

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-516583
(P2025-516583A)

(43)公表日 令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/015 (2006.01)	C 0 7 K	14/015	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/35 (2006.01)	C 1 2 N	15/35		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		4 C 0 8 7
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全50頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-566316(P2024-566316)			(71)出願人	301040958
(86)(22)出願日	令和5年5月11日(2023.5.11)				ザ・チルドレンズ・ホスピタル・オブ・
(85)翻訳文提出日	令和6年12月13日(2024.12.13)				フィラデルフィア
(86)国際出願番号	PCT/US2023/021905				THE CHILDREN'S HOSPI
(87)国際公開番号	WO2023/220287				TAL OF PHILADELPHIA
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)				アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルバ
(31)優先権主張番号	63/340,823				ニア州 フィラデルフィア シビック セ
(32)優先日	令和4年5月11日(2022.5.11)				ンター ブールバード 3 4 0 1
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100102978
(31)優先権主張番号	63/342,324				弁理士 清水 初志
(32)優先日	令和4年5月16日(2022.5.16)			(74)代理人	100205707
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 小寺 秀紀
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ			(74)代理人	100160923
最終頁に続く					弁理士 山口 裕孝
				(74)代理人	100119507
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脳深部構造を標的とするアデノ随伴ウイルスベクター

(57)【要約】
本明細書において提供されるのは、脳内の特定の部分構造に薬剤を送達する、ターゲティングペプチド、およびターゲティングペプチドをコードする配列を含有するベクターである。具体的には、ターゲティングペプチドは、修飾された、配列が指定されたアデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドタンパク質の成分であり、さらに、脳内部分構造は、淡蒼球、被殻、内包、尾状核、前障、黒質、運動皮質、島、側頭皮質、視床、海馬、海馬台、および深部小脳核であり得る。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

修飾型アデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドタンパク質を含むウイルスベクターを別の臓器または脳構造にターゲティングするターゲティングペプチドを含む修飾型AAVカプシドタンパク質であって、ターゲティングペプチドが3～10アミノ酸長である、修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 2】

前記カプシドタンパク質が、SEQ ID NO:20、19、および21～24のいずれかによる配列を有する、請求項1記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 3】

修飾型AAV1カプシドタンパク質、修飾型AAV2カプシドタンパク質、または修飾型AAV9カプシドタンパク質である、請求項1記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 4】

修飾型AAVカプシドタンパク質が、AAV1カプシドタンパク質（SEQ ID NO:1参照）に由来し、ターゲティングペプチドが、該AAV1カプシドタンパク質の残基590の後に挿入されている、請求項1記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 5】

ターゲティングペプチドにリンカー配列が隣接しており、ターゲティングペプチドの各側のリンカー配列が2または3アミノ酸長である、請求項4記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 6】

ターゲティングペプチドのN末端側のリンカー配列がSSA、ターゲティングペプチドのC末端側のリンカー配列がASである、請求項5記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 7】

修飾型AAV1カプシドタンパク質が、SEQ ID NO:4と少なくとも95%同一の配列を有する、請求項6記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 8】

修飾型AAVカプシドタンパク質が、AAV2カプシドタンパク質（SEQ ID NO:2参照）に由来し、ターゲティングペプチドが、該AAV2カプシドタンパク質の残基587の後に挿入されている、請求項1記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 9】

ターゲティングペプチドにリンカー配列が隣接しており、ターゲティングペプチドの各側のリンカー配列が2または3アミノ酸長である、請求項8記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 10】

ターゲティングペプチドのN末端側のリンカー配列がAAA、ターゲティングペプチドのC末端側のリンカー配列がAAである、請求項9記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 11】

修飾型AAV2カプシドタンパク質が、SEQ ID NO:5と少なくとも95%同一の配列を有する、請求項10記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 12】

修飾型AAVカプシドタンパク質が、AAV9カプシドタンパク質（SEQ ID NO:3参照）に由来し、ターゲティングペプチドが、該AAV9カプシドタンパク質の残基588の後に挿入されている、請求項1記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 13】

ターゲティングペプチドにリンカー配列が隣接しており、ターゲティングペプチドの各側のリンカー配列が2または3アミノ酸長である、請求項12記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項 14】

ターゲティングペプチドのN末端側のリンカー配列がAAA、ターゲティングペプチドの

10

20

30

40

50

C末端側のリンカー配列がASである、請求項13記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項15】

修飾型AAV9カプシドタンパク質が、SEQ ID NO:6と少なくとも95%同一の配列を有する、請求項14記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項16】

標的ペプチドが、SEQ ID NO:8、10、12、14、16、および18からなる群より選択されるアミノ酸配列を内部に有する最大10アミノ酸長の配列を含む、請求項1記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項17】

ターゲティングペプチドが、7アミノ酸長である、請求項16記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項18】

別個の脳構造が、淡蒼球、被殻、内包、尾状核、前障、黒質、運動皮質、島、側頭皮質、視床、海馬、海馬台、および深部小脳核である、請求項1～17のいずれか一項記載の修飾型AAVカプシドタンパク質。

【請求項19】

請求項1～18のいずれか一項記載の修飾型カプシドタンパク質をコードする配列を含む、核酸。

【請求項20】

請求項1～18のいずれか一項記載の修飾型カプシドタンパク質を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ウイルス。

【請求項21】

請求項1～18のいずれか一項記載の修飾型カプシドタンパク質をコードする核酸を含む、ウイルスベクター。

【請求項22】

関心対象の核酸をコードする核酸配列をさらに含む、請求項21記載のウイルスベクター。

【請求項23】

関心対象の核酸が、治療剤である、請求項22記載のウイルスベクター。

【請求項24】

治療剤が、タンパク質またはRNAi分子である、請求項23記載のウイルスベクター。

【請求項25】

請求項21～24のいずれか一項記載のウイルスベクターを含む、細胞。

【請求項26】

哺乳動物細胞である、請求項25記載の細胞。

【請求項27】

ヒト細胞である、請求項25記載の細胞。

【請求項28】

インビトロである、請求項25記載の細胞。

【請求項29】

インビボである、請求項25記載の細胞。

【請求項30】

請求項20記載のウイルスベクターと、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項31】

請求項20記載のウイルスを対象へ投与する工程を含む、対象の別個の脳構造に薬剤を送達する方法。

【請求項32】

薬剤が、siRNA、shRNA、miRNA、非コードRNA、lncRNA、治療用タンパク質、またはCRISPR系である、請求項31記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 33】

投与が、中枢神経系への投与である、請求項31～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 34】

投与が、大槽、脳室内腔、上衣、脳室、くも膜下腔、および/または髄腔内への投与である、請求項33記載の方法。

【請求項 35】

投与が、淡蒼球への投与である、請求項33記載の方法。

【請求項 36】

投与が、全身投与である、請求項31～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 37】

多数のウイルス粒子が投与される、請求項31～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項 38】

ウイルスが、1キログラムあたり約 1×10^6 ～約 1×10^{18} ベクターゲノム (vg/kg) の用量で投与される、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

ウイルスが、患者の体重に基づき約 1×10^7 ～ 1×10^{17} 、約 1×10^8 ～ 1×10^{16} 、約 1×10^9 ～ 1×10^{15} 、約 1×10^{10} ～ 1×10^{14} 、約 1×10^{10} ～ 1×10^{13} 、約 1×10^{10} ～ 1×10^{11} 、約 1×10^{11} ～ 1×10^{12} 、約 1×10^{12} ～ 1×10^{13} 、または約 1×10^{13} ～ 1×10^{14} vg/kgの用量で投与される、請求項37記載の方法。

【請求項 40】

対象が、ヒトである、請求項31～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 41】

請求項20記載のウイルスを哺乳動物へ投与する工程を含む、哺乳動物における疾患を処置する方法。

【請求項 42】

疾患が、神経変性疾患である、請求項41記載の方法。

【請求項 43】

神経変性疾患が、ハンチントン病、ALS、遺伝性痙攣性片麻痺、原発性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、ケネディ病、アルツハイマー病、ポリグルタミンリピート病、またはパーキンソン病である、請求項42記載の方法。

【請求項 44】

哺乳動物が、ヒトである、請求項41記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本願は、2022年5月11日に出願された米国仮出願第63/340,823号および2022年5月16日に出願された米国仮出願第63/342,324号に基づく優先権の恩典を主張するものであり、それらの各々の内容全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表の参照

本願は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、電子的に提出された配列表XMLを含有している。2023年5月9日に作成された該配列表XMLは、CHOPP0054WO_ST26.xmlという名前であり、32,221バイトのサイズである。

【0003】

1. 分野

本開示は、概して、医学およびウイルス学の領域に関する。より具体的には、分子治療薬を脳深部構造に送達するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 関連技術の説明

合理的設計および定向進化を含む、AAVベクターバリエーションを生成するための種々の戦略が開発されている。合理的設計アプローチは、形質導入の効率または特異性を変更するための標的特異的な変化をカプシドに加えるため、例えば、形質導入効率を増加させるためのチロシン変異をカプシド表面において加えるため、AAVカプシドの知識を利用する。しかしながら、脳深部構造を特異的または効率的に標的とするAAVバリエーションは存在しない。ハンチントン病（HD）およびパーキンソン病（PD）を含む疾患は、既存のAAVバリエーションが効果的に標的とすることができない脳深部構造に主に影響する。そのため、脳深部構造を標的とすることができるAAVバリエーションが必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

概要

本明細書において提供されるのは、修飾型カプシドを各々含むウイルスベクターであり、ここで、修飾型カプシドは、ウイルスベクターを別個の脳構造にターゲティングする少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。

【0006】

1つの態様において、提供されるのは、修飾型アデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドタンパク質を含むウイルスベクターを別個の器官または脳構造にターゲティングするターゲティングペプチドを含む修飾型AAVカプシドタンパク質であり、ターゲティングペプチドは3～10アミノ酸長である。いくつかの局面において、修飾型AAVカプシドタンパク質は、修飾型AAV1カプシドタンパク質、修飾型AAV2カプシドタンパク質、または修飾型AAV9カプシドタンパク質である。

【0007】

いくつかの局面において、修飾型AAVカプシドタンパク質は、AAV1カプシドタンパク質（SEQ ID NO:1参照）に由来し、ターゲティングペプチドは、AAV1カプシドタンパク質の残基590の後に挿入されている。いくつかの局面において、ターゲティングペプチドにはリンカー配列が隣接しており、ターゲティングペプチドの各側のリンカー配列は、2または3アミノ酸長である。いくつかの局面において、ターゲティングペプチドのN末端側のリンカー配列はSSAであり、ターゲティングペプチドのC末端側のリンカー配列はASである。いくつかの局面において、修飾型AAV1カプシドタンパク質は、SEQ ID NO:4と少なくとも95%同一の配列を有する。

【0008】

いくつかの局面において、修飾型AAVカプシドタンパク質は、AAV2カプシドタンパク質（SEQ ID NO:2参照）に由来し、ターゲティングペプチドは、AAV2カプシドタンパク質の残基587の後に挿入されている。いくつかの局面において、ターゲティングペプチドにはリンカー配列が隣接しており、ターゲティングペプチドの各側のリンカー配列は、2または3アミノ酸長である。いくつかの局面において、ターゲティングペプチドのN末端側のリンカー配列はAAAであり、ターゲティングペプチドのC末端側のリンカー配列はAAである。いくつかの局面において、修飾型AAV2カプシドタンパク質は、SEQ ID NO:5と少なくとも95%同一の配列を有する。

【0009】

いくつかの局面において、修飾型AAVカプシドタンパク質は、AAV9カプシドタンパク質（SEQ ID NO:3参照）に由来し、ターゲティングペプチドは、AAV9カプシドタンパク質の残基588の後に挿入されている。いくつかの局面において、ターゲティングペプチドにはリンカー配列が隣接しており、ターゲティングペプチドの各側のリンカー配列は、2または3アミノ酸長である。いくつかの局面において、ターゲティングペプチドのN末端側のリンカー配列はAAAであり、ターゲティングペプチドのC末端側のリンカー配列はASである。いくつかの局面において、修飾型AAV9カプシドタンパク質は、SEQ ID NO:6と少なくとも95%同一の配列を有する。

【0010】

いくつかの局面において、標的ペプチドは、SEQ ID NO:7~13からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:8、10、12、14、16、および18からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を内部に有する最大10アミノ酸長の配列を含む。いくつかの局面において、ターゲティングペプチドは、7アミノ酸長である。いくつかの局面において、AAVカプシドタンパク質は、SEQ ID NO:19~24のいずれかの配列を有する。

【0011】

いくつかの局面において、別個の脳構造は、脳深部構造、例えば、淡蒼球、被殻、内包、尾状核、前障、黒質、視床、海馬、海馬台、および小脳深部核である。いくつかの局面において、別個の脳構造は、運動皮質または側頭皮質である。いくつかの局面において、別個の脳構造は、運動皮質および運動前野の第V/VI層投射ニューロンである。

10

【0012】

1つの態様において、本明細書において提供されるのは、本発明の態様のうちの任意のものの修飾型カプシドタンパク質をコードする配列を含む核酸である。

【0013】

1つの態様において、本明細書において提供されるのは、本発明の態様のうちの任意のものの修飾型カプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)である。いくつかの局面において、rAAVの組み合わせが提供される。いくつかの局面において、rAAVは、肝細胞に形質導入しない。

【0014】

1つの態様において、本明細書において提供されるのは、本発明の態様のうちの任意のものの修飾型カプシドタンパク質をコードする核酸を含むウイルスベクターである。いくつかの局面において、ウイルスベクターは、関心対象の核酸をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの局面において、関心対象の核酸は、治療剤である。いくつかの局面において、治療剤は、酵素またはRNAi分子である。

20

【0015】

1つの態様において、本明細書において提供されるのは、本発明の態様のうちの任意のもののウイルスベクターを含む細胞である。いくつかの局面において、細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である。いくつかの局面において、細胞は、インビトロまたはインビボである。

30

【0016】

1つの態様において、本明細書において提供されるのは、本発明の態様のウイルスベクターと薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物である。

【0017】

1つの態様において、本明細書において提供されるのは、薬剤をコードするAAVウイルスを淡蒼球へ直接投与することを含む、対象の別個の脳構造に薬剤を送達する方法である。いくつかの局面において、AAVウイルスは、本発明の態様のウイルスである。

【0018】

1つの態様において、本明細書において提供されるのは、本発明の態様のウイルスを対象へ投与することを含む、対象の別個の脳構造に薬剤を送達する方法である。いくつかの局面において、別個の脳構造は、淡蒼球、被殻、内包、尾状核、前障、黒質、運動皮質、島、側頭皮質、視床、海馬、海馬台、および深部小脳核である。いくつかの局面において、別個の脳構造は、運動皮質および運動前野の第V/VI層投射ニューロンである。

40

【0019】

いくつかの局面において、薬剤は、siRNA、shRNA、miRNA、非コードRNA、lncRNA、治療用タンパク質、またはCRISPR系である。いくつかの局面において、投与は、中枢神経系への投与である。いくつかの局面において、投与は、大槽、脳室内腔、上衣、脳室、くも膜下腔、および/または髄腔内への投与である。いくつかの局面において、脳室は、吻側側脳室、および/または尾側側脳室、および/または右側脳室、および/または左側脳室、および/または右吻側側脳室、および/または左吻側側脳室、および/または右

50

尾側側脳室、および/または左尾側側脳室である。いくつかの局面において、投与は、全身投与である。

【0020】

いくつかの局面において、多数のウイルス粒子が投与される。いくつかの局面において、ウイルスは、1キログラムあたり約 1×10^6 ～約 1×10^{18} ベクターゲノム (vg/kg) の用量で投与される。いくつかの局面において、ウイルスは、患者の体重に基づき、約 1×10^7 ～ 1×10^{17} 、約 1×10^8 ～ 1×10^{16} 、約 1×10^9 ～ 1×10^{15} 、約 1×10^{10} ～ 1×10^{14} 、約 1×10^{10} ～ 1×10^{13} 、約 1×10^{10} ～ 1×10^{13} 、約 1×10^{10} ～ 1×10^{11} 、約 1×10^{11} ～ 1×10^{12} 、約 1×10^{12} ～ 1×10^{13} 、または約 1×10^{13} ～ 1×10^{14} vg/kgの用量で投与される。いくつかの局面において、対象は、ヒトである。

10

【0021】

1つの態様において、本明細書において提供されるのは、本発明の態様のウイルスを哺乳動物へ投与することを含む、哺乳動物の疾患を処置する方法である。いくつかの局面において、疾患は、神経変性疾患である。いくつかの局面において、神経変性疾患は、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、遺伝性痙攣性片麻痺、原発性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、ケネディ病、アルツハイマー病、ポリグルタミンリピート病、またはパーキンソン病である。いくつかの局面において、哺乳動物は、ヒトである。

【0022】

本発明の他の目的、特色、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。しかしながら、この詳細な説明から、本発明の本旨および範囲に含まれる様々な変化および修飾が当業者に明らかになるため、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい態様を示しているが、例示のために与えられているに過ぎないことが理解されるべきである。

20

【図面の簡単な説明】

【0023】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明のある特定の局面をさらに示すために含まれている。本発明は、本明細書に提示された具体的な態様の詳細な説明と組み合わせ、これらの図面のうちの1つまたは複数を参照することによって、よりよく理解され得る。

【0024】

【図1】淡蒼球（注入部位）の細胞内のmRNAの局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および核に局在している。大部分の細胞が、3つのカプシドバリエーション全てについて陽性である。

30

【図2】淡蒼球（注入部位）の細胞内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および突起の両方に局在している。具体的には、FISHによると、mRuby3 mRNAが淡蒼球ニューロンの細胞体に存在したが、タンパク質についての陽性シグナルは、この組織スラブに、ほとんどまたは全く存在しない。

【図3】尾側淡蒼球（注入部位）の細胞内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定する、図2の画像とは異なる淡蒼球領域からの落射蛍光画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および突起の両方に局在している。この組織切片には、mRubyシグナルが存在する。

40

【図4】被殻の細胞内のmRNAの局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性mRNAシグナルは、これらの細胞の細胞体および核に局在している。mNeonGreen (mNG) を発現するカプシドバリエーションは、被殻内の細胞の最も高い形質導入を示す。

【図5】被殻の細胞内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および突起の両方に局在している。FISHによるmRNAと同様に、mNeonGreen (mNG) を発現する新規カプシドバリエーション

50

トは、細胞および突起の両方において最も多くの陽性シグナルを示す。

【図 6】内包内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。mTFP1およびNeonGreenの蛍光の陽性シグナルの顕著な分離が存在する。

【図 7】尾状核の細胞内の mRNA の局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性 mRNA シグナルは、これらの細胞の細胞体に局在している。

【図 8】尾状核の細胞内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および突起の両方に局在している。

【図 9】前障の細胞内の mRNA の局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性 mRNA シグナルは、これらの細胞の細胞体に局在している。

【図 10】前障内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。再び、蛍光の陽性シグナルは、細胞体および細胞突起の両方に見られる。

【図 11】黒質の細胞内の mRNA の局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性 mRNA シグナルは、これらの細胞の細胞体および核に局在している。

【図 12】図 11 の画像とは異なる領域からの、黒質の細胞内の mRNA の局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性 mRNA シグナルは、これらの細胞の細胞体および核に局在している。

【図 13】黒質内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。蛍光の陽性シグナルは、細胞体および細胞突起の両方に見られる。

【図 14】図 13 の画像とは異なる領域からの、黒質内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。蛍光の陽性シグナルは、細胞細胞体および細胞突起の両方に見られる。

【図 15】運動皮質の細胞内の mRNA の局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性 mRNA シグナルは、これらの細胞の細胞体および核に局在している。

【図 16】運動皮質の細胞内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および突起の両方に局在している。際だったことに、FISH によると、mTFP1 および mNeonGreen の両方について mRNA シグナルが存在した；しかしながら、落射蛍光によって示されるように、主に発現されているのは mTFP1 である。

