

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-513785
(P2025-513785A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	1 3 0 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 7
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全94頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-559143(P2024-559143)	(71)出願人	500034653	ジェンザイム・コーポレーション アメリカ合衆国02141マサチューセ ッツ州ケンブリッジ・ウォーター・スト リート450	
(86)(22)出願日	令和5年4月5日(2023.4.5)				
(85)翻訳文提出日	令和6年11月29日(2024.11.29)				
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065388				
(87)国際公開番号	WO2023/196862	(74)代理人	100127926	弁理士 結田 純次	
(87)国際公開日	令和5年10月12日(2023.10.12)				
(31)優先権主張番号	63/328,241	(74)代理人	100216105	弁理士 守安 智	
(32)優先日	令和4年4月6日(2022.4.6)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	セン・チェン	アメリカ合衆国マサチューセッツ州02 141・ケンブリッジ・ウォーター・ス トリート450・サノフィ・パテント・ デパートメント	
(31)優先権主張番号	63/483,075				
(32)優先日	令和5年2月3日(2023.2.3)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	サラ・メリッサ・ハコボ	最終頁に続く	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ				
		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 DM-1筋強直性ジストロフィーの標的遺伝子療法

(57)【要約】
筋強直性ジストロフィー1型(DM1)を処置するためのRNAi分子が本明細書で提供される。更に、RNAiを含有する発現カセット、ベクター(例えば、rAAV)、ウイルス粒子及び医薬組成物が本明細書で提供される。また更に、例えばDM1を処置するためのRNAiの使用に関する方法及びキットが本明細書で提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む RNA i であって、

- a) 前記第 1 の鎖及び前記第 2 の鎖は、二重鎖を形成し、
- b) 前記第 1 の鎖は、ガイド領域を含み、前記ガイド領域は、配列 5' - A G U C G A A G A C A G U U C U A G G G U - 3' (配列番号 1) 又は配列番号 1 の前記配列と約 90 % の同一性を有する配列を有する核酸を含み、及び
- c) 前記第 2 の鎖は、非ガイド領域を含む、RNA i。

【請求項 2】

前記非ガイド領域は、配列 5' - A C C C U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 2) 又は配列番号 2 の前記配列と約 90 % の同一性を有する配列を有する核酸を含む、請求項 1 に記載の RNA i。

【請求項 3】

前記第 1 の鎖は、配列番号 1 の前記配列を有する核酸を含み、及び前記非ガイド領域は、配列番号 2 の前記配列を有する核酸を含む、請求項 1 又は 2 に記載の RNA i。

【請求項 4】

前記第 1 の鎖及び前記第 2 の鎖は、ループ構造を形成することができる RNA リンカーによって連結されている、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の RNA i。

【請求項 5】

前記 RNA リンカーは、約 4 ～ 約 50 個のヌクレオチドを含む、請求項 4 に記載の RNA i。

【請求項 6】

前記ループ構造は、約 4 ～ 約 20 個のヌクレオチドを含む、請求項 4 又は 5 に記載の RNA i。

【請求項 7】

前記ループ構造は、配列番号 3 の配列又は配列番号 3 の前記配列と約 90 % の同一性を有する配列を有する核酸を含む、請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載の RNA i。

【請求項 8】

5' から 3' に、前記第 2 の鎖、前記 RNA リンカー及び前記第 1 の鎖を含む、請求項 4 ～ 7 のいずれか一項に記載の RNA i。

【請求項 9】

5' から 3' に、前記第 1 の鎖、前記 RNA リンカー及び前記第 2 の鎖を含む、請求項 4 ～ 7 のいずれか一項に記載の RNA i。

【請求項 10】

配列番号 7 の配列又は配列番号 7 の前記配列と約 90 % の同一性を有する配列を有する核酸を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の RNA i。

【請求項 11】

低分子阻害性 RNA (s i RNA)、マイクロ RNA (m i RNA) 又は低分子ヘアピン RNA (s h RNA) である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の RNA i。

【請求項 12】

足場を更に含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の RNA i。

【請求項 13】

前記足場は、配列番号 11 の核酸の全て又は一部を含む、請求項 12 に記載の RNA i。

【請求項 14】

前記 m i RNA は、前記足場内に埋め込まれている、請求項 13 に記載の RNA i。

【請求項 15】

前記足場は、前記 RNA i をコードする核酸の 5' 側に位置する 5' アームと、前記 RNA i をコードする前記核酸の 3' 側に位置する 3' アームとを有する、請求項 14 に記載の RNA i。

【請求項 16】

前記足場は、miR-155 足場である、請求項 12～15 のいずれか一項に記載の RNAi。

【請求項 17】

前記 miR-155 足場は、前記 RNAi の 5' 側に位置する、配列番号 9 又は配列番号 9 の配列と約 90% の同一性を有する配列の核酸を含む、請求項 12～16 のいずれか一項に記載の RNAi。

【請求項 18】

前記 miR-155 足場は、前記 RNAi の 3' 側に位置する、配列番号 10 又は配列番号 10 の配列と約 90% の同一性を有する配列の核酸を含む、請求項 12～17 のいずれか一項に記載の RNAi。

【請求項 19】

筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) に関連するポリペプチドをコードする RNA を標的化する、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の RNAi。

【請求項 20】

前記ポリペプチドは、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) である、請求項 19 に記載の RNAi。

【請求項 21】

前記 DMPK は、DM-1 に関連する変異を含む、請求項 20 に記載の RNAi。

【請求項 22】

DMPK をコードする遺伝子は、5 つ以上の CTG トリヌクレオチドリピートを含む、請求項 20 又は 21 に記載の RNAi。

【請求項 23】

請求項 1～22 のいずれか一項に記載の RNAi をコードする核酸を含む発現カセット。

【請求項 24】

前記 RNAi をコードする前記核酸は、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 23 に記載の発現カセット。

【請求項 25】

前記プロモーターは、筋特異的プロモーターである、請求項 24 に記載の発現カセット。

【請求項 26】

前記プロモーターは、デスミンプロモーター又はそのバリエーションである、請求項 24 又は 25 に記載の発現カセット。

【請求項 27】

前記デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の 1 つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、請求項 26 に記載の発現カセット。

【請求項 28】

前記デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の 2 つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、請求項 26 又は 27 に記載の発現カセット。

【請求項 29】

前記デスミンプロモーターは、1 つ以上の Byrne エンハンサーエレメント及び／又は 1 つ以上の Paulin エンハンサーエレメントを含む、請求項 26～28 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 30】

前記デスミンプロモーターは、配列番号 21 のヌクレオチド配列若しくは配列番号 21 の前記配列と約 90% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号 22 のヌクレオチド配列若しくは配列番号 22 の前記配列と約 90% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含む、請求項 26～29 のいずれか一項に記載の発現カセット。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

前記デスミンプロモーターは、配列番号 1 2 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 2 の前記ヌクレオチド配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 2 6 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 3 2】

イントロンを更に含む、請求項 2 3 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 3 3】

前記イントロンは、ウサギ β グロビンイントロンである、請求項 3 2 に記載の発現カセット。

【請求項 3 4】

前記イントロンは、配列番号 1 3 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 3 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の発現カセット。

【請求項 3 5】

前記 R N A i をコードする前記核酸は、前記イントロンに埋め込まれている、請求項 3 2 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 3 6】

前記イントロンは、5'アームと3'アームとを含み、前記5'アームは、前記 R N A i をコードする前記核酸の5'側に位置し、及び前記3'アームは、前記 R N A i をコードする前記核酸の3'側に位置する、請求項 3 5 に記載の発現カセット。

【請求項 3 7】

前記イントロンの前記5'アームは、配列番号 1 4 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 4 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 3 6 に記載の発現カセット。

【請求項 3 8】

前記イントロンの前記3'アームは、配列番号 1 5 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 5 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 3 6 又は 3 7 に記載の発現カセット。

【請求項 3 9】

ポリアデニル化シグナルを更に含む、請求項 2 3 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 4 0】

前記ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、S V 4 0 ポリアデニル化シグナル又は H S V T K p A である、請求項 3 9 に記載の発現カセット。

【請求項 4 1】

前記ポリアデニル化シグナルは、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである、請求項 4 0 に記載の発現カセット。

【請求項 4 2】

前記ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルは、配列番号 1 6 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 6 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 3 9 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 4 3】

配列番号 1 7 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 7 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 2 3 ～ 4 2 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 4 4】

改変デスミンプロモーターを含む発現カセットであって、前記改変デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の 1 つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、発現カセット。

【請求項 4 5】

前記改変デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の 2 つのエンハンサーエレメン

10

20

30

40

50

トとプロモーターとを含む、請求項 4 4 に記載の発現カセット。

【請求項 4 6】

前記改変デスミンプロモーターは、1 つ以上の B y r n e エンハンサーエレメント及び／又は 1 つ以上の P a u l i n エンハンサーエレメントを含む、請求項 4 4 又は 4 5 に記載の発現カセット。

【請求項 4 7】

前記改変デスミンプロモーターは、配列番号 2 1 のヌクレオチド配列若しくは配列番号 2 1 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号 2 2 のヌクレオチド配列若しくは配列番号 2 2 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含む、請求項 4 4 ～ 4 6 のいずれか一項に記載の発現カセット。

10

【請求項 4 8】

前記デスミンプロモーターは、配列番号 1 2 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 2 の前記ヌクレオチド配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 4 4 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 4 9】

イントロンを更に含む、請求項 4 4 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 5 0】

前記イントロンは、ウサギ β グロビンイントロンである、請求項 4 9 に記載の発現カセット。

20

【請求項 5 1】

前記イントロンは、配列番号 1 3 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 3 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の発現カセット。

【請求項 5 2】

導入遺伝子をコードする核酸は、前記イントロンに埋め込まれている、請求項 4 4 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 5 3】

前記イントロンは、5 ' アームと 3 ' アームとを含み、前記 5 ' アームは、前記導入遺伝子をコードする前記核酸の 5 ' 側に位置し、及び前記 3 ' アームは、前記導入遺伝子をコードする前記核酸の 3 ' 側に位置する、請求項 5 2 に記載の発現カセット。

30

【請求項 5 4】

前記イントロンの前記 5 ' アームは、配列番号 1 4 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 4 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 5 3 に記載の発現カセット。

【請求項 5 5】

前記イントロンの前記 3 ' アームは、配列番号 1 5 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 5 の前記配列と約 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 5 3 又は 5 4 に記載の発現カセット。

【請求項 5 6】

ポリアデニル化シグナルを更に含む、請求項 4 4 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の発現カセット。

40

【請求項 5 7】

前記ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、S V 4 0 ポリアデニル化シグナル又は H S V T K p A である、請求項 5 6 に記載の発現カセット。

【請求項 5 8】

前記ポリアデニル化シグナルは、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである、請求項 5 7 に記載の発現カセット。

【請求項 5 9】

前記ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルは、配列番号 1 6 のヌクレオチド配列又

50

は配列番号 16 の前記配列と約 90 % の同一性を有する配列を含む、請求項 56 ~ 58 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 60】

前記導入遺伝子は、ポリペプチド又は核酸をコードする、請求項 44 ~ 59 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 61】

前記導入遺伝子は、RNAi をコードする、請求項 44 ~ 60 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 62】

請求項 23 ~ 61 のいずれか一項に記載の発現カセットを含むベクター。

10

【請求項 63】

前記発現カセットは、1 つ以上のスタッパー核酸配列に隣接している、請求項 62 に記載のベクター。

【請求項 64】

前記 1 つ以上のスタッパー核酸配列は、ヒト *Serpina1* 遺伝子に由来する、請求項 63 に記載のベクター。

【請求項 65】

前記発現カセットの 5' 側に位置するスタッパー核酸配列は、ヒト *Serpina1* 遺伝子に由来する、請求項 63 又は 64 に記載のベクター。

【請求項 66】

前記発現カセットの 5' 側に位置するスタッパー配列は、配列番号 18 のヌクレオチド配列又は配列番号 18 の前記配列と約 90 % の同一性を有する配列を含む、請求項 63 ~ 65 のいずれか一項に記載のベクター。

20

【請求項 67】

前記発現カセットの 3' 側に位置するスタッパー核酸配列は、ヒト *Serpina1* 遺伝子に由来する、請求項 63 ~ 66 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 68】

前記発現カセットの 3' 側に位置するスタッパー配列は、配列番号 19 のヌクレオチド配列又は配列番号 19 の前記配列と約 90 % の同一性を有する配列を含む、請求項 63 ~ 67 のいずれか一項に記載のベクター。

30

【請求項 69】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターである、請求項 62 ~ 68 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 70】

前記発現カセットは、1 つ以上の AAV 逆位末端反復 (ITR) 配列に隣接している、請求項 69 に記載の rAAV ベクター。

【請求項 71】

前記発現カセットは、2 つの AAV ITR に隣接している、請求項 70 に記載の rAAV ベクター。

【請求項 72】

前記 AAV ITR は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギ AAV、ウシ AAV 又はマウス AAV 血清型の ITR である、請求項 70 又は 71 に記載の rAAV ベクター。

40

【請求項 73】

前記 AAV ITR は、AAV2 ITR である、請求項 70 ~ 72 のいずれか一項に記載の rAAV ベクター。

【請求項 74】

配列番号 20 のヌクレオチド配列又は配列番号 20 の前記配列と約 90 % の同一性を有

50

する配列を含む、請求項 69～73 のいずれか一項に記載の rAAV ベクター。

【請求項 75】

自己相補的 rAAV ベクターである、請求項 69～74 のいずれか一項に記載の rAAV ベクター。

【請求項 76】

請求項 23～61 のいずれか一項に記載の発現カセット、請求項 62～68 のいずれか一項に記載のベクター又は請求項 69～75 のいずれか一項に記載の rAAV ベクターを含む細胞。

【請求項 77】

請求項 62～68 のいずれか一項に記載のベクターを含むウイルス粒子。

10

【請求項 78】

請求項 69～75 のいずれか一項に記載の rAAV ベクターを含む組換え AAV 粒子。

【請求項 79】

AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV又はマウスAAVカプシド rAAV2/HBoV1血清型のカプシドを含む、請求項 78 に記載の rAAV 粒子。

20

【請求項 80】

前記 rAAV ウイルス粒子の前記 ITR 及び前記カプシドは、同じ AAV 血清型に由来する、請求項 78 又は 79 に記載の rAAV 粒子。

【請求項 81】

前記 rAAV ウイルス粒子の前記 ITR 及び前記カプシドは、異なる AAV 血清型に由来する、請求項 78 又は 79 に記載の rAAV 粒子。

【請求項 82】

AAVrh74 N502I 血清型のカプシドを含む、請求項 78、79 又は 81 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子。

30

【請求項 83】

前記 ITR は、AAV2 ITR であり、及び前記 rAAV 粒子の前記カプシドは、AAVrh74 N502I 血清型のカプシドである、請求項 82 に記載の rAAV 粒子。

【請求項 84】

AAVrh74 W505R 血清型のカプシドを含む、請求項 78、79 又は 81 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子。

【請求項 85】

前記 ITR は、AAV2 ITR であり、及び前記 rAAV 粒子の前記カプシドは、AAVrh74 W505R 血清型のカプシドである、請求項 83a に記載の rAAV 粒子。

40

【請求項 86】

rAAV ベクター及びカプシドを含む rAAV 粒子であって、前記 rAAV ベクターは、5' から 3' に、以下の核酸、

AAV2 ITR、

ヒト *serpinA1* 遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸、

Byrne デスミンエンハンサーエレメント、

Paulin デスミンエンハンサーエレメント、

デスミンプロモーター、

ウサギ β グロビンイントロンの 5' アーム、

5' miR155 足場配列、

50

DMPK²⁰⁴ miRNAガイド配列、
 miR155末端ループ配列、
 DMPK²⁰⁴ miRNAパッセンジャー配列、
 3' miR155足場配列、
 ウサギβグロビンイントロンの3'アーム、
 最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、
 ヒトserpinA1遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸、及び
 AAV2 ITR
 を含み、前記カプシドは、AAVrh74 N502 Iカプシドである、rAAV粒子。
 【請求項87】

10

rAAVベクターを含むrAAV粒子であって、前記rAAVベクターは、5'から3'に、以下の核酸、
 配列番号43のポリヌクレオチド配列を含むAAV2 ITR、
 配列番号18のポリヌクレオチド配列を含む、ヒトserpinA1遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸、
 配列番号21のポリヌクレオチド配列を含むByrneデスミンエンハンサーエレメント、
 配列番号22のポリヌクレオチド配列を含むPaulinデスミンエンハンサーエレメント、
 配列番号23のポリヌクレオチド配列を含むデスミンプロモーター、
 配列番号14のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギβグロビンイントロンの5'アーム、
 配列番号40のポリヌクレオチド配列を含む5' miR155足場配列、
 配列番号4のポリヌクレオチド配列を含むDMPK²⁰⁴ miRNAガイド配列、
 配列番号6のポリヌクレオチド配列を含むmiR155末端ループ配列、
 配列番号5のポリヌクレオチド配列を含むDMPK²⁰⁴ miRNAパッセンジャー配列、
 配列番号41のポリヌクレオチド配列を含む3' miR155足場配列、
 配列番号15のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギβグロビンイントロンの3'アーム、
 配列番号16のポリヌクレオチド配列を含む最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、
 配列番号19のポリヌクレオチド配列を含む、ヒトserpinA1遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸、及び
 配列番号49のポリヌクレオチド配列を含むAAV2 ITR
 を含み、カプシドは、AAVrh74 N502 Iカプシドである、rAAV粒子。
 【請求項88】

20

30

前記AAVrh74 N502 Iカプシドは、請求項50のアミノ酸配列を含むカプシドタンパク質を含む、請求項86又は87に記載のrAAV粒子。
 【請求項89】

rAAVベクター及びカプシドを含むrAAV粒子であって、前記rAAVベクターは、5'から3'に、以下の核酸、AAV2 ITR、ヒトserpinA1遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸、Byrneデスミンエンハンサーエレメント、Paulinデスミンエンハンサーエレメント、デスミンプロモーター、ウサギβグロビンイントロンの5'アーム、5' miR155足場配列、DMPK²⁰⁴ miRNAガイド配列、miR155末端ループ配列、DMPK²⁰⁴ miRNAパッセンジャー配列、3' miR155足場配列、ウサギβグロビンイントロンの3'アーム、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ヒトserpinA1遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸及びAAV2 ITRを含み、前記カプシドは、AAVrh74 W505 Rカプシドである、rAAV粒子。
 【請求項90】

40

rAAVベクターを含むrAAV粒子であって、前記rAAVベクターは、5'から3'

50

に、以下の核酸、配列番号43のポリヌクレオチド配列を含むAAV2 ITR、配列番号18のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸、配列番号21のポリヌクレオチド配列を含むByrneデスミンエンハンサーエレメント、配列番号22のポリヌクレオチド配列を含むPaulinデスミンエンハンサーエレメント、配列番号23のポリヌクレオチド配列を含むデスミンプロモーター、配列番号14のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギβグロビンイントロンの5'アーム、配列番号40のポリヌクレオチド配列を含む5' *miR155* 足場配列、配列番号4のポリヌクレオチド配列を含むDMPK²⁰⁴ *miRNA* ガイド配列、配列番号6のポリヌクレオチド配列を含む *miR155* 末端ループ配列、配列番号5のポリヌクレオチド配列を含むDMPK²⁰⁴ *miRNA* パッセンジャー配列、配列番号41のポリヌクレオチド配列を含む3' *miR155* 足場配列、配列番号15のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギβグロビンイントロンの3'アーム、配列番号16のポリヌクレオチド配列を含む最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、配列番号19のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸及び配列番号49のポリヌクレオチド配列を含むAAV2 ITRを含み、カプシドは、AAVrh74 W505Rカプシドである、rAAV粒子。

10

【請求項91】

前記AAVrh74 W505Rカプシドは、配列番号52のアミノ酸配列を含むカプシドタンパク質を含む、請求項86a又は86bに記載のrAAV粒子。

20

【請求項92】

請求項77に記載のウイルス粒子又は請求項78～86のいずれか一項に記載のrAAV粒子を含む組成物。

【請求項93】

請求項77に記載のウイルス粒子又は請求項78～86のいずれか一項に記載のrAAV粒子を含む医薬組成物。

【請求項94】

薬学的に許容される担体を更に含む、請求項87又は88に記載の組成物。

【請求項95】

ヒトデスミン遺伝子の1つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む改変デスミンプロモーター。

30

【請求項96】

ヒトデスミン遺伝子の2つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、請求項90に記載の改変デスミンプロモーター。

【請求項97】

1つ以上のByrneエンハンサーエレメント及び／又は1つ以上のPaulinエンハンサーエレメントを含む、請求項90又は91に記載の改変デスミンプロモーター。

【請求項98】

配列番号21のヌクレオチド配列若しくは配列番号21の前記配列と約90%の同一性を有する配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号22のヌクレオチド配列若しくは配列番号22の前記配列と約90%の同一性を有する配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む、請求項90～92のいずれか一項に記載の改変デスミンプロモーター。

40

【請求項99】

配列番号12のヌクレオチド配列又は配列番号12の前記配列と約90%の同一性を有する配列を含む、請求項90～93のいずれか一項に記載の改変デスミンプロモーター。

【請求項100】

請求項1～22のいずれか一項に記載のRNAiを含むキット。

【請求項101】

請求項77に記載のウイルス粒子又は請求項78～86のいずれか一項に記載のAAV粒子を含むキット。

50

【請求項 102】

請求項 87～89 のいずれか一項に記載の組成物を含むキット。

【請求項 103】

使用説明書を更に含む、請求項 95～97 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 104】

筋強直性ジストロフィー 1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の RNAi を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 105】

筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の RNAi を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

10

【請求項 106】

DMPK RNA の蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の RNAi を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 107】

筋強直性ジストロフィー 1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、請求項 77 に記載のウイルス粒子又は請求項 78～86 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

20

【請求項 108】

筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、請求項 77 に記載のウイルス粒子又は有効量の、請求項 78～86 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 109】

DMPK RNA の蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、請求項 77 に記載のウイルス粒子又は有効量の、請求項 78～86 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

30

【請求項 110】

前記ウイルス粒子又は rAAV 粒子の前記有効量は、約 1×10^8 ～約 2×10^{13} ゲノムコピー／mL の用量である、請求項 102～104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 111】

前記用量は、約 5×10^{12} ゲノムコピー／mL である、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 112】

前記用量は、約 1×10^{13} ゲノムコピー／mL である、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 113】

前記用量は、約 2×10^{13} ゲノムコピー／mL である、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 114】

前記ウイルス粒子又は rAAV 粒子の前記有効量は、約 1×10^8 ～約 2×10^{14} ゲノムコピー／体重 kg の用量である、請求項 102～104 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 115】

前記用量は、約 5×10^{13} ゲノムコピー／体重 kg である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 116】

前記用量は、約 1×10^{14} ゲノムコピー／体重 kg である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 117】

50

前記用量は、約 2×10^{14} ゲノムコピー／体重 kg である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 118】

筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、請求項 87～89 のいずれか一項に記載の組成物を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 119】

筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、請求項 87～89 のいずれか一項に記載の組成物を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 120】

DMPK RNA の蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、請求項 87～89 のいずれか一項に記載の組成物を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 121】

前記 RNAi は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、前記免疫抑制剤は、前記 RNAi の投与前、それと同時に及び／又はその後に投与される、請求項 99～101 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 122】

前記ウイルス粒子又は前記 rAAV 粒子は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、前記免疫抑制剤は、前記ウイルス粒子又は前記 rAAV 粒子の投与前、それと同時に及び／又はその後に投与される、請求項 102～104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 123】

前記組成物は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、前記免疫抑制剤は、前記組成物の投与前、それと同時に及び／又はその後に投与される、請求項 113～115 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年4月6日に提出された米国仮特許出願第63／328,241号明細書及び2023年2月3日に提出された米国仮特許出願第63／483,075号明細書に対する、米国特許法第条119(e)に基づく優先権を主張するものであり、その内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の提出

XML ファイルの以下の提出物：コンピュータ可読形式 (CRF) の配列表 (ファイル名：737870__SA9-363PC__ST26.xml、作成日：2023年4月3日、サイズ：82,900 バイト) の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、バリエーション RNAi 分子に関する。いくつかの態様では、本発明は、筋ジストロフィーを処置するためのバリエーション RNAi 分子に関する。

【背景技術】

【0004】

RNA 干渉 (RNAi) は、遺伝子機能の基礎研究で遺伝子サイレンシングに有用な手段であることが示されており、多数の疾患の発症に関連する遺伝子を抑制するための治療剤として大いに期待されている。自然界では、RNAi による遺伝子制御は、マイクロ RNA (miRNA) として知られている低分子 RNA 分子を介して行われる (Ambros, (2004) Nature 431:350-355; Krol et al., (

10

20

30

40

50

2010) Nat. Rev. Genet. 11: 597-610)。マイクロRNAは、多様な細胞プロセスの強力な制御因子として登場し、ウイルスベクターで送達すると、人工のmiRNAを継続的に発現し、強力かつ持続的な標的遺伝子の抑制がもたらされる。miRNAのプロセッシングに参与するメカニズムを解明することで、科学者が内在性の細胞性RNAi機構を利用し、人工のmiRNAを使用することによって標的遺伝子産物の分解を誘導することが可能となった（例えば、米国特許出願公開第2014/0163214号明細書及びDavidson et al., (2012) Cell 150: 873-875を参照されたい）。

【0005】

筋強直性ジストロフィー1型(DM1)は、DMPK遺伝子座におけるCTGリピートの伸長(50超)によって引き起こされる一遺伝子性で常染色体優性の進行性疾患である。リピートを有するDMPKは、mRNAに転写され、これによりヘアピンを形成してRNA結合タンパク質と結合し、それらを通常の機能から隔離する。これにより、核内フォーカスの出現、mRNAのミスプライシング及び最終的に筋強直がもたらされる。DM1は、主に骨格筋、心筋及び平滑筋に影響を与え、身体的、認知的及び行動学的な著しい機能障害並びに身体障害をもたらす。現在、DM1に承認された療法は、存在しない。従って、DM1を処置するための療法に関する高いアンメットメディカルニーズが存在する。

10

【0006】

特許出願及び刊行物を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

いくつかの態様では、本発明は、第1の鎖及び第2の鎖を含むRNAiであって、a) 第1の鎖及び第2の鎖は、二重鎖を形成し、b) 第1の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、配列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3' (配列番号1)又は配列番号1の配列と約90%の同一性を有する配列を有する核酸を含み、及びc) 第2の鎖は、非ガイド領域を含む、RNAiを提供する。いくつかの実施形態では、非ガイド領域は、配列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3' (配列番号2)又は配列番号2の配列と約90%の同一性を有する配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号1の配列を有する核酸を含み、及び非ガイド領域は、配列番号2の配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖及び第2の鎖は、ループ構造を形成することができるRNAリンカーによって連結されている。いくつかの実施形態では、RNAリンカーは、約4〜約50個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ループ構造は、約4〜約20個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ループ構造は、配列番号3の配列又は配列番号3の配列と約90%の同一性を有する配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、RNAiは、5'から3'に、第2の鎖、RNAリンカー及び第1の鎖を含む。いくつかの実施形態では、RNAiは、5'から3'に、第1の鎖、RNAリンカー及び第2の鎖を含む。いくつかの実施形態では、RNAiは、配列番号7の配列又は配列番号7の配列と約90%の同一性を有する配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、RNAiは、低分子阻害性RNA(sRNA)、マイクロRNA(miRNA)又は低分子ヘアピンRNA(shRNA)である。

30

40

【0008】

本発明のいくつかの実施形態では、RNAiは、足場を更に含む。いくつかの実施形態では、足場は、配列番号11の核酸の全て又は一部を含む。いくつかの実施形態では、miRNAは、足場内に埋め込まれている。いくつかの実施形態では、足場は、RNAiをコードする核酸の5'側に位置する5'アームと、RNAiをコードする核酸の3'側に位置する3'アームとを有する。いくつかの実施形態では、足場は、miR-155足場で

50

ある。いくつかの実施形態では、miR-155足場は、RNAiの5'側に位置する、配列番号9又は配列番号9の配列と約90%の同一性を有する配列の核酸を含む。いくつかの実施形態では、miR-155足場は、RNAiの3'側に位置する、配列番号10又は配列番号10の配列と約90%の同一性を有する配列の核酸を含む。

【0009】

本発明のいくつかの実施形態では、RNAiは、筋強直性ジストロフィー-1(DM1)に関連するポリペプチドをコードするRNAを標的化する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ(DMPK)である。いくつかの実施形態では、DMPKは、DM1に関連する変異を含む。いくつかの実施形態では、DMPKをコードする遺伝子は、5つ以上のCTGトリヌクレオチドリピートを含む。

10

【0010】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載されるRNAiのいずれかをコードする核酸を含む発現カセットを提供する。いくつかの実施形態では、RNAiをコードする核酸は、プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プロモーターは、筋特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、デスミンプロモーター又はそのバリエーションである。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の1つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の2つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、1つ以上のByrneエンハンサーエレメント及び／又は1つ以上のPaulinエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列若しくは配列番号21の配列と約90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号22のヌクレオチド配列若しくは配列番号22の配列と約90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号12のヌクレオチド配列又は配列番号12のヌクレオチド配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、イントロンを更に含む。いくつかの実施形態では、イントロンは、ウサギβグロビンイントロンである。いくつかの実施形態では、イントロンは、配列番号13のヌクレオチド配列又は配列番号13の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAiをコードする核酸は、イントロンに埋め込まれている。いくつかの実施形態では、イントロンは、5'アームと3'アームとを含み、5'アームは、RNAiをコードする核酸の5'側に位置し、及び3'アームは、RNAiをコードする核酸の3'側に位置する。いくつかの実施形態では、イントロンの5'アームは、配列番号14のヌクレオチド配列又は配列番号14の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、イントロンの3'アームは、配列番号15のヌクレオチド配列又は配列番号15の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、ポリアデニル化シグナルを更に含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、SV40ポリアデニル化シグナル又はHSV TK pAである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。いくつかの実施形態では、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルは、配列番号16のヌクレオチド配列又は配列番号16の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号17のヌクレオチド配列又は配列番号17の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。

