

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-522883

(P2023-522883A)

(43)公表日 令和5年6月1日(2023.6.1)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
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53頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-562939(P2022-562939)	(71)出願人	507053954
(86)(22)出願日	令和3年4月14日(2021.4.14)		ザ・ボード・オブ・リージェンツ・オブ
(85)翻訳文提出日	令和4年12月14日(2022.12.14)		・ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス
(86)国際出願番号	PCT/US2021/027266		・システム
(87)国際公開番号	WO2021/211700		THE BOARD OF REGENTS
(87)国際公開日	令和3年10月21日(2021.10.21)		OF THE UNIVERSITY OF
(31)優先権主張番号	63/010,179		TEXAS SYSTEM
(32)優先日	令和2年4月15日(2020.4.15)		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス、
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		オースティン、ウエスト セブンス スト
			リート 2 1 0
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	230104019
			弁護士 大野 聖二
		(74)代理人	100149076
			弁理士 梅田 慎介
		(74)代理人	100173185
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経学的障害を処置するための組成物および方法

(57)【要約】

本開示は、神経学的障害、たとえば巨大軸索ニューロパチー等を含むがそれらに限らない、対象における疾患および/または障害を処置するための方法および組成物を提供する。本明細書に記載される方法は、遺伝子療法(たとえば、rAAVウイルスベクター)を、対象の迷走神経(たとえば、左迷走神経)中への注射を介して、対象に直接投与することを含む。

【選択図】図4

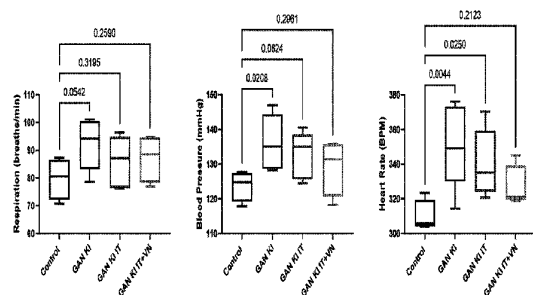


FIG. 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の組み換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ウイルスベクターを、前記少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスベクターを前記対象の迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 2】

前記迷走神経が、前記対象の左迷走神経である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記疾患および/または障害が、神経学的疾患および/または障害である、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記神経学的疾患および/または障害が、少なくとも1つの自律神経機能不全により特徴付けられ、および前記迷走神経中への注射を介する前記少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスベクターの投与が、前記少なくとも1つの自律神経機能不全の少なくとも1つの症状を緩和する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも1つの症状が、構音障害、嚥下障害、消化管運動の不適切な制御、血圧の不適切な制御、呼吸困難、起立性低血圧症、発汗異常、尿道の不適切な制御、性機能障害、およびこれらの任意の組合せから選択される、請求項 4 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記疾患および/または障害が、脊髄性筋萎縮症、フリードリッヒの運動失調、C L N 3 バッテン病、C L N 6 バッテン病、C L N 7 バッテン病、てんかん性脳症、リー症候群、シャルコー・マリー・トゥース病、巨大軸索ニューロパチー、ラフォラ病、S L C 1 3 A 5 てんかん性脳症、グリコシル化の先天性疾患、タイプ I q、K a h r r i z i 症候群、アンジェルマン症候群、レット症候群、痙性対麻痺、小児期の交代性片麻痺、およびツェルバーガスベクトラム障害から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記疾患および/または障害が、巨大軸索ニューロパチーである、請求項 6 に記載の方法。 30

【請求項 8】

前記 r A A V ウイルスベクターが、
 (i) A A V カプシドタンパク質と、
 (i i) 5 ' から 3 ' の方向に
 a) 第 1 の A A V I T R 配列、
 b) プロモーター配列、
 c) ギガキソニン (G A N) ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子、
 d) ポリ A 配列；および
 e) 第 2 の A A V I T R 配列
 を含む r A A V ベクターとを含む、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 9】

前記 G A N ポリペプチドが、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が、G A N ポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列であり、前記 G A N ポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列が、配列番号 3 で表される核酸配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記プロモーター配列が、配列番号 8 で表される核酸配列を含む、請求項 8 に記載の方 50

法。

【請求項 12】

前記ポリ A 配列が、配列番号 9 で表される核酸配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記プロモーター配列が配列番号 8 で表される核酸配列を含み、前記 G A N ポリペプチドが配列番号 3 で表される核酸配列を含み；および前記ポリ A 配列が配列番号 9 で表される核酸配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 r A A V ベクターが、配列番号 10 で表される核酸配列を含む、請求項 13 に記載の方法。

10

【請求項 15】

前記 A A V カプシドタンパク質が、A A V 9 カプシドタンパク質である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 r A A V ウイルスベクターが、ウイルス粒子約 3.5×10^{13} 個 ~ 約 3.5×10^{14} 個の量で投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記対象が、少なくとも 1 つの治療有効量の初回 r A A V ウイルスベクターをこれまでに投与されたことのある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記初回 r A A V ウイルスベクターが、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内もしくは眼周囲、経口、経直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、脳槽内、神経内 (intraneurally)、胸膜内、局所、リンパ節内、脳槽内、または神経内 (intraneuronal) で前記対象に投与された、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 19】

前記初回 r A A V ウイルスベクターが、前記対象に髄腔内投与された、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記初回 r A A V ウイルスベクターが、前記対象の迷走神経中への注射を介して投与される r A A V ウイルスベクターと同じである、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 21】

前記対象が、前記 r A A V ウイルスベクターに対する中和抗体を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

対象における巨大軸索ニューロパチーを処置する方法であって、

a) 第 1 の治療有効量の r A A V ウイルスベクターを、前記対象に髄腔内投与するステップと、

b) 少なくとも第 2 の治療有効量の r A A V ウイルスベクターを、前記少なくとも第 2 の治療有効量の r A A V ウイルスベクターを前記対象の左迷走神経中に注射することにより、投与するステップと

40

を含み、

前記 r A A V ウイルスベクターが、

(i) A A V 9 カプシドタンパク質と、

(ii) 配列番号 10 で表される核酸配列を含む r A A V ベクターと

を含む、方法。

【請求項 23】

前記第 1 の治療有効量の r A A V ウイルスベクターおよび前記少なくとも第 2 の治療有効量の r A A V ウイルスベクターが、連続的に投与される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

50

前記第1の治療有効量のrAAVウイルスベクターおよび前記少なくとも第2の治療有効量のrAAVウイルスベクターが、同時に投与される、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

【0002】

本出願は、2020年4月15日出願の米国仮特許出願第63/010,179号の優先権を主張し、その内容は、あらゆる目的のため参照により全体として本明細書に組み込まれる。

10

政府支援

【0003】

本発明は、国立衛生研究所により授与された助成NS087175の下、政府の支援を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0004】

配列表の参照による組み込み

本出願はEFS-Webを介してASCIIフォーマットで提出され、参照により全体として本明細書に組み込まれる配列表を含む。前記ASCIIコピーは2021年4月14日に作成され、「TAYS-010_SeqList.txt」と命名され、大きさは約28.2KBである。

20

【背景技術】

【0005】

アデノ随伴ウイルス(AAV)に基づく遺伝子療法は、神経学的障害およびその付随する自律神経機能不全の処置を含む、異なる多種多様な疾患の処置において益々一般化している。しかし、最近の研究は、ある特定のAAV血清型に対する中和抗体がヒト集団においてきわめて一般的であることを明らかにした。実際、いくつかの研究は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、およびAAV9に対する中和抗体の保有率は、それぞれ70%、70%、40%、46%、38%、および47%ほど高いことを示した。中和抗体陽性の個人において、AAVに基づく遺伝子療法は実行性がないと考えられる。最終的に、これまでに第1のAAVに基づく遺伝子療法の投与を受けたことがあり、そしてa)第1のAAVに基づく遺伝子療法の追加投与；またはb)異なるAAVに基づく遺伝子療法を必要とする対象に関して、中和抗体の存在は特に問題である。したがって、対象における中和抗体の存在に付随する問題を克服するAAVに基づく遺伝子療法を投与するための組成物および方法に対する必要性が当技術分野において存在する。さらに、AAVのような遺伝子療法ベクターに対して血清陽性である対象を含む、対象の自律神経系に対する遺伝子療法ベクターの送達と関連する組成物および方法に対する必要性が当技術分野において存在する。

30

【0006】

巨大軸索ニューロパチーは、年齢3~4歳の幼児学令前期において開始する稀で壊滅的な神経学的障害であり、一般的に感覚性運動失調が現れる。末梢神経系(PNS)において、疾患は感覚および運動神経を進行性に影響を及ぼす。病理は自律神経系(ANS)全体を通じて明らかであり、また患者は、構音障害、嚥下障害、GI運動に関する問題、および呼吸困難の形態の腸管機能不全および自律神経機能不全を頻繁に呈する。患者は、車椅子依存となり、上肢の使用は限定され、そして10代後半末期までにその下肢をほとんどまたはまったく使えなくなるのが典型的である。さらに、10代において、気管切開術(またはその他の人工呼吸手段)、ならびに栄養管が必要になることが多い。巨大軸索ニューロパチーを有する患者から得られたMRI結果は、大脳および小脳内白質異常、疾患後期において最終的に脳幹および脊髄の重度萎縮を示すことが多いように、巨大軸索ニューロパチーは中枢神経系にも影響を及ぼす。20代になるまでに死が訪れるのが典型的である。巨大軸索ニューロパチーは、第16染色体に位置するGAN遺伝子内の、ギガキソ

40

50

ニン（GAN）タンパク質をコードする16q24.1における異常により惹起される常染色体劣性の遺伝障害である。異常なGANタンパク質は、ニューロフィラメントと呼ばれるタンパク質の短い系の沈着を伴う、神経細胞部分（軸索と呼ばれる）の腫脹を惹起し、巨大軸索の外観をもたらす。巨大軸索は、末梢神経系の変性および機能異常を惹起する。巨大軸索ニューロパチーに対して現在処置法は存在しない。したがって、巨大軸索ニューロパチーの処置と関連する組成物および方法に対する必要性が当技術分野において存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示は、組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）に基づく遺伝子療法を含む、ただしこれに限定されない遺伝子療法の分野と一般的に関連する。より具体的には、本開示は、rAAVに基づく遺伝子療法をこれまでに投与されたことがあり、および/または1つもしくは複数のAAV血清型に対する中和抗体について血清陽性である対象に対するrAAVウイルスベクターの投与と一般的に関連する。本開示は、対象の少なくとも1つの迷走神経への注射を介して、少なくとも1つのrAAVウイルスベクターを対象に対して投与するための組成物および方法を提供する。本開示は、ギガキソニン（GAN）ポリペプチドをコードするトランスジーン配列を含むrAAVウイルスベクター、その製造法、およびトランスジーンを送達して疾患または障害（GAN遺伝子の喪失、機能不全、および/または欠損に付随する疾患を含む）を処置または防止するためのその使用も提供する。

10

【0008】

本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ウイルスベクターを、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを前記対象の迷走神経に注射することにより、前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。

20

【0009】

一部の態様では、迷走神経は、対象の左迷走神経であり得る。

【0010】

一部の態様では、疾患および/または障害は、神経学的疾患および/または障害であり得る。

30

【0011】

一部の態様では、神経学的疾患および/または障害は、少なくとも1つの自律神経機能不全により特徴付けられ、および迷走神経への注射を介する少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターの投与は、少なくとも1つの自律神経機能不全の少なくとも1つの症状を緩和する。一部の態様では、少なくとも1つの症状は、構音障害、嚥下障害、消化管運動の不適切な制御、血圧の不適切な制御、呼吸困難、起立性低血圧症、発汗異常、尿道の不適切な制御、性機能障害、およびこれらの任意の組合せから選択され得る。

【0012】

一部の態様では、疾患および/または障害は、脊髄性筋萎縮症、フリードリッヒの運動失調、CLN3バッテン病、CLN6バッテン病、CLN7バッテン病、てんかん性脳症、リー症候群、シャルコー・マリー・トゥース病、巨大軸索ニューロパチー、ラフォラ病、SLC13A5てんかん性脳症、グリコシル化の先天性疾患、タイプIq、Kahrizizhi症候群、アンジェルマン症候群、レット症候群、痙性対麻痺、小児期の交代性片麻痺、およびツェルベータースペクトラム障害から選択され得る。一部の態様では、疾患および/または障害は巨大軸索ニューロパチーであり得る。

40

【0013】

一部の態様では、rAAVウイルスベクターは、(i)AAVカプシドタンパク質と、(ii)5'から3'の方向に：a)第1のAAV ITR配列；b)プロモーター配列；c)ギガキソニン（GAN）ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子；d)ポリA配列；およびe)第2のAAV ITR配列を含むrAAVベクター

50

とを含み得る。

【0014】

一部の態様では、GANポリペプチドは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み得る。

【0015】

一部の態様では、GANポリペプチドをコードする核酸配列は、GANポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列であり得、GANポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列は、配列番号3で表される核酸配列を含む。

【0016】

一部の態様では、プロモーター配列は配列番号8で表される核酸配列を含み得る。 10

【0017】

一部の態様では、ポリA配列は配列番号9で表される核酸配列を含み得る。

【0018】

一部の態様では、rAAVベクターは、5'から3'の方向に、a)第1のAAV ITR配列；b)配列番号8で表される核酸配列を含むプロモーター配列；c)GANポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、GANポリペプチドをコードする前記核酸配列が配列番号3で表される核酸配列を含む、トランスジーン核酸分子；d)配列番号9で表される核酸配列を含むポリA配列；およびe)第2のAAV ITR配列を含み得る。

【0019】

一部の態様では、rAAVベクターは配列番号10で表される核酸配列を含み得る。 20

【0020】

一部の態様では、AAVカプシドタンパク質はAAV9カプシドタンパク質であり得る。

【0021】

一部の態様では、rAAVウイルスベクターは、ウイルス粒子約 3.5×10^{13} 個～約 3.5×10^{14} 個の量で投与され得る。

【0022】

一部の態様では、対象は、少なくとも1つの治療有効量の初回rAAVウイルスベクターをこれまでに投与された可能性がある。一部の態様では、初回rAAVウイルスベクターは、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内もしくは眼周囲、経口、経直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、脳槽内、神経内(intranervally)、胸膜内、局所、リンパ節内、脳槽内、または神経内(intranerve)で対象に投与された可能性がある。一部の態様では、初回rAAVウイルスベクターは、対象に髄腔内投与された可能性がある。 30

【0023】

一部の態様では、初回rAAVウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射を介して投与されるrAAVウイルスベクターと同じであり得る。

【0024】

一部の態様では、対象はrAAVウイルスベクターに対する中和抗体を有し得る。 40

【0025】

本開示は、対象における巨大軸索ニューロパチーを処置する方法であって、a)第1の治療有効量のrAAVウイルスベクターを、前記対象に髄腔内投与するステップと、b)少なくとも第2の治療有効量のrAAVウイルスベクターを、前記少なくとも第2の治療有効量のrAAVウイルスベクターを前記対象の左迷走神経中に注射することにより、投与するステップとを含み、前記rAAVウイルスベクターが、(i)AAV9カプシドタンパク質と、(ii)配列番号10で表される核酸配列を含むrAAVベクターとを含む、方法を提供する。一部の態様では、第1の治療有効量のrAAVウイルスベクターおよび少なくとも第2の治療有効量のrAAVウイルスベクターは、連続的に投与可能である。一部の態様では、第1の治療有効量のrAAVウイルスベクターおよび少なくとも第2 50

の治療有効量の r A A V ウイルスベクターは、同時に投与可能である。

【 0 0 2 6 】

上記の任意の態様、または本明細書に記載した他の任意の態様は、他の任意の態様と組み合わせることができる。

【 0 0 2 7 】

他に定義しない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術における当業者によって共通に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書では、単数形は文脈によって他が明確に指示されない限り、複数形を含み、たとえば用語「1つの」および「その」は単数または複数であると理解され、用語「または」は包括的であると理解される。例として、「1つの要素」は1つまたは複数の要素を意味する。明細書全体にわたって、用語「含む (c o m p r i s i n g) 」または「含む (c o m p r i s e s または c o m p r i s i n g) 」等の変形は、記述した要素、整数、もしくはステップ、または要素、整数、もしくはステップの群を意味するが、他の任意の要素、整数、もしくはステップ、または要素、整数、もしくはステップの群を排除しないことが理解されよう。「約」は、記述した値の 10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、0 . 5 %、0 . 1 %、0 . 0 5 %、または 0 . 0 1 % 以内と理解することができる。文脈から他が明確でない限り、本明細書で提供する全ての数値は、用語「約」によって修飾される。

【 0 0 2 8 】

本明細書に記載した方法および材料と同様または等価の方法および材料は、本開示の実施または試験に用いることができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書で述べる全ての出版物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、参照により全体として組み込まれる。本明細書で引用する参考文献は、特許を請求する発明の先行技術であると認めてはいない。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先する。さらに、材料、方法、および実施例は説明のためのみであり、限定的であることを意図していない。本開示のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになる。

【 0 0 2 9 】

上記のおよびさらなる特徴は、添付した図面と併せて取り上げた場合に、以下の詳細な説明からより明確に理解される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 】 G F P レポータータンパク質を使用して、ラットの左迷走神経中に注射した後の、A A V 9 / ベクタートランスジーン発現を示す画像を示す図である。矢印 = 迷走神経；アステリクス = 迷走神経の背側運動核；星型 = 疑核。

【 図 2 】 A A V 9 / G A N の髄腔内注射により事前免疫化されたラットにおいて、左迷走神経を介して A A V 9 / G F P ウイルスベクターを投与した後の G F P 発現を示す一連の画像を示す図である。左側パネル：左節上神経節の神経細胞体。右側パネル：左頸部迷走神経線維。

【 図 3 】 非免疫化ラット（左側パネル）、または A A V 9 に対して事前免疫化されたラット（右側パネル）において、A A V 9 / G F P を左迷走神経に注射した後の、ラット脳内における G F P 発現を示す一連の画像を示す図である。迷走神経の背側運動核を「D M N X」で示し、そして孤束核を「S o l N l a t」で示す。

【 図 4 】 ピロカルピンが負荷され、そして本開示の組成物および方法を使用して処置された野生型および突然変異 G A N ノックインマウスにおける自律神経機能に付随する生理学的応答を示す一連のグラフを示す図である。グラフデータを箱ひげ図として表し、エラーバーは最大値および最低値を表し、また箱で囲まれた線はメジアンを表す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 1 】

本開示は、とりわけ、対象における疾患を処置するための組成物および方法を提供し、

方法は、少なくとも1つの治療有効量の組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ウイルスベクターを、対象の迷走神経中への注射を介して、前記対象に投与するステップを含む。

【0032】

本開示は、とりわけ、単離されたポリヌクレオチド、組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクター、およびギガキソニン（GAN）ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子を含むrAAVウイルスベクターも提供する。本開示は、これらの単離されたポリヌクレオチド、rAAVベクター、およびrAAVウイルスベクターを製造する方法、ならびにGAN遺伝子の喪失、誤機能不全、および/または欠損に付随する疾患を含む、巨大軸索ニューロパチーを含む、ただしこれに限定されない疾患または障害を処置または防止するためにトランスジーンを送達するためのその使用も提供する。

