(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-543253
(P2024-543253A)
(43)公表日　令和6年11月20日(2024.11.20)

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/12 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/12 | ＺＮＡ | ４Ｂ０６５ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/63 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/63 | Ｚ | ４Ｃ０８４ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/864 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/864 | １００Ｚ | ４Ｃ０８７ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/10 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/10 | | ４Ｈ０４５ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/0793(2010.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/0793 | | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全24頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-527624(P2024-527624)
(86)(22)出願日　令和4年11月11日(2022.11.11)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月31日(2024.5.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/079756
(87)国際公開番号　WO2023/086966
(87)国際公開日　令和5年5月19日(2023.5.19)
(31)優先権主張番号　63/278,905
(32)優先日　令和3年11月12日(2021.11.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(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,AT,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

(71)出願人　515289842
リサーチ インスティチュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０５，コロンバス， チルドレンズ ドライブ ７００， ルーム ダブリュー１７２
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田 誠
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田 博宣
(74)代理人　100142907
弁理士　本田 淳
(74)代理人　100152489
弁理士　中村 美樹
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＳＬＣ６Ａ１遺伝子治療のための材料及び方法

(57)【要約】
本開示は、例えば、小児てんかんの脳造影に見られるような欠陥のあるＳＬＣ６Ａ１遺伝子に起因する、起電性ナトリウム及びクロライド結合γアミノ酪酸トランスポーター（ＧＡＴ－１）タンパク質の必要性に関連する状態の治療方法に関する。具体的には、本開示は、ＧＡＴ－１タンパク質の発現の喪失及び／又はＧＡＴ－１タンパク質レベルの低下を特異的に治療するための遺伝子治療ベクターを提供する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＧＡＴ－１タンパク質のＧＡＢＡトランスポーター活性を必要とする対象に、ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードする導入遺伝子を送達する方法であって、
前記方法が、脳室内注射、大槽内注射、腰椎髄腔内注射によって、又は静脈内送達によって、前記導入遺伝子を含む遺伝子治療ベクターを対象の脳脊髄液に投与することを含み、
前記導入遺伝子が、ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードする、配列番号１のポリヌクレオチド、又は配列番号１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のポリヌクレオチドを含むか、あるいは、前記導入遺伝子が、ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードする、配列番号３、４、５、６、７、若しくは８のポリヌクレオチド、又は配列番号３、４、５、６、７、若しくは８と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のポリヌクレオチドを含む、方法。
【請求項２】
前記対象が、少なくとも１つの欠陥のあるＳＬＣ６Ａ１対立遺伝子を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記導入遺伝子が、前記対象のニューロン若しくは星状細胞、又はそれらの両方に送達される、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記投与により、前記対象における発作、認知発達障害、及び運動失調のうちの少なくとも１つが治療される、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記投与により、前記対象におけるてんかん性脳症が治療される、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記てんかん性脳症が、小児てんかん性脳症である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記遺伝子治療ベクターが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶＴＴ、Ａｎｃ８０、ＡＡＶ－７ｍ８、Ａｎｃ８０Ｌ６５、ＡＡＶＲＨ１０、ＡＡＶＲＨ７４、若しくはＡＡＶ－Ｂ１、又はそれらのうちのいずれかの誘導体である、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記遺伝子治療ベクターが、髄腔内送達によって投与される、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記遺伝子治療ベクターが、髄腔内送達によって投与され、前記方法が、前記遺伝子治療ベクターの投与後に、前記対象をトレンデレンブルグ体位にすることを更に含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記遺伝子治療ベクターが、脳室内注射によって投与される、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記遺伝子治療ベクターが、大槽内注射によって投与される、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】

