRNA足場、(b) 異種ガイド鎖、及び(c) 異種パッセンジャー鎖を含み得る。

10

【0014】

一実施形態では、pri-又はpre-miRNA足場は、ヒトマイクロRNAに由来するhit pri-又はpre-miRNA足場である。ヒトマイクロRNAの例としては、hit mir-16-1、mir-21、mir-23a、miRNA-30a、mir-31、mir-122、mir-155、又はmir-451に由来するものが挙げられる。好ましくは、hit pri-又はpre-miRNA足場は、ヒトマイクロRNAの天然ガイド鎖の天然配列及び天然パッセンジャー鎖の天然配列を含まない。異種ガイド鎖は、天然ガイド鎖の天然配列の置き換えとして、hit pri-又はpre-miRNA足場に挿入され得る。異種ガイド鎖は、標的遺伝子のmRNAに相補的であり得る。細胞質ヌクレアーゼによってpri-又はpre-miRNAを処理すると、異種ガイド鎖はRISC複合体に組み込まれて、RISC複合体が標的遺伝子のmRNAを標的とし、標的遺伝子の発現を下方調節することを可能にする。

20

【0015】

上記の方法では、異種ガイド鎖は、タンパク質のmRNAに相補的であり得、その排除は、ミエリンの遺伝性又は後天性障害の治療転帰を改善する。一例では、ミエリンの遺伝性又は後天性障害は、ペリツェウス・メルツバッハー病であり得る。その場合、タンパク質は、PLP1であり得る。その目的のために、異種ガイド鎖は、配列番号42~80のうちの1つ、例えば、配列番号54又は配列番号75に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、又は95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み得る。別の例では、ミエリンの遺伝性又は後天性障害は、多系統萎縮症である。その場合、標的とされるタンパク質は、アルファシヌクレインであり得る。その目的のために、異種ガイド鎖は、配列番号122~161のうちの1つに対して少なくとも70%、80%、85%、90%、又は95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み得る。更なる例では、ミエリンの遺伝性又は後天性障害は、基底核及び小脳萎縮を伴う低髄鞘形成症(H-ABC)である。その場合、標的とされるタンパク質は、微小管関連タンパク質チューブリンベータ-4aであり得る。したがって、異種ガイド鎖は、配列番号204~244のうちの1つに対して少なくとも70%、80%、85%、90%、又は95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み得る。好ましくは、ヌクレオチド配列は、21~30ヌクレオチドの長さを有する。

30

40

【0016】

別の態様では、本開示は、第1のRNA配列及び第2のRNA配列を含むRNA分子を特徴とする。第1の配列及び第2のRNA配列は、実質的に相補的であり、第1のRNA配列は、少なくとも19ヌクレオチドの配列長を有し、配列番号2~40、82~121、及び163~203からなる群から選択される1つの標的配列に少なくとも70%、80%、85%、90%、又は95%、又は100%相補的である。一実施形態では、標的配列は、配列番号14又は35を含むか、又はそれである。一実施形態では、RNA分子は、ヒトマイクロRNAに由来するpre-miRNA足場又はpri-miRNA足場、例えば、hit pri-又はpre-miRNA足場に含まれてもよい。ヒトマイクロRNAの例としては、hit mir-16-1、mir-21、mir-23a、miRNA

50

−30a、miR-31、miR-122、miR-155、及びmiR-451が挙げられる。一例では、ヒトマイクロRNAは、miRNA-30aである。好ましくは、ヒトpri-又はpre-miRNA足場は、ヒトマイクロRNAの天然ガイド鎖の天然配列及び天然パッセンジャー鎖の天然配列を含まない。一例では、第1の鎖は、天然ガイド鎖の天然配列の置き換えとして、ヒトpri-又はpre-miRNA足場に挿入される異種ガイド鎖である。一実施形態では、RNA分子は、図11又は12に示される配列番号284又は285の配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【0017】

(1) 上記のRNA分子をコードするポリヌクレオチド、(2) ポリヌクレオチドを含む発現カセット又は発現ベクター、及び(3) ポリヌクレオチド又は発現カセット又は発現ベクターを含む宿主細胞は、本開示の範囲内である。発現カセット又は発現ベクターは、5'から3'に、5' ITR、プロモーター配列領域、転写後調節エレメント、poly Aシグナル配列領域、及び3' ITRのうちの1つ以上を更に含み得る。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、AAVベクターなどのウイルスベクターである。一例では、AAVベクターは、乏突起膠細胞に対する優先的な指向性を有する。そのようなAAVベクターの例としては、AAV/Olig001、AAV/Olig002、及びAAV/Olig003が挙げられる。別の例は、Powell SK et al. Mol Ther 28 (5) : 1373-1380に記載されているような、VP2領域に挿入された6つのグルタミン酸残基を有するAAV9である。

【0018】

上記のRNA分子、又はポリヌクレオチド、又は発現カセット、又は発現ベクター、又は宿主細胞を使用して、ミエリン関連障害を治療することができる。したがって、本開示は、(a) RNA分子、ポリヌクレオチド、発現カセット、発現ベクター、及び宿主細胞のうちの1つ以上と、(b) 薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を更に提供する。

【0019】

また、ミエリンの障害を治療する方法も提供される。方法は、上記のRNA分子、ポリヌクレオチド、発現カセット、発現ベクター、及び宿主細胞のうちの1つ以上を、それを必要とする対象に投与することを含む。対象は、ヒトであり得る。投与は、注射を介して行われ得る。いくつかの実施形態では、RNA分子、又はポリヌクレオチド、又は発現カセット、又は発現ベクター、又は宿主細胞、又は医薬組成物は、脳実質、脊柱管、くも膜下腔、脳の脳室、大槽、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される中枢神経系の領域に投与され得る。RNA分子、又はポリヌクレオチド、又は発現カセット、又は発現ベクター、又は宿主細胞、又は医薬組成物は、実質内投与、髄腔内投与、脳室内投与、大槽内投与、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される方法によって投与され得る。いくつかの実施形態では、障害は、ペリツェウス・メルツバッハー病、多系統萎縮症、又は基底核及び小脳萎縮を伴う低髄鞘形成症である。

【0020】

本開示はまた、同様のRNA分子、又はポリヌクレオチド、又は発現カセット、又は発現ベクター、又は宿主細胞、又は医薬組成物、又は上記と同じ様式で対象における他のミエリン障害を治療するための方法も提供する。その場合、RNA分子は、関連遺伝子(その機能獲得は障害をもたらす)のレベル又は機能を低減又は阻害することができる。障害及び関連遺伝子の例としては、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)における機能獲得変異を伴うアレキサンダー病、アシル-CoAオキシダーゼ1(ACOX1)における機能獲得変異を伴うミッチェル病、ラミンB1遺伝子(LMNB1)のゲノム重複(又は遺伝子の上流の欠失)を伴う(LMNB1遺伝子発現の増加をもたらす)自律神経系疾患を伴う常染色体顕性白質ジストロフィー(ADLD)、中枢性髄鞘形成不全白質ジストロフィー、ワーデンブルグ症候群、又はSOX10(転写因子SOX-10をコードする遺伝子)を含む22q11.2q13の重複を伴うヒルシュスプルング病、グリコーゲン分岐酵素(GBE1)の折り畳みを改変し、機能獲得をもたらす変異を伴う成人ポリグルコ

サン小体病 (APBD)、スフェロイド形成を伴い、CSF1R (コロニー刺激因子1受容体をコードする遺伝子) における機能獲得変異を伴う遺伝性びまん性白質脳症遺伝子、又はIFIH1 (インターフェロン誘導型ヘリカーゼCドメイン含有タンパク質1をコードする遺伝子) における機能獲得変異を伴うエカルディ・グティエール症候群が挙げられる。

【0021】

したがって、本開示は、本明細書に記載の遺伝子のうちの1つのレベル又は機能を低減又は阻害するRNA分子を特徴とする。RNA分子は、第1のRNA配列及び第2のRNA配列を含む。第1の配列及び第2のRNA配列は、実質的に相補的であり、第1のRNA配列は、少なくとも19ヌクレオチドの配列長を有し、本明細書に記載の遺伝子のうちの1つをコードするmRNAに少なくとも90%相補的である。一実施形態では、RNA分子は、ヒトマイクロRNAに由来するpre-miRNA足場又はpri-miRNA足場、例えば、ヒトpri-又はpre-miRNA足場に含まれてもよい。ヒトマイクロRNAの例としては、ヒトmir-16-1、mir-21、mir-23a、mirNA-30a、mir-31、mir-122、mir-155、及びmir-451が挙げられる。好ましくは、ヒトpri-又はpre-miRNA足場は、ヒトマイクロRNAの天然ガイド鎖の天然配列及び天然パッセンジャー鎖の天然配列を含まない。一例では、第1の鎖は、天然ガイド鎖の天然配列の置き換えとして、ヒトpri-又はpre-miRNA足場に挿入される異種ガイド鎖である。

【0022】

他の実施形態では、障害は、カナバン病、クラッペ病、グロバイド細胞白質ジストロフィー、X連鎖性副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、低髄鞘性白質ジストロフィー-2、ニーマン・ピック病C型、4H白質ジストロフィー/POLI-II関連白質ジストロフィー、ゼルウェガースペクトラム障害、中枢神経系髄鞘低下を伴う小児期運動失調、脳髄黄色腫症、SOX10関連末梢脱髄性ニューロパシー、成人レフサム病、自閉症スペクトラム障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、脆弱X症候群、統合失調症、多発性硬化症、視神経脊髄炎、進行性多巣性白質脳症、脳脊髄炎、橋中心髄鞘崩壊症、副腎白質ジストロフィー、ワーラー変性、視神経炎、横断性脊髄炎、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、脊髄損傷、外傷性脳損傷、放射線後損傷、化学療法の神経学的合併症、脳卒中、急性虚血性視神経障害、ビタミンE欠乏症、ビタミンE単独欠乏症候群、バッセン・コーンツヴァイク症候群、マルキアファーク・ビニャミ症候群、異染性白質ジストロフィー、三叉神経痛、急性播種性脳炎、ギリアン・バレー症候群、マリー・シャルコー・トゥース病、又はベル麻痺である。

【0023】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細は、以下の説明に記載される。本開示の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】ヌクレオチドバルジをもたらす不完全な相補性を有するヒトmir-16-1 NR_029486 (mbase受託MI0000070) (Han et al., 2006) の5'隣接配列、赤 (太字及び下線付き) 及び青 (斜体及び下線付き) として示されるガイド鎖及びパッセンジャー鎖配列を有するステムループ配列、3'隣接配列、並びにステムループ構造を示す。

【図2】ヌクレオチドバルジをもたらす不完全な相補性を有するヒトmir-21 NC_000017.11 (Yue et al., 2010) (mbase受託MI0000077) の5'隣接配列、赤 (太字及び下線付き) 及び青 (斜体及び下線付き) として示されるガイド鎖及びパッセンジャー鎖配列を有するステムループ配列、3'隣接配列、並びにステムループ構造を示す。

【図3】ヌクレオチドバルジをもたらす不完全な相補性を有するヒトmir-23a NR_029495 (mbase受託MI0000079) (van den Berg

10

20

30

40

50

e t a l . , 2 0 1 6) の 5 ' 隣接配列、赤 (太字及び下線付き) 及び青 (斜体及び下線付き) として示されるガイド鎖及びパッセンジャー鎖配列を有するステムループ配列、3 ' 隣接配列、並びにステムループ構造を示す。

【図4】ヌクレオチドバルジをもたらす不完全な相補性を有するヒトmiRNA-30a NR_029504 (m b a s e 受託MI0000088) (Z e n g e t a l . , 2 0 0 2) の 5 ' 隣接配列、赤 (太字及び下線付き) 及び青 (斜体及び下線付き) で示されるガイド鎖及びパッセンジャー鎖配列を有するステムループ配列、3 ' 隣接配列、並びにステムループ構造を示す。

【図5】ヌクレオチドバルジをもたらす不完全な相補性を有するヒトmiR-31 NR_029505.1 (m b a s e 受託MI0000089) (E l y e t a l . , 2 0 0 8) の 5 ' 隣接配列、赤 (太字及び下線付き) 及び青 (斜体及び下線付き) で示されるガイド鎖及びパッセンジャー鎖配列を有するステムループ配列、3 ' 隣接配列、並びにステムループ構造を示す。

【図6】ヌクレオチドバルジをもたらす不完全な相補性を有するヒトmiR-122 NR_029667 (m b a s e 受託MI0000442) (E l y e t a l . , 2 0 0 8) の 5 ' 隣接配列、赤 (太字及び下線付き) 及び青 (斜体及び下線付き) として示されるガイド鎖及びパッセンジャー鎖配列を有するステムループ配列、3 ' 隣接配列、並びにステムループ構造を示す。

【図7】ヌクレオチドバルジをもたらす不完全な相補性を有するヒトmiR-155 NR_030784 NC_0000021.9 (m b a s e 受託MI0000681) の 5 ' 隣接配列、赤 (太字及び下線付き) 及び青 (斜体及び下線付き) で示されるガイド鎖及びパッセンジャー鎖配列を有するステムループ配列、3 ' 隣接配列、並びにステムループ構造を示す。

【図8】ヌクレオチドバルジをもたらす不完全な相補性を有するヒトmiR-451 NR_029970 (m b a s e 受託MI0001729) (Y o d a e t a l . , 2 0 1 3) の 5 ' 隣接配列、赤 (太字及び下線付き) として示されるガイド鎖配列を有するステムループ配列、3 ' 隣接配列、並びにステムループ構造を示す。

【図9】標的領域の選択の例を示す。非商業的なウェブベースのアルゴリズムベースの設計ツールを使用して、目的の遺伝子のコード配列内に標的領域を特定した。1つの標的領域は、配列番号35であり、配列は赤 (太字及び下線付き) で示されている。標的配列に完全に相補的であるヌクレオチド配列を決定し、相補性を示すために3 ' から5 ' にアライメントして示されている。矢印の下には、配列番号75が青 (斜体及び下線付き) で5 ' から3 ' の方向に示されている。

【図10】骨格として使用されたヒトmiR-30aの (50~100ヌクレオチドの) 3 ' 及び5 ' 隣接領域、並びにループ領域 (黒) を示す。ヒトmiR-30aのガイド鎖は、赤 (太字及び下線付き) で示されている。PLP1標的配列に完全に相補的な20~22ヌクレオチド配列は、5 ' 隣接配列の後で置換され、続いて、天然に存在するマイクロRNAからのループ配列、20~22ヌクレオチドのガイド鎖の逆相補体 (10~11位の欠失によって改変されて、RISC複合体へのガイド鎖の優先的な負荷を可能にするバルジを作出する、青 (太字及び下線付き) で示されている)、次いで、3 ' 隣接配列が続く。

【図11】ヒトmiR-30aのpre-miRNAポリヌクレオチド (配列番号283) 、及びmfoldによって予測される、本開示の改変されたmiR-30a-PLP1ポリヌクレオチド (配列番号284) の保存された二次構造の例を示す。設計されたpre-miRNAであるmiR-30a-PLP1は、天然配列と同じ二次構造 (同じフレームワーク領域を有するが、異なるガイド及び鎖配列を有する) を有し、天然配列と類似の自由エネルギー (dG) を有する。結果として生じるヘアピンは、保存されたループ領域を有し、Dicerがループを除去し、dsRNA二本鎖を残すために必要な切断部位を含む。しかしながら、2つの構造は、異なるmRNA分子を標的とする。この場合、miR-30a-PLP1は、ヒトPLP1のmRNAを標的とする。右側のmiR-30

10

20

30

40

50

a-PLP1配列は、配列番号75のRNA配列を含み、ここで、Tは、Uで置き換えられている。

【図12】mfoldによって予測される、本開示の別の改変されたmiR-30a-PLP1ポリヌクレオチド（配列番号285）を示す。設計されたpre-miRNAであるmiR-30a-PLP1は、天然配列と同じ二次構造（同じフレームワーク領域を有するが、異なるガイド及び鎖配列を有する）を有し、天然配列と類似の自由エネルギー（dG）を有する。結果として生じるヘアピンは、保存されたループ領域を有し、Dicerがループを除去し、dsRNA二本鎖を残すために必要な切断部位を含む。この場合、miR-30a-PLP1は、配列番号14及び配列番号54からの21ヌクレオチドのRNA配列を含み、ヒトPLP1のmRNAを標的とする。

10

【発明を実施するための形態】

【0025】

本開示は、ミエリンの遺伝性及び／又は後天性障害、例えば、脱髄を治療するための組成物及び方法に関する。

【0026】

1. ミエリン関連障害

ミエリン関連障害としては、対象における脱髄、不十分な髄鞘形成及び髄鞘再生、又は髄鞘形成不全に関連する任意の疾患又は状態が挙げられる。そのような障害は、遺伝性であるか、後天性であるか、又はその両方であり得る。CNSにおける脱髄は、遺伝子変異（白質ジストロフィー）、自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症）、又は外傷（例えば、外傷性脳損傷、脊髄損傷、又は虚血性脳卒中）に応答して生じ得る。更に、ミエリン機能の混乱は、自閉症スペクトラム障害（ASD）、アルツハイマー病（Nasrabad et al., 2018）、多系統萎縮症（Wenning et al., 2008）、パーキンソン病（Bohnen and Albin, 2011）、脆弱X症候群（Filly, 2016）、及び統合失調症（Najjar and Pearlman, 2015）などの神経障害及び精神障害において重要な役割を果たし得る。

20

【0027】

白質ジストロフィーは、ミエリンの異常な産生、処理、又は発達に起因する、希少な、主に遺伝性の神経障害の群であり、遺伝子欠損（変異）の結果である。いくつかの形態は出生時に存在するが、他の形態は子供が幼児になるまで症状を生じない場合がある。いくつかは主に成人に影響を与える。白質ジストロフィーとしては、カナバン病（MIM#271900）、ペリツェウス・メルツバッハー病（MIM#312080）、基底核及び小脳萎縮を伴う低髄鞘形成症（OMIM#612438）、クラッペ病（グロバイド細胞白質ジストロフィー、MIM#245200）、X連鎖性副腎白質ジストロフィー（MIM#300100）、異染性白質ジストロフィー（MLD、MIM#250100）、ペリツェウス・メルツバッハー様疾患（又は低髄鞘性白質ジストロフィー-2、MIM#608804）、ニーマン・ピック病C型（NPC、MIM#257220）、自律神経系疾患を伴う常染色体顕性白質ジストロフィー（ADLD、MIM#169500）、4H白質ジストロフィー（Pol II II関連白質ジストロフィー、MIM#607694）、ゼルウェガススペクトラム障害（ZSD、MIM#数種）、中枢神経系髄鞘低下を伴う小児期運動失調又はCACH（また、白質消失病とも呼ばれる、又はVWMD、MIM#603896）、脳髄黄色腫症（CTX、MIM#213700）、アレキサンダー病（AXD、MIM#203450）、SOX10関連末梢脱髄性ニューロパシー、中枢性髄鞘形成不全白質ジストロフィー、ワーデンブルグ症候群、及びヒルシュスプルング病（PCWH、MIM#609136）、成人ポリグルコサン小体病（APBD、MIM#263570）、スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症（HDL S、MIM#221820）、エカルディ・グティエール症候群（AGS、MIM#多数）、及び成人レフサム病（MIM#266500）が挙げられる。

30

40

【0028】

A. ペリツェウス・メルツバッハー病

50

ペリツェウス・メルツバッハー病（PMD）は、生後1年で発症することが多い、希少で致命的なX連鎖性の潜性髄鞘形成不全白質ジストロフィーである。症状には、低血圧、眼振、及び特に運動機能における発達のマイルストーンの遅延が含まれる。PMDは進行性であり、協調性、運動能力、及び知的機能が低下し、多くの場合、成人前の早期死亡につながる。米国には、PMDを有するおよそ3,500人の患者がおり（Schmidt et al., 2020）、有効な治療法はない。

【0029】

最も一般的な（Elitt et al., 2020）形態のPMDは、ミエリンの最も豊富なタンパク質成分の1つであるミエリンタンパク質プロテオリピドタンパク質1（PLP1）をコードする遺伝子の重複変異によって引き起こされる。PLP1は、外膜表面の付着に寄与して、ミエリン鞘の独自のアーキテクチャを作出する。

10

【0030】

乏突起膠細胞におけるPLP1タンパク質の過剰発現は、機能不全を誘発し、適切なミエリン形成を妨げ、CNSにおける髄鞘性乏突起膠細胞の広範囲な喪失をもたらす（Osorio and Goldman, 2018）。遺伝子重複を有する患者においてPLP1の発現を正常レベルに低減することは、乏突起膠細胞の機能を回復させ、転帰を改善するために使用され得る。

【0031】

PLP1の過剰発現は、「毒性機能獲得」の例である。この場合、過剰発現されるタンパク質は、細胞毒性をもたらす。PLP1の過剰発現に対処する1つの方法は、PLP1遺伝子の発現を低減するためのRNA干渉の使用によるものである。これは、マイクロRNAベースの遺伝子治療で達成することができる。PLP1のmRNAを標的とする治療用miRNA前駆体の発現カセットを送達するAAVベクターの単回投与を使用して、乏突起膠細胞におけるPLP1翻訳を低減するために、内因性mRNAサイレンシング機構を活性化することができる。更に、PLP1の過剰発現は、主に乏突起膠細胞に限定されるため、乏突起膠細胞に対するより高い指向性を有するAAVベクターの使用は、安全性及び治療有効性を改善するために使用され得る。

20

【0032】

アンチセンスオリゴヌクレオチド戦略を使用して、ジンピーマウス（これらは、異常なPLPを発現し、重度のPMDに見られる細胞、分子、及び神経学的特徴を再現することによってPMDをモデル化する）におけるPLP1の過剰発現を抑制することができる。出生後のジンピーマウスにおける単回用量のPLP1標的化アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与は、乏突起膠細胞の数を回復させ、髄鞘形成を増加させ、運動性能を改善し、呼吸機能を正常化し、最大8ヶ月のエンドポイントまで寿命を延ばした（Elitt et al., 2020）。

30

【0033】

miRNA戦略を使用して、Plp1-Tgマウス（PLP1重複によって引き起こされるPMDモデル）におけるPLP1の過剰発現を低減することもできる。乏突起膠細胞特異的（ヒトCNP）の制御下で、PLP1のmRNAを標的とする人工miRNA（PLP1指向性ショートヘアピンを有する合成miR-155）をコードする導入遺伝子を有するAAVベクターの直接実質内注射（脳組織、具体的には、乏突起膠細胞が富化されている線状体及び内包への）により、マウスPMDモデル（Plp1トランスジェニックマウス、PLP1重複モデル）における乏突起膠細胞の消滅を防止し、ミエリンを回復させ、並びに神経学的表現型及び生存を改善した（Liet al., 2019）。

40

【0034】

乏突起膠細胞を効率的に標的とするAAVベクターを、PLP1遺伝子の過剰発現を低減するためのmiRNA戦略と組み合わせる、PMDに対する治療アプローチは、PMDを治療するのに有利であり得る。

【0035】

B. 多系統萎縮症

50

多系統萎縮症（MSA）は、動きの遅さ、振戦、固縮（こわばり）、不協調性、及び発話障害を含む、パーキンソン病の症状に似ている症状を特徴とする、希少で致命的な進行性の神経変性障害である。症状は、典型的には、ヒトが50～60歳のときに現れ、急速に進行する。ほとんどのMSA患者は、症状の発症から6～10年以内に疾患又はその合併症によって死亡する。米国には、MSAを有するおよそ15,000～50,000人の患者がいる（Multiple System Atrophy Fact Sheet | National Institute of Neurological Disorders and Stroke, n.d.）。いくつかの薬は症状の緩和をもたらすが、疾患の進行を遅らせる治療法はなく、治療もしない。

【0036】

パーキンソン病のようなMSAの病態は、シナプスタンパク質アルファシヌクレイン（神経伝達物質の放出に関与するタンパク質）の蓄積及び凝集を特徴とする。しかしながら、アルファシヌクレインがニューロン内に蓄積し、凝集するパーキンソン病とは異なり、MSAは、乏突起膠細胞内に、グリア細胞質内封入体と呼ばれるアルファシヌクレインの異常な蓄積を特徴とする。グリア細胞質内封入体の形態で毒性蓄積したアルファシヌクレインによる乏突起膠細胞－ミエリン－軸索複合体の破壊は、炎症、脱髄、及びその後の神経喪失をもたらす。

【0037】

乏突起膠細胞におけるアルファシヌクレインタンパク質の蓄積は、機能不全を誘発し、適切なミエリン形成を妨げ、CNSにおける二次神経変性をもたらす（Marmion et al., 2021）。MSA患者の乏突起膠細胞におけるアルファシヌクレインのレベルを低減することは、グリア細胞封入体の形成の抑制を回復させ、転帰を改善することが期待される。

【0038】

アルファシヌクレインの過剰発現に対処する1つの方法は、アルファシヌクレイン遺伝子の発現を低減するためのRNA干渉の使用である。これは、マイクロRNAベースの遺伝子治療で達成することができる。アルファシヌクレインのmRNAを標的とする治療用miRNA前駆体の発現カセットを送達するAAVベクターの単回投与は、内因性mRNAサイレンシング機構を活性化して、乏突起膠細胞におけるアルファシヌクレインの翻訳及びその後の蓄積を低減することが期待される。更に、MSAにおけるアルファシヌクレインの蓄積は、主に乏突起膠細胞に限定されるため、乏突起膠細胞に対するより高い指向性を有するAAVベクターの使用は、安全性及び治療有効性を改善することが期待される。