【図 17】帯状皮質においては、わずかな新規カプシド mRNA 陽性細胞が、FISH によって検出された。しかしながら、広範囲の mTFP1 陽性細胞が、落射蛍光顕微鏡法によって検出された。

【図 18】側頭皮質の島の細胞内の mRNA の局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性 mRNA シグナルは、これらの細胞の細胞体（細胞質および核）に局在している。

【図 19】側頭皮質の島の細胞内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および突起の両方に局在している。

【図 20】視床の細胞内の mRNA の局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) 画像。陽性 mRNA シグナルは、これらの細胞の細胞体（細胞質および核）に局在している。

【図 21】視床の細胞内の各特異的蛍光色素からのタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および突起の両方に局在している

10

20

30

40

50

。

【図22】図22A～D。アカゲザルの淡蒼球に送達された上位3つの新規カプシドの落射蛍光画像。被殻においては、3つ全ての発現が高度である。(A) AAV1.THTD.mTFP1の発現を示す画像；(B) AAV2.SGGR.mNeonGreenの発現を示す画像；(C) AAV2.SKGQ.mRuby3の発現を示す画像；(D) A～Cのマージされた画像。

【図23】図23A～D。アカゲザルの淡蒼球に送達された上位3つの新規カプシドの落射蛍光画像。運動皮質においては、AAV1.THTD.mTFP1の発現が極めて高度である。(A) AAV1.THTD.mTFP1の発現を示す画像；(B) AAV2.SGGR.mNeonGreenの発現を示す画像；(C) AAV2.SKGQ.mRuby3の発現を示す画像；(D) A～Cのマージされた画像。

10

【図24】図24A～D。アカゲザルの淡蒼球に送達された上位3つの新規カプシドの落射蛍光画像。3つ全ての発現が、海馬(CA1)および隣接する海馬台に局在している。(A) AAV1.THTD.mTFP1の発現を示す画像；(B) AAV2.SGGR.mNeonGreenの発現を示す画像；(C) AAV2.SKGQ.mRuby3の発現を示す画像；(D) A～Cのマージされた画像。

【図25】第2のアカゲザルの淡蒼球(注射部位)の細胞内のmRNAの局在を決定するための、各特異的蛍光色素についての、共焦点顕微鏡法によって撮影された蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および核に局在している。

【図26】第2のアカゲザルの淡蒼球(注射部位)の細胞内の各特異的蛍光色素からタンパク質の局在を決定するための、落射蛍光画像。陽性シグナルは、これらの細胞の細胞体および突起の両方に局在している。

20

【図27】内包/内側淡蒼球にウイルスを注射されたマウスに由来する脳および脊髄のホルマウント。マウス番号は左側にあり、それらのID番号は、どの半球がどの蛍光色素発現カプシドを受容したかを反映するため、色分けされている。

【図28】視床にウイルスを注射されたマウスに由来する脳および脊髄のホルマウント。マウス番号は左側にあり、それらのID番号は、どの半球がどの蛍光色素発現カプシドを受容したかを反映するため、色分けされている。

【図29】小脳深部核にウイルスを注射されたマウスに由来する脳および脊髄のホルマウント。マウス番号は左側にあり、それらのID番号は、どの半球がどの蛍光色素発現カプシドを受容したかを反映するため、色分けされている。

30

【図30】左の内包および内側淡蒼球にAAV2.SGGR.mNeonGreen、右にAAV2.SKGQ.mRuby3を注射されたマウスに由来する4つの冠状脳スライス。

【図31】左の内包および内側淡蒼球にAAV2.SKGQ.mRuby3、右にAAV1.THTD.mTFP1を注射されたマウスに由来する3つの冠状脳スライス。

【図32】左の視床にAAV2.SGGR.mNeonGreen、右にAAV2.SKGQ.mRuby3を注射されたマウスに由来する4つの冠状脳スライス。小脳および後脳の単一矢状切片。

【図33】左の視床にAAV2.SKGQ.mRuby3、右にAAV1.THTD.mTFP1を注射されたマウスに由来する4つの冠状脳スライス。小脳および脳幹の矢状切片は、AAV1.THTD.mTFP1陽性の小脳深部核内のニューロンを示している。

40

【図34】左の小脳深部核にAAV1.THTD.mTFP1、右にAAV2.SGGR.mNeonGreenを注射された小脳の矢状切片。

【図35】左の小脳深部核にAAV1.THTD.mTFP1、右にAAV2.SGGR.mNeonGreenを注射された外側大脳の矢状切片。

【図36】左の小脳深部核にAAV1.THTD.mTFP1、右にAAV2.SGGR.mNeonGreenを注射された脳全体の矢状切片。大脳全体にAAV1.THTD.mTFP1陽性のニューロンおよび突起が存在する。

【図37】左の小脳深部核にAAV2.SKGQ.mRuby3、右にAAV1.THTD.mTFP1を注射された脳全体の矢状切片。大脳全体にAAV1.THTD.mTFP1陽性のニューロンおよび突起が存在する。

50

【図38-1】図38A~38C。サンプリングされた脳領域におけるAAVカプシドバリエーションのUMI濃縮のヒートマップ表示。(図38A) AAVペプチド挿入の領域にわたるアンプリコンシーケンシング(Amplicon seq)は、多数のサンプリングされた組織における送達されたカプシドバリエーションの分子バーコード(Unique Molecular Identifier)(UMI)カウントを収集することを可能にした。(A)におけるアンプリコンは、形質導入された組織から回収されたカプシドDNAから生成された。各カプシドバリエーションの%存在量が、示された各組織について表される。蛍光による検証に進められたカプシドが示されている。(図38B) (A)に示されたのと同じDNAアンプリコンシーケンシングUMIカウントを、インプットに対する濃縮を計算することによってノーマライズした。最も高度に表されたカプシド候補は、インプットカプシドプールにおける存在量に対して最も高い濃縮を示すものである。(図38C) アンプリコンシーケンシングによってRNAから得られたUMIカウントの%存在量。

10

【図38-2】図38-1の説明を参照。

【図39】アカゲザルの運動皮質および運動前野の多数の皮質第V/VI層投射ニューロンにおけるAAV1.THTD.mTFP1の局在を決定するための落射蛍光画像。

【図40】アカゲザルの肝臓において、AAV gDNAおよびタンパク質発現は、検出閾値を下回っていた。

【発明を実施するための形態】

【0025】

詳細な説明

20

本明細書において提供されるのは、修飾型カプシドを各々含むウイルスベクターであり、ここで、修飾型カプシドは、ウイルスベクターを脳深部構造にターゲティングする少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。ある特定の態様において、脳構造は、淡蒼球、被殻、内包、尾状核、前障、黒質、運動皮質、島、側頭皮質、視床、海馬、海馬台、および深部小脳核である。ある特定の態様において、AAVは、AAV1、AAV2、またはAAV9である。例示的な野生型参照AAV1カプシドタンパク質配列は、SEQ ID NO:1に提供される。例示的な野生型参照AAV2カプシドタンパク質配列は、SEQ ID NO:2に提供される。例示的な野生型参照AAV9カプシドタンパク質配列は、SEQ ID NO:3に提供される。ある特定の局面において、ターゲティングペプチドは、AAV1カプシドの590位、AAV2カプシドの587位、またはAAV9カプシドの588位に挿入されている。例示的な修飾型AAV1カプシドタンパク質配列は、SEQ ID NO:4に提供され、SSAX₇AS(最初のSSAおよび最後のASはリンカー配列であり、X₇がターゲティングペプチドを表す)として、590位の後にターゲティングペプチドの挿入を示している。例示的な修飾型AAV2カプシドタンパク質配列は、SEQ ID NO:5に提供され、AAAX₇AA(最初のAAAおよび最後のAAはリンカー配列であり、X₇がターゲティングペプチドを表す)として、587位の後にターゲティングペプチドの挿入を示している。例示的な修飾型AAV9カプシドタンパク質配列は、SEQ ID NO:6に提供され、AAAX₇AS(最初のAAAおよび最後のASはリンカー配列であり、X₇がターゲティングペプチドを表す)として、588位の後にターゲティングペプチドの挿入を示している。

30

【0026】

40

I. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、パルボウイルス科の小型の非病原性ウイルスである。現在までに、多数の血清学的に区別されるAAVが同定されており、ヒトまたは霊長類から単離されたものは12を超える。AAVは、複製のためのヘルパーウイルスに対する依存によって、この科の他のメンバーから区別される。

【0027】

AAVゲノムは、宿主細胞ゲノムに組み込まれることなく染色体外状態で存在することができ；広い宿主域を有しており；インビトロおよびインビボで分裂細胞および非分裂細胞の両方に形質導入し、形質導入された遺伝子の高レベルの発現を維持する。AAVウイルス粒子は、熱安定性があり；溶媒、界面活性剤、pH変化、および温度に対して抵抗性

50

であり；CsCl勾配またはその他の手段によって、カラム精製され、かつ/または濃縮され得る。AAVゲノムは、プラス鎖またはマイナス鎖のいずれかの一本鎖デオキシリボ核酸（ssDNA）を含む。約4.7kbのAAVゲノムは、プラス極性またはマイナス極性のいずれかの一本鎖DNAの1つのセグメントからなる。ゲノムの末端は、ヘアピン構造へと折り畳まれ、ウイルスDNA複製の起点として機能することができる短い末端逆位配列（ITR）である。

【0028】

AAV「ゲノム」とは、最終的にはパッケージングまたは被包されてAAV粒子を形成する組換え核酸配列をさす。AAV粒子は、多くの場合、AAVカプシドタンパク質によってパッケージングされたAAVゲノムを含む。組換えベクターを構築または製造するために、組換えプラスミドが使用される場合、AAVベクターゲノムは、組換えプラスミドのベクターゲノム配列に相当しない「プラスミド」の部分を、含まない。組換えプラスミドのこの非ベクターゲノム部分は「プラスミド骨格」と呼ばれ、プラスミドのクローニングおよび増幅のために重要であり、プラスミドの増殖および産生のために必要な過程であるが、それ自体がウイルス粒子にパッケージングまたは被包されることはない。したがって、AAVベクター「ゲノム」とは、AAVカプシドタンパク質によってパッケージングまたは被包される核酸をさす。

【0029】

AAVビリオン（粒子）は、AAVカプシドを含む、直径約25nmの、エンベロープを有しない正二十面体粒子である。AAV粒子は、共に相互作用してカプシドを形成する、3つの関連するカプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3から構成される正二十面体対称を含む。大部分のネイティブAAVのゲノムは、多くの場合、2つのオープンリーディングフレーム（ORF）を含有しており、それらは、左ORFおよび右ORFと呼ばれることもある。右ORFは、多くの場合、カプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3をコードする。これらのタンパク質は、多くの場合、それぞれ、1:1:10の比で見出されるが、異なる比の場合もあり、全て右側のORFに由来する。カプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3は、オルタナティブスプライシングおよび稀な開始コドンの使用によって、互いに異なっている。欠失分析は、オルタナティブスプライシングを受けたメッセージから翻訳されるVP1の除去または変更が、感染性粒子の収量の低下をもたらすことを示している。VP3コード領域内の変異は、一本鎖子孫DNAまたは感染性粒子の産生の失敗をもたらす。ある特定の態様において、AAV粒子のゲノムは、1つ、2つ、または3つ全てのVP1ポリペプチド、VP2ポリペプチド、およびVP3ポリペプチドをコードする。

【0030】

左ORFは、一本鎖子孫ゲノムの産生に加えて、複製および転写の制御に関与している非構造Repタンパク質、Rep 40、Rep 52、Rep 68、およびRep 78を多くの場合コードする。Repタンパク質のうちの2つは、ヒト19番染色体のqアームの領域へのAAVゲノムの優先的組み込みに関連付けられている。Rep68/78は、NTP結合活性を有し、DNAヘリカーゼ活性およびRNAヘリカーゼ活性も有することが示されている。いくつかのRepタンパク質は、核局在化シグナルを有し、いくつかの潜在的なリン酸化部位も有している。ある特定の態様において、AAV（例えば、rAAV）のゲノムは、Repタンパク質のうちのいくつかまたは全てをコードする。ある特定の態様において、AAV（例えば、rAAV）のゲノムは、Repタンパク質をコードしない。ある特定の態様において、Repタンパク質のうちの1つまたは複数は、トランスで送達されてもよく、したがって、ポリペプチドをコードする核酸を含むAAV粒子には含まれない。

【0031】

AAVゲノムの末端は、ウイルスDNA複製の起点として機能するT字型ヘアピン構造へと折り畳まれる可能性を有する短い末端逆位配列（ITR）を含む。したがって、AAVのゲノムは、一本鎖ウイルスDNAゲノムに隣接する1つまたは複数の（例えば、一對の）ITR配列を含む。ITR配列は、多くの場合、各々約145塩基の長さを有する。ITR領域内では、ITRの機能の中心であると考えられる2つの要素、GAGCリピートモチーフおよび

末端分解部位 (terminal resolution site) (trs) が記載されている。リピートモチーフは、ITRが直鎖型またはヘアピン型のいずれかのコンフォメーションにある時に、Repに結合することが示されている。この結合が、部位特異的かつ鎖特異的に起こるtrsにおける切断のため、Rep68/78を位置付けると考えられている。複製における役割に加えて、これらの2つの要素は、ウイルス組み込みの中心であるようである。19番染色体の組み込み遺伝子座に含有されているのは、trsが隣接するRep結合部位である。これらの要素は、遺伝子座特異的な組み込みのため、機能性であり必要であることが示されている。

【0032】

「組換え」という用語は、組換えウイルスベクター、例えば、組換えレンチウイルスベクターまたは組換えパルボウイルス（例えば、AAV）ベクターなどのベクターの修飾語としても、組換え核酸配列および組換えポリペプチドなどの配列の修飾語としても、一般に、天然には起こらない様式で、組成物が操作（即ち、改変）されていることを意味する。組換えベクター、例えば、組換えAAVベクター、組換えレトロウイルスベクター、または組換えレンチウイルスベクターの具体例は、野生型ウイルスゲノムに通常存在しない核酸配列が、ウイルスゲノム内に挿入されているものである。組換え核酸配列の例は、核酸（例えば、遺伝子）が、ベクターにクローニングされた阻害性RNAをコードしており、ウイルスゲノム内で遺伝子が通常関連している5'領域、3'領域、および/もしくはイントロン領域を含むか、または含まないものである。「組換え」という用語は、ウイルスベクターなどのベクター、およびポリヌクレオチドなどの配列に関して、本明細書において必ず使用されるわけではないが、そのような省略にも関わらず、核酸配列、ポリヌクレオチド、トランスジーン等を含む「組換え」型は、明白に含まれる。

【0033】

組換えウイルス「ベクター」は、分子的方法を使用してウイルスから野生型ゲノムの一部を除去し、非ネイティブの核酸、例えば、核酸配列に交換することによって、野生型ウイルスゲノムから得られる。典型的には、例えば、AAVの場合、AAVゲノム的一方または両方の末端逆位配列 (ITR) 配列は、組換えAAVベクターに保持される。「組換え」ウイルスベクター（例えば、rAAV）は、ウイルスゲノム核酸に対して、非ネイティブの配列、例えば、トランスアクチベーターをコードする核酸、または阻害性RNAをコードする核酸、または治療用タンパク質をコードする核酸に、ウイルスゲノムの一部が交換されているため、ウイルス（例えば、AAV）ゲノムから区別される。したがって、そのような非ネイティブ核酸配列の組み入れが、ウイルスベクターを「組換え」ベクターとして定義し、「組換え」ベクターは、AAVの場合には「rAAVベクター」とも呼ばれる。

【0034】

ある特定の態様において、AAV（例えば、rAAV）は、2つのITRを含む。ある特定の態様において、AAV（例えば、rAAV）は、一対のITRを含む。ある特定の態様において、AAV（例えば、rAAV）は、機能または活性を有するポリペプチドを少なくともコードする核酸配列に隣接する（即ち、その5'末端および3'末端の各々にある）一対のITRを含む。

【0035】

AAVベクター（例えば、rAAVベクター）は、エキスピボ、インピトロ、またはインピボの細胞のその後の感染（形質導入）のため、パッケージングされ得、本明細書において「AAV粒子」と呼ばれる。組換えAAVベクターがAAV粒子に被包またはパッケージングされている場合、その粒子は「rAAV粒子」とも呼ばれる。ある特定の態様において、AAV粒子は、rAAV粒子である。rAAV粒子は、多くの場合、rAAVベクターまたはその一部分を含む。rAAV粒子は、1つまたは複数のrAAV粒子（例えば、多数のAAV粒子）であり得る。rAAV粒子は、典型的には、rAAVベクターゲノムを被包またはパッケージングするタンパク質（例えば、カプシドタンパク質）を含む。rAAVベクターへの言及は、rAAV粒子に言及するためにも使用され得ることに注意する。

【0036】

任意の適当なAAV粒子（例えば、rAAV粒子）が、本明細書中の方法または使用のために使用され得る。rAAV粒子、および/またはそれに含まれるゲノムは、AAVの任意の適当な血清型または株に由来し得る。rAAV粒子、および/またはそれに含まれるゲノムは、AAVの2つ以上の血清型または株に由来してもよい。したがって、rAAVは、AAVの任意の血清型または株のタンパク質および/もしくは核酸またはそれらの一部分を含んでいてよく、ここで、AAV粒子は、哺乳動物細胞の感染および/または形質導入に適している。AAV血清型の非限定的な例には、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-rh74、AAV-rh10、およびAAV-2i8が含まれる。

【0037】

ある特定の態様において、多数のrAAV粒子は、同じ株もしくは血清型（もしくはサブグループもしくはバリエーション）の粒子、またはそれに由来する粒子を含む。ある特定の態様において、多数のrAAV粒子は、（例えば、異なる血清型および/または株の）2つ以上の異なるrAAV粒子の混合物を含む。

【0038】

本明細書において使用されるように、「血清型」という用語は、他のAAV血清型と血清学的に区別されるカプシドを有するAAVをさすために使用される区別である。血清学的特殊性は、もう1つのAAVと比較した、あるAAVに対する抗体の間の交差反応性の欠如に基づき決定される。そのような交差反応性の違いは、一般的に、カプシドタンパク質配列/抗原決定基の違いによる（例えば、AAV血清型のVP1、VP2、および/またはVP3の配列の違いによる）。カプシドバリエーションを含むAAVバリエーションは、参照AAVまたはその他のAAV血清型と血清学的に区別されない可能性があるにも関わらず、参照またはその他のAAV血清型と比較して、少なくとも1つのヌクレオチドまたはアミノ酸残基が異なっている。

【0039】

ある特定の態様において、第1の血清型のゲノムに基づくrAAVベクターは、ベクターをパッケージングするカプシドタンパク質のうちの1つまたは複数の血清型に相当する。例えば、AAVベクターゲノムを構成する1つまたは複数のAAV核酸（例えば、ITR）の血清型は、rAAV粒子を構成するカプシドの血清型に相当する。

【0040】

ある特定の態様において、rAAVベクターゲノムは、ベクターをパッケージングするAAVカプシドタンパク質のうちの1つまたは複数の血清型とは区別される、AAV（例えば、AAV2）血清型のゲノムに基づいていてもよい。例えば、3つのカプシドタンパク質のうち少なくとも1つまたは複数の異なる血清型、例えば、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、もしくはAAV-2i8の血清型、またはそれらのバリエーションに由来する一方で、rAAVベクターゲノムは、AAV2由来の核酸（例えば、ITR）を含んでいてよい。

【0041】

ある特定の態様において、参照血清型に関するrAAV粒子またはそのベクターゲノムは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、またはAAV-2i8の粒子のポリヌクレオチド、ポリペプチド、または部分配列と少なくとも60%またはそれ以上（例えば、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等）同一である配列を含むか、またはそれからなるポリヌクレオチド、ポリペプチド、または部分配列を有する。具体的な態様において、参照血清型に関するrAAV粒子またはそのベクターゲノムは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、またはAAV-2i8の血清型のカプシドまたはITR配列と少なくとも60%またはそれ以上（例えば、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等）同一である配列を含むか、また