10

【0033】

kelch様タンパク質16としても知られているギガキソニン（GAN）は、GAN遺伝子によりコードされる、ヒト内のタンパク質である。GANは、タンパク質の細胞骨格BTB/kelch（Broad-Complex、Tramtrack、およびBricabrach）ファミリーのメンバーである。GANは、中間フィラメント（IF）タンパク質のユビキチン化および分解を促進するE3リガーゼアダプタータンパク質である。GAN遺伝子内の突然変異は、巨大軸索ニューロパチーを惹起することが示されている。

20

【0034】

本明細書で使用される用語「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」は、この名称に付随し、パルボウイルス（Parvoviridae）ファミリーのデペンドパルボウイルス（Dependoparvovirus）属に属するウイルスのクラスのメンバーを指す。アデノ随伴ウイルスは、細胞中で増殖する一本鎖DNAウイルスであり、その中である種の機能が共感染するヘルパーウイルスによって提供される。AAVに関する一般的な情報および総説は、たとえばCarter, 1989, Handbook of Parvoviruses, 1巻, 169~228頁およびBerns, 1990, Virology, 1743~1764頁, Raven Press (New York)に見出すことができる。種々の血清型が、遺伝子レベルであっても、構造的および機能的両方に極めて密接に関連していることがよく知られているので、これらの総説に記載された同じ原理が総説の発行日以後に特徴解析されたさらなるAAVの血清型に適用可能であることが、完全に期待される（たとえばBlacklowe, 1988, Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison編, 165~174頁、およびRose, Comprehensive Virology 3: 1~61頁（1974）を参照）。たとえば、全てのAAV血清型は同種rep遺伝子によって媒介される極めて類似した複製特性を明らかに呈し、全てが、AAV2で発現されるもののような3つの関連するカプシドタンパク質を有している。ゲノムの長さに沿った血清型間の広範な交叉ハイブリダイゼーションおよび「逆方向末端反復配列」（ITR）に対応する末端における類似の自己アニール性セグメントの存在を明らかにするヘテロデュプレックス解析によって、関連性の程度がさらに示唆されている。類似した感染性パターンも、各血清型における複製機能が同様の規制制御の下にあることを示唆している。このウイルスの多数の血清型が遺伝子送達に適していることが知られており、全ての既知の血清型が種々の組織型の細胞に感染することができる。連続的に番号付けされた少なくとも11個のAAV血清型が当技術で知られている。本明細書で開示した方法において有用な非限定的な例示的血清型には、11個の血清型、たとえばAAV2、AAV8、AAV9、またはバリエーション血清型、たとえばAAV-DJおよびAAV- Φ Bのいずれかが含まれる。AAV粒子は、3つの主要なウイルスタンパク質、即ちVP1、VP2、およびVP3を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。一部の態様では、AAVは、血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AA

30

40

50

V 8、AAV 9、AAV 10、AAV 11、AAV 12、AAV 13、AAV PHP . B、AAV rh 74、または AAV rh . 10 を指す。

【0035】

例示的なアデノ随伴ウイルスおよび組み換えアデノ随伴ウイルスには、それだけに限らないが、全ての血清型（たとえば AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 11、AAV 12、AAV 13、AAV PHP . B、AAV rh 74、および AAV rh . 10）が含まれる。例示的なアデノ随伴ウイルスおよび組み換えアデノ随伴ウイルスには、それだけに限らないが、自己相補性 AAV (scAAV) および 1 つの血清型のゲノムと別の血清型のカプシドとを含む AAV ハイブリッド（たとえば AAV 2 / 5、AAV - DJ、および AAV - DJ 8）が含まれる。例示的なアデノ随伴ウイルスおよび組み換えアデノ随伴ウイルスには、それだけに限らないが、rAAV - LK 03、AAV - KP - 1 (Kerunら . JCI Insight, 2019; 4(22): e131610 に詳細に記載) および AAV - NP 59 (Paulkら . Molecular Therapy, 2018; 26(1): 289 ~ 303 頁に詳細に記載) が含まれる。

10

【0036】

AAV の構造および機能

AAV は複製欠損性のパルボウイルスであり、その一本鎖 DNA ゲノムは約 4 . 7 kb の長さで、2 つの 145 ヌクレオチド逆方向末端反復 (ITR) を含む。AAV には多数の血清型が存在する。AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列は既知である。たとえば、AAV - 1 の完全ゲノムは GenBank 受託番号 NC__002077 で提供され、AAV - 2 の完全ゲノムは GenBank 受託番号 NC__001401 および Srivastavaら, J. Virol., 45: 555 ~ 564 頁 (1983) で提供され、AAV - 3 の完全ゲノムは GenBank 受託番号 NC__1829 で提供され、AAV - 4 の完全ゲノムは GenBank 受託番号 NC__001829 で提供され、AAV - 5 ゲノムは GenBank 受託番号 AF085716 で提供され、AAV - 6 の完全ゲノムは GenBank 受託番号 NC__001862 で提供され、AAV - 7 および AAV - 8 のゲノムの少なくとも一部はそれぞれ GenBank 受託番号 AX753246 および AX753249 で提供され、AAV - 9 のゲノムは Gaoら, J. Virol., 78: 6381 ~ 6388 頁 (2004) で提供され、AAV - 10 のゲノムは Mol. Ther., 13(1): 67 ~ 76 頁 (2006) で提供され、AAV - 11 のゲノムは Virology, 330(2): 375 ~ 383 頁 (2004) で提供されている。AAV rh . 74 ゲノムの配列は米国特許第 9,434,928 号で提供されている。米国特許第 9,434,928 号は、カプシドタンパク質および自己相補性ゲノムの配列も提供している。一態様では、AAV ゲノムは自己相補性ゲノムである。ウイルス DNA 複製 (rep)、カプシド封入 / パッケージング、および宿主細胞染色体の一体化を指示するシス作用性配列は、AAV ITR の中に含まれている。3 つの AAV プロモーター (それらの相対的なマップ位置によって p5、p19、および p40 と命名) は、rep および cap 遺伝子をコードする 2 つの AAV 内部オープンリーディングフレームの発現を推進する。単一の AAV イントロンの (ヌクレオチド 2107 および 2227 における) 差別的スプライシングと一体になった 2 つの rep プロモーター (p5 および p19) は、rep 遺伝子からの 4 つの rep タンパク質 (rep78、rep68、rep52、および rep40) の産生をもたらす。rep タンパク質は、究極的にはウイルスゲノムの複製に参与する多種の酵素特性を有している。

20

30

40

【0037】

cap 遺伝子は p40 プロモーターから発現され、3 つのカプシドタンパク質、即ち VP1、VP2、および VP3 をコードする。選択的なスプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位が、この 3 つの関連するカプシドタンパク質の産生に参与している。より具体的には、VP1、VP2、および VP3 タンパク質のそれぞれがそれから翻訳される単一の mRNA が転写された後で、この mRNA は 2 つの異なる様式でスプライシングさ

50

れ得る。長いイントロンまたは短いイントロンが切除され、mRNAの2つのプール、即ち2.3 kbと2.6 kbの長さのmRNAプールの形成がもたらされる。長いイントロンが好ましいことが多く、したがって2.3 kbの長さのmRNAは主要なスプライスバリエーションと称され得る。この形態はVP1タンパク質の合成がそれから始まる第1のAUGコドンを欠き、VP1タンパク質合成の全体のレベルの低下をもたらす。主要なスプライスバリエーションに残る第1のAUGコドンは、VP3タンパク質の開始コドンである。しかし、同じオープンリーディングフレーム中のそのコドンの上流には、最適のKozak（翻訳開始）コンテキストによって囲まれたACG配列（スレオニンをコードする）が存在する。これはVP2タンパク質の合成の低いレベルに寄与する。VP2タンパク質は実際上、それぞれが参照により本明細書に組み込まれるBecerra SP5, (1985年12月). "Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82(23): 7919~23頁; Cassinotti P5, (1988年11月). "Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1". Virology. 167(1): 176~84頁; Muralidhar S5, (1994年1月). "Site-directed mutagenesis of adeno-associated virus type 2 structural protein initiation codons: effects on regulation of synthesis and biological activity". Journal of Virology. 68(1): 170~6頁; および Trempe JP, Carter BJ (1988年9月). "Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein". Journal of Virology. 62(9): 3356~63頁に記載されているように、VP1と同じく、VP3タンパク質にN末端残基が付加されたものである。単一のコンセンサスポリア部位は、AAVゲノムのマップ位置95に位置している。AAVのライフサイクルおよび遺伝的特徴は、Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97~129頁(1992)に概説されている。

【0038】

それぞれのVP1タンパク質は、VP1部分、VP2部分、およびVP3部分を含む。VP1部分は、VP1タンパク質に特有のVP1タンパク質のN末端部分である。VP2部分は、VP2タンパク質のN末端部分にも見出される、VP1タンパク質の中に存在するアミノ酸配列である。VP3部分とVP3タンパク質は同じ配列を有する。VP3部分は、VP1タンパク質とVP2タンパク質に共有されるVP1タンパク質のC末端部分である。

【0039】

VP3タンパク質は、不連続の可変表面領域I~IX (VR-I~IX)にさらに分割することができる。可変表面領域 (VR) のそれぞれは、その内容が参照により本明細書に組み込まれるDiMattea, "Structural Insight into the Unique Properties of Adeno-Associated Virus Serotype 9" J. Virol., Vol. 86(12): 6947~6958頁, 2012年6月に記載されているように、単独でまたは他のVRのそれぞれの特定のアミノ酸配列との組合せで、特有の感染表現型（たとえば低下した抗原性、改善された形質導入および/または他のAAV血清型と比較した組織特異的向性）を

特定の血清型に付与することができる特定のアミノ酸配列を含み得る。

【0040】

AAVは、たとえば遺伝子療法において外来のDNAを細胞に送達するためのベクターとしてこれを魅力的なものにする固有の特徴を有している。培養における細胞のAAV感染は細胞変性を起こさず、ヒトおよびその他の動物の天然の感染は症状がなく無症候性である。さらに、AAVは多くの哺乳動物細胞に感染して*in vivo*で多くの異なる組織を標的とすることを可能にする。さらに、AAVは分裂している細胞および分裂していない細胞にゆっくりと形質導入し、実質的にこれらの細胞の生涯にわたって転写活性の核エピソーム（染色体外エレメント）として持続することができる。AAVのプロウイルスゲノムはクローニングされたDNAとしてプラスミド中に挿入され、それにより組み換えゲノムの構築が実行可能になる。さらに、AAVの複製とゲノムのカプシド封入を指示するシグナルがAAVゲノムのITRの中に含まれているので、ゲノムの内部の約4.3 kbの一部または全部（複製および構造のカプシドタンパク質、*rep-cap*をコードする）を外来DNAで置き換えて、AAVベクターを生成することができる。*rep*および*cap*のタンパク質はトランスで提供され得る。AAVの別の顕著な特徴は、これが極めて安定で元気なウイルスであることである。これはアデノウイルスを不活化するために用いられる条件（56～65 で数時間）に容易に耐え、AAVの低温保存の問題を重要でなくしている。AAVは凍結乾燥することさえできる。最後に、AAVに感染した細胞は重複感染に抵抗しない。

10

【0041】

多くの研究が筋肉における長期（1.5年超）の組み換えAAV媒介タンパク質発現を実証している。Clarkら, *Hum Gene Ther*, 8:659～669頁（1997）；Kesslerら, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:14082～14087頁（1996）；およびXiaoら, *J Virol*, 70:8098～8108頁（1996）を参照されたい。Chaoら, *Mol Ther*, 2:619～623頁（2000）およびChaoら, *Mol Ther*, 4:217～222頁（2001）も参照されたい。さらに、筋肉は高度に血管新生しているので、Herzogら, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:5804～5809頁（1997）およびMurphyら, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13921～13926頁（1997）に記載されているように、組み換えAAV形質導入によって、筋肉内注射の後の全身循環におけるトランスジーン産生物の出現がもたらされた。さらに、Lewisら, *J Virol*, 76:8769～8775頁（2002）は、骨格筋線維が抗体の正しいグリコシル化、フォールディング、および分泌のために必要な細胞性因子を有していることを実証し、筋肉が分泌されたタンパク質治療剤を安定的に発現することができることを示した。本発明の組み換えAAV（*rAAV*）ゲノムは、治療用タンパク質をコードする核酸分子（たとえばKCTD7）および核酸分子の側にある1つまたは複数のAAV ITRを含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれからなる。偽型*rAAV*の産生は、たとえばWO2001083692に開示されている。その他の型の*rAAV*バリエーション、たとえばカプシド変異を有する*rAAV*も意図されている。たとえばMarsicら, *Molecular Therapy*, 22（11）:1900～1909頁（2014）を参照されたい。種々のAAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当技術で既知である。

20

30

40

【0042】

トランスジーン配列を含む単離されたポリヌクレオチド

本開示は、少なくとも1つのトランスジーン核酸分子を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0043】

一部の態様では、トランスジーン核酸分子は、GANポリペプチドをコードする核酸配列またはその少なくとも1つの断片を含み得る。一部の態様では、トランスジーン核酸分子は、GANポリペプチドの生物学的等価物をコードする核酸配列を含み得る。

50

【 0 0 4 4 】

一部の態様では、G A Nポリペプチドは、配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列またはその断片を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。一部の態様では、G A Nポリペプチドは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の少なくとも一部と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列またはその断片を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。

10

【 0 0 4 5 】

一部の態様では、G A Nポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号3～6のいずれか1つで表される核酸配列と、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。一部の態様では、G A Nポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号3で表される核酸配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。

【 0 0 4 6 】

一部の態様では、G A Nポリペプチドをコードする核酸配列は、G A Nポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列であってよい。G A Nポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列は、G A Nポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列と65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%（またはその間の任意のパーセンテージ）を超えず同一の核酸配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなるとよい。本明細書で使用する場合、「G A Nポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列」は、配列番号7で表されるような、ヒトゲノムにおけるG A Nポリペプチドをコードする核酸配列を指す。配列番号3～6は、G A Nポリペプチドをコードする固有のコドン最適化された核酸配列である。

20

【 0 0 4 7 】

一部の態様では、G A Nポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列、たとえば配列番号3～6で表される配列等は、ドナースプライス部位を含まない可能性がある。一部の態様では、G A Nポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列は、約1個、または約2個、または約3個、または約4個、または約5個、または約6個、または約7個、または約8個、または約9個、または約10個を超えないドナースプライス部位を含んでよい。一部の態様では、G A Nポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列は、G A Nポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列と比較して、少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または少なくとも6個、または少なくとも7個、または少なくとも8個、または少なくとも9個、または少なくとも10個少ないドナースプライス部位を含む。理論に縛られることは望まないが、曖昧なスプライシングが防止されるので、コドン最適化された核酸配列におけるドナースプライス部位の除去によって、*in vivo*におけるG A Nポリペプチドの発現を予想外かつ予測外に増加させることができる。さらに、曖昧なスプライシングは様々な対象の間で変動することがあり、ドナースプライス部位を含むG A Nポリペプチドの発現レベルは様々な対象の間で予測外に変動することがあることを意味している。

30

40

【 0 0 4 8 】

一部の態様では、G A Nポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列、たとえば配列番号3～6で表される配列等は、G A Nポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列のGC含量と異なるGC含量を有し得る。一部の態様では、G A Nポリペプチドを

50

コードするコドン最適化された核酸配列のGC含量は、GANポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列と比較して、核酸配列全体にわたってより均一に分布している。理論に縛られることは望まないが、核酸配列全体にわたってGC含量をより均一に分布させることによって、コドン最適化された核酸配列は転写物の長さによってより均一な融解温度(「Tm」)を呈する。核酸配列の転写および/または翻訳はポリメラーゼおよび/またはリボソームの停滞をあまり伴わずに起こるので、融解温度の均一性は、予期しないことに、ヒト対象におけるコドン最適化された核酸の発現の増大をもたらす。

【0049】

一部の態様では、GANポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列、たとえば配列番号3~6で表される配列等は、GANポリペプチドをコードする野生型またはコドン最適化されていない核酸配列に対して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも500%、または少なくとも1000%増大したヒト対象における発現を呈する。

10

【0050】

一部の態様では、GANポリペプチドは、タンパク質タグをさらに含み得る。理論に縛られることは望まないが、タンパク質タグを含ませることによって、外因性GANポリペプチドの検出および/または可視化が可能になる。当業者には認識されるように、タンパク質タグの非限定的な例には、Mycタグ、ポリヒスチジンタグ、FLAGタグ、HATタグ、SBPタグ、または当技術で既知の任意の他のタンパク質タグが含まれる。

20

【0051】

AAVベクター

一部の態様では、本明細書に記載した少なくとも1つのトランスジーン核酸分子を含む単離されたポリヌクレオチドは、組み換えAAV(rAAV)ベクターであり得る。

【0052】

本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、元のままのレプリコンを含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなる核酸であって、それによりベクターが、細胞内に入れられた場合に、たとえばトランスフェクション、感染、または形質転換のプロセスによって複製される、核酸を指す。いったん細胞内に入れば、ベクターは染色体外(エピソーマル)エレメントとして複製され、または宿主細胞の染色体内に統合され得ることが当技術で理解されている。ベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、改変されたバキュロウイルス、パポウイルス、またはその他に改変された天然産生のウイルスから誘導される核酸が含まれ得る。核酸を送達するための例示的な非ウイルスベクターには、裸のDNA; 単独もしくはカチオン性ポリマーと組み合わせたカチオン性脂質とのDNAの複合体; アニオン性およびカチオン性のリボソーム; 異種ポリリジン、定義された長さのオリゴペプチド、およびポリエチレンジアミン等のカチオン性ポリマーと縮合し、ある場合にはリボソームに含まれるDNAを含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなるDNA-タンパク質複合体及び粒子; ならびにウイルスおよびポリリジン-DNAを含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなる三重複合体の使用が含まれる。

30

40

【0053】

一般的な組み換え手法に関しては、プロモーターとその中にポリヌクレオチドを作動可能に連結することができるクロニング部位との両方を含むベクターは、当技術で周知である。そのようなベクターはin vitroまたはin vivoでRNAを転写することができ、Agilent Technologies社(Santa Clara, Calif)およびPromega Biotech社(Madison, Wis.)等の供給元から市販されている。発現および/またはin vitroでの転写を最適化するため、クロニングされたトランスジーンの5'および/または3'の翻訳されない部分を除去、付加、または変化させて、余分で潜在的で不適切な代替の翻訳開始コドンまたは転写もしくは翻訳のレベルにおいて発現に干渉またはこれを低減させ得る他の配列を排

50

除することが必要であろう。あるいは、発現を増強するために、コンセンサスリボソーム結合部位を開始コドンの5'のすぐ傍に挿入することができる。

【0054】

本明細書で使用される「rAAVベクター」は、1つまたは複数のトランスジーン核酸分子および1つまたは複数のAAV逆方向末端反復配列(ITR)を含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなるベクターを指す。そのようなAAVベクターは、宿主細胞中に存在する場合に、たとえば宿主細胞のトランスフェクションによってrepおよびcapの遺伝子産物の機能を提供する感染性ウイルス粒子の中に、複製しパッケージすることができる。一部の態様では、AAVベクターは、プロモーター、少なくとも1つのタンパク質もしくはRNAをコードし得る少なくとも1つの核酸、および/または感染性AAV粒子の中にパッケージされた側面ITRの中のエンハンサーおよび/またはターミネーターを含む。カプシド封入された核酸部分は、AAVベクターゲノムと称し得る。rAAVベクターを含むプラスミドは、製造目的のためのエレメント、たとえば抗生剤耐性遺伝子、複製起点の配列、その他を含んでもよいが、これらはカプシド封入されず、したがってAAV粒子の一部を形成しない。