20

30

40

【0011】

いくつかの態様では、本発明は、改変デスミンプロモーターを含む発現カセットを提供し、改変デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の1つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターは、

50

ヒトデスミン遺伝子の2つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターは、1つ以上のB y r n eエンハンサーエレメント及び／又は1つ以上のP a u l i nエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列若しくは配列番号21の配列と約90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号22のヌクレオチド配列若しくは配列番号22の配列と約90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号12のヌクレオチド配列又は配列番号12のヌクレオチド配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、イントロンを更に含む。いくつかの実施形態では、イントロンは、ウサギβグロビンイントロンである。いくつかの実施形態では、イントロンは、配列番号13のヌクレオチド配列又は配列番号13の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、導入遺伝子をコードする核酸は、イントロンに埋め込まれている。いくつかの実施形態では、イントロンは、5'アームと3'アームとを含み、5'アームは、導入遺伝子をコードする核酸の5'側に位置し、及び3'アームは、導入遺伝子をコードする核酸の3'側に位置する。いくつかの実施形態では、イントロンの5'アームは、配列番号14のヌクレオチド配列又は配列番号14の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、イントロンの3'アームは、配列番号15のヌクレオチド配列又は配列番号15の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、ポリアデニル化シグナルを更に含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、SV40ポリアデニル化シグナル又はHSV TK pAである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。いくつかの実施形態では、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルは、配列番号16のヌクレオチド配列又は配列番号16の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、ポリペプチド又は核酸をコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、RNAiをコードする。

10

20

30

40

50

【0012】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載される発現カセットのいずれかを含むベクターを提供する。いくつかの実施形態では、発現カセットは、1つ以上のスタッファー核酸配列に隣接している。いくつかの実施形態では、1つ以上のスタッファー核酸配列は、ヒトSerpina1遺伝子に由来する。いくつかの実施形態では、発現カセットの5'側に位置するスタッファー核酸配列は、ヒトSerpina1遺伝子に由来する。いくつかの実施形態では、発現カセットの5'側に位置するスタッファー配列は、配列番号18のヌクレオチド配列又は配列番号18の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットの3'側に位置するスタッファー核酸配列は、ヒトSerpina1遺伝子に由来する。いくつかの実施形態では、発現カセットの3'側に位置するスタッファー配列は、配列番号19のヌクレオチド配列又は配列番号19の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。

【0013】

本発明のいくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターである。いくつかの実施形態では、発現カセットは、1つ以上のAAV逆位末端反復(ITR)配列に隣接している。いくつかの実施形態では、発現カセットは、2つのAAV ITRに隣接している。いくつかの実施形態では、AAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギAAV、ウシAAV又はマウスAAV血清型のITRである。いくつかの実施形態では、AAV ITRは、AAV2 ITRである。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、配列番号20のヌクレオチド配列又は配列番号20の配列と約90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態で

は、ベクターは、自己相補的 r A A V ベクターである。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載される発現カセットのいずれか、本明細書に記載されるベクターのいずれか又は本明細書に記載される r A A V ベクターのいずれかを含む細胞を提供する。

【 0 0 1 5 】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載されるベクターのいずれかを含むウイルス粒子を提供する。いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載される r A A V ベクターのいずれかを含む組換え A A V 粒子を提供する。いくつかの実施形態では、A A V ウイルス粒子は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、A A V 12、A A V r h 7 4、A A V r h 7 4 N 5 0 2 I、A A V r h 7 4 W 5 0 5 R、A A V 2 R 4 7 1 A、A A V 2 / 2 - 7 m 8、A A V D J、A A V 2 N 5 8 7 A、A A V 2 E 5 4 8 A、A A V 2 N 7 0 8 A、A A V V 7 0 8 K、A A V 2 - H B K O、A A V D J 8、A A V P H P . B、A A V P H P . e B、A A V B R 1、A A V H S C 1 5、A A V H S C 1 7、ヤギ A A V、A A V 1 / A A V 2 キメラ、ウシ A A V 又はマウス A A V カプシド r A A V 2 / H B o V 1 血清型のカプシドを含む。いくつかの実施形態では、r A A V ウイルス粒子の I T R 及びカプシドは、同じ A A V 血清型に由来する。いくつかの実施形態では、r A A V ウイルス粒子の I T R 及びカプシドは、異なる A A V 血清型に由来する。いくつかの実施形態では、A A V ウイルス粒子は、A A V r h 7 4 N 5 0 2 I 血清型のカプシドを含む。いくつかの実施形態では、I T R は、A A V 2 I T R であり、及び r A A V 粒子のカプシドは、A A V r h 7 4 N 5 0 2 I の血清型のカプシドである。いくつかの実施形態では、A A V ウイルス粒子は、A A V r h 7 4 W 5 0 5 R 血清型のカプシドを含む。いくつかの実施形態では、I T R は、A A V 2 I T R であり、及び r A A V 粒子のカプシドは、A A V r h 7 4 W 5 0 5 R 血清型のカプシドである。いくつかの実施形態では、本発明は、r A A V ベクター及びカプシドを含む r A A V 粒子であって、r A A V ベクターは、5' から 3' に、以下の核酸、A A V 2 I T R、ヒト s e r p i n A 1 遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸、B y r n e デスミンエンハンサーエレメント、P a u l i n デスミンエンハンサーエレメント、デスミンプロモーター、ウサギ β グロビンイントロンの 5' アーム、5' m i R 1 5 5 足場配列、D M P K ^{2 0 4} m i R N A ガイド配列、m i R 1 5 5 末端ループ配列、D M P K ^{2 0 4} m i R N A パッセンジャー配列、3' m i R 1 5 5 足場配列、ウサギ β グロビンイントロンの 3' アーム、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ヒト s e r p i n A 1 遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸及び A A V 2 I T R を含み、カプシドは、A A V r h 7 4 N 5 0 2 I カプシドである、r A A V 粒子を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、r A A V ベクターを含む r A A V 粒子であって、r A A V ベクターは、5' から 3' に、以下の核酸、配列番号 4 3 のポリヌクレオチド配列を含む A A V 2 I T R、配列番号 1 8 のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト s e r p i n A 1 遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸、配列番号 2 1 のポリヌクレオチド配列を含む B y r n e デスミンエンハンサーエレメント、配列番号 2 2 のポリヌクレオチド配列を含む P a u l i n デスミンエンハンサーエレメント、配列番号 2 3 のポリヌクレオチド配列を含むデスミンプロモーター、配列番号 1 4 のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギ β グロビンイントロンの 5' アーム、配列番号 4 0 のポリヌクレオチド配列を含む 5' m i R 1 5 5 足場配列、配列番号 4 のポリヌクレオチド配列を含む D M P K ^{2 0 4} m i R N A ガイド配列、配列番号 6 のポリヌクレオチド配列を含む m i R 1 5 5 末端ループ配列、配列番号 5 のポリヌクレオチド配列を含む D M P K ^{2 0 4} m i R N A パッセンジャー配列、配列番号 4 1 のポリヌクレオチド配列を含む 3' m i R 1 5 5 足場配列、配列番号 1 5 のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギ β グロビンイントロンの 3' アーム、配列番号 1 6 のポリヌクレオチド配列を含む最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、配列番号 1 9 のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト s e r p i n

10

20

30

40

50

A 1 遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸及び配列番号 49 のポリヌクレオチド配列を含む AAV2 ITR を含み、カプシドは、AAVrh74 N502 I カプシドである、rAAV 粒子を提供する。いくつかの実施形態では、AAVrh74 N502 I カプシドは、配列番号 50 のアミノ酸配列を含むカプシドタンパク質を含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、本発明は、rAAV ベクター及びカプシドを含む rAAV 粒子であって、rAAV ベクターは、5' から 3' に、以下の核酸、AAV2 ITR、ヒト *serpinA1* 遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸、Byrne デスミンエンハンサーエレメント、Paulin デスミンエンハンサーエレメント、デスミンプロモーター、ウサギ β グロビンイントロンの 5' アーム、5' *miR155* 足場配列、DMPK²⁰⁴ *miRNA* ガイド配列、*miR155* 末端ループ配列、DMPK²⁰⁴ *miRNA* パッセンジャー配列、3' *miR155* 足場配列、ウサギ β グロビンイントロンの 3' アーム、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ヒト *serpinA1* 遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸及び AAV2 ITR を含み、カプシドは、AAVrh74 W505R カプシドである、rAAV 粒子を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、rAAV ベクターを含む rAAV 粒子であって、rAAV ベクターは、5' から 3' に、以下の核酸、配列番号 43 のポリヌクレオチド配列を含む AAV2 ITR、配列番号 18 のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト *serpinA1* 遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸、配列番号 21 のポリヌクレオチド配列を含む Byrne デスミンエンハンサーエレメント、配列番号 22 のポリヌクレオチド配列を含む Paulin デスミンエンハンサーエレメント、配列番号 23 のポリヌクレオチド配列を含むデスミンプロモーター、配列番号 14 のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギ β グロビンイントロンの 5' アーム、配列番号 40 のポリヌクレオチド配列を含む 5' *miR155* 足場配列、配列番号 4 のポリヌクレオチド配列を含む DMPK²⁰⁴ *miRNA* ガイド配列、配列番号 6 のポリヌクレオチド配列を含む *miR155* 末端ループ配列、配列番号 5 のポリヌクレオチド配列を含む DMPK²⁰⁴ *miRNA* パッセンジャー配列、配列番号 41 のポリヌクレオチド配列を含む 3' *miR155* 足場配列、配列番号 15 のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギ β グロビンイントロンの 3' アーム、配列番号 16 のポリヌクレオチド配列を含む最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、配列番号 19 のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト *serpinA1* 遺伝子由来のスタッパー核酸配列をコードする核酸及び配列番号 49 のポリヌクレオチド配列を含む AAV ITR を含み、カプシドは、AAVrh74 W505R カプシドである、rAAV 粒子を提供する。いくつかの実施形態では、AAVrh74 W505R カプシドは、配列番号 52 のアミノ酸配列を含むカプシドタンパク質を含む。

【0017】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載されるウイルス粒子又は rAAV 粒子のいずれかを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるウイルス粒子又は rAAV 粒子のいずれかを含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体を更に含む。

【0018】

いくつかの態様では、本発明は、（例えば、筋細胞で導入遺伝子を発現するための）改変デスミンプロモーターを提供し、改変デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の 1 つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の 2 つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターは、1 つ以上の Byrne エンハンサーエレメント及び／又は 1 つ以上の Paulin エンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターは、配列番号 21 のヌクレオチド配列若しくは配列番号 21 の配列と約 90% の同一性を有する配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号 22 のヌクレオチド配列若しくは配列番号 22 の配列と約 90% の同一性を有する配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレ

メントを含む。いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターは、配列番号 12 のヌクレオチド配列又は配列番号 12 の配列と約 90% の同一性を有する配列を含む。

【0019】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載されるような RNAi、本明細書に記載されるようなウイルス粒子、本明細書に記載されるような AAV 粒子又は本明細書に記載されるような組成物の 1 つ以上を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、使用説明書を更に含む。

【0020】

いくつかの態様では、本発明は、筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載される RNAi のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載される RNAi のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、DMPK RNA の蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載される RNAi のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。

10

【0021】

いくつかの態様では、本発明は、筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載されるようなウイルス粒子 (例えば、rAAV 粒子) のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載されるようなウイルス粒子 (例えば、rAAV 粒子) のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、DMPK RNA の蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載されるようなウイルス粒子 (例えば、rAAV 粒子) のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。

20

【0022】

本発明のいくつかの実施形態では、ウイルス粒子 (例えば、rAAV 粒子) の有効量は、約 1×10^8 ~ 約 2×10^{13} ゲノムコピー / mL の用量である。本発明のいくつかの実施形態では、用量は、約 5×10^{12} ゲノムコピー / mL である。本発明のいくつかの実施形態では、用量は、約 1×10^{13} ゲノムコピー / mL である。本発明のいくつかの実施形態では、用量は、約 2×10^{13} ゲノムコピー / mL である。

30

【0023】

本発明のいくつかの実施形態では、ウイルス粒子 (例えば、rAAV 粒子) の有効量は、約 1×10^8 ~ 約 2×10^{14} ゲノムコピー / 体重 kg の用量である。本発明のいくつかの実施形態では、用量は、約 5×10^{13} ゲノムコピー / 体重 kg である。本発明のいくつかの実施形態では、用量は、約 1×10^{14} ゲノムコピー / 体重 kg である。本発明のいくつかの実施形態では、用量は、約 2×10^{14} ゲノムコピー / 体重 kg である。

40

【0024】

いくつかの態様では、本発明は、筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載されるような組成物のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載されるような組成物のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、DMPK RNA の蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、本明

50

細書に記載されるような組成物のいずれかを哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態では、RNAiは、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、免疫抑制剤は、RNAiの投与前、それと同時及び／又はその後に投与される。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子又はrAAV粒子は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、免疫抑制剤は、ウイルス粒子又はrAAV粒子の投与前、それと同時及び／又はその後に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、免疫抑制剤は、組成物の投与前、それと同時及び／又はその後に投与される。

【0026】

本出願は、以下の説明を添付図面と合わせて参照することによって理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】 nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴ 遺伝子カセットの配列の概略を示す。miR155-amir-DMPK²⁰⁴ 配列の上流にハイブリッド筋肉プロモーターが位置する。miRNAの下流には、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列 (minBGHPA) がある。カセットの両側には、AAV2 ITRに隣接し、サイズが3739bpである組み合わせたベクターゲノムが生成される。

【図1B】 nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴ 遺伝子カセットのクローニングに使用されるITRプラスミドを示す。ITRプラスミドは、AAV2の5' ITR及び3' ITRに隣接するAAV2スタッフア配列を含有する。AAV2スタッフア配列は、クローニングのためのNcoI制限部位及びSphI制限部位を含む。

【図1C】 DC969-nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴ プラスミドのパッケージングを確認するためにHEK293細胞で行われた小規模なパッケージングアッセイの結果を示す。AAVのrep/capプラスミドを使用して小規模産生を行った。y軸は、標準的なEGFPプラスミドの遺伝子カセット (CD627-CBA-GFP) と比較した場合の、1つのHEK293細胞当たり産生されるベクターの量を示す。DRP: DNアーゼ耐性粒子。

【図2A】 尾静脈注射後のDMSXLマウスにおけるAAV、nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴ (amir155-204) 発現カセットによるDMPKノックダウンの評価を示す。図2Aは、異なる臓器内の導入遺伝子のコピー数を定量化することで評価した場合のAAVの形質導入効率及び生体内分布を示す。qPCRの結果をAAVのコピー数／細胞核の平均比率として表す。図2Bは、形質導入組織のamir-DMPK²⁰⁴ のレベルを示す。マイクロRNAの投入レベルをU6核内低分子RNAに正規化し、BSS (平衡塩類溶液) 処置細胞と比較して設定した。図2Cは、形質導入組織のDMPKのサイレンシングを示す。qRT-PCRによって総DMPKを決定した。mRNA投入量をtatボックス結合タンパク質 (TBP) に正規化し、BSS処置細胞と比較して設定した。点線は、TBP発現と比較して50%のDMPK発現を示す。図2A～2Cでは、スチューデントの対応のあるt検定を使用してデータを評価した: *p<0.05、**p<0.01、***p<0.001及び****p<0.0001。n=13 (BSS)、n=12 (amir155-204)。

【図2B】 同上。

【図2C】 同上。

【図3A】 AAV nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴ によるヒトDMPKの抑制を示す。DMSXLマウスにAAV nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴ を用量依存的に全身注射した。マウスを8週間後に安楽死させ、臓器を採取し、amir-DMPK²⁰⁴ 及びDMPK転写物のレベルを測定した。図3Aは、様々な組織中のU6に正規化されたamir-DMPK²⁰⁴ の存在量を示す。図3Bは、様々な組織中のmTBPに正規化されたhDMPK転写物の存在量を示す。ANOVAの多

10

20

30

40

50

重比較検定を使用してデータを評価した： $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 及び $****p < 0.0001$ 。（ $n =$ 野生型10、BSS 7、低用量5、中用量13 及び高用量7）。

【図3B】同上。

【図4】AAV $nDes-miR155-amir-DMPK^{204}$ による全身処置後のDMSXLマウスにおけるスプライシング異常の修正を示す。処置の8週間後の腓腹筋でRT-PCRを使用してLDB3の代替的なエキソン11のスプライシングを評価した。ANOVAの多重比較検定を使用してデータを評価した： $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 及び $****p < 0.0001$ 。（ $n =$ 野生型10、BSS 7、低用量5、中用量13 及び高用量7）。

10

【図5A】AAV $nDes-miR155-amir-DMPK^{204}$ で用量依存的に処置した雌のDMSXLマウスの生存率及び体重の増加を示す。図5Aは、カプランマイヤー生存曲線を示し、低用量又はBSS処置動物と比較した、処置の8週間後の中用量での生存率の改善を示す。図5Bは、BSS処置動物又は低用量処置動物と比較した、AAV $nDes-miR155-amir-DMPK^{204}$ で処置されたDMSXL動物で観察された体重の改善を示す。

【図5B】同上。

【図6】用量依存的なAAV $nDes-miR155-amir-DMPK^{204}$ によってDMSXL DM1マウスモデルを全身処置したときのDM1疾患の電気生理学的特徴の反転を示す。ANOVAの多重比較検定を使用してデータを評価した： $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 及び $****p < 0.0001$ 。（ $n =$ 野生型10、BSS 7、低用量5、中用量13 及び高用量7）。

20

【図7-1】図7Aは、実験プロトコルの概略図を示す。中和抗体を再度確認するために、血液（

【数1】

◆

）を-1日目に採取した。0日目に $1e13vg/kg$ の用量において、GFPLポーターをコードするAAVをNHPに投与し、生体内分布を評価するためにD21に剖検を実施して複数の組織を採取した。図7B-7Eは、AAV9、AAV $rh74$ 及びAAV $rh74-N502I(rh74M)$ を注射した動物の様々な組織からのGFP発現の定量化を示す。棒グラフは、ELISAによって測定された、前脛骨筋(TA；図7B)、大腿二頭筋(図7C)、大腿四頭筋(図7D)、心臓(図7E)及び肝臓(図7F)におけるGFPの量を表す。ANOVAの多重比較検定を使用してデータを評価した： $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 及び $****p < 0.0001$ 。

30

【図7-2】図7-1の続き。

【図8A】AAV $rh74-N502I-nDes-miR155-amir-DMPK^{204}$ によるヒトDMPKの抑制を示す。DMSXLマウスにAAV $rh74-N502I-nDes-miR155-amir-DMPK^{204}$ を用量依存的に全身注射した。マウスを8週間後に安楽死させ、臓器を採取し、 $amir-DMPK^{204}$ 及びDMPK転写物のレベルを測定した。図8Aは、様々な組織中のU6に正規化された $amir-DMPK^{204}$ の存在量を示す。図8Bは、様々な組織中のmTBPに正規化されたhDMPK転写物の存在量を示す。ANOVAの多重比較検定を使用してデータを評価した： $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 及び $****p < 0.0001$ 。

40

【図8B】同上。

【図9】AAV $rh74-N502I-nDes-miR155-amir-DMPK^{204}$ による内在性DMPKのサイレンシングを示す。iPSCから分化したヒトDM1心筋細胞から抽出したRNAの総DMPKレベルをqRT-PCRによって決定した。これらの心筋細胞をAAV $rh74-N502I-nDes-miR155-amir-DMPK$

50

204で形質導入した。mRNA投入レベルをTBP mRNAに正規化した。miRCTL3を陰性対照とし、1に設定した。スチューデントの対応のあるT検定：** $p < 0.01$ 。

【図10】amiR-DMPK204で処置したHEK293細胞におけるゲノムワイド遺伝子発現変化を示すボルケーノプロットである（Benjamin Hochberg FDR<1%）。表は、FDR<1%及びFDR<5%の相補的な3'UTRシードを有する上位4つの差次的に発現された（DE）遺伝子を示す。

【図11】複数の配列間で保存されたamiRDMPK204標的配列を示す。ヒト標的は、配列番号28であり、マカク標的は、配列番号29であり、マウス標的は、配列番号30であり、ラット標的は、配列番号31であり、イヌ標的は、配列番号32である。

【図12】示された処置群の複数の組織におけるウイルスゲノムコピー／細胞の生体内分布を示す。

【図13】示された処置群の様々な筋肉組織における用量依存的なamiR-DMPK発現を示す。

【図14】示された処置群ごとの様々な筋肉における処置後のDMPK発現レベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

いくつかの態様では、本発明は、第1の鎖及び第2の鎖を含むRNAiであって、a) 第1の鎖及び第2の鎖は、二重鎖を形成し、b) 第1の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、配列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'（配列番号1）又は配列番号1の配列と約90%の同一性を有する配列を有する核酸を含み、及びc) 第2の鎖は、非ガイド領域を含み、非ガイド領域は、配列5'-ACCCUAGAUUCUUCGAUU-3'（配列番号2）又は配列番号2の配列と約90%の同一性を有する配列を有する核酸を含む、RNAiを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、RNAiをコードする核酸を発現する、例えばRNAiを哺乳動物の筋肉で発現させるための発現カセットを提供する。いくつかの実施形態では、発現カセットは、rAAVベクター内に存在する。

【0029】

いくつかの態様では、本発明は、本発明のRNAiを哺乳動物に投与することにより、哺乳動物の筋強直性ジストロフィー1（DM-1）を処置する方法を提供する。いくつかの実施形態では、投与されたRNAiは、哺乳動物の筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ（DMPK）の発現を阻害し、これにより哺乳動物のDM-1を寛解させる。

【0030】

一般的な技術

本明細書に記載又は参照される技術及び手順は、一般的に十分に理解され、当業者による従来の方法、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2; A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow and Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R. I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 19

10

20

30

40

50

84) ; Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., Academic Press, 1998) ; Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, Plenum Press, 1998) ; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8) ; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1996) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987) ; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994) ; Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991) ; Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002) ; Immunobiology (C. A. Janeway et al., 2004) ; Antibodies (P. Finch, 1997) ; Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989) ; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000) ; Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995) ; 及び Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 2011) に記載された、広く利用されている方法などを使用して一般に用いられている。

【0031】

定義

本明細書で使用される「ベクター」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核酸を含む組換えプラスミド又はウイルスを指す。

【0032】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」という用語は、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。従って、この用語は、一本鎖、二本鎖若しくは多本鎖DNA若しくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド又はプリン及びピリミジン塩基を含むポリマー又は他の天然、化学的若しくは生化学的に修飾された非天然若しくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドの主鎖は、(典型的にはRNA若しくはDNAに見ることができるような)糖及びリン酸基又は修飾若しくは置換された糖若しくはリン酸基を含み得る。代わりに、ポリヌクレオチドの主鎖は、ホスホロアミダートなどの合成サブユニットのポリマーを含むことができ、従って、オリゴデオキシヌクレオシドホスホロアミダート($P-NH_2$)又は混合ホスホロアミダート-ホスホジエステルオリゴマーであり得る。加えて、相補鎖を合成し、適切な条件下で鎖をアニーリングするか、又は適切なプライマーと共にDNAポリメラーゼを使用して新規の相補鎖を合成することにより、化学合成の一本鎖ポリヌクレオチド産物から二本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。

【0033】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に用いられ、最小長に限定されない。そのようなアミノ酸残基のポリマーは、天然又は非天然のアミノ酸残基を含み得、アミノ酸残基のペプチド、オリゴペプチド、二量体、三量体及び多量体を含むが、これらに限定されない。全長タンパク質及びその断片の両方がこの定義に包含される。この用語には、ポリペプチドの発現後修飾、例えばグリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化なども含まれる。更に、本発明の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列に対して（一般的に本質的に保存的な）欠失、付加及び置換などの修飾を含むタンパク質を指す。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発によるように意図的なものであり得るか、又はタンパク質を産生する宿主の変異若しくはPCR増幅に起因するエラーによるように偶発的なものであり得る。

10

【0034】

「組換えウイルスベクター」は、1つ以上の異種配列（すなわちウイルス起源ではない核酸配列）を含む組換えポリヌクレオチドベクターを指す。組換えAAVベクターの場合、組換え核酸は、少なくとも1つ、いくつかの実施形態では2つの逆位末端反復配列（ITR）に隣接している。

【0035】

「組換えAAVベクター（rAAVベクター）」は、少なくとも1つ、いくつかの実施形態では2つのAAV逆位末端反復配列（ITR）に隣接する1つ以上の異種配列（すなわちAAV起源ではない核酸配列）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（又は好適なヘルパー機能を発現し）、AAVのrep及びcap遺伝子産物（すなわちAAVのRep及びCapタンパク質）を発現する宿主細胞に存在する場合、複製されて感染性ウイルス粒子にパッケージングされ得る。rAAVベクターがより大きいポリヌクレオチド（例えば、染色体又はクロモソーム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、そのrAAVベクターは「プロベクター」と称されることがあり、AAVパッケージング機能と好適なヘルパー機能の存在下で複製し、カプシド形成することによって「レスキュー」され得る。rAAVベクターは、脂質と複合化され、リポソーム内に封入され、ウイルス粒子、特にAAV粒子内にカプシド形成されたプラスミド、線状人工染色体が挙げられるが、これらに限定されない複数の形態のいずれかであり得る。rAAVベクターをAAVウイルスカプシドにパッケージングして「組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV粒子）」を生成することができる。

20

30

【0036】

「異種」とは、比較されるか又は導入若しくは組み込まれる実体の残りとは遺伝子型的に異なる実体に由来するものを意味する。例えば、遺伝子工学技術によって異なる細胞型に導入されるポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（及び発現すると異種ポリペプチドをコードすることができる）。同様に、ウイルスベクターに組み込まれる細胞配列（例えば、遺伝子又はその部分）は、ベクターに対して異種のヌクレオチド配列である。

40

【0037】

「導入遺伝子」という用語は、細胞に導入されるポリヌクレオチドを指し、RNAに転写され、任意選択により適切な条件下で翻訳及び／又は発現することができる。態様では、導入遺伝子は、それが導入された細胞に所望の特性を付与するか、又はそうでなければ所望の治療的若しくは診断結果をもたらす。別の態様では、導入遺伝子は、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。

【0038】

ウイルス力価に関して使用される「ゲノム粒子（gp）」、「ゲノム均等物」又は「ゲノムコピー（gc）」という用語は、感染力又は機能性にかかわらず、組換えAAVのDNAゲノムを含有するビリオンの数を指す。特定のベクター調製物中のゲノム粒子の数は

50

、本明細書の実施例又は例えばClark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278に記載されるような手順によって測定することができる。

【0039】

本明細書で使用される「ベクターゲノム (vg)」という用語は、ベクター、例えばウイルスベクターの一連のポリヌクレオチド配列を含む、1つ以上のポリヌクレオチドを指し得る。ベクターゲノムは、ウイルス粒子中でカプシド形成され得る。特定のウイルスベクターに応じて、ベクターゲノムは、一本鎖DNA、二本鎖DNA又は一本鎖RNA若しくは二本鎖RNAを含み得る。ベクターゲノムは、特定のウイルスベクター及び／又は特定のウイルスベクターに組換え技術によって挿入される任意の異種配列に関連する内在性配列を含み得る。例えば、組換えAAVベクターゲノムは、プロモーター配列、スタッパー配列、目的配列（例えば、RNAi）及びポリアデニル化配列に隣接する少なくとも1つのITR配列を含み得る。完全なベクターゲノムは、ベクターの完全な一連のポリヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの核酸力価は、vg/mLを単位として測定され得る。この力価を測定するのに好適な方法は、当技術分野で公知である（例えば、定量PCR）。

【0040】

本明細書で使用する場合、「阻害する」という用語は、特定の標的の存在又は活性を妨害、低減、排除又はそうでなければ拮抗させる作用を指し得る。阻害は、部分的阻害又は完全阻害を指し得る。例えば、遺伝子の発現を阻害することは、mRNAの存在量の減少（例えば、mRNA転写物のサイレンシング）、mRNAの分解、mRNAの翻訳の阻害などを含む、遺伝子の発現の妨害、低減、排除又は任意の他の拮抗をもたらすあらゆる作用を指し得る。いくつかの実施形態では、DMPKの発現を阻害することは、DMPK mRNAの存在量の減少（例えば、DMPK mRNA転写物のサイレンシング）、DMPK mRNAの分解、DMPK mRNAの翻訳の阻害などを含む、DMPKの発現の妨害、低減、排除又は任意の他の拮抗を指し得る。別の例として、細胞内のタンパク質の蓄積を阻害することは、mRNAの存在量の減少（例えば、mRNA転写物のサイレンシング）、mRNAの分解、mRNAの翻訳の阻害、タンパク質の分解などを含む、タンパク質の発現の妨害、低減、排除又は他の拮抗をもたらすあらゆる作用を指し得る。いくつかの実施形態では、細胞内のDMPKタンパク質の蓄積を阻害することは、DMPK mRNAの存在量の減少（例えば、DMPK mRNA転写物のサイレンシング）、DMPK mRNAの分解、DMPK mRNAの翻訳の阻害、DMPKタンパク質の分解などを含む、細胞内のDMPKタンパク質の蓄積の妨害、低減、排除又は他の拮抗を指す。