はそれからなるカプシドまたはITR配列を有する。

【0042】

ある特定の態様において、本明細書中の方法は、rAAV1、rAAV2、rAAV3、rAAV4、rAAV5、rAAV6、rAAV7、rAAV8、rAAV9、rAAV10、rAAV11、rAAV12、rRh10、rRh74、またはrAAV-2i8の粒子の使用、投与、または送達を含む。

【0043】

ある特定の態様において、本明細書中の方法は、rAAV2粒子の使用、投与、または送達を含む。ある特定の態様において、rAAV2粒子は、AAV2カプシドを含む。ある特定の態様において、rAAV2粒子は、ネイティブまたは野生型のAAV2粒子の対応するカプシドタンパク質と少なくとも60%、65%、70%、75%、またはそれ以上同一、例えば、80%、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、最大100%同一である1つまたは複数のカプシドタンパク質（例えば、VP1、VP2、および/またはVP3）を含む。ある特定の態様において、rAAV2粒子は、ネイティブまたは野生型のAAV2粒子の対応するカプシドタンパク質と少なくとも75%またはそれ以上同一、例えば、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、最大100%同一であるカプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3を含む。ある特定の態様において、rAAV2粒子は、ネイティブまたは野生型のAAV2粒子のバリエーションである。いくつかの局面において、AAV2バリエーションの1つまたは複数のカプシドタンパク質は、ネイティブまたは野生型のAAV2粒子のカプシドタンパク質と比較して、1、2、3、4、5、5~10、10~15、15~20、またはそれ以上のアミノ酸置換を有する。

【0044】

ある特定の態様において、rAAV9粒子は、AAV9カプシドを含む。ある特定の態様において、rAAV9粒子は、ネイティブまたは野生型のAAV9粒子の対応するカプシドタンパク質と少なくとも60%、65%、70%、75%、またはそれ以上同一、例えば、80%、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、最大100%同一である1つまたは複数のカプシドタンパク質（例えば、VP1、VP2、および/またはVP3）を含む。ある特定の態様において、rAAV9粒子は、ネイティブまたは野生型のAAV9粒子の対応するカプシドタンパク質と少なくとも75%またはそれ以上同一、例えば、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、最大100%同一であるカプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3を含む。ある特定の態様において、rAAV9粒子は、ネイティブまたは野生型のAAV9粒子のバリエーションである。いくつかの局面において、AAV9バリエーションの1つまたは複数のカプシドタンパク質は、ネイティブまたは野生型のAAV9粒子のカプシドタンパク質と比較して、1、2、3、4、5、5~10、10~15、15~20、またはそれ以上のアミノ酸置換を有する。

【0045】

ある特定の態様において、rAAV粒子は、1つまたは複数の所望のITR機能（例えば、DNA複製；宿主細胞ゲノムへのAAV DNAの組み込み、および/または、所望の場合、パッケージングを可能にするヘアピンを形成する能力）を保持している限り、ネイティブまたは野生型のAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-rh74、AAV-rh10、またはAAV-2i8の対応するITRと少なくとも75%またはそれ以上同一、例えば、80%、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、最大100%同一である1つまたは2つのITR（例えば、一対のITR）を含む。

【0046】

ある特定の態様において、rAAV2粒子は、1つまたは複数の所望のITR機能（例えば、

DNA複製；宿主細胞ゲノムへのAAV DNAの組み込み；および/または、所望の場合、パッケージングを可能にするヘアピンを形成する能力）を保持している限り、ネイティブまたは野生型のAAV2粒子の対応するITRと少なくとも75%またはそれ以上同一、例えば、80%、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、最大100%同一である1つまたは2つのITR（例えば、一对のITR）を含む。

【0047】

ある特定の態様において、rAAV9粒子は、1つまたは複数の所望のITR機能（例えば、DNA複製；宿主細胞ゲノムへのAAV DNAの組み込み；および/または、所望の場合、パッケージングを可能にするヘアピンを形成する能力）を保持している限り、ネイティブまたは野生型のAAV2粒子の対応するITRと少なくとも75%またはそれ以上同一、例えば、80%、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、最大100%同一である1つまたは2つのITR（例えば、一对のITR）を含む。

【0048】

rAAV粒子は、任意の適当な数の「GAGC」リピートを有するITRを含み得る。ある特定の態様において、AAV2粒子のITRは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10、またはそれ以上の「GAGC」リピートを含む。ある特定の態様において、rAAV2粒子は、3つの「GAGC」リピートを含むITRを含む。ある特定の態様において、rAAV2粒子は、4つより少ない「GAGC」リピートを有するITRを含む。ある特定の態様において、rAAV2粒子は、4つより多い「GAGC」リピートを有するITRを含む。ある特定の態様において、rAAV2粒子のITRは、最初の2つの「GAGC」リピートの4番目のヌクレオチドがTではなくCであるRep結合部位を含む。

【0049】

rAAV粒子にパッケージング/被包するためのrAAVベクターに組み入れられ得るDNAの例示的な適当な長さは、約5キロベース（kb）以下であり得る。具体的な態様において、DNAの長さは、約5kb未満、約4.5kb未満、約4kb未満、約3.5kb未満、約3kb未満、または約2.5kb未満である。

【0050】

RNAiまたはポリペプチドの発現を指示する核酸配列を含むrAAVベクターは、当技術分野において公知の適当な組換え技術を使用して生成され得る（例えば、Sambrook et al., 1989を参照すること）。組換えAAVベクターは、典型的には、AAVウィルスパッケージング系を使用して、形質導入可能なAAV粒子にパッケージングされ、増殖させられる。形質導入可能なAAV粒子は、哺乳動物細胞に結合し、侵入し、その後、核酸カーゴ（例えば、異種遺伝子）を細胞の核に送達することができる。したがって、形質導入可能なインタクトrAAV粒子は、哺乳動物細胞に形質導入するよう構成される。哺乳動物細胞に形質導入するよう構成されたrAAV粒子は、多くの場合、複製能がなく、自己複製するための付加的なタンパク質機構を必要とする。したがって、哺乳動物細胞に形質導入するよう構成されたrAAV粒子は、哺乳動物細胞に結合し、侵入し、核酸を細胞に送達するよう改変されており、ここで、送達のための核酸は、多くの場合、rAAVゲノム内的一对のAAV ITRの間に位置付けられる。

【0051】

形質導入可能なAAV粒子を作製するための適当な宿主細胞には、異種rAAVベクターのレシピエントとして使用され得る、または使用されたことがある、微生物、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞が含まれるが、これらに限定されるわけではない。（例えば、アクセッション番号ATCC CRL1573で、American Type Culture Collectionを通じて容易に入手可能な）安定的なヒト細胞株HEK293に由来する細胞が使用され得る。ある特定の態様において、アデノウイルス5型DNA断片によって形質転換されており、アデノウイルスのE1a遺伝子およびE1b遺伝子を発現する修飾型ヒト胎児腎臓細胞株（例えば、HEK293）が、組換えAAV粒子を生成するために使用される。修飾型HEK293細胞

胞株は、容易にトランスフェクトされ、rAAV粒子を作製するための特に便利なプラットフォームを提供する。哺乳動物細胞に形質導入することができる高力価AAV粒子を生成する方法は、当技術分野において公知である。例えば、AAV粒子は、Wright, 2008およびWright, 2009に記載されるようにして作製され得る。

【0052】

ある特定の態様において、AAV発現ベクターのトランスフェクションの前に、またはそれと同時に、AAVヘルパー構築物によって宿主細胞にトランスフェクトすることによって、AAVヘルパー機能が宿主細胞に導入される。このように、AAVヘルパー構築物は、生産的なAAV形質導入に必要な欠落しているAAV機能を補完するため、AAVのrep遺伝子および/またはcap遺伝子の少なくとも一過性の発現を提供するため、使用されることがある。AAVヘルパー構築物は、多くの場合、AAV ITRを欠いており、複製することも、パッケージングされることもできない。これらの構築物は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルス、またはビリオンの形態であり得る。多数のAAVヘルパー構築物、例えば、RepおよびCapの両方の発現産物をコードする一般的に使用されているプラスミドpAAV/AdおよびpIM29+45が記載されている。Repおよび/またはCapの発現産物をコードする多数のその他のベクターが公知である。

10

【0053】

「発現ベクター」とは、宿主細胞における発現のために必要とされる必要な制御領域と共に、遺伝子または核酸配列を含有する特殊なベクターである。発現ベクターは、細胞内での増殖のための複製起点を少なくとも含有してよく、任意で、付加的な要素、例えば、異種核酸配列、発現調節要素（例えば、プロモーター、エンハンサー）、イントロン、ITR、およびポリアデニル化シグナルを含有していてもよい。

20

【0054】

II. 治療剤

いくつかの態様において、ウイルス遺伝子導入法は、哺乳動物細胞または標的組織に核酸を導入するために使用され得る。そのような方法は、阻害性RNA、非コードRNA、および/または治療用タンパク質をコードする核酸を、培養物中または宿主生物内の細胞へ投与するために使用され得る。

【0055】

A. 阻害性RNA

30

「RNA干渉 (RNAi)」とは、siRNAによって開始される配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングの過程である。RNAiにおいては、siRNAが、標的mRNAの分解を誘導し、その結果として、遺伝子発現を配列特異的に阻害する。

【0056】

「阻害性RNA」、「RNAi」、「低分子干渉RNA」もしくは「短鎖干渉RNA」もしくは「siRNA」分子、「短鎖ヘアピン型RNA」もしくは「shRNA」分子、または「miRNA」は、関心対象の核酸配列にターゲティングされるヌクレオチドのRNA二重鎖である。本明細書において使用されるように、「siRNA」という用語は、shRNAおよびmiRNAのサブセットを包含する総称的な用語である。「RNA二重鎖」とは、RNA分子の2つの領域の間の相補的対合によって形成される構造をさす。siRNAは、siRNAの二重鎖部分のヌクレオチド配列が、標的とされた遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるため、遺伝子に「ターゲティング」される。ある特定の態様において、siRNAは、ハンチンチンをコードする配列にターゲティングされる。いくつかの態様において、siRNAの二重鎖の長さは、30塩基対未満である。いくつかの態様において、二重鎖は、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、または10塩基対長であり得る。いくつかの態様において、二重鎖の長さは、19〜25塩基対長である。ある特定の態様において、二重鎖の長さは、19または21塩基対長である。siRNAのRNA二重鎖部分は、ヘアピン構造の一部であり得る。二重鎖部分に加えて、ヘアピン構造は、二重鎖を形成する2つの配列の間に位置するループ部分を含有し得る。ループの長さは変動し得る。いくつかの態様において、ループは、5、6、7、8、9、10、

40

50

11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長である。ある特定の態様において、ループは、18ヌクレオチド長である。ヘアピン構造は、3'および/または5'のオーバーハング部分も含有し得る。いくつかの態様において、オーバーハングは、0、1、2、3、4、または5ヌクレオチド長の3'および/または5'のオーバーハングである。

【0057】

shRNAは、5'隣接領域、siRNA領域セグメント、ループ領域、3'siRNA領域、および3'隣接領域を含有するよう設計されたステム-ループ構造から構成される。大部分のRNAi発現戦略は、強力なpolIIIベースのプロモーターによって駆動される短鎖ヘアピン型RNA (shRNA) を利用している。多くのshRNAが、インビトロでもインビボでも標的配列の効果的なノックダウンを示しているが、標的遺伝子の効果的なノックダウンを示したいくつかのshRNAは、インビボで毒性を有することも見出された。

【0058】

miRNAは、前駆体ステムループ転写物からプロセシングされる小さい細胞RNA (約22nt) である。公知のmiRNAステムループは、関心対象の遺伝子に特異的なRNAi配列を含有するよう修飾され得る。miRNAは内在的に発現されるため、miRNA分子はshRNA分子より好ましい場合がある。したがって、miRNA分子は、dsRNA応答性インターフェロン経路を誘導する可能性が低く、shRNAより効率的にプロセシングされ、サイレンシング効果が80%高いことが示されている。

【0059】

最近発見された代替的なアプローチは、RNAiベクターとしての人工miRNA (siRNA配列を運搬 (shuttling) するpri-miRNA足場) の使用である。人工miRNAは、より自然に、内在性RNAi基質に類似し、(例えば、RNAiの組織特異的発現を可能にする) Pol-II転写および(例えば、複数のsiRNA配列の送達を可能にする) ポリシストロン戦略を、より受け入れやすい。参照により組み入れられる米国特許第10,093,927号を参照すること。

【0060】

「shRNA」の転写単位は、不對ヌクレオチドのループによって接続されたセンス配列とアンチセンス配列とから構成される。shRNAは、エキスポーチン5によって核から核外輸送され、細胞質に入ると、ダイサーによってプロセシングされ、機能性のsiRNAを生成する。「miRNA」ステムループは、典型的には、より大きい一次転写物 (pri-miRNA) の一部として発現された、不對ヌクレオチドのループによって接続された、センス配列とアンチセンス配列とから構成され、ドロージャ-DGCR8複合体によって切り出されてpre-miRNAとして公知の中間体を生成し、その後、それが、エキスポーチン5によって核から核外輸送され、細胞質に入ると、ダイサーによってプロセシングされて機能性のsiRNAを生成する。「人工miRNA」または「人工miRNAシャトルベクター」とは、本明細書において交換可能に使用されるように、効果的なドロージャプロセシングに必要なステムループ内の構造要素を保持しながら、ドロージャおよびダイサーによるプロセシングを介して切り出される二重鎖ステムループの領域 (少なくとも約9~20ヌクレオチド) が、標的遺伝子に対するsiRNA配列に交換されている、一次miRNA転写物をさす。「人工」という用語は、(約35ヌクレオチド上流および約40ヌクレオチド下流の) 隣接配列が、siRNAのマルチクロニングサイト内の制限酵素部位から生じるという事実から生じる。本明細書において使用されるように、「miRNA」という用語は、天然に存在するmiRNA配列および人工的に生成されたmiRNAシャトルベクターの両方を包含する。

【0061】

siRNAは、核酸配列によってコードされ得、核酸配列は、プロモーターも含み得る。核酸配列は、ポリアデニル化シグナルも含み得る。いくつかの態様において、ポリアデニル化シグナルは、合成最小ポリアデニル化シグナルまたは6Tの配列である。

【0062】

RNAiの設計においては、いくつかの要因、例えば、siRNAの性質、サイレンシング効

10

20

30

40

50

果の持続性、および送達系の選択を考慮する必要がある。RNAi効果を生じるため、生物に導入されるsiRNAは、典型的には、エクソン配列を含有している。さらに、RNAi過程は相同性に依存するため、相同であるが遺伝子特異的ではない配列との間の交差干渉の可能性を最小化しながら、遺伝子特異性を最大化するため、注意深く配列を選択しなければならない。好ましくは、siRNAは、siRNAの配列と阻害すべき遺伝子との間の80%、85%、90%、95%、98%より大きい、またはさらには100%の同一性を示す。標的遺伝子との同一性が約80%未満である配列は、効果が実質的に低い。したがって、siRNAと阻害すべき遺伝子との間の相同性が大きいほど、無関係な遺伝子の発現が影響を受ける可能性が低くなる。

【0063】

さらに、siRNAのサイズも、重要な考慮事項である。いくつかの態様において、本発明は、少なくとも約19~25ヌクレオチドを含み、遺伝子発現をモジュレートすることができるsiRNA分子に関する。本発明に関して、siRNAは、好ましくは、500、200、100、50、または25ヌクレオチド未満の長さである。より好ましくは、siRNAは、約19ヌクレオチド~約25ヌクレオチド長である。

【0064】

siRNA標的とは、一般に、ポリペプチドをコードする領域を含むポリヌクレオチド、または複製、転写、もしくは翻訳、もしくはポリペプチドの発現にとって重要なその他の過程を制御するポリヌクレオチド領域、またはポリペプチドをコードする領域と、それと機能的に連結された、発現を制御する領域との両方を含むポリヌクレオチドを意味する。細胞において発現される任意の遺伝子が標的とされ得る。好ましくは、標的遺伝子は、疾患にとって重要な細胞活性の進行に関与もしくは関連するもの、または研究対象として特に興味深いものである。

【0065】

B. 非コードRNA

cDNAクローニングプロジェクトおよびゲノムタイリングアレイによって立証されているように、ヒトゲノムのうちの90%超は、転写を受けるが、タンパク質をコードしない。これらの転写産物は、非タンパク質コードRNA (ncRNA) と呼ばれる。多様なncRNA転写物、例えば、リボソームRNA、転移RNA、競合内在性RNA (ceRNA)、核内低分子RNA (snRNA)、および核小体低分子RNA (snoRNA) は、細胞機能にとって必須である。同様に、多数の短鎖ncRNA、例えば、マイクロRNA (miRNA)、内在性短鎖干渉RNA (siRNA)、PIWI相互作用RNA (piRNA)、および核小体低分子RNA (snoRNA) は、真核細胞において重要な制御的な役割を果たすことも公知である。最近の研究は、細胞型特異的な発現を示し、特定の細胞内コンパートメントに局在する長鎖ncRNA (lncRNA) 転写物の群を証明した。lncRNAも、細胞の発生および分化において重要な役割を果たすことが公知であり、このことは、それらが進化の過程で選択されてきたという見解を支持する。

【0066】

lncRNAは、多くの異なる機能を有するようである。多くの場合において、それらは、タンパク質の活性もしくは局在の制御において役割を果たすか、または細胞内構造の組織的フレームワークとして機能するようである。他の場合において、lncRNAは、プロセシングされて複数の小さいRNAを生成し、または他のRNAがどのようにプロセシングされるかをモジュレートすることもできる。公の研究コンソーシアムGenCode (バージョン#27) によって作製されたデータの最新版は、ほぼ28,000の転写物を生成する、ヒトゲノム内のほぼ16,000のlncRNAを掲載しており；他のデータベースを含めた時には、40,000を超えるlncRNAが公知である。

【0067】

興味深いことに、lncRNAは、特定のゲノム遺伝子座における特定の標的タンパク質の発現に影響を与え、タンパク質結合パートナーの活性をモジュレートし、クロマチン修飾複合体をそれらの作用部位に差し向けることができ、転写後プロセシングを受けて多数の

10

20

30

40

50

5'キャップ付きの小さいRNAを産生する。エピジェネティックな経路も、lncRNAのディファレンシャルな発現を制御することができる。

【0068】

異常発現されたlncRNAは、正常な生理学的過程においても、複数の疾患状態においても重要な役割を果たすことを示唆する証拠も、増えている。lncRNAは、様々な疾患、例えば、虚血、心臓病、アルツハイマー病、乾癬、および脊髄小脳失調症8型において異常制御されている。この異常制御は、様々な種類のがん、例えば、乳がん、結腸がん、前立腺がん、肝細胞がん、および白血病においても示されている。いくつかのlncRNA、例えば、gadd74およびlncRNA-RoR5は、細胞周期制御因子、例えば、サイクリン、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）、CDK阻害剤、およびp53をモジュレートし、したがって、より一層の柔軟性および頑強性を細胞周期進行に提供する。さらに、いくつかのlncRNA、例えば、動原体形成にとって必須であり、したがって、ヒトおよびハエにおける有糸分裂中の染色体分離にとって重要であるセントロメアサテライトRNAは、有糸分裂過程に関連している。もう1つの核内lncRNA、MA-linclは、細胞増殖の制御因子である近傍の遺伝子Puraの発現を抑制するため、シスで機能することによって、M期終了を制御する。