【0039】

最近、マウスにおけるMSAのモデルを作製するために、乏突起膠細胞に対する独自の指向性を有するAAVベクターであるAAV-Olig001（Powell et al., 2016）が使用された。αシヌクレイン導入遺伝子を有するAAV-Olig001は、乏突起膠細胞においてαシヌクレインの選択的過剰発現をもたらし、背側線条体において>95%の乏突起膠細胞指向性を有し、ヒトMSAと同様の脱髄及び神経炎症をもたらした（Williams et al., 2020）。同様に、アカゲザルにおいてαシヌクレイン導入遺伝子を発現するAAV-Olig001の線条体内注射は、線条体全体に広範なαシヌクレインの発現をもたらした。脱髄は、ヒト疾患に類似して、AAV-Olig001-αシヌクレインで注射された動物の脳梁及び線条体の白質束において観察された（AAV-Olig001-GFPでは観察されなかった）（Mandel et al., 2017）。

【0040】

最近、Mavroeidiらは、培養されたマウス乏突起膠細胞へのアルファシヌクレインの投与が、内因性乏突起膠細胞のアルファシヌクレインを毒性凝集体に動員したことを示した（Mavroeidi et al., 2019）。同様に、内因性乏突起膠細胞のアルファシヌクレインは、インビボでのマウス脳へのアルファシヌクレイン

10

20

30

40

50

投与によってもたらされる病理学的凝集体に組み込まれた (Mavroeiidi et al., 2019)。更に、これは、アルファシヌクレインのノックアウトマウスにおいて緩和された。これらの結果は、内因性アルファシヌクレインが、細胞内アルファシヌクレイン凝集体の形成に必要であることを実証している。乏突起膠細胞におけるアルファシヌクレインの発現の操作は、グリア細胞質内封入体におけるアルファシヌクレインの蓄積を低減し、それによってMSAの急速な進行を遅延又は停止させるための合理的なアプローチを提供する可能性がある。

【0041】

本明細書に開示されるように、乏突起膠細胞を効率的に標的とするAAVベクターを、アルファシヌクレインの遺伝子発現を低減するためのmiRNA戦略と組み合わせる、MSAに対する新規の治療アプローチの使用は、有利であり得る。

10

【0042】

C. 基底核及び小脳萎縮を伴う低髄鞘形成症

基底核及び小脳萎縮を伴う低髄鞘形成症 (H-ABC) は、希少で、常染色体顕性、髄鞘形成不全の小児白質ジストロフィーである。H-ABCは、典型的には、幼児期にジストニア、進行性歩行障害、並びに言語及び認知障害などの症状を呈する。H-ABCの症状及び進行は、生後最初の数ヶ月で発症した場合はより重篤であるが、小児期の後半に症状が始まる場合はそれほど重篤ではない。磁気共鳴画像法 (MRI) は、典型的には、小脳萎縮とともに尾状及び被殻の特徴的な低髄鞘化及び萎縮を示す (Simons et al., 2013)。米国には、H-ABCを有するおよそ2,600人の患者がおり (Schmidt et al., 2020)、有効な治療法はない。

20

【0043】

H-ABCは、微小管関連タンパク質チューブリンベーター4aをコードするTUBB4A遺伝子 (これは、 α -チューブリンとヘテロ二量体化して、微小管に組み立てるサブユニットを形成する) の毒性機能獲得変異によって引き起こされる。微小管は、細胞の形状を支援し、タンパク質を必要な場所に移動させるのに役立つ細胞内ケーブルである。チューブリンベーター4aタンパク質は、成熟乏突起膠細胞において高度に発現される微小管構成要素である。Tubb4a遺伝子の変異は、微小管のダイナミクスを変化させ、破壊し、最終的には乏突起膠細胞の喪失をもたらす (Curriel et al., 2017, Sase et al., 2020)。

30

【0044】

チューブリンベーター4aタンパク質の過剰発現は、乏突起膠細胞における微小管ダイナミクスを変化させ、機能不全を誘発し、適切なミエリン形成を妨げ、CNSにおける髄鞘性乏突起膠細胞の広範囲な喪失をもたらす (Curriel et al., 2017, Sase et al., 2020)。患者におけるチューブリンベーター4aタンパク質の発現の正常化は、乏突起膠細胞の機能を回復させ、転帰を改善するために使用され得る。

【0045】

チューブリンベーター4aタンパク質の過剰発現は、「毒性機能獲得」の別の例である。この場合、過剰発現されるタンパク質は、細胞毒性につながる微小管ダイナミクスの破壊をもたらす。チューブリンベーター4aタンパク質の過剰発現に対処する1つの方法は、TUBB4A遺伝子の発現を低減するためのRNA干渉の使用によるものである。これは、マイクロRNAベースの遺伝子治療で達成することができる。TUBB4AのmiRNAを標的とする治療用miRNA前駆体の発現カセットを送達するAAVベクターの単回投与を使用して、乏突起膠細胞におけるTUBB4A翻訳を低減するために、内因性miRNAサイレンシング機構を活性化することができる。更に、TUBB4Aの過剰発現は、主に乏突起膠細胞に限定されるため、乏突起膠細胞に対するより高い指向性を有するAAVベクターの使用は、安全性及び治療有効性を改善するために使用され得る。

40

【0046】

H-ABCを有する患者の最も一般的な変異は、TUBB4A^{D249N}である。全て

50

のタンパク質と同様に、チューブリンベーター4aタンパク質は、鎖のように一緒に連結されたアミノ酸で構成され、次いで正確な構成に折り畳まれる。タンパク質をコードする遺伝子の変異は、不正確なアミノ酸の鎖への組み込みをもたらす得る。この場合、チューブリンベーター4aは、通常、鎖の249番目の位置にアミノ酸のアスパラギン酸を有する。変異は、この位置でアミノ酸のアスパラギン酸への切り替えをもたらす。この小さい変化は、多くの場合、タンパク質の機能に大きな影響を与える。

【0047】

最近、Saseらは、マウスTUBB4A遺伝子に同じ変異を有する、H-ABCのマウスモデルを開発した(Sase et al., 2020)。これらのマウス(Tubb4a^{D249N}/D249Nマウス)は、H-ABC患者に類似する、異常な歩き方、不十分な協調性、並びに単収縮及び低下した反射などの不随意の動きを伴う進行性運動機能不全を示した。Tubb4a^{D249N}/D249Nはまた、対照と比較して短縮された生存期間、対照マウスと比較してミエリン染色の喪失、微小管の挙動及び形成の変化、並びに乏突起膠細胞の劇的な喪失も示した。これらの結果は、Tubb4a^{D249N}/D249Nマウスが、ヒトにおけるH-ABC疾患と多くの同様の症状及び病態を共有することを実証している。乏突起膠細胞を効率的に標的とするAAVベクターを、TUBB4A遺伝子発現を正常化するためのmiRNA及び／又は遺伝子置き換え戦略と組み合わせる、H-ABCに対する治療アプローチは、有利であり得る。

10

【0048】

本開示は、毒性機能獲得のタンパク質をコードする1つ以上の遺伝子又はRNAを標的とする、siRNAなどの治療用核酸を細胞に高効率で送達するために、AAVベクターなどのウイルスベクターを用いる。いくつかの実施形態では、RNAi分子、例えば、本開示のsiRNA分子をコードするAAVベクターは、活性剤の乏突起膠細胞への送達を増加させ得る。治療用核酸又はポリヌクレオチドは、細胞内の毒性機能獲得タンパク質の遺伝子発現(例えば、mRNAレベル)を有意に阻害することができる可能性があり、したがって、タンパク質の凝集及び封入体の形成などの細胞内のタンパク質によって誘発又は引き起こされる欠陥を改善する。

20

【0049】

そのような阻害性核酸、例えば、siRNAは、脱髄などのミエリンの様々な遺伝性及び／又は後天性障害を治療するために使用されてもよい。本開示によれば、患者における障害を治療及び／又は改善するための方法は、患者に対して、有効量の少なくとも1つの治療用核酸(例えば、1つ以上のsiRNA二本鎖をコードするポリヌクレオチド)を細胞に投与し、遺伝子発現の阻害／サイレンシングを可能にすることを含む。

30

【0050】

2. 核酸

本開示のある特定の態様は、1つ以上の阻害性核酸(例えば、阻害性RNA分子)、そのような阻害性核酸をコードするポリヌクレオチド、及びそのような阻害性核酸を発現するように操作された導入遺伝子を提供する。1つ以上の阻害性核酸は、同じ遺伝子(例えば、同じmRNA配列又は同じ遺伝子の異なるmRNA配列にハイブリダイゼーションするか、又は特異的に結合する)又は異なる遺伝子(例えば、異なる遺伝子のmRNAにハイブリダイゼーションするか、特異的に結合する)を標的とし得る。

40

【0051】

A. 阻害性核酸

阻害性核酸は、細胞内の標的核酸(例えば、標的RNA)に結合し、細胞内の標的核酸のレベル又は機能を低下又は阻害することができる核酸を指す。阻害性核酸の例としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列(EGS)オリゴヌクレオチド、低分子干渉(si)RNA化合物、一本鎖又は二本鎖RNA干渉(RNAi)化合物、改変塩基／ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、及び標的核酸の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズし、そのレベル又は機能を調節する他のオリゴマー化合物又はオリゴヌクレオチド模倣物が挙げられる。いくつかの実施形態では、阻害

50

性核酸は、アンチセンスRNA、アンチセンスDNA、キメラアンチセンスオリゴヌクレオチド、改変結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、干渉RNA (iRNA)、短鎖若しくは低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA若しくはマイクロ干渉RNA (miRNA)、低分子時間型RNA (stRNA)、短ヘアピン型RNA (shRNA)、低分子RNA誘導性遺伝子活性化因子 (RNAa)、低分子活性化RNA (saRNA)、又はそれらの組み合わせであり得る。いくつかの例では、阻害性核酸は、RNA干渉を媒介する阻害性RNA分子である。

【0052】

RNA干渉 (RNAi) は、細胞が遺伝子発現を調節する、1998年に発見されたプロセス (Fire et al., 1998) である。細胞の細胞質内の二本鎖RNA (dsRNA) は、二本鎖RNAが、RNAse III様酵素DICERによって、およそ21~23ヌクレオチド長の小さい二本鎖断片に処理されるRNAi経路を誘発する。これらの二本鎖断片は、RNA誘導性サイレンシング複合体 (RISC) と呼ばれる多サブユニットタンパク質に統合される。RISCは、二本鎖断片を、複合体から除去されるパッセンジャー鎖と、特定のmRNA内の標的配列に相補的であり、RISC複合体に、特定の標的mRNA分子の翻訳を切断又は抑制するように指示するガイド鎖と、に巻き戻すアルゴノートタンパク質を含有する (Kotowska-Zimmer et al., 2021)。このようにして、mRNA分子をコードする遺伝子は、本質的に不活性又は「サイレンシング」される。

【0053】

RNAi技術は、3種のツールである、合成siRNA、ベクターベースのshRNA、及び人工miRNA (amiRNA) を用い得る。合成siRNAは、細胞内に送達されなければならない、安定性及び薬物動態学的課題を克服しなければならない外因性二本鎖RNAである。shRNAは、プラスミド又はウイルス発現ベクターを使用して細胞に送達されるタイトなヘアピンループ構造を有する人工RNA分子である。shRNAは、典型的には、強いpol IIIプロモーター (例えば、U6又はH1) から転写され、ヘアピンとしてRNAi経路に入る。しかしながら、強いpol IIIプロモーターによって駆動される転写は、内因性miRNA生体発生機構を飽和させる超生理学的レベルのshRNAを産生し得、毒性をもたらす。amiRNAは、天然一次miRNA (pri-miRNA) に基づいて足場に標的特異的shRNA挿入物を埋め込む。これにより、内因性miRNAと同様の適切な処理及び輸送が保証され、毒性が低下する (Kotowska-Zimmer et al., 2021)。

【0054】

本開示のいくつかの実施形態では、阻害性RNA分子は、siRNA、miRNA (amiRNAを含む)、又はshRNAであり得る。

【0055】

siRNAは、細胞内でRNAiを誘導するおよそ19~25 (例えば、19~23) 塩基対長の二本鎖RNA分子として、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、siRNA配列はまた、人工miRNA足場 (「shmiRNA」) に挿入することができる。

【0056】

shRNAは、細胞内でRNAiを誘導する、短いループ (例えば、約4~11ヌクレオチド) によって連結されたおよそ19~25 (例えば、19~23) 塩基対の二本鎖RNAを含むRNA分子として、当該技術分野において既知である。

【0057】

miRNAは、ループによって連結された短い (例えば、19~25塩基対) 配列の二本鎖RNAを含み、1つ以上のバルジ (例えば、誤対合又は非対合塩基対) を含む1つ以上の追加の配列の二本鎖RNAを含む、細胞内でRNAiを誘導するRNA分子として、当該技術分野において既知である。本明細書で使用される場合、「miRNA」という用語は、内因性miRNA、並びに外因性又は異種のmiRNAを包含する。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、「miRNA」は、pri-miRNA又はpre-miRNAを指すことができる。miRNA処理中に、pri-miRNA転写物が産生される。pri-miRNAは、Drosha-DGCR8によって処理され、1つ以上の配列を切除して、5' 隣接領域、ガイド鎖、ループ領域、非ガイド鎖、及び3' 隣接領域を有するpre-miRNA、又は5' 隣接領域、非ガイド鎖、ループ領域、ガイド鎖、及び3' 隣接領域を残すことによって、pre-miRNAを産生する。次いで、pre-miRNAを細胞質に輸出し、Dicerによって処理して、ガイド鎖及び非ガイド（又は乗客）鎖を有するsiRNAを得る。次いで、ガイド鎖は、例えば、ガイド鎖に相補的な標的RNA配列を認識することによって、遺伝子サイレンシングを触媒するために、RISC複合体によって使用される。miRNAの更なる説明は、例えば、WO2008/150897に見ることが10
ことができる。miRNAによる標的配列の認識は、主に、標的とmiRNAのシード配列、例えば、ガイド鎖のヌクレオチド1～8（5' から3' に）との間の対合によって決定される（例えば、Boudreau, R. L. et al. (2013) Nucleic Acids Res. 41: e9を参照されたい）。

【0058】

本開示のいくつかの実施形態では、阻害性RNA分子は、ヘアピン構造を形成する。概して、ヘアピン形成RNAは、ループ配列によってアンチセンス鎖（例えば、ガイド鎖）に接続されたセンス鎖（例えば、パッセンジャー鎖）を含む二本鎖を有するステム部分をコードする単一の核酸を含む自己相補的な「ステムループ」構造内に配置される。パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、相補性を共有している。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、100%の相補性を共有する。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%の相補性を共有する。パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、塩基対のミスマッチのために相補性を欠く場合がある。いくつかの実施形態では、ヘアピン形成RNAのパッセンジャー鎖及びガイド鎖は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、又は少なくとも10個のミスマッチを有し得る。概して、（ループに対して）ステムの最初の2～8ヌクレオチドは、「シード」残基と称され、標的の認識及び結合において重要な役割を果たしている。20
（ループに対して）ステムの第1の残基は、「アンカー」残基と称される。いくつかの実施形態では、ヘアピン形成RNAは、アンカー残基においてミスマッチを有する。30

【0059】

いくつかの実施形態では、阻害性RNA分子は、細胞（又は対象）内で処理されて、「成熟miRNA」を形成する。成熟miRNAは、miRNAをもたらす生物学的経路において最初の前駆体分子を生成するRNAポリメラーゼII又はIIIによって、そのmiRNA遺伝子又はイントロンからの一次miRNAの転写を通して開始される多段階経路の結果である。一度転写されると、pri-miRNA（しばしばヘアピン構造を有する1000個を超えるヌクレオチド長）は、ヘアピン構造とssRNAとの間の接合部の近くでpri-miRNAを切断するDrosha酵素によって処理され、前駆体miRNA（pre-miRNA）をもたらす。pre-miRNAは、細胞質にエクスポートされ、pre-miRNAループでDicer酵素によって更に還元され、二本になったmiRNA鎖をもたらす。40

【0060】

miRNA二本鎖の2本鎖のうち、1つのアーム、ガイド鎖（miR）は、典型的には、より高い濃度で見られ、最終的にRNA誘導サイレンシング複合体に装填されるアルゴノートタンパク質に結合し、会合する。ガイド鎖miRNA-RISC複合体は、しばしばmRNAの3' UTRにおいて、mRNAのその相補的な配列に結合することによって遺伝子発現を調節するのを助ける。miRNA二本鎖の非ガイド鎖は、パッセンジャー鎖として既知であり、しばしば分解されるが、持続してもよく、無傷又は部分的分解後のいずれかで作用して、遺伝子発現において機能的役割を有する。50

【0061】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、ヒト遺伝子を標的とするガイド鎖を有する阻害性核酸（例えば、miRNA）を発現するように操作される。「標的とすること」は、標的遺伝子（例えば、標的遺伝子のmRNA転写物）上のその同族（例えば、相補的）配列への阻害性核酸のハイブリダイゼーション又は特異的結合を指す。いくつかの実施形態では、遺伝子転写物を標的とする阻害性核酸は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30のヌクレオチド長である標的遺伝子と、相補性の領域を共有する。いくつかの実施形態では、相補性の領域は、30以上のヌクレオチド長である。

10

【0062】

典型的には、ガイド鎖は、ミエリンの疾患又は障害に関連するヒト遺伝子転写物を標的にし得る。例としては、PLP1（PMDに関連する）、SNCA（MSAに関連する）、又はTUBB4A（H-ABCに関連する）が挙げられる。いくつかの実施形態では、これらの遺伝子転写物のうちのいずれかを標的とするガイド鎖は、以下に記載される配列を含む単離された核酸によってコードされる。

【0063】

Homo sapiensのプロテオリピドタンパク質1（PLP1）、転写物バリエーション1のmRNAをコードする配列を以下に示す。

【0064】

NCBI参照配列：PLP1（NM_000533.5）コード配列（配列番号1）
ATGGGCTTGTAGAGTGCTGTGCAGTGGCACTGTTCTGTG
GCTGTGGACATGAAGCCCTCACTGGGCACAGAAAAGCTAAT
TGAGACCTATTTCTCCAAAACTACCAAGACTATGAGTAT
CTCATCAATGTGATCCATGCCTTCCAGTATGTTCATCTATG
GAACTGCCTCTTTCTTCTTCTTCTTATGGGGCCCTCCTGCT
GGCTGAGGGCTTCTACACCACCGGCGCAGTCAGGCAGATC
TTTGGCGACTACAAGACCACCATCTGCGGGCAAGGGGCCCTGA
GCGCAACGGTAACAGGGGGGCCAGAAAGGGGGAGGGGGTTCCAG
AGGCCAACATCAAGCTCATTTCTTTGGAGCGGGGTGTGTGTCAT
TGTTTTGGGAAAATGGCTAGGACATCCCGACAAGTTTTGTGG
GCATCACCTATGCCCTGACCGTTGTGTGGCTCCTGGTGTT
TGCCCTGCTCTGCTGTGCCTGTGTACATTTACTTCAACACC
TGGACCACCTGCCAGTCTATTGCCCTTCCCCAGCAAGACCT
CTGCCAGTATAGGCAGTCTCTGTGTGCTGATGCCAGAAATGTA
TGGTGTTCTCCCATGGGAATGCTTTTCCCTGGCAAGGGTTTGT
GGCTCCAACCTTCTGTCCATCTGCAAAACAGCTGAGTTTCC
AAATGACCTTCCACCTGTTTATTGCTGCATTTGTGGGGGGC
TGCAAGCTACACTGGTTTCCCTGCTCACCTTTCATGATTGCT
GCCACTTACAACCTTTGCCGTCCTTAAACTCATGGGGCCGAG
GCACCAAGTTCTGA

20

30

40

【0065】

PLP1を標的とするための例示的な標的配列及びガイド鎖を以下の表1に示す。

【表 1】

表 1. P L P 1 標的配列

配列 番号	標的配列	配列 番号	ガイド鎖	
2	CTACCAAGACTATGAGTATCT	42	AGATACTCATAGTCTTGGTAG	
3	ACTACCAAGACTATGAGTATC	43	GATACTCATAGTCTTGGTAGT	
4	CAAGACTATGAGTATCTCATC	44	GATGAGATACTCATAGTCTTG	
5	GACTATGAGTATCTCATCAAT	45	ATTGATGAGATACTCATAGTC	
6	ACTATGAGTATCTCATCAATG	46	CATTGATGAGATACTCATAGT	
7	GAGTATCTCATCAATGTGATC	47	GATCACATTGATGAGATACTC	10
8	TGATCCATGCCTTCCAGTATG	48	CATACTGGAAGGCATGGATCA	
9	CCTTCCAGTATGTCATCTATG	49	CATAGATGACATACTGGAAGG	
10	CAGTATGTCATCTATGGAAGT	50	AGTTCCATAGATGACATACTG	
11	ATCTATGGAAGTGCCTCTTTC	51	GAAAGAGGCAGTTCCATAGAT	
12	CCTCTTTCTTCTTCCCTTTATG	52	CATAAAGGAAGAAGAAAGAGG	
13	TGCCTCTTTCTTCTTCCTTTA	53	TAAAGGAAGAAGAAAGAGGCA	
14	GCCTCTTTCTTCTTCCTTTAT	54	ATAAAGGAAGAAGAAAGAGGC	
15	CCTCTTTCTTCTTCCTTTATG	55	CATAAAGGAAGAAGAAAGAGG	
16	GGCGACTACAAGACCACCATC	56	GATGGTGGTCTTGTAGTCGCC	
17	GCGACTACAAGACCACCATCT	57	AGATGGTGGTCTTGTAGTCGC	
18	AGGCCAACATCAAGCTCATTC	58	GAATGAGCTTGATGTTGGCCT	20
19	CAACATCAAGCTCATTCTTTG	59	CAAAGAATGAGCTTGATGTTG	
20	TTTGGAGCGGGTGTGTCATTG	60	CAATGACACACCCGCTCCAAA	
21	GAGCGGGTGTGTCATTGTTTG	61	CAAACAATGACACACCCGCTC	
22	GGTGTGTCATTGTTTGGGAAA	62	TTTCCCAAACAATGACACACC	
23	GGCTAGGACATCCCGACAAGT	63	ACTTGTGCGGGATGTCCTAGCC	
24	AGGACATCCCGACAAGTTTGT	64	ACAAACTTGTGCGGGATGTCCT	
25	AGTTTGTGGGCATCACCTATG	65	CATAGGTGATGCCCACAACT	
26	GCTCTGCTGTGCCTGTGTACA	66	TGTACACAGGCACAGCAGAGC	
27	GCTGTGCCTGTGTACATTTAC	67	GTAAATGTACACAGGCACAGC	
28	CTGCTGTGCCTGTGTACATTT	68	AAATGTACACAGGCACAGCAG	
29	CTGTGCCTGTGTACATTTACT	69	AGTAAATGTACACAGGCACAG	30
30	TGCTGTGCCTGTGTACATTTA	70	TAAATGTACACAGGCACAGCA	
31	GCTGTGCCTGTGTACATTTAC	71	GTAAATGTACACAGGCACAGC	
32	CTGTGTACATTTACTTCAACA	72	TGTTGAAGTAAATGTACACAG	
33	TGGACCACCTGCCAGTCTATT	73	AATAGACTGGCAGGTGGTCCA	
34	AGCAAGACCTCTGCCAGTATA	74	TATACTGGCAGAGGTCTTGCT	
35	ATGACCTTCCACCTGTTTATT	75	AATAAACAGGTGGAAGGTCAT	
36	TGACCTTCCACCTGTTTATTG	76	CAATAAACAGGTGGAAGGTCA	
37	CCACCTGTTTATTGCTGCATT	77	AATGCAGCAATAAACAGGTGG	
38	CCTGTTTATTGCTGCATTTGT	78	ACAAATGCAGCAATAAACAGG	
39	TACAACTTTGCCGTCCTTAAA	79	TTTAAGGACGGCAAAGTTGTA	
40	ACAACTTTGCCGTCCTTAAAC	80	GTTTAAGGACGGCAAAGTTGT	40

【0066】

Homo sapiens のシヌクレインアルファ (SNCA)、転写物バリエント 1、mRNA をコードする配列を以下に示す。

【0067】

NCBI 参照配列：NM_000345.4 コード配列 (配列番号 81)

A T G G A T G T A T T C A T G A A A G G A C T T T C A A A G G C C A A G G A G G
 G A G T T G T G G C T G C T G C T G A G A A A A C C A A A C A G G G T G T G G C
 A G A A G C A G C A G G A A A G A C A A A A G A G G G T G T T C T C T A T G T A
 G G C T C C A A A A C C A A G G A G G G A G T G G T G C A T G G T G T G G C A A

C A G T G G C T G A G A A G A C C A A A G A G C A A G T G A C A A A T G T T G G
A G G A G C A G T G G T G A C G G G T G T G A C A G C A G T A G C C C A G A A G
A C A G T G G A G G G A G C A G G G A G C A T T G C A G C A G C C A C T G G C T
T T G T C A A A A A G G A C C A G T T G G G C A A G A A T G A A G A A G G A G C
C C C A C A G G A A G G A A T T C T G G A A G A T A T G C C T G T G G A T C C T
G A C A A T G A G G C T T A T G A A A T G C C T T C T G A G G A A G G G T A T C
A A G A C T A C G A A C C T G A A G C C T A A

【 0 0 6 8 】

ヒトアルファシヌクレインを標的とするための例示的な標的配列及びガイド鎖を以下の表 2 に示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 ヒトアルファシヌクレイン標的配列