前記遺伝子治療ベクターが、腰椎髄腔内注射によって投与される、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記遺伝子治療ベクターが、静脈内送達によって投与される、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードする、配列番号１のポリヌクレオチド、又は配列番号１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のポリヌクレオチドを含む、導入遺伝子。
【請求項１５】
ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードする、配列番号３、４、５、６、７、若しくは８のポリヌクレオチド、又は配列番号３、４、５、６、７、若しくは８と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のポリヌクレオチドを含む、導入遺伝子。
【請求項１６】
ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードする、配列番号１のポリヌクレオチド、又は配列番号１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含むゲノムを有する、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）。
【請求項１７】
ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードする、配列番号３、４、５、６、７、若しくは８の導入遺伝子、又は配列番号３、４、５、６、７、若しくは８と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のポリヌクレオチドを含むゲノムを有する、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）。
【請求項１８】
前記組換えアデノ随伴ウイルスが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶＴＴ、Ａｎｃ８０、ＡＡＶ－７ｍ８、Ａｎｃ８０Ｌ６５、ＡＡＶＲＨ１０、ＡＡＶＲＨ７４、若しくはＡＡＶ－Ｂ１血清型ベクター、又はそれらの誘導体である、請求項１６又は１７に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）。
【請求項１９】
ＡＡＶ９である、請求項１８に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、２０２１年１１月１２日に出願された米国仮特許出願第６３／２７８，９０５号に対する優先権を主張する。
【０００２】
本開示は、例えば、小児てんかんの脳造影に見られるような欠陥のあるＳＬＣ６Ａ１遺伝子に起因する、起電性ナトリウム及びクロライド結合γアミノ酪酸トランスポーター（ＧＡＴ－１）タンパク質の必要性に関連する状態の治療方法に関する。具体的には、本開示は、ＧＡＴ－１タンパク質の発現の喪失及び／又はＧＡＴ－１タンパク質レベルの低下を特異的に治療するための遺伝子治療ベクターを提供する。
【０００３】
配列表の参照による組み込み
本出願は、開示の別個の部分として、コンピュータ可読形式の配列表（ファイル名：５６３３０＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ．ＸＭＬ、５９，１７４バイト、２０２２年１１月８日

に作成されたＡＳＣＩＩテキストファイル）を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００４】

ＳＬＣ６Ａ１遺伝子は、起電性ナトリウム及びクロライド結合γ－アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）トランスポーターであるＧＡＴ－１をコードする。ＧＡＴ－１タンパク質は、ＧＡＢＡ作動性ニューロン及び星状細胞の細胞膜に局在する。そこで、ＧＡＴ－１タンパク質は、シナプスからの抑制性神経伝達物質ＧＡＢＡの再取り込み、すなわち、シナプス間隙からのＧＡＢＡの除去に関与している。

【０００５】

ＳＬＣ６Ａ１遺伝子における常染色体優性変異は、小児てんかん性脳症の形態を引き起こす。主な症状は、様々な形態の発作、認知発達障害、及び運動失調を含む。

遺伝的バリアントの大部分は新規に生じ、いくつかの変異の機能的影響が最近確認されている。４６０人のてんかん患者を対象とした研究では、５つのミスセンス変異、１つのナンセンス、１つのスプライス部位、及び１つのインフレーム欠失を含む、疾患関連ＳＬＣ６Ａ１バリアントを有する８人の患者が同定された。同定されたＳＬＣ６Ａ１バリアントをラットＧＡＴ－１配列に導入すると、完全な消失から野生型活性ＧＡＢＡの輸送活性の最大２７％の低下までの範囲がもたらされた［非特許文献１］。

【０００６】

患者の治療は、現在、主に抗てんかん薬の使用による対症療法に限定されている。これらの薬物は、根底にある遺伝的欠陥には対処せず、それ故に、疾患の進行を停止する又は遅らせるという見込みはなく、長い期間投与されると、有効性の喪失をもたらす可能性がある。

【０００７】

したがって、ＧＡＴ－１タンパク質のＧＡＢＡトランスポーター活性が必要とされる、小児てんかん性脳症を含む状態の治療の必要性が当該技術分野に依然として存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Ｍａｔｔｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，ＳＬＣ６Ａ１ ｖａｒｉａｎｔｓ ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｄ ｉｎ ｅｐｉｌｅｐｓｙ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｒｅｄｕｃｅ ｇａｍｍａ－ａｍｉｎｏｂｕｔｙｒｉｃ ａｃｉｄ ｔｒａｎｓｐｏｒｔ，Ｅｐｉｌｅｐｓｉａ，５９（９）：ｅ１３５－ｅ４１（２０１８）

【発明の概要】

【０００９】

本開示は、機能性ＧＡＴ－１タンパク質を発現する遺伝子治療ベクターを提供する。遺伝子治療ベクターは、ＧＡＴ－１のＧＡＢＡトランスポーター活性（すなわち、シナプス間隙からＧＡＢＡを除去する活性）を必要とする対象に、ＧＡＴ－１タンパク質をコードする導入遺伝子を送達するのに有用である。