10

【0069】

lncRNAは、拡張（extended）オープンリーディングフレーム（ORF）を欠く、200ヌクレオチド超（例えば、約200～約1200nt、約2500nt、またはそれ以上）の転写物として一般的に定義される群である。「非コードRNA」（ncRNA）という用語には、lncRNAが含まれ、例えば、約200nt未満、例えば、約30～200ntのより短い転写物も含まれる。

20

【0070】

したがって、いくつかの態様において、例えば、関心対象の特定の脳構造への、ncRNAの送達は、異常なRNA発現レベルを矯正するか、または疾患を引き起こすlncRNAのレベルをモジュレートする。したがって、いくつかの態様において、本発明は、ウイルスゲノムが治療用非コードRNA（ncRNA）をコードするよう改変されているrAAVを提供する。いくつかの態様において、ncRNAは、約200ヌクレオチド（nt）以上の長さの長鎖非コードRNA（lncRNA）である。いくつかの態様において、治療薬は、約25ntまたは約30nt～約200nt長のncRNAである。いくつかの態様において、lncRNAは、約200nt～約1,200nt長である。いくつかの態様において、lncRNAは、約200nt～約1,100、約1,000、約900、約800、約700、約600、約500、約400、または約300nt長である。

30

【0071】

C. CRISPR系

遺伝子編集とは、生細胞内の標的遺伝子の修飾を可能にするテクノロジーである。最近、オンデマンド遺伝子編集を実施するためのCRISPRの細菌免疫系の活用は、科学者がゲノム編集に取り組む方式を革新した。RNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼであるCRISPR系のCas9タンパク質は、そのガイドRNA配列を変更することによって、比較的容易に新しい部位を標的とするよう改変され得る。この発見は、配列特異的な遺伝子編集を機能的に有効なものにした。

40

【0072】

一般に、「CRISPR系」とは、CRISPR関連（「Cas」）遺伝子の発現またはその活性の指示に関与する転写物およびその他の要素、例えば、Cas遺伝子をコードする配列、tracr（トランス活性化CRISPR）配列（例えば、tracrRNAまたは活性部分tracrRNA）、（内在性CRISPR系の状況における「ダイレクトリピート」およびtracrRNAによってプロセシングされた部分ダイレクトリピートを包含する）tracrメイト配列、（内在性CRISPR系の状況において「スペーサー」とも呼ばれる）ガイド配列、ならびに/またはCRISPR遺伝子座に由来するその他の配列および転写物を集合的にさす。

【0073】

50

CRISPR/CasヌクレアーゼまたはCRISPR/Casヌクレアーゼ系は、DNAに配列特異的に結合する非コードRNA分子（ガイド）RNA、およびヌクレアーゼ機能性（例えば、2つのヌクレアーゼドメイン）を有するCasタンパク質（例えば、Cas9）を含み得る。CRISPR系の1つまたは複数の要素は、例えば、内在性CRISPR系を含む特定の生物、例えば、化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）に由来する、I型、II型、またはIII型のCRISPR系に由来し得る。

【0074】

CRISPR系は、本明細書に記述されるように、標的部位における二本鎖切断（DSB）およびその後の破壊を誘導することができる。他の態様において、「ニッカーゼ」と見なされるCas9バリエーションが、標的部位において一本鎖にニックを入れるために使用される。ニックの同時導入によって5'オーバーハングが導入されるよう、配列を標的とする異なるgRNAの対によって各々指示されるニッカーゼの対が、例えば、特異性を改善するため、使用され得る。他の態様において、遺伝子発現に影響を与えるため、触媒活性のないCas9が、異種エフェクタードメイン、例えば、転写の抑制因子（例えば、KRAB）または活性化因子と融合させられる。あるいは、触媒活性のないCas9を含むCRISPR系は、リボソーム結合タンパク質に融合した、転写の抑制因子または活性化因子をさらに含む。

【0075】

いくつかの局面において、Casヌクレアーゼおよび（標的配列に特異的なcrRNAと固定されたtracrRNAとの融合物を含む）gRNAが、細胞に導入される。一般に、gRNAの5'末端側にある標的部位は、相補的な塩基対合を使用して、Casヌクレアーゼを、標的部位、例えば、遺伝子にターゲティングする。標的部位は、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列、例えば、典型的には、NGGまたはNAGの直ぐ5'側の位置に基づき選択され得る。これに関して、gRNAは、ガイドRNAの最初の20、19、18、17、16、15、14、14、12、11、または10ヌクレオチドを標的DNA配列に対応するよう修飾することによって、所望の配列にターゲティングされる。一般に、CRISPR系は、標的配列の部位におけるCRISPR複合体の形成を促進する要素を特徴とする。典型的には、「標的配列」とは、一般に、ガイド配列が相補性を有するよう設計された配列をさし、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するために十分な相補性があることを条件として、完全な相補性は必ずしも必要とされない。

【0076】

標的配列は、任意のポリヌクレオチド、例えば、DNAポリヌクレオチドまたはRNAポリヌクレオチドを含み得る。標的配列は、細胞の核または細胞質、例えば、細胞小器官内に位置し得る。一般に、標的配列を含む標的とされた遺伝子座への組換えのために使用され得る配列または鋳型は、「編集鋳型」または「編集ポリヌクレオチド」または「編集配列」と呼ばれる。いくつかの局面において、外来性鋳型ポリヌクレオチドは、編集鋳型とも呼ばれる。いくつかの局面において、組換えは、相同組換えである。

【0077】

典型的には、内在性CRISPR系に関して、（標的配列にハイブリダイズし、1つまたは複数のCasタンパク質と複合体化されたガイド配列を含む）CRISPR複合体の形成は、標的配列の内部または近く（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50塩基対内、またはそれ以上）における一方または両方の鎖の切断をもたらす。野生型tracr配列の全部または一部分（例えば、野生型tracr配列の約20、26、32、45、48、54、63、67、85ヌクレオチド、もしくはそれ以上、または約20、26、32、45、48、54、63、67、85ヌクレオチド、もしくはそれ以上より長い）を含むか、またはそれからなることができるtracr配列も、例えば、ガイド配列に機能的に連結されたtracrメイト配列の全部または一部分への、tracr配列の少なくとも一部分のハイブリダイゼーションによって、CRISPR複合体の一部を形成し得る。tracr配列は、ハイブリダイズし、CRISPR複合体の形成に関与するために十分な、tracrメイト配列に対する相補性を有し、例えば、最適に整列化された時、tracrメイト配列の全長に対して、少なくとも50%、60%

、70%、80%、90%、95%、または99%の配列相補性を有する。

【0078】

CRISPR系の要素の発現が、1つまたは複数の標的部位におけるCRISPR複合体の形成を指示するよう、CRISPR系の1つまたは複数の要素の発現を駆動する1つまたは複数のベクターを、細胞に導入することができる。成分は、タンパク質および/またはRNAとして細胞に送達されてもよい。例えば、Cas酵素、tracrメイト配列に連結されたガイド配列、およびtracr配列は、各々、別々のベクターにおいて別々の制御要素に機能的に連結されていてよい。Cas酵素は、キメラ標的遺伝子ミニジーンとして、またはキメラミニジーントランスアクチベーターの標的遺伝子としての、本明細書に開示される制御されたオルタナティブスプライシングイベントの調節下にある標的遺伝子であってよい。gRNAは、構成性プロモーターの調節下にあってよい。

10

【0079】

あるいは、同じまたは異なる制御要素から発現される要素のうちの2つ以上を、単一のベクターにおいて組み合わせてもよく、1つまたは複数の付加的なベクターが、第1のベクターに含まれていないCRISPR系の成分を提供してもよい。ベクターは、1つまたは複数の挿入部位、例えば、(「クローニング部位」とも呼ばれる)制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含み得る。いくつかの態様において、1つまたは複数の挿入部位は、1つまたは複数のベクターの1つまたは複数の配列要素の上流および/または下流に位置する。複数の異なるガイド配列が使用される時、細胞内の複数の異なる対応する標的配列にCRISPR活性をターゲティングするため、単一の発現構築物が使用されてもよい。

20

【0080】

ベクターは、CRISPR酵素、例えば、Casタンパク質をコードする酵素コード配列に機能的に連結された制御要素を含み得る。Casタンパク質の非限定的な例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (Csn1およびCsx12としても公知)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csfl、Csf2、Csf3、Csf4、それらのホモログ、またはそれらの修飾バージョンが含まれる。これらの酵素は公知であり；例えば、化膿性連鎖球菌Cas9タンパク質のアミノ酸配列は、SwissProtデータベースにアクセス番号Q99ZW2で見出され得る。

30

【0081】

CRISPR酵素は、(例えば、化膿性連鎖球菌または肺炎球菌(*S.pneumonia*)に由来する)Cas9であり得る。CRISPR酵素は、標的配列の位置において、例えば、標的配列内および/または標的配列の相補鎖内において、一方または両方の鎖の切断を指示することができる。ベクターは、変異型CRISPR酵素が、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を切断する能力を欠くよう、対応する野生型酵素と比べて変異しているCRISPR酵素をコードし得る。例えば、化膿性連鎖球菌に由来するCas9のRuvC1触媒ドメインにおけるアスパラギン酸からアラニンへの置換(D10A)は、Cas9を、両鎖を切断するヌクレアーゼから(一本鎖を切断する)ニッカーゼへと変換する。いくつかの態様において、Cas9ニッカーゼは、ガイド配列、例えば、DNA標的のセンス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ標的とする2つのガイド配列と組み合わせて使用され得る。この組み合わせは、両方の鎖にニックを入れ、NHEJまたはHDRを誘導するために使用することを可能にする。

40

【0082】

いくつかの態様において、CRISPR酵素をコードする酵素コード配列は、特定の細胞、例えば、真核細胞における発現のため、コドン最適化される。真核細胞とは、特定の生物、例えば、哺乳動物、例えば、以下に限定されるわけではないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、もしくは非ヒト霊長類のもの、またはそれらに由来するものであり得る。一般に、コドン最適化とは、ネイティブアミノ酸配列を維持しながら、ネイティブ配列

50

の少なくとも1つのコドン、その宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンに交換することによって、関心対象の宿主細胞における発現の増強のため、核酸配列を修飾する過程をさす。様々な種が、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用の違い）は、翻訳されるコドンの特性および特定の転移RNA（tRNA）分子の利用可能性にとりわけ依存すると考えられている、メッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳効率と、多くの場合相関する。細胞内の選択されたtRNAの優勢は、一般に、ペプチド合成において最も頻繁に使用されるコドンの反映である。したがって、コドン最適化に基づき、所定の生物における最適な遺伝子発現のため、遺伝子を仕立てることができる。

【0083】

一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、CRISPR複合体と標的配列との配列特異的結合を指示するために十分な標的ポリヌクレオチド配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。いくつかの態様において、ガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性の程度は、適当なアライメントアルゴリズムを使用して最適に整列化された時、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、もしくはそれ以上であるか、または約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、もしくはそれ以上を超えている。

【0084】

最適なアライメントは、配列を整列化するための任意の適当なアルゴリズムを使用して決定され得、その非限定的な例には、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler変換に基づくアルゴリズム（例えば、Burrows Wheeler Aligner）、Clustal W、Clustal X、BLAT、Novoalign（Novocraft Technologies）、ELAND（Illumina, San Diego, Calif.）、SOAP（soap.genomics.org.cnにおいて入手可能）、およびMaq（maq.sourceforge.netにおいて入手可能）が含まれる。

【0085】

CRISPR酵素は、1つまたは複数の異種タンパク質ドメインを含む融合タンパク質の一部であってもよい。CRISPR酵素融合タンパク質は、付加的なタンパク質配列、および、任意選択の、2つのドメインの間のリンカー配列を含み得る。CRISPR酵素に融合させることができるタンパク質ドメインの例には、非限定的に、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、および以下の活性のうちの1つまたは複数を含むタンパク質ドメインが含まれる：メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、RNA切断活性、および核酸結合活性。エピトープタグの非限定的な例には、ヒスチジン（His）タグ、V5タグ、FLAGタグ、インフルエンザ赤血球凝集素（HA）タグ、Mycタグ、VSV-Gタグ、およびチオレドキシン（Trx）タグが含まれる。レポーター遺伝子の例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、βガラクトシダーゼ、βグルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質（CFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、および自己蛍光タンパク質、例えば、青色蛍光タンパク質（BFP）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。CRISPR酵素は、DNA分子に結合するか、または他の細胞分子に結合する、あるタンパク質またはあるタンパク質の断片、例えば、以下に限定されるわけではないが、マルトース結合タンパク質（MBP）、Sタグ、Lex A DNA結合ドメイン（DBD）融合物、GAL4A DNA結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス（HSV）BP16タンパク質融合物をコードする遺伝子配列に融合させられてもよい。CRISPR酵素を含む融合タンパク質の一部を形成し得る付加的なドメインは、参照により本明細書に組み入れられるUS 20110059502に記載されている。

【0086】

D. 治療用タンパク質

いくつかの態様は、組換えタンパク質および組換えポリペプチドの発現に関する。その

ようなタンパク質は、神経保護タンパク質、例えば、抗アポトーシスタンパク質、抗酸化酵素（例えば、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）ファミリーに属するもの）、神経栄養/神経保護因子、または抗炎症タンパク質であり得る。治療用タンパク質は、Birc1a（NAIP）、Birc2（c-IAP1/HIAP-2）、Birc3（cIAP-2/HIAP-1）、Birc4（XIAP）、Birc5（サバイビン）、Birc6（アポロン（apollon））、Birc7（リビン（livin））、Birc8（TslAP）；Bcl-2ファミリーのメンバー：Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w、Mcl-1、Bcl-2L10、BFL-1；Jun相互作用タンパク質（JIP）、JIP-1、JIP-2、JIP-3、JIP-4として公知のc-Jun N末端キナーゼ（JNK）の内在性阻害剤；SOD1、SOD2；カタラーゼ；ペルオキシレドキシン1、ペルオキシレドキシン2、グルタチオンプレオキシダーゼ（preoxidase）1（Gpx1）、Gpx2、Gpx3、もしくはGpx4；NGF、BDNF、CNTF、GDNF、増殖/分化因子15（GDF-15）、エリスロポエチン、もしくは血管内皮増殖因子（VEGF）；インターロイキン10（IL-10）；グルタチオンS-トランスフェラーゼ、アネキシン1（ANXA1）、NF-κBの阻害剤（IκB）；USH1、USH1G（別名SANS）、CIB2（カルシウムおよびインテグリン結合タンパク質2）、ATOH-1、ACTG1、ATP2B2、CDH23（カドヘリン23）、CLDN14、CLRN1、COCH、COL11A2、DFNA5、DFNB31、DFNB59、ESPN、EYA4、GJB2、GJB3、GJB6、KCNQ4、LHFPL5、MT-RNR1、MT-TS1、MYO1A、MYO6、MYO7A（ミオシン7a）、MYO15A、OTOF、PCDH15（プロトカドヘリン15）、PDZD7、POU3F4、SLC26A4、STRC、TECTA、TMC1、TMC2、TMIE、TMPRSS3、TRIOBP、USH1C、VLGR1、WFS1、ACTG1、ADCY1、ATOF1、ATP6V1B1、BDNF、BDP1、BSND、DATSPER2、CABP2、CD164、CDC14A、CDH23、CEACAM16、CHD7、CCDC50、CIB2、CLDN14、CLIC5、CLPP、CLRN1、COCH、COL2A1、COL4A3、COL4A4、COL4A5、COL9A1、COL9A2、COL11A1、COL11A2、CRYM、DCDC2、DFNA5、DFNB31、DFNB59、DIAPH1、EDN3、EDNRB、ELMOD3、EMOD3、EPS8、EPS8L2、ESPN、ESRRB、EYA1、EYA4、FAM65B、FOXI1、GIPC3、GJB2、GJB3、GJB6、GPR98、GRHL2、GPSM2、GRXCR1、GRXCR2、HARS2、HGF、HOMER2、HSD17B4、ILDR1、KARS、KCNE1、KCNJ10、KCNQ1、KCNQ4、KITLG、LARS2、LHFPL5、LOXHD1、LRTOMT、MARVELD2、MCM2、MET、MIR183、MIRN96、MITF、MSRB3、MT-RNR1、MT-TS1、MYH14、MYH9、MYO15A、MYO1A、MYO3A、MYO6、MYO7A、NARS2、NDP、NF2、NT3、OSBPL2、OTOA、OTOF、OTOG、OTOGL、P2RX2、PAX3、PCDH15、PDZD7、PJKV、PNPT1、POLR1D、POLR1C、POU3F4、POU4F3、PRPS1、PTPRQ、RDX、S1PR2、SANS、SEMA3E、SERPINB6、SLC17A8、SLC22A4、SLC26A4、SLC26A5、SIX1、SIX5、SMAC/DIABLO、SNAI2、SOX10、STRC、SYNE4、TBC1D24、TCOF1、TECTA、TIMM8A、TJP2、TNC、TMC1、TMC2、TMIE、TMEM132E、TMPRSS3、TRPN、TRIOBP、TSPEAR、USH1C、USH1G、USH2A、USH2D、VLGR1、WFS1、WHRN、またはXIAPであり得る。

【0087】

本願が「修飾型タンパク質」または「修飾型ポリペプチド」の機能または活性に言及する時、これには、例えば、非修飾型のタンパク質またはポリペプチドと比べて付加的な利点を有するタンパク質またはポリペプチドが含まれることを、当業者は理解するであろう。「修飾型タンパク質」に関する態様は、「修飾型ポリペプチド」に関しても実施され得、その逆も同様であることが具体的に企図される。

【0088】

組換えタンパク質は、アミノ酸の欠失および/または置換を有してもよく；したがって、欠失を有するタンパク質、置換を有するタンパク質、ならびに欠失および置換を有するタンパク質は、修飾型タンパク質である。いくつかの態様において、これらのタンパク質は、挿入またはアミノ酸の付加をさらに含んでもよく、例えば、融合タンパク質またはリンカーを有するタンパク質などである。「欠失修飾型タンパク質」は、ネイティブタンパク質の1つまたは複数の残基を欠くが、ネイティブタンパク質の特異性および/または活

性を有し得る。「欠失修飾型タンパク質」は、低下した免疫原性または抗原性も有し得る。欠失修飾型タンパク質の例は、少なくとも1つの抗原性領域、即ち、特定の生物、例えば、修飾型タンパク質が投与される生物において抗原性であると決定されたタンパク質の領域からのアミノ酸残基の欠失を有するものである。

【0089】

置換バリエーションまたは交換バリエーションは、典型的には、タンパク質内の1つまたは複数の部位における1つのアミノ酸ともう1つのアミノ酸との交換を含有しており、ポリペプチドの1つまたは複数の特性、具体的には、エフェクター機能および/またはバイオアベイラビリティをモジュレートするため、設計されている。置換は、保存的、即ち、1つのアミノ酸が類似した形状および電荷のアミノ酸に交換されるものであってもよいし、またはそうでなくてもよい。保存的置換は、当技術分野において公知であり、例えば、アラニンからセリンへ；アルギニンからリジンへ；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへ；アスパラギン酸からグルタミン酸へ；システインからセリンへ；グルタミンからアスパラギンへ；グルタミン酸からアスパラギン酸へ；グリシンからプロリンへ；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへ；イソロイシンからロイシンまたはバリンへ；ロイシンからバリンまたはイソロイシンへ；リジンからアルギニンへ；メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへ；フェニルアラニンからチロシン、ロイシン、またはメチオニンへ；セリンからスレオニンへ；スレオニンからセリンへ；トリプトファンからチロシンへ；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへ；およびバリンからイソロイシンまたはロイシンへの変化を含む。

10

20

【0090】

欠失または置換に加えて、修飾型タンパク質は、典型的には、少なくとも1つの残基の付加を含む、残基の挿入を、ポリペプチド内に有していてもよい。これには、ターゲティングペプチドもしくはターゲティングポリペプチドの挿入、または単一残基のみの挿入が含まれ得る。融合タンパク質と呼ばれる末端付加については、後述する。