10

【0055】

一部の態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのトランスジーン核酸分子を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのAAV逆転ターミナル(ITR)配列を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのプロモーター配列を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのエンハンサー配列を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのポリA配列を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、RepCap配列を含み得る。

20

【0056】

一部の態様では、rAAVベクターは、第1のAAV ITR配列、プロモーター配列、トランスジーン核酸分子、および第2のAAV ITR配列を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、5'から3'の方向に、第1のAAV ITR配列、プロモーター配列、トランスジーン核酸分子、および第2のAAV ITR配列を含み得る。

【0057】

一部の態様では、rAAVベクターは、第1のAAV ITR配列、プロモーター配列、トランスジーン核酸分子、ポリA配列、および第2のAAV ITR配列を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、5'から3'の方向に、第1のAAV ITR配列、プロモーター配列、トランスジーン核酸分子、ポリA配列、および第2のAAV ITR配列を含み得る。

30

【0058】

一部の態様では、rAAVベクターは、2つ以上のトランスジーン核酸分子を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、少なくとも2つのトランスジーン核酸分子を含み得て、それによりrAAVベクターは第1のトランスジーン核酸分子および少なくとも第2のトランスジーン核酸分子を含む。一部の態様では、第1および少なくとも第2のトランスジーン核酸分子は、同じ核酸配列を含み得る。一部の態様では、第1および少なくとも第2のトランスジーン核酸分子は、異なる核酸配列を含み得る。一部の態様では、第1および少なくとも第2のトランスジーン核酸配列は、互いに隣接し得る。

40

【0059】

一部の態様では、rAAVベクターは、2つ以上のプロモーター配列を含み得る。一部の態様では、rAAVベクターは、少なくとも2つのプロモーター配列を含み得て、それによりrAAVベクターは第1のプロモーター配列および少なくとも第2のプロモーター配列を含む。一部の態様では、第1および少なくとも第2のプロモーター配列は、同じ配列を含み得る。一部の態様では、第1および少なくとも第2のプロモーター配列は、異なる配列を含み得る。一部の態様では、第1および少なくとも第2のプロモーター配列は、互いに隣接し得る。rAAVベクターが第1のトランスジーン核酸分子および少なくとも

50

第2のトランスジーン核酸分子も含む一部の態様では、第1のプロモーターは第1のトランスジーン核酸分子の上流(5')に位置してよく、少なくとも第2のプロモーターは第1のトランスジーン核酸分子と少なくとも第2のトランスジーン核酸分子との間に位置してよく、それにより少なくとも第2のプロモーターは第1のトランスジーン核酸分子の下流(3')かつ少なくとも第2のトランスジーン核酸分子の上流(5')に位置する。

【0060】

先行するrAAVベクターのいずれも、少なくとも1つのエンハンサーをさらに含む得る。少なくとも1つのエンハンサーは、rAAVベクターのいずれの場所に位置してもよい。一部の態様では、少なくとも1つのエンハンサーは、プロモーターのすぐ上流(5')に位置し得る。即ち、rAAVベクターは、5'から3'の方向に、第1のAAV ITR配列、エンハンサー、プロモーター配列、トランスジーン核酸分子、ポリA配列、および第2のAAV ITR配列を含み得る。一部の態様では、少なくとも1つのエンハンサーは、プロモーターのすぐ下流(3')に位置し得る。即ち、rAAVベクターは、5'から3'の方向に、第1のAAV ITR配列、プロモーター配列、エンハンサー、トランスジーン核酸分子、ポリA配列、および第2のAAV ITR配列を含み得る。一部の態様では、少なくとも1つのエンハンサーは、トランスジーン核酸分子のすぐ下流に位置し得る。即ち、rAAVベクターは、5'から3'の方向に、第1のAAV ITR配列、プロモーター配列、トランスジーン核酸分子、エンハンサー、ポリA配列、および第2のAAV ITR配列を含み得る。

【0061】

AAV ITR配列

一部の態様では、AAV ITR配列は、当技術で既知の任意のAAV ITR配列を含み得る。一部の態様では、AAV ITR配列は、AAV1 ITR配列、AAV2 ITR配列、AAV4 ITR配列、AAV5 ITR配列、AAV6 ITR配列、AAV7 ITR配列、AAV8 ITR配列、AAV9 ITR配列、AAV10 ITR配列、AAV11 ITR配列、AAV12 ITR配列、AAV13 ITR配列、AAVrh74 ITR配列、またはAAVrh.10 ITR配列であってよい。

【0062】

即ち、一部の態様では、AAV ITR配列は、AAV1 ITR配列、AAV2 ITR配列、AAV4 ITR配列、AAV5 ITR配列、AAV6 ITR配列、AAV7 ITR配列、AAV8 ITR配列、AAV9 ITR配列、AAV10 ITR配列、AAV11 ITR配列、AAV12 ITR配列、AAV13 ITR配列、AAVrh74 ITR配列、またはAAVrh.10 ITR配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなってもよい。

【0063】

プロモーター配列およびエンハンサー

本明細書で使用される用語「プロモーター」および「プロモーター配列」は、遺伝子またはトランスジーン等のコーディング配列の転写の開始および速度が制御されるポリヌクレオチド配列の領域である調節配列を意味する。プロモーターは、たとえば構造的、誘起的、抑制的、または組織特異的であってよい。プロモーターは、RNAポリメラーゼおよび転写因子等の制御性のタンパク質および分子が結合し得る遺伝要素を含み得る。非限定的な例示的プロモーターには、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター(任意選択でRSVエンハンサーとともに)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、SV40プロモーター、ジヒドロフォレートリダクターゼプロモーター、 α -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、U6プロモーター、シナプシンプロモーター、H1プロモーター、遍在性ニワトリ α -アクチンハイブリッド(CBh)プロモーター、小核RNA(U1aまたはU1b)プロモーター、MECP2プロモーター、MeP418プロモーター、MeP426プロモーター、MeP426プロモーターのヒトバリエーション、ミニマルMECP2プロモーター、VMD2プロモーター、mRhoproモーター、またはEF1プロモーターが含まれる。

10

20

30

40

50

【0064】

本明細書で提供されるさらなる非限定的な例示的プロモーターには、それだけに限らないが、EFla、Ubc、ヒト - アクチン、CAG、TRE、Ac5、ポリヘドリン、CaMKIIa、Gal1、TEF1、GDS、ADH1、Ubi、および - 1 - アンチトリプシン (hAAT) が含まれる。mRNA 転写の効率を増大または低減させるために、そのようなプロモーターのヌクレオチド配列を改変し得ることは、当技術で既知である。たとえば Gaora (2018) Mol. Ther. : Nucleic Acids 12 : 135 ~ 145 頁を参照されたい (RNA ポリメラーゼ III 転写を無効にし、RNA ポリメラーゼ II 依存性 mRNA 転写を刺激するために、7SK、U6、および H1 プロモーターの TATA ボックスを改変する)。遍在性または組織特異的な発現のために、合成由来のプロモーターを用いてもよい。さらに、そのいくつかを上で言及したウイルス由来プロモーター、たとえば CMV、HIV、アデノウイルス、および AAV のプロモーターは、本明細書に記載した方法において有用であり得る。一部の態様では、転写効率を増大させるために、プロモーターは少なくとも 1 つのエンハンサーとともに用いられる。エンハンサーの非限定的な例には、間質性レチノイド結合タンパク質 (IRBP) エンハンサー、RSV エンハンサー、または CMV エンハンサーが含まれる。

10

【0065】

一部の態様では、プロモーター配列は、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR プロモーター配列 (任意選択で RSV エンハンサーとともに)、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配列、SV40 プロモーター配列、ジヒドロフォレートリダクターゼプロモーター配列、JcT プロモーター配列、強い - アクチンプロモーター配列、ホスホグリセロールキナーゼ (PGK) プロモーター配列、U6 プロモーター配列、シナプシンプロモーター、H1 プロモーター配列、遍在性ニワトリ - アクチンハイブリッド (CBh) プロモーター配列、小核 RNA (U1a または U1b) プロモーター配列、MECP2 プロモーター配列、MeP418 プロモーター、MeP426 プロモーター配列、小型の遍在性プロモーター配列 (JetI プロモーター配列としても知られている)、MECP2 プロモーター配列、VMD2 プロモーター配列、mRho プロモーター配列、EFI プロモーター配列、EFla プロモーター配列、Ubc プロモーター配列、ヒト - アクチンプロモーター配列、CAG プロモーター配列、TRE プロモーター配列、Ac5 プロモーター配列、ポリヘドリンプロモーター配列、CaMKIIa プロモーター配列、Gal1 プロモーター配列、TEF1 プロモーター配列、GDS プロモーター配列、ADH1 プロモーター配列、Ubi プロモーター配列、MeP426 プロモーター、または - 1 抗トリプシン (hAAT) プロモーター配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなり得る。

20

30

【0066】

エンハンサーは、標的配列の発現を増大させる制御エレメントである。「プロモーター/エンハンサー」は、プロモーターとエンハンサーの両方の機能を提供することができる配列を含むポリヌクレオチドである。たとえば、レトロウイルスの長いターミナルリピートは、プロモーターとエンハンサーの両方の機能を含んでいる。エンハンサー/プロモーターは、「内因性」または「外因性」または「異種」であり得る。「内因性」エンハンサー/プロモーターは、ゲノム内の所与の遺伝子に天然に連結されたエンハンサー/プロモーターである。「外因性」または「異種」エンハンサー/プロモーターは、遺伝子操作 (即ち分子生物学的手法) または合成手法の手段によって遺伝子に並置され、それによりその遺伝子の転写が連結されたエンハンサー/プロモーターによって指示される、エンハンサー/プロモーターである。本明細書で提供される方法、組成物、および構築物における使用のための連結されたエンハンサー/プロモーターの非限定的な例には、PDE プロモータープラス IRBP エンハンサー、または CMV エンハンサープラス U1a プロモーターが含まれる。エンハンサーは遠方から、また内因性または異種のプロモーターの位置に対するそれらの配向とは関係なく、作動し得ることが当技術で理解されている。即ち、プロモーターから離れて作動するエンハンサーは、したがってベクター中のその位置または

40

50

プロモーターの位置に対するその配向とは関係なく、そのプロモーターに「作動可能に連結」されていることがさらに理解される。

【0067】

本開示を通して使用される場合、用語「作動可能に連結された」は、遺伝子が空間的に連結されたプロモーターの制御下にある遺伝子（即ちトランスジーン）の発現を指す。プロモーターは、その制御下にある遺伝子の5'（上流）または3'（下流）に位置し得る。プロモーターは、その制御下にある遺伝子の5'（上流）に位置し得る。プロモーターと遺伝子との間の距離は、プロモーターとそのプロモーターがそれから誘導された遺伝子内でプロモーターが制御する遺伝子との間の距離とほぼ同じであってよい。プロモーターと遺伝子との間の距離の変動は、プロモーター機能の損失なしに適応させることができる。

10

【0068】

一部の態様では、プロモーター配列は、J e Tプロモーター配列を含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなってよい。J e Tプロモーター配列は、配列番号8で表される核酸配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなってよい。

【0069】

トランスジーン核酸分子

トランスジーン核酸分子は、上の見出し「トランスジーン配列を含む単離されたポリヌクレオチド」の下に記載したトランスジーン核酸分子のいずれかを含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。

20

【0070】

一部の態様では、r A A Vベクター中に存在するトランスジーン核酸分子は、同じr A A Vベクター中にも存在するプロモーター配列の転写制御の下にあり得る。

【0071】

ポリA配列

一部の態様では、ポリアデニル化（ポリA）配列は、当技術で既知の任意のポリA配列を含み得る。ポリA配列の非限定的な例には、それだけに限らないが、M E C P 2ポリA配列、レチノールデヒドロゲナーゼ1（R D H 1）ポリA配列、ウシ成長ホルモン（B G H）ポリA配列、S V 4 0ポリA配列、S P A 4 9ポリA配列、s N R P - T K 6 5ポリA配列、s N R PポリA配列、またはT K 6 5ポリA配列が含まれる。

30

【0072】

即ち、ポリA配列は、M e C P 2ポリA配列、レチノールデヒドロゲナーゼ1（R D H 1）ポリA配列、ウシ成長ホルモン（B G H）ポリA配列、S V 4 0ポリA配列、S P A 4 9ポリA配列、s N R P - T K 6 5ポリA配列、s N R PポリA配列、またはT K 6 5ポリA配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなってよい。

【0073】

一部の態様では、ポリA配列は、配列番号9で表される配列と、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなり得る。

40

【0074】

一部の態様では、本開示のr A A Vベクターは、配列番号10で表される配列と、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなり得る。

【0075】

一部の態様では、本開示のr A A Vベクターは、配列番号11で表される配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98

50

%、99%、もしくは100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなっていてよい。

【0076】

細菌プラスミド

一部の態様では、本開示のrAAVベクターは、*in vitro*でのrAAVベクターの増殖を可能にするために細菌プラスミドの中に含ませてよい。即ち、本開示は、本明細書に記載したrAAVベクターのいずれかを含む細菌プラスミドを提供する。細菌プラスミドはさらに、複製の起点の配列を含み得る。細菌プラスミドはさらに、抗生剤耐性遺伝子を含み得る。細菌プラスミドは、耐性遺伝子プロモーターをさらに含み得る。細菌プラスミドは、原核生物プロモーターをさらに含み得る。一部の態様では、本開示の細菌プラスミドは、配列番号10または配列番号11で表される核酸配列のいずれかと、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（またはその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなり得る。

10

【0077】

複製の起点の配列

一部の態様では、複製の起点の配列は、当技術で既知の任意の複製の起点の配列を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなっていてよい。複製の起点の配列は、細菌の複製の起点の配列であってよく、それにより前記細菌の複製の起点の配列を含むrAAVベクターが当技術で標準的な方法を用いることによって細菌内で産生され、増殖し、維持されることが可能になる。

20

【0078】

抗生剤耐性遺伝子

一部の態様では、本開示の細菌プラスミド、rAAVベクターおよび/またはrAAVウイルスベクターは、抗生剤耐性遺伝子を含み得る。

【0079】

一部の態様では、抗生剤耐性遺伝子は、当技術で既知の任意の抗生剤耐性遺伝子を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなっていてよい。当技術で既知の抗生剤耐性遺伝子の例には、それだけに限らないが、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、プレオマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、ポリミキシンB耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、およびクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれる。

30

【0080】

AAVウイルスベクター

「ウイルスベクター」は、*in vivo*、*ex vivo*、または*in vitro*で宿主細胞中に送達されるポリヌクレオチドを含む、組み換えで産生されたウイルスまたはウイルス粒子と定義される。ウイルスベクターの例には、レトロウイルスベクター、AAVベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター等が含まれる。アルファウイルスベクター、たとえばSemliki Forestウイルス系ベクターおよびSindbisウイルス系ベクターも、遺伝子療法および免疫療法における使用のために開発されている。たとえばSchlesingerおよびDubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5: 434~439頁およびYingら, (1999) Nat. Med. 5(7): 823~827頁を参照されたい。

40

【0081】

「AAVピリオン」または「AAVウイルス粒子」または「AAVウイルスベクター」または「rAAVウイルスベクター」または「AAVベクター粒子」または「AAV粒子」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質およびカプシド封入されたポリヌクレオチドrAAVベクターからなるウイルス粒子を指す。即ち、rAAVウイルスベクター

50

の産生には必然的に r A A V ベクターの産生が含まれ、したがってベクターは r A A V ベクターの中に含まれる。

【 0 0 8 2 】

本明細書で使用される場合、用語「ウイルスカプシド」または「カプシド」は、ウイルス粒子のタンパク質性シェルまたはコートを指す。カプシドは、ウイルスゲノムをカプシド封入し、保護し、輸送し、また宿主細胞中に放出するように機能する。カプシドは一般に、タンパク質（「カプシドタンパク質」）のオリゴマー性構造サブユニットからなっている。本明細書で使用される場合、用語「カプシド封入」は、ウイルスカプシド中に封入されることを意味する。A A V のウイルスカプシドは3つのウイルスカプシドタンパク質、即ち V P 1、V P 2、および V P 3 の混合物からなっている。V P 1、V P 2、および V P 3 の混合物は、そのそれぞれが参照により全体として本明細書に組み込まれる S o n n t a g F r a , (2 0 1 0 年 6 月) “ A v i r a l a s s e m b l y f a c t o r p r o m o t e s A A V 2 c a p s i d f o r m a t i o n i n t h e n u c l e o l u s ” . P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s o f t h e U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a . 1 0 7 (2 2) : 1 0 2 2 0 ~ 5 頁、および R a b i n o w i t z J E , S a m u l s k i R J (2 0 0 0 年 1 2 月) . “ B u i l d i n g a b e t t e r v e c t o r : t h e m a n i p u l a t i o n o f A A V v i r i o n s ” . V i r o l o g y . 2 7 8 (2) : 3 0 1 ~ 8 頁に記載されているように、1 : 1 : 1 0 (V P 1 : V P 2 : V P 3) または 1 : 1 : 2 0 (V P 1 : V P 2 : V P 3) の比で T = 1 の 2 0 面体対称に配置された 6 0 個のモノマーを含む。

【 0 0 8 3 】

本開示は、a) 本明細書に記載される r A A V ベクターのいずれか、またはその相補体；および b) A A V カプシドタンパク質を含む r A A V ウイルスベクターを提供する。

【 0 0 8 4 】

本開示は、a) 本明細書に記載される r A A V ベクターのいずれか；および b) A A V カプシドタンパク質を含む r A A V ウイルスベクターを提供する。

【 0 0 8 5 】

A A V カプシドタンパク質は、当技術で既知の任意の A A V カプシドタンパク質であってよい。A A V カプシドタンパク質は、A A V 1 カプシドタンパク質、A A V 2 カプシドタンパク質、A A V 4 カプシドタンパク質、A A V 5 カプシドタンパク質、A A V 6 カプシドタンパク質、A A V 7 カプシドタンパク質、A A V 8 カプシドタンパク質、A A V 9 カプシドタンパク質、A A V 1 0 カプシドタンパク質、A A V 1 1 カプシドタンパク質、A A V 1 2 カプシドタンパク質、A A V 1 3 カプシドタンパク質、A A V P H P . B カプシドタンパク質、A A V r h 7 4 カプシドタンパク質、または A A V r h . 1 0 カプシドタンパク質であってよい。

【 0 0 8 6 】

代替の r A A V ベクターおよび r A A V ウイルスベクターの実施形態

1 . 5 ' から 3 ' の方向に、

- a) 第 1 の A A V I T R 配列、
 - b) プロモーター配列、
 - c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子、
 - d) ポリ A 配列、および
 - e) 第 2 の A A V I T R 配列
- を含む r A A V ベクター。

2 . G A N ポリペプチドが、配列番号 1 または配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む、実施形態 1 に記載の r A A V ベクター。