【0041】

ウイルス力価に関して使用される「感染単位 (iu)」、「感染粒子」又は「複製単位」という用語は、例えば、McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973に記載されているような、複製中心アッセイとしても公知の感染中心アッセイによって測定されるような感染能及び複製能のある組換えAAVベクター粒子の数を指す。

【0042】

ウイルス力価に関して使用される「形質導入単位 (tu)」という用語は、本明細書の実施例又は例えばXiao et al. (1997) Exp. Neurol., 144:113-124; 若しくはFisher et al. (1996) J. Virol., 70:520-532に記載されているような機能アッセイで測定される場合の、機能的な導入遺伝子産物の産生をもたらす感染性組換えAAVベクター粒子の数を指す。

【0043】

「逆位末端反復」又は「ITR」配列は、当技術分野で十分に理解されている用語であり、逆方向のウイルスゲノムの末端に見られる比較的短い配列を指す。

【0044】

「AAV逆位末端反復（ITR）」配列は、当技術分野で十分に理解されている用語であり、天然の一本鎖AAVゲノムの両末端に存在する約145個のヌクレオチドの配列である。ITRの最も外側にある125個のヌクレオチドは、2つの別の方向のいずれかに存在する可能性があり、異なるAAVゲノム間及び単一のAAVゲノムの両端間で不均一性がもたらされる。最も外側にある125個のヌクレオチドは、いくつかの短い自己相補性領域（A、A'、B、B'、C、C'及びD領域と表記される）も含み、このITRの部分内で鎖内塩基対合を生じさせることが可能となる。

【0045】

「末端分解配列」又は「trs」は、ウイルスDNAの複製中にAAVのrepタンパク質によって切断される、AAV ITRのD領域内の配列である。変異末端分解配列は、AAVのrepタンパク質による切断に対して難分解性である。

10

【0046】

「AAVのヘルパー機能」とは、宿主細胞によってAAVを複製し、パッケージングすることができる機能を指す。AAVのヘルパー機能は、AAVの複製及びパッケージングを補助するヘルパーウイルス又はヘルパーウイルス遺伝子を含むが、これらに限定されない、いずれかの多数の形態で提供され得る。他のAAVのヘルパー機能は、遺伝毒性剤など、当技術分野で公知である。

【0047】

AAVに関する「ヘルパーウイルス」は、宿主細胞によってAAV（欠陥のあるパルボウイルス）を複製し、パッケージングすることができるウイルスを指す。ヘルパーウイルスは、AAVの複製を可能にする「ヘルパー機能」を提供する。アデノウイルス、ヘルペスウイルス並びにワクシニアウイルス及びバキュロウイルスなどのポックスウイルスを含む多数のそのようなヘルパーウイルスが同定されている。アデノウイルスには多数の異なるサブグループが含まれるが、サブグループCのアデノウイルス5型（Ad5）が最も一般的に使用されている。ヒト、非ヒト哺乳動物及び鳥類起源の多数のアデノウイルスが知られており、ATCCなどの寄託機関から入手可能である。ATCCなどの寄託機関から同様に入手可能なヘルペスファミリーのウイルスとしては、例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）及び仮性狂犬病ウイルス（PRV）が挙げられる。AAVを複製するためのアデノウイルスヘルパー機能の例としては、E1A機能、E1B機能、E2A機能、VA機能及びE4orf6機能が挙げられる。寄託機関から入手可能なバキュロウイルスとしては、オートグラフィカ・カリフォルニカ（Autographa californica）の核多角体病ウイルスが挙げられる。

20

30

【0048】

rAAVの調製物は、感染性AAV粒子と感染性ヘルパーウイルス粒子の比率が少なくとも約102：1；少なくとも約104：1、少なくとも約106：1；又は少なくとも約108：1以上である場合、ヘルパーウイルスを「実質的に含まない」と言われる。いくつかの実施形態では、調製物は、同等量のヘルパーウイルスタンパク質（すなわち上記に述べたヘルパーウイルス粒子の不純物が破壊された形態で存在した場合、そのようなレベルのヘルパーウイルスの結果として存在するであろうタンパク質）も含まない。ウイルス及び／又は細胞タンパク質の汚染は、一般に、SDSゲル上にクマシー染色バンドが存在する（例えば、AAVのカプシドタンパク質であるVP1、VP2及びVP3に相当するバンド以外のものが出現する）ことで観察することができる。

40

【0049】

参照ポリペプチド又は核酸配列に関する「配列同一性パーセント（％）」は、配列をアラインさせ、必要であれば、最大の配列同一性パーセントを達成するためにギャップを導入した後の、いずれの保存的置換も配列同一性の一部として考慮しない、参照ポリペプチド又は核酸配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドと同一である候補配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドのパーセンテージとして定義される。アミノ酸又は核酸配列同一性パ

50

ーセントを決定するためのアラインメントは、当業者の範囲内の様々な方法において、例えば公的に利用可能なコンピュータソフトウェアプログラム、例えば *Current Protocols Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1987), Supp. 30, section 7.7.18, Table 7.7.1 に記載され、BLAST、BLAST-2、ALIGN 又は Megalign (DNASTAR) ソフトウェアを含むプログラムを使用して達成することができる。好ましいアラインメントプログラムは、ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania) である。当業者は、比較する配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要ないずれかのアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。本明細書の目的のために、所与のアミノ酸配列 B との、それによる又はそれに対する所与のアミノ酸配列 A のアミノ酸配列同一性 % (代わりに所与のアミノ酸配列 B との、それによる又はそれに対する特定のアミノ酸配列同一性 % を有するか又はそれを含む所与のアミノ酸配列 A として表現することができる) は、以下のように計算される: $100 \times \text{分数 } X / Y$ (X は、そのプログラムの A 及び B のアラインメントで配列アラインメントプログラムによって同一のマッチとしてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Y は、B におけるアミノ酸残基の合計数である)。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは等しくない場合、B に対する A のアミノ酸配列同一性 % は、A に対する B のアミノ酸配列同一性 % と等しくないことが理解されるであろう。本明細書の目的のために、所与の核酸配列 D との、それによる又はそれに対する所与の核酸配列 C の核酸配列同一性 % (代わりに所与の核酸配列 D との、それによる又はそれに対する特定の核酸配列同一性 % を有するか又はそれを含む所与の核酸配列 C として表現することができる) は、以下のように計算される: $100 \times \text{分数 } W / Z$ (W は、そのプログラムの C 及び D のアラインメントで配列アラインメントプログラムによって同一のマッチとしてスコア付けされたヌクレオチドの数であり、Z は、D におけるヌクレオチドの合計数である)。核酸配列 C の長さが核酸配列 D の長さとは等しくない場合、D に対する C の核酸配列同一性 % は、C に対する D の核酸配列同一性 % と等しくないことが理解されるであろう。

【0050】

「単離」分子 (例えば、核酸若しくはタンパク質) 又は細胞は、その自然環境の成分から同定、分離及び／又は回収されたものであることを意味する。

【0051】

「有効量」は、臨床結果 (例えば、症状の寛解、臨床評価項目の達成など) を含む、有益な又は所望の結果を生じさせるのに十分な量である。有効量は、1 回以上の投与で投与され得る。疾患状態の観点から、有効量は、疾患の発症を寛解、安定化又は遅延させるのに十分な量である。

【0052】

「個体」又は「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜 (例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ)、霊長類 (例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、例えばサル)、ウサギ並びにげっ歯類 (例えば、マウス及びラット) が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、個体又は対象は、ヒトである。

【0053】

本明細書で使用する場合、「処置」は、有益な又は所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目的では、有益な又は所望の臨床結果としては、検出可能又は検出不能にかかわらず、症状の緩和、疾患の程度の低減、疾患の安定化した (例えば、悪化しない) 状態、疾患の蔓延 (例えば、転移) の防止、疾患進行の遅延又は緩徐化、疾患状態の寛解又は緩和及び緩解 (部分的又は全体的にかかわらない) が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」は、処置を受けていない場合に予想される生存期間と比較すると、生存期間が延長することも意味し得る。

【0054】

本明細書で使用する場合、「予防的処置」という用語は、個体が障害を有するリスクが

あるか又は障害を有するリスクにあることがわかっている又は疑われているが、ただし障害の症状がないか又は最低限の症状を示す処置を指す。予防的処置を受けている個体は、症状が発症する前に処置することができる。

【0055】

本明細書で使用する場合、「筋強直性ジストロフィー1型」又は「DM1」という用語は、骨格筋及び平滑筋だけでなく、眼、心臓、内分泌系及び中枢神経系に影響を及ぼす多系統障害を指す。DM-1には、重複する3つのカテゴリーが存在する(Bird, TD, Myotonic Dystrophy Type 1. 1999 Sep 17 [2021年3月25に更新]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews (登録商標) [インターネット]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022)。軽度のDM1は、白内障及び軽度の筋強直を特徴とし、古典的なDM1は、筋力低下及び消耗、筋強直、白内障及び多くの場合心臓伝導障害を特徴とし、先天性DM1は、出生時における低血圧及び重度の全身衰弱を特徴とし、多くの場合呼吸不全及び早期死亡を伴い、知的障害が一般的である。

10

【0056】

本明細書で使用する場合、「筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ」、「DMPK」「ミオトニンプロテインキナーゼ」、「MT-PK」、「筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ」又は「MDPK」という用語は、DM1のほとんどの症例に関連する遺伝子又はそのポリペプチド産物のいずれかを指し得る。DMPK遺伝子の3'非翻訳領域は、5~37コピーのCTGトリヌクレオチドリピートを含有する。この不安定なモチーフが50~1,000コピーに伸長することによって筋強直性ジストロフィーI型が引き起こされ、反復エレメントのコピー数が増加するにつれて重症度が増大する。

20

【0057】

本明細書で使用する場合、「RNAi」は、細胞内でRNA干渉を誘導する、あらゆるRNA分子を指し得る。RNAiの例としては、低分子阻害性RNA(sRNA)、マイクロRNA(miRNA)及び低分子ヘアピンRNA(shRNA)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

「miRNA」は、(i) RNAiによってノックダウンするための目的遺伝子を標的化する二本鎖配列と、(ii) 内在性miRNAに類似したステムループ構造を形成する追加の配列とを含有するポリヌクレオチドを指し得る。いくつかの実施形態では、miRNAは、ステムループ構造に隣接する核酸を含む。これらの隣接配列は、「miRNA足場」として知られている。RNAiの目的遺伝子を標的化する配列(例えば、短い約20 ntの配列)は、miRNA様のステムループを生成する配列と、ポリヌクレオチドがmiRNA様の二次構造にアセンブルされるときに目的配列と塩基対合して二重鎖を形成する配列とにライゲーションされ得る。本明細書に記載されるように、この二重鎖は、不完全にハイブリダイゼーションされる可能性があり、例えば1つ以上の不対合又は誤対合塩基を含み得る。このポリヌクレオチドがダイサーによって切断されると、目的遺伝子を標的化する配列を含むこの二重鎖は、巻き戻されてRISC複合体に組み込まれ得る。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し得る。miRNA足場の例としては、miR-155配列(Lagos-Quintana, M. et al. (2002) Curr. Biol. 12: 735-9)及びmiRGE足場(国際公開第2014016817A2号パンフレット)が挙げられる。配列をmiRNA足場にクローニングするための市販のキットは、当技術分野で公知である(例えば、Life Technologies、Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA社製Invitrogen(商標)BLOCK-iT(商標)Pol II miRNAi発現ベクターキット)。

30

40

【0059】

本明細書で使用する場合、「センス」核酸という用語は、導入遺伝子の全て又は一部を

50

コードする配列を含む核酸である。いくつかの例では、導入遺伝子の mRNA は、センス核酸である。

【0060】

本明細書で使用する場合、「アンチセンス」核酸は、「センス」核酸に相補的な核酸の配列である。例えば、アンチセンス核酸は、導入遺伝子をコードする mRNA に相補的であり得る。

【0061】

本明細書で使用する場合、RNA i の「ガイド領域」は、典型的には相補性に基づいて標的 mRNA に結合する RNA i 鎖である。相補性領域は、ガイド領域の全て又は一部を包含し得る。典型的には、相補性領域は、少なくともシード領域を含む。多くの場合、RNA i のアンチセンス領域は、ガイド領域である。

10

【0062】

本明細書で使用する場合、RNA i の「パッセンジャー領域」又は「非ガイド領域」は、本明細書で互換的に用いられ、ガイド領域に補完的な RNA i の領域である。多くの場合、RNA i のセンス領域は、パッセンジャー領域である。

【0063】

本明細書で使用する場合、RNA i (例えば、miRNA) の「シード領域」は、約 1 ～ 8 ヌクレオチド長のマイクロ RNA の領域である。いくつかの例では、シード領域及びその標的 mRNA の 3' - UTR は、RNA i を認識する際の重要な決定因子であり得る。

【0064】

本明細書で使用する場合、「オフターゲット遺伝子サイレンシング」は、意図しない mRNA の 3' - UTR 内の配列との RNA i のシード領域の対合を指し、それらの転写産物の翻訳抑制及び不安定化を誘導する (例えば、意図しない mRNA の発現を減少させる) 。

20

【0065】

本明細書における「約」値又はパラメータへの言及は、この値又はパラメータ自体に関する実施形態を含む (及び説明する)。例えば、「約 X」を言及する説明には、「X」の説明が含まれる。

【0066】

本明細書で使用する場合、項目の単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」及び「その」は、別途指示がない限り、複数形を含む。

30

【0067】

本開示に記載される本発明の態様及び実施形態は、態様及び実施形態を「含む」、「からなる」及び「から本質的になる」を含むことを理解されたい。

【0068】

RNA i

いくつかの態様では、本発明は、筋強直性ジストロフィー 1 型 (DM1) を処置するための、DMPK RNA を標的化する改善された RNA i を提供する。いくつかの実施形態では、RNA i は、低分子阻害性 RNA (siRNA)、マイクロ RNA (miRNA) 又は低分子ヘアピン RNA (shRNA) である。低分子阻害性 RNA、すなわち干渉 RNA (siRNA) は、細胞中で RNA i を誘導する約 19 ～ 25 (例えば、19 ～ 23) 塩基対長の二本鎖 RNA 分子として当技術分野で公知である。miRNA は、典型的には siRNA よりも小さく、複数の標的と、翻訳を抑制し、mRNA を分解し、いくつかの例では mRNA をエンドヌクレアーゼ的に切断するための機能とを有し得る。低分子ヘアピン RNA (shRNA) は、細胞内に RNA i を誘導する短いループ (例えば、約 4 ～ 11 個のヌクレオチド) によって連結された二本鎖 RNA の約 19 ～ 25 (例えば、19 ～ 23) 個の塩基対を含む RNA 分子として当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、RNA i は、第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含み、a) 第 1 の鎖及び第 2 の鎖は、二重鎖を形成し、b) 第 1 の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、核酸配列 5' - AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU - 3' (配列番号 1) を含み、及び c) 第 2

40

50

の鎖は、が非ガイド領域を含む。いくつかの実施形態では、核ガイド領域は、核酸配列 5' - A G U C G A A G A C A G U U C U A G G G U - 3' (配列番号 1) を含み、非ガイド領域が配列 5' - A C C C U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 2) を含む。
【0069】

いくつかの実施形態では、第 1 の鎖がガイド領域を含み、ガイド領域が 5' - A G U C G A A G A C A G U U C U A G G G U - 3' (配列番号 1) と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖がガイド領域を含み、ガイド領域が 5' - A G U C G A A G A C A G U U C U A G G G U - 3' (配列番号 1) と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有するが、少なくとも 1 つの CpG モチーフを維持する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖が非ガイド領域を含み、非ガイド領域が 5' - A C C C U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 2) と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖が非ガイド領域を含み、非ガイド領域が 5' - A C C C U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 2) と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有するが、少なくとも 1 つの CpG モチーフを維持する核酸配列を含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、RNAi は、配列番号 7 の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAi は、配列番号 7 と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAi は、配列番号 7 と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有する核酸配列を含むが、(例えば、シード配列内の) 少なくとも 1 つの配列を維持する。

【0071】

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含み、a) 第 1 の鎖及び第 2 の鎖が二重鎖を形成し、b) 第 1 の鎖がガイド領域を含み、及び c) 第 2 の鎖が非ガイド領域を含む、RNAi をコードする核酸を提供する。いくつかの実施形態では、RNAi をコードする核酸は、配列番号 4 の核酸配列及び／又は配列番号 5 の核酸を含む。いくつかの実施形態では、RNAi をコードする核酸は、配列番号 4 と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有する核酸配列及び／又は配列番号 5 と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAi は、配列番号 8 の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、RNAi は、配列番号 8 と約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 超の同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0072】

マイクロ RNA (miRNA) は、ループによって連結された二本鎖 RNA の短い (例えば、約 19 ~ 25 塩基対の) 配列を含み、1 つ以上のバルジ (例えば、誤対合又は不對合塩基対) を含む二本鎖 RNA の 1 つ以上の追加の配列を含有する、細胞内に RNAi を誘導する RNA 分子として当技術分野で公知である。本明細書で使用する場合、「miRNA」という用語は、内在性 miRNA だけでなく、外因性又は異種 miRNA を包含する。いくつかの実施形態では、「miRNA」は、pri-miRNA 又は pre-miRNA と称され得る。pri-miRNA 転写産物は、miRNA のプロセッシング中に産生される。pri-miRNA は、Drosha-DGCR8 によってプロセッシングされ、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; 又は 5' 隣接領域、非ガイド鎖、ループ領域、ガイド鎖及び 3' 隣接領域を含む pre-miRNA が残るように 1 つ以上の配列を切除することにより、pre-miRNA が産生される。次いで、pre-miRNA は細胞質に輸送され、ダイサーによってプロセッシングされ、ガイド

鎖と非ガイド（又はパッセンジャー）鎖を含む *s i R N A* が生成される。次いで、ガイド鎖は、*R I S C* 複合体に利用され、例えばガイド鎖に相補的な標的 *R N A* 配列を認識することによって遺伝子サイレンシングを引き起こす。*m i R N A* の更なる説明は、例えば、国際公開第 2008/150897 号パンフレットに見出され得る。*m i R N A* による標的配列の認識は、主に、標的配列と *m i R N A* シード配列、例えばガイド鎖のヌクレオチド 1～8（5' から 3'）との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）。

【0073】

p r i / p r e - m i R N A 構造では、相補的塩基対合（例えば、ワトソン・クリック塩基対合）により、二重鎖にガイド鎖：非ガイド鎖の界面が部分的に形成される。しかしながら、いくつかの実施形態では、この相補的塩基対合は、二重鎖全体にわたって延在していない。いくつかの実施形態では、界面におけるバルジが、1 つ以上のヌクレオチド位置に存在し得る。本明細書で使用する場合、「バルジ」という用語は、二重鎖内の対向する核酸と非相補的な核酸の領域を指し得る。いくつかの実施形態では、バルジは、相補的な核酸の領域が互いに結合する一方、中央の非相補的領域のうちの領域が結合しないときに形成される。いくつかの実施形態では、バルジは、2 つの相補領域の間に位置する核酸の 2 つの鎖が異なる長さであるときに形成される。下記で説明するように、バルジは、1 つ以上のヌクレオチドを含み得る。

【0074】

m i R N A のプロセッシング中、*m i R N A* は、ガイド鎖：非ガイド鎖の界面に隣接する切断部位で切断され、これによりガイド鎖と非ガイド鎖との *s i R N A* 二重鎖が放出される。いくつかの実施形態では、*m i R N A* は、切断部位に隣接するセンス鎖又はアンチセンス鎖にバルジを含む。別の言い方をすると、いくつかの実施形態では、*m i R N A* は、シード配列に隣接するガイド鎖又は非ガイド鎖にバルジを含む。

【0075】

いくつかの実施形態では、*m i R N A* は、成熟非ガイド鎖の 5' 切断部位に対向するガイド鎖にバルジを含む。いくつかの実施形態では、*m i R N A* は、非ガイド鎖の 5' ヌクレオチドに対向するバルジを含む。いくつかの実施形態では、*m i R N A* は、成熟ガイド鎖の 3' 切断部位に対向するセンス鎖にバルジを含む。いくつかの実施形態では、*m i R N A* は、ガイド鎖の 3' ヌクレオチドに対向するバルジを含む。

【0076】

R N A i ベースの治療の安全性は、意図しない *m R N A* に結合し、それらの発現を低減させる低分子阻害性 *R N A* (*s i R N A*) の能力（オフターゲット遺伝子サイレンシングとして知られる効果）によって妨げられる可能性がある。オフターゲットは主に、シード領域（低分子 *R N A* のヌクレオチド 2～8）が、意図しない *m R N A* の 3' - *U T R* 内の配列と対合するときに生じ、これらの転写産物の翻訳抑制及び不安定化を誘導する。オフターゲットが低減された *R N A i* は、ガイド配列及び非ガイド配列内の塩基を置換することにより、例えば *C p G* モチーフを生成することによって設計することができる。大幅に低下したオフターゲットスコアをもたらす得る潜在的な置換は、最低限のオフターゲットの可能性と強力なサイレンシング能力を有する候補配列を同定する、特異性に焦点を当てた *s i R N A* 設計アルゴリズムである *S i S P O T R* アルゴリズムを使用して評価することができる（Boudreau et al, *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41 (1) e9。低下した *S i S P O T R* スコアから、親 *R N A i* 分子と比較して、潜在的なヒトオフターゲットの数が少ない配列であることが予想される。本発明のいくつかの実施形態では、*R N A i* は、オフターゲット遺伝子サイレンシングを低減するように改良される。

【0077】

いくつかの実施形態では、第 1 の鎖及び第 2 の鎖は、ループ構造を形成することができる *R N A*（例えば、*R N A* リンカー）によって連結されている。当技術分野で一般に知ら

10

20

30

40

50

れているように、RNAループ構造（例えば、ステムループ又はヘアピン）は、RNA分子が、共に塩基対合することのないRNA配列によって塩基対が互いに分かれた2つのRNA配列を含むときに形成される。例えば、配列A及びCが共に塩基対となるように相補的又は部分的に相補的であるが、配列Bの塩基が共に塩基対しない場合、RNA分子A-B-Cでループ構造が形成され得る。

【0078】

いくつかの実施形態では、ループ構造を形成することができるRNAは、4～50個のヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、ループ構造を形成することができるRNAは、13個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ループを形成することができるRNAのヌクレオチドの数は、4～50個のヌクレオチド又はその間の任意の整数である。いくつかの実施形態では、0～50%のループが、ループの別の部分と相補的であり得る。本明細書で使用する場合、「ループ構造」という用語は、核酸の2つの相補鎖を結合する配列である。いくつかの実施形態では、ループ構造の1～3個のヌクレオチドが核酸の相補鎖に隣接し、ループ構造の遠位部分の1～3個のヌクレオチドと相補的であり得る。例えば、ループ構造の5'末端の3個のヌクレオチドは、ループ構造の3'末端の3個のヌクレオチドに相補的であり得る。

【0079】

いくつかの実施形態では、本開示のRNAiをコードする核酸は、異種miRNA足場を含む。いくつかの実施形態では、異種miRNA足場の使用は、miRNA発現を調節するか、例えばmiRNA発現を増加させるか、又はmiRNA発現を低減させるために使用される。当技術分野で公知の任意のmiRNA足場を使用することができる。いくつかの実施形態では、miRNA足場は、miR-155足場（例えば、Lagos-Quintana, M. et al. (2002) Curr. Biol. 12:735-9及びLife Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA社製Invitrogen（商標）BLOCK-iT（商標）Pol II miRNAi発現ベクターキットを参照されたい）又はmirGE足場（国際公開第2014/016817号パンフレット）に由来する。

【0080】

筋強直性ジストロフィー1型（DM-1）を処置する方法

筋強直性ジストロフィー1型（DM1）は、DMPK遺伝子座（筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ）におけるCTGリピートの伸長（50超）によって引き起こされる一遺伝子性で常染色体優性の進行性疾患である。リピートを有するDMPKはmRNAへと転写され、これによりヘアピンを形成してRNA結合タンパク質と結合し、それらを通常の機能から隔離する。これにより、核内フォーカスの出現、ミスプライミング及び最終的に筋強直がもたらされる。DM1は、主に骨格筋、心筋及び平滑筋に影響を与え、身体的、認知的及び行動学的な著しい機能障害並びに身体障害をもたらす。

【0081】

いくつかの態様では、本発明は、本開示の医薬組成物（例えば、本開示のrAAV粒子を含む医薬組成物）を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物の筋強直性ジストロフィー1（DM1）を処置するための方法及び組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、本開示の医薬組成物（例えば、本開示のrAAV粒子を含む医薬組成物）を哺乳動物に投与することを含む、DM-1を有する哺乳動物のDMPKの発現を阻害するための方法及び組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、本開示の医薬組成物（例えば、本開示のrAAV粒子を含む医薬組成物）を哺乳動物に投与することを含む、DM1を有する哺乳動物の細胞内のDMPKの蓄積を阻害するための方法及び組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、本開示のRNAiをコードするベクターを含むrAAV粒子の有効量を哺乳動物の筋肉脳に投与することを含む、DM1の症状を寛解するための方法及び組成物を提供する。

【0082】

いくつかの態様では、本発明は、DM1を有する哺乳動物のDMPK mRNAを標的

化するためのRNAiを提供する。いくつかの実施形態では、RNAiは、配列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'（配列番号1）を含む第1の核酸を含む第1の鎖と、配列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'（配列番号2）を含む第2の核酸を含む第2の鎖とを含む。本明細書に記載される（例えば、rAAVベクターの一部としての）RNAiは、特にDM1の処置に利用され得る。

【0083】

いくつかの実施形態では、RNAiは、低分子阻害性RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）又は低分子ヘアピンRNA（shRNA）である。低分子阻害性RNA、すなわち干渉RNA（siRNA）は、細胞中でRNAiを誘導する約19～25（例えば、19～23）塩基対長の二本鎖RNA分子として当技術分野で公知である。miRNAは、典型的にはsiRNAよりも小さく、複数の標的と、翻訳を抑制し、mRNAを分解し、いくつかの例ではmRNAをエンドヌクレアーゼ的に切断するための機能とを有し得る。低分子ヘアピンRNA（shRNA）は、細胞内にRNAiを誘導する短いループ（例えば、約4～11個のヌクレオチド）によって連結された二本鎖RNAの約19～25（例えば、19～23）個の塩基対を含むRNA分子として当技術分野で公知である。

10

【0084】

いくつかの実施形態では、miRNAは、配列番号1と約90%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、miRNAは、配列番号1と約90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一又は100%のいずれかと同一であるガイド配列を含む。

20

【0085】

いくつかの実施形態では、miRNAは、配列番号2と約90%同一である非ガイド配列（パッセンジャー鎖）を含む。いくつかの実施形態では、miRNAは、配列番号2と約90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一又は100%のいずれかと同一である非ガイド配列を含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、第1の鎖及び第2の鎖は、ループ構造を形成することができるRNAによって連結されている。当技術分野で一般に知られているように、RNAループ構造（例えば、ステムループ又はヘアピン）は、RNA分子が、共に塩基対合することのないRNA配列によって塩基対が互いに分かれた2つのRNA配列を含むときに形成される。例えば、配列A及びCが共に塩基対となるように相補的又は部分的に相補的であるが、配列Bの塩基が共に塩基対しない場合、RNA分子A-B-Cでループ構造が形成され得る。

30

【0087】

いくつかの実施形態では、ループ構造を形成することができるRNAは、4～50個のヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、ループ構造を形成することができるRNAは、13個のヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、ループ構造を形成することができるRNAは、ヌクレオチド配列GUUUUGGCCACUGACUGAC（配列番号3）を含む。いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号3の配列と少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%のいずれかで同一であるヌクレオチド配列を含む。

40

【0088】

いくつかの態様では、本発明は、配列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'（配列番号1）を含む第1の核酸を含む第1の鎖と、配列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'（配列番号2）を含む第2の核酸を含む第2の鎖とを含むRNAiを哺乳動物（例えば、DM1を有する哺乳動物）に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、組換えウイルス粒子は、RNAiを含む。いくつかの実施形態では、組換えウイルス粒子は、rAAVベクターをカプシド形成するAAV粒

50

子であり、r A A Vベクターは、R N A iをコードする。

【0089】

いくつかの実施形態では、r A A V粒子の送達は、哺乳動物にr A A V粒子を全身注射することによる。いくつかの実施形態では、全身注射は、静脈内注射、動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮内注射又は皮下注射、C S F内及び髄腔内投与（I T）である。

【0090】

いくつかの態様では、本発明は、本開示の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物のD M 1を処置する方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、本開示の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、D M 1を有する哺乳動物の細胞内のD M P Kの蓄積を阻害する方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、本開示の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、D M 1を有する哺乳動物のD M P Kの発現を阻害する方法を提供する。いくつかの実施形態では、D M P Kは、変異D M P K（例えば、37超又は50超のC T Gリピートを含むD M P K）である。

【0091】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異D M P Kの活性を抑制するために、本開示のR N A iをコードするr A A Vベクターを含む医薬組成物の有効量を投与することにより、D M 1を有するヒトを処置する方法を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む。