【００１０】

提供される方法により、ＧＡＴ－１タンパク質レベルの低下を伴う状態が治療される。そのような状態としては、限定されないが、小児てんかん性脳症が挙げられる。

本開示は、脳室内注射、大槽内注射、若しくは腰椎髄腔内注射、又はＣＳＦにアクセスする他の注射方法を介して、あるいは静脈内送達を介して、あるいはそのような経路の組み合わせを介して、遺伝子治療ベクターを対象の脳脊髄液（ＣＳＦ）に送達することを含む治療方法を提供する。

【００１１】

遺伝子治療ベクターは、例えば、髄腔内送達を用いて、それを必要とする対象に投与され、対象は、遺伝子治療ベクターの投与後にトレンデレンブルグ体位にされる。

遺伝子治療ベクターは、対象におけるＧＡＴ－１タンパク質レベルが低下したＧＡＢＡ

作動性ニューロン及び／又は星状細胞に導入遺伝子を送達するのに有用である。

【００１２】

遺伝子治療ベクターは、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶＴＴ、Ａｎｃ８０、ＡＡＶ－７ｍ８、Ａｎｃ８０Ｌ６５、ＡＡＶＲＨ１０、ＡＡＶＲＨ７４、若しくはＡＡＶ－Ｂ１、又はそれらのいずれかの誘導体である。遺伝子治療ベクターは、例えば、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ９、ＡＡＶ８、又はＡＡＶ１０である。遺伝子治療ベクターは、例えば、ＡＡＶ９、ＡＡＶ８、又はＡＡＶ１０である。遺伝子治療ベクターは、例えば、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、又はＡＡＶ６である。

【００１３】

遺伝子治療ベクター内の導入遺伝子は、例えば、ニューロン及び星状細胞において、ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含む。

【００１４】

遺伝子治療ベクターは、例えば、ＳＬＣ６Ａ１　ｃＤＮＡを含む。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】図１は、ＳＬＣ６Ａ１　ｃＤＮＡからのＧＡＴ－１タンパク質の発現のための、ＡＡＶ　ＩＴＲと隣接する例示的な導入遺伝子を示す。

【図２】図２は、図１の導入遺伝子を含むｒＡＡＶ由来のｍＲＮＡのＨＥＫ２９３細胞における発現を示す。

【図３－１】図３Ａ～Ｅは、図１の導入遺伝子を含むｒＡＡＶ由来のｍＲＮＡの野生型マウスにおける発現を示す。

【図３－２】同上。

【図３－３】同上。

【図４－１】図４Ａ～Ｂは、処理したＳ２９５Ｌマウスの体重を示す。

【図４－２】同上。

【図５】図５Ａ～Ｄは、処理したＳ２９５Ｌマウスの行動試験の結果を示す。Ａ：ロータロッド４０日目、Ｂ：ケージハンギング４０日目、Ｄ：ケージハンギング１４０日目、及びＥ：ケージハンギング１４０日目。

【図６】図６は、処理したＳ２９５Ｌマウスのクラスピング試験の結果を示す。

【図７】図７Ａ～Ｃは、追加のマウスの行動試験の結果を示す。

【図８】図８は、処理したＳ２９５ＬマウスのＥＥＧ試験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

遺伝子治療ベクター

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、遺伝子治療ベクターの一例である。それは、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖ＤＮＡゲノムは、１４５ヌクレオチドの末端逆位配列（ＩＴＲ）を２つ含めて約４．７ｋｂの長さであり、ウイルス自体又はその誘導体を指すために使用され得る。この用語は、他に特定されない限り、全てのサブタイプ、並びに天然に存在する形態及び組換え形態の両方を包含する。複数の血清型のＡＡＶが存在する。ＡＡＶの血清型は、各々特定のクレードと関連しており、そのメンバーは血清学的及び機能的な類似性を共有している。したがって、ＡＡＶは、クレードによっても称され得る。例えば、ＡＡＶ９配列は、「クレードＦ」配列と称される（Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７８：６３８１－６３８８（２００４）。本開示は、特定のクレード、例えばクレードＦ内の任意の配列の使用を企図する。ＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列は既知である。例えば、ＡＡＶ－１の完全なゲノムはＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００２０７７に提供され、ＡＡＶ－２の完全なゲノムはＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１４０１及びＳｒｉｖａｓｔａｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，４５：５５