3 . K C T D 7 ポリペプチドが、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含む、実施形態 2 に記載の r A A V ベクター。

4 . K C T D 7 ポリペプチドが、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む、実施形態

10

20

30

40

50

2に記載の r A A V ベクター。

5. G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号 3 ~ 6 のいずれか 1 つで表される核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

6. G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号 3 で表される核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

7. G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号 4 で表される核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

8. G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号 5 で表される核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

9. G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号 6 で表される核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。 10

10. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 1 I T R 配列、A A V 2 I T R 配列、A A V 4 I T R 配列、A A V 5 I T R 配列、A A V 6 I T R 配列、A A V 7 I T R 配列、A A V 8 I T R 配列、A A V 9 I T R 配列、A A V 1 0 I T R 配列、A A V 1 1 I T R 配列、A A V 1 2 I T R 配列、A A V 1 3 I T R 配列、A A V r h 7 4 I T R 配列、A A V r h . 1 0 I T R 配列、またはこれらの任意の組合せを含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

11. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 1 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

12. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 2 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。 20

13. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 4 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

14. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 5 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

15. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 6 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

16. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 7 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

17. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 8 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。 30

18. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 9 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

19. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 1 0 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

20. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 1 1 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

21. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 1 2 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

22. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V 1 3 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。 40

23. 第 1 の A A V I T R 配列が、A A V r h 7 4 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

24. 第 1 の A A V I T R 配列が A A V r h . 1 0 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

【 0 0 8 7 】

25. 第 2 の A A V I T R 配列が、A A V 1 I T R 配列、A A V 2 I T R 配列、A A V 4 I T R 配列、A A V 5 I T R 配列、A A V 6 I T R 配列、A A V 7 I T R 配列、A A V 8 I T R 配列、A A V 9 I T R 配列、A A V 1 0 I T R 配列、A A V 1 1 I T R 配列、A A V 1 2 I T R 配列、A A V 1 3 I T R 配列、A A V r h 7 4 I T R 配列、A A V r h . 1 0 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。 50

4 I T R 配列、A A V r h . 1 0 I T R 配列、またはこれらの任意の組合せを含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

26. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 1 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

27. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 2 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

28. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 4 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

29. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 5 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

30. 第2の A A V I T R 配列が A A V 6 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

31. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 7 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

32. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 8 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

33. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 9 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

34. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 1 0 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

35. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 1 1 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

36. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 1 2 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

37. 第2の A A V I T R 配列が、A A V 1 3 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

38. 第2の A A V I T R 配列が、A A V r h 7 4 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

39. 第2の A A V I T R 配列が、A A V r h . 1 0 I T R 配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

40. プロモーター配列が J e T プロモーター配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

41. J e T プロモーター配列が、配列番号8で表される核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

42. ポリA配列が、配列番号11で表される核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

43. 5'から3'の方向に

a) 第1の A A V I T R 配列、

b) 配列番号8の核酸配列を含むプロモーター配列、

c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドが配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を含む、トランスジーン核酸分子；

d) 配列番号9の核酸配列を含むポリA配列；および

e) 第2の A A V I T R 配列。

を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

44. 5'から3'の方向に

a) 第1の A A V I T R 配列

b) 配列番号8の核酸配列を含むプロモーター配列；

c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を含む、トランスジーン核酸分子；

10

20

30

40

50

d) 配列番号 9 の核酸配列を含むポリ A 配列 ; および

e) 第 2 の A A V I T R 配列

を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

45 . 5 ' から 3 ' の方向に

a) 第 1 の A A V I T R 配列

b) 配列番号 8 の核酸配列を含むプロモーター配列 ;

c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドが配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、トランスジーン核酸分子 ;

d) 配列番号 9 の核酸配列を含むポリ A 配列 ; および

e) 第 2 の A A V I T R 配列

を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

46 . 5 ' から 3 ' の方向に

a) 第 1 の A A V I T R 配列

b) 配列番号 8 の核酸配列を含むプロモーター配列 ;

c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が配列番号 3 ~ 6 のいずれか 1 つで表される核酸配列を含む、トランスジーン核酸分子 ;

d) 配列番号 9 の核酸配列を含むポリ A 配列 ; および

e) 第 2 の A A V I T R 配列

を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

47 . 5 ' から 3 ' の方向に

a) 第 1 の A A V I T R 配列

b) 配列番号 8 の核酸配列を含むプロモーター配列 ;

c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が配列番号 3 ~ 6 のいずれか 1 つで表される核酸配列を含む、トランスジーン核酸分子 ;

d) 配列番号 9 の核酸配列を含むポリ A 配列 ; および

e) 第 2 の A A V I T R 配列

を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

48 . 5 ' から 3 ' の方向に

a) 第 1 の A A V I T R 配列

b) 配列番号 8 の核酸配列を含むプロモーター配列 ;

c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が配列番号 3 で表される核酸配列を含む、トランスジーン核酸分子 ;

d) 配列番号 9 の核酸配列を含むポリ A 配列 ; および

e) 第 2 の A A V I T R 配列

を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

49 . 5 ' から 3 ' の方向に

a) 第 1 の A A V I T R 配列

b) 配列番号 8 の核酸配列を含むプロモーター配列 ;

c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が配列番号 4 で表される核酸配列を含む、トランスジーン核酸分子 ;

d) 配列番号 9 の核酸配列を含むポリ A 配列 ; および

e) 第 2 の A A V I T R 配列

を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

【 0 0 8 8 】

50 . 5 ' から 3 ' の方向に

a) 第 1 の A A V I T R 配列

50

- b) 配列番号 8 の核酸配列を含むプロモーター配列；
 c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が配列番号 5 で表される核酸配列を含む、トランスジーン核酸分子；
 d) 配列番号 9 の核酸配列を含むポリ A 配列；および
 e) 第 2 の A A V I T R 配列
 を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

5 1 . 5 ' から 3 ' の方向に

- a) 第 1 の A A V I T R 配列
 b) 配列番号 8 の核酸配列を含むプロモーター配列；
 c) G A N ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジーン核酸分子であって、前記 G A N ポリペプチドをコードする核酸配列が配列番号 6 で表される核酸配列を含む、トランスジーン核酸分子；
 d) 配列番号 9 の核酸配列を含むポリ A 配列；および
 e) 第 2 の A A V I T R 配列
 を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

5 2 . 配列番号 1 0 の核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

5 3 . 配列番号 1 1 の核酸配列を含む、先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

5 4 .

- a) 先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター、またはその相補体；および
 b) A A V カプシドタンパク質
 を含む r A A V ウイルスベクター。

5 5 .

- a) 先行する実施形態のいずれか一項に記載の r A A V ベクター；および
 b) A A V カプシドタンパク質
 を含む r A A V ウイルスベクター。

5 6 . A A V カプシドタンパク質が、A A V 1 カプシドタンパク質、A A V 2 カプシドタンパク質、A A V 4 カプシドタンパク質、A A V 5 カプシドタンパク質、A A V 6 カプシドタンパク質、A A V 7 カプシドタンパク質、A A V 8 カプシドタンパク質、A A V 9 カプシドタンパク質、A A V 1 0 カプシドタンパク質、A A V 1 1 カプシドタンパク質、A A V 1 2 カプシドタンパク質、A A V 1 3 カプシドタンパク質、A A V P H P . B カプシドタンパク質、A A V r h 7 4 カプシドタンパク質、または A A V r h . 1 0 カプシドタンパク質である、実施形態 5 0 または 5 1 に記載の r A A V ウイルスベクター。

5 7 . A A V カプシドタンパク質が A A V 1 カプシドタンパク質である、実施形態 5 2 に記載の r A A V ウイルスベクター。

5 8 . A A V カプシドタンパク質が A A V 2 カプシドタンパク質である、実施形態 5 2 に記載の r A A V ウイルスベクター。

5 9 . A A V カプシドタンパク質が A A V 3 カプシドタンパク質である、実施形態 5 2 に記載の r A A V ウイルスベクター。

6 0 . A A V カプシドタンパク質が A A V 4 カプシドタンパク質である、実施形態 5 2 に記載の r A A V ウイルスベクター。

6 1 . A A V カプシドタンパク質が A A V 5 カプシドタンパク質である、実施形態 5 2 に記載の r A A V ウイルスベクター。

6 2 . A A V カプシドタンパク質が A A V 6 カプシドタンパク質である、実施形態 5 2 に記載の r A A V ウイルスベクター。

6 3 . A A V カプシドタンパク質が A A V 7 カプシドタンパク質である、実施形態 5 2 に記載の r A A V ウイルスベクター。

10

20

30

40

50

64. AAVカプシドタンパク質がAAV8カプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

65. AAVカプシドタンパク質がAAV9カプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

66. AAVカプシドタンパク質がAAV10カプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

67. AAVカプシドタンパク質がAAV11カプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

68. AAVカプシドタンパク質がAAV12カプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

69. AAVカプシドタンパク質がAAV13カプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

70. AAVカプシドタンパク質がAAVPHP.Bカプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

71. AAVカプシドタンパク質がAAVrh74カプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

72. AAVカプシドタンパク質がAAVrh.10カプシドタンパク質である、実施形態52に記載のrAAVウイルスベクター。

【0089】

組成物および医薬組成物

本開示は、本明細書に記載した単離されたポリヌクレオチド、rAAVベクター、および/またはrAAVウイルスベクターのいずれかを含む組成物を提供する。一部の態様では、組成物は医薬組成物であってよい。したがって、本開示は、本明細書に記載した単離されたポリヌクレオチド、rAAVベクター、および/またはrAAVウイルスベクターのいずれかを含む医薬組成物を提供する。

【0090】

医薬組成物は、本明細書に記載したように、薬理学の技術において既知のまたは開発された任意の方法によって製剤化することができ、その方法には、それだけに限らないが、活性成分（たとえばウイルス粒子または組み換えベクター）を賦形剤および/または添加物および/またはその他の補助的成分と接触させ、産生物を用量単位に分割または包装することが含まれる。本開示のウイルス粒子は、望ましい特徴、たとえば増大した安定性、増大した細胞トランスフェクション、持続したまたは遅延した放出、生体分布もしくは向性、コードされたタンパク質の*in vivo*での調節されたまたは増進された翻訳、およびコードされたタンパク質の*in vivo*での放出プロファイルを有して製剤化され得る。

【0091】

したがって、医薬組成物は、食塩水、脂質類、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポブックス、コアシェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、ウイルスベクターをトランスフェクトした細胞（たとえば対象への移植のための）、ナノ粒子模倣体、またはそれらの組合せをさらに含んでよい。一部の態様では、医薬組成物はナノ粒子として製剤化される。一部の態様では、ナノ粒子は自己アSEMBルした核酸ナノ粒子である。

【0092】

本開示による医薬組成物は、単一の単位用量として、および/または複数の単一単位用量として、バルクで調製され、包装され、および/または販売され得る。活性成分の量は一般に、対象に投与される活性成分の投薬量に等しくおよび/またはそのような投薬量の都合の良い割合、たとえばそのような投薬量の半分または3分の1等である。本発明の製剤は、1つまたは複数の賦形剤および/または添加物を、それぞれともにウイルスベクターの安定性を増大し、ウイルスベクターによる細胞のトランスフェクションまたは形質導入を増大し、ウイルスベクターによってコードされたタンパク質の発現を増大し、および/またはウイルスベクターによってコードされたタンパク質の放出プロファイルを変更さ

10

20

30

40

50

せる量で含み得る。一部の態様では、医薬組成物は、賦形剤および/または添加物を含む。賦形剤および/または添加物の非限定的な例には、溶媒、分散媒、希釈剤、またはその他の液体ビヒクル、分散または懸濁の助剤、界面活性剤、等張化剤、増粘剤または乳化剤、保存剤、またはそれらの組合せが含まれる。

【0093】

一部の態様では、医薬組成物は凍結保護剤を含む。用語「凍結保護剤」は、凍結中の物質に対する損傷を低減または排除することができる薬剤を指す。凍結保護剤の非限定的な例には、スクロース、トレハロース、ラクトース、グリセロール、デキストロース、ラフィノース、および/またはマンニトールが含まれる。

【0094】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」は、標準的な薬学的担体のいずれか、たとえばリン酸塩緩衝食塩溶液、水、およびエマルジョン、たとえば水中油もしくは油中水エマルジョン、ならびに種々の種類の湿潤剤を包含する。組成物は安定剤および保存剤を含んでもよい。担体、安定剤、およびアジュバントの例については、Martin (1975) Remington's Pharm. Sci., 15版 (Mack Publ. Co., Easton) を参照されたい。

【0095】

一部の態様では、本開示の医薬組成物は、リン酸塩緩衝食塩水 (PBS)、D-ソルビトール、またはそれらの任意の組合せを含んでよい。

【0096】

一部の態様では、医薬組成物はPBSを含んでよく、PBSは約100mM~約500mM、または約200mM~約400mM、または約300mM~約400mMの濃度で存在する。一部の態様では、塩化ナトリウムが約350mMの濃度で存在してよい。

【0097】

一部の態様では、医薬組成物はD-ソルビトールを含んでよく、D-ソルビトールは約1%~約10%、または約2.5%~約7.5%の濃度で存在する。一部の態様では、D-ソルビトールは約5%の濃度で存在してよい。

【0098】

即ち、本開示は、5%の濃度でD-ソルビトールを含む350mMのリン酸塩緩衝食塩溶液中に本開示のrAAVベクターおよび/またはrAAVウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する。

【0099】

本開示の組成物を使用する方法

本開示は、開示した組成物または医薬組成物を用いる、たとえば細胞、組織、器官、動物、または対象に治療有効量の組成物または医薬組成物を投与する、または接触させる、当技術で既知のまたは本明細書に記載した細胞、組織、器官、動物、または対象における疾患または障害の処置のための開示した組成物または医薬組成物の使用を提供する。一態様では、対象は哺乳動物である。好ましくは、対象はヒトである。用語「対象」および「患者」は、本明細書では相互交換可能に用いられる。

【0100】

本開示は、疾患および/または障害を防止または処置する方法であって、治療有効量の、本明細書に開示されるrAAVベクター、rAAVウイルスベクター、組成物、および/または医薬組成物のいずれか1つを対象に投与するステップを含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなる方法を提供する。

【0101】

処置方法は、本明細書に記載される疾患および/または障害の1つまたは複数の症状を緩和することができる。一実施形態では、本明細書に記載した組成物の送達によって、症状が検出可能になる前にGAN遺伝子の変異を有している対象に投与されれば、検出可能な症状の進行を防止しまたは遅延させることができる。したがって、処置は治療的または予防的であり得る。治療は、確立した症状または表現型の阻害または逆転を指す。治療は

10

20

30

40

50

、症状または表現型の発症の遅延も意味し得る。予防は、既に明白な症状を呈していない対象における症状の進行を阻止または防止することを意味する。明白な症状を呈していない対象は、月齢18か月、12か月、または6か月以前に実施される適切な遺伝子検査によって、GAN遺伝子の機能喪失変異を有すると若年期に特定することができる。

【0102】

本開示の方法、組成物、医薬組成物、rAAVベクター、またはrAAVウイルスベクターを用いて処置すべき対象は、本明細書に記載した疾患および/または症状のいずれをも有し得る。

【0103】

本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法（たとえば、rAAVウイルスベクター）を、前記少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を前記対象の迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。

10

【0104】

本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを前記対象の迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置で使用するための、少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを提供するが、前記rAAVウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置を目的とする医薬を製造するための、少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターの使用を提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。

20

【0105】

一部の態様では、迷走神経は左迷走神経である。したがって、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを前記対象の左迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置で使用するための少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターも提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターは、対象の左迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置を目的とする医薬を製造するための、少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターの使用も提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターは、対象の左迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。

30

【0106】

一部の態様では、迷走神経は右迷走神経である。したがって、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを前記対象の右迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置で使用するための少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターを提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターは、対象の右迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置を目的とする医薬を製造するための、少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターの使用も提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のrAAVウイルスベクターは、対象の左迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。

40

【0107】

本開示は、対象における自律神経機能不全の少なくとも1つの症状を緩和する方法であ

50

って、少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法（たとえば、r A A Vウイルスベクター）を、対象の迷走神経中に投与するステップを含む方法を提供する。

【0108】

本開示は、対象における自律神経機能不全の少なくとも1つの症状を緩和する方法であって、少なくとも1つの治療有効量のr A A Vウイルスベクターを対象の迷走神経中に投与するステップを含む方法を提供する。本開示は、対象における自律神経機能不全の少なくとも1つの症状を緩和する方法で使用するための少なくとも1つの治療有効量のr A A Vベクターも提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のr A A Vウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、対象における自律神経機能不全の少なくとも1つの症状を緩和する医薬を製造するための少なくとも1つの治療有効量のr A A Vウイルスベクターの使用も提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のr A A Vウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。一部の態様では、迷走神経は左迷走神経である。一部の態様では、迷走神経は右迷走神経である。

10

【0109】

自律神経機能不全の症状には、構音障害（発声困難）、嚥下障害（嚥下困難）、消化管運動の制御に伴う問題（たとえば、食欲不振、腹部膨満、下痢、便秘を惹起する）、血圧の制御に伴う問題、および呼吸困難、起立性低血圧症（めまいおよび失神をもたらす）、運動不耐性（運動に伴い心拍数を変化させることができない）、発汗異常（発汗過剰および/または発汗不十分）、尿の問題（たとえば、排尿開始困難、失禁、および膀胱の残尿感）、および性的問題（たとえば、射精困難または勃起維持困難、陰乾燥、またはオルガスムを有することが困難）が含まれ得るが、ただしこれらに限定されない。一部の態様では、自律神経機能不全は、神経学的障害を含む、ただしこれに限定されない特定の疾患および/または障害と関連し得る。

20

【0110】

本開示は、遺伝子療法（たとえば、r A A Vウイルスベクター）が対象の自律神経系を標的とするようにする方法を提供し、同方法は、少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を対象の迷走神経中に注射するステップを含む。

【0111】

本開示は、r A A Vウイルスベクターが対象の自律神経系を標的とするようにする方法を提供し、同方法は、少なくとも1つの治療有効量のr A A Vウイルスベクターを対象の迷走神経中に注射するステップを含む。本開示は、r A A Vウイルスベクターが対象の自律神経系を標的とするようにする方法で使用するための、少なくとも1つの治療有効量のr A A Vウイルスベクターも提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のr A A Vは、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、r A A Vウイルスベクターが対象の自律神経系を標的とするようにすることを目的とする医薬を製造するための、少なくとも1つの治療有効量のr A A Vウイルスベクターの使用も提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量のr A A Vウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。一部の態様では、迷走神経は左迷走神経である。一部の態様では、迷走神経は右迷走神経である。

30

40

【0112】

本開示は、対象の自律神経系において外因性核酸を発現させる方法を提供し、同方法は、外因性核酸を含む組成物を、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するステップを含む。本開示は、対象の自律神経系において外因性核酸を発現させる方法で使用するための、外因性核酸を含む組成物を提供するが、前記組成物は、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、対象の自律神経系において外因性核酸を発現させる方法のための医薬の製造における、外因性核酸を含む組成物の使用を提供するが、前記組成物は、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。一部の態様では、迷走神経は左迷走神経である。一部の態様では、迷走神経は右迷走神経である。