【0092】

いくつかの実施形態では、本方法は、変異D M P Kの活性を抑制するために、本開示のR N A iをコードするr A A Vベクターを含む医薬組成物の有効量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、r A A V粒子のウイルス力価は、少なくとも約 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 又は 50×10^{12} ゲノムコピー／mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、r A A V粒子のウイルス力価は、約 $5 \times 10^{12} \sim 6 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12} \sim 7 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12} \sim 8 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12} \sim 9 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 11 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12} \sim 15 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12} \sim 20 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12} \sim 30 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ 又は $50 \times 10^{12} \sim 100 \times 10^{12}$ ゲノムコピー／mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、r A A V粒子のウイルス力価は、約 $5 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 又は $25 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ ゲノムコピー／mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、r A A V粒子のウイルス力価は、少なくとも約 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 又は 50×10^9 形質導入単位／mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、r A A V粒子のウイルス力価は、約 $5 \times 10^9 \sim 6 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9 \sim 7 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9 \sim 8 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 11 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9 \sim 20 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9 \sim 25 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9 \sim 30 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$ 又は $50 \times 10^9 \sim 100 \times 10^9$ 形質導入単位／mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、r A A V粒子のウイルス力価は、約 $5 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9 \sim 25 \times 10^9$ 又は $25 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$ 形質導入単位／mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、r A A V粒子のウイルス力価は、少なくとも約 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 11×10^{10} 、 15×10^{10} 、 20×10^{10} 、 25×10^{10} 、 30×10^{10} 、 40×10^{10} 又は 50×10^{10} 感染単位／mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、r A A V粒子のウイルス力価は、少なくとも約 $5 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10} \sim 7 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10} \sim 8 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10} \sim 9 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10} \sim 11 \times 10^{10}$ 、1

$1 \times 10^{10} \sim 15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10} \sim 20 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10} \sim 25 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10} \sim 30 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10} \sim 40 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$ 又は $50 \times 10^{10} \sim 100 \times 10^{10}$ 感染単位/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、rAAV 粒子のウイルス力価は、少なくとも約 $5 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10} \sim 15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10} \sim 25 \times 10^{10}$ 又は $25 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$ 感染単位/mL のいずれかである。

【0093】

いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{13}$ ゲノムコピー/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、約 $5 \times 10^8 \sim 10 \times 10^8$ 、約 $10 \times 10^8 \sim 20 \times 10^8$ 、約 $20 \times 10^8 \sim 30 \times 10^8$ 、約 $30 \times 10^8 \sim 40 \times 10^8$ 、約 $40 \times 10^8 \sim 50 \times 10^8$ 又は約 $50 \times 10^8 \sim 100 \times 10^8$ ゲノムコピー/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、約 $5 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、約 $10 \times 10^9 \sim 20 \times 10^9$ 、約 $20 \times 10^9 \sim 30 \times 10^9$ 、約 $30 \times 10^9 \sim 40 \times 10^9$ 、約 $40 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$ 又は約 $50 \times 10^9 \sim 100 \times 10^9$ ゲノムコピー/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、約 $5 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、約 $10 \times 10^{10} \sim 20 \times 10^{10}$ 、約 $20 \times 10^{10} \sim 30 \times 10^{10}$ 、約 $30 \times 10^{10} \sim 40 \times 10^{10}$ 、約 $40 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$ 又は約 $50 \times 10^{10} \sim 100 \times 10^{10}$ ゲノムコピー/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{11}$ 、約 $5 \times 10^{11} \sim 10 \times 10^{11}$ 、約 $10 \times 10^{11} \sim 20 \times 10^{11}$ 、約 $20 \times 10^{11} \sim 30 \times 10^{11}$ 、約 $30 \times 10^{11} \sim 40 \times 10^{11}$ 、約 $40 \times 10^{11} \sim 50 \times 10^{11}$ 又は約 $50 \times 10^{11} \sim 100 \times 10^{11}$ ゲノムコピー/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、約 $5 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、約 $10 \times 10^{12} \sim 20 \times 10^{12}$ 、約 $20 \times 10^{12} \sim 30 \times 10^{12}$ 、約 $30 \times 10^{12} \sim 40 \times 10^{12}$ 、約 $40 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ 又は約 $50 \times 10^{12} \sim 100 \times 10^{12}$ ゲノムコピー/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 $1 \times 10^{13} \sim 2 \times 10^{13}$ ゲノムコピー/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 1×10^8 、約 5×10^8 、約 1×10^9 、約 5×10^9 、約 1×10^{10} 、約 5×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 5×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 5×10^{12} 、約 1×10^{13} 又は約 2×10^{13} ゲノムコピー/mL である。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 5×10^{12} ゲノムコピー/mL である。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 1×10^{13} ゲノムコピー/mL である。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量濃度は、約 2×10^{13} ゲノムコピー/mL である。

【0094】

いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量は、少なくとも約 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{14}$ ゲノムコピー/体重 kg のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量は、約 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{14}$ ゲノムコピー/体重 kg のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される rAAV 粒子の用量は、約 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{13}$ 、 1×10^{10}

$\sim 5 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 5 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 又は $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ g c / 体重 k g のいずれかである。

いくつかの実施形態では、個体に投与される r A A V 粒子の用量は、約 1×10^9 、約 5×10^9 、約 1×10^{10} 、約 5×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 5×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 5×10^{12} 、約 1×10^{13} 、約 5×10^{13} 、約 1×10^{14} 又は約 2×10^{14} ゲノムコピー / 体重 k g である。いくつかの実施形態では、個体に投与される r A A V 粒子の用量は、約 5×10^{13} ゲノムコピー / 体重 k g である。いくつかの実施形態では、個体に投与される r A A V 粒子の用量は、約 1×10^{14} ゲノムコピー / 体重 k g である。いくつかの実施形態では、個体に投与される r A A V 粒子の用量は、約 2×10^{14} ゲノムコピー / 体重 k g である。

10

20

30

40

50

【0095】

いくつかの実施形態では、個体に投与される r A A V 粒子の総量は、少なくとも約 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{14}$ ゲノムコピー / 体重 k g のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される r A A V 粒子の総量は、約 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{14}$ ゲノムコピー / 体重 k g のいずれかである。本発明のいくつかの実施形態では、線条体に注射される組成物の体積は、 $10 \mu\text{L}$ 、 $25 \mu\text{L}$ 、 $50 \mu\text{L}$ 、 $75 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L}$ 、 $200 \mu\text{L}$ 、 $300 \mu\text{L}$ 、 $400 \mu\text{L}$ 、 $500 \mu\text{L}$ 、 $600 \mu\text{L}$ 、 $700 \mu\text{L}$ 、 $800 \mu\text{L}$ 、 $900 \mu\text{L}$ 、 1 mL 、 5 mL 、 10 mL 、 25 mL 、 50 mL 、 75 mL 若しくは 100 mL 超のいずれか1つ又はその間の任意の量である。

【0096】

本発明の組成物（例えば、本開示の RNA i をコードするベクターを含む r A A V 粒子）は、DM1を処置するために、単独で又は1つ以上の追加の治療剤と組み合わせて使用することができる。連続投与の間の間隔は、単位が少なくとも（又は代替的にそれ未満の）分、時間又は日であり得る。

【0097】

いくつかの実施形態では、DM1を処置するための RNA i は、例えば、RNA i に対する免疫応答を抑制するために、免疫抑制剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、RNA i の投与前に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、RNA i の投与と同時に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、RNA i の投与後に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、RNA i

の投与後、その間又はその後の任意の組み合わせで投与される。

【0098】

いくつかの実施形態では、DM1を処置するためのrAAV粒子は、例えば、rAAV粒子及び／又はrAAV粒子の導入遺伝子産物に対する免疫応答を抑制するために、免疫抑制剤と組み合わせで投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、rAAV粒子の投与前に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、rAAV粒子の投与と同時に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、rAAV粒子の投与後に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、rAAV粒子の投与後、投与中又は投与後の任意の組み合わせで投与される。

【0099】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー1（DM1）を処置するための医薬の製造における、本明細書に記載されるRNAiのいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM1を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ（DMPK）の発現を阻害するための医薬の製造における、本明細書に記載されるRNAiのいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM1を有する哺乳動物の細胞内のDMPK RNAの蓄積を阻害するための医薬の製造における、本明細書に記載されるRNAiのいずれかの有効量の使用を提供する。

【0100】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー1（DM1）を処置するための、本明細書に記載されるRNAiのいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM1を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ（DMPK）の発現を阻害するための、本明細書に記載されるRNAiのいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM1を有する哺乳動物の細胞内のDMPK RNAの蓄積を阻害するための、本明細書に記載されるRNAiのいずれかの有効量の使用を提供する。

【0101】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー1（DM1）を処置するための、本明細書に記載されるRNAiを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM1を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ（DMPK）の発現を阻害するための、本明細書に記載されるRNAiのいずれかを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM1を有する哺乳動物の細胞内のDMPK RNAの蓄積を阻害するための、本明細書に記載されるRNAiのいずれかを提供する。

【0102】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー1（DM1）を処置するための医薬の製造における、本明細書に記載されるウイルス粒子（例えば、AAV粒子）のいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM1を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ（DMPK）の発現を阻害するための医薬の製造における、本明細書に記載されるウイルス粒子（例えば、AAV粒子）のいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM1を有する哺乳動物の細胞内のDMPK RNAの蓄積を阻害するための医薬の製造における、本明細書に記載されるウイルス粒子（例えば、AAV粒子）のいずれかの有効量の使用を提供する。

【0103】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー1（DM1）を処置するための、本明細書に記載されるウイルス粒子（例えば、A

10

20

30

40

50

A V 粒子) のいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現を阻害するための、本明細書に記載されるウイルス粒子 (例えば、AAV 粒子) のいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞内の DMPK RNA の蓄積を阻害するための、本明細書に記載されるウイルス粒子 (例えば、AAV 粒子) のいずれかの有効量の使用を提供する。

【0104】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) を処置するための、本明細書に記載されるウイルス粒子 (例えば、AAV 粒子) を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現を阻害するための、本明細書に記載されるウイルス粒子 (例えば、AAV 粒子) のいずれかを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞内の DMPK RNA の蓄積を阻害するための、本明細書に記載されるウイルス粒子 (例えば、AAV 粒子) のいずれかを提供する。

10

【0105】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) を処置するための医薬の製造における、本明細書に記載される組成物のいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現を阻害するための医薬の製造における、本明細書に記載される組成物のいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞内の DMPK RNA の蓄積を阻害するための医薬の製造における、本明細書に記載される組成物のいずれかの有効量の使用を提供する。

20

【0106】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) を処置するための、本明細書に記載される組成物のいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現を阻害するための、本明細書に記載される組成物のいずれかの有効量の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞内の DMPK RNA の蓄積を阻害するための、本明細書に記載される組成物のいずれかの有効量の使用を提供する。

30

【0107】

いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする哺乳動物の筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) を処置するための、本明細書に記載される組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物における筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現を阻害するための、本明細書に記載される組成物のいずれかを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞内の DMPK RNA の蓄積を阻害するための、本明細書に記載される組成物のいずれかを提供する。

40

【0108】

RNAi 発現構築物及びベクター

本発明は、本明細書に記載される RNAi を発現するための発現構築物、ベクター及び rAAV 粒子を提供する。

【0109】

いくつかの実施形態では、本開示の RNAi をコードする核酸は、異種 miRNA 足場を含む。いくつかの実施形態では、異種 miRNA 足場の使用は、miRNA 発現を調節

50

するか、例えばmiRNA発現を増加させるか、又はmiRNA発現を低減させるために使用される。当技術分野で公知の任意のmiRNA足場を使用することができる。いくつかの実施形態では、miRNA足場は、miR-155足場（例えば、Lagos-Quintana, M. et al. (2002) Curr. Biol. 12:735-9及びLife Technologies、Thermo Fisher Scientific; Waltham、MA社製Invitrogen（商標）BLOCK-iT（商標）Pol II miRNAi発現ベクターキットを参照されたい）又はmirG足場（国際公開第2014/016817号パンフレット）から誘導される。いくつかの実施形態では、本開示のRNAiをコードする核酸は、miRNA足場を含む。いくつかの実施形態では、miRNA足場は、配列番号11に示される。いくつかの実施形態では、miRNA足場は、配列番号11の核酸配列と80%、85%、90%、95%又は99%超の同一性を有する核酸配列を含む。

10

【0110】

いくつかの実施形態では、RNAiは、DM1に関連するポリペプチド（例えば、変異DMPK）をコードするRNAを標的化する。理論に束縛されるものではないが、RNAiを使用して、機能獲得がDM1に関連しているポリペプチド（例えば、変異DMPK）の発現及び／又は活性を低減又は排除することができるものと考えられる。

【0111】

いくつかの実施形態では、（例えば、本開示のRNAiをコードする）導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている。例示的なプロモーターとしては、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター、RSV LTR、MoMLV LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ1（PGK）プロモーター、シミアンウイルス40（SV40）プロモーター及びCK6プロモーター、トランスサイレチンプロモーター（TTR）、TKプロモーター、テトラサイクリン応答プロモーター（TRE）、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター（LSP）、E2Fプロモーター、テロメラーゼ（hTERT）プロモーター；サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβアクチン／ウサギβグロビンプロモーター（CAGプロモーター；Niwa et al., Gene, 1991, 108(2):193-9）並びに伸長因子1-αプロモーター（EF1-α）プロモーター（Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23及びGuo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ヒトβ-グルクロニダーゼプロモーター又はニワトリβアクチン（CBA）プロモーターに連結されたサイトメガロウイルスエンハンサーを含む。プロモーターは、構成的プロモーター、誘導性プロモーター又は抑制的プロモーターであり得る。

20

30

【0112】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外因的に供給される化合物、温度などの環境因子又は特定の生理学的状態、例えば急性期、細胞の特定の分化状態の存在によって又は複製細胞のみで調節され得る。外因的に供給されるプロモーターによって調節される誘導性プロモーターの例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン（MT）プロモーター、デキサメタゾン（Dex）誘導性マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系（国際公開第98/10088号パンフレット）；エクジソン昆虫プロモーター（No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351(1996)）、テトラサイクリン抑制系（Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992)）、テトラサイクリン誘導系（Gossen et al, Science, 268:1766-1769(1995), Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518(1998)も参照されたい）、RU486誘導系（Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243(1997)及びWang et al., Gene Ther.

40

50

， 4：432－441（1997））並びにラパマイシン誘導系（Magari et al.， J. Clin. Invest.， 100：2865－2872（1997））が挙げられる。なお、これに関連して有用であり得る他の種類の誘導性プロモーターは、特定の生理学的状態、例えば温度、急性期、細胞の特定の分化状態によって又は複製細胞のみで調節されるプロモーターである。

【0113】

いくつかの実施形態では、調節配列により、組織特異的な遺伝子発現能力が付与される。いくつかの場合、組織特異的調節配列は、組織特異的な方法で転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。そのような組織特異的調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）は、当技術分野でよく知られている。いくつかの実施形態では、プロモーターは、筋特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、デスミンプロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ヒトデスミンプロモーター（例えば、ヒトデスミン遺伝子の－228～＋75；例えば、配列番号23）である。いくつかの実施形態では、プロモーターは、改変デスミンプロモーターである。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、筋細胞で高レベルに発現させるために重要なデスミンプロモーターエレメントを含む（Li and Paulin， et. al.， 1991. Journal of Biol Chem.）。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、少なくとも1コピーのByrneデスミンエンハンサー（例えば、配列番号21）を含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、少なくとも1コピーのPaulinデスミンエンハンサー（－973～－693）（例えば、配列番号22）を含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、1コピーのByrneデスミンエンハンサーと、1コピーのPaulinデスミンエンハンサー（－973～－693）とを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、1コピーのByrneデスミンエンハンサーと、1コピーのPaulinデスミンエンハンサー（－973～－693）と、ヒトデスミン遺伝子のプロモーター（－228～＋75）を含む。

【0114】

いくつかの態様では、本発明は、発現カセット（例えば、筋細胞に導入遺伝子（例えば、治療用導入遺伝子）を発現させるための発現カセット）を提供し、発現カセットは、改変デスミンプロモーターを含み、デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の1つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の2つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、1つ以上のByrneエンハンサーエレメント及び／又は1つ以上のPaulinエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含み、いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号22のヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含み、1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号22のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号22のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号22のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0115】

いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターを含む発現カセットは、イントロンを更に含む。いくつかの実施形態では、イントロンは、ウサギβグロビンイントロンである。いくつかの実施形態では、イントロンは、配列番号13のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、イントロンは、配列番号13のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、導入遺伝子（例えば、治療用導入遺伝子）をコードする核酸は、イントロンに埋め込まれている。いくつかの実施形態では、イントロンは、5'アームと3'アームとを含み、5'アームは、導入遺伝子をコードする核酸の5'側に位置し、3'アームは、導入遺伝子をコードする核酸の3'側に位置する。いくつかの実10
施形態では、イントロンの5'アームは、配列番号14の配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、イントロンの5'アームは、配列番号14のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有する配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、イントロンの3'アームは、配列番号15の配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、イントロンの3'アームは、配列番号15のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有する配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、イントロンの5'アームは、配列番号14の配列を有する核酸を含み、イントロンの3'アームは、配列番号15の配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、イントロンの5'アームは、配列番号14のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有する配列を有する核酸を含み、イントロンの3'アームは、配列番号15のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有する配列を有する核酸を含む。20

【0116】

いくつかの実施形態では、改変デスミンプロモーターを含む発現カセットは、ポリアデニル化シグナルを更に含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、SV40ポリアデニル化シグナル又はHSVT K p Aである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。いくつかの実施形態では、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルは、配列番号16の配列を有する核酸を含む。いくつかの実施形30
態では、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルは、配列番号16のヌクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は99%のいずれかの同一性を有する配列を有する核酸を含む。

【0117】

いくつかの実施形態では、本発明は、筋細胞に導入遺伝子（例えば、治療用導入遺伝子）を発現させるために改変デスミンプロモーターを含む発現カセットを提供する。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、ポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド）をコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、核酸（例えば、治療用核酸）をコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、RNAiをコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、siRNA、shRNA又はmiRNAをコードする。40

【0118】

いくつかの態様では、本発明は、改変デスミンプロモーターを提供し、デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の1つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の2つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、1つ以上のByrneエンハンサーエレメント及び／又は1つ以上のPaulinエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含み、いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号22のヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプ50

ロモーターは、配列番号 21 のヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含み、1 つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号 22 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号 21 のヌクレオチド配列と少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 % 又は 99 % のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号 22 のヌクレオチド配列と少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 % 又は 99 % のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、デスミンプロモーターは、配列番号 21 のヌクレオチド配列と少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 % 又は 99 % のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含み、1 つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号 22 のヌクレオチド配列と少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 % 又は 99 % のいずれかの同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

10

【0119】

いくつかの態様では、本発明は、組換え自己相補的ゲノム（例えば、自己相補的 rAAV ベクター）を含む rAAV 粒子を提供する。自己相補的ベクターゲノムを含む AAV ウイルス粒子及び自己相補的 AAV ゲノムの使用法は、米国特許第 6,596,535 号明細書；同第 7,125,717 号明細書；同第 7,465,583 号明細書；同第 7,785,888 号明細書；同第 7,790,154 号明細書；同第 7,846,729 号明細書；同第 8,093,054 号明細書；及び同第 8,361,457 号明細書；並びに Wang Z., et al., (2003) Gene Ther 10:2105-2111 に記載されており、それらの各々がその全体で本明細書に参照として組み込まれる。自己相補的ゲノムを含む rAAV は、その部分的に相補的な配列（例えば、異種核酸の相補的なコード鎖及び非コード鎖）により、二本鎖 DNA 分子を速やかに形成する。いくつかの実施形態では、ベクターは、異種核酸をコードする第 1 の核酸配列と、核酸の相補体をコードする第 2 の核酸配列とを含み、第 1 の核酸配列は、その長さの大部分又は全てに沿って第 2 の核酸配列と鎖内塩基対を形成することができる。

20

【0120】

いくつかの実施形態では、RNAi をコードする第 1 の異種核酸配列と、RNAi の相補体をコードする第 2 の異種核酸配列とが、変異 ITR（例えば、右側の ITR）によって連結されている。いくつかの実施形態では、ITR は、ポリヌクレオチド配列

30

【化 1】

5'-

CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCC
GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA

-3 (配列番号 27)

を含む。変異 ITR は、末端分解配列を含む D 領域の欠失を含む。その結果、AAV ウイルスゲノムを複製する際に、rep タンパク質によって変異 ITR でウイルスゲノムが切断されず、従って、5' から 3' の順に、以下を含む組換えウイルスゲノムがウイルスカプシドにパッケージングされる：AAV ITR、調節配列を含む第 1 の異種ポリヌクレオチド配列、変異 AAV ITR、第 1 の異種ポリヌクレオチドに対して逆位方向の第 2 の異種ポリヌクレオチド及び第 3 の AAV ITR。

40

【0121】

rAAV 粒子及び rAAV 粒子を産生する方法

本発明は、本明細書に開示されるような RNAi を含む rAAV 粒子を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、DM1 を処置するために、組換えウイルス粒子を使用して RNAi を送達する方法を提供する。いくつかの実施形態では、rAAV 粒子は、1 つ又は 2 つの ITR に隣接する本開示の RNAi をコードする配列を含む。核酸は、AAV

50

粒子中にカプシド形成される。AAV粒子は、カプシドタンパク質も含む。いくつかの実施形態では、核酸は、目的のコード配列（例えば、本開示のRNAiをコードする核酸）が転写方向に作動的に連結された成分である、転写開始配列及び終結配列を含む制御配列を含み、それにより発現カセットを形成する。発現カセットは、5'末端及び3'末端で少なくとも1つの機能的なAAV ITR配列に隣接している。「機能的なAAV ITR配列」とは、ITR配列が、AAVビリオンのレスキュー、複製及びパッケージングを意図するように機能することを意味する。それら全てがその全体で参照により本明細書に組み込まれる、Davidson et al., PNAS, 2000, 97(7)3428-32; Passini et al., J. Virol., 2003, 77(12): 7034-40; 及びPechan et al., Gene Ther., 2009, 16: 10-16を参照されたい。本発明のいくつかの態様を実践するために、組換えベクターは、カプシド形成に必須となるAAVの配列及びrAAVに感染するための物理的構造の少なくとも全てを含む。本発明のベクターに使用されるAAV ITRは、野生型ヌクレオチド配列（例えば、Kotkin, Hum. Gene Ther., 1994, 5: 793-801に記載されるような）を有する必要がなく、ヌクレオチドの挿入、欠失若しくは置換によって改変され得るか、又はAAV ITRは、いくつかのAAV血清型のいずれかに由来し得る。現在では40を超えるAAVの血清型が知られており、新しい血清型及び既存の血清型のバリエーションが次々に同定されている。Gao et al., PNAS, 2002, 99(18): 11854-6; Gao et al., PNAS, 2003, 100(10): 6081-6; 及びBossis et al., J. Virol., 2003, 77(12): 6799-810を参照されたい。あらゆるAAV血清型の使用が本発明の範囲内であると見なされる。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、AAV血清型に由来するベクターであり、例えば限定されるものではないが、AAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVrh74、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV又はマウスAAVカプシド血清型のITRなどである。いくつかの実施形態では、AAV中の核酸は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV又はマウスAAVカプシド血清型のITRなどのITRを含む。いくつかの実施形態では、AAV中の核酸は更に、本明細書に記載されるようなRNAiをコードする。例えば、AAV中の核酸は、本明細書で想定されるあらゆるAAV血清型の少なくとも1つのITRを含むことができ、更に、ガイド領域を含む1つの鎖と非ガイド領域を含む別の鎖とを含むRNAiをコードすることができる。一実施形態では、AAV中の核酸は、あらゆるAAV血清型の少なくとも1つのITRを含むことができ、更に、配列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'（配列番号1）又は配列番号1と80%、85%、90%若しくは95%の同一性を有する配列を含む第1の核酸を含む第1の鎖と、配列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'（配列番号2）又は配列番号2と80%、85%、90%若しくは95%の同一性を有する配列を含む第2の核酸を含む第2の鎖とを含むRNAiをコードすることができる。

【0122】

いくつかの実施形態では、AAV中の核酸は、5'から3'に、以下をコードする核酸を含む：ITR（例えば、AAV2 ITR）、プロモーター、本明細書に開示されるようなRNAiをコードする核酸、ポリアデニル化シグナル及びAAV ITR（例えば、AAV2 ITR）。いくつかの実施形態では、AAV中の核酸は、5'から3'に、以下をコードする核酸を含む：ITR（例えば、AAV2 ITR）、プロモーター、配列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'（配列番号1）又は配列番号1と80%、85%、90%若しくは95%の同一性を有する配列を含む第1の核酸を含む第1の鎖と、配列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'（配列番号2）又は

10

20

30

40

50

配列番号 2 と 80%、85%、90% 若しくは 95% の同一性を有する配列を含む第 2 の核酸を含む第 2 の鎖とを含む RNA i をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル及び A A V I T R (例えば、A A V 2 I T R)。いくつかの実施形態では、A A V 中の核酸は、5' から 3' に、以下をコードする核酸を含む：I T R (例えば、A A V 2 I T R)、デスミンプロモーター、本明細書に開示されるような RNA i をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル (例えば、ウシ成長ホルモンのポリ A) 及び A A V I T R (例えば、A A V 2 I T R)。いくつかの実施形態では、A A V 中の核酸は、5' から 3' に、以下をコードする核酸を含む：I T R (例えば、A A V 2 I T R)、デスミンプロモーター、イントロン (例えば、キメライントロン)、配列 5' - A G U C G A A G A C A G U U C U A G G G U - 3' (配列番号 1) 又は配列番号 1 と 80%、85%、90% 若しくは 95% の同一性を有する配列を含む第 1 の核酸を含む第 1 の鎖と、配列 5' - A C C C U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 2) 又は配列番号 2 と 80%、85%、90% 若しくは 95% の同一性を有する配列を含む第 2 の核酸を含む第 2 の鎖とを含む RNA i をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル (例えば、ウシ成長ホルモンのポリ A) 及び A A V I T R (例えば、A A V 2 I T R) の全て又はその機能的部分。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖と第 2 の鎖が、二重鎖を形成する。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、リンカーによって第 2 の鎖に連結されている。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号 3 の核酸配列又は配列番号 3 と 80%、85%、90% 若しくは 95% の同一性を有する配列を含む。

10

20

【0123】

いくつかの実施形態では、A A V 中の核酸は、5' から 3' に、以下をコードする核酸を含む：I T R (例えば、A A V 2 I T R)、スタッファー配列 (例えば、ヒト α -1-アンチトリプシン (A A T) スタッファー配列の全て又は一部)、デスミンプロモーター、イントロンの 5' アーム (例えば、ウサギ β グロビンイントロン)、配列 5' - A G U C G A A G A C A G U U C U A G G G U - 3' (配列番号 1) 又は配列番号 1 と 80%、85%、90% 若しくは 95% の同一性を有する配列を含む第 1 の核酸を含む第 1 の鎖と、配列 5' - A C C C U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 2) 又は配列番号 2 と 80%、85%、90% 若しくは 95% の同一性を有する配列を含む第 2 の核酸を含む第 2 の鎖とを含む RNA i をコードする核酸、イントロンの 3' アーム (例えば、ウサギ β グロビンイントロン)、ポリアデニル化シグナル (例えば、ウシ成長ホルモンのポリ A)、スタッファー配列 (例えば、ヒト α -1-アンチトリプシン (A A T) スタッファー配列の全て又は一部) 及び A A V I T R (例えば、A A V 2 I T R) の全て又はその機能的部分。

30

【0124】

いくつかの実施形態では、A A V 中の核酸は、5' から 3' に、以下をコードする核酸を含む：I T R (例えば、A A V 2 I T R)、デスミンプロモーター、配列 5' - A C C C U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 2) 又は配列番号 2 と 80%、85%、90% 若しくは 95% の同一性を有する配列を含む第 1 の核酸を含む第 1 の鎖と、配列 5' - A C C C U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 1) 又は配列番号 1 と 80%、85%、90% 若しくは 95% の同一性を有する配列を含む第 2 の核酸を含む第 2 の鎖とを含む RNA i をコードする核酸、ポリアデニル化シグナル (例えば、ウシ成長ホルモンのポリ A) 及び A A V I T R (例えば、A A V 2 I T R)。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖及び第 2 の鎖が、二重鎖を形成する。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、リンカーによって第 2 の鎖に連結されている。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号 6 の核酸配列を含む。

40

【0125】

いくつかの実施形態では、A A V 中の核酸は、5' から 3' に、以下をコードする核酸を含む：I T R (例えば、A A V 2 I T R)、スタッファー配列 (例えば、ヒト α -1-アンチトリプシン (A A T) スタッファー配列の全て又は一部)、デスミンプロモーター、イントロンの 5' アーム (例えば、ウサギ β グロビンイントロン)、配列 5' - A C C C

50

U A G A U G U C U U C G A U U - 3' (配列番号 2) を含む第 1 の核酸を含む第 1 の鎖と、配列 5' - A G U C G A A G A C A G U U C U A G G G U - 3' (配列番号 1) を含む第 2 の核酸を含む第 2 の鎖とを含む RNA i をコードする核酸、イントロンの 3' アーム (例えば、ウサギ β グロビンイントロン)、ポリアデニル化シグナル (例えば、ウシ成長ホルモンのポリ A)、スタッパー配列 (例えば、ヒト α -1-アンチトリプシン (A A T) スタッパー配列の全て又は一部) 及び A A V I T R (例えば、A A V 2 I T R) の全て又はその機能的部分。