配列 番号	標的配列	配列 番号	ガイド鎖	
82	GGATGTATTCATGAAAGGACT	122	AGTCCTTTCATGAATACATCC	
83	ATGTATTCATGAAAGGACTTT	123	AAAGTCCTTTCATGAATACAT	
84	TGTATTCATGAAAGGACTTTC	124	GAAAGTCCTTTCATGAATACA	
85	AGTTGTGGCTGCTGCTGAGAA	125	TTCTCAGCAGCAGCCACAAC	
86	GTTGTGGCTGCTGCTGAGAAA	126	TTTCTCAGCAGCAGCCACAAC	
87	TGTGGCAGAAGCAGCAGGAAA	127	TTTCCTGCTGCTTCTGCCACA	
88	TGGCAGAAGCAGCAGGAAAGA	128	TCTTTCCTGCTGCTTCTGCCA	10
89	AGAGGGTGTCTCTATGTAGG	129	CCTACATAGAGAACCCCTCT	
90	CAGTGGCTGAGAAGACCAAAG	130	CTTTGGTCTTCTCAGCCACTG	
91	GACCAAAGAGCAAGTGACAAA	131	TTTGTCACCTTGCTCTTTGGTC	
92	CCAAAGAGCAAGTGACAAATG	132	CATTTGTCACTTGCTCTTTGG	
93	CAAAGAGCAAGTGACAAATGT	133	ACATTTGTCACTTGCTCTTTG	
94	ACCAAAGAGCAAGTGACAAAT	134	ATTTGTCACTTGCTCTTTGGT	
95	CCAAAGAGCAAGTGACAAATG	135	CATTTGTCACTTGCTCTTTGG	
96	CAAAGAGCAAGTGACAAATGT	136	ACATTTGTCACTTGCTCTTTG	
97	AGAGCAAGTGACAAATGTTGG	137	CCAACATTTGTCACTTGCTCT	
98	GCAAGTGACAAATGTTGGAGG	138	CCTCCAACATTTGTCACTTGC	
99	AGTGACAAATGTTGGAGGAGC	139	GCTCCTCCAACATTTGTCACT	20
100	GGACCAGTTGGGCAAGAATGA	140	TCATTCTTGCCCAACTGGTCC	
101	AGGACCAGTTGGGCAAGAATG	141	CATTCTTGCCCAACTGGTCT	
102	GACCAGTTGGGCAAGAATGAA	142	TTCATTCTTGCCCAACTGGTC	
103	GTTGGGCAAGAATGAAGAAGG	143	CCTTCTTCATTCTTGCCCAAC	
104	GGGCAAGAATGAAGAAGGAGC	144	GCTCCTTCTTCATTCTTGCCC	
105	GGAAGGAATTCTGGAAGATAT	145	ATATCTTCCAGAATTCCTTCC	
106	GAAGGAATTCTGGAAGATATG	146	CATATCTTCCAGAATTCCTTC	
107	GGAAGATATGCCTGTGGATCC	147	GGATCCACAGGCATATCTTCC	
108	GCCTGTGGATCCTGACAATGA	148	TCATTGTCAGGATCCACAGGC	
109	TGCCTGTGGATCCTGACAATG	149	CATTGTCAGGATCCACAGGCA	
110	GATCCTGACAATGAGGCTTAT	150	ATAAGCCTCATTGTCAGGATC	30
111	ATCCTGACAATGAGGCTTATG	151	CATAAGCCTCATTGTCAGGAT	
112	TCCTGACAATGAGGCTTATGA	152	TCATAAGCCTCATTGTCAGGA	
113	CCTGACAATGAGGCTTATGAA	153	TTCATAAGCCTCATTGTCAGG	
114	GACAATGAGGCTTATGAAATG	154	CATTTTCATAAGCCTCATTGTC	
115	CTGACAATGAGGCTTATGAAA	155	TTTCATAAGCCTCATTGTCAG	
116	TGACAATGAGGCTTATGAAAT	156	ATTTTCATAAGCCTCATTGTCA	
117	GACAATGAGGCTTATGAAATG	157	CATTTTCATAAGCCTCATTGTC	
118	AGGAAGGGTATCAAGACTACG	158	CGTAGTCTTGATACCCTTCCT	
119	AGGGTATCAAGACTACGAACC	159	GGTTCGTAGTCTTGATACCCT	
120	TCAAGACTACGAACCTGAAGC	160	GCTTCAGGTTTCGTAGTCTTGA	
121	CTACGAACCTGAAGCCTAA	161	TTAGGCTTCAGGTTTCGTAG	40

【0069】

Homo sapiens のチューブリンベータ 4 A クラス I V a (TUBB4A)、
転写物バリエーション 1 をコードする配列を以下に示す。NCBI 参照配列：NM_001289123.2 (配列番号 162)。

A T G A G A A G G G G G G C T G C G G A C C G A G A A A C T G A G C G G C T C C
C G G G G G C G C A G G G A C C G T G C T C C G C C G T C T C C G C C G C A T C
T T C C A C C C T C G C C G C C G C C G C A G C T C C C C G C G C T C G T G C C
A C C G C C G C C G C G T C C A C C C T C A G C G C C A C C G C C A T G C G G G
A G A T C G T G C A C C T G C A G G C C G G C C A G T G C G G C A A C C A G A T

C G G G G C C A A G T T T T G G G A G G T T A T C A G T G A C G A A C A T G G C
 A T C G A C C C C A C A G G C A C A T A C C A T G G G G A C A G T G A C C T G C
 A A C T G G A G A G G A T C A A C G T G T A C T A C A A C G A G G C C A C A G G
 A G G A A A T T A T G T C C C C A G A G C G G T G C T G G T G G A C C T G G A A
 C C C G G C A C C A T G G A C T C T G T C C G T T C T G G C C C C T T C G G T C
 A G A T C T T T C G G C C G G A C A A C T T C G T G T T T G G C C A A T C C G G
 A G C C G G C A A C A A C T G G G C A A A G G G G C A C T A C A C G G A G G G C
 G C A G A G C T G G T G G A C G C T G T C C T G G A C G T A G T C C G G A A G G
 A G G C C G A G A G C T G C G A C T G C C T T C A G G G C T T C C A G C T G A C
 C C A C T C G C T G G G G G G T G G C A C G G G G T C C G G A A T G G G C A C G
 C T G C T C A T C A G T A A G A T C C G C G A G G A G T T C C C A G A C C G C A
 T C A T G A A C A C C T T C A G C G T G G T G C C C T C G C C C A A A G T G T C
 A G A C A C G G T G G T G G A G C C C T A C A A C G C C A C G C T G T C T G T G
 C A C C A G C T G G T G G A G A A T A C G G A T G A G A C C T A C T G C A T C G
 A C A A C G A G G C A C T C T A C G A C A T C T G T T T C C G C A C C C T C A A
 G C T G A C C A C C C C C A C C T A C G G G G A C C T C A A C C A C C T G G T G
 T C G G C C A C C A T G A G C G G G G T C A C C A C C T G C C T G C G C T T C C
 C G G G C C A G C T G A A C G C C G A C C T G C G C A A G C T G G C C G T C A A
 C A T G G T T C C C T T T C C T C G C C T G C A C T T C T T C A T G C C C G G C
 T T C G C A C C C C T G A C C A G C C G G G G C A G C C A G C A G T A C C G G G
 C C C T G A C G G T G C C C G A G C T C A C C C A G C A G A T G T T C G A T G C
 C A A G A A C A T G A T G G C G G C G T G C G A C C C G C G C C A C G G C C G C
 T A C C T G A C C G T G G C C G C C G T G T T C C G G G G C C G C A T G T C C A
 T G A A G G A G G T G G A C G A G C A G A T G C T G A G C G T G C A G A G C A A
 G A A C A G C A G C T A C T T C G T G G A G T G G A T C C C C A A C A A C G T G
 A A G A C G G C C G T G T G C G A C A T C C C G C C C C G C G G C C T G A A G A
 T G G C C G C G A C C T T C A T C G G C A A C A G C A C G G C C A T C C A G G A
 G C T G T T C A A G C G C A T C T C C G A G C A G T T C A C G G C C A T G T T C
 C G G C G C A A G G C C T T C T T G C A C T G G T A C A C G G G C G A G G G C A
 T G G A C G A G A T G G A G T T C A C C G A G G C C G A G A G C A A C A T G A A
 T G A C C T G G T A T C T G A G T A C C A G C A G T A C C A G G A C G C C A C G
 G C C G A G G A G G G C G A G T T C G A G G A G G A G G C G G A G G A G G A G G
 T G G C C T A G

【 0 0 7 0 】

ヒト T U B B 4 A を標的とするための例示的な標的配列及びガイド鎖を以下の表 3 に示す。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. ヒト TUBB4A 標的配列

配列 番号	標的配列	配列 番号	ガイド鎖	
163	GGGAGGTTATCAGTGACGAAC	204	GTTTCGTCCTGATAACCTCCC	
164	GGAGGTTATCAGTGACGAACA	205	TGTTTCGTCCTGATAACCTCC	
165	GGTTATCAGTGACGAACATGG	206	CCATGTTTCGTCCTGATAAACC	
166	GAGGTTATCAGTGACGAACAT	207	ATGTTTCGTCCTGATAACCTC	
167	AGGTTATCAGTGACGAACATG	208	CATGTTTCGTCCTGATAACCT	
168	CCTGCAACTGGAGAGGATCAA	209	TTGATCCTCTCCAGTTGCAGG	
169	CTGCAACTGGAGAGGATCAAC	210	GTTGATCCTCTCCAGTTGCAG	10
170	TGGAGAGGATCAACGTGTACT	211	AGTACACGTTGATCCTCTCCA	
171	GGAGAGGATCAACGTGTACTA	212	TAGTACACGTTGATCCTCTCC	
172	GAGAGGATCAACGTGTACTAC	213	GTAGTACACGTTGATCCTCTC	
173	AGAGGATCAACGTGTACTACA	214	TGTAGTACACGTTGATCCTCT	
174	GGATCAACGTGTACTACAACG	215	CGTTGTAGTACACGTTGATCC	
175	GAGGATCAACGTGTACTACAA	216	TTGTAGTACACGTTGATCCTC	
176	ACGAGGCCACAGGAGGAAATT	217	AATTTCTCCTGTGGCCTCGT	
177	CGAGGCCACAGGAGGAAATTA	218	TAATTTCTCCTGTGGCCTCG	
178	GAGGCCACAGGAGGAAATTAT	219	ATAATTTCTCCTGTGGCCTC	
179	AGGCCACAGGAGGAAATTATG	220	CATAATTTCTCCTGTGGCCT	
180	GGCCACAGGAGGAAATTATGT	221	ACATAATTTCTCCTGTGGCC	20
181	CCAGAGCGGTGCTGGTGGACC	222	GGTCCACCAGCACCGCTCTGG	
182	GGTGCTGGTGGACCTGGAACC	223	GGTTCCAGGTCCACCAGCACC	
183	AGATCTTTTCGGCCGACAAC	224	AGTTGTCCGCGCCGAAAGATCT	
184	CAACTTCGTGTTTGGCCAATC	225	GATTGGCCAAACACGAAGTTG	
185	GCACGCTGCTCATCAGTAAGA	226	TCTTACTGATGAGCAGCGTGC	
186	CACGCTGCTCATCAGTAAGAT	227	ATCTTACTGATGAGCAGCGTG	
187	CGGTGGTGGAGCCCTACAACG	228	CGTTGTAGGGCTCCACCACCG	
188	TGCACCAGCTGGTGGAGAATA	229	TATTCTCCACCAGCTGGTGCA	
189	GCTGGTGGAGAATACGGATGA	230	TCATCCGTATTCTCCACCAGC	
190	CGGATGAGACCTACTGCATCG	231	CGATGCAGTAGGTCTCATCCG	
191	GAGACCTACTGCATCGACAAC	232	GTTGTCGATGCAGTAGGTCTC	30
192	AGACCTACTGCATCGACAACG	233	CGTTGTCGATGCAGTAGGTCT	
193	CCTACTGCATCGACAACGAGG	234	CCTCGTTGTCGATGCAGTAGG	
194	TCGACAACGAGGCACTCTACG	235	CGTAGAGTGCCTCGTTGTCTGA	
195	ACGAGGCACTCTACGACATCT	236	AGATGTCGTAGAGTGCCTCGT	
196	GCACTCTACGACATCTGTTTC	237	GAAACAGATGTCGTAGAGTGC	
197	CCGTCAACATGGTTCCCTTTC	238	GAAAGGGAACCATGTTGACGG	
198	GCTACTTCGTGGAGTGGATCC	239	GGATCCACTCCACGAAGTAGC	
199	CAGGAGCTGTTCAAGCGCATC	240	GATGCGCTTGAACAGCTCCTG	
200	AGGCCTTCTTGCACTGGTACA	241	TGTACCAGTGCAAGAAGGCCT	
201	GAGGCCGAGAGCAACATGAAT	242	ATTCATGTTGCTCTCGGCCTC	
202	AGGCCGAGAGCAACATGAATG	243	CATTCATGTTGCTCTCGGCCT	
203	CAACATGAATGACCTGGTATC	244	GATACCAGGTCATTCATGTTG	40

【0071】

いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、5～300塩基長（例えば、10～30、15～25、19～22、25～50、40～90、60～90、75～100、90～150、110～200、150～250、200～300などのヌクレオチド長）である。pre-miRNA又は成熟miRNAをコードする阻害性核酸配列は、10～50、又は5～50塩基長であってもよい。いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、図11又は12に示される配列番号284又は285の配列をコードするか、又はそれを含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからなる。

【0072】

B. 足場

ある特定の実施形態では、阻害性RNA分子は、分子足場を含む阻害性核酸にコードされ得る。本明細書で使用される場合、「分子足場」は、その後の分子を設計又は作製するための配列又は構造的基礎を形成するフレームワーク又は出発分子である。

【0073】

いくつかの実施形態では、分子足場は、少なくとも1つの5'隣接領域、又は1つの3'隣接領域、又はその両方を含む。非限定的な例として、5'又は3'隣接領域は、任意の長さであってもよく、野生型マイクロRNA配列の全体若しくは一部に由来してもよく、又は完全に人工の配列であってもよい。5'又は3'隣接配列を含み得る。いくつかの実施形態では、5'及び3'隣接配列のうちの1つ又は両方が存在しない場合がある。いくつかの実施形態では、5'及び3'隣接配列は、同じ長さであっても、異なった長さであってもよい。いくつかの実施形態では、5'又は3'隣接配列は、1~10ヌクレオチド長、5~15ヌクレオチド長、10~30ヌクレオチド長、20~50ヌクレオチド長、40を超えるヌクレオチド長、50を超えるヌクレオチド長、100を超えるヌクレオチド長、又は200を超えるヌクレオチド長であり得る。

【0074】

いくつかの実施形態では、pri-miRNA足場を含むか又はそれをコードする阻害性核酸配列は、少なくとも200、250、260、270、280、290、又は300塩基長である。いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、標的核酸（例えば、ヒトmRNA、例えば、PLP1、SNCA、又はTUBB4Aのもの）の、例えば、少なくとも5、10、15、20、25、若しくは30塩基、又は最大30若しくは40塩基に、少なくとも80%又は90%相補的な塩基の配列を含むか、又はそれからなるか、あるいは標的核酸の10、15、20、25、若しくは30塩基にわたり最大3個のミスマッチ（例えば、最大1、又は最大2個のミスマッチ）を有する塩基の配列を含む。

【0075】

いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、人工miRNA (amiRNA) である。amiRNAは、天然miRNAを改変して、pre-mRNAの天然標的化領域を、目的の標的化領域で置き換えることによって誘導される。例えば、天然に存在し、発現されるmiRNAは、目的の遺伝子を標的とするmiRNAのステム配列によって置き換えられたステム配列を用いて、足場又は骨格（例えば、pri-miRNA足場）として使用することができる。人工前駆体マイクロRNA (pre-amiRNA) は、通常、1つの単一の安定した小さいRNAが優先的に生成されるように処理される。

【0076】

ステムループ構造のステムを形成することは、本明細書に記載の少なくとも1つのsiRNA、miRNA、shRNA、又は他のRNAi剤をコードする阻害性核酸の最低条件である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のsiRNA、miRNA、shRNA、又は他のRNAi剤は、標的配列に部分的に相補的であるか、又はそれにハイブリダイズする少なくとも1つの核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、阻害性核酸のステムループ構造の5'アームは、アンチセンス配列（すなわち、ガイド配列／鎖）をコードする核酸配列を含む。いくつかの他の実施形態では、阻害性核酸のステムループ構造の3'アームは、アンチセンス／ガイド配列をコードする核酸配列を含む。

【0077】

ある特定の実施形態では、阻害性核酸のステムループ構造のセンス配列及びアンチセンス配列を分離するのは、ループ配列（ループモチーフ、リンカー、又はリンカーモチーフとしても既知）である。ループ配列は、任意の長さ、4~30ヌクレオチド、4~20ヌクレオチド、4~15ヌクレオチド、5~15ヌクレオチド、6~12ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、及び／又は15ヌクレオチドであり得る。

【0078】

本開示のいくつかの態様は、ヒト又は非ヒト（例えば、マウス）の *pr i - m i R N A* 足場に挿入される、ヒト遺伝子を標的とするガイド鎖をコードする核酸配列に関する。いくつかの実施形態では、*pr i - m i R N A* 足場は、*mir - 16 - 1*、*mi R - 21*、*mi R - 23 a*、*mi R N A - 30 a*、*mi R - 31*、*mi R - 122*、*mi R - 155*、又は *mi R - 451* から選択され得る。いくつかの実施形態では、*pr i - m i R N A* 足場は、ヒト *m R N A*（例えば、*PLP1*、*SNCA*、又は *TUBB4A* のもの）又はその標的配列（例えば、配列番号 14 及び配列番号 35 などの上の表 1～3 に記載されるものによってコードされるもの）を標的とする阻害性核酸に隣接する。いくつかの実施形態では、*pr i - m i R N A* 足場は、ガイド鎖（例えば、配列番号 54 及び配列番号 75 などの上の表 1～3 に記載されるものに対応するか、又はそれによってコードされるガイド鎖 *R N A* 配列）を含むか、又はそれをコードする阻害性核酸に隣接する。いくつかの実施形態では、*pr i - m i R N A* 足場は、ヒト *mi R N A - 30 a* からであり得る（図 11、左）。関連するガイド鎖 *R N A* 配列は、ステムループの 5' アーム又は 3' アームのいずれかにあり得る。一例では、配列番号 75 に対応するか、又はそれによってコードされるガイド鎖 *R N A* 配列は、5' アームにあり得る（図 11、右を参照されたい）。別の例では、配列番号 54 に対応するか、又はそれによってコードされるガイド鎖 *R N A* 配列は、3' アームにあり得る（図 12 を参照されたい）。

10

【0079】

C. 組換え核酸

本開示の組換え核酸には、上記の阻害性核酸、並びに阻害性核酸を含むプラスミド及びベクターゲノムが含まれる。組換え核酸、プラスミド、又はベクターゲノムは、（例えば、プラスミドの）増殖を調整する、及び／又は導入遺伝子（例えば、阻害性核酸）の発現を制御するための調節配列を含んでもよい。組換え核酸はまた、ウイルスベクター（例えば、*r A A V* ベクター）の構成要素として提供されてもよい。概して、ウイルスベクターは、カプシドにパッケージングされた組換え核酸を含むベクターゲノムを含む。

20

【0080】

D. 調節エレメント

本開示は、導入遺伝子（例えば、*R N A* をコードするもの）及び様々な調節又は制御エレメント（例えば、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメント）を含む組換え核酸を含む。典型的には、調節エレメントは、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現に影響を与える核酸配列である。例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンなどを含む、遺伝子発現に有用な調節エレメントの正確な性質は、適切な異種ポリヌクレオチドの転写及び／又は翻訳を促進することを意図して、生物ごとによって、及び細胞型ごとによって変動する。調節制御は、転写、翻訳、スプライシング、メッセージの安定性などのレベルで影響を受ける可能性がある。典型的には、転写を調節する調節制御エレメントは、転写されるポリヌクレオチドの 5' 末端（すなわち、上流）の近くに並置される。調節制御エレメントはまた、転写配列の 3' 末端（すなわち、下流）に、又は転写物内（例えば、イントロン内）に位置してもよい。調節制御エレメントは、転写配列から離れた距離（例えば、1～100、100～500、500～1000、1000～5000、5000～10000、又はそれ以上のヌクレオチド）に位置することができる。しかしながら、ベクターゲノム（例えば、*A A V* ベクターゲノム）の長さに起因して、調節制御エレメントは、典型的には、ポリヌクレオチドから 1～1000 ヌクレオチド以内である。

30

40

【0081】

a. プロモーター

本明細書で使用される場合、「真核生物プロモーター」などの「プロモーター」という用語は、真核生物細胞（例えば、乏突起膠細胞）における特定の遺伝子、又は 1 つ以上のコード配列の転写を開始するヌクレオチド配列を指す。プロモーターは、他の調節エレメント又は領域と協働して、遺伝子又はコード配列の転写レベルを指示することができる。これらの調節エレメントとしては、例えば、転写結合部位、リプレッサー及び活性化タンパク質結合部位、並びに、例えば、アテニュエーター、エンハンサー及びサイレンサーを

50

含む、プロモーターからの転写の量を調節するために直接的又は間接的に作用することが知られている他のヌクレオチド配列が挙げられる。プロモーターは、多くの場合同じ鎖上に位置し、それが作動可能に連結された遺伝子又はコード配列の転写開始部位、5'の近くに位置する。プロモーターは、概して、100～1000ヌクレオチド長である。プロモーターは、典型的には、プロモーターの非存在下での同じ遺伝子の発現と比べて遺伝子発現を増加させる。

【0082】

本明細書で使用される場合、「コアプロモーター」又は「最小限のプロモーター」は、転写を適切に開始するために必要なプロモーター配列の最小限の部分を目指す。これは、転写開始部位、RNAポリメラーゼの結合部位、及び一般的な転写因子結合部位のいずれかを含んでもよい。プロモーターはまた、他の一次調節エレメント（例えば、エンハンサー、サイレンサー、境界エレメント、インシュレーター）及び遠位プロモーター配列（コアプロモーターの3'）を含有する近位プロモーター配列（コアプロモーターの5'）を含んでもよい。

【0083】

好適なプロモーターの例としては、アデノウイルス主要後期プロモーターなどのアデノウイルスプロモーター；サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターなどの異種プロモーター；呼吸器合胞体ウイルスプロモーター；ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター；アルブミンプロモーター；マウス乳がんウイルス（MMTV）プロモーターなどの誘導性プロモーター；メタロチオネインプロモーター；熱ショックプロモーター； α -1抗トリプシンプロモーター；B型肝炎表面抗原プロモーター；トランスフェリンプロモーター；アポリポタンパク質A-1プロモーター；ニワトリ β アクチン（CBA）プロモーター；伸長因子1aプロモーター（EF1a）、CBAプロモーターのハイブリッド形態（CBhプロモーター）、及びCAGプロモーター（サイトメガロウイルス早期エンハンサーエレメント及びプロモーター、並びにトリベータアクチン遺伝子の第1のエクソン及び第1のイントロン、並びにウサギベータグロビン遺伝子のスプライスアクセプター）（Alexopoulos et al. (2008) BioMed. Central Cell Biol. 9:2）が挙げられる。

【0084】

プロモーターは、構成的であっても、組織特異的であっても、又は調節されていてもよい。構成的プロモーターは、作動可能に連結された遺伝子を常に発現させるものである。いくつかの実施形態では、構成的プロモーターは、ほとんどの生理学的及び発達の条件下でほとんどの真核生物組織で活性である。

【0085】

調節されたプロモーターは、活性化又は非活性化され得るものである。調節されたプロモーターには、通常「オフ」であるが、「オン」に誘導され得る誘導性プロモーター、及び通常「オン」であるが「オフ」にされ得る「抑制性」プロモーターが含まれる。温度、ホルモン、サイトカイン、重金属、及び調節タンパク質を含む多くの異なる調節因子が知られている。区別は絶対的なものではなく、構成的プロモーターはしばしばある程度調節され得る。いくつかの場合には、例えば、病理学的状態が改善するときに自然に下方調節されるプロモーターを用いて、内因性経路を利用して導入遺伝子発現の調節を提供することができる。

【0086】

組織特異的プロモーターは、特定の種類の組織、細胞、又は器官のみにおいて活性なプロモーターである。典型的には、組織特異的プロモーターは、特定の組織、細胞、及び／又は器官に特異的な転写活性化エレメントによって認識される。例えば、組織特異的プロモーターは、他の組織よりも1つ又は複数の特定の組織（例えば、2つ、3つ又は4つ）においてより活性であり得る。いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターによって調整される遺伝子の発現は、プロモーターが特異的である組織において、他の組織よりもはるかに高い。いくつかの実施形態では、プロモーターは、それが特異的である組織以

外の任意の組織において、ほとんど、又は実質的に活性がなくてもよい。

【0087】

b. エンハンサー

別の態様では、本明細書に記載の組換え核酸は、導入遺伝子（例えば、本明細書に開示されるRNA分子）の発現を増加させるエンハンサーを更に含み得る。典型的には、エンハンサーエレメントは、プロモーターエレメントの上流に位置するが、下流又は別の配列（例えば、導入遺伝子）内に位置してもよい。エンハンサーは、改変核酸の上流又は下流に100ヌクレオチド、200ヌクレオチド、300ヌクレオチド、又はそれ以上に位置し得る。エンハンサーは、典型的には、プロモーターエレメント単独によって提供される増加した発現を超えて、導入遺伝子（例えば、阻害性核酸をコードする）の発現を増加させる。