５－５６４（１９８３）に提供され、ＡＡＶ－３の完全なゲノムはＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿１８２９に提供され、ＡＡＶ－４の完全なゲノムはＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１８２９に提供され、ＡＡＶ－５ゲノムはＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０８５７１６に提供され、ＡＡＶ－６の完全なゲノムはＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００　１８６２に提供され、ＡＡＶ－７及びＡＡＶ－８ゲノムの少なくとも一部はＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＸ７５３２４６及びＡＸ７５３２４９にそれぞれ提供され、ＡＡＶ－９ゲノムはＧａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７８：６３８１－６３８８（２００４）に提供され、ＡＡＶ－１０ゲノムはＭｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１３（１）：６７－７６（２００６）に提供され、ＡＡＶ－１１ゲノムはＶｉｒｏｌｏｇｙ，３３０（２）：３７５－３８３（２００４）に提供され、ＡＡＶ－１２ゲノムの一部はＧｅｎｂａｎｋ受託番号ＤＱ８１３６４７に提供され、ＡＡＶ－１３ゲノムの一部はＧｅｎｂａｎｋ受託番号ＥＵ２８５５６２に提供されている。ＡＡＶ　ｒｈ．７４ゲノムの配列は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，４３４，９２８号に提供されている。ＡＡＶ－Ｂ１ゲノムの配列は、Ｃｈｏｕｄｈｕｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２４（７）：１２４７－１２５７（２０１６）に提供されている。Ａｎｃ８０の配列は、Ｚｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　１２：１０５６－１０６８，２０１５及びＶａｎｄｅｎｂｅｒｇｈｅ　ｅｔ　ａｌ，ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６０１６３（いずれも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、並びにＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＫＴ２３５８０４－ＫＴ２３５８１２に提供されている。

【００１７】

ウイルスＤＮＡ複製、カプシド形成／パッケージング、及び宿主細胞染色体組み込みを指示するＣｉｓ作用配列は、ＩＴＲ内に含有される。３つのＡＡＶプロモーター（それらの相対的なマップ位置に対してｐ５、ｐ１９、及びｐ４０と名付けられた）は、ｒｅｐ及び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駆動する。２つのｒｅｐプロモーター（ｐ５及びｐ１９）は、（ヌクレオチド２１０７及び２２２７における）単一のＡＡＶイントロンの選択的スプライシングと相まって、ｒｅｐ遺伝子から４つのｒｅｐタンパク質（ｒｅｐ７８、ｒｅｐ６８、ｒｅｐ５２、及びｒｅｐ４０）の産生をもたらす。Ｒｅｐタンパク質は、ウイルスゲノムの複製に最終的に関与する複数の酵素特性を有する。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ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３をコードする。選択的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位は、３つの関連するカプシドタンパク質の産生に関与している。単一のコンセンサスポリアデニル化部位は、ＡＡＶゲノムのマップ位置９５に位置する。ＡＡＶの生活環及び遺伝学は、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｔｏｐｉｃｓ　ｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１５８：９７－１２９（１９９２）に概説されている。

【００１８】

ＡＡＶは、例えば、遺伝子治療において、外来ＤＮＡを細胞に送達するためのベクターとして魅力的となる固有の特徴を有する。培養中の細胞のＡＡＶ感染は、非細胞変性であり、ヒト及び他の動物の自然感染は、無症状及び無症候性である。更に、ＡＡＶは、多くの哺乳動物細胞に感染し、インビボで多くの異なる組織を標的とする可能性を許容する。更に、ＡＡＶは、ゆっくり分裂する細胞及び非分裂細胞を形質導入し、転写的に活性な核エピソーム（染色体外要素）として、本質的にそれらの細胞の寿命にわたって存続することができる。天然のＡＡＶプロウイルスゲノムは、組換えゲノムの構築を実現可能にするプラスミド中のクローン化ＤＮＡとして感染性である。更に、ＡＡＶ複製、ゲノムカプシド形成、及び組み込みを指示するシグナルがＡＡＶゲノムのＩＴＲ内に含有されているため、内部約４．３ｋｂのゲノム（複製及び構造カプシドタンパク質をコードする、ｒｅｐ－ｃａｐ）の一部又は全部を、プロモーター、目的のＤＮＡ、及びポリアデニル化シグナルを含有する遺伝子カセット等の外来ＤＮＡに置き換えることができる。Ｒｅｐ及びｃａｐタンパク質は、トランスで提供され得る。ＡＡＶの別の重要な特徴は、それが極めて安定で頑健なウイルスであるということである。ＡＡＶは、アデノウイルスを不活性化する