【0091】

「生物学的に機能的に等価」という用語は、当技術分野においてよく理解されており、本明細書においてさらに詳細に定義される。したがって、タンパク質の生物学的活性が維持されることを条件として、アミノ酸のうちの約70%～約80%、または約81%～約90%、またはさらには約91%～約99%が、対照ポリペプチドのアミノ酸と同一または機能的に等価である配列が含まれる。組換えタンパク質は、ある特定の局面において、そのネイティブカウンターパートと生物学的に機能的に等価であり得る。

30

【0092】

アミノ酸配列および核酸配列は、付加的な残基、例えば、付加的なN末端もしくはC末端のアミノ酸、または5'配列もしくは3'配列を含んでいたとしても、タンパク質発現に関して言うと、生物学的タンパク質活性の維持を含む、上記の基準を配列が満たす限り、本質的には、本明細書に開示される配列のうちの1つに記載されるものであり得ることも理解されるであろう。末端配列の付加は、具体的には、例えば、コード領域の5'部分もしくは3'部分のいずれかに隣接する様々な非コード配列を含んでいてもよい核酸配列、または遺伝子内に存在することが公知の様々な内部配列、即ち、イントロンを含んでいてもよい核酸配列に当てはまる。

40

【0093】

本明細書において使用されるように、タンパク質またはペプチドは、一般に、遺伝子から翻訳される、約200アミノ酸より大きい、全長配列までのタンパク質；約100アミノ酸より大きいポリペプチド；および/または約3～約100アミノ酸のペプチドをさすが、これらに限定されるわけではない。便宜上、「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。

【0094】

本明細書において使用されるように、「アミノ酸残基」とは、任意の天然に存在するアミノ酸、任意のアミノ酸誘導体、または当技術分野において公知の任意のアミノ酸模倣物

50

をさす。ある特定の態様において、タンパク質またはペプチドの残基は、アミノ酸残基の配列を中断する非アミノ酸なしに、連続している。他の態様において、配列は、1つまたは複数の非アミノ酸部分を含んでもよい。具体的な態様において、タンパク質またはペプチドの残基の配列は、1つまたは複数の非アミノ酸部分によって中断されていてもよい。

【0095】

したがって、「タンパク質またはペプチド」という用語は、天然に存在するタンパク質に見出される20の一般的なアミノ酸のうちの少なくとも1つ、または少なくとも1つの修飾型もしくは稀なアミノ酸を含むアミノ酸配列を包含する。

【0096】

本発明のある特定の態様は、融合タンパク質に関する。これらの分子は、N末端またはC末端で異種ドメインに連結された治療用タンパク質を有し得る。例えば、融合は、異種宿主におけるタンパク質の組換え発現を可能にするため、他の種に由来するリーダー配列を利用してもよい。もう1つの有用な融合には、融合タンパク質の精製を容易にするための、好ましくは、切断可能な、タンパク質アフィニティタグ、例えば、血清アルブミンアフィニティタグもしくは6ヒスチジン残基、または免疫活性ドメイン、例えば、抗体エピトープの付加が含まれる。非限定的なアフィニティタグには、ポリヒスチジン、キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質（MBP）、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）が含まれる。

【0097】

融合タンパク質を生成する方法は、当業者に周知である。そのようなタンパク質は、例えば、完全融合タンパク質の新規合成によって作製されてもよいし、または異種ドメインをコードするDNA配列の付着およびその後のインタクト融合タンパク質の発現によって作製されてもよい。

【0098】

親タンパク質の機能的活性を回収する融合タンパク質の作製は、タンデムに接続されたポリペプチドの間でスプライシングされるペプチドリンカーをコードする架橋DNAセグメントによって、遺伝子を接続することによって、容易にされ得る。リンカーは、得られる融合タンパク質の適切な折り畳みを可能にするために十分な長さである。

【0099】

トランスジーンの発現は、トランスジーンの天然プロモーター（即ち、トランスジーンコード配列と共に天然に見出されるプロモーター）によって指示されてもよいし、またはトランスジーンの発現は、異種プロモーター（例えば、CMVプロモーター、エスピンプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、およびTMHS（LHFPL5）プロモーター）によって指示されてもよい。例えば、本明細書に記載されるトランスジーンのうちの任意のものは、その天然プロモーターと共に使用され得る。あるいは、本明細書に記載されるトランスジーンのうちの任意のものは、異種プロモーターと共に使用され得る。本明細書において使用されるように、異種プロモーターとは、その配列の発現を天然には指示しない（即ち、天然にはその配列と共に見出されない）プロモーターをさす。本明細書に示されるトランスジーンのうちの任意のものの発現を指示するために使用され得る代表的な異種プロモーターには、例えば、CMVプロモーター、CBAプロモーター、CASIプロモーター、Pプロモーター、およびEF-1プロモーター、 α 9ニコチン受容体プロモーター、プレスチンプロモーター、Gfilプロモーター、およびVglut3プロモーターが含まれる。さらに、上述のトランスジーンのうちの1つの発現を天然に指示するプロモーター（例えば、KCNQ4プロモーター、Myo7aプロモーター、Myo6プロモーター、またはAtohlプロモーター）が、トランスジーンの発現を指示する異種プロモーターとして使用されてもよい。他の態様において、プロモーターは、エスピンプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、およびTMHS（LHFPL5）プロモーターである。

【0100】

III. 処置および投与の方法

10

20

30

40

50

ウイルスベクターは、いくつかの局面において、患者へ直接投与されてもよいし（インビボ）、またはインビトロもしくはエクスピボで細胞を処理するために使用され、次いで、患者へ投与されてもよい。「ベクター」という用語は、小さい担体核酸分子、プラスミド、ウイルス（例えば、AAVベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター）、または核酸の挿入もしくは組み入れによって操作され得るその他の媒介物をさす。ベクター、例えば、ウイルスベクターは、その中の核酸配列が、転写され、タンパク質をコードしている場合は、その後、細胞によって翻訳されるよう、核酸配列を細胞に導入（introduce/transfer）するために使用され得る。

【0101】

任意の適当な細胞または哺乳動物が、本明細書に記載される方法または使用によって投与または処置され得る。典型的には、本明細書に記載される方法を必要とする哺乳動物は、疾患状態に関連する異常な（abnormalもしくはaberrant）タンパク質を有するか、または発現すると推測される。あるいは、哺乳動物レシピエントは、遺伝子補充療法を受け入れ可能な状態を有し得る。本明細書において使用されるように、「遺伝子補充療法」とは、治療剤をコードする外来性遺伝材料のレシピエントへの投与およびその後の投与された遺伝材料のインサイチュー発現をさす。したがって、「遺伝子補充療法を受け入れ可能な状態」という語句は、遺伝性疾患（即ち、1つまたは複数の遺伝子欠陥に起因する疾患状態）、後天性病理（即ち、先天性欠陥に起因しない病理学的状態）、癌、および予防的過程（即ち、疾患または望ましくない医学的状态の防止）などの状態を内含する。したがって、本明細書において使用されるように、「治療剤」という用語は、哺乳動物レシピエントに対して有益な効果を及ぼす任意の薬剤または材料をさす。したがって、「治療剤」には、核酸成分またはタンパク質成分を有する治療用分子および予防用分子の両方が内含される。

【0102】

哺乳動物の非限定的な例には、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、類人猿、テナガザル、チンパンジー、オランウータン、サル、マカク等）、飼育動物（例えば、イヌおよびネコ）、家畜（例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）、ならびに実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）が含まれる。ある特定の態様において、哺乳動物は、ヒトである。ある特定の態様において、哺乳動物は、非げっ歯類哺乳動物（例えば、ヒト、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、イヌ等）である。ある特定の態様において、非げっ歯類哺乳動物は、ヒトである。哺乳動物は、任意の年齢または任意の発達段階（例えば、成人、10代、子供、乳児、または子宮内の哺乳動物）であり得る。哺乳動物は、男性であってもよいし、または女性であってもよい。ある特定の態様において、哺乳動物は、動物疾患モデル、例えば、疾患状態に関連する異常なタンパク質を有するか、もしくは発現する動物モデル、または疾患状態を引き起こす不十分なタンパク質発現を有する動物モデルであり得る。

【0103】

本明細書に記載される方法または組成物によって処置される哺乳動物（対象）には、成人（18歳以上）および子供（18歳未満）が含まれる。成人には、高齢者が含まれる。代表的な成人は、50歳以上である。子供の年齢は、1～2歳、または2～4歳、4～6歳、6～18歳、8～10歳、10～12歳、12～15歳、および15～18歳の範囲である。子供には、乳児も含まれる。乳児は、典型的には、1～12か月齢の範囲である。

【0104】

ある特定の態様において、方法は、本明細書に記載される哺乳動物へ多数のウイルス粒子を投与することを含み、ここで、疾患状態、例えば、神経変性疾患の1つまたは複数の症状の重症度、頻度、進行、または発症時間が、減少し、低下し、防止され、阻害され、または遅延する。ある特定の態様において、方法は、疾患状態、例えば、神経変性疾患の有害な症状を処置するため、多数のウイルス粒子を哺乳動物へ投与することを含む。ある特定の態様において、方法は、疾患状態、例えば、神経変性疾患を安定化するため、その悪化もしくは進行を遅延させるか、もしくは防止するため、またはその有害な症状を逆転

させるため、多数のウイルス粒子を哺乳動物へ投与することを含む。

【0105】

ある特定の態様において、方法は、哺乳動物の中枢神経系または本明細書に記載されるその一部分へ多数のウイルス粒子を投与することを含み、疾患状態、例えば、神経変性疾患の1つまたは複数の症状の重症度、頻度、進行、または発症時間が、少なくとも約5～約10日、約10～約25日、約25～約50日、または約50～約100日、減少し、低下し、防止され、阻害され、または遅延する。

【0106】

ある特定の態様において、症状または有害効果は、初期、中期、もしくは後期の症状；行動、人格、もしくは言語の症状；嚥下、運動、てんかん発作、振戦、もしくはそわそわ（fodgeting）の症状；運動失調；および/または認知症状、例えば、記憶、整理する能力を含む。

10

【0107】

IV. 薬学的組成物

本明細書において使用されるように、「薬学的に許容される」および「生理学的に許容される」という用語は、投与、インビボの送達または接触の1つまたは複数の経路に適している、生物学的に許容される組成物、製剤、液体、もしくは固体、またはそれらの混合物を意味する。「薬学的に許容される」または「生理学的に許容される」組成物とは、生物学的にまたはその他の点で望ましくないものではない材料であり、例えば、その材料は、実質的な望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく対象へ投与され得る。そのような組成物、「薬学的に許容され」かつ「生理学的に許容される」製剤および組成物は、無菌であり得る。そのような薬学的な製剤および組成物は、例えば、対象へのウイルス粒子の投与において使用され得る。

20

【0108】

そのような製剤および組成物には、薬学的な投与またはインビボの接触もしくは送達と適合性の、溶媒（水性または非水性）、溶液（水性または非水性）、乳濁液（例えば、水中油型または油中水型）、懸濁液、シロップ、エリキシル、分散液および懸濁液の媒体、コーティング、等張剤、ならびに吸収促進剤または遅延剤が含まれる。水性および非水性の溶媒、溶液、および懸濁液は、懸濁化剤および増粘剤を含み得る。補足的な活性化合物（例えば、保存剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、および抗真菌剤）も、製剤および組成物に組み入れられ得る。

30

【0109】

薬学的組成物は、典型的には、薬学的に許容される賦形剤を含有する。そのような賦形剤には、それ自体、組成物を受容する個体にとって有害な抗体の産生を誘導せず、過度の毒性なしに投与され得る任意の薬学的薬剤が含まれる。薬学的に許容される賦形剤には、ソルビトール、ツイーン80、ならびに液体、例えば、水、生理食塩水、グリセロール、およびエタノールが含まれるが、これらに限定されるわけではない。薬学的に許容される塩、例えば、鉍酸塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等；および有機酸の塩、例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等がそれらに含まれていてもよい。さらに、補助物質、例えば、界面活性剤、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質等が、そのような媒質に存在してもよい。

40

【0110】

薬学的組成物は、本明細書に記載されるように、または当業者に公知であるように、特定の投与または送達の経路と適合性であるよう製剤化され得る。したがって、薬学的組成物は、様々な経路による投与または送達に適した担体、希釈剤、または賦形剤を含む。

【0111】

ウイルス粒子の注射または注入に適した薬学的形態は、無菌の注射可能もしくは注入可能な溶液または分散液の即時調製に適合した、無菌の水溶液または分散液を含み得、任意でリボソームに被包されている。全ての場合において、最終的な形態は、無菌の液体であり、製造、使用、および保管の条件下で安定しているべきである。液体の担体または媒質

50

は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、植物油、無毒のグリセリルエステル、およびそれらの適当な混合物を含む溶媒または液体分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、リポソームの形成、分散液の場合、必要な粒子サイズの維持、または界面活性剤の使用によって維持され得る。等張剤、例えば、糖、緩衝剤、または塩（例えば、塩化ナトリウム）が含まれ得る。注射可能組成物の吸収の長期化は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に使用することによってもたらされ得る。

【0112】

ウイルス粒子の溶液または懸濁液は、任意で、以下の成分のうちの1つまたは複数を含み得る：無菌の希釈液、例えば、注射用水、生理食塩水溶液、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、人工CSF、界面活性剤、不揮発性油、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、グリセリン、またはその他の合成溶媒；抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸等；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、例えば、酢酸、クエン酸、またはリン酸、ならびに浸透圧の調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース。

【0113】

本発明の組成物、方法、および使用に適した薬学的製剤、組成物、および送達系は、当技術分野において公知である（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; および Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315を参照すること）。

【0114】

ウイルス粒子およびそれらの組成物は、投与の容易さおよび投与量の均一性のため、投与単位形態に製剤化され得る。投与単位形態とは、本明細書において使用されるように、処置される個体のための単位投与量として適した物理的に不連続の単位をさし；各単位は、必要な薬学的担体と共に、所望の治療効果を生じるよう計算された、予定された量の活性化化合物を含有する。投与単位形態は、所望の効果を生じるために必要であると考えられるウイルス粒子の数に依存する。必要量は、単一の用量に製剤化されてもよいし、または複数の投与単位に製剤化されてもよい。用量は、適当なウイルス粒子濃度に合わせて調整され、任意で、抗炎症剤と組み合わせられ、使用のためにパッケージングされ得る。

【0115】

1つの態様において、薬学的組成物は、治療的に有効な量、即ち、当該疾患状態の症状もしくは有害効果を低下させるか、もしくは寛解させるために十分な量、または所望の利益を付与するために十分な量を提供するために十分な遺伝材料を含む。

【0116】

「単位剤形」とは、本明細書において使用されるように、処置される対象のための単位投与量として適した物理的に不連続の単位をさし、各単位は、1つまたは複数の用量で投与された時に所望の効果（例えば、予防効果または治療効果）を生じるよう計算された予定された量を、任意で、薬学的担体（賦形剤、希釈剤、媒質、または充填剤）と共に含有する。単位剤形は、例えば、アンプルおよびバイアルの中にあってもよく、それらは、液体組成物を含んでもよいし、またはフリーズドライもしくは凍結乾燥された状態の組成物を含んでもよく；例えば、無菌の液体担体が、インビボの投与または送達の前に添加されて

もよい。個々の単位剤形は、マルチドーズのキットまたは容器に含まれてもよい。したがって、例えば、ウイルス粒子およびその薬学的組成物は、投与の容易さおよび投与量の均一性のため、単一または複数の単位剤形にパッケージングされ得る。

【0117】

ウイルス粒子を含有する製剤は、典型的には、当業者によって容易に決定される有効量を含有する。ウイルス粒子は、典型的には、組成物の約1%～約95%(w/w)の範囲であってよく、または、適当である場合には、さらに高くてもよい。投与される量は、処置のために考慮される哺乳動物またはヒト対象の年齢、体重、および身体状態などの要因に依存する。有効な投与量は、用量応答曲線を確立するルーチンの試験を通じて、当業者によって確立され得る。

【0118】

V. 定義

「ポリヌクレオチド」、「核酸」、および「トランスジーン」という用語は、全ての形態の核酸、オリゴヌクレオチド、例えば、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA)、ならびにそれらのポリマーをさすために、本明細書において交換可能に使用される。ポリヌクレオチドには、ゲノムDNA、cDNA、およびアンチセンスDNA、ならびにスプライシングを受けた、またはスプライシングを受けていないmRNA、rRNA、tRNA、ならびに阻害性のDNAまたはRNA(RNAi、例えば、低分子もしくは短鎖ヘアピン型(sh)RNA、マイクロRNA(miRNA)、低分子もしくは短鎖干渉(si)RNA、トランススプライシングRNA、またはアンチセンスRNA)が含まれる。ポリヌクレオチドには、天然に存在するポリヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、および意図的に修飾または変更されたポリヌクレオチド(例えば、バリエーション核酸)が含まれ得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、または三重鎖であってよく、直鎖状または環状であってよく、任意の適当な長さであってよい。ポリヌクレオチドの記述において、特定のポリヌクレオチドの配列または構造は、5'から3'への方向に配列を提供するという慣習に従って、本明細書において記述され得る。

【0119】

ポリペプチドをコードする核酸は、多くの場合、ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む。他に示されない限り、特定の核酸配列は、縮重コドン置換も含む。

【0120】

核酸は、オープンリーディングフレームに機能的に連結された1つまたは複数の発現調節要素または発現制御要素を含んでいてよく、ここで、1つまたは複数の制御要素は、哺乳動物細胞における、オープンリーディングフレームによってコードされたポリペプチドの転写および翻訳を指示するよう構成される。発現調節/制御要素の非限定的な例には、転写開始配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、TATAボックス等)、翻訳開始配列、mRNA安定性配列(stability sequences)、ポリA配列、分泌配列等が含まれる。発現調節/制御要素は、任意の適当な生物のゲノムから入手され得る。

【0121】

「プロモーター」とは、RNAポリメラーゼおよび適切な転写のために必要とされるその他の因子の認識を提供することによって、コード配列の発現を指示し、かつ/または調節する、一般的には、コード配列の上流(5')にある、ヌクレオチド配列をさす。pol IIIプロモーターは、発現の調節のために制御要素が付加される、転写開始部位を特定するために機能する、TATAボックスと任意選択のその他の配列とから構成される短いDNA配列である最小プロモーターを含む。1型pol IIIプロモーターは、(a) 5'配列要素(Aブロック)；(b) 中間配列要素(Iブロック)；(c) 3'配列要素(Cブロック)という3つのシス作用性配列要素を転写開始部位の下流に含む。2型pol IIIプロモーターは、(a) Aボックス(5'配列要素)；および(b) Bボックス(3'配列要素)という2つの必須シス作用性配列要素を転写開始部位の下流に含む。3型pol IIIプロモーターは、いくつかのシス作用性プロモーター要素、例えば、伝統的なTATAボックス、近位配列要素(P

10

20

30

40

50

SE)、および遠位配列要素(DSE)を、転写開始部位の上流に含む。

【0122】

「エンハンサー」とは、転写活性を刺激することができるDNA配列であり、プロモーターの内在性の要素、または発現のレベルもしくは組織特異性を増強する異種要素であり得る。それは、いずれかの方向(5'→3'または3'→5')で機能することができ、プロモーターの上流または下流のいずれに位置付けられた時にも機能することができる。

【0123】

プロモーターおよび/またはエンハンサーは、その全体がネイティブ遺伝子に由来してもよいし、または天然に見出される異なる要素に由来する異なる要素から構成されていてもよいし、またはさらには合成DNAセグメントから構成されていてもよい。プロモーターまたはエンハンサーは、刺激、生理学的な、または発達上の条件に応答して、転写開始の有効性をモジュレート/調節するタンパク質因子の結合に関与するDNA配列を含み得る。