【0126】

いくつかの実施形態では、ベクターは、(1つ以上の) スタッパー核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、スタッパー核酸は、レポーターポリペプチドをコードする配列を含み得る。当業者によって理解されるように、スタッパー核酸は、ベクター内の様々な領域に位置し得、ベクター内の連続した配列 (例えば、単一位置における単一のスタッパー核酸) 又は複数の配列 (例えば、2つ以上の位置 (例えば、2つの位置、3つの位置など) における2つ以上のスタッパー核酸) から構成され得る。いくつかの実施形態では、スタッパー核酸は、RNA i 配列の下流に位置し得る。実施形態では、スタッパー核酸は、RNA i 配列の上流 (例えば、プロモーターと RNA i をコードする核酸との間) に位置し得る。同様に当業者に理解されるように、様々な核酸がスタッパー核酸として使用され得る。いくつかの実施形態では、スタッパー核酸は、ヒト α -1-アンチトリプシン (A A T) スタッパー配列又は C 1 6 P 1、1 6 番染色体 P 1 クローン (ヒト C 1 6) スタッパー配列の全て又は一部を含む。いくつかの実施形態では、スタッパー配列は、遺伝子の全て又は一部を含む。例えば、スタッパー配列は、ヒト A A T 配列の一部を含む。当業者であれば、遺伝子の異なる部分 (例えば、ヒト A A T 配列) を スタッパー断片として使用することができることを認識するであろう。例えば、スタッパー断片は、遺伝子の 5' 末端、遺伝子の 3' 末端、遺伝子の中央、遺伝子の非コード部分 (例えば、イントロン)、遺伝子のコード領域 (例えば、エキソン) 又は遺伝子の非コード部分とコード部分との混合物に由来するものであり得る。当業者であれば、スタッパー配列の全て又は一部を スタッパー断片として使用できることも認識するであろう。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号 1 8 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 8 のヌクレオチド配列と約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % 超の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 5' スタッパー配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号 1 9 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 9 のヌクレオチド配列と約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % 超の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 3' スタッパー配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号 1 8 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 8 のヌクレオチド配列と約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % 超の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 5' スタッパー配列を含み、配列番号 1 9 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 9 のヌクレオチド配列と約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % 超の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 3' スタッパー配列を含む。

【0127】

更なる実施形態では、r A A V 粒子は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V r h . 8、A A V r h 8 R、A A V r h . 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V r h 7 4、A A V r h 7 4 N 5 0 2 I、A A V r h 7 4 W 5 0 5 R のカプシドタンパク質又はこれらのカプシドタンパク質の変異体を含む。いくつかの実施形態では、変異カプシドタンパク質は、A A V カプシドを形成する能力を維持している。いくつかの実施形態では、r A A V 粒子は、A A V 5 チロシン変異カプシド (Z h o n g L . e t a l . , (2008) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 105 (22) : 7827-7832) を含む。更なる実施形態では、r A A V 粒子は、クレード A ~ F 由来の A A V 血清型のカプシドタンパク質 (G a o , e t a l . , J . V i r o l . 2004, 78 (12) : 6381) を含む。

【0128】

特定の標的細胞の形質導入を最適化するか、又は特定の標的組織（例えば、患部組織）内の特定の細胞型を標的化するために、異なるAAV血清型が使用される。rAAV粒子は、同一の血清型又は混合血清型のウイルスタンパク質及びウイルス核酸を含むことができる。例えば、いくつかの実施形態では、rAAV粒子は、AAV1カプシドタンパク質と少なくとも1つのAAV2 ITRを含むことができるか、又はAAV2カプシドタンパク質と少なくとも1つのAAV1 ITRを含むことができる。rAAV粒子を産生するためのAAV血清型の任意の組み合わせは、各々の組み合わせが本明細書に明示的に明記されているかのように本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、本発明は、少なくとも1つのAAV2 ITRに隣接したAAV1カプシドと本開示のrAAVベクターを含むrAAV粒子（例えば、本開示のRNAiをコードする核酸を含む発現カセット）を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、AAV2カプシドを含むrAAV粒子を提供する。

10

【0129】

いくつかの態様では、本発明は、組換え自己相補的ゲノムを含むウイルス粒子を提供する。自己相補的ゲノムを含むrAAV粒子及び自己相補的AAVゲノムの使用方法は、米国特許第6,596,535号明細書；同第7,125,717号明細書；同第7,465,583号明細書；同第7,785,888号明細書；同第7,790,154号明細書；同第7,846,729号明細書；同第8,093,054号明細書；及び同第8,361,457号明細書；並びにWang Z., et al., (2003) Gene Ther 10:2105-2111に記載されており、それらの各々がその全体で本明細書に参照として組み込まれる。自己相補的ゲノムを含むrAAVは、その部分的に相補的な配列（例えば、導入遺伝子の相補的なコード鎖及び非コード鎖）により、二本鎖DNA分子を速やかに形成する。いくつかの実施形態では、本発明は、AAVゲノムを含むrAAV粒子を提供し、rAAVゲノムは、第1の異種ポリヌクレオチド配列（例えば、本開示のRNAi）と第2の異種ポリヌクレオチド配列（例えば、本開示のRNAiのアンチセンス鎖）とを含み、第1の異種ポリヌクレオチド配列は、その長さの大部分又は完全に沿って第2のポリヌクレオチド配列と鎖内塩基対を形成することができる。いくつかの実施形態では、第1の異種ポリヌクレオチド配列と第2の異種ポリヌクレオチド配列は、鎖内塩基対合を容易にする配列、例えばヘアピンDNA構造によって連結されている。ヘアピン構造は、例えば、miRNA分子又はsiRNA分子の技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、第1の異種ポリヌクレオチド配列と第2の異種ポリヌクレオチド配列は、変異ITR（例えば、右側のITR）によって連結されている。いくつかの実施形態では、ITRは、ポリヌクレオチド配列

20

30

【化2】

5'-

CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC
GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA
-3 (配列番号27)

40

を含む。変異ITRは、末端分解配列を含むD領域の欠失を含む。その結果、AAVウイルスゲノムを複製する際に、repタンパク質によって変異ITRでウイルスゲノムが切断されず、従って、5'から3'の順に、以下を含む組換えウイルスゲノムがウイルスカプシドにパッケージングされる：AAV ITR、調節配列を含む第1の異種ポリヌクレオチド配列、変異AAV ITR、第1の異種ポリヌクレオチドに対して逆位方向の第2の異種ポリヌクレオチド及び第3のAAV ITR。いくつかの実施形態では、本発明は、機能的なAAV2 ITR、本開示のRNAiをコードする第1のポリヌクレオチド配列、D領域の欠失を含み、且つ機能的な末端分解配列を欠く変異AAV2 ITR、本開示のRNAiをコードする配列に対する相補配列を含む第2のポリヌクレオチド配列、第1のポリヌクレオチド配列及び機能的なAAV2 ITRを含む組換えウイルスゲノムを含

50

む A A V ウイルス粒子を提供する。

【0130】

r A A V 粒子は、当技術分野で公知の方法を使用して産生することができる。例えば、米国特許 6, 566, 118 号明細書；同第 6, 989, 264 号明細書；及び同第 6, 995, 006 号明細書を参照されたい。本発明の実践では、r A A V 粒子を産生するための宿主細胞としては、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物及び酵母が挙げられる。宿主細胞は、A A V ベクターゲノムが安定して維持されている宿主細胞又はプロデューサー細胞内で A A V の r e p 遺伝子及び c a p 遺伝子が安定して維持されているパッケージング細胞でもあり得る。例示的なパッケージング細胞及びプロデューサー細胞は、293 細胞、A549 細胞又は HeLa 細胞に由来するものである。A A V ベクターは、当技術分野で公知の標準的な技術を使用して精製及び配合される。

10

【0131】

r A A V ベクターを産生するための当技術分野で公知の方法としては、トランスフェクション、安定発現株の産生並びにアデノウイルス－A A V ハイブリッド、ヘルペスウイルス－A A V ハイブリッド (Conway, J E et al., (1997) J. Virology 71 (11): 8780-8789) 及びバキュロウイルス－A A V ハイブリッドを含む感染性ハイブリッドウイルス産生系が挙げられるが、これらに限定されない。r A A V ウイルス粒子を産生するための r A A V 産生培養は全て、1) 例えば、HeLa 細胞、A549 細胞若しくは 293 細胞などのヒト由来細胞株又はバキュロウイルス産生系の場合には SF-9 などの昆虫由来細胞株を含む好適な宿主細胞；2) 野生型若しくは変異型アデノウイルス (温度感受性アデノウイルスなど)、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス又はヘルパー機能を提供するプラスミド構築物によって提供された、好適なヘルパーウイルス機能；3) A A V の r e p 遺伝子と c a p 遺伝子及び遺伝子産物；4) 少なくとも 1 つの A A V I T R 配列に隣接する核酸 (治療用核酸など)；並びに 5) r A A V 産生を補助するための適切な培地及び培地成分を必要とする。いくつかの実施形態では、A A V の r e p 遺伝子産物と c a p 遺伝子産物は、任意の A A V 血清型に由来し得る。一般に、必ずというわけではないが、r e p 遺伝子産物が r A A V ゲノムを複製及びパッケージングするように機能することができるのであれば、A A V の r e p 遺伝子産物は r A A V ベクターゲノムの I T R と同一の血清型である。r A A V ベクターを産生するために、当技術分野で公知の好適な培地を使用することができる。これらの培地には、限定されるものではないが、改変イーグル培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、米国特許第 6, 566, 118 号明細書に記載されているようなカスタム配合物及び米国特許第 6, 723, 551 号明細書に記載されているような SF-900 I I S F M 培地を含む Hyclone Laboratories 及び JRH によって製造された培地が挙げられ、これらの各々は、特に組換え A A V ベクターを産生するために使用されるカスタム培地配合物に関して、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、A A V のヘルパー機能は、アデノウイルス又は HSV によって提供される。いくつかの実施形態では、A A V のヘルパー機能はバキュロウイルスによって提供され、宿主細胞は昆虫細胞 (例えば、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) (SF9) 細胞) である。

20

30

40

【0132】

いくつかの実施形態では、r A A V 粒子は、トリプルトランスフェクション方法、例えば以下に提供される例示的なトリプルトランスフェクション法によって産生され得る。簡単に説明すると、r e p 遺伝子とカプシド遺伝子とを含むプラスミドが、ヘルパーであるアデノウイルスプラスミドと共に (例えば、リン酸カルシウム法を使用して) 細胞株 (例えば、HEK-293 細胞) にトランスフェクトされ得、ウイルスを回収し、任意選択により精製され得る。そのため、いくつかの実施形態では、r A A V ベクターをコードする核酸と、A A V の r e p 及び c a p をコードする核酸と、A A V のヘルパーウイルス機能をコードする核酸とを、宿主細胞にトリプルトランスフェクションすることによって r A A V 粒子が産生され、核酸を宿主細胞にトランスフェクションすることによって r A A V

50

粒子を産生することが可能な宿主細胞が生成される。

【0133】

いくつかの実施形態では、rAAV粒子は、プロデューサー細胞株法、例えば以下に提供される例示的なプロデューサー細胞株法によって産生することができる(Martinet al., (2013) Human Gene Therapy Methods 24:253-269で言及されるものも参照されたい)。簡単に説明すると、細胞株(例えば、HeLa細胞株)が、rep遺伝子、カプシド遺伝子及びプロモーター-異種核酸配列を含有するプラスミドで安定にトランスフェクトされ得る。細胞株をスクリーニングしてrAAVを産生するためのリードクローンを選択し得、次いでこれを産生バイオリクターに展開し、rAAVの産生を開始するためのヘルパーとしてのアデノウイルス(例えば、野生型アデノウイルス)に感染させ得る。続いて、ウイルスを採取し、アデノウイルスを(例えば、熱によって)不活性化及び/又は除去し、rAAV粒子を精製し得る。そのため、いくつかの実施形態では、rAAVベクターをコードする核酸と、AAVのrep及びcapをコードする核酸と、AAVのヘルパーウイルス機能をコードする核酸との1つ以上を含むプロデューサー細胞株によってrAAV粒子が産生される。

10

【0134】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるような任意のrAAV粒子を産生する方法が提供され、(a) rAAV粒子が産生される条件下で宿主細胞を培養することであって、宿主細胞は、(i) 1つ以上のAAVパッケージング遺伝子であって、各々の前記AAVパッケージング遺伝子がAAV複製物及び/又はカプシド形成タンパク質をコードする、AAVパッケージング遺伝子；(ii) 少なくとも1つのAAV ITRに隣接する本明細書に記載されるような本開示のRNAiをコードする核酸を含むrAAVプロベクター；並びに(iii) AAVのヘルパー機能を含むことと；(b) 宿主細胞によって産生されるrAAV粒子を回収することを含む。いくつかの実施形態では、RNAiは、配列番号7のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、前記少なくとも1つのAAV ITRは、AAV ITRからなる群から選択され、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV又はマウスAAVカプシド血清型のITRなどである。いくつかの実施形態では、前記カプシド形成タンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6(例えば、野生型AAV6カプシド又は米国特許出願公開第2012/0164106号明細書に記載されるようなShH10などのバリエーションAAV6カプシド)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9(例えば、野生型AAV9カプシド又は米国特許出願公開第2013/0323226号明細書に記載されるような改変AAV9カプシド)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74(例えば、野生型AAVrh74カプシド又はその全体が参考として組み込まれる国際公開第2019178412号パンフレットに記載されているようなAAVrh74 N502I若しくはAAVrh74 W505RなどのバリエーションAAVrh74カプシド)、チロシンカプシド変異体、ヘパリン結合カプシド変異体、AAV2R471Aカプシド、AAVAAV2/2-7m8カプシド、AAVDJカプシド(例えば、AAVDJ/8カプシド、AAVDJ/9カプシド又は米国特許出願公開第2012/0066783号明細書に記載されている任意の他のカプシド)、AAV2 N587Aカプシド、AAV2 E548Aカプシド、AAV2 N708Aカプシド、AAV V708Kカプシド、ヤギAAVカプシド、AAV1/AAV2キメラカプシド、ウシAAVカプシド、マウスAAVカプシド、rAAV2/HBoV1カプシド又は米国特許第8,283,151号明細書若しくは国際公開第2003/042397号パンフレットに記載されているAAVカプシドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、変異カプシドタンパク質は、AAVカプシドを形成する能力を維持している。いくつかの実施形態では、カプシド形成タンパク質は、AAV5チロシ

20

30

40

50

ン変異カプシドタンパク質である。更なる実施形態では、r A A V 粒子は、クレード A ~ F 由来の A A V 血清型のカプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、r A A V 粒子は、A A V r h 7 4 N 5 0 2 I カプシドと、A A V 2 I T R を含む組換えゲノムと、本開示の R N A i をコードする核酸とを含む。いくつかの実施形態では、r A A V 粒子は、A A V r h 7 4 W 5 0 5 R カプシドと、A A V 2 I T R を含む組換えゲノムと、本開示の R N A i をコードする核酸とを含む。更なる実施形態では、r A A V 粒子が精製される。本明細書で使用する場合、「精製された」という用語は、r A A V 粒子が天然に存在するか又は最初にそれから調製される場合にも存在する可能性のある他の成分の少なくとも一部を欠く、r A A V 粒子の調製を含む。従って、例えば、単離された r A A V 粒子は、培養溶解物又は産生培養上清などのソース混合物から r A A V 粒子を濃縮するために、精製技術を使用して調製され得る。濃縮は、様々な方法において、例えば溶液中に存在する D N アーゼ耐性粒子 (D R P) 若しくはゲノムコピー (g c) の割合若しくは感染力などによって測定することができるか、又は産生培養夾雑物を含む夾雑物若しくはヘルパーウイルス、培地成分などを含むプロセス中の夾雑物などのソース混合物中に存在する第 2 の潜在的な干渉物質との相関から測定することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

本開示の R N A i をコードする導入遺伝子を含む r A A V 粒子と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も本明細書で提供される。医薬組成物は、本明細書に記載されるいずれかの投与方法に好適なものであり得る。本開示の R N A i をコードする核酸を含む r A A V 粒子の医薬組成物は、全身的に導入することができる。例えば、本開示の R N A i をコードする核酸を含む組換えウイルス粒子は、静脈内、動脈内、皮下又は腹腔内投与することができる。

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される本開示の R N A i をコードする導入遺伝子を含む組換えウイルス粒子と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物は、ヒトに投与するのに好適である。そのような担体は、当技術分野でよく知られている (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 and 1570-1580 を参照されたい)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される r A A V と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物は、哺乳動物に全身注射するのに好適である。

【 0 1 3 7 】

そのような薬学的に許容される担体は、滅菌液、例えば水及び油、例えば石油、動物、植物又は合成由来のもの、例えばピーナツ油、大豆油、鉱油などであり得る。生理食塩水及び水性デキストロース、ポリエチレングリコール (P E G) 及びグリセロール溶液も特に注射溶液のための液体担体として使用され得る。医薬組成物は、追加の成分、例えば保存剤、緩衝剤、等張化剤、抗酸化剤及び安定剤、非イオン性湿潤剤又は清澄化剤、増粘剤などを更に含み得る。本明細書に記載される医薬組成物は、単回単位用量又は複数剤形で包装することができる。組成物は、一般に、滅菌溶液及び実質的に等張溶液として配合される。

【 0 1 3 8 】

製造品及びキット

本明細書に記載される方法に使用されるキット又は製造品も提供される。態様では、キットは、好適な包装での本明細書に記載される組成物 (例えば、本開示の R N A i をコードする核酸を含む本開示の r A A V 粒子) を含む。本明細書に記載される組成物に好適な包装は、当技術分野で公知であり、例えばバイアル (密封バイアルなど)、容器、アンブル、ボトル、ジャー、フレキシブル包装 (例えば、密封マイラー袋又はビニール袋) などが挙げられる。これらの製造品は、更に滅菌及び／又は密封され得る。

【 0 1 3 9 】

本発明は、本明細書に記載される組成物を含むキットも提供し、本明細書に記載される使用などの組成物を使用する方法に関する指示所を更に含み得る。本明細書に記載される

キットは、商業的観点及び使用者の観点から望ましい他の材料、例えば他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び本明細書に記載される任意の方法を実行するための指示書を含む添付文書を更に含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、キットは、哺乳動物に rAAV 粒子の有効量を送達するための本開示の RNAi をコードする導入遺伝子を含む組換えウイルス粒子の組成物と、哺乳動物に注射するのに好適な薬学的に許容される担体と、以下の 1 つ以上：緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び哺乳動物に注射を行うための指示書を含む添付書類とを含む。いくつかの実施形態では、rAAV 粒子によって DM-1 を処置するための指示書を含むキットが本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法のいずれか 1 つに従って rAAV 粒子を使用するための指示書を含むキットが本明細書に記載される。

10

【0140】

例示的な実施形態

本発明は、以下に列挙された例示的な実施形態を含む。

【0141】

1. 第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む RNAi であって、a) 第 1 の鎖及び第 2 の鎖は、二重鎖を形成し、b) 第 1 の鎖は、ガイド領域を含み、ガイド領域は、配列 5' - AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU - 3' (配列番号 1) 又は配列番号 1 の配列と約 90% の同一性を有する配列を有する核酸を含み、及び c) 第 2 の鎖は、非ガイド領域を含む、RNAi。

【0142】

2. 非ガイド領域は、配列 5' ACCCUAGAUGUCUUCGAUU - 3' (配列番号 2) 又は配列番号 2 の配列と約 90% の同一性を有する配列を有する核酸を含む、実施形態 1 に記載の RNAi。

20

【0143】

3. 第 1 の鎖は、配列番号 1 の配列を有する核酸を含み、及び非ガイド領域は、配列番号 2 の配列を有する核酸を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の RNAi。

【0144】

4. 第 1 の鎖及び第 2 の鎖は、ループ構造を形成することができる RNA リンカーによって連結されている、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の RNAi。

【0145】

5. RNA リンカーは、約 4 ~ 約 50 個のヌクレオチドを含む、実施形態 4 に記載の RNAi。

【0146】

6. ループ構造は、約 4 ~ 約 20 個のヌクレオチドを含む、実施形態 4 又は 5 に記載の RNAi。

【0147】

7. ループ構造は、配列番号 3 の配列又は配列番号 3 の配列と約 90% の同一性を有する配列を有する核酸を含む、実施形態 4 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の RNAi。

【0148】

8. 5' から 3' に、第 2 の鎖、RNA リンカー及び第 1 の鎖を含む、実施形態 4 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の RNAi。

【0149】

9. 5' から 3' に、第 1 の鎖、RNA リンカー及び第 2 の鎖を含む、実施形態 4 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の RNAi。

【0150】

10. 配列番号 7 の配列又は配列番号 7 の配列と約 90% の同一性を有する配列を有する核酸を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の RNAi。

【0151】

11. 低分子阻害性 RNA (siRNA)、マイクロ RNA (miRNA) 又は低分子ヘアピン RNA (shRNA) である、実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の RNA

50

i。

【0152】

12. 足場を更に含む、実施形態1～11のいずれか1つに記載のRNAi。

【0153】

13. 足場は、配列番号11の核酸の全て又は一部を含む、実施形態12に記載のRNAi。

【0154】

14. miRNAは、足場内に埋め込まれている、実施形態13に記載のRNAi。

【0155】

15. 足場は、RNAiをコードする核酸の5'側に位置する5'アームと、RNAiをコードする核酸の3'側に位置する3'アームとを有する、実施形態14に記載のRNAi。

【0156】

16. 足場は、miR-155足場である、実施形態12～15のいずれか1つに記載のRNAi。

【0157】

17. miR-155足場は、RNAiの5'側に位置する、配列番号9又は配列番号9の配列と約90%の同一性を有する配列の核酸を含む、実施形態12～16のいずれか1つに記載のRNAi。

【0158】

18. miR-155足場は、RNAiの3'側に位置する、配列番号10又は配列番号10の配列と約90%の同一性を有する配列の核酸を含む、実施形態12～17のいずれか1つに記載のRNAi。

【0159】

19. 筋強直性ジストロフィー-1(DM1)に関連するポリペプチドをコードするRNAを標的化する、実施形態1～18のいずれか1つに記載のRNAi。

【0160】

20. ポリペプチドは、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ(DMPK)である、実施形態19に記載のRNAi。

【0161】

21. DMPKは、DM1に関連する変異を含む、実施形態20に記載のRNAi。

【0162】

22. DMPKをコードする遺伝子は、5つ以上のCTGトリヌクレオチドリピートを含む、実施形態20又は21に記載のRNAi。

【0163】

23. 実施形態1～22のいずれか1つに記載のRNAiをコードする核酸を含む発現カセット。

【0164】

24. RNAiをコードする核酸は、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態23に記載の発現カセット。

【0165】

25. プロモーターは、筋特異的プロモーターである、実施形態24に記載の発現カセット。

【0166】

26. プロモーターは、デスミンプロモーター又はそのバリエーションである、実施形態24又は25に記載の発現カセット。

【0167】

27. デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の1つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、実施形態26に記載の発現カセット。

【0168】

20

30

40

50

28. デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の2つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、実施形態26又は27に記載の発現カセット。

【0169】

29. デスミンプロモーターは、1つ以上のByrneエンハンサーエレメント及び／又は1つ以上のPaulinエンハンサーエレメントを含む、実施形態26～28のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0170】

30. デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列若しくは配列番号21の配列と約90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号22のヌクレオチド配列若しくは配列番号22の配列と約90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む、実施形態26～29のいずれか1つに記載の発現カセット。

10

【0171】

31. デスミンプロモーターは、配列番号12のヌクレオチド配列又は配列番号12のヌクレオチド配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態26～30のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0172】

32. イントロンを更に含む、実施形態23～31のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0173】

33. イントロンは、ウサギβグロビンイントロンである、実施形態32に記載の発現カセット。

20

【0174】

34. イントロンは、配列番号13のヌクレオチド配列又は配列番号13の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態32又は33に記載の発現カセット。

【0175】

35. RNAiをコードする核酸は、イントロンに埋め込まれている、実施形態32～34のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0176】

36. イントロンは、5'アームと3'アームとを含み、5'アームは、RNAiをコードする核酸の5'側に位置し、及び3'アームは、RNAiをコードする核酸の3'側に位置する、実施形態35に記載の発現カセット。

30

【0177】

37. イントロンの5'アームは、配列番号14のヌクレオチド配列又は配列番号14の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態36に記載の発現カセット。

【0178】

38. イントロンの3'アームは、配列番号15のヌクレオチド配列又は配列番号15の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態36又は37に記載の発現カセット。

【0179】

39. ポリアデニル化シグナルを更に含む、実施形態23～38のいずれか1つに記載の発現カセット。

40

【0180】

40. ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、SV40ポリアデニル化シグナル又はHSV TK pAである、実施形態39に記載の発現カセット。

【0181】

41. ポリアデニル化シグナルは、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである、実施形態40に記載の発現カセット。

【0182】

50

42. ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルは、配列番号16のヌクレオチド配列又は配列番号16の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態39～41のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0183】

43. 配列番号17のヌクレオチド配列又は配列番号17の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態23～42のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0184】

44. 改変デスミンプロモーターを含む発現カセットであって、改変デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の1つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、発現カセット。

【0185】

45. 改変デスミンプロモーターは、ヒトデスミン遺伝子の2つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、実施形態44に記載の発現カセット。

【0186】

46. 改変デスミンプロモーターは、1つ以上のByrneエンハンサーエレメント及び／又は1つ以上のPaulinエンハンサーエレメントを含む、実施形態44又は45に記載の発現カセット。

【0187】

47. 改変デスミンプロモーターは、配列番号21のヌクレオチド配列若しくは配列番号21の配列と約90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号22のヌクレオチド配列若しくは配列番号22の配列と約90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つ以上のエンハンサーエレメントを含む、実施形態44～46のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0188】

48. デスミンプロモーターは、配列番号12のヌクレオチド配列又は配列番号12のヌクレオチド配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態44～47のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0189】

49. イントロンを更に含む、実施形態44～48のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0190】

50. イントロンは、ウサギβグロビンイントロンである、実施形態49に記載の発現カセット。

【0191】

51. イントロンは、配列番号13のヌクレオチド配列又は配列番号13の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態49又は50に記載の発現カセット。

【0192】

52. 導入遺伝子をコードする核酸は、イントロンに埋め込まれている、実施形態44～51のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0193】

53. イントロンは、5'アームと3'アームとを含み、5'アームは、導入遺伝子をコードする核酸の5'側に位置し、及び3'アームは、導入遺伝子をコードする核酸の3'側に位置する、実施形態52に記載の発現カセット。

【0194】

54. イントロンの5'アームは、配列番号14のヌクレオチド配列又は配列番号14の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態53に記載の発現カセット。

【0195】

55. イントロンの3'アームは、配列番号15のヌクレオチド配列又は配列番号15の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態53又は54に記載の発現カセット。

10

20

30

40

50

【0196】

56. ポリアデニル化シグナルを更に含む、実施形態44～55のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0197】

57. ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、SV40ポリアデニル化シグナル又はHSV TK pAである、実施形態56に記載の発現カセット。

【0198】

58. ポリアデニル化シグナルは、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである、実施形態57に記載の発現カセット。

10

【0199】

59. ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルは、配列番号16のヌクレオチド配列又は配列番号16の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態56～58のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0200】

60. 導入遺伝子は、ポリペプチド又は核酸をコードする、実施形態44～59のいずれか1つに記載の発現カセット。

【0201】

61. 導入遺伝子は、RNAiをコードする、実施形態44～60のいずれか1つに記載の発現カセット。

20

【0202】

62. 実施形態23～61のいずれか1つに記載の発現カセットを含むベクター。

【0203】

63. 発現カセットは、1つ以上のスタッファー核酸配列に隣接している、実施形態62に記載のベクター。

【0204】

64. 1つ以上のスタッファー核酸配列は、ヒトSerpina1遺伝子に由来する、実施形態63に記載のベクター。

【0205】

65. 発現カセットの5'側に位置するスタッファー核酸配列は、ヒトSerpina1遺伝子に由来する、実施形態63又は64に記載のベクター。

30

【0206】

66. 発現カセットの5'側に位置するスタッファー配列は、配列番号18のヌクレオチド配列又は配列番号18の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態63～65のいずれか1つに記載のベクター。

【0207】

67. 発現カセットの3'側に位置するスタッファー核酸配列は、ヒトSerpina1遺伝子に由来する、実施形態63～66のいずれか1つに記載のベクター。

【0208】

68. 発現カセットの3'側に位置するスタッファー配列は、配列番号19のヌクレオチド配列又は配列番号19の配列と約90%の同一性を有する配列を含む、実施形態63～67のいずれか1つに記載のベクター。

40

【0209】

69. 組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターである、実施形態62～68のいずれか1つに記載のベクター。

【0210】

70. 発現カセットは、1つ以上のAAV逆位末端反復(ITR)配列に隣接している、実施形態69に記載のrAAVベクター。

【0211】

71. 発現カセットは、2つのAAV ITRに隣接している、実施形態70に記載の

50

r A A V ベクター。

【0212】

72. A A V I T R は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、A A V 12、A A V 2 R 4 7 1 A、A A V D J、ヤギ A A V、ウシ A A V 又はマウス A A V 血清型の I T R である、実施形態 70 又は 71 に記載の r A A V ベクター。

【0213】

73. A A V I T R は、A A V 2 I T R である、実施形態 70～72 のいずれか 1 つに記載の r A A V ベクター。

【0214】

74. 配列番号 20 のヌクレオチド配列又は配列番号 20 の配列と約 90% の同一性を有する配列を含む、実施形態 69～73 のいずれか 1 つに記載の r A A V ベクター。

【0215】

75. 自己相補的 r A A V ベクターである、実施形態 69～74 のいずれか 1 つに記載の r A A V ベクター。

【0216】

76. 実施形態 23～61 のいずれか 1 つに記載の発現カセット、実施形態 62～68 のいずれか 1 つに記載のベクター又は実施形態 69～75 のいずれか 1 つに記載の r A A V ベクターを含む細胞。