50

【0113】

一部の態様では、外因性核酸を含む組成物は、転写制御の下に置かれかつプロモーター配列と作動可能に連結された外因性核酸を含む組成物であり得る。一部の態様では、外因性核酸を含む組成物は、外因性核酸、および/または転写制御の下に置かれかつプロモーター配列と作動可能に連結された外因性核酸を含む rAAV ウイルスベクターであり得る。

【0114】

本開示は、対象の自律神経系において外因性ポリペプチドを発現させる方法を提供し、同方法は、対象の迷走神経中への注射を介して外因性ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物を対象に投与するステップを含む。本開示は、自律神経系において外因性ポリペプチドを発現させる方法で使用するための、外因性ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物を提供するが、前記組成物は、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、対象の自律神経系において外因性ポリペプチドを発現させる方法で使用することを目的とする医薬の製造で使用するための、外因性ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物の使用を提供するが、前記組成物は、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。一部の態様では、迷走神経は左迷走神経である。一部の態様では、迷走神経は右迷走神経である。

10

【0115】

一部の態様では、外因性ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物は、転写制御の下に置かれかつプロモーター配列と作動可能に連結された外因性ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物であり得る。

20

【0116】

一部の態様では、外因性ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物は、転写制御の下に置かれかつプロモーター配列と作動可能に連結された外因性ポリペプチドをコードする核酸を含む rAAV ウイルスベクターであり得る。

【0117】

外因性核酸および/またはポリペプチドの発現は、自律神経系の特定領域における外因性核酸および/またはポリペプチドの発現を含み得る。自律神経系の特定領域の非限定的な例として、最後野、背側運動核、自律神経系の感覚ニューロン、自律神経系の運動ニューロン、節上神経節、迷走神経の背側運動核、迷走神経回路、疑核、または当技術分野において公知の自律神経系の任意のその他の部分が含まれる。

30

【0118】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象は、少なくとも1つの量の遺伝子療法をこれまでに投与されたことのある対象であり得る。したがって、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を、前記少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を、前記対象の迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含み、前記対象が初回遺伝子療法をこれまでに投与されたことのある、方法を提供する。一部の態様では、対象の迷走神経を介して投与される遺伝子療法は、初回遺伝子療法とは異なる遺伝子療法であり得る。一部の態様では、対象の迷走神経を介して投与される遺伝子療法は、初回遺伝子療法と同じ遺伝子療法であり得る。一部の態様では、初回遺伝子療法は、迷走神経ではない投与経路を介して投与された可能性がある。一部の態様では、初回遺伝子療法は、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内もしくは眼周囲、経口、経直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、脳槽内、神経内 (intraneurally)、胸膜内、局所、リンパ節内、脳槽内、または神経内 (intranerve) で投与された可能性がある。一部の態様では、初回遺伝子療法は、髄腔内投与された可能性がある。

40

【0119】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象は、少なくとも1つの量の初回 rAAV ウイルスベクターをこれまでに投与されたことのある対象であり得る。したがって、本

50

開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスペクターを、前記少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスペクターを、前記対象の迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含み、前記対象が初回 r A A V ウイルスペクターをこれまでに投与されたことのある、方法を提供する。一部の態様では、対象の迷走神経を介して投与される r A A V ウイルスペクターは、初回 r A A V ウイルスペクターとは異なる r A A V ウイルスペクターであり得る。一部の態様では、対象の迷走神経を介して投与される r A A V ウイルスペクターは、初回 r A A V ウイルスペクターと同じであり得る。一部の態様では、対象の迷走神経を介して投与される r A A V ウイルスペクターは、第1の A A V カプシドタンパク質を含む可能性があり、また初回 r A A V ウイルスペクターは、第2の A A V カプシドタンパク質を含む可能性があり、第1の A A V カプシドタンパク質は、第2の A A V カプシドタンパク質とは異なる血清型である。一部の態様では、対象の迷走神経を介して投与される r A A V ウイルスペクターは第1の A A V カプシドタンパク質を含む可能性があり、また初回 r A A V ウイルスペクターは、第2の A A V カプシドタンパク質を含む可能性があり、第1の A A V カプシドタンパク質は、第2の A A V カプシドタンパク質（たとえば、A A V 9 カプシドタンパク質）と同じ血清型である。一部の態様では、初回 r A A V ウイルスペクターは、迷走神経ではない投与経路を介して投与された可能性がある。一部の態様では、初回 r A A V ウイルスペクターは、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内もしくは眼周囲、経口、経直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、脳槽内、神経内 (i n t r a n e r v a l l y)、胸膜内、局所、リンパ節内、脳槽内、または神経内 (i n t r a n e r v e) で投与された可能性がある。一部の態様では、初回 r A A V ウイルスペクターは、髄腔内投与された可能性がある。

【0120】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象は、迷走神経中への注射を介して投与される遺伝子療法に対して血清陽性である対象であり得る。したがって、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を、前記少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を前記対象の迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含み、前記対象が前記遺伝子療法に対して血清陽性である、方法を提供する。

【0121】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象は、迷走神経中への注射を介して投与される r A A V ウイルスペクターと同じ血清型である A A V 粒子に対して血清陽性である対象であり得る。したがって、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスペクターを、前記少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を前記対象の迷走神経中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含み、前記対象が、迷走神経中への注射を介して投与される r A A V ウイルスペクターと同じ血清型である A A V 粒子に対して血清陽性である、方法を提供する。

【0122】

本明細書で使用される場合、用語「血清陽性」とは、対象の血液中に血清学的マーカーが存在することを指す。したがって、非限定的な例では、A A V 9 カプシドを含む A A V ウイルスペクターに対して血清陽性であるといわれる対象は、その血液中に A A V 9 カプシドを含む A A V ウイルスペクターを有する対象である。別の非限定的な例では、中和抗体に対して血清陽性であるといわれる対象は、その血液中に中和抗体を有する対象である。

【0123】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象は、迷走神経中への注射を介して投与される遺伝子療法に対する中和抗体を有する対象であり得る。したがって、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を、前記少なくとも1つの治療有効量の遺伝子療法を前記対象の迷走神経

中に注射することにより、前記対象に投与するステップを含み、前記対象が前記遺伝子療法に対する中和抗体を有する、方法を提供する。

【0124】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象は、迷走神経中への注射を介して投与される r A A V ウイルスベクターと同じ血清型を有する A A V 粒子に対する中和抗体を有する対象であり得る。したがって、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスベクターを、前記少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスベクターを迷走神経中に注射することにより投与するステップを含み、前記対象が r A A V ウイルスベクターと同じ血清型を有する A A V 粒子に対する中和抗体を有する、方法を提供する。非限定的な例では、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスベクターを、前記少なくとも1つの治療有効量の r A A V ウイルスベクターを迷走神経中に注射することにより投与するステップを含み、前記 r A A V ウイルスベクターが A A V 9 カプシドタンパク質を含み、前記対象が A A V 9 カプシドを含む A A V 粒子に対する中和抗体を有する、方法を提供する。

10

【0125】

特定の血清型を有する遺伝子療法または A A V 粒子に対する中和抗体の存在は、当技術分野において標準的な、また当業者にとって公知の方法を使用して決定することができる。

【0126】

本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、a) 少なくとも1つの治療有効量の第1の遺伝子療法と、b) 少なくとも1つの治療有効量の第2の遺伝子療法とを投与するステップを含み、前記少なくとも1つの治療有効量の第2の遺伝子療法が、前記対象の迷走神経中への注射を介して投与される、方法を提供する。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置で使用するための、少なくとも1つの治療有効量の第1の遺伝子療法および少なくとも1つの治療有効量の第2の遺伝子療法を提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量の第2の遺伝子療法は、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置を目的とする医薬を製造するための、少なくとも1つの治療有効量の第1の遺伝子療法および少なくとも1つの治療有効量の第2の遺伝子療法の使用を提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量の第2の遺伝子療法は、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。一部の態様では、迷走神経は左迷走神経であり得る。一部の態様では、迷走神経は右迷走神経であり得る。

20

30

【0127】

先行する方法および使用の一部の態様では、第1の遺伝子療法および第2の遺伝子療法は同じであり得る。先行する方法および使用の一部の態様では、第1の遺伝子療法および第2の遺伝子療法は異なる可能性がある。

【0128】

先行する方法の一部の態様では、第1の遺伝子療法は、対象の迷走神経中への注射ではない投与経路を介して対象に投与され得る。一部の態様では、第1の遺伝子療法は、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内もしくは眼周囲、経口、経直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、脳槽内、神経内 (i n t r a n e r v a l l y)、胸膜内、局所、リンパ節内、脳槽内、または神経内 (i n t r a n e r v e) で投与される。したがって、非限定的な例では、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、a) 前記対象に髄腔内投与される、少なくとも1つの治療有効量の第1の遺伝子療法と、b) 前記対象の迷走神経中への注射を介して前記対象に投与される、少なくとも1つの治療有効量の第2の遺伝子療法とを投与するステップを含む方法を提供する。

40

【0129】

本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、a) 少なく

50

とも1つの治療有効量の第1のrAAVウイルスベクターと、b)少なくとも1つの治療有効量の第2のrAAVウイルスベクターとを投与するステップを含み、前記少なくとも1つの治療有効量の第2のrAAVウイルスベクターが、前記対象の迷走神経中への注射を介して投与される、方法を提供する。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置で使用するための、少なくとも1つの治療有効量の第1のrAAVウイルスベクターおよび少なくとも1つの治療有効量の第2のrAAVウイルスベクターも提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量の第2のrAAVウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。本開示は、対象における疾患および/または障害の処置を目的とする医薬の製造における、少なくとも1つの治療有効量の第1のrAAVウイルスベクターおよび少なくとも1つの治療有効量の第2のrAAVウイルスベクターの使用も提供するが、前記少なくとも1つの治療有効量の第2のrAAVウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射を介して対象に投与するためのものである。一部の態様では、迷走神経は左迷走神経であり得る。一部の態様では、迷走神経は右迷走神経であり得る。

10

【0130】

先行する方法の一部の態様では、第1のrAAVウイルスベクターおよび第2のrAAVウイルスベクターは同じであり得る。先行する方法の一部の態様では、第1のrAAVウイルスベクターおよび第2のrAAVウイルスベクターは異なる可能性がある。

【0131】

先行する方法の一部の態様では、第1のrAAVウイルスベクターおよび第2のrAAVウイルスベクターは同じ血清型であり得る。したがって、非限定的な例では、第1のrAAVウイルスベクターはAAV9カプシドタンパク質を含み、および第2のrAAVウイルスベクターはAAV9カプシドタンパク質を含む。

20

【0132】

先行する方法の一部の態様では、第1のrAAVウイルスベクターは、対象の迷走神経中への注射ではない投与経路を介して対象に投与される。一部の態様では、第1のrAAVウイルスベクターは、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内もしくは眼周囲、経口、経直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、脳槽内、神経内(intranervally)、胸膜内、局所、リンパ節内、脳槽内、または神経内(intranerve)で投与される。したがって、非限定的な例では、本開示は、対象における疾患および/または障害を処置する方法であって、a)前記対象に髄腔内投与される、少なくとも1つの治療有効量の第1のrAAVウイルスベクターと、b)前記対象の迷走神経中への注射を介して前記対象に投与される、少なくとも1つの治療有効量の第2のrAAVウイルスベクターとを投与するステップを含む方法を提供する。

30

【0133】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象には、第1の遺伝子療法および第2の遺伝子療法(たとえば、第1のrAAVウイルスベクターおよび第2のrAAVウイルスベクター)が投与され、第1の遺伝子療法および第2の遺伝子療法は、時間的に近接した状態で投与可能である。

【0134】

本明細書で使用される場合、用語「時間的に近接した状態」とは、一方の治療組成物(たとえば、第1の遺伝子療法)の投与が、別の治療組成物(たとえば、第2の遺伝子療法)の投与の前または後のある期間内に、一方の治療剤の治療効果が他方の治療剤の治療効果と重複するように起こることを指す。一部の実施形態では、一方の治療剤の治療効果は他方の治療剤の治療効果と完全に重複する。一部の実施形態では、「時間的に近接した状態」とは、一方の治療剤の投与が、別の治療剤の投与の前または後のある期間内に、一方の治療剤と他方の治療剤の間で相乗的効果が存在するように起こることを意味する。「時間的に近接した状態」は、治療剤が投与される対象の年齢、性別、体重、遺伝的背景、医学的状态、疾患履歴、および処置履歴、処置または良化の対象とされる疾患または状態；達成されるべき治療転帰；治療剤の投薬量、投与頻度、および投与期間；治療剤の薬物動

40

50

態および薬力学；ならびに治療剤が投与される経路（複数可）を含む、ただしこれらに限定されない種々の因子によって変動し得る。一部の実施形態では、「時間的に近接した状態」とは、15分以内、30分以内、1時間以内、2時間以内、4時間以内、6時間以内、8時間以内、12時間以内、18時間以内、24時間以内、36時間以内、2日以内、3日以内、4日以内、5日以内、6日以内、1週間以内、2週間以内、3週間以内、4週間以内、6週間以内、または8週間以内を意味する。一部の実施形態では、「時間的に近接した状態」とは、1ヶ月以内、2ヶ月以内、3ヶ月以内、4ヶ月以内、5ヶ月以内、6ヶ月以内、7ヶ月以内、8ヶ月以内、9ヶ月以内、10ヶ月以内、11ヶ月、または12ヶ月以内を意味する。一部の実施形態では、「時間的に近接した状態」とは、1年以内、2年以内、3年以内、4年以内、5年以内、6年以内、7年以内、8年以内、9年以内、または10年以内を意味する。一部の実施形態では、1つの治療剤の多回の投与は、別の治療剤の単一の投与と時間的に近接した状態で起こり得る。一部の実施形態では、時間的に近接した状態は、処置サイクル期間中または投与レジメン内で変化し得る。

10

【0135】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象には、第1の遺伝子療法および第2の遺伝子療法（たとえば、第1のrAAVウイルスベクターおよび第2のrAAVウイルスベクター）が投与され、第1の遺伝子療法および第2の遺伝子療法は、同時に投与され得る。

【0136】

本開示の方法および使用の一部の態様では、対象には、第1の遺伝子療法および第2の遺伝子療法（たとえば、第1のrAAVウイルスベクターおよび第2のrAAVウイルスベクター）が投与され、第1の遺伝子療法および第2の遺伝子療法は、連続的に投与され得る。

20

【0137】

本開示の方法および使用の一部の態様では、遺伝子療法は、脊髄性筋萎縮症、フリードリッヒの運動失調、CLN3バッテン病、CLN6バッテン病、CLN7バッテン病、てんかん性脳症、リー症候群、シャルコー・マリー・トゥース病、巨大軸索ニューロパチー、ラフォラ病、SLC13A5てんかん性脳症、グリコシル化の先天性疾患、タイプIq、Kahriziziz症候群、アンジェルマン症候群、レット症候群、痙性対麻痺、小児期の交代性片麻痺、およびツェルバーガスペクトラム障害のうちの少なくとも1つ以上を処置するために、当業者に公知の標準法に従って設計される遺伝子療法であり得る。非限定的な例では、当業者には認識されるように、遺伝子療法は、治療用タンパク質をコードする核酸を送達するように設計された遺伝子療法であり得るが、その場合、治療用タンパク質が発現すると、その結果、疾患及び/又は障害の処置が実現する。別の非限定的な例では、当業者には認識されるように、遺伝子療法は、内因性の核酸および/またはタンパク質の発現および/または活性を上方制御または下方制御する制御性核酸（たとえば、siRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、shRNA等）を送達するように設計された遺伝子療法であり得る。

30

【0138】

遺伝子療法の非限定的な例として、ウイルスに基づく遺伝子療法（たとえば、レンチウイルスベクター、AAVベクター、アデノウイルスベクター等）、非ウイルス性遺伝子療法（たとえば、直鎖状オリゴヌクレオチド、環状プラスミド、ヒト人工染色体）、CRISPRに基づく遺伝子療法、アンチセンスオリゴヌクレオチドに基づく遺伝子療法、ナノ粒子媒介式の遺伝子療法、または当技術分野において公知の任意のその他の遺伝子療法が含まれる。遺伝子療法は、ウイルスベクター（たとえば、rAAVウイルスベクター）、プラスミド、バクテリオファージ、細菌染色体、人工染色体、トランスポゾン、または任意のこれらの組合せを含み得る。

40

【0139】

遺伝子療法は遺伝子発現カセットを含み得る。発現カセットは環状または直鎖状核酸分子であり得る。いくつかのケースでは、発現カセットは、ベクター（たとえば、発現ベク

50

ター)の状態に細胞(たとえば、標的細胞もしくは細胞型および/または非標的細胞型を含む、複数の異なる細胞または細胞型)に送達される。遺伝子発現カセットは、遺伝子、たとえばコドン最適化された遺伝子等の発現を推進するように設計され得る。遺伝子の例を表1に示す。発現カセットは、研究用として、またたとえば表1に示す遺伝障害に対する遺伝子置換戦略を試験するために使用され得る。発現カセットは、このような遺伝子欠陥に起因する障害、疾患、または状態を処置するためにも使用され得る。

【0140】

遺伝子発現カセットは、カセットが導入された細胞内で機能的遺伝子を発現することができる。発現カセットは、たとえば高、中、または低の強度で発現させるためのプロモーターを含み得る。発現カセットは、多くのまたは全ての組織において発現させるための遍在性プロモーターを含み得る。任意の組織特異的プロモーターが、本明細書で提供される発現カセット内に含まれ得る。本明細書で提供される発現カセットに含まれる遺伝子は、最適な遺伝子発現を容易にするためにコドン最適化され得る。したがって、遺伝子の配列は非自然発生的であり得る。

10

【0141】

一部の実施形態では、神経学的障害に付随する遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットが本明細書で提供される(たとえば、表1を参照)。遺伝子をコードするポリヌクレオチドは、(I)たとえば表1で表されるポリヌクレオチド、または(II)表1に示す遺伝子に対して少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、少なくとも99.5%の同一性、少なくとも99.9%の同一性、およびその間の任意の数値もしくは範囲の同一性を有するポリヌクレオチドを含み得る。一実施形態では、本明細書で提供される発現カセットに含まれる遺伝子は、ヒト遺伝子である。本明細書で提供される発現カセットに含まれる遺伝子は、コドン最適化され得る。

20

【0142】

本明細書で提供される発現カセットは、遺伝子の発現を推進するプロモーターをさらに含み得る。たとえば遍在的、構成的、誘起的、および組織特異的プロモーターを含む、任意のプロモーターが使用され得る。ヒト、類人猿、サル、マウス、ラット、ニワトリ等を含む、任意の種に由来するプロモーターが使用され得る。一実施形態では、遺伝子の発現を推進するプロモーターは、高強度の遍在性プロモーターである。一実施形態では、遺伝子の発現を推進するプロモーターは、ニューロン特異的発現を提供し得るプロモーターである。

30

【0143】

遺伝子発現に影響を及ぼすことができる追加の制御エレメントおよびその他のエレメント、たとえばKozakコンセンサス配列、ポリ(A)シグナル、アデノ随伴ウイルス(AAV)の5'および3'逆方向末端反復(ITR)等が、本明細書で提供される発現カセット内に含まれ得る。