10

【0124】

プロモーターの非限定的な例には、SV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRプロモーター；アデノウイルス主要後期プロモーター(Ad MLP)；単純ヘルペスウイルス(HSV)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、例えば、CMV前初期プロモーター領域(CMVIE)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、pol IIプロモーター、pol IIIプロモーター、合成プロモーター、ハイブリッドプロモーター等が含まれる。さらに、非ウイルス遺伝子、例えば、マウスメタロチオネイン遺伝子に由来する配列も、本明細書において有用である。例示的な構成性プロモーターには、ある特定の構成性のまたは「ハウスキーピング」機能をコードする以下の遺伝子のプロモーターが含まれる：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、アデノシンデアミナーゼ、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグリセロールムターゼ、アクチンプロモーター、U6、および当業者に公知のその他の構成性プロモーター。さらに、多くのウイルスプロモーターは、真核細胞において構成的に機能する。これらには、とりわけ、SV40の初期および後期プロモーター；モロニー白血病ウイルスおよびその他のレトロウイルスの末端反復配列(LTR)；ならびに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターが含まれる。したがって、上述の構成性プロモーターのうちの任意のものが、異種遺伝子インサートの転写を調節するため、使用され得る。

20

30

【0125】

「トランスジーン」とは、意図された、または細胞もしくは生物に導入された核酸配列/ポリヌクレオチドを便利にさすために、本明細書において使用される。トランスジーンは、任意の核酸、例えば、阻害性RNAまたはポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子を含み、一般に、天然に存在するAAVゲノム配列に対して異種である。

【0126】

「形質導入する」という用語は、ベクター(例えば、ウイルス粒子)による細胞または宿主生物への核酸配列の導入をさす。したがって、ウイルス粒子による細胞へのトランスジーンの導入は、細胞の「形質導入」と呼ばれ得る。トランスジーンは、形質導入された細胞のゲノム核酸に組み込まれてもよいし、または組み込まれなくてもよい。導入されたトランスジーンは、レシピエント細胞またはレシピエント生物の核酸(ゲノムDNA)に組み込まれた場合、その細胞または生物において安定的に維持され、さらに、レシピエント細胞またはレシピエント生物の子孫細胞または子孫生物に受け継がれ、または遺伝することができる。最後に、導入されたトランスジーンは、レシピエント細胞または宿主生物において、染色体外に、または一時的にのみ、存在してもよい。したがって、「形質導入された細胞」とは、形質導入によってトランスジーンが導入された細胞である。したがって、「形質導入された」細胞とは、トランスジーンが導入された細胞またはその子孫である。形質導入された細胞は、繁殖させられ、トランスジーンが転写され、コードされた阻害性RNAまたはタンパク質が発現され得る。遺伝子治療の使用および方法の場合、形質

40

50

導入された細胞は、哺乳動物に存在し得る。

【0127】

誘導性プロモーターの調節下にあるトランスジーンは、誘導剤の存在下でのみ、または誘導剤の存在下でより多く、発現される（例えば、メタロチオネインプロモーターの調節下での転写は、ある特定の金属イオンの存在下で大幅に増加する）。誘導性プロモーターは、誘導因子が結合した時に転写を刺激する応答要素（RE）を含む。例えば、血清因子、ステロイドホルモン、レチノイン酸、およびサイクリックAMPのためのREが存在する。特定のREを含有するプロモーターは、誘導可能な応答を得るために選択され得、いくつかの場合において、RE自体を異なるプロモーターに付着させ、それによって、組換え遺伝子に誘導可能性を付与することができる。したがって、適当なプロモーター（構成性であるか誘導性であるか；強弱）を選択することによって、遺伝子修飾型細胞におけるポリペプチドの存在および発現レベルの両方を調節することが可能である。ポリペプチドをコードする遺伝子が誘導性プロモーターの調節下にある場合、ポリペプチドのインサイチュー送達は、ポリペプチドの転写を可能にする条件にインサイチューの遺伝子修飾型細胞を曝露することによって、例えば、薬剤の転写を調節する誘導性プロモーターの特異的誘導剤の腹腔内注射によって、誘発される。例えば、メタロチオネインプロモーターの調節下にある遺伝子によってコードされたポリペプチドの、遺伝子修飾型細胞によるインサイチュー発現は、遺伝子修飾型細胞を、適切な（即ち、誘導する）金属イオンを含有する溶液とインサイチューで接触させることによって増強される。

10

【0128】

核酸/トランスジーンは、もう1つの核酸配列と機能的な関係に置かれている時、「機能的に連結」されている。RNAiもしくはポリペプチドをコードする核酸/トランスジーン、またはポリペプチドの発現を指示する核酸は、コードされたポリペプチドの転写を調節するため、誘導性プロモーターまたは組織特異的プロモーターを含んでいてよい。発現調節要素に機能的に連結された核酸は、発現カセットとも呼ばれ得る。

20

【0129】

ある特定の態様において、細胞型特異的な、または誘導性のプロモーター、エンハンサー等が、本明細書に記載される方法および使用において利用される。細胞型特異的プロモーターの非限定的な例には、TMC1、TMC2、エスピン、PCDH15、PTPRQ、TMHS（LHFPL5）、MYO1Aに由来する遺伝子から単離されたものが含まれる。誘導性プロモーターの非限定的な例には、エクジソン、テトラサイクリン、低酸素、およびIFNのためのDNA応答要素が含まれる。

30

【0130】

ある特定の態様において、発現調節要素は、CMVエンハンサーを含む。ある特定の態様において、発現調節要素は、βアクチンプロモーターを含む。ある特定の態様において、発現調節要素は、ニワトリβアクチンプロモーターを含む。ある特定の態様において、発現調節要素は、CMVエンハンサーおよびニワトリβアクチンプロモーターを含む。

【0131】

本明細書において使用されるように、「修飾する」または「バリエント」という用語およびそれらの文法的な変化形は、核酸、ポリペプチド、またはそれらの部分配列が参照配列から逸脱することを意味する。したがって、修飾型配列およびバリエント配列は、参照配列と実質的に同じ、より多い、またはより少ない発現、活性、または機能を有し得るが、参照配列の部分的な活性または機能を少なくとも保持する。バリエントの具体的な種類は、変異タンパク質であり、変異タンパク質とは、変異、例えば、ミスセンス変異またはナンセンス変異を有する遺伝子によってコードされるタンパク質をさす。

40

【0132】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」のバリエントとは、野生型と比較して遺伝学的に変更されている修飾型配列をさす。配列は、コードされたタンパク質配列を変更することなく、遺伝子修飾され得る。あるいは、配列は、バリエントタンパク質をコードするように、遺伝子修飾され得る。核酸またはポリヌクレオチドのバリエントとは、参照配列、例え

50

ば、野生型タンパク質配列に対して少なくとも部分的な配列同一性を依然として保持するタンパク質をコードするようコードン修飾されており、かつバリエーションタンパク質をコードするようコードン修飾されている組み合わせ配列をさすこともできる。例えば、そのような核酸バリエーションのいくつかのコードンは、それによってコードされるタンパク質のアミノ酸を変更することなく変化しており、その核酸バリエーションのいくつかのコードンは、それによってコードされるタンパク質のアミノ酸が変化するように変化している。

【0133】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。本明細書に開示される「核酸」または「ポリヌクレオチド」または「トランスジェーン」によってコードされる「ポリペプチド」には、そのポリペプチドがある程度の機能または活性を保持する限り、部分的なまたは全長のネイティブ配列、天然に存在する野生型および機能性多型タンパク質、それらの機能性部分配列（断片）、ならびにそれらの配列バリエーションが含まれる。したがって、本発明の方法および使用において、核酸配列によってコードされるそのようなポリペプチドは、処置される哺乳動物の、欠陥のある内在性タンパク質、またはその活性、機能、もしくは発現が不十分であるか、欠損しているか、もしくは存在しない内在性タンパク質と同一である必要はない。

【0134】

修飾の非限定的な例には、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸（例えば、約1～約3、約3～約5、約5～約10、約10～約15、約15～約20、約20～約25、約25～約30、約30～約40、約40～約50、約50～約100、約100～約150、約150～約200、約200～約250、約250～約500、約500～約750、約750～約1000、またはそれ以上のヌクレオチドまたは残基）の置換が含まれる。

【0135】

アミノ酸修飾の例は、保存的アミノ酸置換または欠失である。具体的な態様において、修飾された配列またはバリエーション配列は、未修飾配列（例えば、野生型配列）の機能または活性の少なくとも一部を保持している。

【0136】

アミノ酸修飾のもう1つの例は、ウイルス粒子のカプシドタンパク質へのターゲティングペプチドの導入である。組換えウイルスベクターを、中枢神経系、例えば、別個の脳領域にターゲティングするペプチドが同定されている。

【0137】

そのように修飾された組換えウイルスは、ある種類の組織（例えば、CNS組織）に、もう1つの種類の組織（例えば、肝組織）より優先的に結合し得る。ある特定の態様において、修飾型カプシドタンパク質を保有する組換えウイルスは、比較可能な未修飾カプシドタンパク質より高いレベルで結合することによって、脳血管上皮組織を「標的とする」ことができる。例えば、修飾型カプシドタンパク質を有する組換えウイルスは、未修飾組換えウイルスより50%～100%高いレベルで脳血管上皮組織に結合し得る。

【0138】

「核酸断片」とは、所定の核酸分子の一部である。大多数の生物において、デオキシリボ核酸（DNA）が遺伝材料であり、リボ核酸（RNA）は、DNA内に含有される情報のタンパク質への移行に関与している。開示されたヌクレオチド配列の断片およびバリエーション、ならびにそれらによってコードされるタンパク質または部分長タンパク質も、本発明に包含される。「断片」または「一部分」とは、ポリペプチドもしくはタンパク質をコードするヌクレオチド配列、またはポリペプチドもしくはタンパク質のアミノ酸配列の、全長または全長未満を意味する。ある特定の態様において、断片または一部分は、生物学的に機能性である（即ち、野生型の活性または機能の5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%を保持している）。

【0139】

分子の「バリエーション」とは、ネイティブ分子の配列と実質的に類似している配列である

。ヌクレオチド配列の場合、バリエーションには、遺伝暗号の縮重のため、ネイティブタンパク質の同一のアミノ酸配列をコードする配列が含まれる。天然に存在する対立遺伝子バリエーション、例えば、これらは、分子生物学技術の使用によって、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびハイブリダイゼーション技術によって同定され得る。バリエーションヌクレオチド配列には、ネイティブタンパク質をコードする、例えば、部位特異的変異導入を使用することによって生成されたヌクレオチド配列などの、合成によって得られたヌクレオチド配列が含まれ、アミノ酸置換を有するポリペプチドをコードするものも含まれる。一般に、本発明のヌクレオチド配列バリエーションは、ネイティブ（内在性）ヌクレオチド配列に対して、少なくとも40%、50%、60%~70%、例えば、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%~79%、一般に、少なくとも80%、例えば、81%~84%、少なくとも85%、例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%~98%の配列同一性を有する。ある特定の態様において、バリエーションは、生物学的に機能性である（即ち、野生型の活性または機能の5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%を保持している）。

10

20

30

40

50

【0140】

特定の核酸配列の「保存的バリエーション」とは、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列をさす。遺伝暗号の縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が、所定のポリペプチドをコードする。例えば、CGT、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGのコードンは、全て、アミノ酸アルギニンをコードする。したがって、コードンによってアルギニンが指定される全ての位置において、コードンは、コードされるタンパク質を変更することなく、記載された対応するコードンのうちの任意のものに変更され得る。そのような核酸の変動は、「保存的に修飾された変動」の一種である「サイレント変動」である。ポリペプチドをコードする本明細書に記載される全ての核酸配列は、他に注記されない限り、可能性のある全てのサイレント変動も記載する。当業者は、（通常、メチオニンの唯一のコードンであるATGを除く）核酸内の各コードンが、標準的な技術によって、機能的に同一の分子を与えるため、修飾され得ることを認識するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各「サイレント変動」は、記載された各配列に潜在している。

【0141】

ポリヌクレオチド配列の「実質的同一性」という用語は、標準的なパラメータを使用して、記載されたアライメントプログラムのうちの1つを使用して、参照配列と比較されたポリヌクレオチドが、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、もしくは79%、または少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、もしくは89%、または少なくとも90%、91%、92%、93%、もしくは94%、またはさらには少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。当業者は、これらの値が、コードン縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレームの位置付け等を考慮することによって、2つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の対応する同一性を決定するため、適切に調整され得ることを認識する。これらの目的のためのアミノ酸配列の実質的同一性とは、通常、少なくとも70%、少なくとも80%、90%、またはさらには少なくとも95%の配列同一性を意味する。

【0142】

ポリペプチドに関して「実質的同一性」という用語は、ポリペプチドが、指定された比較ウィンドウにおいて、参照配列に対して、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、もしくは79%、または80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、もしくは89%、または少なくとも90%、91%、92%、93%、もしくは94%、またはさらには95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を含むことを示す。2つのポリペプチド配列が同一であることの指標は、一方のポリペプチドが、第2のポリペプチドに対して産生された抗体と免疫

学的に反応性であることである。したがって、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、そのポリペプチドは第2のポリペプチドと同一である。

【0143】

「力覚」とは、機械的刺激に対する応答を意味する。機械的刺激のニューロン信号への変換の例の触覚、聴覚、および平衡感覚。力覚入力は、「メカノトランスダクション」と呼ばれる過程を通じて、機械的刺激に対する応答に変換される。

【0144】

「疾患」とは、細胞、組織、もしくは器官を損傷するか、またはそれらの正常な機能に干渉する状態または障害を意味する。疾患の例には、例えば、対象の内耳において発現される、力覚伝達において機能するタンパク質の機能喪失を特徴とする遺伝性疾患が含まれる。もう1つの態様において、疾患は、アッシャー症候群（例えば、USH1）または老人性難聴である。1つの態様において、疾患は、遺伝子欠陥、例えば、TMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHKN、CLRN1、PDZD7、USH1C（例えば、ハーモニン（harmonin）a、b、またはc）の欠陥に関連する聴覚障害である。

【0145】

「処置する」および「処置」という用語は、望ましくない生理学的変化または障害、例えば、障害の発症、進行、もしくは悪化を防止するか、阻害するか、低下させるか、または減少させることを目的とした、治療的処置および予防的または防止的な措置の両方をさす。本発明の目的のため、有益なまたは所望の臨床結果には、検出可能であってもよいし、検出不能であってもよい、症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の症状または有害効果の安定化（即ち、悪化または進行がないこと）、疾患進行の遅延または緩徐化、疾患状態の寛解または軽減、および回復（部分または完全）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。「処置」とは、処置を受けない場合に予想される生存と比較した、生存の延長も意味し得る。処置を必要とする者には、その状態または障害を既に有する者のみならず、（例えば、遺伝学的アッセイによって決定される）その素因を有する者も含まれる。

【0146】

本明細書において使用されるように、指定された成分に関して「本質的に含まない」とは、指定された成分が、意図的に組成物に配合されておらず、かつ/または混入物質として、もしくは微量にのみ存在することを意味するために、本明細書において使用される。したがって、組成物への意図せぬ混入に起因する指定された成分の総量は、0.05%をはるかに下回り、好ましくは、0.01%を下回る。最も好ましいのは、指定された成分の量が標準的な分析方法によって検出され得ない組成物である。

【0147】

本明細書において使用されるように、「1つの（a）」または「1つの（an）」は、1または複数を意味し得る。特許請求の範囲において使用されるように、「含む」という単語と共に使用される時、「1つの（a）」または「1つの（an）」という単語は、1または複数を意味し得る。

【0148】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、選択肢のみをさすと明示されていない限り、または選択肢が相互に排他的であると明示されていない限り、「および/または」を意味するために使用されるが、本開示は、選択肢のみ、および「および/または」をさす定義を支持する。本明細書において使用されるように、「もう1つ」とは、少なくとも第2、またはそれ以上を意味し得る。

【0149】

本願全体を通じて、「約」という用語は、値が、その値を決定するために利用されたデバイスの誤差の固有の変動、方法の固有の変動、研究対象間に存在する変動、または記載された値の10%以内の値を含むことを示すために使用される。

【0150】

VI. キット

10

20

30

40

50

本発明は、パッケージング材料および1つまたは複数の成分をその中に含むキットを提供する。キットは、典型的には、成分の説明、または成分のインビトロ、インビボ、もしくはエキスビボでの使用についての説明を含むラベルまたはパッケージングインサートをその中に含む。キットは、そのような成分、例えば、核酸、組換えベクター、および/またはウイルス粒子のコレクションを含有し得る。

【0151】

キットとは、キットの1つまたは複数の成分を収容する物理的構造をさす。パッケージング材料は、成分を無菌的に維持することができ、そのような目的のために一般的に使用される材料から作られたものであってよい（例えば、紙、波形繊維、ガラス、プラスチック、ホイル、アンプル、バイアル、チューブ等）。

【0152】

ラベルまたはインサートは、その中の1つまたは複数の成分の識別情報、用量、活性成分の臨床薬理学、例えば、作用機序、薬物動態、および薬力学を含み得る。ラベルまたはインサートは、製造元、ロット番号、製造の場所および日付、有効期限を識別する情報を含み得る。ラベルまたはインサートは、製造元情報、ロット番号、製造元の場所および日付を識別する情報を含み得る。ラベルまたはインサートは、キットの成分が使用され得る疾患に関する情報を含み得る。ラベルまたはインサートは、方法、使用、または処置プロトコルもしくは治療計画における、キットの成分のうちの1つまたは複数の使用についての、医師または対象のための説明を含み得る。説明は、投与の量、頻度、または継続期間、および本明細書に記載される方法、使用、処置プロトコル、または予防計画もしくは治療計画のうちの任意のものを実施するための説明を含み得る。

【0153】

ラベルまたはインサートは、成分が提供し得る任意の利益、例えば、予防的または治療的な利益に関する情報を含み得る。ラベルまたはインサートは、可能性のある有害な副作用、合併症、または反応に関する情報、例えば、特定の組成物を使用することが適切でない状況に関する対象または医師への警告を含み得る。対象が組成物と不適合性であり得る1つもしくは複数の他の薬物治療を受ける時、受ける予定である時、もしくは現在受けている時、または対象が組成物と不適合性であるもう1つの処置プロトコルもしくは治療計画を受ける時、受ける予定である時、もしくは現在受けている時にも、有害な副作用または合併症が起こり得、したがって、説明は、そのような不適合性に関する情報を含み得る。

【0154】

ラベルまたはインサートには、成分、キット、もしくは梱包材（例えば、箱）とは別であるか、またはそれに添付されているか、またはキットの成分を含有しているアンプル、チューブ、もしくはバイアルに付着している、「印刷物」、例えば、紙または厚紙が含まれる。ラベルまたはインサートは、さらに、コンピュータが読み取り可能な媒体、例えば、バーコード付きの印刷されたラベル、ディスク、光ディスク、例えば、CDもしくはDVD-ROM/RAM、DVD、MP3、または電気記憶媒体、例えば、RAMおよびROM、またはこれらのハイブリッド、例えば、磁気/光記憶媒体、フラッシュメモリ、ハイブリッド、およびメモリタイプカードを含み得る。

【実施例】

【0155】

VII. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を示すために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において良好に機能することが本発明者によって発見された技術を表し、したがって、その実施のための好ましいモードを構成すると見なされることが、当業者には理解されるはずである。しかしながら、本開示を考慮すれば、多くの変化を、開示された具体的な態様に加えても、本発明の本旨および範囲から逸脱することなく、同様のまたは類似の結果を得ることが可能であることを、当業者は理解するはずである。