【0217】

77. 実施形態 62～68 のいずれか 1 つに記載のベクターを含むウイルス粒子。

【0218】

78. 実施形態 69～75 のいずれか 1 つに記載の r A A V ベクターを含む組換え A A V 粒子。

【0219】

79. A A V ウイルス粒子は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、A A V 12、A A V r h 7 4、A A V r h 7 4 N 5 0 2 I、A A V r h 7 4 W 5 0 5 R、A A V 2 R 4 7 1 A、A A V 2 / 2 - 7 m 8、A A V D J、A A V 2 N 5 8 7 A、A A V 2 E 5 4 8 A、A A V 2 N 7 0 8 A、A A V V 7 0 8 K、A A V 2 - H B K O、A A V D J 8、A A V P H P . B、A A V P H P . e B、A A V B R 1、A A V H S C 1 5、A A V H S C 1 7、ヤギ A A V、A A V 1 / A A V 2 キメラ、ウシ A A V 又はマウス A A V カプシド r A A V 2 / H B o V 1 血清型のカプシドを含む、実施形態 78 に記載の r A A V 粒子。

【0220】

80. r A A V ウイルス粒子の I T R 及びカプシドは、同じ A A V 血清型に由来する、実施形態 78 又は 79 に記載の r A A V 粒子。

【0221】

81. r A A V ウイルス粒子の I T R 及びカプシドは、異なる A A V 血清型に由来する、実施形態 78 又は 79 に記載の r A A V 粒子。

【0222】

82. A A V r h 7 4 N 5 0 2 I 血清型のカプシドを含む、実施形態 78、79 又は 81 に記載の r A A V 粒子。

【0223】

83. I T R は、A A V 2 I T R であり、及び r A A V 粒子のカプシドは、A A V r h 7 4 N 5 0 2 I 血清型のカプシドである、実施形態 82 に記載の r A A V 粒子。

【0224】

84. A A V r h 7 4 W 5 0 5 R 血清型のカプシドを含む、実施形態 78、79 又は 81 に記載の r A A V 粒子。

10

20

30

40

50

【0225】

85. ITRは、AAV2 ITRであり、及びrAAV粒子のカプシドは、AAVrh74 W505R血清型のカプシドである、実施形態84に記載のrAAV粒子。

【0226】

86. rAAVベクター及びカプシドを含むrAAV粒子であって、rAAVベクターは、5'から3'に、以下の核酸、AAV2 ITR、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸、Byrneデスミンエンハンサーエレメント、Paulinデスミンエンハンサーエレメント、デスミンプロモーター、ウサギβグロビンイントロンの5'アーム、5'miR155足場配列、DMPK²⁰⁴ miRNAガイド配列、miR155末端ループ配列、DMPK²⁰⁴ miRNAパッセンジャー配列、3'miR155足場配列、ウサギβグロビンイントロンの3'アーム、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸及びAAV2 ITRを含み、カプシドは、AAVrh74 N502 Iカプシドである、rAAV粒子。87. rAAVベクターを含むrAAV粒子であって、rAAVベクターは、5'から3'に、以下の核酸、配列番号43のポリヌクレオチド配列を含むAAV2 ITR、配列番号18のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸、配列番号21のポリヌクレオチド配列を含むByrneデスミンエンハンサーエレメント、配列番号22のポリヌクレオチド配列を含むPaulinデスミンエンハンサーエレメント、配列番号23のポリヌクレオチド配列を含むデスミンプロモーター、配列番号14のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギβグロビンイントロンの5'アーム、配列番号40のポリヌクレオチド配列を含む5'miR155足場配列、配列番号4のポリヌクレオチド配列を含むDMPK²⁰⁴ miRNAガイド配列、配列番号6のポリヌクレオチド配列を含むmiR155末端ループ配列、配列番号5のポリヌクレオチド配列を含むDMPK²⁰⁴ miRNAパッセンジャー配列、配列番号41のポリヌクレオチド配列を含む3'miR155足場配列、配列番号15のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギβグロビンイントロンの3'アーム、配列番号16のポリヌクレオチド配列を含む最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、配列番号19のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸及び配列番号49のポリヌクレオチド配列を含むAAV2 ITRを含み、カプシドは、AAVrh74 N502 Iカプシドである、rAAV粒子。

10

20

30

【0227】

88. AAVrh74 N502 Iカプシドは、配列番号50のアミノ酸配列を含むカプシドタンパク質を含む、実施形態86又は87に記載のrAAV粒子。

【0228】

89. rAAVベクター及びカプシドを含むrAAV粒子であって、rAAVベクターは、5'から3'に、以下の核酸、AAV2 ITR、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸、Byrneデスミンエンハンサーエレメント、Paulinデスミンエンハンサーエレメント、デスミンプロモーター、ウサギβグロビンイントロンの5'アーム、5'miR155足場配列、DMPK²⁰⁴ miRNAガイド配列、miR155末端ループ配列、DMPK²⁰⁴ miRNAパッセンジャー配列、3'miR155足場配列、ウサギβグロビンイントロンの3'アーム、最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸及びAAV2 ITRを含み、カプシドは、AAVrh74 W505Rカプシドである、rAAV粒子。

40

【0229】

90. rAAVベクターを含むrAAV粒子であって、rAAVベクターは、5'から3'に、以下の核酸、配列番号43のポリヌクレオチド配列を含むAAV2 ITR、配列番号18のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト*serpinA1*遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸、配列番号21のポリヌクレオチド配列を含むByrne

50

デスミンエンハンサーエレメント、配列番号 22 のポリヌクレオチド配列を含む P a u l i n デスミンエンハンサーエレメント、配列番号 23 のポリヌクレオチド配列を含むデスミンプロモーター、配列番号 14 のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギβグロビンイントロンの 5' アーム、配列番号 40 のポリヌクレオチド配列を含む 5' m i R 155 足場配列、配列番号 4 のポリヌクレオチド配列を含む D M P K²⁰⁴ m i R N A ガイド配列、配列番号 6 のポリヌクレオチド配列を含む m i R 155 末端ループ配列、配列番号 5 のポリヌクレオチド配列を含む D M P K²⁰⁴ m i R N A パッセンジャー配列、配列番号 41 のポリヌクレオチド配列を含む 3' m i R 155 足場配列、配列番号 15 のポリヌクレオチド配列を含む、ウサギβグロビンイントロンの 3' アーム、配列番号 16 のポリヌクレオチド配列を含む最小限のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、配列番号 19 のポリヌクレオチド配列を含む、ヒト s e r p i n A 1 遺伝子由来のスタッファー核酸配列をコードする核酸及び配列番号 49 のポリヌクレオチド配列を含む A A V 2 I T R を含み、カプシドは、A A V r h 74 W 505 R カプシドである、r A A V 粒子。

10

【0230】

91. A A V r h 74 W 505 R カプシドは、配列番号 52 のアミノ酸配列を含むカプシドタンパク質を含む、実施形態 89 又は 90 に記載の r A A V 粒子。

【0231】

92. 実施形態 77 に記載のウイルス粒子又は実施形態 78～91 のいずれか 1 つに記載の r A A V 粒子を含む組成物。

【0232】

93. 実施形態 77 に記載のウイルス粒子又は実施形態 78～91 のいずれか 1 つに記載の r A A V 粒子を含む医薬組成物。

【0233】

94. 薬学的に許容される担体を更に含む、実施形態 92 又は 93 に記載の組成物。

【0234】

95. ヒトデスミン遺伝子の 1 つ以上のエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む改変デスミンプロモーター。

【0235】

96. ヒトデスミン遺伝子の 2 つのエンハンサーエレメントとプロモーターとを含む、実施形態 95 に記載の改変デスミンプロモーター。

【0236】

97. 1 つ以上の B y r n e エンハンサーエレメント及び／又は 1 つ以上の P a u l i n エンハンサーエレメントを含む、実施形態 95 又は 96 に記載の改変デスミンプロモーター。

【0237】

98. 配列番号 21 のヌクレオチド配列若しくは配列番号 21 の配列と約 90 % の同一性を有する配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメント及び／又は配列番号 22 のヌクレオチド配列若しくは配列番号 22 の配列と約 90 % の同一性を有する配列を含む 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含む、実施形態 95～97 のいずれか 1 つに記載の改変デスミンプロモーター。

【0238】

99. 配列番号 12 のヌクレオチド配列又は配列番号 12 の配列と約 90 % の同一性を有する配列を含む、実施形態 95～98 のいずれか 1 つに記載の改変デスミンプロモーター。

【0239】

100. 実施形態 1～22 のいずれか 1 つに記載の R N A i を含むキット。

【0240】

101. 実施形態 77 に記載のウイルス粒子又は実施形態 78～91 のいずれか 1 つに記載の A A V 粒子を含むキット。

【0241】

20

30

40

50

102. 実施形態92～94のいずれか1つに記載の組成物を含むキット。

【0242】

103. 使用説明書を更に含む、実施形態100～102のいずれか1つに記載のキット。

【0243】

104. 筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、実施形態1～22のいずれか1つに記載のRNAiを哺乳動物に投与することを含む方法。

【0244】

105. 筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、実施形態1～22のいずれか1つに記載のRNAiを哺乳動物に投与することを含む方法。

【0245】

106. DMPK RNAの蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、実施形態1～22のいずれか1つに記載のRNAiを哺乳動物に投与することを含む方法。

【0246】

107. 筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、実施形態77に記載のウイルス粒子又は有効量の、実施形態78～91のいずれか1つに記載のrAAV粒子を哺乳動物に投与することを含む方法。

【0247】

108. 筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、実施形態77に記載のウイルス粒子又は有効量の、実施形態78～91のいずれか1つに記載のrAAV粒子を哺乳動物に投与することを含む方法。

【0248】

109. DMPK RNAの蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、実施形態77に記載のウイルス粒子又は有効量の、実施形態78～91のいずれか1つに記載のrAAV粒子を哺乳動物に投与することを含む方法。

【0249】

110. ウイルス粒子又はrAAV粒子の有効量は、約 1×10^8 ～約 2×10^{13} ゲノムコピー／mLの用量である、実施形態102～104のいずれか1つに記載の方法。

【0250】

111. 用量は、約 5×10^{12} ゲノムコピー／mLである、実施形態110に記載の方法。

【0251】

112. 用量は、約 1×10^{13} ゲノムコピー／mLである、実施形態110に記載の方法。

【0252】

113. 用量は、約 2×10^{13} ゲノムコピー／mLである、実施形態110に記載の方法。

【0253】

114. ウイルス粒子又はrAAV粒子の有効量は、約 1×10^8 ～約 2×10^{14} ゲノムコピー／体重kgの用量である、実施形態107～109のいずれか1つに記載の方法。

【0254】

115. 用量は、約 5×10^{13} ゲノムコピー／体重kgである、実施形態114に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0255】

116. 用量は、約 1×10^{14} ゲノムコピー／体重 $k g$ である、実施形態 114 に記載の方法。

【0256】

117. 用量は、約 2×10^{14} ゲノムコピー／体重 $k g$ である、実施形態 114 に記載の方法。

【0257】

118. 筋強直性ジストロフィー-1 (DM1) の処置を、それを必要とする哺乳動物において行う方法であって、有効量の、実施形態 92～94 のいずれか 1 つに記載の組成物を哺乳動物に投与することを含む方法。

10

【0258】

119. 筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) の発現の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物において行う方法であって、有効量の、実施形態 92～94 のいずれか 1 つに記載の組成物を哺乳動物に投与することを含む方法。

【0259】

120. DMPK RNA の蓄積の阻害を、それを必要とする、DM-1 を有する哺乳動物の細胞において行う方法であって、有効量の、実施形態 92～94 のいずれか 1 つに記載の組成物を哺乳動物に投与することを含む方法。

【0260】

121. RNAi は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、免疫抑制剤は、RNAi の投与前、それと同時に及び／又はその後に投与される、実施形態 104～106 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0261】

122. ウイルス粒子又は rAAV 粒子は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、免疫抑制剤は、ウイルス粒子又は rAAV 粒子の投与前、それと同時に及び／又はその後に投与される、実施形態 107～109 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0262】

123. 組成物は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され、免疫抑制剤は、組成物の投与前、それと同時に及び／又はその後に投与される、実施形態 118～120 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【実施例】

【0263】

本発明の例示として提供され、限定することを目的としない以下の実施例を参照することにより、本開示の主題がよりよく理解されるであろう。

【0264】

実施例 1: amiR-DMPK²⁰⁴ 発現カセットの生成

DMPK 遺伝子を標的化するように設計されたマイクロ RNA (amiR-DMPK²⁰⁴) をコードする一本鎖 AAV ウイルスベクターを生成した (図 1A)。構築物は、最適化されたマイクロ RNA の骨格である miR155 (BLOCK-iT; Sermonfisher カタログ番号 K4935-00、K4936-00、K4937-00、K4938-00) に amiR-DMPK²⁰⁴ のマイクロ RNA が埋め込まれるように設計され、これ以降「miR155 amiR-DMPK²⁰⁴」又は「amiR155-DMPK²⁰⁴」である。miR155 amiR-DMPK²⁰⁴ を、ウサギ β グロビンイントロン配列に隣接させ、ハイブリッド筋肉プロモーター (nDes) の制御下に配置した。

40

【0265】

Byrne デスミンエンハンサーと、1 コピーの Paulin デスミンエンハンサー (-973～-693) と、ヒトデスミン遺伝子のプロモーター (-228～+75) を含む nDesmin プロモーターを、従来のオリゴヌクレオチド合成によって合成した (Genscript, USA)。

50

【0266】

ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列を、*amiR-DMPK²⁰⁴*のマイクロRNAに隣接するイントロンの3'側に配置した(*minBGHpA*)。フィラー配列(「スタッファー」)が含まれていた。遺伝子カセット全体は、DNAのレスキュー及び複製のため並びにAAVカプシドにパッケージングするために、野生型AAV血清型2の逆位末端反復(ITR)配列に隣接する。配列をインビボ有効性試験のためのベクターを生成するために使用されるITRプラスミドに入れるように操作した。

【0267】

5'及び3' ITR 配列

ITR配列は、145bpのAAV2の野生型配列であった。3' ITR(発現カセットの下流)は、フリップ配向であった(*GenBank*: LQ493091.1)。5' ITR(発現カセットの上流)は、フロップ方向(145bp)であった(*Miller et al.*, 2004, *Nature Genetics* 36.7(2004); 767-773)。配列の正確性は、サンガー配列決定で確認した。

【0268】

nDesプロモーター

nDesプロモーターを、文献に示されるデスミンプロモーターエレメントを使用して構築した(*Li and Paulin, et al.* 1991, *J Biol Chem.* 266.10; 6562-6570)。nDesプロモーターは、1コピーの*Byrne*デスミンエンハンサーと、1コピーの*Paulin*デスミンエンハンサー(-973~-693)と、ヒトデスミン遺伝子のプロモーター(-228~+75)を含む。

【0269】

ウサギβグロビンイントロンの5'アーム及び3'アーム

*miRNA*のイントロン発現が標的ノックダウンを増強することが知られているため、このイントロンを*amiR-DMPK²⁰⁴*カセットに隣接するようにして使用した。

【0270】

*miR155*足場を含む*amiR-DMPK²⁰⁴*(*miR155-amiRDMPK²⁰⁴*)

内在性の*miRNA*は、多くの一次RNA転写物(*pri-miRNA*)に見られるヘアピン様の二次構造である。核内では、マイクロプロセッサ*Drosha*/*DGCR8*複合体が*pri-miRNA*の基部ステムに結合してこれを切断し、ステムループの前駆体*miRNA*(*pre-miRNA*)を遊離させる。次いで、*pre-miRNA*が核から排出されるが、ここで*Dicer*/*TRBP*によってループが切断され、成熟RNA二重鎖が形成される。標的鎖としても知られるガイド鎖は、パッセンジャー鎖から分離し、RNA誘導サイレンシング複合体(*RISC*)のアルゴノートタンパク質にロードされ、次いで、このアルゴノートタンパク質は、分解又は翻訳抑制のために相補的なmRNA転写物を標的化する。

【0271】

*amiR-DMPK²⁰⁴*配列は、DM1療法の標的として同定されている。*amiR-DMPK²⁰⁴*の標的配列は、*DMPK*ヌクレオチド配列の3'UTR内の「CUG」反復配列の上流に位置する。従って、*amiR-DMPK²⁰⁴*は、野生型と変異型の両方の*DMPK*転写物を抑制することができる。

【0272】

加えて、*amiR-DMPK²⁰⁴*の標的領域は、非ヒト霊長類(NHP-カニクイザル)及びヒトで保存されており、NHPでの*DMPK*ノックダウンの前臨床評価が可能である(図11)。*amiR-DMPK²⁰⁴*のマイクロRNAを評価すると、*miR155*足場がパッセンジャー鎖のプロセッシングを最小限にしながら効率的なガイドプロセッシングを有し、オフターゲット効果の可能性を低減することが示された(下記の実施例2を参照されたい)。

【0273】

開発のために選択された最終構築物は、miR155足場を含むamiR-DMPK²⁰⁴ (amiR155-DMPK²⁰⁴) であり、ガイド鎖は、プロセッシングされると分解のためにDMPK mRNAを標的化する。操作されたpre-miRNA配列構造は、マウスmiR-155配列 (Lagos-Quintana et al., 2002, Current Biology, 12:9, 735-739) をベースにしたものである。miR-155転写物に由来する5'及び3'隣接領域を、できるだけmiR-155構造を保つようにしてベクターに挿入した。ステムループ構造が最適化され、2個のヌクレオチドの内部ループにより、天然のmiR-155分子に見られる5個のヌクレオチド/3個のヌクレオチドの内部ループよりも高いノックダウン率がもたらされた (ソース: BLOCK-iT (商標) Pol II miR RNAi発現ベクター (Invitrogen))。AAVカプシドに関連して、ベクターであるnDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴は、DM1のDMSXLマウスモデルで強力なインビボ活性を有することが示された (下記の実施例3を参照されたい)。

10

【0274】

minBGHポリA

mRNAの転写終結とポリアデニル化ができるように、186bpの最小限のBGHポリA部位をamiR-DMPK²⁰⁴配列の下流に挿入した。

【0275】

A1ATイントロン由来のスタッファ配列

α1-アンチトリプシン遺伝子イントロン配列4由来のスタッファ配列を使用して、遺伝子カセットをrAAVベクターのパッケージング制限まで引き上げた。

20

【0276】

nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴カセットを含むITRプラスミド (nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴) のクローニング

1938bpのITR-ITR配列の発現構築物である、nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-minBGHポリAカセットを設計した。ITRプラスミドへのnDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-minBGHポリAカセットのクローニングを行った。合成されたnDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-minBGHポリAは、ITRプラスミドにクローニングするための5'NcoI部位と3'SphI部位とを含んでいた (図1B)。簡単に説明すると、合成されたnDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-minBGHポリA配列を含有するプラスミドを、NcoIとSphIとで消化し、1.9kBの断片をゲル精製した。ITRプラスミドをNcoIとSphIとで消化し、子牛腸アルカリホスファターゼ (New England Biolabs; カタログ番号M0290) を使用して脱リン酸化し、8.2kBのベクターの骨格断片をゲル精製した。発現カセットを含有する消化された1.9kBの断片と、消化されたITRプラスミドとをライゲーションし、プラスミドITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴を生成した。

30

【0277】

小規模なrAAVベクターの産生

ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴プラスミドのパッケージングを確認するために、HEK293細胞で小規模なパッケージングアッセイを実施した。AAVのrep/capプラスミドを使用して小規模産生を行った。図1Cは、標準的なEGFPプラスミドの遺伝子カセットと比較した場合の、1つのHEK293細胞当たり産生されるベクターの量を示す。

40

【0278】

amiR-DMPK²⁰⁴がDM1表現型を修正する可能性について判断するために、DM1患者由来の骨格筋芽細胞培養物中のヒトDMPK転写物をサイレンシングし、スプライシングの欠陥を修正する能力を検証した。DMPK遺伝子の3'UTRでCTGが伸長することにより、DMPK mRNAのヘアピン構造が不溶性のリボ核内フォーカスとして凝集し、いくつかのRNA結合タンパク質が隔離される。その結果として生じるmu

50

s c l e b l i n d - l i k e 1 (M B N L 1) などの必須のスプライシング因子が再分布することにより、筋組織の分化に關与する下流エフェクターのミススプライシングが引き起こされる。a m i R - D M P K ²⁰⁴ によって D M 1 患者細胞を処置すると、M B N L 1 のエキソン7インクルージョンにより測定した場合、50%を超える D M P K m R N A のサイレンシング及びスプライシング修正が引き起こされた。

【0279】

実施例2：m i R 1 5 5 a m i R - D M P K ²⁰⁴ のプロセシング

a m i R - D M P K ²⁰⁴ を A A V カプシドにパッケージングし、D M P K ノックダウンの有効性、パッセンジャー鎖の活性及びプロセシングパターンをインビボで分析した。n D e s - m i R 1 5 5 - a m i R - D M P K ²⁰⁴ を保持する構築物を A A V にパッケージングした。このベクターを、1,000超の C T G リピートを含むヒト D M P K を発現する D M S X L 成人ヒト化 D M 1 マウスモデルに静脈内注射した。8週間後、動物を安楽死させ、D M P K ノックダウンの有効性を測定するために複数の組織を収集し、パッセンジャー鎖の活性とプロセシングパターンを測定するために心臓組織を選択した。

【0280】

R T - P C R 解析から、複数の筋組織で a m i R - D M P K ²⁰⁴ の強い発現が示され、心臓ではより高い発現が示された(図2B)。a m i R - D M P K ²⁰⁴ の発現と共に、R T P C R 解析から、心臓で強い D M P K の抑制が確認され、異なる骨格筋では平均して70%超及び約30%の D M P K の抑制が確認された(図2C)。心臓組織では、D M P K の発現は、T B P (T A T A 結合タンパク質) 発現と比較して50%未満である。注目すべきことに、T B P と比較して低レベルの D M P K を発現する D S M X L マウス(約50%、図2Cにおいて点線で示される)は、明らかな D M 1 表現型が存在しない。興味深いことに、n D e s m i n プロモーターは、肝臓でより高い形質導入が観察されているものの(図2A)、心臓組織で強い活性を示し、骨格筋で同様のレベルを示した(図2B)。これは、発現が主に D M 1 病変を発症した心筋及び骨格筋に限定されていることを示唆している。

【0281】

a m i R - D M P K ²⁰⁴ のプロセシングを評価するために、低分子トランスクリプトーム分析のための N G S により、成熟 a m i R - D M P K ²⁰⁴ の長さ並びにガイド鎖及びパッセンジャー鎖の配列組成について心臓組織を分析した。

a m i R - D M P K ²⁰⁴ のプロセシングによってパッセンジャー鎖は生成されなかった。a m i R - D M P K ²⁰⁴ がプロセシングされて独占的にマウス心筋細胞中のガイド鎖(99%超)となるが、多くの場合、m i R B a s e データベースから予測されるものよりも長い鎖が生成された(表1)。m i R 1 5 5 のプロセシングにより、ほとんどの場合に長さが22nt~26ntの成熟した長さが生じたが、5'末端で正確にプロセシングされていた(表1)。m i R 1 5 5 a m i R - D M P K ²⁰⁴ に対してマッピングした異なるガイド鎖長(nt)の配列分布をパーセンテージ(リード%)として計算した。予想される a m i R - D M P K ²⁰⁴ のガイド鎖には下線が引かれ、シード配列は太字で示されている。アスタリスクは、a m i R - D M P K ²⁰⁴ のガイド鎖の予測された長さに相当するリードを示す。

【0282】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. パーセンテージ(リード%)として計算された、miR155 amiR-DMPK²⁰⁴ に対してマッピングした異なるガイド鎖の長さ(nt)の配列分布。予想される amiR-DMPK²⁰⁴ のガイド鎖には下線が引かれている。

アスタリスクは、amiR-DMPK²⁰⁴ のガイド鎖の予測された長さに相当するリードを示す。

miR-155 リード配列	長さ	%配列	配列番号
<u>AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGT</u>	23	52	33
<u>AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTT</u>	24	24	34
<u>AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTTT</u>	25	11	35
<u>AGTCGAAGACAGTTCTAGGGT*</u>	22	6	36
<u>AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTTTT</u>	26	3	37
<u>AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTG</u>	22	4	38

10

20

【0283】

全体として、パッセンジャー鎖は、miR155を含むamiR-DMPK²⁰⁴では検出されなかった(ガイド%は99%超である)。従って、miR155のmiRNA足場はRNAiに関して十分に検証されているため、miR155を前臨床試験のリードとして選択した。

【0284】

実施例3：トランスジェニックマウスにおけるmiR155-amiR-DMPK²⁰⁴をコードするAAVの全身注射によるヒトDMPKの用量依存的抑制

最も効果のある用量を決定するために、3つの別個の用量のミオトロピックAAV(国際公開第2019/207132号パンフレット)カプシドの送達について調査した。miR155足場を含むamiR-DMPK²⁰⁴(amiR155-DMPK²⁰⁴)の発現カセットをコードするAAVを、用量漸増試験で評価した。8週齢のDMSXLマウスに、低用量、中間用量及び高用量に相当する、 5.0×10^{11} ベクターゲノム(vg)/kg、 5×10^{12} vg/kg及び 1.0×10^{13} vg/kgを静脈内注射した。マウスを、AAV注入後の8週間の時点の体重、生存率、筋強直及び心機能などの臨床症状について分析した。遺伝子導入の8週間後にマウスを安楽死させ、DMPKの抑制とスプライシングの修正を測定した。miR155-amiR-DMPK²⁰⁴の発現レベルを低分子RNA TaqManによって測定し、mRNA投入レベルをu6核内低分子RNAに正規化した。

30

40

【0285】

amiR155-DMPK²⁰⁴の発現を用量依存的に観察すると(図3A)、複数の組織で総DMPK発現の用量依存的な減少がもたらされた(図3B)。全体として、約10コピー/u6のamiR155-DMPK²⁰⁴は、心臓及び横隔膜のDMPKを50%以上減少させるのに十分であることが観察され、この量は、DM1患者を処置するのに十分な量であり得る。

【0286】

次に、スプライシング異常などの特有のDM1表現型におけるDMPKの抑制結果を調査した。LIMドメイン結合3(Ldb3)転写物にエキソン11のインクルージョンを生じさせるLdb3の異常スプライシングは、CUGリピートRNAによるRNAスプラ

50

イシング機構の隔離から生じるDM1特異的表現型として実証されている (Yamashita et al. 2014. *Neurobiol Dis.* 69:200-5)。中用量又は高用量のAAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴で処置したマウスでは、腓腹筋にエキソン11のインクルージョンを含むLdb3転写物の有意な減少が観察され、amiR155-DMPK²⁰⁴で処置した筋肉におけるスプライシングの欠陥が効果的に修正されたことが確認された (図4)。

【0287】

これらの分子の修正に加え、次いで疾患の生理学的及び機能的症状の観点からAAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴の有効性を測定した。

【0288】

処置によって生存率を改善し、体重減少を軽減することができるかどうかを判断するために、DMSXLマウスを3つの異なる用量のAAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴で処置し、生存率及び体重を観察した。中用量及び高用量での8週間の処置後、体重及び生存率の改善が観察された。これに対して、低用量又は平衡塩類溶液(BSS)対照では、改善は観察されなかった (図5A及び5B)。

【0289】

次に、筋強直及び心臓異常の防止などの疾患の機能的症状の観点から、AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴の有効性を測定した。筋電図測定により、AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴で処置されたマウスで筋強直が有意に減少したことが明らかになった (表2)。特に処置後、中用量で処置された動物の7.6%のみが筋強直となった。これに対して、対照群(BSSで処置された)又は低用量群のマウスの50%超が、持続性筋強直(スコア1)となった。

【0290】

【表2】

表2. AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴による処置後の筋強直を有する

DMSXL DM1 マウスの数。

群	筋強直(腓腹筋)を有する 動物の数
野生型	0/10
DMSXL 対照(未処置)	4/7
DMSXL-5E11 VG/Kg (低用量)	3/5
DMSXL-5E12 VG/Kg (中用量)	1/13
DMSXL-5E13 VG/Kg (高用量)	1/7

【0291】

ミオトニー放電を4点スケールで等級付けした：0、筋強直なし；1、針挿入の50%

未満における時折のミオトニー放電；2、針挿入の50%超におけるミオトニー放電；3：ほぼ毎回の挿入に伴うミオトニー放電。

【0292】

DMSXLマウスの心機能も、骨格筋機能と共に8週間の処置後の体表面心エコー図を使用して観察した。AAV nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴により、BSS処置対照と比較して心拍出量が改善された。心拍出量の有意な改善が、処置して8週間後の中用量群（5e12vg/kg）で認められた（図6）。

【0293】

実施例4：AAVrh74N502Iカプシドが筋肉形質導入を改善し、肝臓形質導入を低減する

非ヒト霊長類の様々な組織におけるAAVrh74N502I VP1カプシドタンパク質（国際公開第2019178412号パンフレット；配列番号50）を含有するAAVカプシドの形質導入効率を検証するために実験を行った。実験の概略を図7Aに示す。非ヒト霊長類を、それぞれeGFP発現カセットを含有する 1×10^{13} vg/kgのAAV9、AAVrh74又はAAVrh74N502Iカプシドのいずれかで静脈内処置した。処置の21日後に動物を殺し、前脛骨筋（TA）、大腿二頭筋、大腿四頭筋、心臓及び肝臓のeGFP発現レベルを測定した。

【0294】

AAVrh74N502Iカプシドタンパク質を含有するカプシドにより、対照カプシドと比較して、非ヒト霊長類における筋肉形質導入が改善され（図7B～7E）、肝臓形質導入が減少した（図7F）（表3）。

【0295】

【表3】

表3.AAV9及びAAVrh74カプシドで処置したものと比較した、AAVrh74N502Iカプシドで処置した非ヒト霊長類の組織におけるeGFPレベルの上昇。

組織	AAV9	AAVrh74
前脛骨筋	+13×	+178×
大腿二頭筋	+303×	+56×
大腿四頭筋	NS*	+32×
心臓	NS	+13×
肝臓	-15×	-2×