【0144】

AAVの逆方向末端反復(ITR)配列は、それぞれ約145塩基の対称的な配列である。AAV ITRは、ウイルスゲノムの5'および3'末端に位置する。ITRは効率的なAAVゲノム増殖にとって重要である。ITR配列は、たとえば、AAVベクター内で、異種ポリヌクレオチド、即ちAAV起源ではないポリヌクレオチドに隣接することができる。

40

【0145】

変異したITRが、本明細書で提供される発現カセット内に含まれ得る。5' ITRおよび/または3' ITRは変異し得る。一実施形態では、5' ITRが変異している。一実施形態では、3' ITRが変異している。一実施形態では、5' ITRおよび3' ITRが変異している。ITRは、自己相補性となるように変異し得る。一実施形態では、3' ITRが自己相補性となるように変異している。

50

【0146】

本開示の方法および使用の一部の態様では、迷走神経は左迷走神経である。本開示の方法および使用の一部の態様では、迷走神経は右迷走神経である。

【0147】

本開示の方法および使用の一部の態様では、rAAVウイルスベクターは、GANポリペプチドをコードする核酸配列を含むrAAVウイルスベクターを含む、ただしこれに限定されない、本明細書に記載されるrAAVウイルスベクターのいずれかであり得る。

【0148】

一部の態様では、疾患および/または障害は、GAN遺伝子が関与する遺伝障害であり得る。GAN遺伝子が関与する遺伝障害は、GANの喪失、機能不全、および/または欠損であり得る。 10

【0149】

一部の態様では、疾患はGANタンパク質が関与する障害であり得る。GANタンパク質が関与する遺伝障害は、GANの喪失、機能不全、および/または欠損であり得る。

【0150】

疾患および/または障害は、巨大軸索ニューロパチーであり得る。

【0151】

一部の態様では、疾患および/または障害は、対象のゲノム内に存在するGAN遺伝子の少なくとも1つのコピーの機能喪失によって特徴付けられる疾患および/または障害であり得る。一部の態様では、疾患および/または障害は、対象のゲノム内に存在するGAN遺伝子の少なくとも1つのコピーの機能低下によって特徴付けられる疾患および/または障害であり得る。一部の態様では、疾患および/または障害は、対象のゲノム内に存在するGAN遺伝子の少なくとも1つのコピーに含まれる少なくとも1つの突然変異における、少なくとも1つの突然変異によって特徴付けられる疾患および/または障害であり得る。 20

【0152】

本明細書で提供される方法に含まれる対象は、GAN遺伝子および/またはGANタンパク質が欠損している可能性がある。本明細書で使用される場合、「GAN遺伝子の欠損」とは、対象が、GAN遺伝子内に1つまたは複数の突然変異を有し得るかまたは機能的なGAN遺伝子を欠いていることを意味する。本明細書で使用される場合、「GANタンパク質の欠損」とは、対象が、GANタンパク質内に1つまたは複数の突然変異を有し得るかまたは機能的なGANタンパク質を欠いていることを意味する。 30

【0153】

GAN遺伝子またはGANタンパク質内の突然変異は、当技術分野において公知である任意の種類突然変異であり得る。変異の非限定的な例には、体細胞変異、単一ヌクレオチドバリエーション(SNV)、ナンセンス変異、挿入、欠失、重複、フレームシフト変異、反復拡張、短い挿入および欠失(INDDEL)、長いINDDEL、選択的スプライシング、選択的スプライシングの産物、改変された翻訳の開始、改変された翻訳の開始の産物、プロテオーム切断、プロテオーム切断の産物が含まれる。

【0154】

一部の態様では、疾患および/または障害は、疾患および/または障害を有しない対照の対象と比較した、対象におけるGAN遺伝子の発現減少によって特徴付けられる疾患および/または障害であり得る。一部の態様では、発現の低下は、少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約99%、または少なくとも約100%であってよい。 40

【0155】

一部の態様では、疾患および/または障害は、疾患および/または障害を有しない対照の対象と比較した、対象におけるGANタンパク質量の減少によって特徴付けられる疾患 50

および/または障害であり得る。一部の態様では、G A Nタンパク質の減少は、少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約99%、または少なくとも約100%であり得る。

【0156】

一部の態様では、疾患および/または障害は、疾患および/または障害を有しない対照の対象と比較した、対象におけるG A Nタンパク質の活性減少によって特徴付けられる疾患および/または障害であり得る。一部の態様では、G A Nタンパク質の活性減少は、少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約99%、または少なくとも約100%であり得る。

10

【0157】

本開示の方法および使用の一部の態様では、疾患および/または障害は神経系の障害であり得る。

【0158】

本開示の方法および使用の一部の態様では、疾患および/または障害は、脊髄性筋萎縮症、フリードリッヒの運動失調、CLN3パッテン病、CLN6パッテン病、CLN7パッテン病、てんかん性脳症、リー症候群、シャルコー・マリー・トゥース病、巨大軸索ニューロパチー、ラフォラ病、SLC13A5てんかん性脳症、グリコシル化の先天性疾患、タイプIq、Kahrizi症候群、アンジェルマン症候群、レット症候群、痙性対麻痺、小児期の交代性片麻痺、およびツェルベーター・スベクトラム障害のうちの1つまたは複数であり得る。代表的な神経系障害を、障害に付随する代表的な遺伝子およびポリヌクレオチドを含め、下記の表1に示す。これらの代表的な遺伝子およびポリヌクレオチドは、1つまたは複数の神経系障害に付随する治療ポリペプチドをコードする。

20

【0159】

30

40

50

【表 1】

表1

疾患	遺伝子	タンパク質	代表的NCBI参照配列
脊髄性筋萎縮症	<i>SMN1</i>	サバイバルモーターニューロン遺伝子1	NG_008691.1
フリードリッヒの運動失調	<i>FXN</i>	フラタキシン	NG_008845.2
CLN3バットエン病	<i>CLN3</i>	CLN3	NG_008654.2
CLN6バットエン病	<i>CLN6</i>	CLN6	NG_008764.2
CLN7バットエン病	<i>CLN7</i>	CLN7	NG_008657.1
てんかん性脳症	<i>SLC6A1</i>	溶質輸送体ファミリー6のメンバー1	NG_053003.1
リー症候群	<i>SURF1</i>	Surfeit遺伝子座タンパク質1	NG_008477.1
シャルコー・マリー・トウス病	<i>MFN2</i>	ミトフュージン2	NG_007945.1
巨大軸索ニューロパチー	<i>GAN</i>	ギガキソニン	NG_009007.1
ラフォラ病	<i>EPM2A</i> <i>NHLRC1</i>	ラフォリン マリン	NG_012832.2 NG_016750.1
SLC13A5てんかん性脳症	<i>SLC13A5</i>	ナトリウム依存性クエン酸トランスポーター	NG_034220.1
グリコシル化の先天性疾患、タイプIq、Kahrizi症候群	<i>SRD5A3</i>	ステロイド5 α -リダクターゼ3	NG_028230.1
アンジェルマン症候群	<i>UBE3A</i>	E3ユビキチンリガーゼ	NG_009268.1
レット症候群	<i>MECP2</i>	メチル-CpG結合タンパク質2	NG_007107.2
痙性対麻痺	<i>SPG7</i>	パラプレギン	NG_008082.1
小児期の交代性片麻痺	<i>ATP1A3</i> <i>ATP1A2</i>	Na ⁺ /K ⁺ APTaseの α サブユニット	NG_008015.1 NG_008014.1
ツェルバーガースペクトラム障害	<i>PEX1</i> <i>PEX2</i> <i>PEX3</i> <i>PEX5</i> <i>PEX6</i> <i>PEX7</i> <i>PEX10</i>	ペルオキシソームバイオジェネシス因子1 ペルオキシソームバイオジェネシス因子2 ペルオキシソームバイオジェネシス因子3 ペルオキシソームバイオジェネシス因子3	NG_008341.2 NG_008371.1 NG_008459.1 NG_008448.1 NG_008370.1 NG_008462.1 NG_008342.1

10

20

30

40

50

	<i>PEX11β</i>	ス因子5	NG_033000.3	
	<i>PEX12</i>	ペルオキシソームバイオジェネシ	NG_008447.1	
	<i>PEX13</i>	ス因子6	NG_008665.1	
	<i>PEX14</i>	ペルオキシソームバイオジェネシ	NG_008340.2	
	<i>PEX16</i>	ス因子7	NG_008460.1	
	<i>PEX19</i>	ペルオキシソームバイオジェネシ	NG_008637.1	
	<i>PEX26</i>	ス因子10	NG_008339.1	10
		ペルオキシソームバイオジェネシ		
		ス因子11β		
		ペルオキシソームバイオジェネシ		
		ス因子12		
		ペルオキシソームバイオジェネシ		
		ス因子13		
		ペルオキシソームバイオジェネシ		
		ス因子14		
		ペルオキシソームバイオジェネシ		20
		ス因子16		
		ペルオキシソームバイオジェネシ		
		ス因子19		
		ペルオキシソームバイオジェネシ		
		ス因子26		
クレアチン輸送障害	<i>SLC6A8</i>	ナトリウム及びクロライド依存性 クレアチントランスポーター1;	NG_012016.2	
GNAO1脳症	<i>GNAO1</i>	Gタンパク質サブユニットα o1	NG_042800.1	30
パーキンソン病	<i>GDNF</i> <i>DCC</i> <i>NRTN</i>	グリア細胞系由来のニューロトロ フィック因子 ネトリン1受容体 ニュールツリン	NG_011675.2 NG_013341.2 NG_008202.1	
ウンフェルリヒト・ル ントボルク病	<i>CSTB</i>	シスタチンB	NG_011545.1	
成人ポリグルコサン 体疾患	<i>GBE1</i>	グリコーゲン分枝酵素	NG_011810.1	40

【 0 1 6 0 】

一部の態様では、対象は年齢0.5歳未満、または年齢1歳未満、または年齢1.5歳未満、または年齢2歳未満、または年齢2.5歳未満、または年齢3歳未満、または年齢3.5歳未満、または年齢3.5歳未満、または年齢4歳未満、または年齢4.5歳未満、または年齢5歳未満、または年齢5.5歳未満、または年齢6歳未満、または年齢6.5歳未満、または年齢7歳未満、または年齢7.5歳未満、または年齢8歳未満、または年齢8.5歳未満、または年齢9歳未満、または年齢9.5歳未満、または年齢10歳未満であってよい。一部の態様では、対象は年齢11歳未満、年齢12歳未満、年齢13歳未満、年齢14歳未満、年齢15歳未満、年齢20歳未満、年齢30歳未満、年齢40歳

未満、年齢50歳未満、年齢60歳未満、年齢70歳未満、年齢80歳未満、年齢90歳未満、年齢100歳未満、年齢110歳未満、または年齢120歳未満であってよい。一部の態様では、対象は年齢0.5歳未満であってよい。一部の態様では、対象は年齢4歳未満であってよい。一部の態様では、対象は年齢10歳未満であってよい。

【0161】

本明細書で開示した処置および防止の方法は、治療または防止のための患者を特定および選択するために適切な診断手法と組み合わせてよい。

【0162】

本開示は、宿主細胞を本明細書で開示したrAAVウイルスベクターのいずれか1つと接触させることを含む、宿主細胞中のタンパク質のレベルを増加させる方法を提供し、rAAVウイルスベクターは、タンパク質をコードするトランスジーン核酸分子を含む本明細書で開示したrAAVベクターのいずれか1つを含む。一部の態様では、タンパク質は治療用タンパク質である。一部の態様では、宿主細胞は*in vitro*、*in vivo*、または*ex vivo*である。一部の態様では、宿主細胞は対象由来である。一部の態様では、対象は正常な対象におけるタンパク質のレベルおよび/または機能と比較して低下したタンパク質のレベルおよび/または機能をもたらす障害に罹患している。

10

【0163】

一部の態様では、タンパク質のレベルは、宿主細胞中で約 1×10^{-7} ng、約 3×10^{-7} ng、約 5×10^{-7} ng、約 7×10^{-7} ng、約 9×10^{-7} ng、約 1×10^{-6} ng、約 2×10^{-6} ng、約 3×10^{-6} ng、約 4×10^{-6} ng、約 6×10^{-6} ng、約 7×10^{-6} ng、約 8×10^{-6} ng、約 9×10^{-6} ng、約 10×10^{-6} ng、約 12×10^{-6} ng、約 14×10^{-6} ng、約 16×10^{-6} ng、約 18×10^{-6} ng、約 20×10^{-6} ng、約 25×10^{-6} ng、約 30×10^{-6} ng、約 35×10^{-6} ng、約 40×10^{-6} ng、約 45×10^{-6} ng、約 50×10^{-6} ng、約 55×10^{-6} ng、約 60×10^{-6} ng、約 65×10^{-6} ng、約 70×10^{-6} ng、約 75×10^{-6} ng、約 80×10^{-6} ng、約 85×10^{-6} ng、約 90×10^{-6} ng、約 95×10^{-6} ng、約 10×10^{-5} ng、約 20×10^{-5} ng、約 30×10^{-5} ng、約 40×10^{-5} ng、約 50×10^{-5} ng、約 60×10^{-5} ng、約 70×10^{-5} ng、約 80×10^{-5} ng、または約 90×10^{-5} ngのレベルに増加している。

20

30

【0164】

本開示は、細胞を有効量の明細書で開示したrAAVウイルスベクターのうちいずれか1つと接触させることを含む、対象における細胞に目的の遺伝子を導入する方法を提供し、rAAVウイルスベクターは目的の遺伝子を含む本明細書で開示したrAAVベクターのうちいずれか1つを含む。

【0165】

本開示の方法の一部の態様では、対象には、本開示のrAAVベクターまたはrAAVウイルスベクターを投与することに加えて、予防的免疫抑制処置レジメンを施行することもできる。一部の態様では、免疫抑制処置レジメンには、少なくとも1つの免疫抑制治療剤を投与することが含まれる。免疫抑制治療剤の非限定的な例には、それだけに限らないが、シロリムス(ラパマイシン)、アセトアミノフェン、ジフェンヒドラミン、IVメチルプレドニソロン、プレドニソン、またはそれらの任意の組合せが含まれる。免疫抑制治療剤は、rAAVベクターおよび/もしくはrAAVウイルスベクターの投与の日に先立って、rAAVベクターおよび/もしくはrAAVウイルスベクターの投与と同じ日に、またはrAAVベクターおよび/もしくはrAAVウイルスベクターの投与の後の任意の日に、投与してよい。

40

【0166】

診断または処置の「対象」は、細胞または哺乳動物等の動物、またはヒトである。対象は特定の種に限定されず、限定なしに類人猿、ネズミ、ラット、イヌ、またはウサギ種を含む、診断または処置の対象となる非ヒト動物、および感染または動物のモデルの対象と

50

なるもの、ならびにその他の家畜、スポーツ動物、またはペットを含む。一部の態様では、対象はヒトである。

【0167】

本明細書で使用される場合、対象における疾患の「処置すること」または「処置」は、(1) 疾患を阻止しまたはその進行を阻むこと、または(2) 疾患もしくは疾患の症状を改善しまたはその退行を惹起することを指す。当技術で理解されているように、「処置」は、臨床的結果を含む有益なまたは望ましい結果を得るためのアプローチである。本技術の目的のため、有益なまたは望ましい結果には、検出可能であってもなくても、1つまたは複数の、それだけに限らないが、1つまたは複数の症状の緩和または改善、状態(疾患を含む)の程度の遞減、状態(疾患を含む)の状況の安定化(即ち、悪化しないこと)、状態(疾患を含む)の遅延または遅らせること、状態(疾患を含む)の進行、改善、または軽減、状況および寛解(部分的であっても全面的であっても)が含まれ得る。

10

【0168】

本明細書で使用される場合、「防止すること」または疾患の「防止」は、疾患に罹患しやすい、または疾患の症状がまだ表れていない対象における発生から症状または疾患を防止することを指す。

【0169】

本明細書で使用される場合、用語「有効量」および/または「治療有効量」とは、所望の効果を達成するのに十分な量を意味することを意図している。治療または予防の用途に関しては、有効量は、問題の状態の種類および重症度、ならびに個別の対象の特徴、たとえば一般的健康状態、年齢、性別、体重、および医薬組成物に対する忍容性に依存することになる。遺伝子治療に関しては、有効量は、対象において欠如している遺伝子の部分的または完全な機能の回復をもたらすために十分な量であってよい。一部の態様では、rAAVウイルスベクターの有効量は、GANポリペプチドが産生されるような対象における遺伝子の発現をもたらすために十分な量である。一部の態様では、有効量は、それを必要とする対象におけるガラクトースの代謝を増大させるために必要な量である。当業者であれば、これらのおよびその他の因子に応じて適切な量を決定することができよう。

20

【0170】

一部の態様では、有効量は、問題の用途の大きさおよび性質に依存することになる。これは標的の対象および使用する方法の性質および感受性に依存することにもなる。当業者であれば、これらのおよびその他の考慮に基づいて有効量を決定することができよう。有効量は、実施形態に応じた組成物の1つまたは複数の投与を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなり得る。

30

【0171】

本明細書で使用される場合、用語「投与する」または「投与」は、ヒトまたは動物等の対象への物質の送達を意味することを意図している。投与は、処置の経過を通して1つの用量で、連続的に、または間欠的に、達成することができる。最も有効な投与の手段および投薬量を決定する方法は当業者には既知であり、治療に用いる組成物、治療の目的、ならびに処置される対象の年齢、健康状態、または性別によって変動することになる。単一または多回の投与は、処置する臨床医またはペットおよびその他の動物の場合には処置する獣医によって選択される用量レベルおよびパターンで行なってよい。

40

【0172】

最も有効な投与の手段および投薬量を決定する方法は当業者には既知であり、治療に用いる組成物、治療の目的、ならびに処置される対象によって変動することになる。単一または多回の投与は、処置する臨床医によって選択される用量レベルおよびパターンで行なってよい。投薬量は投与の経路に影響されることが注意される。好適な投薬処方および薬剤を投与する方法は当技術で既知である。そのような好適な投薬量の非限定的な例は、投与あたり 10^9 ベクターゲノムの低い量から 10^{17} ベクターゲノムの高い量までであってよい。

【0173】

50

本明細書に記載した方法の一部の態様では、対象に投与されるウイルス粒子（たとえば r A A V ウイルスベクター）の数は、約 10^9 ~ 約 10^{17} の範囲である。一部の態様では、約 10^{10} ~ 約 10^{12} 、約 10^{11} ~ 約 10^{13} 、約 10^{11} ~ 約 10^{12} 、約 10^{11} ~ 約 10^{14} 、約 10^{12} ~ 約 10^{16} 、約 10^{13} ~ 約 10^{16} 、約 10^{14} ~ 約 10^{15} 、約 5×10^{11} ~ 約 5×10^{12} 、約 10^{11} ~ 約 10^{18} 、約 10^{13} ~ 約 10^{16} 、または約 10^{12} ~ 約 10^{13} 個のウイルス粒子が対象に投与される。

【0174】

本明細書に記載した方法の一部の態様では、対象に投与されるウイルス粒子（たとえば r A A V ウイルスベクター）の数は、少なくとも約 10^{10} 、または少なくとも約 10^{11} 、または少なくとも約 10^{12} 、または少なくとも約 10^{13} 、または少なくとも約 10^{14} 、または少なくとも約 10^{15} 、または少なくとも約 10^{16} 、または少なくとも約 10^{17} 個のウイルス粒子である。