10

【0088】

多くのエンハンサーが当該技術分野で既知であり、これにはサイトメガロウイルス主要最初期エンハンサーが含まれるが、これらに限定されない。より具体的には、CMVプロモーターは、3つの領域であるモジュレーター、独自領域、及びエンハンサーを含む（Isomura and Stinski (2003) J. Virol. 77 (6) : 3602-3614）。CMVエンハンサー領域は、別のプロモーター、又はその一部と組み合わせて、ハイブリッドプロモーターを形成し、それに作動可能に結合した核酸の発現を増加させることができる。例えば、CBAプロモーター又はその一部は、CMVプロモーター／エンハンサー又はその一部と組み合わされて、Gray et al. (2011, Human Gene Therapy 22: 1143-1153) に記載されているように、ニワトリベータアクチンハイブリッドプロモーターを表す「CBh」プロモーターと呼ばれるCBAのバージョンを作製することができる。プロモーターと同様に、エンハンサーは、構成的であっても、組織特異的であっても、又は調節されていてもよい。

20

【0089】

c. フィラー、スペーサー、及びスタッパー

本明細書に開示されるように、組換え核酸は、rAAVベクターに使用され得る。その場合、組換え核酸は、核酸の長さを、rAAVベクターへのAAVパッケージングに許容されるウイルスゲノム配列の正常なサイズ（例えば、およそ4.7~4.9キロ塩基）に近いサイズ、又はその正常なサイズに調節するために、追加の核酸エレメントを含んでもよい（Grieger and Samulski (2005) J. Virol. 79 (15) : 9933-9944）。そのような配列は、同義的に、フィラー、スペーサー又はスタッパーと称され得る。いくつかの実施形態では、フィラーDNAは、核酸の非翻訳（非タンパク質コード）セグメントである。いくつかの実施形態では、フィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列は、約1~10、10~20、20~30、30~40、40~50、50~60、60~70、70~80、80~90~90~100、100~150、150~200、200~250、250~300、300~400、400~500、500~750、750~1000、1000~1500、1500~2000、2000~3000、又はそれを超える長さの配列である。

30

40

【0090】

AAVベクターは、典型的には、核酸のAAVカプシドへの最適パッケージングのために、約4kb~約5.2kb又は約4.1~4.9kbの範囲のサイズを有するDNAの挿入物を受け入れる。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、約3.0kb~約3.5kb、約3.5kb~約4.0kb、約4.0kb~約4.5kb、約4.5kb~約5.0kb、又は約5.0kb~約5.2kbの間の全長を有するベクターゲノムを含む。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、約4.7kbの全長を有するベクターゲノムを含む。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、自己相補的なベクターゲノムを含む。rAAVベクターにおける自己相補的（sc）ベクターゲノムの全長は、一本鎖（ss）ベクターゲノムに等しい（すなわち、約4kb~約5.2kb）が、s

50

c ベクターゲノムをコードする核酸配列（すなわち、導入遺伝子、調節エレメント及び ITR を含む）は、s c ベクターがカプシド内にパッケージングされるためには、s s ベクターゲノムをコードする核酸配列の半分の長さでなければならない。

【0091】

d. イントロン及びエクソン

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組換え核酸は、例えば、イントロン、エクソン、及び／又はその一部を含む。イントロンは、r A A V ベクターへのベクターゲノムパッケージングのための適切な長さを達成するために、フィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列として機能し得る。イントロン及び／又はエクソン配列はまた、イントロン及び／又はエクソンエレメントの非存在下での発現と比較して、導入遺伝子（例えば、本明細書に開示される RNA）の発現を増強することもできる（Kurachi et al. (1995) J. Biol. Chem. 270 (10): 576-5281, WO2017/074526）。更に、フィラー／スタッパーポリヌクレオチド配列（「インシュレーター」とも称される）は、当該技術分野において周知であり、限定されないが、WO2014/144486 及び WO2017/074526 に記載されているものが含まれる。

【0092】

e. ポリアデニル化シグナル配列 (poly A)

更なる調節エレメントとしては、終止コドン、終結配列、及びポリアデニル化 (poly A) シグナル配列、例えばウシ成長ホルモン poly A シグナル配列 (BHG poly A) が挙げられ得るが、これらに限定されない。poly A シグナル配列は、遺伝子転写の終結を誘導する、真核生物 mRNA の 3' 末端におけるポリアデノシン「テール」の効率的な付加を駆動する（例えば、Goodwin and Rottman J. Biol. Chem. (1992) 267 (23): 16330-16334 を参照されたい）。poly A シグナルは、その 3' 末端での新たに形成された前駆体 mRNA のエンドヌクレオチド分解切断、及びアデニン塩基のみからなる RNA ストレッチのこの 3' 末端への付加のためのシグナルとして機能する。poly A テールは、mRNA の核外輸送、翻訳及び安定性に重要である。いくつかの実施形態では、poly A は、SV40 初期ポリアデニル化シグナル、SV40 後期ポリアデニル化シグナル、HSV チミジンキナーゼポリアデニル化シグナル、プロタミン遺伝子ポリアデニル化シグナル、アデノウイルス 5 E1b ポリアデニル化シグナル、成長ホルモンポリアデニル化シグナル、PBGD ポリアデニル化シグナル、又はインシリコで設計されるポリアデニル化シグナルであり得る。

【0093】

3. 発現カセット及び発現ベクター

本開示はまた、上記の阻害性核酸をコードする組換え核酸を含むか、又はそれからなる発現カセットも提供する。そのような組換え核酸がまだプロモーターを含んでいない場合、発現カセットは、更にプロモーターを含んでもよい。したがって、本発明による発現カセットは、5' から 3' の方向に、プロモーター、コード配列、及び任意選択でターミネーター又は他のエレメントを含む。発現カセットは、生物、好ましくは細胞、好ましくは罹患細胞への、目的の核酸配列の容易な移入を可能にする。

【0094】

本開示の発現カセットは、好ましくはベクターに含まれる。したがって、本開示のベクターは、目的の核酸配列を有する細胞を形質転換することを可能にする。対応して、本開示は、本開示による発現カセット又は本開示による組換え核酸を含む宿主細胞を提供する。組換え核酸はまた、目的の核酸配列の発現を可能にするようなプロモーター又はエンハンサーを含んでもよい。

【0095】

外因性遺伝物質（例えば、核酸、発現カセット、又は 1 つ以上の治療用若しくは阻害性 RNA をコードする発現ベクター）を、遺伝子組換え細胞を提供するために、トランスフェクション又は形質導入などの遺伝子移入方法によって、インビボで目的の標的細胞に導

10

20

30

40

50

入することができる。様々な発現ベクター（すなわち、標的細胞への外因性遺伝物質の送達を容易にするためのビヒクル）は、当業者に既知である。本明細書で使用される場合、「外因性遺伝物質」は、細胞内に天然に見られない、天然若しくは合成のいずれかの核酸又はオリゴヌクレオチドを指すか、又はそれが細胞内に天然に見られる場合、それは、細胞によって生物学的に著しいレベルで転写又は発現されない。したがって、「外因性遺伝物質」は、例えば、RNAに転写され得る天然に存在しない核酸を含む。

【0096】

本明細書で使用される場合、「細胞のトランスフェクション」は、ウイルス送達ビヒクルの使用なしで、加えられた核酸（DNA、RNA、又はそのハイブリッド）の組み込みによって、細胞による新しい遺伝物質の獲得を指す。したがって、トランスフェクションは、物理的又は化学的方法を使用して核酸を細胞に導入することを指す。いくつかのトランスフェクション技法は、当業者に既知であり、リン酸カルシウム核酸共沈殿、リン酸ストロンチウム核酸共沈殿、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクション、及びタングステン粒子促進マイクロ粒子衝撃を含む。対照的に、「細胞の形質導入」は、DNA又はRNAウイルスを使用して核酸を細胞に移入するプロセスを指す。核酸を細胞に移入するためのRNAウイルス（例えば、レトロウイルス）は、本明細書において形質導入キメラウイルスと称される。ウイルス内に含有される外因性遺伝物質は、形質導入細胞のゲノムに組み込むことができる。キメラDNAウイルス（例えば、治療剤をコードするDNAを担持するアデノウイルス）で形質導入された細胞は、そのゲノムに組み込まれた外因性遺伝物質を有し得ないが、細胞内に染色体外に保持された外因性遺伝物質を発現することが可能であり得る。

【0097】

典型的には、外因性遺伝物質は、新しい遺伝子の転写を制御するプロモーターとともに異種遺伝子（治療用RNA又はタンパク質をコードする）を含み得る。プロモーターは、転写を開始するために必要な特異的なヌクレオチド配列を特徴的に有する。任意選択で、外因性遺伝物質は、所望の遺伝子転写活性を得るために必要な追加の配列（すなわち、エンハンサー）を更に含む。外因性遺伝物質は、プロモーターとコード配列が作動可能に連結されて、コード配列の転写を可能にするように、プロモーターのすぐ下流の細胞ゲノムに導入され得る。レトロウイルス発現ベクターは、挿入された外因性遺伝子の転写を制御するための外因性プロモーターエレメントを含んでもよい。そのような外因性プロモーターには、構成的プロモーター及び誘導性プロモーターの両方が含まれる。

【0098】

天然に存在する構成的プロモーターは、必須の細胞機能の発現を制御する。その結果、構成的プロモーターの制御下にある遺伝子は、細胞成長の全ての条件下で発現される。例示的な構成的プロモーターとしては、ある特定の構成的又は「ハウスキーピング」機能をコードする以下の遺伝子のプロモーターが挙げられる：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、アデノシンデアミナーゼ、ホスホグリセロールキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグリセロールムターゼ、アクチンプロモーター、ユビキチン、伸長因子-1、及び当該技術分野の当業者に既知である他の構成的プロモーター。加えて、多くのウイルスプロモーターは、真核細胞において構成的に機能する。これらとしては、とりわけ、SV40の初期及び後期プロモーター；モロニー白血病ウイルス及び他のレトロウイルスの長い末端反復（LTR）；並びに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターなどが挙げられる。したがって、上記の構成的プロモーターのうちのいずれも、異種遺伝子挿入子の転写を制御するために使用することができる。

【0099】

誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導剤の存在下でのみ発現されるか、又はそれによって大いに制御される（例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下での転写は、ある特定の金属イオンの存在下で大幅に増加する）。誘導性プロモーターには、それらの誘導因子が結合したときに転写を刺激する応答性エレメント（RE）が含まれる

。例えば、血清因子、ステロイドホルモン、レチノイン酸、及び環状AMPに対するREがある。特定のREを含有するプロモーターは、誘導性応答を得るために選択することができ、ある場合には、RE自体を異なるプロモーターに結合させ、それによって組換え遺伝子に誘導性を付与することができる。したがって、適切なプロモーター（構成的対誘導性、強い対弱い）を選択することによって、遺伝子組換え細胞における治療剤の存在及び発現のレベルの両方を制御することが可能である。治療剤をコードする遺伝子が誘導性プロモーターの制御下にある場合、例えば、薬剤の転写を制御する誘導性プロモーターの特異的誘導剤を注射することによって、治療剤の転写を可能にするための条件に遺伝子組換え細胞をインサイチュで曝露することによって、治療剤のインサイチュでの送達が発現される。例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下で遺伝子によってコードされる治療剤の遺伝子組換え細胞によるインサイチュ発現は、インサイチュで遺伝子組換え細胞を適切な（すなわち、誘導する）金属イオンを含有する溶液と接触させることによって増強される。

10

【0100】

したがって、インサイチュで送達される治療剤の量は、以下のような要因を制御することによって調節される：（１）挿入された遺伝子の転写を指示するために使用されるプロモーターの性質（すなわち、プロモーターが構成的であるか又は誘導性であるか、強いのか又は弱い）、（２）細胞に挿入される外因性遺伝子のコピーの数、（３）患者に投与される（例えば、移植される）形質導入／トランスフェクトされた細胞の数、（４）インプラント（例えば、グラフト又はカプセル化された発現系）のサイズ、（５）インプラントの数、（６）形質導入／トランスフェクトされた細胞又はインプラントが所定の位置に残される時間の長さ、及び（７）遺伝子組換え細胞による治療剤の産生速度。治療有効用量の特定の治療剤の送達のためのこれらの因子の選択及び最適化は、上記で開示された因子及び患者の臨床プロファイルを考慮に入れて、過度の実験なしに当業者の範囲内であるとみなされる。

20

【0101】

少なくとも１つのプロモーター及び治療剤をコードする少なくとも１つの異種核酸に加えて、発現ベクターは、発現ベクターでトランスフェクト又は形質導入された細胞の選択を促進するための、選択遺伝子、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子又は蛍光タンパク質遺伝子を含み得る。代替的に、細胞は、２つ以上の発現ベクターでトランスフェクトされ、少なくとも１つのベクターは、治療剤をコードする遺伝子を含有し、他方のベクターは、選択遺伝子を含有する。好適なプロモーター、エンハンサー、選択遺伝子、及び／又はシグナル配列の選択は、過度の実験なしに、当業者の範囲内であるとみなされる。

30

【0102】

本開示のコード配列は、任意の種類の標的又は宿主細胞に挿入することができる。発現ベクターの関連において、ベクターは、当該技術分野の任意の方法によって、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母、又は昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、又は生物学的手段によって宿主細胞に移入することができる。

【0103】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を産生するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al. (2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)を参照されたい。

40

【0104】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法は、DNA及びRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、遺伝子を

50

哺乳動物、例えば、ヒト細胞に挿入するための最も広く使用されている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスⅠ、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許第 5, 350, 674 号及び同第 5, 585, 362 号を参照されたい。

【0105】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段としては、コロイド分散系、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、並びに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質ベースの系が挙げられる。インビトロ及びインビボで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

10

【0106】

本明細書に開示されるように、上記の RNA 分子は、対象における障害を治療するために使用され得る。いくつかの実施形態では、RNA 分子をコードするポリヌクレオチドは、プラスミド又はウイルスベクターなどのベクターに挿入され得るか、又はそれによってコードされ得る。好ましくは、ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターに挿入されるか、又はウイルスベクターによってコードされる。ウイルスベクターは、ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAV ベクター、レンチウイルスベクターなどであり得る。いくつかの具体的な実施形態では、ウイルスベクターは、AAV ベクターである。いくつかの実施形態では、RNA は、レトロウイルスベクターによってコードされてもよい（例えば、米国特許第 5, 399, 346 号、同第 5, 124, 263 号、同第 4, 650, 764 号、及び同第 4, 980, 289 号を参照されたく、これらの各々の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。

20

【0107】

アデノウイルスは、インビボで核酸を様々な細胞型に効率的に送達するように改変され得る真核生物の DNA ウイルスであり、神経細胞及びグリア細胞に対する遺伝子を標的とするためを含む、遺伝子治療プロトコルにおいて広く使用されている。様々な複製欠陥アデノウイルス及び最小アデノウイルスベクターが、核酸治療剤について記載されている（例えば、PCT 特許公開第 1994/26914 号、同第 1995/02697 号、同第 1994/28152 号、同第 1994/12649 号、同第 1995/02697、及び同第 1996/22378 号を参照されたく、これらの各々の内容は、参照によりそれらの全体が組み込まれる）。そのようなアデノウイルスベクターを使用して、本開示の RNA 分子を細胞に送達することもできる。

30

【0108】

4. AAV

アデノ随伴ウイルスは、その臨床的安全性の記録、非病原性の性質、非分裂細胞（ニューロンなど）に感染する能力、及び単回投与後に長期的な遺伝子発現を提供する能力により、広く使用されている遺伝子治療ベクターである（Hocquemiller et al., 2016）。現在、多くのヒト及び非ヒト霊長類 AAV 血清型が同定されている（Gao et al., 2004）。AAV ベクターは、世界中の何百もの臨床試験で安全性が実証されており、臨床有効性は、血友病 B、脊髄性筋萎縮症、アルファ 1 抗トリブソン、及びレーバー先天性黒内障の試験で示されている（Keeler et al., 2017）。3つの AAV ベースの遺伝子治療が承認されている。最初の Glybera は、2012 年に European Medicines Agency（欧州医薬品庁、EMA）によって承認された（主に商業的失敗のため 2017 年に取り消された）。Luxturna は、2017 年に希少な遺伝性網膜ジストロフィーのために FDA によって承認され、Zolgensma は、2019 年に脊髄性筋萎縮症のために FDA によって承認された。

40

【0109】

それらの安全性、非病原性の性質、及びニューロンに感染する能力のために、AAV、

50

例えば、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、及びAAV9は、CNS適用のための一般的に使用される遺伝子治療ベクターである。しかしながら、直接CNS注射後、これらの血清型は、特に遺伝子発現が構成的プロモーターによって駆動される場合、支配的なニューロン指向性を呈し、乏突起膠細胞における発現は低く、これは、白質疾患の治療におけるそれらの使用の可能性を制限する。AAV1/2、AAV2、及びAAV8は、乏突起膠細胞特異的プロモーターが使用される場合にのみ、乏突起膠細胞を形質導入することが示されている（Chen et al., 1998、Lawlor et al., 2009、Li et al., 2019）。発現特異性のため

の細胞特異的プロモーターへの依存は、非乏突起膠細胞系統細胞における非選択的な細胞取り込み及び潜在性プロモーター活性を介した導入遺伝子の漏出性発現の可能性を可能にする。

10

【0110】

これらの課題を軽減するための本明細書に記載のアプローチは、乏突起膠細胞に対する高い指向性を有するAAV血清型を使用することを含む。最近、DNAシャッフリング及び指向進化を使用して、乏突起膠細胞に対して強い選択性を有するキメラAAVカプシド、AAV/Oligo001が記載されている（Powell et al., 2016）。その後、AAV/Oligo001は、カナバン病のマウスモデルにおいて新生児乏突起膠細胞を形質導入することが示された（Francis et al., 2021）。ランダムな変異誘発及びペプチドライブラリの挿入などの他のアプローチを使用して、乏突起膠細胞に対する指向性及び選択性についてスクリーニングすることができるカプシドライブラリを生成することができる。

20

【0111】

前述のように、「アデノ随伴ウイルス」及び／又は「AAV」という用語は、直鎖の一本鎖DNAゲノムを有するパルボウイルス及びそれらのバリエーションを指す。この用語は、別様に必要とされる場合を除いて、全ての亜型、並びに天然に存在する形態及び組換え形態の両方を包含する。AAVを含むパルボウイルスは、細胞に進入し、核酸（例えば、導入遺伝子）を核に導入することができるため、遺伝子治療ベクターとして有用である。いくつかの実施形態では、導入された核酸（例えば、rAAVベクターゲノム）は、形質導入細胞の核内にエピソームとして持続する環状コンカテマーを形成する。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、宿主細胞ゲノム内の特定の部位、例えば、ヒト染色体19上の部位に挿入される。部位特異的統合は、ランダム統合とは対照的に、予測可能な長期発現プロファイルをもたらす可能性が高いと考えられる。ヒトゲノムへのAAVの挿入部位は、AAVS1と称される。細胞に導入されると、核酸によってコードされるRNA又はポリペプチドは、細胞によって発現され得る。AAVは、ヒトにおけるいかなる病原性疾患とも関連しないため、AAVによって送達される核酸を使用して、ヒト対象における疾患、障害、及び／又は状態の治療のための治療用RNA又はポリペプチドを発現することができる。

30

【0112】

AAVの複数の血清型が自然界に存在し、少なくとも15の野生型血清型が、これまでにヒトから同定されている（すなわち、AAV1～AAV15）。天然に存在する及びバリエーションの血清型は、他のAAV血清型と血清学的に異なるタンパク質カプシドを有することによって区別される。例としては、とりわけ、AAV1、AAV2、AAV、AAV3（AAV3A及びAAV3Bを含む）、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV12、AAVrh10、AAVrh74（WO2016/210170を参照されたい）、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAV、並びに組換えにより産生されたバリエーション（例えば、挿入、欠失及び置換を伴うカプシドバリエーションなど）、例えば、AAV2i8、NP4、NP22、NP66、DJ、DJ/8、DJ/9、LK3、RHM4-1と称されるバリエーションなどが挙げられる。例えば、「霊長類AAV」は、霊長類に感染するAAVを指し、「非霊長類AAV」は、非霊長類哺乳動物に感染するAAVを

40

50

指し、「ウシ A A V」は、ウシ哺乳動物に感染する A A Vを指す。

【0113】

血清型独自性は、別の A A Vと比較して、ある A A Vに対する抗体間の交差反応性の欠如に基づいて決定される。そのような交差反応性の差は、通常、カプシドタンパク質配列及び抗原決定因子の差に起因する（例えば、A A V血清型の V P 1、V P 2、及び／又は V P 3 配列の差に起因する）。しかしながら、一部の天然に存在する A A V又は人工の A A V変異（例えば、組換え A A V）は、現在既知の血清型のいずれとも血清学的差異を示さない場合がある。次いで、これらのウイルスは、対応する種類のサブグループ、又はより単純にバリエーション A A Vとみなされ得る。したがって、本明細書で使用される場合、「血清型」という用語は、血清学的に異なるウイルス、並びに血清学的には異ならないが、所与の血清型のサブグループ又はバリエーション内にあり得るウイルスの両方を指す。

10

【0114】

既知の A A V血清型のカプシドのアミノ酸配列の包括的なリスト及びアラインメントは、Marsic et al. (2014) Molecular Therapy 22 (11): 1900-1909によって提供されている。様々な血清型の A A Vのゲノム配列、並びに天然 I T R、repタンパク質、及びカプシドサブユニットの配列が、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献中に、又は GenBankなどの公的データベース中に見出され得る。例えば、GenBank 受託番号 NC_002077 (A A V 1)、AF063497 (A A V 1)、NC_001401 (A A V 2)、AF043303 (A A V 2)、NC_001729 (A A V 3)、NC_001863 (A A V 3 B)、NC_001829 (A A V 4)、U89790 (A A V 4)、NC_006152 (A A V 5)、NC_001862 (A A V 6)、AF513851 (A A V 7)、AF513852 (A A V 8)、及び NC_006261 (A A V 8)を参照されたく、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。また、例えば、Srivistava et al. (1983) J. Virology 45: 555、Chiorini et al. (1998) J. Virology 71: 6823、Chiorini et al. (1999) J. Virology 73: 1309、Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virology 73: 939、Xiao et al. (1999) J. Virology 73: 3994、Muramatsu et al. (1996) Virology 221: 208、Shade et al. (1986) J. Virol. 58: 921、Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 11854、Moris et al. (2004) Virology 33: 375-383、国際特許公開 WO00/28061、WO99/61601、WO98/11244、WO2013/063379、WO2014/194132、WO2015/121501、及び米国特許第 6,156,303号及び米国特許第 7,906,111号を参照されたい。

20

30

【0115】

本明細書で考察されるように、「組換えアデノ随伴ウイルス」又は「r A A V」は、内因性ウイルスゲノムの全て又は一部を非天然配列で置き換えることによって、野生型 A A Vから区別される。ウイルス内に非天然配列を組み込むことは、ウイルスベクターを「組換え」ベクター、したがって、「r A A Vベクター」として定義する。r A A Vベクターは、所望の R N A又はタンパク質又はポリペプチド（例えば、本明細書に開示される R N A分子）をコードする異種ポリヌクレオチドを含み得る。組換えベクター配列は、A A Vカプシドにカプシド化又はパッケージングされてもよく、「r A A Vベクター」、「r A A Vベクター粒子」、「r A A Vウイルス粒子」、又は単に「r A A V」と称される。

40

【0116】

r A A Vベクターの産生のために、V P 1: V P 2: V P 3の望ましい比率は、約 1: 1: 1~約 1: 1: 100の範囲内、好ましくは約 1: 1: 2~約 1: 1: 50の範囲内、より好ましくは約 1: 1: 5~約 1: 1: 20の範囲内である。V P 1: V P 2の望ましい比率は 1: 1であるが、V P 1: V P 2の比率の範囲は 1: 50~50: 1で変動し

50

得る。

【0117】

本開示は、AAV起源ではないポリヌクレオチド配列（例えば、AAVとは異種のポリヌクレオチド）を含むrAAVベクターを提供する。異種ポリヌクレオチドは、少なくとも1つ、場合によっては2つのAAV末端反復配列（例えば、逆方向末端反復）に隣接し得る。本明細書において「ベクターゲノム」とも称される、ITRが隣接する異種ポリヌクレオチドは、典型的には、目的のRNA若しくはポリペプチド、又は目的の遺伝子、例えば、治療的処置のための標的をコードする。対象（例えば、患者）へのrAAVベクターの送達又は投与は、コードされたRNA／タンパク質／ペプチドを対象に提供する。したがって、rAAVベクターを使用して、例えば、様々な疾患、障害及び状態を治療するための発現のための異種ポリヌクレオチドを転写／送達することができる。

10

【0118】

rAAVベクターゲノムは概して、ウイルスrep及びcap遺伝子を置き換えた異種核酸配列に対してcisに145塩基のITRを保持する。そのようなITRは、組換えAAVベクターを産生するために有用であるが、改変されたAAV ITR、及び部分的又は完全に合成された配列を含む非AAV末端反復もまた、この目的に役立ち得る。ITRは、ヘアピン構造を形成し、例えば、感染後の相補的DNA鎖の宿主細胞媒介性合成のためのプライマーとして機能する。ITRはまた、ウイルスパッケージング、統合などにおいて役割を果たしている。ITRは、AAVゲノム複製、及びrAAVベクターへのパッケージングのためにcisで必要とされる唯一のAAVウイルスエレメントである。rAAVベクターゲノムは、任意選択で、異種配列（例えば、関心のある遺伝子をコードする導入遺伝子、又はアンチセンス及びsiRNAを含むがこれらに限定されない関心のある核酸配列、並びに多くの他のものの中でもCRISPR分子）を含むベクターゲノムの5'及び3'末端に一般的に存在する2つのITRを含む。5'及び3' ITRは、両方とも同じ配列を含んでもよく、又は各々が異なる配列を含んでもよい。AAV ITRは、血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくは11、又は任意の他のAAVを含むがこれらに限定されない、任意のAAVに由来し得る。