*NS = 有意でない

【0296】

実施例5：DMSXLマウスモデルにおけるAAVrh74N502I nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴の標的結合の評価

最も効果のある用量を決定するために、2つの別個の用量のAAVrh74N502Iカプシドの送達について調査した。miR155足場を含むamir-DMPK²⁰⁴（miR155-amir-DMPK²⁰⁴）の発現カセットをコードするAAVを、用量漸増試験で評価した。8週齢のDMSXLマウスに、低用量及び高用量に相当する、 9×10^{13} ベクターゲノム（vg）/kg及び 1.8×10^{14} vg/kgを静脈内注射し

た。遺伝子導入の8週間後にマウスを安楽死させ、DMPKの抑制とamiR-DMPK²⁰⁴の発現レベルを低分子RNA TaqManによって測定し、mRNA投入レベルをu6核内低分子RNAに正規化した。

【0297】

amiR-DMPK²⁰⁴の発現を用量依存的に観察すると(図8A)、複数の組織で総DMPK発現の用量依存的な減少がもたらされた(図8B)。全体として、約10コピー／U6のamiR-DMPK²⁰⁴が心臓及び横隔膜のDMPKを50%以上減少させるのに十分であることが観察され、この量はDM1患者を処置するのに十分な量であり得る。

【0298】

最終的に、ミオトロピックカプシドであるAAVrh74N502I(配列番号50)に関連して、リードベクターのnDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴は、DM1 iPSC由来の心筋細胞で強力なインビボ活性を有することが示された(図9)。

【0299】

実施例6：トランスクリプトームにおけるAAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴の評価

amiR-DMPK²⁰⁴による処置がトランスクリプトームになんらかの大きい影響を及ぼすかどうかを判断するために、ゲノムワイドRNA配列決定(RNA-seq)を実施して、CBA miR155-amiR-DMPK²⁰⁴プラスミドをHEK293細胞株にトランスフェクトすることにより、amiR-DMPK²⁰⁴による処置をCTL3(スクランブルmiRNA)と比較した。観察された非DMPK遺伝子発現の変化がamiR-DMPK²⁰⁴のオフターゲット効果に起因するものであるかどうかを評価するために、大幅に下方制御された標的でシード相補性が濃縮されているかを評価した。5%の偽発見率(FDR)の有意な閾値を用いると、3'UTRにTTCGACシード相補体を含む差次的に発現された4つの遺伝子、OPN4(12.5倍)、DMPK(1.7倍)、KRTAP21-2(1.7倍)、C8ORF44-SGK3(1.7倍)が存在した(表4)。1%のFDRでは、OPN4(12.5倍)、DMPK(1.7倍)のみが差次的発現を示している(図10)。予想される通り、DMPKは、最も大きい影響を受けたmRNAレベルの1つであった(44%のサイレンシング)。全体として、HEK293細胞でamiR-DMPK²⁰⁴が過剰発現した後、最小限のオフターゲット効果が観察された。

【0300】

【表4】

表4

遺伝子名	CTL3に 対する log2 倍数 204	CTL3に 対する 倍数 204	P 値	FDR_BH <0.05	FDR_BH <0.01
OPN4	-3.64	12.5	2.7746E-17	5E-13	はい
DMPK	-0.77	1.7	3.4308E-10	2E-06	はい
KRTAP21-2	-0.76	1.7	0.0001	0.0103	
C8orf44- SGK3	-0.79	1.7	0.0003	0.0191	

【0301】

実施例 7：非ヒト霊長類における AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴ の生体内分布と活性を調査する用量設定試験

AAVrh74MN502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴ の生体内分布と活性を判断するために、単回静脈内注入（IV）用量をカニクイザルに投与した。試験期間は、単回注射後の 12 週間であった。

【0302】

合計 16 匹のカニクイザル（雄 8 匹、雌 8 匹；24～48 ヶ月齢）に、試験の 1 日目に 1 度、伏在静脈に IV 投与した。用量を下記の表 5 に示す。動物を、用量レベル（vg/kg）に基づいて 4 つの異なるカテゴリーに分類した（各群で雄 2 匹及び雌 2 匹）：製剤緩衝液（第 1 群）； 5×10^{13} vg/kg（第 2 群）； 1×10^{14} vg/kg（第 3 群）；及び 2×10^{14} vg/kg（第 4 群）。12 週間後、動物を殺し、組織を分析のために採取した。

【0303】

【表 5】

表 5

群	被験物質又は対照物質	用量レベル (vg/kg)	用量濃度 (vg/mL)	動物の数	
				雄	雌
1	製剤緩衝液	0	0	2	2
2	AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴	5×10^{13}	5×10^{12} vg/ml	2	2
3	AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴	1×10^{14}	1×10^{13} vg/ml	2	2
4	AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴	2×10^{14}	2×10^{13} vg/ml	2	2

【0304】

RNA 及び DNA を抽出するために、採取した組織を機械的にホモジナイズし、試料をデジタル PCR（dPCR）で分析した。

【0305】

いくつかの筋肉組織と非筋肉組織で、AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴ の用量依存的な生体内分布と活性が実証された。いくつかの骨格筋（前脛骨筋（TA）；腓腹筋；大腿四頭筋；大腿二頭筋；ヒラメ筋；長指伸筋（EDL）；横隔膜）並びに心筋及び肝臓組織を分析した。検証した全ての組織にウイルスゲノムコピーが見られ、各組織のコピー数／細胞は用量依存的であった（図 12）。amiR-DMPK の発現（図 13）及び DMPK の下方制御（図 14）も様々な筋肉組織、心臓組織及び肝臓組織で用量依存的であった。DMPK 発現の用量依存的な減少は、対照群と比較して最大 90% 減少することが判明した。動物で検証された全ての用量は安全性があり、動物で忍容性が良好であることが判明した。

【0306】

配列

全てのポリペプチド配列は、別段の指示がない限り、N 末端から C 末端として提示され

る。全ての核酸配列は、別段の指示がない限り、5'から3'として提示される。

【0307】

Byrne デスミンエンハンサー配列

【化3】

```
CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTT
TC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGT
TG
CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGT
GT
GTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCA
GGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAA
ACTG
AAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCCTGTTTATAAACTTGAGGCCCA
CCCTCGA (配列番号 21)
```

10

ソース: Li and Paulin, et. al. 1991. "High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer." Journal of Biol Chem. 266. 10; 6562-6570.

2 番染色体上のホモサピエンスデスミン遺伝子座制御領域 (DES-LCR) (NCBI 参照配列: NG_046330.1) 20

Byrne エンハンサー配列は、参照配列の 17767~18125 に相当する。

【0308】

Paulin デスミンエンハンサー配列

【化4】

```
CCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGTTCTCCT
CT
ATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTG
GG
TTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTG
TG
AGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAA
GTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAAACTGAA (配列番号 22)
```

30

ソース: Li and Paulin, et. al. 1991. "High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer." Journal of Biol Chem. 266. 10; 6562-6570.

2 番染色体上のホモサピエンスデスミン遺伝子座制御領域 (DES-LCR) (NCBI 参照配列: NG_046330.1) 40

Paulin エンハンサー配列は、参照配列の 17787~18063 に相当する。

【0309】

Paulin デスミンプロモーター配列 (-228~+75)

50

【化 5】

CTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAG
 GA
 CCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCC
 CC
 CACGGCCACGGGCGGCCCTTTCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGACAGCTGTCAGGGG
 AG
 GGGAGGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCT
 GT
 CTCCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCG
 CCGGCCAGCCTCGCCCCG (配列番号23)

10

公開された配列と異なる1つの塩基対が存在する（Aの代わりにCであり、太字と下線で示される）。

ソース：Li and Paulin, et. al. 1991. "High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer." Journal of Biol Chem. 266. 10; 6562-6570.

2番染色体上のホモサピエンスデスミン遺伝子座制御領域（DES-LCR）（NCBI参照配列：NG_046330.1）

Paulinプロモーター配列は、参照配列の18535～18844に相当する。

20

【0310】

完全nDesプロモーター配列

【化 6】

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTT
 TC
 CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGT
 TG
 CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGT
 GT
 GTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCA
 GG
 GGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGAAAC
 TG
 AAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGGCCCA
 CCTCGAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCA
 TGCG
 TTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGG
 AG
 ATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCG
 TG
 GGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAG
 CC
 ACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGAAACTGAAAGCTTCT
 GC
 AGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAGGACC
 CC
 CGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCA
 CG
 GCCACGGGCGGCCCTTTCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGACAGCTGTCAGGGGAGGG
 GA
 GGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCT
 CC
 CCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCCG
 CCAGCCTCGCCCCG (配列番号12)

30

40

50

ソース：Li and Paulin, et. al. 1991. "High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer." Journal of Biol Chem. 266. 10; 6562-6570.

【0311】

ウサギβグロビンイントロン

【化7】

GTGAGTTTGGGGACCCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTATA
TGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACC
ATG**CATG**GACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATT
GTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACCTTTTCGTAAACTTTAGCTTGCATT
TGTAACGAATTTTAAATTCACCTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGATT
CCAATCAGGGTATATTATATTGTAACCTTCAGCACAGTTTGTAGAGAACAATTGTTATAATTA
AATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAATATTCTTATT
GGTAGAAACAACACTACA**T**CCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATA
TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACC
ATGTTTCATGCCTTCTTCT**T**TTTCCTACAG (配列番号13)

10

【0312】

ウサギβグロビンイントロンの5'アーム

【化8】

GTGAGTTTGGGGACCCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTA
TA
TGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCA
CC
ATG**CATG**GACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCA
TT
GTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACCTTTTCGTAAACTTTAGCTTGCA
TT
TGTAACGAATTTTAAATTCACCTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGA
TTC (配列番号14)

20

30

ソース：オリクトラガス・クニクルス (*Oryctolagus cuniculus*) ヘモグロビン、β (HBB2) 遺伝子ID100009084

本発明の配列は、遺伝子ID100009084に存在しない追加のCATG (太字と下線で示される) を有する。

【0313】

ウサギβグロビンイントロンの3'アーム

【化9】

CAATCAGGGTATATTATATTGTAACCTTCAGCACAGTTTGTAGAGAACAATTGTTATAAT
TA
AATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAATATTCTTA
TT
GGTAGAAACAACACTACA**T**CCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGA
TA
TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAA
CCATGTTTCATGCCTTCTTCT**T**TTTCCTACAG (配列番号15)

40

ソース：オリクトラガス・クニクルス (*Oryctolagus cuniculus*) ヘモグロビン、β (HBB2) 遺伝子ID100009084

本発明の配列は、遺伝子ID100009084の2つのC残基の代わりに2つのT残

50

基（上記で太字と下線で示される）を有する。

【0314】

miR155-DMPK²⁰⁴配列：

5' miR155隣接配列

RNA配列

CUGGAGGCUUGCUGAAGGCGUGUAUGCUCU（配列番号9）

DNA配列

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCT（配列番号40）

ソース：BLOCK-iT（商標）Pol II miR RNAi発現ベクターキット
カタログ番号K493500

操作されたpre-miRNA配列構造は、マウスmiR-155配列（Lagos-Quintana et al., 2002, Current Biology, 12: 9, 735-739）をベースにしたものである。

amiR-DMPK²⁰⁴ガイド-DNA

AGTCGAAGACAGTTCTAGGGT（配列番号4）

miR155末端ループ-DNA

GTTTTTGCCACTGACTGAC（配列番号6）

ソース：BLOCK-iT（商標）Pol II miR RNAi発現ベクターキット
カタログ番号K493500

操作されたpre-miRNA配列構造は、マウスmiR-155配列（Lagos-Quintana et al., 2002, Current Biology, 12: 9, 735-739）をベースにしたものである。

amiR-DMPK²⁰⁴パッセンジャー-DNA

ACCCTAGATGTCTTCGATT（配列番号5）

amiR-DMPK²⁰⁴ガイド-RNA-miR155末端ループ-amiR-DMPK²⁰⁴パッセンジャー-RNA

AGUCGAAGACAGUUCUAGGGUUGUUUUGGCCACUGACUGACACCCUAGAUGUCUUCGAUU（配列番号7）

amiR-DMPK²⁰⁴ガイド-DNA-miR155末端ループ-amiR-DMPK²⁰⁴パッセンジャー-DNA

AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTTGTTTTTGCCACTGACTGACACCCCTAGATGTCTTCGATT（配列番号8）

3' miR155隣接配列

RNA配列

GACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAUGGAACA AAUGGCC（配列番号10）

DNA配列

GACACAAGGCCCTGTTACTAGCACTCACATGGGAACA AATGGCC（配列番号41）

ソース：BLOCK-iT（商標）Pol II miR RNAi発現ベクターキット
カタログ番号K493500

操作されたpre-miRNA配列構造は、マウスmiR-155配列（Lagos-Quintana et al., 2002, Current Biology, 12: 9, 735-739）をベースにしたものである。

miR155

RNA

CUGGAGGCUUGCUGAAGGCGUGUAUGCUGACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAUGGAACA AAUGGCC（配列番号11）

DNA

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACACAAGGCCCTG

10

20

30

40

50

T T A C T A G C A C T C A C A T G G A A C A A A T G G C C (配列番号 4 2)

全 m i R 1 5 5 - D M P K ^{2 0 4} 二重鎖配列 - R N A

【化 1 0】

CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGAGUCGAAGACAGUUCUAGGGUGUUUUGGC
CACUGACUGACACCCUAGAUGUCUUCGAUUCAGGACACAAGGCCUGUUACUAGCACU
CACAUGGAACAAUUGGCC (配列番号 24)

全 m i R 1 5 5 - D M P K ^{2 0 4} 二重鎖配列 - D N A

【化 1 1】

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGT TTTTGGC
CACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATT CAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACT
CACATGGAACAAATGGCC (配列番号 25)

10

【 0 3 1 5】

最小限の B G H p A 配列

【化 1 2】

TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
GACAATAGC (配列番号 16)

20

ソース：ウシ (B o s t a u r u s) 成長ホルモン 1 (G H 1) の m R N A N C B I

参照配列 NM_180996.1

【 0 3 1 6】

1 1 3 8 b p の A 1 A T イントロンスタッファー配列 (発現カセットの上流)

30

40

50

【化 1 3】

TACGTACAATTGGGATCCTTCGAACTTGAGAGAAAACATCCCAGGGATTACAGATC
AC
ATGCAGGCAGGGACCAGCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGG
AT
GGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAGTTATTTTTGGGTGGGATTCACCACTTT
TC
CCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGT
TG
AACTTGACCTCGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCA
GC
TTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGGAGA
GA
AGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCCAGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACC
TC
CCAGGAAGCGCTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCTCCCTCCCT
GT
CACATAGGCCTTGCTCCTCCTCAAGGCTTTGGCTGATGGGGCTGGCTCCCCTCTGTG
CA
TCTTCCTGACAAGCGCCTCTCCCCCTGCTCAGGTGCACCCACAACCTCAGAACAGGGA
AG
AGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGGCTCTCTCCTTTCTAGTACACGGCTT
GA
AGCTCCTTGAGGACACGGACCCTGGCAGTGACCTTCACAGTGCCCAGACCCCAAGAT
AA
TGCAGCCATTTCATGGAACATGCAGGTTGTTCATTGGTCGCCTTTAGTTTTCCAAAATA
AG
TGTCACCTTTAGCTGAAATCATTCATTAATTCAGACACCAAATCTCACAGATCGAAGG
AG
TCAGAAATTCCTTTGAAACAACCTTAGCCCCAACCTTTCTGTGTCAGTATGGATAAAT
CA
AGGCCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCAAAGTTGAAATTCAGGGTCAGTGACACAAC
CT
CAAGGGAGGCCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCCCTGCCTGGCTTTGCTGTTT
GC
CCACCGTCCCGTGTGTCAGTGAATCACGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGTCTTCA
TT
TGTTTCCCTCGGCCCCCTTCCTCAGCCTCAGGACAGTGCTAGCAGCCCCCACACATTC
TTCCCTACAGATACCATGG (配列番号18)

10

20

30

ソース：プラスミドDC 969 (Serpina1 = A1AT) 14 番染色体NG__0
08290.1

【0317】

398bpのA1ATイントロンスタッファー配列 (発現カセットの下流)

40

50

【化 1 4】

GCATGCAGAGTGGACAGGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCTTTCTCATTGGACA
GA
AGGAGGAGACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCC
AG
GACTTTAGCTGTGCTGACTGCAGCCTGGCTTGCCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAA
GA
GCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCCCTGGCCTTGCCCTCCACCTCCCCTC
CC
CTATGCTGTTTTCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCCCTGGGGCCCCCAGG
AC
CCTGGCATTTTAACCCTCAGGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGAGTCCAT
CA CCTGCTGTATGCCACACACCATCCCCACAGTCGACATTTAAATT (配列番号
19)

10

ソース：プラスミド DC 969 (Serpina1 = A1AT) 14 番染色体 NG__0
08290.1

【0318】

ITR-nDes-miR155-amir-DMPK²⁰⁴-BGHPA-スタッフア
ー-ITR (3739bp)

【化 1 5】

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC
GAC

20

30

40

50

【化 1 6】

CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTT
CCTTACGTACAATTGGGATCCTTCGAACCTTGAGAGAAAACATCCCAGGGATTTACAGATCACATGCAG
GCA
GGGACCAGCTCAACCCTTCTTTAATGTTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGG
AGC
GAGAGGCAGTTATTTTTGGGTGGGATTCAACACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGT
CAA
TCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAACTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAA
AAC
ATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGG
AGA
GAAGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCAGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACCTCCAGGAA
GCG
CTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCTCCCTCCCTGTCACATAGGCCTTGCTCCTC
CTC
AAGGCTTTGGGTGATGGGGTGGCTCCCTCTGTCCATCTTCCTGACAAGCGCCTCTCCCCCTGCTCA
GGT
GCACCCACAACCTCAGAACAGGGAAGAGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGGCTCTCTCCTTT
CTA
GTACACGGCTTGAAGCTCCTTGAGGACACGGACCTGGCAGTGACCTTCACAGTGCCCAGACCCCAAG
ATA
ATGCAGCCATTTCATGGAACGTCAGGTTGTTTCATTGGTCGCCTTTAGTTTTCCAAAATAAGTGTCACCT
TAG
CTGAAATCATTCATTAATTCAGACACCAATCTCACAGATCGAAGGAGTCAGAAATTCCTTTGAAACA
ACT
TAGCCCCAACCTTTCTGTGTCAGTATGGATAAATCAAGGCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCAAAGT
TGA
AATTGAGGTCAGTGACACAACCTCAAGGGAGGCCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCCGCTGCCT
GGC
TTTGCTGTTTGCCCAACCGTCCCGTGTCACTGAATCACGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGTCTTC
ATT
TGTTTCCCTCGGCCCCCTTCCTCAGCCTCAGGACAGTGCTAGCAGCCCCACACATTCTTCCCTACAGA
TAC
CATGGCACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCAG
CCA
TGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGT
TGG
GTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGG
GAT
GAATCAGGGAGGGGGCGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGTGGGAGCGC
ACA
TAGCAATTGGAACGAAAGCTTATCAGACCCCTTCTTGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGG
CCC
CACCTCGAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCAGCCATGCGTTCTC
CTC
TATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTGACATG
CGG
CTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGG
AGG
GGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTG
GAA
ACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGTGCTGCTGCTGCGGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAG
GAC
CCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCACGGCCACG
GGC
CGCCCTTTCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGACAGCTGTGAGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGATGTCAG
GAG
GGATACAAATAGTGCCGACGCTGGGGGCCCTGTCTCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGC
CTG
CCCGCCGCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCCGGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAGGCGCGCC
TGA
GAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCTTGATTGTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTAT

10

20

30

40

50

【化 1 7】

ATG
GAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTGTGTTAGAAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGCATGGACC
CTC
ATGATAATTTTGTTCCTTTCACCTTCTACTCTGTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTCTTTTCAT
TTT
CTGTAACCTTTTCGTAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTAAATTCACCTTTGTTTATTG
TCA
GATTGTAAGATCCCATCGATTCCGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAGACAG
TTC
TAGGGTGTTCCTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTGAGGACACAAGGCCTGTTACTAGC
ACT
CACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAA
CAA
TTGTTATAATTAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATCTGGCTGGCGTGGAATATTCTT
ATT
GGTAGAAACAACCTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGTTTACAATGATATACACTGTT
TGA
GATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTT
TCC
TACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGC
CTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTCTTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCAT
TGTCTG
AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA
TAGCGCATGCAGAGTGGACAGGGGCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCTTTCTCATTGGACAGAAGGAG
GAGACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCCAGGACTTTAGCTGTGC
TGACTGCAG
CCTGGCTTGCCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAAGAGCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCC
CTG
GCCTTGCCCTCCACCTCCCCTCCCCTATGCTGTTTTCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCCC
TGG
GGCCCCCAGGACCCTGGCATTTTAACCCCTCAGGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGAGTCCA
TCA
CCTGCTGTATGCCACACACCATCCCCACAGTCGACATTTAAATT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG**
CCA
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTT
GGTCGCCCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

(配列番号20)

10

20

30

40

50

【 0 3 1 9】

【表 6】

表 5. 5'ITR～3'ITR の ITR-nDes-miR155- amiR-DMPK²⁰⁴ 配列のアノテーション(3739bp)

配列 ナンバリング	配列番号	アノテーション
1～145	43	5' ITR
146～1283	44	A1ATスタッファー
1284～2238	12	nDesプロモーター(下記に詳細)
1284～1642	21	Byrneエンハンサー
1643～1648	n/a	Kpn1制限部位
1647～1923	22	Paulinエンハンサー
1923～1928	n/a	HindIII制限部位
1929～1934	n/a	PstI制限部位
1929～2238	23	Paulinプロモーター
2268～2578	45	5'アームウサギβグロビンイントロン
2579～2584	n/a	BamH1制限部位
2585～2611	46	5'miR155隣接配列
2612	n/a	Invitrogen Block-ITキットの追加の塩基
2613～2633	4	DMPK ²⁰⁴ miRNAガイド
2634～2652	6	miR155末端ループ
2653～2671	5	DMPK ²⁰⁴ miRNAパッセンジャー
2672～2674		Invitrogen Block-ITキットの追加の塩基
2675～2716	41	3'miR155隣接配列
2717～2722	n/a	Xho1制限部位
2723～3005	47	3'アームウサギβグロビンイントロン
3011～3196	16	minBGHポリA
3197～3594	48	A1ATスタッファー
3595～3739	49	3'ITR

【0320】

合成された n D e s - m i R 1 5 5 - 2 0 4 断片の配列：

10

20

30

40

50

【化 1 8】

AGATCTCCATGGCACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGT
 TTC
 CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGG
 AGA
 TGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGA
 GTA
 GGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTG
 GGA
 GCGCACATAGCAATTGGAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAA
 CTT
 GAGGCCCCACCTCGAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTCCTCCAGCCATG
 CGT
 TCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGT
 TGA
 CATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGA
 ATC
 AGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATA
 GCA
 ATTGGAACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGTCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCC
 GTC
 ACAGGACCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCAC
 GGC
 CACGGGCGCCCTTTCTTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTGAGGGAGGGAGGCGGGGGCTG
 ATG
 TCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGC
 CGG
 CCGCTGCCCCCGCCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCCGGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAG
 GCG
 CGCCTGAGAACTTCAGGGTGAATTTGGGGACCCCTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAATTC
 ATG
 TTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGC
 ATG
 GACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTTGTCTCCTCTTATTTTC
 TTT
 TCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATTGTAAACGAATTTTAAATTCACCTTTTGT
 TTA
 TTTGTGAGATTGTAAGATCCCATCGATTGCGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCG
 AAG
 ACAGTTCTAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCTAGATGTCTTCGATTGAGGACACAAGGCTGT
 TAC
 TAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTT
 TAG
 AGAACAAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCGGCTGGCGTGGA
 TAT
 TCTTATTGGTAGAAACAACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATA
 CAC
 TGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTC
 TTC
 TTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCC
 CCC
 GTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATGTCATC
 GCA
 TTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
 AAGACAATAGCGCATGCGTCGACT (配列番号 26)

10

20

30

【0 3 2 1】

40

ポリ A に対する n D e s - m i R 1 5 5 - 2 0 4 プロモーター

50

【化 1 9】

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTGGGGTTGGCAGCTGTGCTGCCAGGGAGA
TGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTA
GGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGA
GCGCACATAGCAATTGGAAGCTTATCAGACCCCTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTT
GAGGCCCCACCCTCGAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGT
TCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTGGGGTTGGCAGCTGTTGTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGA
CATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATC
AGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCA
ATTGGAAACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTC
ACAGGACCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCACGGC
CACGGGCCGCCCTTTCCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCACTGTGAGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGATG
TCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGG
CCGCTTGCCCGCCGCTCCTCCGTGCGCCCGCAGCCTCGCCCGGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAGGCG
CGCTGAGAACTTCAGGGTGAATTTGGGGACCCCTGATTGTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAATTCATG
TTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGATACCATGTCATG
GACCTTCATGATAATTTTGTCTTTTCACTTTCTACTCTGTGACAACCATTTGTCTCCTCTTATTTCTTT
TCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCAATTTGTAACGAATTTTAAATTCACTTTGTGTTA
TTTGTGAGATTGTAAGATCCCATCGATTCCGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAG
ACAGTTCTAGGGTGTGTTTGGCCACTGACTGACACCTAGATGTCTTCGATTGAGGACACAAGGCTGTTAC
TAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAG
AGAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATCTGGCTGGCGTGGAAATAT
TCTTATTGGTAGAAACAACCTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACAC
TGTTTGAGATGAGGATAAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTC
TTTTCTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCA
TTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
ACAATAGC

10

20

(配列番号17)

【0 3 2 2】

A A V r h 7 4 バリエーションのアミノ酸配列（国際公開第 2 0 1 9 1 7 8 4 1 2 号パンフレット）

30

40

50

【化 2 0】

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
 145 150 155 160
 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
 180 185 190
 Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
 210 215 220
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
 245 250 255
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480

10

20

30

40

50

【化 2 1】

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
485 490 495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
500 505 510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
515 520 525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540
Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
545 550 555 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
565 570 575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Tyr Ile
580 585 590
Gly Ser Arg Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
645 650 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
660 665 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
690 695 700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705 710 715 720
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

10

20

Asn Leu (配列番号39)

【0 3 2 3】

A A V r h 7 4 N 5 0 2 I のアミノ酸配列

【化 2 2】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFN
GLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNL
GRAVFQAKKRVLLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKGQPAKKRLN
FGQTGDSESVDPDPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNNEGADGVGSSSGNWHC
DSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDENRF
HCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
NNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAG
PNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLNQNNNSIFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAM
ATHKDDERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVAD
NLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGL
KHPPPQILIKNTVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQY
TSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 50)

30

40

【0 3 2 4】

A A V r h 7 4 N 5 0 2 I カプシドをコードするヌクレオチド配列

50

【化 2 3】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATT
CGCGAGTGGTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAA
GCAGGACAACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAA
CGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACG
ACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAAT
CACGCCGACGCCGAGTTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAAC
CTCGGGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGCGGGTCTCGAACCTCTGGGCCTGGTT
GAATCGCCGGTTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCCA
GCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAA
AGAGACTCAATTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAA
TCGGAGAACCACCAGCAGGCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCG
GTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCTCTCA
GGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACC
CGCACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGG
ACCTCGGGAGGAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGG
GTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTC
ATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATC
CAAGTCAAGGAGGTACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTAC
CAGCACGATTACGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTC
GGCGCACCAAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCTCAGTA
CGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCTGTGGGCCGGTCTGTCCTTCTACTG
CCTGGAGTACTTTCCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAATTACAGTA
CAACTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACC
GGCTGATGAACCTCTCATCGACCAGTACTTGTACTACCTGTCCCGGACTCAAAGCA
CGGGCGGTACTGCAGGAACTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGGCCTAACACA
TGTCGGCTCAGGCCAAGAAGTGGCTACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGTCT
CCACGACACTGTGCGAGAACAACAACAGCATCTTTGCCTGGACGGGTGCCACCAAGT
ATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTACCCACA
AGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGG
GAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGCTAACCCAGCGAGGAAGAA
ATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGGCCGATAACCT
GCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTACC
TGGCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAGA
TTCCTCATACGGACGGCAACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGA
AGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAAAAACACACCTGTTCCCGCGGATCCTCCGA
CCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTCATCACGCAGTACAGTACCGGCCAGG
TCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCCA
GAGATTCAGTACACTTCCAACCTACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAAT
ACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATC
TGTA (配列番号 51)

10

20

30

【0 3 2 5】

A A V r h 7 4 W 5 0 5 R のアミノ酸配列

40

50

【化 2 4】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNNGRLVLPGYKYLGPFN
GLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNL
GRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSQSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLN
FGQTGDSESVDPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHC
DSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRF
HCHFSRPDWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
NNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAG
PNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFARTGATKYHLNGRDSLVPNGVAM
ATHKDDEERFFPSSGVLMMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEKTTNPVATEQYGVVAD
NLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGL
KHPPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQY
TSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 52)