【0156】

実施例1 - 淡蒼球への治療的送達

それぞれ、AAV1カプシドの590位、AAV2カプシドの587位、およびAAV9カプシドの588位へのランダムターゲティングペプチド配列の挿入による、AAV1、AAV2、およびAAV9へのランダムペプチドの挿入によって、ペプチド修飾型AAVカプシドバリエーションのライブラリを生成した。これらのライブラリを、アカゲザルにおいて、淡蒼球への注入後に、脳深部構造および大脳皮質に広く形質導入するバリエーションについてスクリーニングした（図38A～38C）。さらに2匹のアカゲザルにおける蛍光実験におけるさらなる検証のため、6つのバリエーション（表1）を選択した。少なくとも5つのカプシドバリエーションが、HDおよびPDにおいて影響を受ける脳深部構造に形質導入した。AAV1.THTD.mTFP1の形質導入は、尾状核/被殻において広範であった。AAV1.THTD.mTFP1は、HDにおいて高度に脆弱である多数の皮質第V/VI層投射ニューロンも形質導入した（図39）。これらのAAVカプシドは、HDおよびPDのための多様な治療用ペイロードをパッケージングするために使用され得る。これらのバリエーションについての肝臓形質導入は、検出限界未満であった（図40）（AAV-BLD010はAAV1.THTD.mTFP1であり；AAV-BLD011はAAV2.SGGR.NES_mNGであり；AAV-BLD012はAAV2.SKGQ.mRuby3である）。

10

【0157】

（表1）カプシドターゲティングペプチド

血清型	DNA	ペプチド
AAV1	TCTAGTGGGGATTCGACGAAG (SEQ ID NO: 7)	SSGDSTK (SEQ ID NO: 8)
AAV1	ACGCATACTGATCATACGCGT (SEQ ID NO: 9)	THTDDTR (SEQ ID NO: 10)
AAV2	TCTAAGGGGCAGGGGACGGGG (SEQ ID NO: 11)	SKGQGTG (SEQ ID NO: 12)
AAV2	TCGGGGGGGAGGTATGCGGAG (SEQ ID NO: 13)	SGGRYAE (SEQ ID NO: 14)
AAV9	TCTTTGGGTAGTACTAAGGTG (SEQ ID NO: 15)	SLGSTKV (SEQ ID NO: 16)
AAV9	AAGATGTTGAGTGTTGTTAAT (SEQ ID NO: 17)	KMLSVVN (SEQ ID NO: 18)

20

30

【0158】

選択されたバリエーションをさらに分析するため、THTDDTRターゲティングペプチド（SEQ ID NO:20）を含むAAV1バリエーションをmTFP1発現カセットによってパッケージングし（AAV1.THTD.mTFP1）、SGGRYAEターゲティングペプチド（SEQ ID NO:22）を含むAAV2バリエーションをmNeonGreen発現カセットによってパッケージングし（AAV2.SGGR.NES_mNG）、SKGQGTGターゲティングペプチド（SEQ ID NO:21）を含むAAV2バリエーションをmRuby3発現カセットによってパッケージングし（AAV2.SKGQ.mRuby3）、KMLSVVNターゲティングペプチド（SEQ ID NO:24）を含むAAV9バリエーションをHaloタグ発現カセットによってパッケージングし（AAV9KMLS.Haloタグ）、SLGSTKVターゲティングペプチド（SEQ ID NO:23）を含むAAV9バリエーションをmBFP2発現カセットによってパッケージングした（AAV9SLGS.mBFP2）。

40

【0159】

2匹の成体アカゲザルの淡蒼球に、合計7.5E10vgの用量で、ある特定のカプシドバリエーションを注射した。淡蒼球への送達後のカプシドの各々の体内分布および輸送特性を決定するため、イメージング研究を実施した。それぞれのバリエーションカプシドに特異的な各蛍光色素から、mRNAの局在を決定するため、組織の10umのzスタックのFISH画像を使用した（図1、4、7、9、11、12、15、17、18、20、および25）。それぞれのバリエーションカプシドに特異的な各蛍光色素から、タンパク質の局在を決定するため、落射蛍光

50

画像を使用した（図2、3、5、6、8、10、13、14、16、17、19、21～24、および26）。

【0160】

実施例2 - 淡蒼球ベクターのマウス注射

3匹のマウスが、表2に表される指定された解剖学的構造（視床、内包/内側淡蒼球（IC/MGP）、または深部小脳核（DCN））の各半球に異なるウイルスの注射を受けた。異なるウイルスは、RVC1023、pmAAV2.SGGR.NeonGreen；RVC1024、pmAAV2.SKGO.mRuby；およびRVC1025、pmAAV1.THTD.mTFPであった。注射の22日後にマウスを剖検し、落射蛍光顕微鏡法によって査定した（図27～37）。

【0161】

（表2）淡蒼球ベクターのマウス注射パラダイム

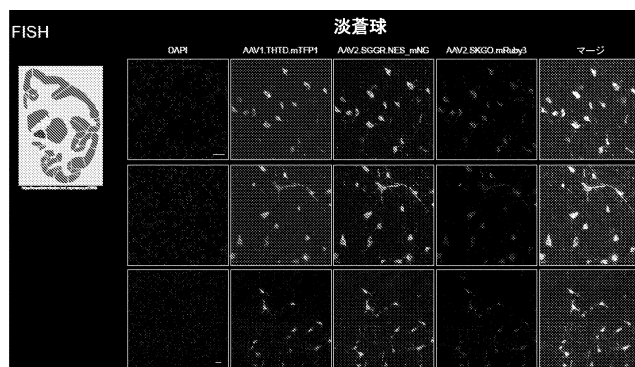
マウス ID	ROA	左	右	vg/半球
4279	視床	NeonGreen	mRuby	5.00E+09
4280	視床	mRuby	TFP	5.00E+09
4281	視床	TFP	NeonGreen	5.00E+09
4282	IC/MGP	NeonGreen	mRuby	4.00E+09
4285	IC/MGP	mRuby	TFP	4.00E+09
4292	IC/MGP	TFP	NeonGreen	4.00E+09
4293	IC/MGP	mRuby	TFP	4.00E+09
A16	DCN	NeonGreen	mRuby	4.00E+09
A17	DCN	mRuby	TFP	4.00E+09
A18	DCN	TFP	NeonGreen	4.00E+09

【0162】

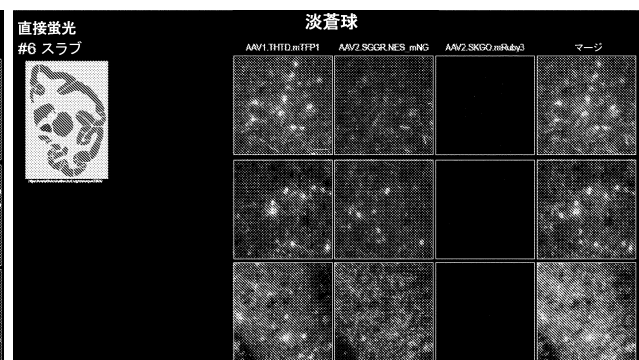
本明細書に開示され、特許請求の範囲に記載された方法は、全て、本開示を考慮すれば、過度の実験法なしに製造され、実施され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい態様に関して説明されているが、本発明の概念、本旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載された方法および工程または工程の順序に変動が適用され得ることが、当業者には明らかであろう。より具体的には、本明細書に記載された薬剤を、化学的にも生理学的にも関連しているある特定の薬剤に置換しても、同じ、または類似している結果が達成され得ることが、明らかであろう。当業者に明らかなそのような類似の代用物および修飾は、全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の本旨、範囲、および概念に含まれると見なされる。