20

【0119】

本開示のrAAVベクターは、カプシドの血清型（例えば、AAV8、Oligo001）とは異なるAAV血清型（例えば、野生型AAV2、その断片又はバリエーション）からのITRを含み得る。1つの血清型からの少なくとも1つのITRを含むが、異なる血清型からのカプシドを含むそのようなrAAVベクターは、ハイブリッドウイルスベクターと称され得る（米国特許第7,172,893号を参照されたい）。AAV ITRは、野生型ITR配列全体を含んでもよく、又はそのバリエーション、断片、若しくは改変であってもよいが、機能性を保持する。

30

【0120】

いくつかの実施形態では、rAAVベクターゲノムは、直鎖の一本鎖であり、AAV ITRに隣接している。異種遺伝子の転写及び翻訳の前に、自己プライミングITRのうちの1つの遊離3'-OHを使用して、DNAポリメラーゼ（例えば、形質導入細胞内のDNAポリメラーゼ）によって、およそ4700ヌクレオチドの一本鎖DNAゲノムを二本鎖形態に変換して、第2の鎖合成を開始しなければならない。いくつかの実施形態では、完全長一本鎖ベクターゲノム（すなわち、センス及びアンチセンス）はアニールして、完全長二本鎖ベクターゲノムを生成する。これは、反対の極性（すなわち、センス又はアンチセンス）のゲノムを担持する複数のrAAVベクターが同時に同じ細胞を形質導入する場合に生じ得る。それらがどのように産生されるかにかかわらず、二本鎖ベクターゲノムが形成されると、細胞は、二本鎖DNAを転写及び翻訳し、異種遺伝子を発現することができる。

40

【0121】

rAAVベクターからの導入遺伝子発現の効率は、発現前に一本鎖rAAVゲノム（ssAAV）を二本鎖DNAに変換する必要性によって妨げられ得る。このステップは、D

50

NA合成又は複数のベクターゲノム間の塩基対合を必要とせずに、二本鎖DNAに折り畳むことができる逆方向反復ゲノムをパッケージングすることができる自己相補的AAVゲノム(scAAV)を使用することによって回避され得る。例えば、米国特許第8,784,799号; McCarty, (2008) Molec. Therapy 16(10):1648-1656、及びMcCarty et al., (2001) Gene Therapy 8:1248-1254、McCarty et al., (2003) Gene Therapy 10:2112-2118を参照されたい。

【0122】

rAAVベクターのウイルスカプシドは、野生型AAV又はバリエーションAAV、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAVrh74 (WO2016/210170を参照されたい)、AAV12、AAV2i8、AAV1.1、AAV2.5、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV9.45、RHM4-1 (WO2015/013313の配列番号5)、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4、RHM15-6、AAV hu.26、AAV1.1、AAV2.5、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV9.45、AAV2i8、AAV29G、AAV2.8G9、AAV-LK03、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B-S312N、AAVトリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ヘビAAV、ヤギAAV、エビAAV、ヒツジAAV、及びそれらのバリエーションからであり得る(例えば、Fields et al., VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers)を参照されたい。カプシドは、米国特許第7,906,111号、Gao et al. (2004) J. Virol. 78:6381、Morris et al. (2004) Virol. 33:375、WO2013/063379、WO2014/194132に開示されているいくつかのAAV血清型に由来し得、WO2015/121501に開示されているトゥルタイプAAV(AAV-TT)バリエーション、並びにWO2015/013313に開示されているRHM4-1、RHM15-1~RHM15-6、及びそれらのバリエーションを含み得る。AAV caps タンパク質の完全な補体には、VP1、VP2、及びVP3が含まれる。AAV VPカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むORFは、完全な補体AAV Capタンパク質未満を含んでもよく、又はAAV caps タンパク質の完全な補体が提供されてもよい。

【0123】

いくつかの実施形態では、2つ以上のAAV血清型(例えば、野生型AAV血清型、バリエーションAAV血清型)に由来するヌクレオチド配列によってコードされるカプシドタンパク質を含むrAAVベクターは、「キメラベクター」又は「キメラカプシド」と称される(その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,491,907号を参照されたい)。いくつかの実施形態では、キメラカプシドタンパク質は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれよりも多くのAAV血清型に由来する核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、組換えAAVベクターは、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAVrh74、AAVrh10、AAV2i8、又はそのバリエーションに由来するカプシド配列を含み、前述のAAV血清型のうちのいずれかからのアミノ酸の組み合わせを含むキメラカプシドタンパク質をもたらす(Rabinowitz et al. (2002) J. Virology 76(2):791-801を参照されたい)。代替的に、キメラカプシドは、1つの血清型からのVP1、異なる血清型からのVP2、更に異なる血清型からのVP3、及びそれらの組み合わせの混合物を含み得る。例えば、キメラウイルスカプシドは、AAV1 caps タンパク質又はサブユニット、並びに少なくとも1つのAAV2 caps タンパク質又はサブユニットを含み得る。キメラカプシドは、例えば、1つ以上のB19 caps

サブユニットを有する AAV カプシドを含み得、例えば、AAV cap タンパク質又はサブユニットは、B19 cap タンパク質又はサブユニットによって置き換えられ得る。例えば、一実施形態では、AAV カプシドの VP3 サブユニットは、B19 の VP2 サブユニットによって置き換えられ得る。いくつかの実施形態では、キメラカプシドは、参照により本明細書に組み込まれる、WO2021/221995 及び WO2014/052789 に記載されているような Olig001 カプシドである。

【0124】

いくつかの実施形態では、キメラベクターは、変更された指向性又は特定の組織若しくは細胞型に対する指向性を示すように操作されている。「指向性」という用語は、ある特定の細胞（例えば、乏突起膠細胞）若しくは組織型へのウイルスの優先的な進入、及び／又はある特定の細胞若しくは組織型への進入を促進する細胞表面との優先的な相互作用を指す。AAV 指向性は、概して、異なるウイルスカプシドタンパク質とそれらの同族細胞受容体との間の特異的相互作用によって決定される（Lykken et al. (2018) J. Neurodev. Disord. 10:16）。好ましくは、ウイルス又はウイルスベクターが細胞に入ると、ベクターゲノム（例えば、rAAV ベクターゲノム）によって担持される配列（例えば、導入遺伝子などの異種配列）が発現する。

【0125】

「指向性プロファイル」は、様々な組織及び／又は器官における 1 つ以上の標的細胞の形質導入のパターンを指す。例えば、キメラ AAV カプシドは、ニューロン、アストロサイト及び他の CNS 細胞の低い形質導入のみを伴う乏突起膠細胞の効率的な形質導入によって特徴付けられる指向性プロファイルを有し得る。参照により本明細書に組み込まれる、WO2014/052789 を参照されたい。そのようなキメラカプシドは、乏突起膠細胞に対する指向性を示す「乏突起膠細胞に特異的」とみなされ得、CNS に直接投与されたときにニューロン、アストロサイト、及び他の CNS 細胞型よりも乏突起膠細胞を優先的に形質導入する場合、本明細書において「オリゴ指向性」と称される。いくつかの実施形態では、乏突起膠細胞に特異的なカプシドによって形質導入される細胞の少なくとも約 80% が乏突起膠細胞であり、例えば、形質導入細胞の少なくとも約 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上が乏突起膠細胞である。

【0126】

いくつかの実施形態では、rAAV ベクターは、「乏突起膠細胞機能不全に関連する障害」を治療又は予防するために有用である。本明細書で使用される場合、「乏突起膠細胞機能不全に関連する」という用語は、それ以外の場合は同一の正常な乏突起膠細胞と比較して、乏突起膠細胞が損傷した、喪失した、又は不適切に機能する疾患、障害又は状態を指す。この用語には、乏突起膠細胞が直接影響を受ける疾患、障害及び状態、並びに乏突起膠細胞が他の細胞への損傷に対して二次的に機能不全になる疾患、障害又は状態が含まれる。いくつかの実施形態では、乏突起膠細胞機能不全に関連する障害は、脱髄である。

【0127】

いくつかの実施形態では、AAV1、AAV2、AAV6、AAV8、及び AAV9 からの配列を含む、乏突起膠細胞に対する指向性を有するキメラ AAV カプシドは、Olig001（BNP61 としても既知）、又は Olig001 の機能的バリエーションである（WO2021/221995 及び WO2014/052789 を参照されたい）。Olig001 カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、以下の配列に記載され、VP1 は、アミノ酸残基 1（メチオニン）から始まり、VP2 は、アミノ酸残基 148（スレオニン）から始まり、VP3 は、アミノ酸残基 203（メチオニン）から始まる。

【0128】

Olig001（BNP61）カプシドのアミノ酸配列（配列番号 245）

MAADGYLPDWLEDTLSEGI RQWWKLKPGPPPKPAERHKD
DSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYD
RQLDSGDNPYLYKNHADAEFQERLKE DTSFGGNLGRAVFQ
AKKRLLLEPLGLVEEA AKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIG

KTGQQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGS
LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSSGNWHCDSQWLGD RVI
TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTP
WGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNNWGFRPKRLSFKLFNI
QVKEVTQNEGKTIANNLTSSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAH
QGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSSFYCLEYF
PSQMLRTGNNFQFTYTTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLI
DQYLYYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWL
PGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLAN
PGIAMATHKDDKERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSDVM
LTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQ
GALPGMVWQNRDVYLQGP IWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFG
LKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQV
SVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEG
VYSEPHPIGTRYLTRPL

10

20

30

40

50

【0129】

いくつかの実施形態では、乏突起膠細胞に対する指向性を有するキメラAAVカプシドは、Olig002 (BNP62としても既知) 又はOlig003 (BNP63としても既知) である (WO2021/221995及びWO2014/052789を参照されたい)。いくつかの実施形態では、Olig002カプシドVP1は、以下に示されるアミノ酸配列又はその機能的バリエーションを含むか、又はそれからなる。

【0130】

Olig002 (BNP62) カプシドのアミノ酸配列 (配列番号246)
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWD LKPGAPKPKANQQKQD
DGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
QQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIG
KTGQQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGS
LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSSGNWHCDSQWLGD RVI
TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPW
GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNNWGFRPKRLNFKLFNIQ
VKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHQ
GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSSFYCLEYFP
SQMLRTGNNFQFTYTTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLID
QYLYYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWL
GPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANP
GIAMATHKDDKERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSDVML
TSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQ
ALPGMVWQNRDVYLQGP IWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFGL
KHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVS
VVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGV
YSEPHPIGTRYLTRPL

【0131】

いくつかの実施形態では、Olig003カプシドは、以下に示されるアミノ酸配列又はその機能的バリエーションを含むか、又はそれからなる。

【0132】

Olig003 (BNP63) カプシドのアミノ酸配列 (配列番号247)
MAADGYLPDWLEDTLSEGI RQWWKLKPGPPPPKPAERHKD
DSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYD
RQLDSGDNPYLYKNHADAEFQERLQGGDTSFGGNLGRAVFQ

A K K R V L E P L G L V E E G A K T A P G K K R P V E Q S P Q E P D S S S G I G
E T G Q Q P A K K R L N F G Q T G D S E S V P D P Q P L G E P P A T P A A V G P
T T M A S G G G A P M A D N N E G A D G V G S S S G N W H C D S Q W L G D R V I
T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S A S T G A S N D N H Y F G Y S T P W
G Y F D F N R F H C H F S P R D W Q R L I N N N W G F R P K R L S F K L F N I Q
V K E V T D N N G V K T I A N N L T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S A H Q
G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N N G S Q A V G R S S F Y C L E Y F P
S Q M L R T G N N F T F S Y T F E D V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N P L I D
Q Y L Y Y L S R T Q T T G G T A N T Q T L G F S Q G G P N T M A N Q A K N W L P
G P C Y R Q Q R V S T T T G Q N N N S N F A W T A G T K Y H L N G R N S L A N P
G I A M A T H K D D K E R F F P S N G I L I F G K Q N A A R D N A D Y S D V M L
T S E E E I K T T N P V A T E E Y G I V A D N L Q Q Q N T A P Q I G T V N S Q G
A L P G M V W Q N R D V Y L Q G P I W A K I P H T D G N F H P S P L M G G F G L
K H P P P Q I L I K N T P V P A D P P T T F N Q S K L N S F I T Q Y S T G Q V S
V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y Y K S T S V D F A V N T E G V
Y S E P H P I G T R Y L T R P L

【0133】

いくつかの実施形態では、キメラAAVカプシド（例えば、Olig001、Olig002、又はOlig003）及び治療用導入遺伝子を含むrAAVベクターを使用して、乏突起膠細胞機能不全に関連する疾患、障害、又は状態を治療することができる。そのような疾患、障害又は状態では、乏突起膠細胞は、損傷している、喪失している、又は不適切に機能する。これは、乏突起膠細胞に対する直接的な効果の結果であり得るか、又は乏突起膠細胞が他の細胞に対する損傷に対して二次的に機能不全になる場合に生じ得る。いくつかの実施形態では、AAV/Olig001カプシド及び本明細書に記載のRNA分子をコードするポリヌクレオチドを含むrAAVベクターを使用して、ミエリンの遺伝性及び後天性障害を治療する。

【0134】

5. ウイルス粒子及び産生

導入遺伝子（例えば、本明細書に開示されるRNAをコードするもの）を有するウイルスベクター（例えば、rAAVベクター）は、導入遺伝子、好適な調節エレメント、及び細胞形質導入を媒介するウイルスタンパク質の産生に必要なエレメントをコードするポリヌクレオチドから組み立てられ得る。ウイルスベクターの例としては、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、及びAAVベクター、特にrAAVベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0135】

本開示の方法に従って産生されるrAAVベクターのベクターゲノム構成要素は、少なくとも1つの導入遺伝子（例えば、RNA分子をコードするポリヌクレオチド）、及びRNAの発現を制御するための関連する発現制御配列を含む。好ましい実施形態では、ベクターゲノムは、rep及びcapが欠失した、並びに／又は導入遺伝子及びその関連する発現制御配列によって置き換えられたAAVゲノムなどのパルボウイルスゲノムの一部を含む。導入遺伝子は、典型的には、ウイルスrep及びcapタンパク質をコードする核酸の代わりに、ウイルス複製に十分な1つ又は2つのAAV ITR又はITRエレメントに隣接（adjacent）して（すなわち、それらに隣接（flanked）して）挿入される。標的細胞（例えば、乏突起膠細胞）における導入遺伝子の組織特異的発現の促進での使用に適した他の調節配列もまた含まれてもよい。

【0136】

A. パッケージング細胞

導入遺伝子を含み、ウイルス複製（例えば、cap及びrep）に必要なウイルスタンパク質を欠くrAAVベクターは、そのようなタンパク質がウイルス複製及びパッケージングに必要であるため、複製することができないことを当業者は理解するであろう。ca

p及びrep遺伝子は、ベクターゲノムに導入遺伝子を供給するプラスミドとは別個のプラスミドの一部として細胞（例えば、宿主細胞、例えば、パッケージング細胞）に供給されてもよい。

【0137】

パッケージング細胞又はプロデューサー細胞は、ベクター、プラスミド、又はDNAコンストラクトでトランスフェクトされ得る細胞又は細胞株を意味し、ウイルスベクターの完全な複製及びパッケージングに必要なものである、失われている機能をtransで提供する。rAAVベクターの組み立てに必要な遺伝子としては、ベクターゲノム（例えば、RNAをコードする導入遺伝子、調節エレメント、及びITR）、AAV rep遺伝子、AAV cap遺伝子、及び他のウイルス（例えば、アデノウイルス）からのある特定のヘルパー遺伝子が挙げられる。当業者は、AAV産生に必要な遺伝子が、例えば、1つ以上のプラスミドのトランスフェクションを含む様々な手法でパッケージング細胞に導入され得ることを理解するであろう。しかしながら、いくつかの実施形態では、いくつかの遺伝子（例えば、rep、cap、ヘルパー）は、パッケージング細胞中に既に存在してもよく、ゲノム中に組み込まれても、又はエピソーム上に担持されてもよい。いくつかの実施形態では、パッケージング細胞は、構成的又は誘導的な様式で、1つ以上の失われているウイルス機能を発現する。

10

【0138】

当該技術分野で既知の任意の好適なパッケージング細胞が、パッケージングされたウイルスベクターの製造に用いられ得る。哺乳動物細胞又は昆虫細胞が好ましい。本開示の実践において、パッケージング細胞の産生に有用な細胞の例として、例えば、PER.C6、WI38、MRC5、A549、HEK293細胞（構成的プロモーターの制御下で機能的アデノウイルスE1を発現する）、B-50、又は任意の他のHeLa細胞、HepG2、Saos-2、HuH7、及びHT1080細胞株等のヒト細胞株が挙げられる。好適な非ヒト哺乳動物細胞株としては、例えば、VERO、COS-1、COS-7、MDCK、BHK21-F、HKCC又はCHO細胞が挙げられる。

20

【0139】

いくつかの実施形態では、パッケージング細胞は、浮遊培養中で成長することができる。いくつかの実施形態では、パッケージング細胞は、無血清培地で成長することができる。例えば、HEK293細胞は、無血清培地中で懸濁状態で成長する。別の実施形態では、パッケージング細胞は、米国特許第9,441,206号に記載されるようなHEK293細胞であり、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）番号PTA13274として寄託される。WO2002/46359に開示されているものを含むがこれらに限定されない多数のrAAVパッケージング細胞株が、当該技術分野で知られている。

30

【0140】

パッケージング細胞として使用するための細胞株としては、昆虫細胞株が挙げられる。AAVの複製を可能にし、培養物中で維持することができる任意の昆虫細胞を、本開示に従って使用することができる。例えば、Spodoptera frugiperda、例えば、Sf9又はSf21細胞株、ショウジョウバエ属細胞株、又はカ細胞株、例えば、Aedes albopictus由来細胞株が挙げられる。好ましい細胞株は、Spodoptera frugiperda Sf9細胞株である。以下の参考文献は、異種ポリペプチドの発現のための昆虫細胞の使用、そのような細胞に核酸を導入する方法、及びそのような細胞を培養物中で維持する方法に関するそれらの教示に関して、本明細書に組み込まれる：Methods in Molecular Biology, ed. Richard, Humana Press, NJ (1995); O'Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford Univ. Press (1994)、Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828、Kajigaya et al. (1991) Proc. Nat'l. Acad. Sc

40

50

i. USA 88:4646-4650、Ruffing et al. (1992) J. Virol. 66:6922-6930、Kimbauer et al. (1996) Virol. 219:37-44、Zhao et al. (2000) Virol. 272:382-393、及び米国特許第6,204,059号。

【0141】

更なる代替として、本開示のウイルスベクターは、例えば、Urabe et al. (2002) Human Gene Therapy 13:1935-1943によって記載されているように、rep/cap遺伝子及びrAAVテンプレートを送達するためのバキュロウイルスベクターを使用して、昆虫細胞内で産生されてもよい。AAVのためにバキュロウイルス産生を使用する場合、いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは自己相補的である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、任意選択で、バキュロウイルスヘルパー機能をコードする追加の核酸を含み、それによってウイルスカプシドの産生を促進する、バキュロウイルス感染細胞（例えば、昆虫細胞）である。

10

【0142】

パッケージング細胞は、概して、ヘルパー機能及びウイルスベクターの複製及びパッケージングをもたらすのに十分なパッケージング機能とともに、1つ以上のウイルスベクター機能を含む。これらの様々な機能は、プラスミド又はアンプリコンなどの遺伝子コンストラクトを使用して一緒に、又は別々にパッケージング細胞に供給され得、それらは、細胞株内で染色体外に存在し得るか、又は宿主細胞の染色体に組み込まれ得る。

【0143】

20

B. ヘルパー機能

AAVは、ヘルパーウイルスによる細胞の同時感染がなければ、細胞内で複製できない。ヘルパー機能は、ウイルスベクターのパッケージングを開始するために必要な、パッケージング細胞の活性感染を確立するために必要なヘルパーウイルス要素を含む。ヘルパーウイルスは、典型的には、アデノウイルス又は単純ヘルペスウイルスを含む。アデノウイルスヘルパー機能は、典型的には、アデノウイルス構成要素、アデノウイルス初期領域1A (E1a)、E1b、E2a、E4、及びウイルス関連(VA)RNAを含む。ヘルパー機能（例えば、E1a、E1b、E2a、E4、及びVA RNA）は、様々なヘルパー要素をコードする1つ以上の核酸で細胞をトランスフェクトすることによって、パッケージング細胞に提供することができる。代替的に、宿主細胞（例えば、パッケージング細胞）は、ヘルパータンパク質をコードする核酸を含み得る。例えば、HEK293細胞は、ヒト細胞をアデノウイルス5 DNAで形質転換することによって生成され、現在、E1及びE3を含むがこれらに限定されない、いくつかのアデノウイルス遺伝子を発現する（例えば、Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. Virol. 36:59-72）を参照されたい。したがって、これらのヘルパー機能は、例えば、それらをコードするプラスミドによって細胞にそれらを供給する必要なしに、HEK293パッケージング細胞によって提供され得る。

30

【0144】

いくつかの実施形態では、パッケージング細胞は、少なくとも(i)導入遺伝子及びAAV ITRを含むベクターゲノムを含み、エンハンサー、プロモーター、エクソン、イントロン、及びpoly Aの調節エレメントのうちの少なくとも1つを更に含むプラスミド、(ii) rep遺伝子（例えば、AAV2 rep）及びcap遺伝子（例えば、Oligo01 cap）を含むプラスミド、並びに(iii)ヘルパー機能を含むプラスミドでトランスフェクトされる。

40

【0145】

複製及びパッケージングのためにヘルパー機能を有するヌクレオチド配列を細胞宿主に導入する任意の方法を用いることができ、これには、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、カチオン性又はアニオン性リポソーム、及び核局在化シグナルと組み合わせたりポソームが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヘルパー機能は、ウイルスベクターを使用するトランスフェクシ

50

ンによって、又はヘルパーウイルスを使用する感染によって提供され、ウイルス感染を発生するための標準的な方法が使用され得る。

【0146】

ベクターゲノムは、DNA又はRNAコンストラクトなどの任意の好適な組換え核酸であってもよく、一本鎖、二本鎖、又は二本鎖（すなわち、WO2001/92551に記載されているように自己相補的）であってもよい。

【0147】

C. パッケージングされたウイルスベクターの産生

ウイルスベクターは、当業者に既知のいくつかの方法によって作製することができる（例えば、WO2013/063379を参照されたい）。好ましい方法は、Griegger, et al. (2015) Molecular Therapy 24(2):287-297に記載されており、その内容は、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。簡潔に述べると、HEK293細胞の効率的なトランスフェクションを出発点として使用し、適格な臨床マスター細胞バンクからの接着HEK293細胞株を使用して、迅速かつ拡張可能なrAAV生成を可能にするシェーカーフラスコ及びWAVEバイオリアクター内での動物成分を含まない懸濁条件で増殖させる。三重トランスフェクション法（例えば、WO96/40240）を使用して、HEK293細胞株懸濁液は、トランスフェクションの48時間後に採取した場合、 1×10^5 超の粒子含有ベクターゲノム(vg)/細胞、又は 1×10^{14} 超のvg/L（細胞培養物）を生成することができる。より具体的には、三重トランスフェクションは、パッケージング細胞を3つのプラスミド（1つのプラスミドは、AAV rep及びcap（例えば、Oligo001 cap）遺伝子をコードし、別のプラスミドは、様々なヘルパー機能（例えば、アデノウイルス又はHSVタンパク質、例えば、E1a、E1b、E2a、E4、及びVA RNAをコードし、別のプラスミドは、導入遺伝子（例えば、本明細書に記載のRNA）及び導入遺伝子の発現を制御する様々なエレメントをコードする）でトランスフェクトする方法を指す。

【0148】

一本鎖ベクターゲノムは、プラス鎖又はマイナス鎖として、ほぼ等しい割合でカプシドにパッケージングされる。rAAVベクターのいくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、プラス鎖極性（すなわち、DNA鎖のセンス又はコード配列）にある。rAAVベクターのいくつかの実施形態では、ベクターは、マイナス鎖極性（すなわち、アンチセンス又はテンプレートDNA鎖）にある。5'から3'の配向のプラス鎖のヌクレオチド配列が与えられると、5'から3'の配向のマイナス鎖のヌクレオチド配列は、プラス鎖のヌクレオチド配列の逆相補体として決定することができる。

【0149】

所望の収率を達成するために、成長及びトランスフェクションの両方を支援する適合性のある無血清懸濁培地の選択、トランスフェクション試薬の選択、トランスフェクション条件及び細胞密度などのいくつかの変数が最適化される。

【0150】

rAAVベクターは、カラムクロマトグラフィー又は塩化セシウム勾配などの当該技術分野における標準的な方法によって精製され得る。rAAVベクターを精製する方法は、当該技術分野において既知であり、Clark et al. (1999) Human Gene Therapy 10(6):1031-1039、Schenpp and Clark (2002) Methods Mol. Med. 69:427-443、米国特許第6,566,118号、及びWO98/09657に記載されている方法が含まれる。

【0151】

イオン交換クロマトグラフィー法に基づく普遍的な精製戦略を使用して、AAV血清型1~6、8、9、及び様々なキメラカプシド（例えば、Oligo001）の高純度なベクター調製物を生成することができる。いくつかの実施形態では、このプロセスは、1週間