10

【0 3 2 6】

A A V r h 7 4 W 5 0 5 R をコードするヌクレオチド配列

【化 2 5】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATT
CGCGAGTGGTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAA
GCAGGACAACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAA
CGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACG
ACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAAT
CACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAAC
CTCGGGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGCGGGTCTCGAACCTCTGGGCCTGGTT
GAATCGCCGGTTAAGACGGCTCCTGGAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCCA
GCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAA
AGAGACTCAATTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAA
TCGGAGAACCACCAGCAGGCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCG
GTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCCTCA
GGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACC
CGCACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGG
ACCTCGGGAGGAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGG
GTATTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAGCGACTC
ATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATC
CAAGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTAC
CAGCACGATTCAAGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGTCCCGTACGTGCTCGGCTC
GGCGCACCAAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCTCAGTA
CGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCTGTGGGCCGGTCTGCTCTTCTACTG
CCTGGAGTACTTTCCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAATTGAGTA
CAACTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACC
GGCTGATGAACCTCTCATCGACAGTACTTGTACTACCTGTCCCGGACTCAAAGCA
CGGGCGGTACTGCAGGAACCTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGGCTAACAACA
TGTCGGCTCAGGCCAAGAAGTGGCTACCCGCTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCTCT
CCACGACACTGTGCGAGAACAACAACAGCAACTTTGCCAGGACGGGTGCCACCAAG
TATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTACCCAC
AAGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAG
GGAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGCTAACCAGCGAGGAAGA
AATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGGCCGATAACC
TGCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTAC
CTGGCATGGTGTGGCAGAACC GGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAG
ATTCTCATACGGACGGCAACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTG
AAGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTA AAAACACACCTGTTCCCGCGGATCCTCCG
ACCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTCATCACGCAGTACAGTACCGGCCAG
GTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCC
AGAGATTGAGTACACTTCCAATACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAA
TACTGAGGGTACTTATCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAAT
CTGTAA (配列番号 53)

20

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

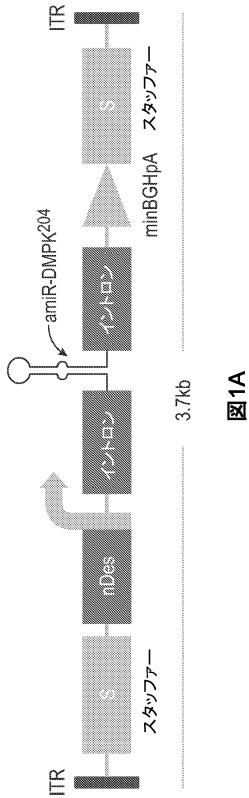


図 1A

【図 1 B】

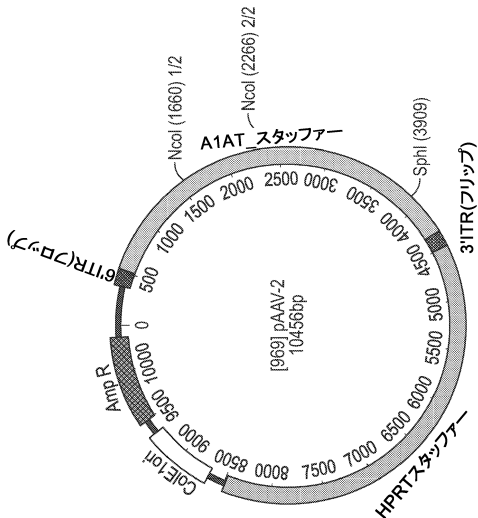


図 1B

【図 1 C】

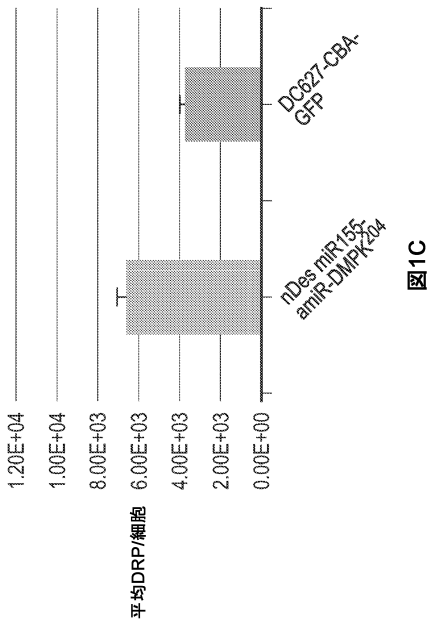


図 1C

【図 2 A】

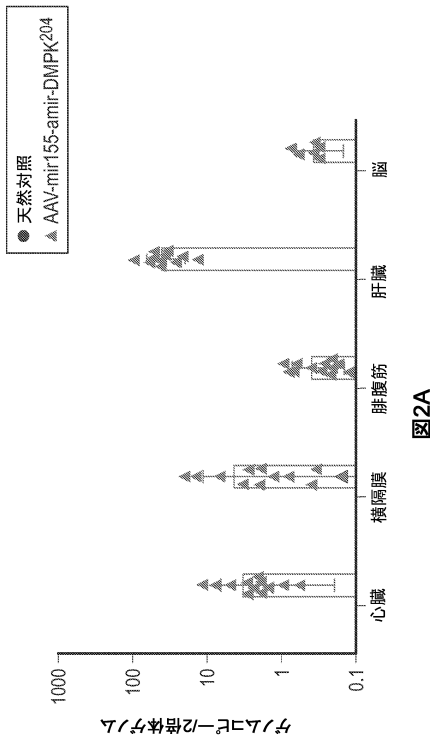


図 2A

10

20

30

40

50

【图 2 B】

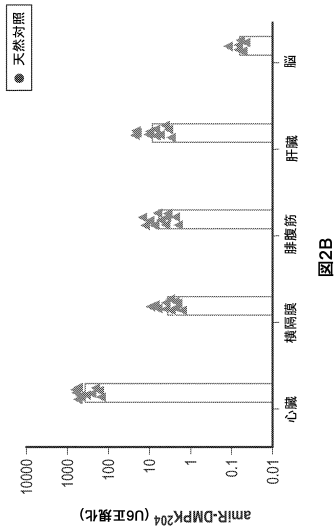


图2B

【图 2 C】

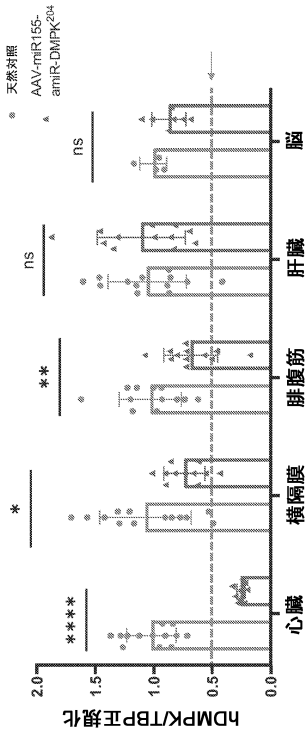


图2C

【图 3 A】

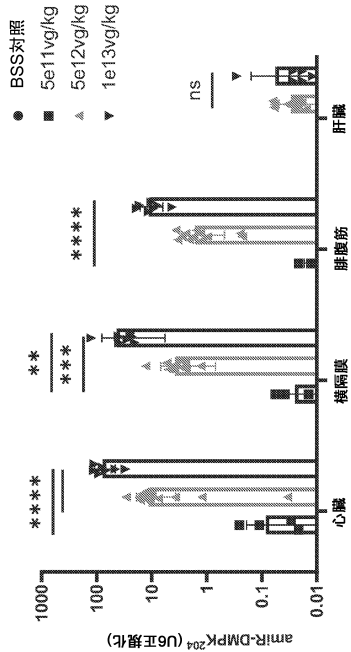


图3A

【图 3 B】

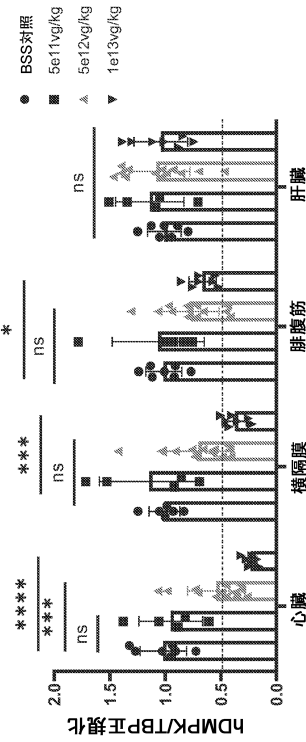


图3B

10

20

30

40

50

【図 4】

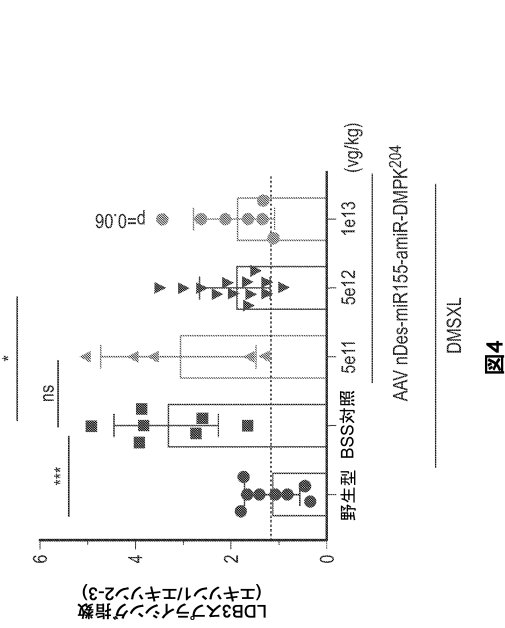


図4

【図 5 A】

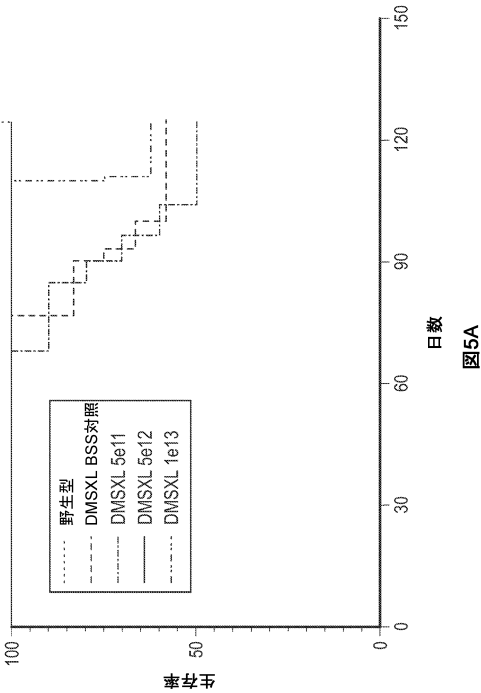


図5A

【図 5 B】

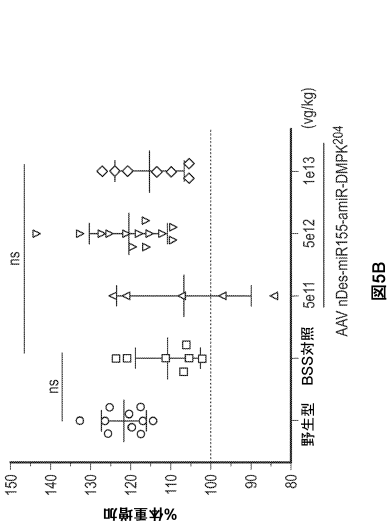


図5B

【図 6】

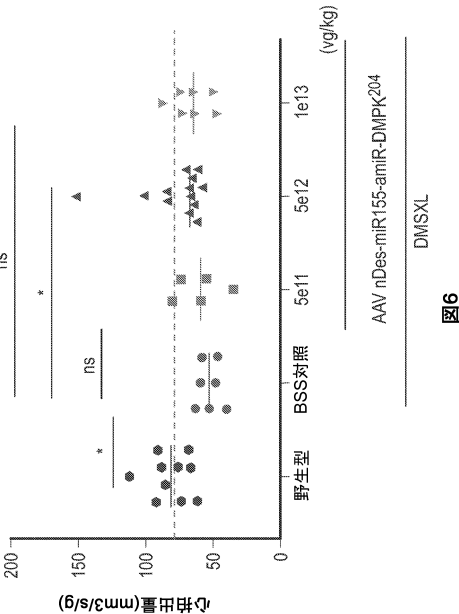


図6

10

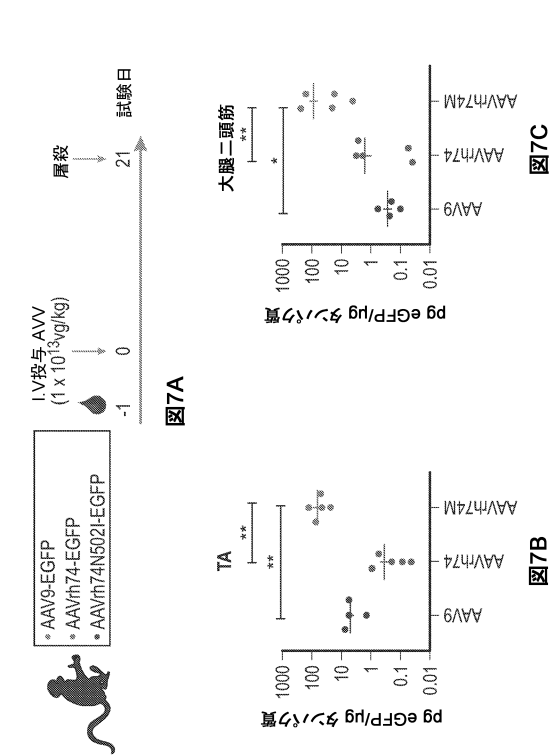
20

30

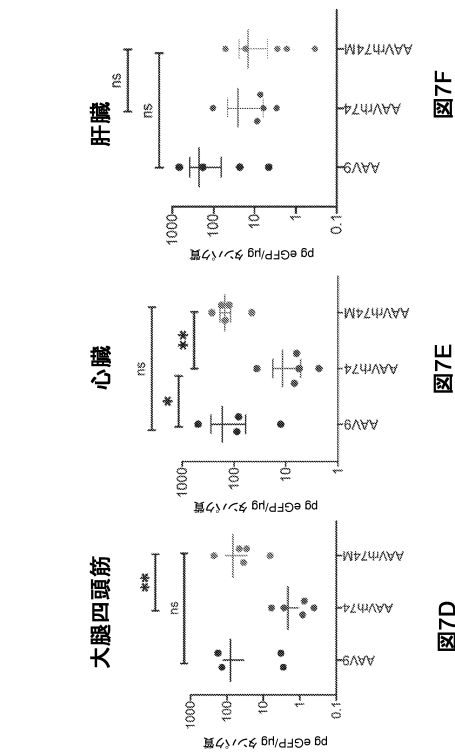
40

50

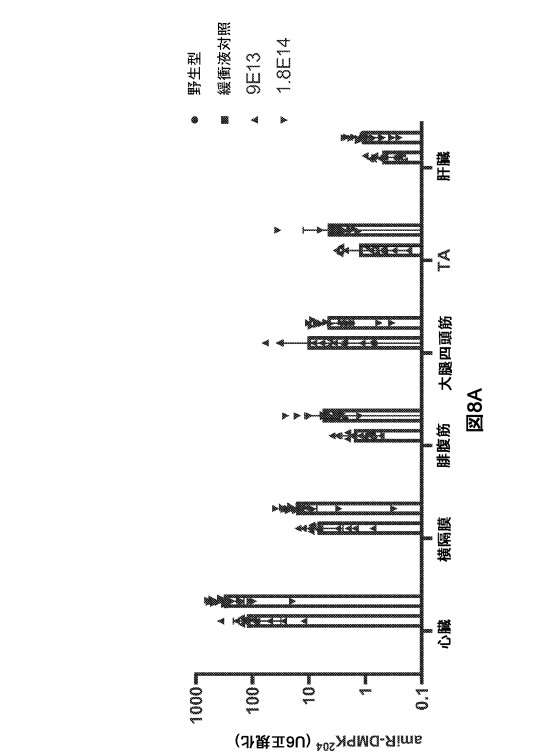
【 図 7 - 1 】



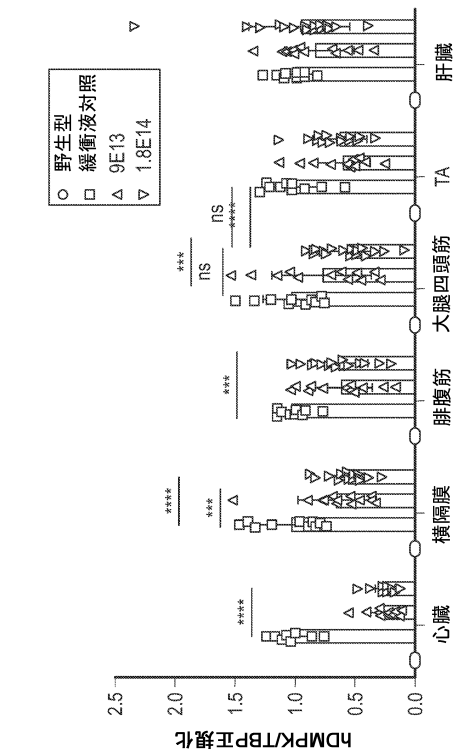
【 図 7 - 2 】



【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



10

20

30

40

50

【 図 9 】

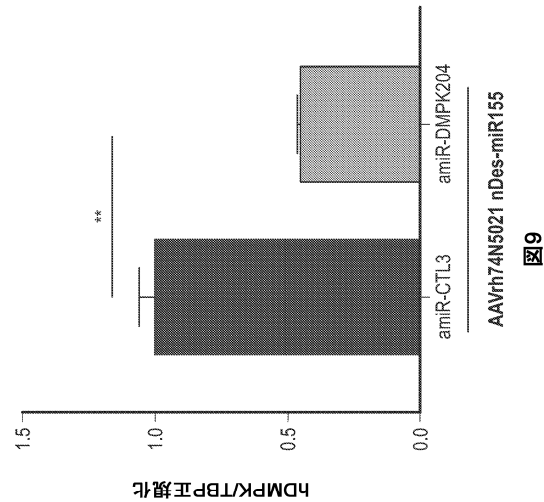


図 9

【 図 1 0 】

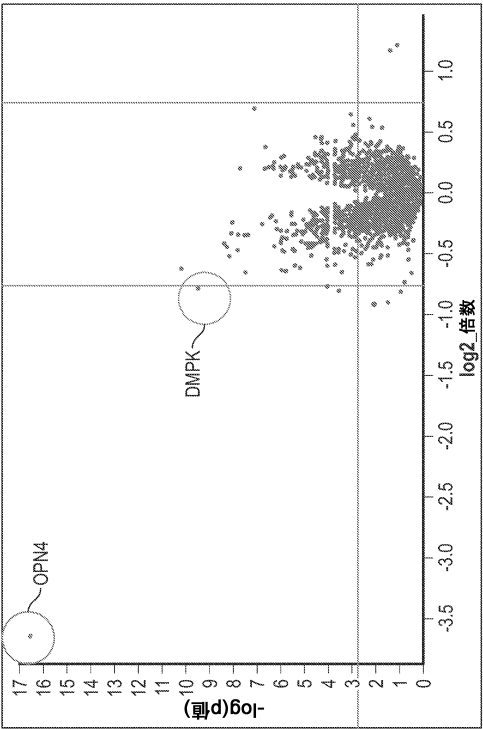


図 10

【 図 1 1 】

DNA	ACCCTAGAACTGCTCTCGACT
標的配列(ヒト)	ACCCTAGAACTGCTCTCGACT
標的配列(マカク)	ACCCTAGAACTGCTCTCGACT
標的配列(マウス)	ACCCTAAGACTCCAAGCCATC
標的配列(ラット)	ACCCTAAGACTCCAAGCCATT
標的配列(イヌ)	ACCCTAGAGCCCCAAGCCGGA

図 11

【 図 1 2 】

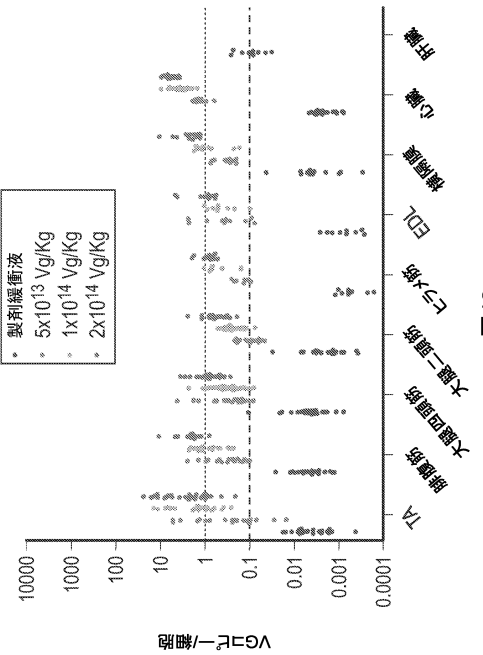


図 12

10

20

30

40

50

【図 1 3】

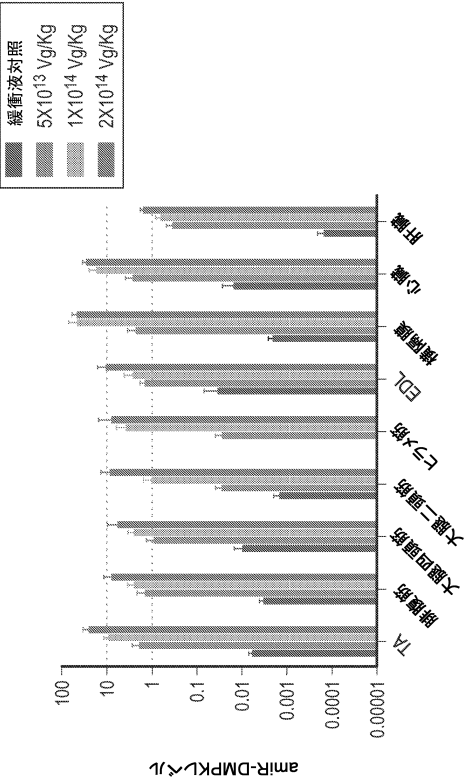


図13

【図 1 4】

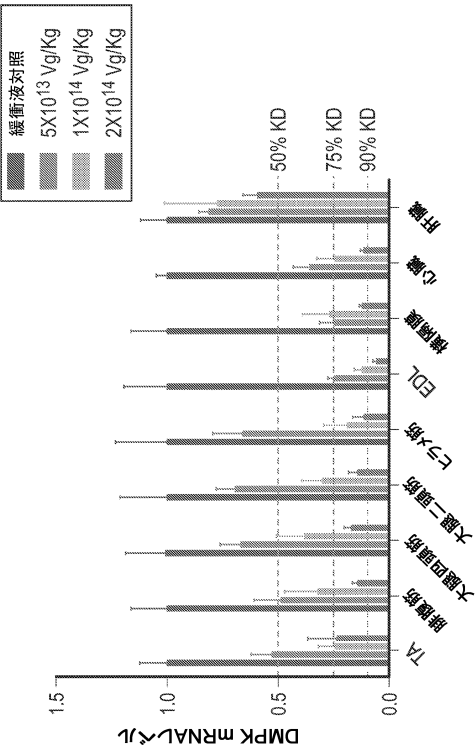


図14

【配列表】

2025513785000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **C12N15/113 A61K31/713 C12N15/86 C12N7/00**
ADD.

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)

C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/222354 A1 (UNIV WASHINGTON [US]) 21 November 2019 (2019-11-21)	1-6, 8-11, 19-26, 62, 69-73, 75-81, 92-94, 100-123
Y	the whole document -----	1-99
X	WO 2018/178067 A1 (UNIV BRUSSEL VRIJE [BE]) 4 October 2018 (2018-10-04)	44-62, 69, 75-79, 95-99
Y	the whole document ----- -/--	23-99

☒ 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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 July 2023

Date of mailing of the international search report

19/07/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, Serge

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065388

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/142447 A1 (SOLID BIOSCIENCES INC [US]) 15 July 2021 (2021-07-15) the whole document -----	1-43
A	WO 2020/028816 A1 (GENZYME CORP [US]) 6 February 2020 (2020-02-06) the whole document -----	1-123
A	WO 2018/204786 A1 (VOYAGER THERAPEUTICS INC [US]) 8 November 2018 (2018-11-08) the whole document -----	1-123
A	WO 2019/178412 A1 (RES INST NATIONWIDE CHILDRENS HOSPITAL [US]) 19 September 2019 (2019-09-19) cited in the application the whole document -----	69-85
A	WO 2020/041634 A1 (RES INST NATIONWIDE CHILDRENS HOSPITAL [US]) 27 February 2020 (2020-02-27) the whole document -----	1-123
A	WO 2019/207132 A1 (UNIV HEIDELBERG [DE]) 31 October 2019 (2019-10-31) cited in the application the whole document -----	69-85
A	KOTOWSKA-ZIMMER ANNA ET AL: "Artificial miRNAs as therapeutic tools: Challenges and opportunities", WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS: RNA, vol. 12, no. 4, E1640, 2021, pages 1-33, XP093052225, United Kingdom ISSN: 1757-7004, DOI: 10.1002/wrna.1640 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wrna.1640 the whole document -----	1-123
A	Y. SEOW ET AL: "Artificial mirtron-mediated gene knockdown: Functional DMPK silencing in mammalian cells", RNA, vol. 18, no. 7, 30 May 2012 (2012-05-30), pages 1328-1337, XP055649110, US ISSN: 1355-8382, DOI: 10.1261/rna.030601.111 the whole document ----- -/--	1-123

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065388

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/226638 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL INC [US]) 13 December 2018 (2018-12-13) the whole document -----	1-123

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2023/065388
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:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/065388

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019222354 A1	21-11-2019	AU 2019268346 A1	24-12-2020
		BR 112020023298 A2	09-03-2021
		CA 3098249 A1	21-11-2019
		CL 2020002955 A1	23-04-2021
		CN 112469421 A	09-03-2021
		CO 2020015239 A2	08-03-2021
		EP 3793566 A1	24-03-2021
		JP 2021522836 A	02-09-2021
		KR 20210010549 A	27-01-2021
		MA 51938 A1	30-11-2021
		PH 12020551913 A1	14-06-2021
		SG 11202011151V A	30-12-2020
		US 2021269825 A1	02-09-2021
		WO 2019222354 A1	21-11-2019
WO 2018178067 A1	04-10-2018	AU 2018241847 A1	17-10-2019
		CA 3057899 A1	04-10-2018
		EP 3600445 A1	05-02-2020
		JP 2020515572 A	28-05-2020
		JP 2023093487 A	04-07-2023
		US 2020407749 A1	31-12-2020
		WO 2018178067 A1	04-10-2018
WO 2021142447 A1	15-07-2021	AU 2021205965 A1	01-09-2022
		CA 3164335 A1	15-07-2021
		CN 115279421 A	01-11-2022
		EP 4087617 A1	16-11-2022
		JP 2023510799 A	15-03-2023
		US 2023183740 A1	15-06-2023
		WO 2021142447 A1	15-07-2021
WO 2020028816 A1	06-02-2020	AR 114540 A1	16-09-2020
		AU 2019314529 A1	25-03-2021
		BR 112021001980 A2	04-05-2021
		CA 3108526 A1	06-02-2020
		CN 112805382 A	14-05-2021
		CO 2021002637 A2	30-07-2021
		EP 3830265 A1	09-06-2021
		IL 280581 A	25-03-2021
		JP 2021534814 A	16-12-2021
		KR 20210062627 A	31-05-2021
		SG 11202101072U A	30-03-2021
		TW 202022116 A	16-06-2020
		US 2021309999 A1	07-10-2021
		WO 2020028816 A1	06-02-2020
WO 2018204786 A1	08-11-2018	AU 2018261790 A1	28-11-2019
		CA 3061652 A1	08-11-2018
		CN 110913866 A	24-03-2020
		EP 3618839 A1	11-03-2020
		JP 2020518258 A	25-06-2020
		SG 11201909870S A	28-11-2019
		US 2020123574 A1	23-04-2020
		WO 2018204786 A1	08-11-2018
WO 2019178412 A1	19-09-2019	AU 2019234918 A1	17-09-2020
		BR 112020018354 A2	29-12-2020
		CA 3092353 A1	19-09-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/065388

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 111819286 A	23-10-2020
		EP 3765624 A1	20-01-2021
		IL 277270 A	29-10-2020
		JP 7304878 B2	07-07-2023
		JP 2021515572 A	24-06-2021
		KR 20200131843 A	24-11-2020
		RU 2020131998 A	18-04-2022
		SG 11202008687X A	29-10-2020
		US 2021087584 A1	25-03-2021
		WO 2019178412 A1	19-09-2019
WO 2020041634 A1	27-02-2020	AU 2019326551 A1	18-03-2021
		CA 3110466 A1	27-02-2020
		EP 3841209 A1	30-06-2021
		JP 2021534755 A	16-12-2021
		US 2022033823 A1	03-02-2022
		WO 2020041634 A1	27-02-2020
WO 2019207132 A1	31-10-2019	AU 2019258830 A1	03-12-2020
		CA 3097375 A1	31-10-2019
		CN 112040988 A	04-12-2020
		EP 3784288 A1	03-03-2021
		JP 2021521833 A	30-08-2021
		US 2021363193 A1	25-11-2021
		WO 2019207132 A1	31-10-2019
WO 2018226638 A1	13-12-2018	US 2020172928 A1	04-06-2020
		WO 2018226638 A1	13-12-2018

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	

,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,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,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,L
A,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,P
H,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

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 4 1. ケンブリッジ. ウォーター・ストリート4 5 0.
サノフィ. パテント・デパートメント

(72)発明者 森口 貴子

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 4 1. ケンブリッジ. ウォーター・ストリート4 5 0.
サノフィ. パテント・デパートメント

(72)発明者 キャサリン・オリオーダン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 4 1. ケンブリッジ. ウォーター・ストリート4 5 0.
サノフィ. パテント・デパートメント

(72)発明者 グウオシアン・ルアン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 4 1. ケンブリッジ. ウォーター・ストリート4 5 0.
サノフィ. パテント・デパートメント

F ターム (参考) 4B065 AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA23 CA44
4C084 AA19 NA14 ZA941 ZB082 ZC751
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA05 NA14 ZA94 ZC75
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA94 ZC75