10

【0175】

本明細書に記載される方法の一部の態様では、対象に投与されるウイルス粒子（たとえば、r A A V ウイルスベクター）の数は、約 3.5×10^{13} 個のウイルス粒子である。本明細書に記載される方法の一部の態様では、対象に投与されるウイルス粒子（たとえば、r A A V ウイルスベクター）の数は、約 3.5×10^{14} 個のウイルス粒子である。本明細書に記載される方法の一部の態様では、対象に投与されるウイルス粒子（たとえば、r A A V ウイルスベクター）の数は、約 3.5×10^{13} 個 ~ 約 3.5×10^{14} 個のウイルス粒子である。

20

【0176】

本明細書に記載した方法の一部の態様では、対象に投与されるウイルス粒子（たとえば r A A V ウイルスベクター）の数は対象の年齢に依存し得る。非限定的な例では、7歳またはそれ以上の年齢の対象には約 10×10^{14} 個のウイルス粒子を投与してよく、約4歳 ~ 約7歳の年齢の対象には約 10×10^{14} 個のウイルス粒子を投与してよく、約3歳 ~ 約4歳の年齢の対象には約 9×10^{14} 個のウイルス粒子を投与してよく、約2歳 ~ 約3歳の年齢の対象には約 8.2×10^{14} 個のウイルス粒子を投与してよく、約1歳 ~ 約2歳の年齢の対象には約 7.3×10^{14} 個のウイルス粒子を投与してよく、約0.5歳 ~ 約1歳の年齢の対象には約 4×10^{14} 個のウイルス粒子を投与してよく、約0.5歳未満の年齢の対象には 3×10^{14} 個のウイルス粒子を投与してよい。

30

【0177】

一部の態様では、組成物、医薬組成物中のウイルス粒子の量、または患者に投与されるウイルス粒子の量は、ウイルスゲノムを含むと予測されるウイルス粒子のパーセンテージに基づいて計算することができる。

【0178】

一部の態様では、本開示の r A A V ウイルスベクターは、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内または眼周囲、経口、経直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、脳槽内、神経内、胸膜内、局所、リンパ内、脳槽内で対象に導入してよい。そのような導入は、動脈内、心臓内、脳室下、硬膜外、大脳内、脳室内、網膜下、硝子体内、関節内、腹腔内、子宮内、神経内、またはそれらの任意の組合せであってもよい。一部の態様では、ウイルス粒子は所望の標的組織に、たとえば非限定的な例として、肺、眼、または CNS に送達される。一部の態様では、ウイルス粒子の送達は全身的である。脳槽内の投与経路には、脳室の脳脊髄液への薬物の直接投与が含まれる。これは、大槽への直接注射または永久的に位置したチューブによって実施し得る。一部の態様では、本開示の r A A V ウイルスベクターは髄腔内に投与される。

40

【0179】

一部の態様では、本開示の r A A V ウイルスベクターは、対象における遺伝子欠損を修復する。一部の態様では、成功裡に処理された細胞、組織、器官、または対象における修復された標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの修復されていない標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとの比は、少なくとも約 1.5 : 1、約 2 : 1、約 3 : 1、約 4

50

：1、約5：1、約6：1、約7：1、約8：1、約9：1、約10：1、約20：1、約50：1、約100：1、約1000：1、約10,000：1、約100,000：1、または約1,000,000：1である。修復された標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの量または比は、ウェスタンブロット、ノーザンブロット、サザンブロット、PCR、シーケンシング、マススペクトル、フローサイトメトリー、免疫組織化学、免疫蛍光、*in situ*ハイブリダイゼーションにおける蛍光、次世代シーケンシング、イムノブロット、およびELISAを含むがそれらに限らない当技術で既知の任意の方法によって決定することができる。

【0180】

本開示のrAAVベクター、rAAVウイルスベクター、組成物、または医薬組成物の投与は、処置の経過を通して1つの用量で、連続的に、または間欠的に、達成することができる。一部の態様では、本開示のrAAVベクター、rAAVウイルスベクター、組成物、または医薬組成物は、注射、注入、または移植によって非経口的に投与される。

10

【0181】

一部の態様では、本開示のrAAVウイルスベクターは、脳および頸椎に増進された向性を示す。一部の態様では、本開示のrAAVウイルスベクターは、血液脳関門(BBB)を通過することができる。

【0182】

製造方法

本開示のrAAVウイルスベクターを産生するために種々のアプローチを用い得る。一部の態様では、ヘルパーウイルスまたはヘルパープラスミドおよび細胞株を用いることによって、パッケージングが達成される。ヘルパーウイルスまたはヘルパープラスミドは、ウイルスベクターの産生を容易にするエレメントおよび配列を含んでいる。別の態様では、ヘルパープラスミドはパッケージング細胞株のゲノムの中に安定に組み込まれ、それによりパッケージング細胞株はヘルパープラスミドによるさらなるトランスフェクションを必要としない。

20

【0183】

一部の態様では、細胞はパッケージング細胞株またはヘルパー細胞株である。一部の態様では、ヘルパー細胞株は真核細胞、たとえばHEK293細胞または293T細胞である。一部の態様では、ヘルパー細胞は酵母細胞または昆虫細胞である。

30

【0184】

一部の態様では、細胞はテトラサイクリンアクチベータータンパク質をコードする核酸、およびテトラサイクリンアクチベータータンパク質の発現を制御するプロモーターを含む。一部の態様では、テトラサイクリンアクチベータータンパク質の発現を制御するプロモーターは、構造的プロモーターである。一部の態様では、プロモーターはホスホグリセレートキナーゼプロモーター(PGK)またはCMVプロモーターである。

【0185】

ヘルパープラスミドはたとえば、複製能のあるAAVを産生せず、複製能のないAAVをパッケージングするためおよび複製能のないAAVをパッケージングすることができるビリオンタンパク質を高いタイターで産生するために必要なトランスオールビリオンタンパク質をコードする複製能のないウイルスゲノムから誘導された少なくとも1つのウイルスヘルパーDNA配列を含み得る。

40

【0186】

AAVをパッケージングするためのヘルパープラスミドは当技術で既知であり、たとえば参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2004/0235174A1号を参照されたい。そこで述べられているように、AAVヘルパープラスミドはヘルパーウイルスとしてDNA配列、非限定的な例としてそれぞれの元のプロモーターまたは異種プロモーターによって制御されるAd5遺伝子E2A、E4、およびVAを含み得る。AAVヘルパープラスミドは、所望の標的細胞のトランスフェクションの単純な検出を可能にするために、蛍光タンパク質等のマーカータンパク質の発現のための発現カセットをさ

50

らに含んでよい。

【0187】

本開示は、パッケージング細胞株を本明細書で開示したAAVヘルパープラスミドのいずれか1つおよび本明細書で開示したrAAVベクターのいずれか1つでトランスフェクトすることを含む、rAAVウイルスベクターを産生する方法を提供する。一部の態様では、AAVヘルパープラスミドとrAAVベクターはパッケージング細胞株に共同トランスフェクトされる。一部の態様では、細胞株は哺乳動物細胞株、たとえばヒト胚性腎（HEK）293細胞株である。本開示は、本明細書で開示したrAAVベクターおよび/またはrAAVウイルスベクターのいずれか1つを含む細胞を提供する。

【0188】

本明細書で使用される場合、ウイルスまたはプラスミドに関連する用語「ヘルパー」は、本明細書に記載したrAAVベクターのいずれか1つの複製およびパッケージングのために必要なさらなる成分を提供するために用いられるウイルスまたはプラスミドを指す。ヘルパーウイルスによってコードされる成分は、ピリオンのアセンブリー、カプシド封入、ゲノムの複製、および/またはパッケージングのために必要な任意の遺伝子を含み得る。たとえば、ヘルパーウイルスまたはプラスミドは、ウイルスゲノムの複製のための必要な酵素をコードし得る。AAV構築物とともに用いるために好適なヘルパーウイルスおよびプラスミドの非限定的な例には、pHELP（プラスミド）、アデノウイルス（ウイルス）、またはヘルペスウイルス（ウイルス）が含まれる。一部の態様では、pHELPプラスミドはpHELPKプラスミドであってよく、この場合はアンピシリン発現カセットがカナマイシン発現カセットに交換される。

【0189】

本明細書で使用される場合、パッケージング細胞（またはヘルパー細胞）は、ウイルスベクターを産生するために用いられる細胞である。組み換えAAVウイルスベクターの産生には、トランスで提供されるRepおよびCapタンパク質、ならびにAAVの複製を助けるアデノウイルス由来の遺伝子配列が必要である。一部の態様では、パッケージング/ヘルパー細胞が、細胞のゲノムの中に安定に組み込まれるプラスミドを含む。他の態様では、パッケージング細胞は過渡的にトランスフェクトされ得る。典型的には、パッケージング細胞は真核細胞、たとえば哺乳動物細胞または昆虫細胞である。

【0190】

キット

本明細書に記載した単離されたポリヌクレオチド、rAAVベクター、rAAVウイルスベクター、組成物、および/または医薬組成物は、治療、診断、または研究の用途におけるその使用を容易にするために、医薬用または診断用または研究用のキットにアセンブルしてよい。一部の態様では、本開示のキットは、本明細書に記載したように、単離されたポリヌクレオチド、rAAVベクター、rAAVウイルスベクター、組成物、医薬組成物、宿主細胞、単離された組織のいずれか1つを含む。

【0191】

一部の態様では、キットは使用説明書をさらに含む。具体的には、そのようなキットは、本明細書に記載した1つまたは複数の薬剤を、これらの薬剤の意図された用途および正しい使用を記載した説明書とともに含んでよい。一部の態様では、キットは、キットの1つもしくは複数の成分を混合し、および/または試料を単離し混合して対象に適用するための説明書を含んでよい。一部の態様では、キット中の薬剤は医薬製剤中にあり、特定の用途および薬剤の投与の方法に適した投薬量である。研究目的用のキットは、種々の実験を行なうために適切な濃度または量で成分を含み得る。

【0192】

キットは、本明細書に記載した方法の使用を容易にするように設計され、多くの形態を取ることができる。キットの成分のそれぞれは、適用できる場合には、液体形態（たとえば溶液中）または固体形態（たとえば乾燥粉末）で提供され得る。ある特定の例では、組成物のいくつかは、たとえば、キットとともに提供されてもよく提供されなくてもよい好

10

20

30

40

50

適な溶媒または他の種（たとえば、水または細胞培養培地）によって再構成または他の方法で処理（たとえば活性形に）することができる。一部の態様では、組成物は保存溶液（たとえば凍結保存溶液）中で提供され得る。保存溶液の非限定的な例には、DMSO、パラホルムアルデヒド、およびCryosstor（登録商標）（Stem Cell Technologies社, Vancouver, Canada）が含まれる。一部の態様では、保存溶液はある量のメタロプロテアーゼ阻害剤を含む。

【0193】

一部の態様では、キットは、本明細書に記載した成分のいずれか1つまたは複数、1つまたは複数の容器中に含む。即ち、一部の態様では、キットは、本明細書に記載した薬剤を収容する容器を含み得る。薬剤は液体、ゲル、または固体（粉末）の形態であってもよい。薬剤は無菌的に調製され、シリンジに包装され、冷蔵で出荷され得る。あるいは、保存のために薬剤をバイアルまたはその他の容器中に収容してもよい。第2の容器が無菌的に調製された他の薬剤を有してもよい。あるいは、キットは、事前に混合され、シリンジ、バイアル、チューブ、またはその他の容器中で出荷された活性薬剤を含んでよい。キットは、対象に薬剤を投与するために必要な部品、たとえばシリンジ、局所適用デバイス、またはIVニードルチューブおよびバッグの1つもしくは複数または全てを有してよい。

10

【0194】

さらなる定義

文脈によって他が指示されない限り、本明細書に記載した本発明の種々の特徴は任意の組合せで用いることができることが特に意図されている。さらに、本開示は、一部の態様で、本明細書で説明した任意の特徴または特徴の組合せを除外または削除してよいことも意図している。説明のため、複合体が成分A、B、およびCを含むと明細書で述べている場合には、A、B、もしくはCのいずれか、またはそれらの組合せを、単独でまたは任意の組合せで削除または放棄してよいことが特に意図されている。

20

【0195】

他に明示的に示さない限り、全ての特定した態様、実施形態、特徴、および用語は、引用した態様、実施形態、特徴、または用語と、その生物学的等価物の両方を含むことが意図されている。

【0196】

本技術の実施には、他に指示がない限り、当技術の技能の範囲内にある有機化学、薬理学、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組み換えDNAの従来手法が採用されることになる。たとえばSambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版(1989); Current Protocols In Molecular Biology (F. M. Ausubelら編, (1987)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. HamesおよびG. R. Taylor編(1995)), HarlowおよびLane編, (1988) Antibodies, a Laboratory Manual, およびAnimal Cell Culture (R. I. Freshney編, (1987))を参照されたい。

30

40

【0197】

本明細書で使用される場合、用語「含む」は、組成物および方法が引用した要素を含むが、他を排除しないことを意味することを意図している。本明細書で使用される場合、移行句「実質的に～からなる」（および文法的変形）は、引用した材料またはステップ、および引用した実施形態の基礎的かつ新規な特徴に実質的に影響しない材料またはステップを包含すると解釈すべきである。即ち、本明細書で使用される用語「実質的に～からなる」は、「含む」と等価であると解釈するべきではない。「からなる」は、他の成分および本明細書で開示した組成物を投与するための実質的な方法ステップの微量を超える要素を

50

排除することを意味する。これらの移行句のそれぞれによって定義される態様は、本開示の範囲内である。本明細書におけるそれぞれの例において、用語「含む」、「実質的に～からなる」、および「からなる」のいずれも、それらの元の意味を保持したままで他の2つの句によって置き換えることができる。本明細書に記載したいずれの単一の用語、単一の要素、単一の句、用語の群、または要素の群は、特許請求の範囲からそれぞれ具体的に除外され得る。

【0198】

全ての数値指定、たとえば範囲を含むpH、温度、時間、濃度、および分子量は、必要に応じて1.0または0.1の増分で、あるいは±15%、10%、5%、2%の変動で、(+)または(-)に変動する近似である。常に明示的に述べてはいないが、全ての数値指定には、用語「約」が先行していることを理解されたい。常に明示的に述べてはいないが、本明細書に記載した試薬は単に例示的なものであり、その等価物が当技術で既知であることも理解されたい。量または濃度その他の測定可能な値に言及する場合に本明細書で使用される用語「約」は、特定した量の20%、10%、5%、1%、0.5%、または0.1%でさえもの変動を包含することを意味している。

10

【0199】

用語「許容される」、「有効な」、または「十分な」は、本明細書で開示した任意の成分、範囲、用量形態、その他の選択を記載するために使用される場合には、前記の成分、範囲、用量形態、その他が開示した目的に適していることを意図している。

【0200】

また、本明細書で使用される場合、「および/または」は、関連する列挙した項目の1つまたは複数のあらゆる可能な組合せ、ならびに選択肢(「または」)で説明される場合には組合せの欠如を指し、包含する。

20

【0201】

具体的に引用しない限り、用語「宿主細胞」は、たとえば真菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む真核生物宿主細胞を含む。真核生物宿主細胞の非限定的な例には、類人猿、ウシ、ブタ、ネズミ、ラット、鳥類、爬虫類、およびヒト、たとえばHEK293細胞および293T細胞が含まれる。

【0202】

本明細書で使用される用語「単離された」は、実質的に他の材料を含まない分子または生物製剤または細胞材料を指す。

30

【0203】

本明細書で使用される場合、用語「核酸配列」および「ポリヌクレオチド」は相互交換可能に使用され、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである任意の長さのヌクレオチドのポリマーの形態を指す。即ち、この用語には、それだけに限らないが、一本鎖、二本鎖、もしくは多数鎖のDNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、あるいはプリンおよびピリミジン塩基またはその他の天然の、化学的もしくは生化学的に改変された、非天然の、または誘導されたヌクレオチド塩基を含むか、実質的にそれらからなるか、またはそれらからなるポリマーが含まれる。

【0204】

「遺伝子」は、特定のポリペプチドまたはタンパク質をコードすることができる少なくとも1つのオープンリーディングフレーム(ORF)を含むポリヌクレオチドを指す。「遺伝子産物」あるいは「遺伝子発現産物」は、遺伝子が転写され翻訳された際に生成するアミノ酸配列(たとえばペプチドまたはポリペプチド)を指す。

40

【0205】

本明細書で使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写される2ステップのプロセスおよび/または転写されたmRNAが引き続いてペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAから誘導される場合には、発現は真核細胞内におけるmRNAのスプライシングを含み得る。

50

【0206】

「転写の制御下」は当技術でよく理解されている用語であり、ポリヌクレオチド配列、通常DNA配列の転写が、転写の開始に寄与するか、または転写を促進するエレメントに作動可能に連結されていることに依存していることを示す。「作動可能に連結されている」は、ポリヌクレオチドが細胞中において機能することを可能にする様式で配置されていることを意図している。一態様では、プロモーターは下流配列に作動可能に連結されていてよい。

【0207】

用語「コードする」は、それがポリヌクレオチドおよび/または核酸配列に適用される場合には、その塩基配列が、ポリペプチドおよび/またはその断片に翻訳されるRNA転写物（たとえば、mRNA転写物）の塩基配列と同一であるならば、ポリペプチドを「コードしている」と称されるポリヌクレオチドおよび/または核酸配列を指す。アンチセンス鎖はそのような核酸の相補体であり、コードする配列はそれから推測することができる。

10

【0208】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」は相互交換可能に使用され、その最も広い意味においてアミノ酸、アミノ酸アナログ、またはペプチド模倣体の2つ以上のサブユニットの化合物を指す。サブユニットはペプチド結合で連結されていてよい。別の態様では、サブユニットは他の結合、たとえばエステル、エーテル、その他で連結されていてよい。タンパク質またはペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなるアミノ酸の最大の数には制限はない。本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸」は、グリシンおよびDとLの両方の光学異性体、アミノ酸アナログ、およびペプチド模倣体を含む、天然および/または非天然、または合成のアミノ酸を指す。

20

【0209】

本明細書で使用される場合、用語「シグナルペプチド」または「シグナルポリペプチド」は、新たに合成された分泌性または膜のポリペプチドまたはタンパク質のN末端に通常存在するアミノ酸配列を意図している。これはポリペプチドを特定の細胞内位置に、たとえば細胞膜を横切って、細胞膜の中に、または核の中に、指向するように作用する。一部の態様では、シグナルペプチドは局在化の後で除去される。シグナルペプチドの例は当技術で公知である。非限定的な例としては、米国特許第8,853,381号、第5,958,736号、および第8,795,965号に記載されたものがある。一部の態様では、シグナルペプチドはIDUAシグナルペプチドであってよい。

30

【0210】

用語「等価」または「生物学的等価」は、特定の分子、生物学的材料、または細胞材料に言及する場合には、相互交換可能に使用され、最小の相同性を有しながらそれでも所望の構造または機能性を維持している特定の分子、生物学的材料、または細胞材料を意図している。等価のポリペプチドの非限定的な例には、参照ポリペプチド（たとえば野生型ポリペプチド）と少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%の同一性、もしくは少なくとも約99%の同一性を有するポリペプチド、または参照ポリヌクレオチド（たとえば野生型ポリヌクレオチド）と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約97%の配列同一性、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドでコードされるポリペプチドが含まれる。

40

【0211】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチドの間、または2つの核酸分子の間の配列類似性を指す。同一性パーセントは、比較の目的でアラインさせたそれぞれの配列において位置を比較することによって決定することができる。比較した配列中のある位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合には、それらの分子

50

はその位置において同一である。配列の間の同一性の程度は、それらの配列によって共有される一致した位置の数の関数である。「無関係な」または「非相同性」配列は、本開示の配列の1つと40%未満の同一性、25%未満の同一性を共有している。アラインメントおよび配列同一性パーセントは、前記核酸またはアミノ酸の配列をClustalW (<https://genome.jp/tools-bin/clustalw/>で入手可能)にインポートし、これを用いることによって、本明細書で提供した核酸またはアミノ酸の配列について決定することができる。たとえば、本明細書で見出したタンパク質配列アラインメントを実施するために用いたClustalWパラメーターは、Gonnet (タンパク質について)重みマトリックスを用いて生成した。一部の態様では、本明細書で見出した核酸配列を用いて核酸配列アラインメントを実施するために用いたClustalWパラメーターは、ClustalW (DNAについて)重みマトリックスを用いて生成される。

10

【0212】

本明細書で使用される場合、アミノ酸の改変は、アミノ酸の置換、アミノ酸の欠失、またはアミノ酸の挿入であってよい。アミノ酸の置換は、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換であってよい。保存的置き換え(保存的変異、保存的置換、または保存的変形とも呼ばれる)は、所与のアミノ酸を同様の生化学的特性(たとえば電荷、疎水性、または大きさ)を有する異なるアミノ酸に変更する、タンパク質中のアミノ酸の置き換えである。本明細書で使用される場合、「保存的変形」は、アミノ酸残基の、別の生物学的に同様の残基による置き換えを指す。保存的変形の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン、もしくはメチオニン等の1つの疎水性残基の別の残基への置換、または1つの荷電したもしくは極性の残基の別の残基への置換、たとえばアルギニンのリジンへの、グルタミン酸のアスパラギン酸への、グルタミンのアスパラギン酸への置換、その他が含まれる。保存的置換のその他の説明的な例には、アラニンからセリン、アスパラギン酸からグルタミンもしくはヒスチジン、アスパラギン酸からグルタミン酸、システインからセリン、グリシンからプロリン、ヒスチジンからアスパラギン酸もしくはグルタミン、リジンからアルギニン、グルタミン、もしくはグルタミン酸、フェニルアラニンからチロシン、セリンからスレオニン、スレオニンからセリン、トリプトファンからチロシン、チロシンからトリプトファンもしくはフェニルアラニン、その他の変更が含まれる。

20

【0213】

本明細書で開示したポリヌクレオチドは、遺伝子送達ベヒクルを用いて細胞または組織に送達することができる。本明細書で使用される「遺伝子送達」、「遺伝子移送」、「形質導入」等は、導入のために用いられる方法に関わらず、外因性ポリヌクレオチド(時には「トランスジーン」と称される)の宿主細胞への導入を指す用語である。そのような方法には、種々の周知の手法、たとえばベクター媒介遺伝子移送(たとえばウイルス感染/トランスフェクション、またはその他の種々のタンパク質系もしくは脂質系の遺伝子送達複合体による)、ならびに「裸の」ポリヌクレオチドの送達を容易にする手法(たとえばエレクトロポレーション、「遺伝子銃」送達、およびポリヌクレオチドの導入のために用いられる他の種々の手法)が含まれる。導入されたポリヌクレオチドは、安定的または過渡的に宿主細胞中に維持され得る。安定的な維持には、典型的には導入されたポリヌクレオチドが宿主細胞に適合する複製の起点を含むか、または宿主細胞のレプリコン、たとえば染色体外レプリコン(たとえばプラスミド)、または核もしくはミトコンドリアの染色体に統合されることが必要である。当技術において既知で本明細書に記載しているように、いくつかのベクターが遺伝子の哺乳動物細胞への移送を媒介することができることが知られている。

30

40

【0214】

「プラスミド」は、典型的には染色体DNAとは離れていて独立にこれを複製することができるDNA分子である。多くの例で、これは環状で二本鎖である。プラスミドは微生物の集団の中で水平的遺伝子移送のための機構を提供し、典型的には所与の環境状況の下で選択的な利点を提供する。プラスミドは競争的な環境的地位において天然産生の抗生物

50

質に対する耐性を提供する遺伝子を運搬し、あるいは産生されたタンパク質が同様の状況の下で毒素として作用し得る。プラスミドベクターは染色体外環状DNA分子として存在することが多い一方、プラスミドベクターはランダムにまたは標的とされた様式で宿主染色体中に安定的に統合されるようにも設計され、そのような統合は環状プラスミドまたは宿主細胞への導入の前に線状化されたプラスミドを用いて達成できることが当技術で知られている。

【0215】

遺伝子操作で用いられる「プラスミド」は「プラスミドベクター」と呼ばれる。そのような使用のために多くのプラスミドが市販されている。複製されるべき遺伝子は、細胞を特定の抗生物質に対して耐性にする遺伝子を含むプラスミドのコピー、およびいくつかの一般に用いられる制限部位を含み、この位置におけるDNA断片の挿入を容易にする短い領域である多重クロニング部位(MCSまたはポリリンカー)の中に挿入される。プラスミドの別の主要な用途は、大量のタンパク質を作成することである。この場合には、目的の遺伝子を有するプラスミドを含む細菌または真核細胞が研究者によって増殖され、これらは、挿入された遺伝子から大量のタンパク質が産生されるように誘起することができる。

10

【0216】

遺伝子移送がアデノウイルス(Ad)またはアデノ随伴ウイルス(AAV)等のDNAウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物は、ウイルスゲノムまたはその部分、およびトランスジーンを含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなるポリヌクレオチドを指す。

20

【0217】

用語「組織」は、生きているもしくは死亡した生命体の組織または生きているもしくは死亡した生命体から誘導されもしくはこれを模倣するように設計された任意の組織を指すために本明細書において使用される。組織は健康であっても、疾患を有していても、および/または遺伝的変異を有していてもよい。生物学的組織は、任意の単一の組織(たとえば相互に連結されていてもよい細胞の集合)または生命体の身体の器官もしくは部分もしくは領域を構成する組織の群を含み得る。組織は、均一な細胞材料を含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなるとよく、またはたとえば肺組織、骨格組織、および/または筋肉組織を含み得る胸部を含む身体の領域において見出されるようなコンポジット構造であってもよい。例示的な組織には、それだけに限らないが、肝、肺、甲状腺、皮膚、脾、血管、膀胱、腎、脳、胆道系、十二指腸、腹部大動脈、腸骨静脈、心臓、および腸から誘導された組織が含まれ、それらの任意の組合せが含まれ得る。

30

【実施例】

【0218】

実施例1 - 迷走神経を介する遺伝子療法の投与は、自律神経系において外因性タンパク質の発現をもたらす

【0219】

下記の非限定的な実施例は、迷走神経を介するrAAVウイルスベクターの投与は、自律神経系において外因性タンパク質の発現をもたらすことを実証する。

40

【0220】

GFPレポータータンパク質をコードする核酸配列を含むAAV9ウイルスベクターを、ラットの左迷走神経中に注射した。次にGFP発現を、蛍光顕微鏡検査を介して評価した。図1に示すように、GFP発現が、迷走神経(図1において矢印により示される)、迷走神経の背側運動核(図1においてアステリクスにより示される)、および疑核(図1において星型により示される)を含む、中枢神経系および末梢神経系に連結する迷走神経回路内に観察された。これらの結果は、迷走神経を介する遺伝子療法、たとえばrAAVウイルスベクター等の投与が、遺伝子療法が対象の自律神経系を効率的に標的とするようにし、これにより外因性のタンパク質および/または核酸の発現を可能にするのに使用され得ることを示す。

50

【 0 2 2 1 】

実施例 2 - 迷走神経を介する遺伝子療法の投与は、該遺伝子療法に対して事前免疫化された対象においてさえも外因性タンパク質の発現をもたらす。

【 0 2 2 2 】

下記の非限定的な実施例は、迷走神経を介する r A A V ウイルスベクターの投与は、r A A V ウイルスベクターに対して事前免疫化された（即ち、r A A V ウイルスベクターに対する中和抗体を有し、および/または同じ血清型を有する A A V 粒子に対して血清陽性である）対象においてさえも、外因性タンパク質の発現をもたらすことを実証する。

【 0 2 2 3 】

第 1 の実験において、ラットを、ギガキソニン（G A N）ポリペプチドをコードする核酸を含む A A V 9 ウイルスベクターの髄腔内注射により、A A V 9 ウイルスベクターに対して事前免疫化した。引き続き、ラットには、G F P レポータータンパク質をコードする核酸を含む A A V 9 ウイルスベクターを、左迷走神経中への注射を介して投与した。次に G F P 発現を解析した。図 2 に示すように、強い G F P 発現が、左節上神経節の神経細胞体（図 2 の左側パネル）および左頸部迷走神経線維（図 2 の右側パネル）を含む末梢神経系において観察された。

10

【 0 2 2 4 】

第 2 の実験では、ラットを、未処置（以後「非免疫化ラット」と称する）のままとするか、または A A V 9 ウイルスベクターの髄腔内発現により、A A V 9 ウイルスベクターに対して事前免疫化した（以後「免疫化ラット」と称する）。引き続き、左迷走神経中への注射を介して、G F P レポータータンパク質をコードする核酸を含む A A V 9 ウイルスベクターをラットに投与した。次に G F P 発現を解析した。図 3 に示すように、迷走神経の背側運動核（図 3 において「D M N X」として示される）および孤束核（図 3 において「S o l N l a t」として示される）における発現を含む、強い G F P 発現が、事前免疫化されたラット（右側パネル）においてさえも観察された。

20

【 0 2 2 5 】

これらの結果は、A A V 粒子の特定の血清型に対して中和抗体を有し得る（たとえば、A A V に基づく遺伝子療法がこれまでに投与されたことに起因して）対象において、迷走神経を介して引き続く A A V に基づく遺伝子療法を投与することで、処置の中和を回避し、そして外因性タンパク質の発現を効果的に推進することができることを実証する。

30

【 0 2 2 6 】

実施例 3 - 迷走神経を介する遺伝子療法の投与は、巨大軸索ニューロパチーのラットモデルにおいて自律神経機能不全を効果的に処置する

【 0 2 2 7 】

下記の非限定的な実施例は、迷走神経中への注射を介する r A A V ウイルスベクターの投与は、巨大軸索ニューロパチー、より具体的には、巨大軸索ニューロパチーに付随する自律神経機能不全を効果的に処置することができることを実証する。

【 0 2 2 8 】

下記の実験において、巨大軸索ニューロパチーのラットモデルを試験した。巨大軸索ニューロパチーのラットモデルは、突然変異 G A N ポリペプチドをコードする遺伝子をラットに導入することにより確立した。このラットを、本明細書では G A N ノックイン（K I）ラットと称する。

40

【 0 2 2 9 】

月齢 4 か月のときに、G A N K I ラットを、a) 媒体対照を用いて処置し（以後「G A N K I」）；b) G A N ポリペプチドをコードする核酸を含む A A V 9 ウイルスベクター（A A V 9 / G A N）を用いて、髄腔内注射を介して処置し（以後「G A N K I I T」）；または c) 髄腔内注射を介しおよび左迷走神経中への注射を介する両経路で投与される A A V 9 / G A N を用いて処置した（以後「G A N K I I T + V N」）。月齢 20 か月の時に、次にラットに 1 m g / k g ピロカルピンの腹腔内注射を施し、そして自律神経機能に付随する生理学的応答を、ラットに移植された無線テレメトリーデバイス

50

を使用して記録した。この解析の結果を図4に示す。

【0230】

図4に示すように、ピロカルピン処置が負荷された場合、対照ラットと比較して、GAN KIラットは、呼吸(図4の左側パネル)、血圧(図4の中央パネル)、および心拍数(図4の右側パネル)について異常な自律神経応答制御を示した。対照的に、AAV9/GANをIT経路のみ(GAN KI IT)で送達したとき、呼吸および血圧が改善した。AAV9/GANのIT+VN複合式の送達(GAN KI IT+VN)では、対照(野生型ラット)と比較して、IT単独よりも優れた有効性を示し、呼吸、血圧、および心拍数応答が正常化した。1処置群当たり、対照ラット4例を解析し、またGAN KIラット5例を解析した。

10

【0231】

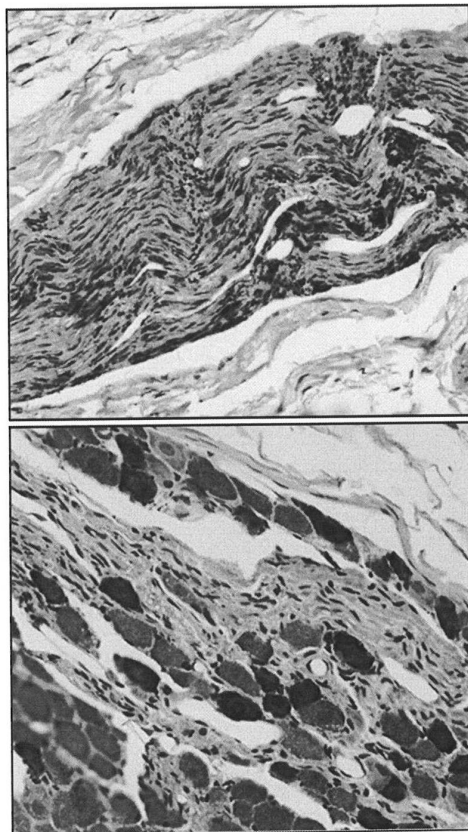
これらの結果は、迷走神経中への注射を介して、GANポリペプチドをコードする核酸を含むrAAVウイルスベクターを投与することで、迷走神経を介する投与がrAAVウイルスベクターの髄腔内投与と併用される場合を含め、巨大軸索ニューロパチー、より具体的には、巨大軸索ニューロパチーに付随する自律神経機能不全を効果的に処置することができることを実証する。

【図面】

【図1】



【図2】



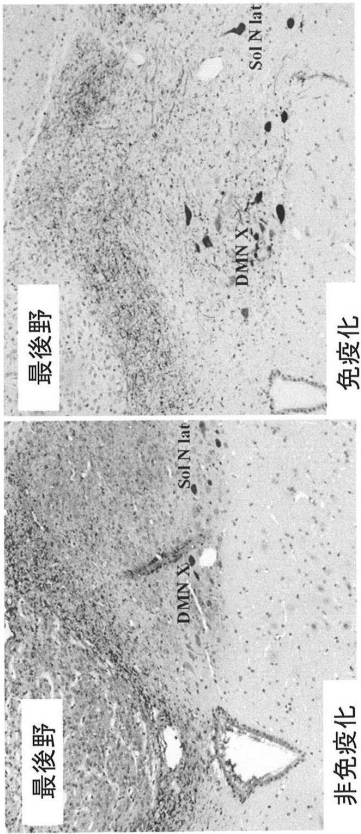
20

30

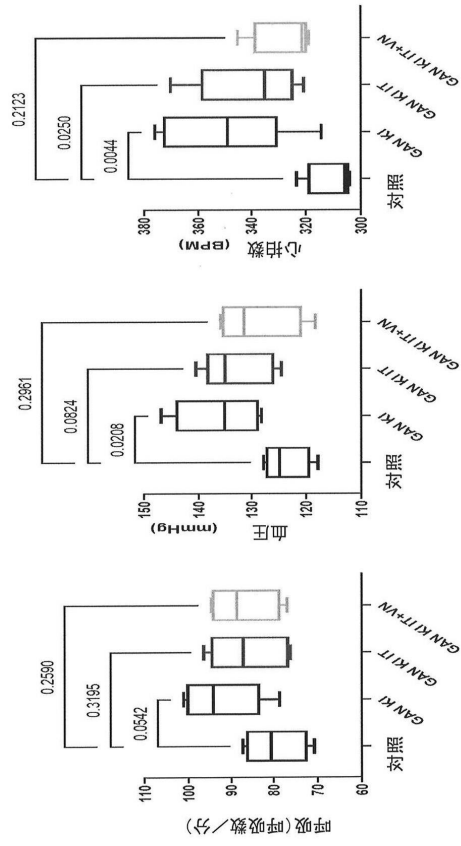
40

50

【 図 3 】



【 図 4 】



10

20

30

40

50

【 配列表 】

2023522883000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/027268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - A61K 9/00; A61K 48/00; A61M 1/34; A61M 1/36; A61M 5/14; C12N 7/00; C12N 15/86 (2021.01)
 CPC - A61K 9/0019; A61K 48/0075; A61K 48/0083; A61M 1/3486; A61M 1/362; A61M 1/3679 (2021.05)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 see Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2018/0193414 A1 (CODA BIOTHERAPEUTICS, INC.) 12 July 2018 (12.07.2018) entire document	1, 3-6, 16-20 2, 7-9, 11, 12, 15, 21
Y	US 2014/0213842 A1 (ELECTROCORE, LLC) 31 July 2014 (31.07.2014) entire document	2
Y	TAGHIAN et al. "A Safe and Reliable Technique for CNS Delivery of AAV Vectors in the Cisterna Magna," Molecular Therapy, 15 November 2019 (15.11.2019), Vol. 28, Iss. 2, Pgs. 411-421. entire document	7
Y	US 2014/0336128 A1 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 13 November 2014 (13.11.2014) entire document	8, 9, 11, 12, 15
Y	US 2016/0331846 A1 (NEW HOPE RESEARCH FOUNDATION) 17 November 2016 (17.11.2016) entire document	11
Y	US 2007/0292922 A1 (FANG et al) 20 December 2007 (20.12.2007) entire document	12
Y	US 2019/0269800 A1 (UNIQUE IP B.V.) 05 September 2019 (05.09.2019) entire document	21

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
27 July 2021

Date of mailing of the international search report
SEP 17 2021

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
Harry Kim

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/027266

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1, 3, and 8-10 were searched.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/06 (2006.01)	A 6 1 P 13/06	
A 6 1 P 13/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 森田 裕

(74)代理人 100162503

弁理士 今野 智介

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(74)代理人 100204582

弁理士 大栗 由美

(72)発明者 ベイリー, レイチェル, エム.

アメリカ合衆国 7 6 2 6 2 テキサス州, トロフィー クラブ, インディアン クリーク ドライヴ
5 5 8

(72)発明者 グレイ, スティーヴン, ジェイ.

アメリカ合衆国 7 6 0 9 2 テキサス州, サウスレイク, ティンバー レイク ドライヴ 5 1 8

F ターム (参考) 4B065 AA95X AB01 AC14 BA01 CA24 CA44

4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 MA52 MA55 MA56
MA58 MA59 MA60 MA66 ZA01 ZA06 ZA24 ZA29 ZA36 ZA43 ZA59
ZA66 ZA81 ZA94 ZB21

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA52 MA55 MA56 MA58 MA59 MA60
MA66 NA14 ZA01 ZA06 ZA24 ZA29 ZA36 ZA43 ZA59 ZA66 ZA81
ZA94 ZB21