以内に完了することができ、高い全カプシド対空カプシド比 ($> 90\%$ 全カプシド) をもたらし、臨床用途に適した精製後収率 ($> 1 \times 10^{13} \text{ vg/L}$) 及び純度を提供する。いくつかの実施形態では、そのような方法は、全ての血清型及びキメラカプシドに関して普遍的である。拡張可能な製造技術を利用して、(例えば、ミエリンの遺伝性及び後天性障害の治療のための) GMP 臨床及び商業グレードの rAAV ベクターを製造することができる。

【0152】

本開示の rAAV ベクターが産生及び精製された後、それらは、ミエリンの遺伝性又は後天性障害を有するヒト対象などの対象への投与用の組成物を調製するために力価測定され得る (例えば、試料中の rAAV ベクターの量が定量され得る)。rAAV ベクターの力価測定は、当該技術分野において既知の方法を使用して達成することができる。

10

【0153】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムを含有する粒子及びベクターゲノムを含有しない「空の」カプシドを含むウイルス粒子の数は、電子顕微鏡法、例えば、透過型電子顕微鏡法 (TEM) によって決定され得る。そのような TEM ベースの方法は、試料中のベクター粒子 (又は野生型 AAV の場合はウイルス粒子) の数を提供することができる。

【0154】

いくつかの実施形態では、rAAV ベクターゲノムは、ベクターゲノム内の配列、例えば、ITR 配列、及び／又は導入遺伝子若しくは調節エレメント内の配列に対するプライマーを使用する定量的 PCR (qPCR) を使用して、力価測定され得る。ベクターゲノムの配列を含有するプラスミドなどの既知の濃度の標準物質の希釈物に対して qPCR を並行して行うことにより、マイクロリットル又はミリリットルなどの単位体積当たりのベクターゲノム (vg) の数として rAAV ベクターの濃度を計算することを可能にする標準曲線を生成することができる。例えば、電子顕微鏡法によって測定されるベクター粒子の数を、試料中のベクターゲノムの数と比較することによって、空のカプシドの数を決定することができる。ベクターゲノムは、治療用導入遺伝子を含有するため、ベクター試料の vg/kg 又は vg/ml は、対象が受けるであろうベクター粒子の数よりも治療量を示すことができ、そのいくつかは空であってもよく、ベクターゲノムを含有しない。ストック溶液中の rAAV ベクターゲノムの濃度が決定されると、それは、対象 (例えば、ミエリンの遺伝性又は後天性障害を有する対象) への投与用の組成物の調製に使用するのに好適な緩衝液に希釈され得るか、又はそれに対して透析され得る。

20

30

【0155】

6. 使用及び治療方法

本明細書に開示される核酸 (例えば、RNA 分子又は RNA 分子をコードするポリヌクレオチド) は、疾患、障害、又は状態の遺伝子治療の治療及び／又は予防のために使用され得る。特に、特定の標的遺伝子 (例えば、PMD、MSA、又は H-ABC) を標的にすることによって、乏突起膠細胞又はミエリンの欠乏又は機能不全に関連する疾患、障害、又は状態を治療又は予防するために使用することができ、関連する標的遺伝子の発現を低減することで、治療上の利益又は改善、例えば、それ以外の点では健康な個体におけるタンパク質のレベル又は機能と比較して、関連するタンパク質 (例えば、PLP1、SNCA、又は TUBB4A) のレベル又は機能の増加によって媒介される、又はそれに関連する疾患、障害、若しくは状態をもたらし得る任意の他の状態及び又は病気のものに使用することができる。本明細書に記載のベクターゲノム及び／又は rAAV ベクターは、同じ疾患、障害、又は状態の遺伝子治療の治療及び／又は予防のために使用され得る。

40

【0156】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、対象の疾患、障害、又は状態の治療における、rAAV ベクター又はその医薬組成物の使用を含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、目的の遺伝子 (例えば、PMD、MSA、又は H-ABC) のレベルの低下を必要とする対象において、その目的の遺伝子のレベルを低下させるための、rAAV ベクター (例えば、AAV/Oligo001)、又はその医薬組成物の使用を含む。

50

【0157】

上記の核酸、ベクターゲノム、及び／又はrAAVベクターは、乏突起膠細胞又はミエリンの欠乏又は機能不全に関連する、又はそれによって引き起こされる疾患、障害、又は状態（例えば、PMD、MSA、又はH-ABC）、並びに関連するタンパク質の下方調節が治療上の利益又は改善をもたらし得る任意の他の状態又は病気の治療及び／又は予防における使用のための医薬の調製に使用され得る。

【0158】

本明細書で使用される場合、ミエリンの障害、ミエリンの疾患、ミエリン関連障害、ミエリン関連疾患、ミエリン障害、及びミエリン疾患は、互換的に使用される。これらは、対象における任意の疾患、状態（例えば、外傷性脊髄損傷及び脳梗塞から生じるもの）、又は脱髄、不十分な髄鞘及び髄鞘再生、又は髄鞘形成不全に関連する障害を含む。そのような障害は、遺伝性であるか、後天性であるか、又はその両方であり得る。これは、様々な神経毒性障害に起因する髄鞘形成関連障害又は脱髄から生じる可能性がある。本明細書で使用される場合、「脱髄」は、脱髄の作用、又は神経を絶縁するミエリン鞘の喪失を指し、多発性硬化症、横断性脊髄炎、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパシー、及びギラン・バレー症候群を含むいくつかの神経変性自己免疫疾患の特質である。白質ジストロフィーは、遺伝性酵素欠乏症によって引き起こされ、これは、CNS白質内のミエリン鞘の異常な形成、破壊、及び／又は異常なターンオーバーを引き起こす。後天性ミエリン障害及び遺伝性ミエリン障害はいずれも、重度の障害につながる予後不良を有する。したがって、本開示のいくつかの実施形態は、対象における神経変性自己免疫疾患の治療方法を含み得る。ニューロンの髄鞘再生は、乏突起膠細胞を必要とする。本明細書で使用される場合、「髄鞘再生」という用語は、ミエリン産生細胞を交換するか、又はそれらの機能を回復させることによる、神経のミエリン鞘の再生を指す。

【0159】

本発明の方法によって治療又は改善され得るミエリン関連疾患又は障害には、対象の脳細胞、例えば、CNSニューロンにおける髄鞘形成不全又は脱髄に関連する疾患、障害又は傷害が含まれる。そのような疾患は、ニューロンを取り囲む髄鞘が欠如しているか、不完全であるか、適切に形成されていないか、又は劣化している疾患及び障害を含むが、これらに限定されない。そのような疾患は、多発性硬化症（MS）、視神経脊髄炎（NMO）、進行性多巣性白質脳症（PML）、脳脊髄炎（EPL）、橋中心髄鞘崩壊症（CPM）、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、ペリツェウス・メルツバッハー病（PMD）、ワーラー変性、視神経炎、横断性脊髄炎、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄損傷、外傷性脳損傷、放射線後損傷、化学療法の神経学的合併症、脳卒中、急性虚血性視神経障害、ビタミンE欠乏症、ビタミンE単独欠乏症候群、バッセン・コーンツヴァイク症候群、マルキアファーク・ビニャミ症候群、異染性白質ジストロフィー、三叉神経痛、急性播種性脳炎、ギリアン・バレー症候群、マリー・シャルコー・トウス病、及びベル麻痺を含むが、これらに限定されない。

【0160】

本発明の方法によって治療又は改善され得るミエリン関連疾患又は障害には、ミエリン欠乏を特徴とする疾患又は障害が含まれる。中枢神経系における不十分な髄鞘形成は、広範な神経障害に関連している。これらの中には、脳室周囲白質軟化症を有する小児における先天性の前脳髄鞘形成不全（congenital deficit in fore brain myelination）が、神経学的罹患率に寄与する脳性麻痺の形態がある（Goldman et al., 2008）Goldman, S. A., Schanz, S., and Windrem, M. S. (2008). Stem cell-based strategies for treating pediatric disorders of myelin. Hum Mol Genet. 17, R76-83. 年齢スペクトルの他方の端では、ミエリン喪失及び非効果的な修復は、老化に関連する認知機能の低下に寄与し得る（Kohama et al., 2011）Koham

a, S. G., Rosene, D. L., and Sherman, L. S. (2011) Age (Dordr). Age-related changes in human and non-human primate white matter: from myelination disturbances to cognitive decline。したがって、髄鞘形成及び／又は髄鞘再生を強化する有効な組成物及び方法は、広範なミエリン関連障害における疾患進行を停止し、かつ機能を回復することにおいて実質的な治療上の利益を有し得ることが企図される。

【0161】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、ミエリン依存性プロセスを強化又は促進するために、ミエリン関連障害を有しない、及び／又は有する疑いのない対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、認知的に健康な対象におけるミエリン依存性プロセスであることが知られている認知を強化するためにCNSニューロンの髄鞘形成を促進するために対象に投与することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、認知強化（向知性）剤と組み合わせて投与することができる。例示的な薬剤としては、健康な個体における認知機能、特に実行機能、記憶、創造性、又はやる気を改善する任意の薬物、サプリメント、又は他の物質が挙げられる。非限定的な例としては、ラセタム（例えば、ピラセタム、オキシラセタム、及びアニラセタム）、栄養補助食品（例えば、bacopa monnieri、panax ginseng、ginkgo biloba、及びGABA）、刺激剤（例えば、アンフェタミン医薬品、メチルフェニデート、覚醒促進剤（eugeroics）、キサンチン、及びニコチン）、レーテアニン、トルカポン、レボドパ、アトモキセチン、及びデシプラミンが挙げられる。

【0162】

治療剤（例えば、RNA分子、RNA分子をコードするポリヌクレオチド、ベクターゲノム、又はベクター、例えばrAAV、又は細胞）の全体的な投薬量は、対象の全体的な健康、対象の疾患状態、状態の重症度、改善の観察、並びに選択される薬剤の処方及び投与経路を含むいくつかの要因に依存する治療有効量である。治療有効量の決定は当業者の能力の範囲内である。正確な処方、投与経路及び投薬量は、対象の状態を考慮して、個々の医師によって選択することができる。

【0163】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の細胞又はヌクレオチド組成物は、ミエリンタンパク質（例えば、MBP）の量を、未処理の対象のミエリンタンパク質のレベルと比較して少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、又は1000%増加させることによって、対象のCNSにおけるミエリン産生を強化するのに有効な量で投与されてもよい。

【0164】

他の実施形態では、細胞又はヌクレオチド組成物は、生存ニューロンの数を、未処理のCNSニューロン又は対象における生存ニューロンの数と比較して少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、又は1000%増加させることによって対象におけるCNSニューロンの生存を促進するのに有効な量で投与されてもよい。

【0165】

ミエリン関連障害に罹患している対象を治療するための別の戦略は、治療有効量の乏突

起膠細胞分化及び／又は増殖誘導剤及び／又は抗神経変性疾患剤とともに、治療有効量の
本明細書に記載の細胞又はヌクレオチド組成物を投与することである。抗神経変性疾患剤
の例としては、Ｌードパ、コリンエステラーゼ阻害剤、抗コリン薬、ドーパミンアゴニスト、
ステロイド、並びにインターフェロン、モノクローナル抗体、及び酢酸グラチラマー
を含む免疫調節剤が挙げられる。したがって、本開示の更なる態様では、本明細書に記載
の組成物は、神経変性及びミエリン関連障害を治療するための補助療法との組み合わせ療法
の一部として投与することができる。

【０１６６】

「併用療法」という語句は、本明細書に記載される乏突起膠細胞前駆体分化誘導組成物の
投与、及びこれらの治療剤の共作用からの有益な効果を提供することを意図した特定の
治療レジメンの一部としての治療剤を包含する。併用投与される場合、乏突起膠細胞前駆
体分化誘導化合物及び治療剤は、別個の組成物として製剤化することができる。併用され
るこれらの治療剤の投与は、典型的には、定義された期間（通常、選択される併用に
応じて、数分、数時間、数日、又は数週間）にわたって実施される。

10

【０１６７】

７．医薬組成物

本開示は、ミエリンの遺伝性又は後天性障害を予防又は治療するための、医薬組成物又は
医薬を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、上記のRNA分子、ポリヌ
クレオチド、発現カセット、発現ベクター（例えば、ウイルスベクターゲノム、発現ベク
ター、rAAVベクター）、及び宿主細胞のうちの１つ以上を含む。

20

【０１６８】

医薬組成物は、薬学的に許容される担体、アジュバント、希釈剤、賦形剤、及び／又は
他の薬剤を更に含む。薬学的に許容される担体、アジュバント、希釈剤、賦形剤又は他の
薬剤は、生物学的に又は別様に望ましくないものではなく、例えば、材料は、材料の有利
な生物学的効果を上回る望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく対象に投与され
得る。任意の好適な薬学的に許容される担体又は賦形剤が、本発明による医薬組成物の調
製に使用され得る（例えば、Remington The Science and Practice of Pharmacy, Adeboye Adejare (Editor) Academic Press, November 2020を参照されたい）。

【０１６９】

医薬組成物は、典型的には、製造及び貯蔵条件下で無菌であり、発熱原を含まず、かつ
安定である。医薬組成物は、溶液（例えば、水、生理食塩水、デキストロース溶液、緩衝
溶液、又は他の薬学的に滅菌された流体）、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は高
い生成物（例えば、ウイルスベクター粒子、微粒子、又はナノ粒子）濃度を収容するのに
好適な他の秩序化された構造として製剤化されてもよい。

30

【０１７０】

いくつかの実施形態では、本開示の上記のRNA分子、ポリヌクレオチド、発現カセ
ット、発現ベクター、ベクターゲノム、宿主細胞、又はrAAVベクターを含む医薬組成物
は、水又は緩衝生理食塩水溶液中で製剤化される。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、及び液体ポリエチレングリ
コールなど）、及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であってもよい。適切
な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合は必要な
粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。いくつかの
実施形態では、等張化剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビ
トールなど、又は塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい場合がある。注射用組
成物の持続的吸着は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及
びゼラチンを含めることによってもたすことができる。いくつかの実施形態では、本開
示の核酸、ベクター、及び／又は宿主細胞は、制御放出製剤、例えば、インプラント及び
マイクロカプセル化送達系を含む、徐放性ポリマー又は生成物を急速放出から保護する他
の担体を含む組成物中で投与され得る。

40

50

【0171】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、静脈内、動脈内、皮下、皮内、腹腔内、筋肉内、関節内、実質内（IP）、髄腔内（IT）、脳室内（ICV）及び／又は大槽内（ICM）投与に好適な組成物を含む非経口医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、ICV注射による投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、rAAVベクター（例えば、AAV/Oligo001）は、PBS中350mMのNaCl及び5%D-ソルビトール中で製剤化される。

【0172】

8. 投与方法

上記のRNA分子、又はポリヌクレオチド、又はベクター（例えば、ベクターゲノム、rAAVベクター）は、対象を治療するために、対象（例えば、患者）に投与されてもよい。ベクターの投与を必要とするヒト対象又は動物へのベクターの投与は、ベクターを投与するための当該技術分野において既知の任意の手段によって行うことができる。本開示のベクターの標的細胞は、CNSの細胞、好ましくは乏突起膠細胞を含む。

【0173】

ベクターは、標準的なケア治療に加えて、及びその補助として投与することができる。すなわち、ベクターは、慣例的な方法を使用して当業者によって決定されるように、同時に、同時期に、又は所定の投薬間隔で、別の薬剤、化合物、薬物、治療又は治療レジメンと同時に投与することができる。本明細書に開示される使用は、当該技術分野で既知の疾患のための標準的なケアに加えて、及び／又はそれと同時の投与スケジュールに基づいて、本開示のrAAVベクターの投与を含む。

【0174】

いくつかの実施形態では、併用組成物は、1種以上の免疫抑制剤を含む。いくつかの実施形態では、併用組成物は、導入遺伝子（例えば、本明細書に開示されるRNA分子をコードするポリヌクレオチド）を含むrAAVベクター、及び1つ以上の免疫抑制剤を含む。いくつかの実施形態では、方法は、導入遺伝子を含むrAAVベクターを対象に投与又は送達することと、ベクターの投与前に予防的に、又はベクターの投与後に（すなわち、ベクター及び／又はタンパク質が提供され、それによって、それらに対する応答の症状が明らかになる前又は後に）、免疫抑制剤を対象に投与することと、を含む。

【0175】

一実施形態では、本開示のベクター（例えば、rAAVベクター）は、全身投与される。全身投与の例示的な方法としては、限定されないが、静脈内（例えば、門脈）、動脈内（例えば、大腿動脈、肝動脈）、血管内、皮下、皮内、腹腔内、経粘膜、肺内、リンパ内、及び筋肉内投与など、並びに直接的な組織又は器官への注射が挙げられる。当業者であれば、全身投与により、全ての組織に核酸を送達することができることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、直接的な組織又は器官への投与は、乏突起膠細胞欠乏症によって直接的な影響を受けるエリア（例えば、脳及び／又は中枢神経系）への投与を含む。いくつかの実施形態では、本開示のベクター及びその医薬組成物は、脳実質に（すなわち、実質内投与によって）、脳脊髄液（CSF）に到達するように脊柱管若しくはくも膜下腔に（すなわち、髄腔内投与によって）、脳の脳室に（すなわち、脳室内投与によって）、及び／又は脳の大槽に（すなわち、大槽内投与によって）投与される。

【0176】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示のベクターは、ミエリンの障害を治療するために、脳に（例えば、実質、脳室（ventricle）、大槽などに）及び／又はCSFに（例えば、脊柱管又はくも膜下腔に）直接注射することによって投与される。本開示のベクターの標的細胞には、皮質、脳梁の皮質下白質、線条体及び／又は小脳に位置する細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、本開示のベクターの標的細胞は、乏突起膠細胞である。追加の投与経路はまた、直接可視化下でのベクターの局所適用、例えば、表面皮質適用、又は他の定位固定適用を含み得る。

【0177】

いくつかの実施形態では、本開示のベクターは、少なくとも2つの経路によって投与される。例えば、ベクターは全身投与され、脳にも直接投与される。少なくとも2つの経路を介して投与される場合、ベクターの投与は、同時又は同時期であることができるが、そうである必要はない。代わりに、異なる経路を介した投与は、各投与間にある時間間隔置いて別個に行うことができる。

【0178】

上記のRNA分子、又はRNA分子をコードするポリヌクレオチド、又はベクターゲノム、又はポリヌクレオチドを含むrAAVベクターは、エクスビボでの細胞の形質導入、又は対象への直接投与（例えば、疾患を有する患者のCNSへ直接的に）のために使用され得る。いくつかの実施形態では、形質導入された細胞（例えば、宿主細胞）は、疾患、障害、又は状態を治療又は予防するために、対象に投与される（例えば、疾患のための細胞治療）。治療用核酸（例えば、RNAをコードする）を含むrAAVベクターは、好ましくは、生物学的に有効な量で細胞に投与される。いくつかの実施形態では、生物学的に有効な量のベクターは、標的細胞において関連する遺伝子の発現の低減をもたらすのに十分な量である。

【0179】

いくつかの実施形態では、本開示は、単独で、又はベクター（プラスミド、ウイルスベクター、ナノ粒子、リポソーム、又は核酸を細胞に提供するための任意の既知の方法を含む）中のいずれかで、細胞（インビボ、インビトロ、又はエクスビボ）に本明細書に記載のRNA分子をコードするポリヌクレオチドを投与することによって、細胞における遺伝子のレベル及び／又は活性を減少させる方法を含む。

【0180】

rAAVベクターの投薬量は、例えば、投与様式、治療される疾患若しくは状態、疾患の病期及び／若しくは侵襲性、個々の対象の状態（年齢、性別、体重など）、特定のウイルスベクター、発現されるタンパク質の安定性、ベクターに対する宿主免疫応答、並びに／又は送達される遺伝子に依存する。概して、用量は、治療効果を達成するために、対象の体重（kg）当たり少なくとも 1×10^8 以上、例えば、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 以上のベクターゲノム（vg）の範囲である。

【0181】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のRNA分子をコードするポリヌクレオチドは、標的細胞（例えば、乏突起膠細胞）における発現に適切な調節エレメント（例えば、プロモーター）を有するDNA分子（例えば、組換え核酸）の構成要素として投与され得る。ポリヌクレオチドは、プラスミド又はウイルスベクター、例えば、rAAVベクターの構成要素として投与され得る。rAAVベクターは、治療を必要とする患者にベクターを直接（例えば、CNSに直接）送達することによってインビボで投与され得る。rAAVベクターは、治療を必要とするドナー患者からの細胞へのベクターのインビトロ投与、続いて形質導入された細胞のドナーへの再導入（例えば、細胞治療）によってエクスビボで患者に投与されてもよい。

【0182】

9. キット

本開示は、包装材料及び1つ以上の構成要素を含むキットを提供する。キットは、典型的には、構成要素の説明、又はその中の構成要素のインビトロ、インビボ、若しくはエクスビボでの使用説明を含むラベル又は添付文書を含む。キットは、そのような構成要素、例えば、上記のRNA分子、ポリヌクレオチド、核酸、発現カセット、発現ベクター（例えば、ウイルスベクターゲノム、発現ベクター、rAAVベクター）、及び宿主細胞、並びに任意選択で第2の活性剤、例えば、化合物、治療剤、薬物、又は組成物の集合体を含み得る。

【0183】

キットは、キットの1つ以上の構成要素を含有する物理的構造を指す。包装材料は、構

10

20

30

40

50

成要素を無菌的に維持することができ、そのような目的に一般的に使用される材料（例えば、紙、ガラス、プラスチック、箔、アンプル、バイアル、チューブなど）で作製することができる。

【0184】

ラベル又は添付文書は、その中の1つ以上の構成要素の識別情報、用量、作用機序、薬物動態、及び薬力学を含む活性成分の臨床薬理学を含み得る。ラベル又は添付文書は、製造、ロット番号、製造場所及び日付、有効期限を特定する情報を含み得る。ラベル又は添付文書は、キット構成要素が使用され得る疾患に関する情報（例えば、ミエリンの遺伝性又は後天性障害、例えば、PMD、MSA、及びH-ABC）を含み得る。ラベル又は添付文書は、方法、使用、又は治療プロトコル若しくは治療レジメンにおけるキット構成要素のうちの1つ以上を使用するための臨床医又は対象に対する指示を含み得る。指示は、投薬量、持続時間の頻度、及び本明細書に記載される方法、使用、治療プロトコル、又は予防若しくは治療レジメンのいずれかを実践するための指示を含み得る。

10

【0185】

ラベル又は添付文書は、潜在的な副作用、合併症又は反応に関する情報、例えば、特定の組成物を使用することが適切でない状況に関する対象又は臨床医への警告を含み得る。

【0186】

10. 定義

本明細書で使用される場合、「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」、及び「ポリヌクレオチド」という用語は、ホスホジエステル結合によって連結された単量体ヌクレオチドで構成されるか、又はそれを含む任意の分子を同義的に指す。核酸は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであり得る。核酸配列は、本明細書において、5'から3'への方向に提示される。本開示の核酸配列（すなわち、ポリヌクレオチド）は、デオキシリボ核酸（DNA）分子又はリボ核酸（RNA）分子であり得、核酸の全ての形態、例えば、二本鎖分子、一本鎖分子、低分子又は短いヘアピンRNA（shRNA）、マイクロ干渉RNA又はマイクロRNA（miRNA）、低分子又は短い干渉RNA（siRNA）、トランススプライシングRNA、アンチセンスRNA、メッセンジャーRNA、トランスファーRNA、リボソームRNAを指す。ポリヌクレオチドがDNA分子である場合、その分子は、遺伝子、cDNA、アンチセンス分子又は前述の分子のいずれかの断片であり得る。ヌクレオチドは、本明細書において、単一文字コード：アデニン（A）、グアニン（G）、チミン（T）、シトシン（C）、イノシン（I）、及びウラシル（U）によって示される。ヌクレオチド配列は、化学修飾又は人工的であり得る。ヌクレオチド配列は、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ及びロック核酸（LNA）、並びにグリコール核酸（GNA）及びトレオース核酸（TNA）を含む。これらの配列の各々は、分子の骨格への変化によって、天然に存在するDNA又はRNAと区別される。また、ホスホロチオエートヌクレオチドが使用されてもよい。他のデオキシヌクレオチド類似体としては、メチルホスホネート、ホスホラミデート、ホスホロジチオエート、N3'-P5'-ホスホラミデート、及びオリゴリボヌクレオチドホスホロチオエート、並びにそれらの2'-O-アリル類似体、及び本開示のヌクレオチド配列に使用され得る2'-O-メチルリボヌクレオチドメチルホスホネートが挙げられる。

20

30

40

【0187】

いくつかの実施形態では、タンパク質又は核酸が単離される。本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、人工的に産生されることを意味する。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）例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってインビトロで増幅される、（ii）クローニングによって組換え的に産生される、（iii）切断及びゲル分離によって精製される、又は（iv）例えば、化学合成によって合成される、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なものである。したがって、5'及び3'制限部位が既知であるか、又は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、ベクターに含まれるヌクレオチド配列は、単離されたとみなされるが、そ

50

の天然宿主中にその天然状態で存在する核酸配列は、単離されていない。単離された核酸は、実質的に精製されてもよいが、必ずしも精製される必要はない。例えば、クローニング又は発現ベクター内の単離された核酸は、それが存在する細胞内にごくわずかなパーセンテージの物質を含み得るという点で純粋ではない。しかしながら、そのような核酸は、当業者に既知の標準技法によって容易に操作可能であるため、本明細書で用語が使用されているように、単離されている。タンパク質又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、その天然環境から単離されたか、又は人工的に産生された（例えば、化学合成、組換えDNA技術などによって）タンパク質又はペプチドを指す。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される配列の任意の1つ以上のチミジン（T）ヌクレオチド又はウリジン（U）ヌクレオチドは、アデノシンヌクレオチドとの塩基対合（例えば、ワトソン・クリック塩基対を介して）に適した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、Tは、Uで置き換えられてもよく、Uは、Tで置き換えられてもよい。