【図面】

【図1】



【図2】



10

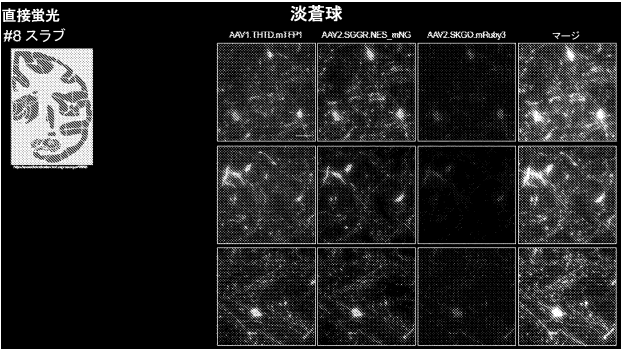
20

30

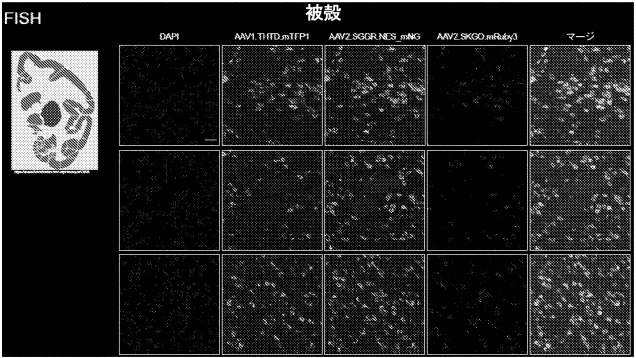
40

50

【図 3】

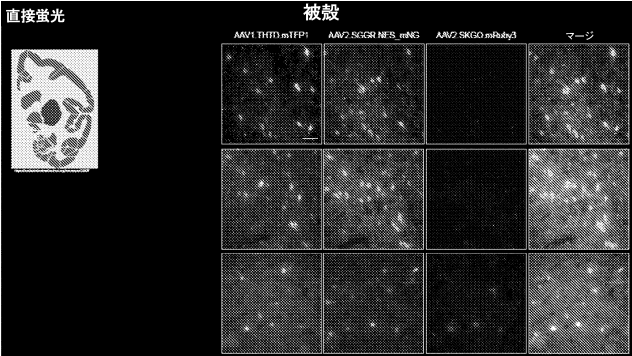


【図 4】

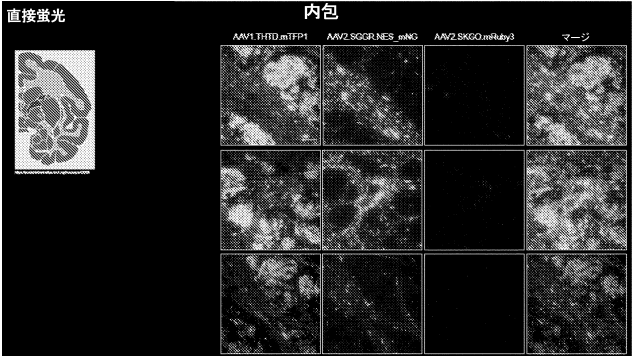


10

【図 5】

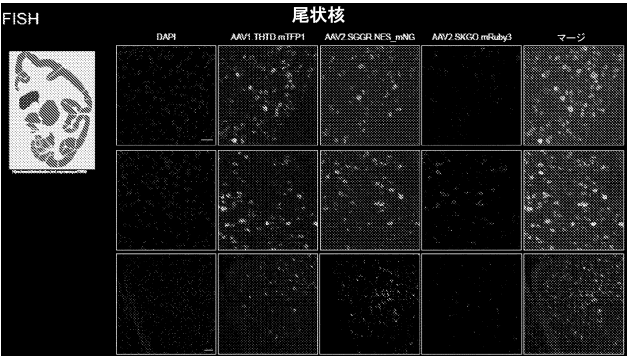


【図 6】

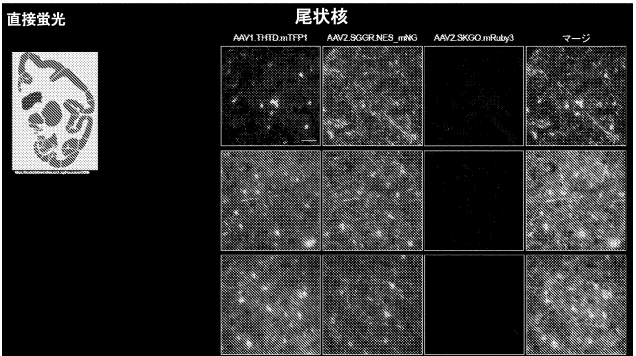


20

【図 7】



【図 8】

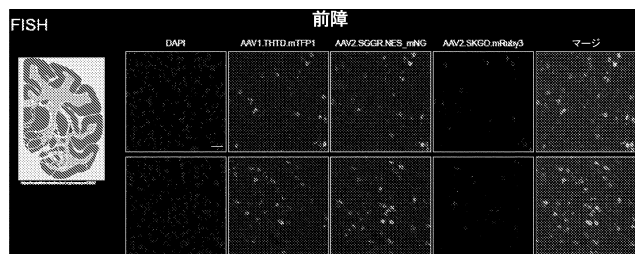


30

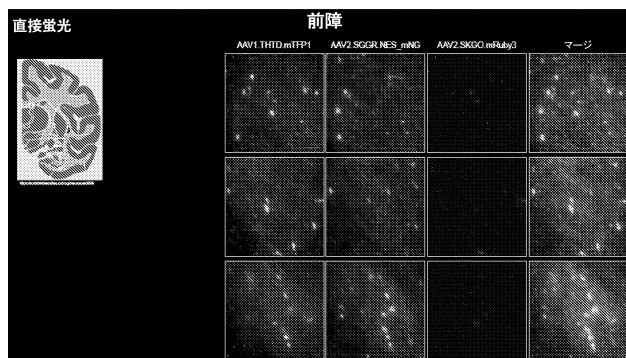
40

50

【図 9】

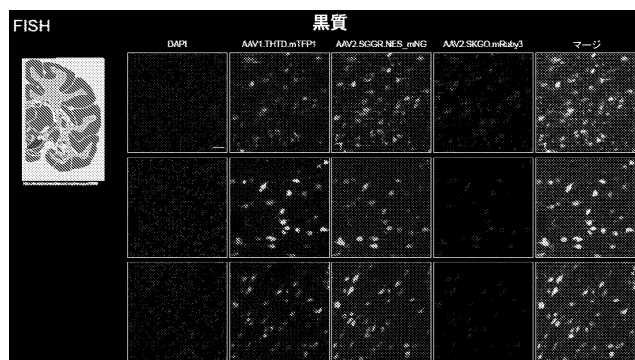


【図 10】

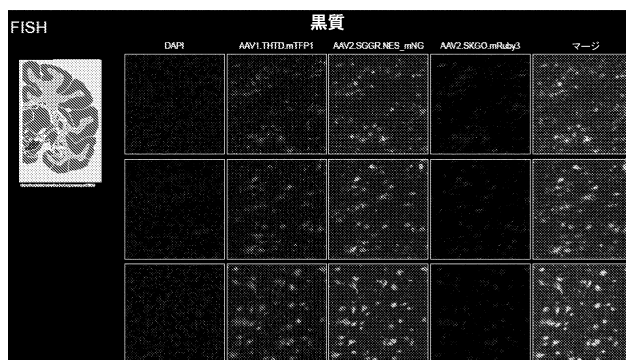


10

【図 11】

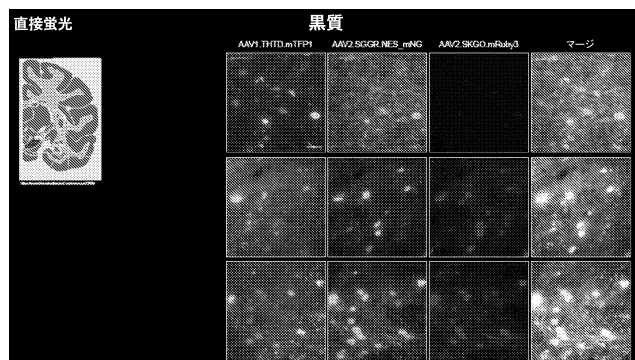


【図 12】

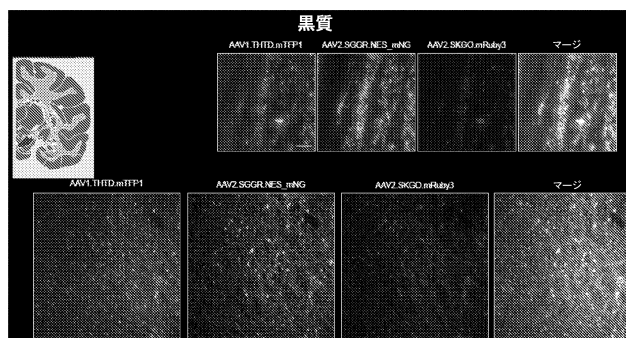


20

【図 13】



【図 14】

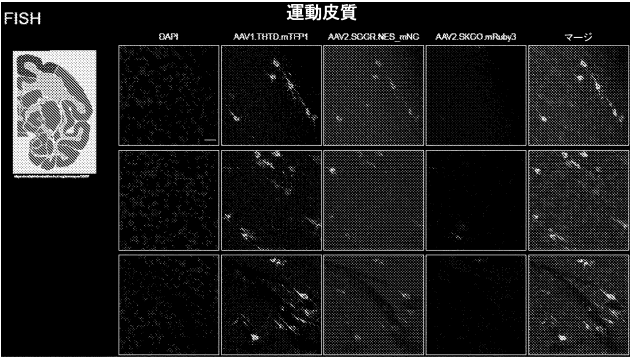


30

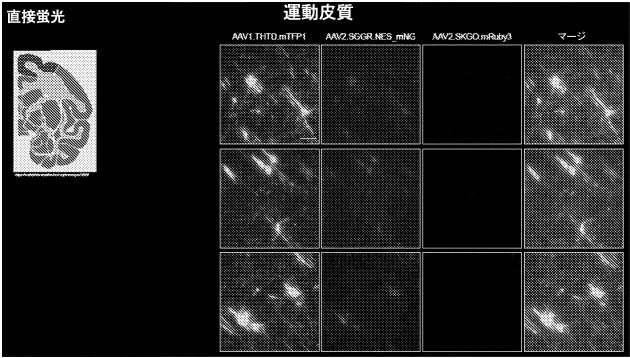
40

50

【図 15】

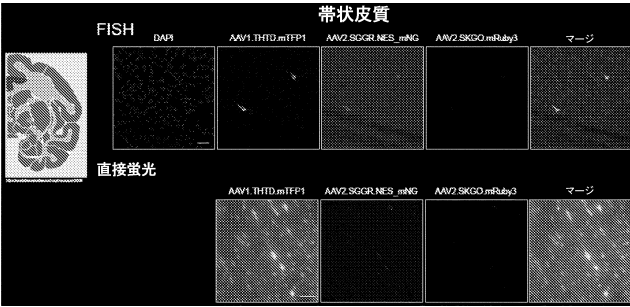


【図 16】

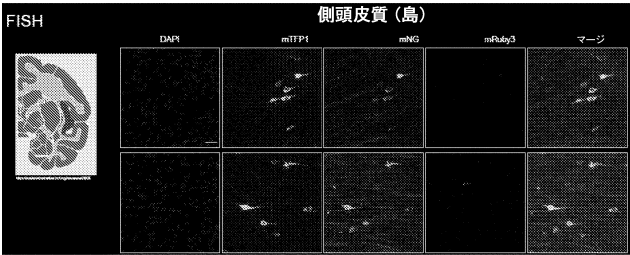


10

【図 17】

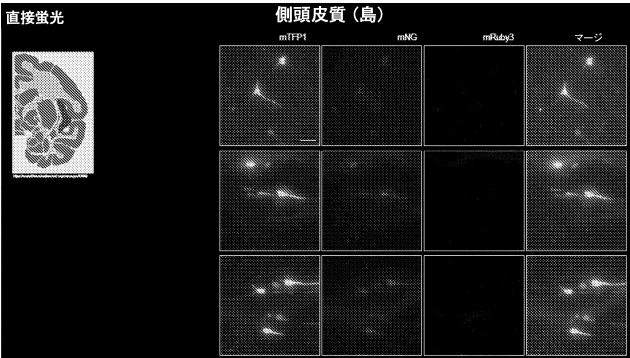


【図 18】

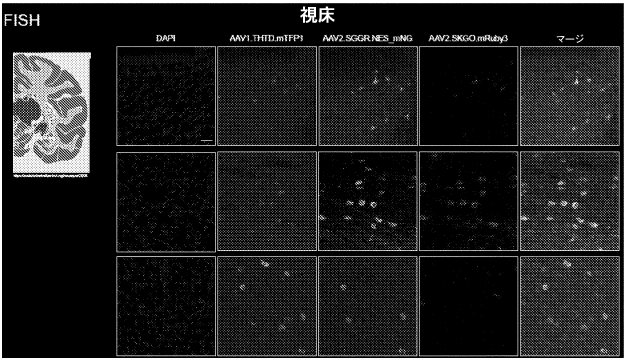


20

【図 19】



【図 20】

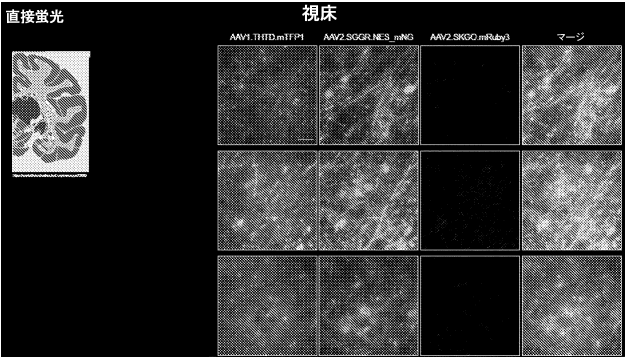


30

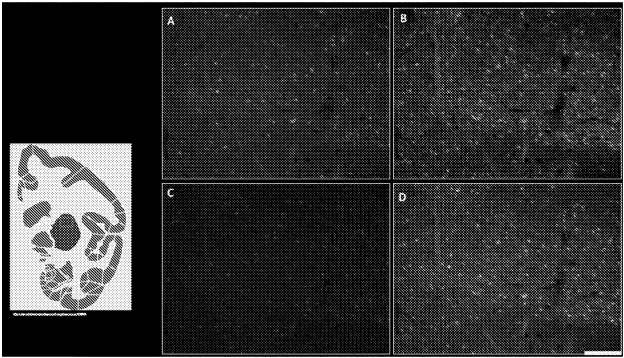
40

50

【図 2 1】

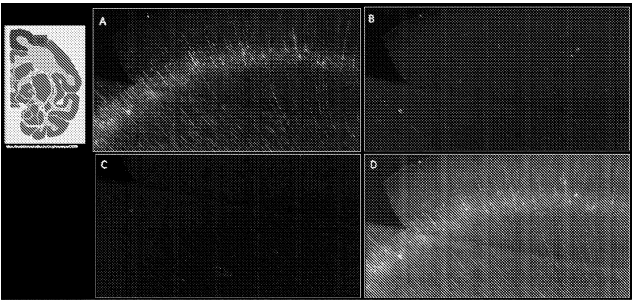


【図 2 2】

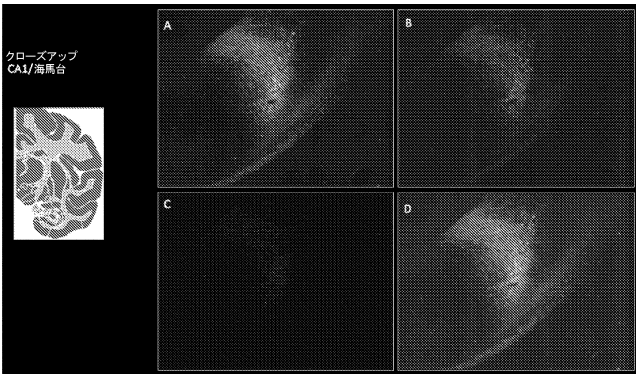


10

【図 2 3】

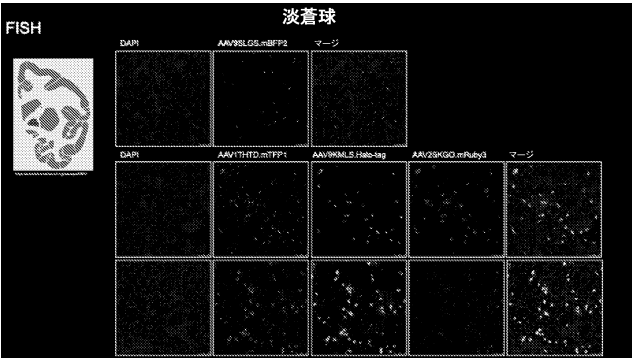


【図 2 4】

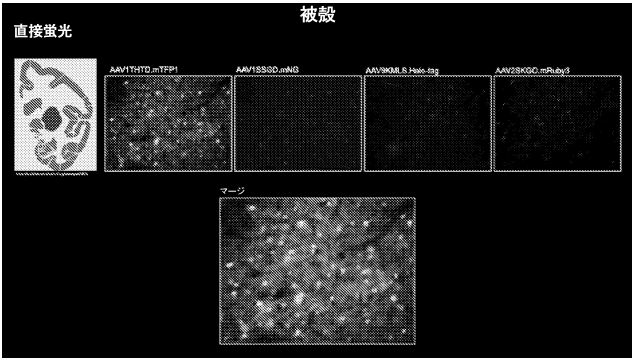


20

【図 2 5】



【図 2 6】

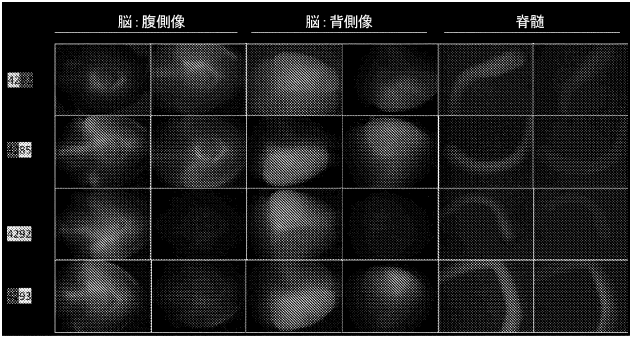


30

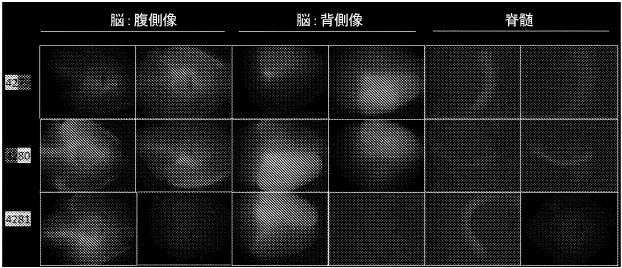
40

50

【図 2 7】

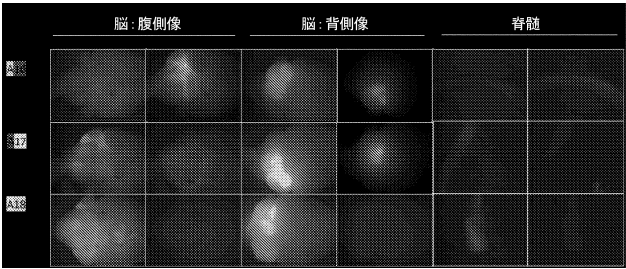


【図 2 8】

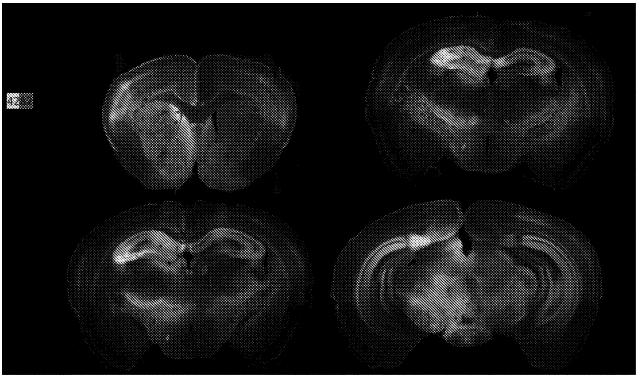


10

【図 2 9】

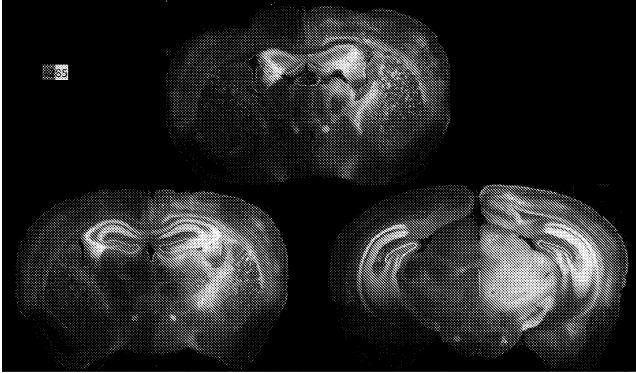


【図 3 0】

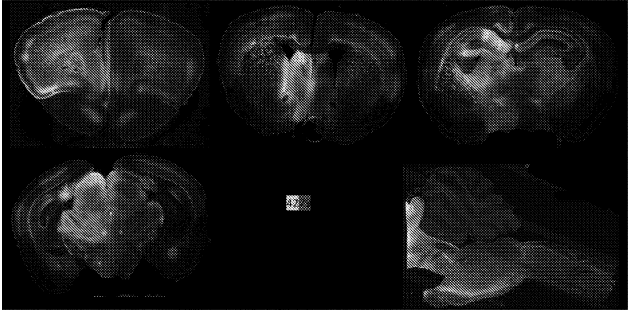


20

【図 3 1】



【図 3 2】

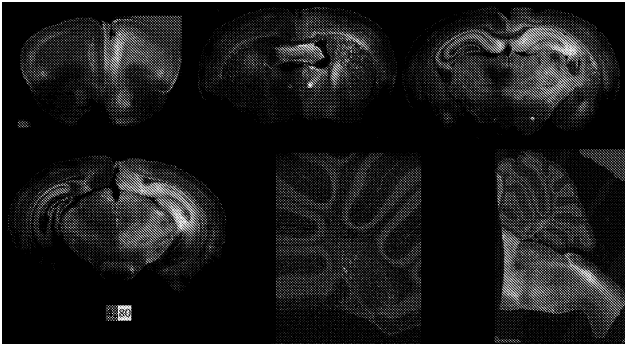


30

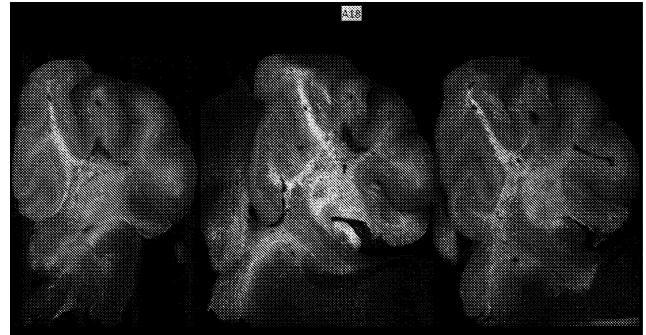
40

50

【圖 3 3】

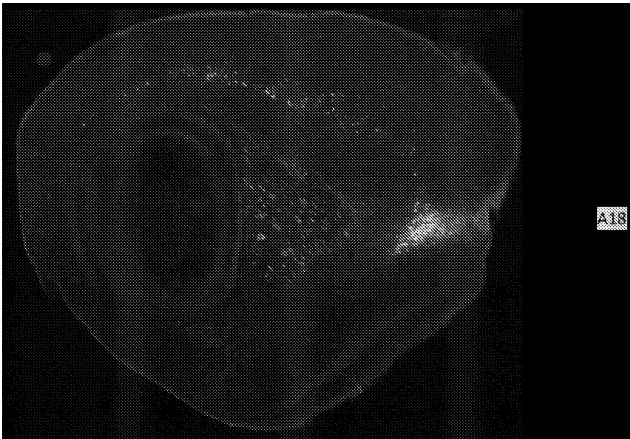


【圖 3 4】

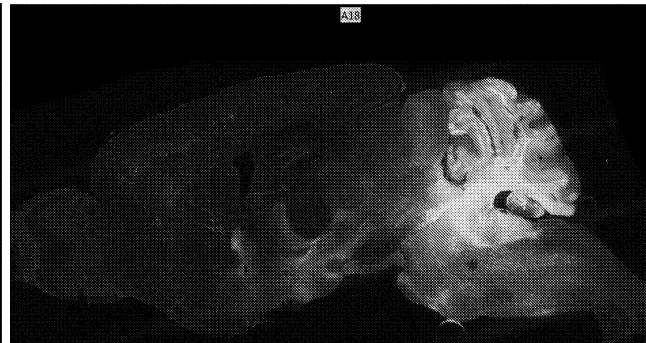


10

【 図 3 5 】

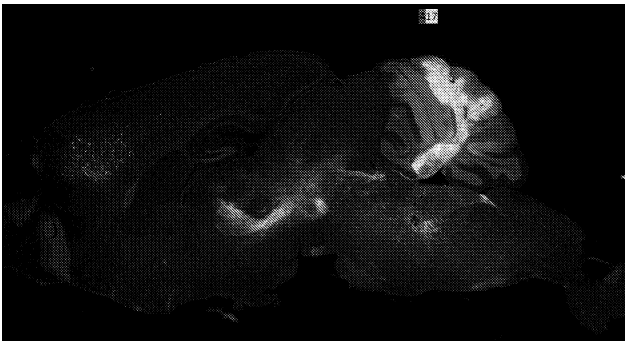


【圖 3 6】

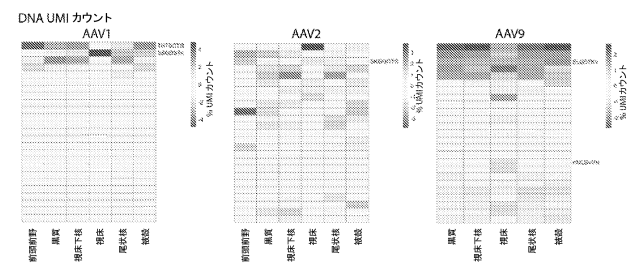


20

【圖 3 7】



【図 3 8 - 1】

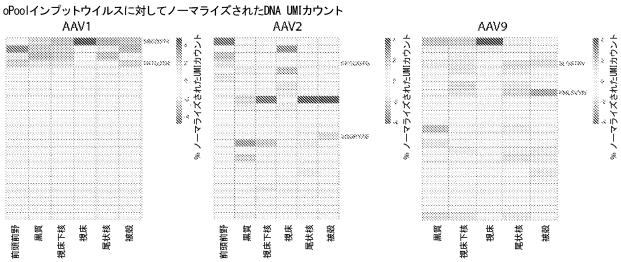


A

30

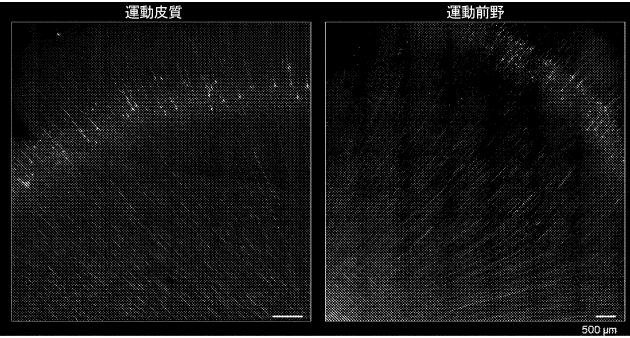
40

【図 38-2】

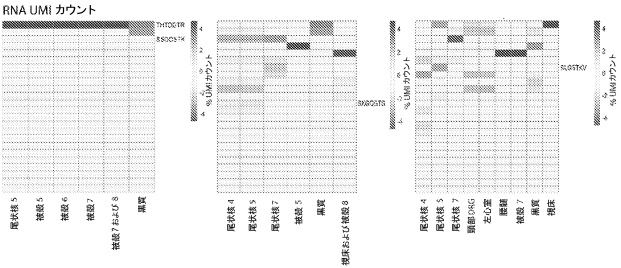


B

【図 39】



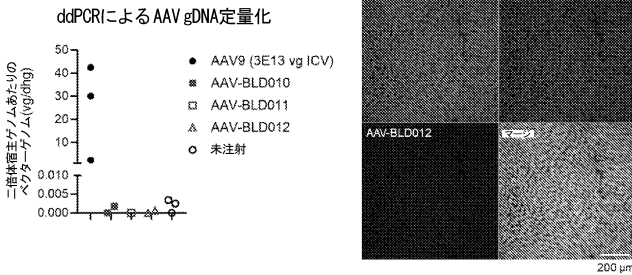
10



C

20

【図 40】



30

【配列表】

2025516583000001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/21905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - INV. A61P 25/28; C07K 7/06; C07K 14/005; C12N 15/86 (2023.01)		
ADD.		
CPC - INV. A61P 25/28; C07K 7/06; C07K 14/005; C12N 15/86		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — A	WO 2021/102234 A1 (The Children's Hospital of Philadelphia) 27 May 2021; abstract; paragraphs [0005]-[0007], [0010], [0011], [0041]; SEQ ID NO: 141	1-7, 18/1-7 16, 17, 18/16-17
A	US 2018/0245098 A1 (The Children's Hospital of Philadelphia) 03 August 2018; paragraphs [0017], [0021]; claim 5	16, 17, 18/16-17
A	US 2022/0098574 A1 (Holobiome, Inc.) 31 March 2022; paragraph [0022]; SEQ ID NO: 84,350	16, 17, 18/16-17
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 July 2023 (24.07.2023)		Date of mailing of the international search report SEP 27 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/21906

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		International application No. PCT/US23/21905
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	10
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	☒ Claims Nos.: 19-44 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: ---Please See Supplemental Page---		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	30
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Groups I+, claims 1-18, SEQ ID NO: 20 (capsid protein sequence), AAV1 (capsid protein type), SEQ ID NO: 10 (targeting peptide sequence).	
Remark on Protest	☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	40

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/21905

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

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

Groups I+, claims 1-18, SEQ ID NO: 20 (capsid protein sequence), AAV1 (capsid protein type), SEQ ID NO: 10 (targeting peptide sequence) are directed to modified AAV capsid proteins comprising organ-specific targeting sequences.

The AAV capsid protein of Claims 1, 2-3 (each in-part), 4-7, 16 (in-part), 17, and 18 (in-part) are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise an AAV capsid encompassing SEQ ID NO: 20 (first exemplary capsid protein sequence) of type AAV1 (first exemplary capsid protein type) comprising a targeting peptide encompassing SEQ ID NO: 10 (first exemplary targeting peptide sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 2-3 and 16 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional AAV capsid sequences, types and targeting peptide sequences, with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 21 (capsid protein sequence), AAV2 (capsid protein type), SEQ ID NO: 12 (targeting peptide sequence).

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

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a modified adeno-associated virus (AAV) capsid protein comprising a targeting peptide that targets a viral vector comprising the modified AAV capsid protein to a distinct organ or brain structure, wherein the targeting peptide is three to ten amino acids in length; these shared technical features are previously disclosed by WO 2021/102234 A1 to The Children's Hospital Of Philadelphia (hereinafter "Philadelphia").

Philadelphia discloses a modified adeno-associated virus, AAV, capsid protein comprising a targeting peptide that targets a viral vector comprising the modified AAV capsid protein to a distinct organ or brain structure, wherein the targeting peptide is three to ten amino acids in length (a modified adeno-associated virus, AAV, capsid protein comprising a targeting peptide that targets a viral vector comprising the modified AAV capsid protein to a distinct organ or brain structure, wherein the targeting peptide is three to ten amino acids in length; claim 1).

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

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)

A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76

,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

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 ダビッドソン ベバリー

アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア サウス ストリート 2 7 1 6
フィフティーンス フロア ザ・チルドレンズ・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア内

(72)発明者 テセドル ルイス

アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア サウス ストリート 2 7 1 6
フィフティーンス フロア ザ・チルドレンズ・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア内

(72)発明者 ラナム ポール

アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア サウス ストリート 2 7 1 6
フィフティーンス フロア ザ・チルドレンズ・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア内

(72)発明者 リーブ デイビッド

アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア サウス ストリート 2 7 1 6

Fターム (参考)