10

【0188】

「異種」とは、それが比較されるか、又はそれが導入若しくは組み込まれるエンティティの残りのものとは遺伝子型的に異なるエンティティに由来することを意味する。例えば、遺伝子工学技法によって、異なる細胞型に導入されるポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチド（発現されると、異種ポリペプチドをコードし得る）である。同様に、ウイルスベクターに組み込まれる細胞配列（例えば、遺伝子又はその一部）は、ベクターに対して異種ヌクレオチド配列である。

20

【0189】

「導入遺伝子」という用語は、細胞に導入され、RNAに転写され、任意選択で、適切な条件下で翻訳及び／又は発現することができる異種ポリヌクレオチドを指す。態様では、それは、それが導入された細胞に所望の特性を付与するか、又はそれ以外の場合、所望の治療的又は診断的結果をもたらす。別の態様では、それは、miRNA、siRNA、又はshRNAなどのRNA干渉を媒介する分子に転写され得る。

【0190】

本明細書で使用される場合、「組換え」という用語は、クローニング、制限、若しくはライゲーションステップの様々な組み合わせの産物であるベクター、ポリヌクレオチド（例えば、組換え核酸）、ポリペプチド、若しくは細胞、及び／又は天然に見られる産物とは異なるコンストラクトをもたらす他の手順を指す。組換えウイルス又はベクター（例えば、rAAVベクター）は、組換え核酸（例えば、導入遺伝子及び1つ以上の調節エレメントを含む核酸）を含むベクターゲノムを含む。この用語は、元のポリヌクレオチドコンストラクトの複製、及び元のウイルスコンストラクトの子孫をそれぞれ含む。

30

【0191】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、機能的関係にある核酸配列（又はポリペプチド）エレメントの連結を指す。核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれたときに作動可能に連結される。例えば、プロモーター又は他の転写調節配列（例えば、エンハンサー）は、コード配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、作動可能に連結されているとは、連結されている核酸配列が連続していることを意味する。いくつかの実施形態では、作動可能に連結されているとは、核酸配列が連続的に連結されていることを意味せず、むしろ連結されているそれらの核酸配列の間に介在配列が存在する。

40

【0192】

「組換えAAVベクター（rAAVベクター）」は、少なくとも1つの、また実施形態では2つのAAV逆方向末端反復配列に隣接する1つ以上の異種配列（すなわち、AAV由来ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。そのようなrAAVベクターは、好適なヘルパーウイルスに感染している（又は好適なヘルパー機能を発現している）、かつAAV rep及びcap遺伝子産物（すなわち、AAV Rep及びCapタンパク質）を発現している宿主細胞内に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒

50

子にパッケージングされ得る。r A A Vベクターが、より大きなポリヌクレオチド（例えば、染色体、又はクローニング若しくはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター）に組み込まれる場合、r A A Vベクターは、A A Vパッケージング機能及び好適なヘルパー機能の存在下での複製及びカプシド化によって「レスキューされ」得る「p r o -ベクター」と呼ばれることがある。r A A Vベクターは、プラスミド、直鎖の人工染色体、脂質との複合体化、リボソーム内のカプセル化、及びウイルス粒子、特にA A V粒子内のカプシド化を含むがこれらに限定されない、いくつかの形態のいずれかであってもよい。r A A Vベクターは、A A Vウイルスカプシドにパッケージングされて、「組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V粒子）」を生成することができる。

【0193】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、核酸（例えば、組換え核酸）の挿入又は組み込みによって操作され得るプラスミド、ウイルス（例えば、r A A V）、コスミド、又は他のビヒクルを指す。ベクターは、例えば、遺伝子操作（例えば、クローニングベクター）を含む様々な目的のために使用して、細胞に核酸を導入／移入し、細胞内の挿入された核酸を転写又は翻訳することができる。いくつかの実施形態では、ベクター核酸配列は、細胞における増殖のための少なくとも複製起点を含有する。いくつかの実施形態では、ベクター核酸は、異種核酸配列、発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー）、選択可能マーカー（例えば、抗生物質耐性）、ポリアデノシン（p o l y A）配列、及び／又はI T Rを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞に送達されると、核酸配列が伝播される。いくつかの実施形態では、インビトロ又はインビボのいずれかで宿主細胞に送達される場合、細胞は、異種核酸配列によってコードされるポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、宿主細胞に送達される場合、核酸配列又は核酸配列の一部は、カプシドにパッケージングされる。宿主細胞は、単離された細胞又は宿主生物内の細胞であり得る。R N A又はポリペプチド又はタンパク質をコードする核酸配列（例えば、導入遺伝子）に加えて、追加の配列（例えば、調節配列）が、同じベクター内（すなわち、遺伝子に対してc i sで）に、及び遺伝子に隣接して存在し得る。いくつかの実施形態では、調節配列は、遺伝子の発現を調節するためにt r a n sで作用する別個の（例えば、第2の）ベクター上に存在し得る。プラスミドベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称され得る。

【0194】

本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」という用語は、r A A Vベクターを形成するようにパッケージング又はカプシド化される組換え核酸配列を指す。典型的には、ベクターゲノムは、異種ポリヌクレオチド配列、例えば、導入遺伝子、調節エレメント、カプシドに元々存在しないI T Rを含む。組換えプラスミドを使用して組換えベクター（例えば、r A A Vベクター）を構築又は製造する場合、ベクターゲノムは、プラスミド全体を含まず、むしろウイルスベクターによる送達を意図する配列のみを含む。組換えプラスミドのこの非ベクターゲノム部分は、典型的には「プラスミド骨格」と称され、これは組換えウイルスベクター産生の伝播に必要とされるプロセスであるプラスミドのクローニング、選択及び増幅に重要であるが、それ自体はr A A Vベクターにパッケージング又はカプシド化されない。

【0195】

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、概して、核酸送達ビヒクルとして機能し、ウイルス粒子（すなわち、カプシド）内にパッケージングされたベクターゲノム（例えば、A A V r e p及びc a pをコードする核酸の代わりに導入遺伝子を含む）を含み、例えば、A A V血清型及びバリエーション（例えば、r A A Vベクター）を含むレンチウイルス及びパルボウイルスを含むウイルス粒子を指す。組換えウイルスベクターは、r e p及び／又はc a p遺伝子を含むベクターゲノムを含まない。

【0196】

本明細書で使用される場合、「m i R N A足場」は、（i）R N A iによるノックダウンのための目的の遺伝子を標的とする二本鎖配列、及び（i i）内因性m i R N Aのステ

10

20

30

40

50

ムループ構造に類似するステムループ構造を形成する追加の配列を含むポリヌクレオチドを指すことができる。RNAiのための目的の遺伝子を標的とする配列（例えば、短い、約20ntの配列）は、miRNA様ステムループを作出する配列、及びポリヌクレオチドがmiRNA様二次構造に組み立てられるときに、目的の配列と塩基対合して二本鎖を形成する配列にライゲーションされてもよい。本明細書に記載されるように、この二本鎖は、不完全にハイブリダイズし得、例えば、それは、1つ以上の非対合又は誤対合塩基を含み得る。Dicerによるこのポリヌクレオチドの切断時に、目的の遺伝子を標的とする配列を含むこの二本鎖は巻き戻され、RISC複合体に組み込まれてもよい。miRNA足場は、miRNA自体又はmiRNAをコードするDNAポリヌクレオチドを指すことができる。miRNA足場の例は、miR-155配列である（Lagos-Quintana, M. et al. (2002) Curr. Biol. 12: 735-9）。miRNA足場に配列をクローニングするための市販のキットは、当該技術分野において既知である（例えば、Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass. のINVITROGEN BLOCK-IT Pol II miRNAi発現ベクターキット）。

10

【0197】

参照ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質の機能的バリエーション若しくは等価物は、参照ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質のポリペプチド誘導体、例えば、1つ以上の点変異、挿入、欠失、切断（truncation）、融合タンパク質、又はそれらの組み合わせを有するタンパク質を指す。それは、参照ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質のへの活性を実質的に保持する。一般に、機能的等価物は、参照ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質と少なくとも60%（例えば、60%～100%（両端の値を含む）の任意の数、例えば、60%、70%、80%、85%、90%、95%、及び99%）同一である。ある特定の実施形態では、点変異は保存的変化であり得る。

20

【0198】

本明細書で使用される場合、「保存的変化」という用語は、ポリペプチド又はタンパク質の生物学的特徴に有意な影響を及ぼさないか、又はそれを変更しないアミノ酸変化を指す。そのような保存的変化には、アミノ酸置換、付加、及び欠失が含まれる。変化は、部位特異的変異誘発及びPCR媒介性変異誘発などの当該技術分野において既知の標準的な技法により、ポリペプチド又はタンパク質に導入され得る。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非帯電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

30

40

【0199】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、又は「治療」という用語は、特定の疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状、特徴、及び／又は原因を部分的又は完全に軽減する、改善する、緩和する、阻害する、その発症を遅延させる、その重症度を低減する、及び／又はその発生率を低減する療法を施すことを指す。

【0200】

本明細書で使用される場合、「改善」という用語は、対象の疾患、障害若しくは状態、又はその症状、又は基礎となる細胞応答の検出可能又は測定可能な改善を意味する。検出可能又は測定可能な改善には、疾患、障害又は状態の発生、頻度、重症度、進行若しくは持続時間、それらによる若しくはそれらに関連する合併症の原因の主観的若しくは客観的

50

な減少、低減、阻害、抑制、制限若しくは制御、それらの症状の改善、又はそれらの逆転が含まれる。

【0201】

本明細書で使用される場合、「に関連する」という用語は、一方の存在、レベル及び／又は形態が他方の存在、レベル及び／又は形態と相関している場合、互いに関連付けられていることを指す。例えば、特定の实体（例えば、ポリペプチド、遺伝子サイン、代謝産物、微生物など）は、その存在、レベル及び／又は形態が（例えば、関連する集団全体にわたって）疾患、障害、又は状態の発生率及び／又は感受性と相関する場合、特定の疾患、障害、又は状態と関連すると考えられる。

【0202】

本明細書で使用される場合、「予防する」又は「予防」という用語は、特定の疾患、障害、若しくは状態（例えば、ミエリン疾患）の1つ以上の兆候若しくは症状の発症の遅延、並びに／又は頻度及び／若しくは重症度の低減を指す。いくつかの実施形態では、疾患、障害又は状態に感受性のある集団において、疾患、障害又は状態の1つ以上の兆候又は症状の発症、頻度及び／又は強度の統計的に有意な減少が観察される場合、薬剤が特定の疾患、障害又は状態を「予防する」とみなされるように、予防が集団ベースで評価される。予防は、疾患、障害、又は状態の発症が所定の期間遅延している場合、完全であるとみなされ得る。

【0203】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、生物、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト哺乳動物、非ヒト霊長類、霊長類、実験動物、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、ネコ、イヌ）を指す。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト疾患モデルである。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、成人、青年、又は小児対象である。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害又は状態、例えば、本明細書に提供されるように治療され得る疾患、障害又は状態に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、欠乏した又は機能不全のミエリンに関連する疾患、障害、又は状態に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態に感受性である。いくつかの実施形態では、感受性対象は、疾患、障害又は状態を発症する（参照対象又は集団において観察される平均リスクと比較して）増加したリスクを有しやすい、及び／又はそれを示す。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害又は状態の1つ以上の症状を呈する。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態の特定の症状（例えば、疾患の臨床的症状）又は特徴を示さない。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態の任意の症状又は特徴を示さない。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト患者である。いくつかの実施形態では、対象は、診断及び／又は療法が施される個体及び／又は施された個体である。

【0204】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、投与の目的となる所望の治療効果を生み出す量を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、疾患、障害又は状態に罹患しているか、又はそれに感受性のある集団に治療的投与レジメンに従って投与される場合に、疾患、障害又は状態を治療するのに十分な量を指す。いくつかの実施形態では、治療有効量は、疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状の発生率及び／若しくは重症度を低減する、並びに／又は発症を遅延させる量である。当業者は、「治療有効量」という用語が、実際には、特定の個体において治療の成功が達成されることを必要としないことを理解するであろう。むしろ、治療有効量は、そのような治療を必要とする患者に投与された場合、有意な数の対象において特定の所望の薬理学的応答を提供する量であり得る。

【実施例】

【0205】

実施例1. AAV発現カセットの構築

ヒトプロテオリピドタンパク質1（PLP1）、転写物バリエーション1、mRNA（NC

10

20

30

40

50

BI参照配列：NM__000533.5、配列番号1)の774塩基対コード配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) ncbi.nlm.nih.gov/refseq/から得た。

【0206】

非商業的なウェブベースのアルゴリズムベースの設計ツールを使用して、目的の遺伝子のコード配列内に標的領域を特定した(図1、赤い配列番号35の配列を参照されたい)。そのような設計ツールとしては、Designer of Small Interfering RNA (DSIR) (Vert et al., 2006)及びBroad Instituteによって利用可能となったGenetic Perturbation Platformが挙げられる。設計ツールを使用して、ヒトPLP1コード配列内の19~21ヌクレオチド標的配列を生成する。標的配列に完全に相補的なヌクレオチド配列を決定した(図9、青い配列番号75の配列、斜体及び下線付き、相補性を示すために3'から5'にアラインメントしたものを参照されたい)。この例では、ヒトmiR-30aを骨格として使用し(図4を参照されたい)、(50~100ヌクレオチドの)3'及び5'隣接領域並びにループ領域を含む人工マイクロRNAを設計した。標的配列に完全に相補的な20~22ヌクレオチド配列は、5'隣接配列の直後に置かれ、続いて、天然に存在するマイクロRNAからのループ配列、20~22ヌクレオチドのガイド鎖の逆相補体(10~11位の欠失によって改変されて、RISC複合体へのガイド鎖の優先的な負荷を可能にするバルジを作出する)、次いで、3'隣接配列が続く(図10)。

【0207】

一本鎖核酸の二次構造の予測のためのウェブベースのソフトウェア(mfold) (Zuker, 2003)を使用して、内因性miRNA(本実験におけるmiR-30a)及び設計された配列(配列番号75を組み込んだmiR-30a/PLP1)の両方の配列の折り畳みを予測する。この場合、設計されたpre-miRNAは、天然配列と同じ二次構造(同じフレームワーク領域を有するが、異なるガイド及び鎖配列を有する)を有し、天然配列と類似の自由エネルギー(dG)を有する(図11)。結果として生じるヘアピンは、保存されたループ領域を有し、Dicerがループを除去し、dsRNA二本鎖を残すために必要な切断部位を含む。

【0208】

設計されたオリゴヌクレオチドを合成し、選択したプロモーターを含むプラスミドにクローニングする。PLP1遺伝子を発現できる細胞株を選択する。一般的な選択は、ヒト胚性腎細胞HEK293である。トランスフェクションを行い、ノックダウンを評価する。

【0209】

実施例2. 追加のAAV発現カセット

追加のAAV発現カセットを、他の好適な内因性ヒトmiRNA構造を骨格又は足場として使用して、実施例1に記載されるのと同じ様式で作製する。これらのヒトmiRNA構造としては、ヒトmiR-16-1 NR__029486 (mbase受託MI0000070) (Han et al., 2006)、ヒトmiR-21 NC__000017.11 (Yue et al., 2010) (mbase受託MI0000077)、ヒトmiR-23a NR__029495 (mbase受託MI0000079) (van den Berg et al., 2016)、ヒトmiRNA-30a NR__029504 (mbase受託MI0000088) (Zeng et al., 2002)、ヒトmiR-31 NR__029505.1 (mbase受託MI0000089) (Ely et al., 2008)、ヒトmiR-122 NR__029667 (mbase受託MI0000442) (Ely et al., 2008)、ヒトmiR-155 NR__030784 NC__000021.9 (mbase受託MI00000681)、及びヒトmiR-451 NR__029970 (mbase受託MI0001729) (Yoda et al., 2013)が挙げられる。

【0210】

実施例 3 miRNAによるPLP1タンパク質発現の下方調節

この実施例は、miRNAコンストラクトが、標的タンパク質の発現を低減することができることを実証している。実験では、3つの人工Plp1-miRNAが、Plp1タンパク質の発現を阻害する能力をインビトロで評価した。実施例1に上記したように、miRNA形成のための非商業的なウェブベースのアルゴリズムベースの設計ツールを使用して、PLP1コード配列（配列番号1）の標的領域を特定した。PLP1を標的とするための3つの標的配列及びガイド鎖を、miRNA（配列番号14及び54、配列番号34及び74、並びに配列番号35及び75）を用いる標的化のために選択した。これらの3組の標的配列及びガイド鎖を、miR30ベースのshRNAノックダウンベクター（E.coli内のプラスミドとして構築される）に組み込んだ。3つのプラスミドはそれぞれ、CBhプロモーター、ヒトPlp1のmRNAを標的とする3つのmiR30ベースのshRNA配列のうちの1つ、及び2つの逆方向末端反復（ITR）の間にクローニングされたコドン最適化した増強緑色蛍光タンパク質（eGFP）からなるポリシストロン発現カセットを含んだ。第4のプラスミドは、スクランブルされたshRNA（ヒト及びマウスにはない）を含み、対照として機能した。プラスミド1332は、配列番号35及び75を有するmiR30ベースのshRNAノックダウンベクターを含み、プラスミド1333は、配列番号14及び54を有するmiR30ベースのshRNAノックダウンベクターを含み、プラスミド1336は、配列番号34及び74を有するmiR30ベースのshRNAノックダウンベクターを含んだ。プラスミド1307は、スクランブルされたshRNA（ヒト及びマウスにおけるいずれのmRNAも標的としない）を含み、対照として機能した。

10

20

【0211】

ノックダウン効率は、L細胞において、Lipofectamine 300を使用して、PLP1のcDNA発現プラスミドベクターとの同時トランスフェクションによってインビトロで評価した。72時間後、（アルファチューブリンを対照として使用して）PLP1タンパク質の発現を評価するために、細胞溶解物に対してウェスタンブロッティングを行った。1レーン当たり10ugのタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、ニトロセルロース膜に移した。ウェスタンブロッティングは、当業者に既知の標準技法を使用して行った。簡潔に述べると、ブロックされた膜を、ラット抗PLPAA3（1：250希釈）、次いで抗ラット西洋ワサビペルオキシダーゼがカップリングされた二次抗体（1：1000希釈）とともに一晩インキュベートした。プロットを洗浄し、免疫検出を行った。

30

【0212】

PLPタンパク質が、およそ22kDaのモノマー及び44kDaの二量体の2つのバンドとして流れるウェスタンブロッティングの結果は、72時間で、プラスミド1332（配列番号35及び75を有するmiR30ベースのshRNAノックダウンベクターを含む）及びプラスミド1333（配列番号14及び54を有するmiR30ベースのshRNAノックダウンベクターを含む）が、PLP1発現の有意な減少を達成したが、プラスミド1336（配列番号34及び74を有するmiR30ベースのshRNAノックダウンベクターを含む）は、達成しなかったことを示す。

40

【0213】

22kD及び44kDの2つのPLP1バンドを組み合わせて、プロットからのeGFPによって正規化した3つの反復実験から得られるデータを使用して、折り畳みの変化を示す形態測定分析を行った。結果は、人工のPLP1 miRNAが、インビトロでPLP1タンパク質の発現を抑制したことを定量的に実証した。具体的には、miR30ベースのshRNAノックダウンベクター（それぞれ、配列番号35及び75並びに配列番号14及び54を有する）を含むプラスミド1332及び1333は、PLP1の発現の有意な減少を達成したが、miR30ベースのshRNAノックダウンベクター（配列番号34及び74を有する）を含むプラスミド1336は、達成しなかった。

【0214】

50

統計的有意性は、一元配置ANOVA、続いてテューキーの多重比較検定を使用して決定した。プラスミド1332及びプラスミド1333の両方が、プラスミド1307 ($P < 0.01$) 及びプラスミド1336 ($P < 0.001$) と比較して、50%を超える減少をもたらした。最大の減少は、miR30ベースのshRNAノックダウンベクターを含むプラスミド1333 (配列番号14及び54を含み、図12に示される) によって達成された。

【0215】

参考文献

- Chen H, McCarty DM, Bruce AT, Suzuki K, and Suzuki K (1998) Gene transfer and expression in oligodendrocytes under the control of myelin basic protein transcriptional control region mediated by adeno-associated virus. *Gene Ther* 5:50-58. 10
- Curriel J, Rodriguez Bey G, Takanohashi A, Bugiani M, Fu X, Wolf NI, Nmezi B, Schiffman R, Bugaighis M, Pierson T, Helman G, Simon C, van der Knaap MS, Liu J, Padiath Q, and Vanderver A (2017) TUBB4A mutations result in specific neuronal and oligodendrocytic defects that closely match clinically distinct phenotypes. *Hum Mol Genet* 26:4506-4518. 20
- Elitt MS, Barbar L, Shick HE, Powers BE, Maeno-Hikichi Y, Madhavan M, Allan KC, Nawash BS, Gevorgyan AS, Hung S, Nevin ZS, Olsen HE, Hitomi M, Schlatter DM, Zhao HT, Swayze A, LePage DF, Jiang W, Conlon RA, Rigo F, and Tesar PJ (2020) Suppression of proteolipid protein rescues Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nature* 585:397-403. 30
- Ely A, Naidoo T, Mufamadi S, Crowther C, and Arbuthnot P (2008) Expressed Anti-HBV Primary MicroRNA Shuttles Inhibit Viral Replication Efficiently In vitro and In vivo. *Molecular Therapy* 16:1105-1112.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811. 40
- Francis JS, Markov V, Wojtas ID, Gray S, McCown T, Samulski RJ, Figueroa M, and Leone P (2021) Preclinical biodistribution, tropism, and efficacy of oligotropic AAV/Oligo01 in a mouse model of congenital white matter disease. *Mol Ther Methods Clin Dev* 20:520-534.
- Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, and Kim VN (2 50

006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125:887-901.

Keeler A, ElMallah M, and Flotte T (2017) Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions: Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. *Clinical and Translational Science* 10:242-248.

Kotowska-Zimmer A, Pewinska M, and Olejniczak M (2021) Artificial miRNAs as therapeutic tools: Challenges and opportunities. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 12:e1640, John Wiley & Sons, Ltd.

Lawlor PA, Bland RJ, Mouravlev A, Young D, and During MJ (2009) Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Mol Ther* 17:1692-1702.

Li H, Okada H, Suzuki S, Sakai K, Izumi H, Matsushima Y, Ichinohe N, Goto Y-I, Okada T, and Inoue K (2019) Gene suppressing therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using artificial microRNA. *JCI Insight* 4:125052.

Mandel RJ, Marmion DJ, Kirik D, Chu Y, Heindel C, McCown T, Gray SJ, and Kordower JH (2017) Novel oligodendroglial alpha synuclein viral vector models of multiple system atrophy: studies in rodents and nonhuman primates. *Acta Neuropathol Commun* 5:47.

Marmion DJ, Peelaerts W, and Kordower JH (2021) A historical review of multiple system atrophy with a critical appraisal of cellular and animal models. *J Neural Transm*, doi:10.1007/s00702-021-02419-8.

Mavroeidi P, Arvanitaki F, Karakitsou A-K, Vetsi M, Kloukina I, Zweckstetter M, Giller K, Becker S, Sorrentino ZA, Giasson BI, Jensen PH, Stefanis L, and Xilouri M (2019) Endogenous oligodendroglial alpha-synuclein and TPPP/p25 α orchestrate alpha-synuclein pathology in experimental multiple system atrophy models. *Acta Neuropathol* 138:415-441.

Multiple System Atrophy Fact Sheet | National Institute of Neurological Disorders and Stroke (n.d.).

Osorio MJ, and Goldman SA (2018) Neurogenetics of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Handb Clin Neurol* 148:701-722.

10

20

30

40

50

Powell SK, Khan N, Parker CL, Samulski RJ, Matsushima G, Gray SJ, and McCown TJ (2016) Characterization of a novel adeno-associated viral vector with preferential oligodendrocyte tropism. *Gene Ther* 23:807–814.

Sase S, Almad AA, Boecker CA, Guedes-Dias P, Li JJ, Takanohashi A, Patel A, McCaffrey T, Patel H, Sirdeshpande D, Curiel J, Shih-Hwa Liu J, Padiath Q, Holzbaur EL, Scherer SS, and Vanderver A (2020) TUBB4A mutations result in both glial and neuronal degeneration in an H-ABC leukodystrophy mouse model. *Elife* 9:e52986.

10

Schmidt JL, Pizzino A, Nicholl J, Foley A, Wang Y, Rosenfeld JA, Mighion L, Bean L, da Silva C, Cho MT, Truty R, Garcia J, Speare V, Blanco K, Powis Z, Hobson GM, Kirwin S, Krock B, Lee H, Dignan JL, Westemeyer MA, Subaran RL, Thiffault I, Tsai EA, Fang T, Helman G, and Vanderver A (2020) Estimating the relative frequency of leukodystrophies and recommendations for carrier screening in the era of next-generation sequencing. *Am J Med Genet A* 182:1906–1912.

20

Simons C, Wolf NI, McNeil N, Caldovic L, Devaney JM, Takanohashi A, Crawford J, Ru K, Grimmond SM, Miller D, Tonduti D, Schmidt JL, Chudnow RS, van Coster R, Lagae L, Kisler J, Sperner J, van der Knaap MS, Schiffmann R, Taft RJ, and Vanderver A (2013) A de novo mutation in the β -tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Am J Hum Genet* 92:767–773.

30

Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, and Simons M (2019) Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiological Reviews* 99:1381–1431, American Physiological Society.

40

Toro Cabrera G, and Mueller C (2016) Design of shRNA and miRNA for Delivery to the CNS. *Methods Mol Biol* 1382:67–80.

van den Berg FT, Rossi JJ, Arbuthnot P, and Weinberg MS (2016) Design of Effective Primary MicroRNA Mimics With Different Basal Stem Conformations. *Mol Ther Nucleic Acids* 5:e278.

Vert J-P, Foveau N, Lajaunie C, and Vandenbrouck Y (2006) An accurate and interpreta

50

Williams GP, Marmion DJ, Schonhoff AM, Jurkuvenaitė A, Won W-J, Standaert DG, Kordower JH, and Harms AS (2020) T cell infiltration in both human multiple system atrophy and a novel mouse model of the disease. *Acta Neuropathol* 139:855–874.

Yoda M, Cifuentes D, Izumi N, Sakaguchi Y, Suzuki T, Giraldez AJ, and Tomari Y (2013) PARN mediates 3'-end trimming of Argonaute 2-cleaved precursor microRNAs. *Cell Rep* 5:10.1016/j.celrep.2013.09.029.

Yue J, Sheng Y, Ren A, and Penmatsa S (2010) A miR-21 hairpin structure-based gene knockdown vector. *Biochem Biophys Res Commun* 394:667-672.

Zeng Y, Wagner EJ, and Cullen BR (2002) Both Natural and Designed Micro RNAs Can Inhibit the Expression of Cognate mRNAs When Expressed in Human Cells. *Molecular Cell* 9:1327–1333, Elsevier.

Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406–3415.

【 0 2 1 6 】

前述の実施例及び好ましい実施形態の説明は、特許請求の範囲によって定義される本開示を限定するものではなく、例解するものとして理解されるべきである。容易に理解されるように、上に記載される特徴の多数の変形及び組み合わせは、特許請求の範囲に記載される本開示から逸脱することなく利用され得る。そのような変形例は、本開示の範囲から逸脱したものとはみなされず、全てのそのような変形例は、以下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。本明細書で引用される全ての参照は、それらの全体が、参照により組み込まれる。

【図面】

【図 1】

【圖 2】

ttmir-16-1 NR_029486 (mbase受託M10000070) (Han et al., 2006)

5' 隣接 (配列番号 248)
AATGGTTTGTGGATTTTGAAAAGGTCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAATACAAGGATCTGATCTTCTGAAG
AAAATATATTTCTTTTATTATGCTCTTATGATAGCAAT

ステムループ (配列番号 249)
>hsa-mir-16-1 MI0000070
GUCAGCAGUGCCUUAAGCAGCAGGUAAGAUUAGGCGUUAGAUAUCUCCAGAAUAACTGUGGAGCC
GAAGUAAGGUUGAC

3' 隣接 (配列番号 250)
CATACTCTACAGTTGTGTTTAAATGTATATTAATGTTACTAATGTGTTTTAGTTTTATTGATAGTCTTTTCAGT
ATTATTGATAATCTTGTTATTTTTAGTATGATTCTGTAA

(配列番号 249)

	ag	c	-	a	u	gauu		
5'	gucagc	ugc	uaatcagcc	gu	aaaaugg	g	uaa	c
3'	caguug	aug	atcgcgugc	ca	uaatgcc	c	auu	u
	ca	a	u	a	u	u	aaa	

ヒトmiR-21 NC_000017.11 (Yue et al., 2010) (mbase参照MI0000077)

5' 磷酸 : (配列番号 251)
GGTTTGTTTTGTTTTGTTTTTATCAAATCCTGCCTGACTGTCTGCTGTTTTGCCTACCATCGTGACATCT
CCATGGCTGTACCACT

ステムループ (配列番号 252)
tgtcgggtagcttatcagactgatgttgactgttgaatctcatggcaacaccagtcgatgggctgtctgaca

>hsa-mir-21 MI0000077 (配列番号 253)
UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGGUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAAGCGAUGGGCGGACUGACAC

3' 隣接 (配列番号 254)
TTTGGTATCTTTCATCTGACCATCCATCCAATGTTCTCATTTAAACATTACCCAGCATCATTGTTTATAATC
AGAAACTCTGGTCCTTCTGT

(配列番号 253)

u	g	a	a	a	u	a
5'	gucgg	agcnauc	gagug	ugaug	cugu	g
						u
3'	caguc	uggguag	cugac	acac	ggua	c
	a	uu	-	a	-	-

【図 3】

hsm1R-23a NR_029495 (mbase受取MI000079) (van den Berg et al., 2016)

注: ガイは、ステムループの3' 端である

5' 隣接 (配列番号 255)

```
CCCAATCTCTATTACCTCTTGGCTCTCTCTCTTTTCCCTCCAGGTCGCAGCTCTGGCCCCGCCGCGTGC
CCCTCTCAGCTCTCTGCTCC
```

ステムループ

hsm-mir-23a MI000079 (配列番号 256)

```
GGCCGGCGUGGGUUCUGCGGGAGUAGUAUUGGCUUUCUGUCACAAAGCAGUACGAGUUAUACCGACC
```

3' 隣接 (配列番号 257)

```
CTGAGGCTCTGCCACGAGATGCTGCCCGGGAGCGGGTGGCAGAGAGGCCCGCAAGCTGTGCTCTGGCTAGG
AGCAGGGCTTAGCTGCTGT
```

(配列番号 256)

```

c c - g g cuuc
5' gg cgg ugggg ggggg gggg ggggg c
   | | | | | | | | | | | | | | | |
3' cc gca aac aggggc agac caa aac u
   a a u g g g g g g g g g g g g g g g
   acug
```

【図 5】

5' 隣接 (配列番号 262)
AATTAAATGAGTGTGTTTTCCTCCCTCAGGTGAAGAAAGAAAAATTTTGGAAAGTAAACACTGAAGAGTCATAGT
ATTCCTCTGTAACCTGGAAC

ステムループ (配列番号 263)
Ggagagaggagaagatgctggcctgactgctgtgaactgggaactgctatgccacaatattgccattcttcc

>hsa-mir-31 MI0000089 (配列番号 264)
GGRGAGGAGGACCAAGGCGUGGCGAGCGCTGUAGACUGGGAACCGCCGAGCCCAAGUAGCCGCUUUIUCC

3' 隣接 (配列番号 265)
TGCTGTGACAGCAGCCATGGCCACTGCATGCCAGTCCCTCTGTATTCTGTGTATGTGCGCCCTTCTTGGATG
TGATTTCATCATAG

(配列番号 264)
g g c -u gaa
5' ggagag gggag gggag gggag gggag guu c
||||| ||||| ||| ||||| ||| |||
3' ccaucc gggag gggag gggag gggag caa u
||| a a c c ggg

【圖 7】

ヒト miR-155 NR_030784 NC_000021.9 (mbase 受託 M10000681)

5' 隣接 (配列番号 270)
GTGGGACAAACAGGAGAGGGGAAATCTGTGGTTTAAATCTTTATGCTCATCTCTGAGTGCTGAAGGCTTCTGTATGGCTGTATG

ステムループ (配列番号 271)
cgtgtaatgctaaatcgtgatagggttttctgcctcaactgactcctacatatgattacaaag

>hsa-mir-155 MI0000681 (配列番号 272)
CUGUUAATGCGUACGCGUGAGAGGGUUUUUUUCCUCCACUGACUCUUCACUAAUUAACACUUUAAG

3' 隣接 (配列番号 273)
TGTATGATGCCGTCTTACTAGCATTACATGGAACAAAATGCTGCCCTGGGAGGATGACAAAGAACCATGATCACTCTGCTGGATAA

(配列番号 272)

5' ¹ ² ³ ⁴ ⁵ ⁶ ⁷ ⁸ ⁹ ¹⁰ ¹¹ ¹² ¹³ ¹⁴ ¹⁵ ¹⁶ ¹⁷ ¹⁸ ¹⁹ ²⁰ ²¹ ²² ²³ ²⁴ ²⁵ ²⁶ ²⁷ ²⁸ ²⁹ ³⁰ ³¹ ³² ³³ ³⁴ ³⁵ ³⁶ ³⁷ ³⁸ ³⁹ ⁴⁰ ⁴¹ ⁴² ⁴³ ⁴⁴ ⁴⁵ ⁴⁶ ⁴⁷ ⁴⁸ ⁴⁹ ⁵⁰ ⁵¹ ⁵² ⁵³ ⁵⁴ ⁵⁵ ⁵⁶ ⁵⁷ ⁵⁸ ⁵⁹ ⁶⁰ ⁶¹ ⁶² ⁶³ ⁶⁴ ⁶⁵ ⁶⁶ ⁶⁷ ⁶⁸ ⁶⁹ ⁷⁰ ⁷¹ ⁷² ⁷³ ⁷⁴ ⁷⁵ ⁷⁶ ⁷⁷ ⁷⁸ ⁷⁹ ⁸⁰ ⁸¹ ⁸² ⁸³ ⁸⁴ ⁸⁵ ⁸⁶ ⁸⁷ ⁸⁸ ⁸⁹ ⁹⁰ ⁹¹ ⁹² ⁹³ ⁹⁴ ⁹⁵ ⁹⁶ ⁹⁷ ⁹⁸ ⁹⁹ ¹⁰⁰ ¹⁰¹ ¹⁰² ¹⁰³ ¹⁰⁴ ¹⁰⁵ ¹⁰⁶ ¹⁰⁷ ¹⁰⁸ ¹⁰⁹ ¹¹⁰ ¹¹¹ ¹¹² ¹¹³ ¹¹⁴ ¹¹⁵ ¹¹⁶ ¹¹⁷ ¹¹⁸ ¹¹⁹ ¹²⁰ ¹²¹ ¹²² ¹²³ ¹²⁴ ¹²⁵ ¹²⁶ ¹²⁷ ¹²⁸ ¹²⁹ ¹³⁰ ¹³¹ ¹³² ¹³³ ¹³⁴ ¹³⁵ ¹³⁶ ¹³⁷ ¹³⁸ ¹³⁹ ¹⁴⁰ ¹⁴¹ ¹⁴² ¹⁴³ ¹⁴⁴ ¹⁴⁵ ¹⁴⁶ ¹⁴⁷ ¹⁴⁸ ¹⁴⁹ ¹⁵⁰ ¹⁵¹ ¹⁵² ¹⁵³ ¹⁵⁴ ¹⁵⁵ ¹⁵⁶ ¹⁵⁷ ¹⁵⁸ ¹⁵⁹ ¹⁶⁰ ¹⁶¹ ¹⁶² ¹⁶³ ¹⁶⁴ ¹⁶⁵ ¹⁶⁶ ¹⁶⁷ ¹⁶⁸ ¹⁶⁹ ¹⁷⁰ ¹⁷¹ ¹⁷² ¹⁷³ ¹⁷⁴ ¹⁷⁵ ¹⁷⁶ ¹⁷⁷ ¹⁷⁸ ¹⁷⁹ ¹⁸⁰ ¹⁸¹ ¹⁸² ¹⁸³ ¹⁸⁴ ¹⁸⁵ ¹⁸⁶ ¹⁸⁷ ¹⁸⁸ ¹⁸⁹ ¹⁹⁰ ¹⁹¹ ¹⁹² ¹⁹³ ¹⁹⁴ ¹⁹⁵ ¹⁹⁶ ¹⁹⁷ ¹⁹⁸ ¹⁹⁹ ²⁰⁰ ²⁰¹ ²⁰² ²⁰³ ²⁰⁴ ²⁰⁵ ²⁰⁶ ²⁰⁷ ²⁰⁸ ²⁰⁹ ²¹⁰ ²¹¹ ²¹² ²¹³ ²¹⁴ ²¹⁵ ²¹⁶ ²¹⁷ ²¹⁸ ²¹⁹ ²²⁰ ²²¹ ²²² ²²³ ²²⁴ ²²⁵ ²²⁶ ²²⁷ ²²⁸ ²²⁹ ²³⁰ ²³¹ ²³² ²³³ ²³⁴ ²³⁵ ²³⁶ ²³⁷ ²³⁸ ²³⁹ ²⁴⁰ ²⁴¹ ²⁴² ²⁴³ ²⁴⁴ ²⁴⁵ ²⁴⁶ ²⁴⁷ ²⁴⁸ ²⁴⁹ ²⁵⁰ ²⁵¹ ²⁵² ²⁵³ ²⁵⁴ ²⁵⁵ ²⁵⁶ ²⁵⁷ ²⁵⁸ ²⁵⁹ ²⁶⁰ ²⁶¹ ²⁶² ²⁶³ ²⁶⁴ ²⁶⁵ ²⁶⁶ ²⁶⁷ ²⁶⁸ ²⁶⁹ ²⁷⁰ ²⁷¹ ²⁷² ²⁷³ ²⁷⁴ ²⁷⁵ ²⁷⁶ ²⁷⁷ ²⁷⁸ ²⁷⁹ ²⁸⁰ ²⁸¹ ²⁸² ²⁸³ ²⁸⁴ ²⁸⁵ ²⁸⁶ ²⁸⁷ ²⁸⁸ ²⁸⁹ ²⁹⁰ ²⁹¹ ²⁹² ²⁹³ ²⁹⁴ ²⁹⁵ ²⁹⁶ ²⁹⁷ ²⁹⁸ ²⁹⁹ ³⁰⁰ ³⁰¹ ³⁰² ³⁰³ ³⁰⁴ ³⁰⁵ ³⁰⁶ ³⁰⁷ ³⁰⁸ ³⁰⁹ ³¹⁰ ³¹¹ ³¹² ³¹³ ³¹⁴ ³¹⁵ ³¹⁶ ³¹⁷ ³¹⁸ ³¹⁹ ³²⁰ ³²¹ ³²² ³²³ ³²⁴ ³²⁵ ³²⁶ ³²⁷ ³²⁸ ³²⁹ ³³⁰ ³³¹ ³³² ³³³ ³³⁴ ³³⁵ ³³⁶ ³³⁷ ³³⁸ ³³⁹ ³⁴⁰ ³⁴¹ ³⁴² ³⁴³ ³⁴⁴ ³⁴⁵ ³⁴⁶ ³⁴⁷ ³⁴⁸ ³⁴⁹ ³⁵⁰ ³⁵¹ ³⁵² ³⁵³ ³⁵⁴ ³⁵⁵ ³⁵⁶ ³⁵⁷ ³⁵⁸ ³⁵⁹ ³⁶⁰ ³⁶¹ ³⁶² ³⁶³ ³⁶⁴ ³⁶⁵ ³⁶⁶ ³⁶⁷ ³⁶⁸ ³⁶⁹ ³⁷⁰ ³⁷¹ ³⁷² ³⁷³ ³⁷⁴ ³⁷⁵ ³⁷⁶ ³⁷⁷ ³⁷⁸ ³⁷⁹ ³⁸⁰ ³⁸¹ ³⁸² ³⁸³ ³⁸⁴ ³⁸⁵ ³⁸⁶ ³⁸⁷ ³⁸⁸ ³⁸⁹ ³⁹⁰ ³⁹¹ ³⁹² ³⁹³ ³⁹⁴ ³⁹⁵ ³⁹⁶ ³⁹⁷ ³⁹⁸ ³⁹⁹ ⁴⁰⁰ ⁴⁰¹ ⁴⁰² ⁴⁰³ ⁴⁰⁴ ⁴⁰⁵ ⁴⁰⁶ ⁴⁰⁷ ⁴⁰⁸ ⁴⁰⁹ ⁴¹⁰ ⁴¹¹ ⁴¹² ⁴¹³ ⁴¹⁴ ⁴¹⁵ ⁴¹⁶ ⁴¹⁷ ⁴¹⁸ ⁴¹⁹ ⁴²⁰ ⁴²¹ ⁴²² ⁴²³ ⁴²⁴ ⁴²⁵ ⁴²⁶ ⁴²⁷ ⁴²⁸ ⁴²⁹ ⁴³⁰ ⁴³¹ <

【図 4】

[illegible]

【図 6】

[illegible]

【図 8】

hmiR-451 NR_010970 (mbase受取MI0001729) (Yoda et al., 2013)

注—ガイド鎖は、ループを組み込む。

5' 隣接 (配列番号 274)

CCCAGCTCTGGAGGCTGACAAGAGAGGACGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAGCTCTCTGCTCAGCCTGTCTC
AACCTACTGACTGCCAGGCCA

ステムループ (配列番号 275)

CUUUGAAGGCGGCAAGCGAACCGUACCAUUCUGAGUUUAGUUAAGUUAUGGUUUCUUCUGCUAUCCAGA

>hsa-mir-451a MI0001729 (配列番号 276)

CUUUGAAGGCGGCAAGCGAACCGUACCAUUCUGAGUUUAGUUAAGUUAUGGUUUCUUCUGCUAUCCAGA

3' 隣接 (配列番号 277)

AAATCTGCCAGGAGAGAGACTCAGGACCTGAGCAGCACTACTGAGGAGGAGACTCCAGCTCAAACAAGCGAGG
GTGGGGCCGTGGATGGG

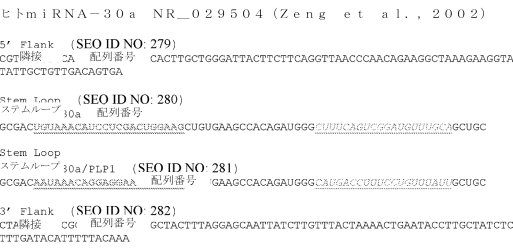
(配列番号 276)

5' c a g
u u u g g a u g g c a a g a a c c g u u a a c c a u u a u c g u
3' g a c c t u a u c u g u u g g u a a u g g u a a u g a u
a a u c u l l l

【図 9】

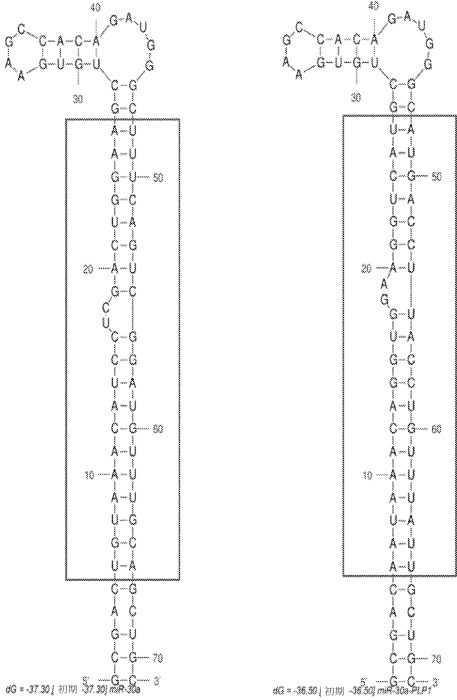


【図 10】

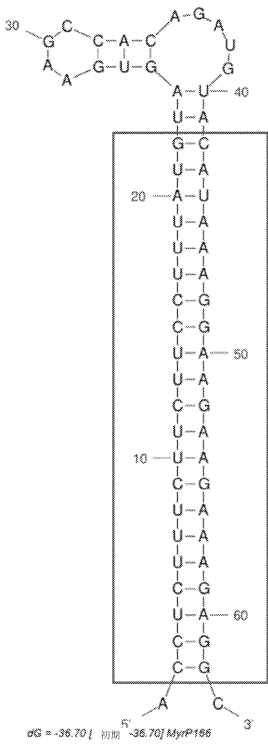


10

【図 11】



【図 12】



20

30

【配列表】

202551618600001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 48/00, C12N 15/86 (2023.01)

ADD. A61P 25/00 (2023.01)

CPC - INV. A61K 48/0058

ADD. A61K 39/0008, C12N 2750/14143

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

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	WO 2022/061378 A2 (ASKLEPIOS BIOPHARMACEUTICAL, INC.) 24 March 2022 [24.03.2022] para [0045]; [0082]; [0084]; [0087]; [0094]; [00101]; [00104]; [0188]; [00193]; [00258]	1-9
A	US 2017/0096683 A1 (GENZYME CORPORATION), 06 April 2017 (06.04.2017) Entire document	1-9

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 July 2023

Date of mailing of the international search report

NOV 02 2023

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

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66117

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.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66117

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.: 10-20, 27-42
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, Claims 1-9, directed to a method of reducing expression of a target gene in an oligodendrocyte or of treating an inherited or acquired disorder of myelin.

— See Extra Pages —

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. 1-9

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66117

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

Group II+, claims 21-26, directed to an RNA molecule. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The RNA molecule may be searched, for example, to encompass wherein the first RNA sequence has a sequence 100% complementarity to SEQ ID NO: 2 for an additional fee and election as such. It is believed that claims 21-26 read on this exemplary invention. Additional RNA molecule(s) comprising additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected RNA molecule(s) comprising additional sequence(s). 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. Another exemplary election would be an RNA molecule wherein the first RNA sequence has a sequence 100% complementarity to SEQ ID NO: 3 (claims 21-26).

The inventions listed as Groups I and II+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The inventions of Group II+ each include the special technical feature of a unique nucleic acid sequence. Each nucleic acid sequence targets a unique sequence, and is considered a distinct technical feature.

Additionally,

Group I has the special technical feature of a method of reducing expression of a target gene in an oligodendrocyte or of treating an inherited or acquired disorder of myelin, that is not required by Group II+.

Group II+ has the special technical feature of an RNA molecule, that is not required by Group I.

Common Technical Features

Groups I and II+ share the technical features of including:
a polynucleotide encoding a pri- or pre-miRNA.

However, these shared technical features are made obvious by prior art, as discussed below.

Group II+ inventions additionally share the technical features of including:

an RNA molecule comprising a first RNA sequence and a second RNA sequence, wherein the first and second RNA sequence are substantially complementary, wherein the first RNA sequence has a sequence length of at least 18 nucleotides.

However, these shared technical features are obvious over US 2017/0098683 A1 to Genzyme Corporation (hereinafter "Genzyme"), in view of US 2018/0127786 A1 to Casebia Therapeutics Limited Liability Partnership (hereinafter "Casebia").

Genzyme teaches a method of reducing expression of a target gene in an oligodendrocyte or of treating an inherited or acquired disorder of myelin (para [0187] - "In some embodiments, the therapeutic polypeptide or therapeutic nucleic acid is used to treat a disorder of the CNS. Without wishing to be bound to theory, it is thought that a therapeutic polypeptide or therapeutic nucleic acid may be used to reduce or eliminate the expression and/or activity of a polypeptide whose gain-of-function has been associated with a disorder"; para [0007] - "In some embodiments, the cell of the CNS is an oligodendrocyte"), the method comprising:
providing an adeno-associated virus (AAV) particle with preferential tropism for the oligodendrocyte cell surface (para [0007] - "In some embodiments, the one or more amino acid substitutions increases the transduction efficiency by the rAAV particle of a cell in the eye or CNS by about at least 10%, about at least 25%, about at least 50%, about at least 75%, or about at least 100%, e.g., as compared to a reference rAAV capsid comprising a wild-type AAV capsid protein. In some embodiments, the cell of the eye is a retina cell, a photoreceptor cell, a retinal pigmented epithelial cells, bipolar cells, horizontal cells, amacrine cells, muller cells and/or ganglion cells. In some embodiments, the cell of the CNS is an oligodendrocyte"); wherein the AAV particle encapsidates a nucleic acid that comprises from 5' to 3':
a 5' inverted terminal repeat (ITR) (para [0248] - "The expression cassette is flanked on the 5' and 3' end by at least one functional AAV ITR sequences"),
a promoter sequence region (para [0136] - "In some embodiments, the RK promoter spans from -112 to +180 relative to the transcription start site"), and
a 3' ITR (para [0248] - "The expression cassette is flanked on the 5' and 3' end by at least one functional AAV ITR sequences"), and
contacting the AAV particle with the oligodendrocyte (para [0036] - "In some aspects, the invention provides a method for delivering a heterologous nucleic acid to the central nervous system (CNS) of an individual comprising administering a recombinant adeno-associated virus (rAAV) particle to the CNS of the individual"), but does not explicitly teach a polynucleotide encoding a pri- or pre-miRNA targeting said target gene.

Casebia teaches AAV vectors comprising pre-miRNA sequences and the use of miRNAs in gene silencing (para [0476] - "A recombinant adeno-associated virus (AAV) vector can be used for delivery"; para [0205] - "According to the present disclosure, any of the microRNA (miRNA) or their binding sites may be incorporated into the compositions of the disclosure"; para [0196] - "The long transcripts are called primary miRNA (pri-miRNA) that include imperfectly base-paired hairpin structures. These pri-miRNA can be cleaved into one or more shorter precursor miRNAs (pre-miRNAs) by Microprocessor, a protein complex in the nucleus, involving Drosha"; para [0197] - "The mature miRNA tethers RISC to partly complementary sequence motifs in target mRNAs predominantly found within the 3' untranslated regions (UTRs) and induces posttranscriptional gene silencing"). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to apply the miRNA payload taught by Casebia to the AAV taught by Genzyme in order to silence the expression of a target gene in an oligodendrocyte.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

— See Extra Pages —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66117

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

Therefore, Group I and II+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of Item 4 above: claims 10-20, 27-42 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	15/82 (2006.01)	C 1 2 N	15/82	1 2 0 Z

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

ス 8 0 9

(72)発明者 アレン, ジェフリー

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 0 3 0 5 3, ロンドンデリー, レインツリー ドライブ 2 1

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02
BC01 CA23 CA44
4C084 AA13 MA66 NA14 ZA02 ZA16 ZA33 ZB07 ZC01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZA02 ZA16 ZA33
ZB07
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 MA66 NA14 ZA02 ZA16 ZA33
ZB07 ZC01