ために用いられる条件（５６℃～６５℃で数時間）に容易に耐えるため、ＡＡＶの低温保存があまり重要ではなくなる。ＡＡＶは、凍結乾燥さえもすることができる。最後に、ＡＡＶに感染した細胞は、重複感染に対して耐性を示さない。

【００１９】

本明細書において使用される「ＡＡＶ」という用語は、野生型ＡＡＶウイルス又はウイルス粒子を指す。「ＡＡＶ」、「ＡＡＶウイルス」、及び「ＡＡＶウイルス粒子」という用語は、本明細書において交換的に使用される。「ｒＡＡＶ」という用語は、組換え型、感染性、カプシド形成ウイルス又はウイルス粒子を指す。「ｒＡＡＶ」、「ｒＡＡＶウイルス」、及び「ｒＡＡＶウイルス粒子」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

【００２０】

「ｒＡＡＶゲノム」という用語は、修飾された天然ＡＡＶゲノムに由来するポリヌクレオチド配列を指す。天然ＡＡＶのｃａｐ及びｒｅｐ遺伝子を除去するように修飾されたｒＡＡＶゲノムが提供される。ｒＡＡＶゲノムは、少なくとも一方又は両方の内因性５’及び３’末端逆位配列（ＩＴＲ）を含む。ｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶゲノムが由来したＡＡＶ血清型とは異なるＡＡＶ血清型からのＩＴＲを含むことができる。ｒＡＡＶゲノムは、（例えば、ｓｃＡＡＶにおけるように）３つのＩＴＲを含むことができる。

【００２１】

５’及び３’末端でＡＡＶ　ＩＴＲと隣接する導入遺伝子を含むｒＡＡＶゲノムが、本明細書で提供される。

配列番号１は、ＳＬＣ６Ａ１　ｃＤＮＡのポリヌクレオチド配列を示す。配列番号２は、配列番号１によってコードされるＧＡＴ－１タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【００２２】

本明細書で提供される導入遺伝子としては、限定されないが、ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードするＳＬＣ６Ａ１　ｃＤＮＡ又はポリヌクレオチドを含む導入遺伝子が挙げられ、ポリヌクレオチドは、配列番号１のポリヌクレオチドと６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％同一である。

【００２３】

本明細書で提供される導入遺伝子としては、限定されないが、配列番号３、４、５、６、７、及び８に記載の導入遺伝子（これらの配列番号はそれぞれ、導入遺伝子と隣接する５’及び３’ＡＡＶ　ＩＴＲも含む）が挙げられ、これらはそれぞれ、配列番号１のＳＬＣ６Ａ１　ｃＤＮＡを含む。ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードする導入遺伝子であって、配列番号３、４、５、６、７、又は８と少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％同一の導入遺伝子も、本明細書で提供される。

【００２４】

本明細書で提供される導入遺伝子は、例えば、配列番号２のＧＡＴ－１タンパク質と少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％同一のＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードすることができる。

本明細書で提供される導入遺伝子は、ＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質をコードし、かつストリンジェントな条件下で、配列番号１を含む導入遺伝子、又は配列番号３、４、５、６、７若しくは８の導入遺伝子、あるいはその補体にハイブリダイズする、ポリヌクレオチドを含む。

【００２５】

「ストリンジェントな」という用語は、ストリンジェントとして当該技術分野において一般に理解される条件を指すために使用される。ハイブリダイゼーションのストリンジェ

シーは、主に、温度、イオン強度、及びホルムアミド等の変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーション及び洗浄のためのストリンジェントな条件の例は、６５～６８℃の０．０１５Ｍ塩化ナトリウム、０．０００１５Ｍクエン酸ナトリウム、又は４２℃の０．０１５Ｍ塩化ナトリウム、０．０００１５Ｍクエン酸ナトリウム、及び５０％ホルムアミドである。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ　Ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．１９８９）を参照されたい。

【００２６】

プロモーターの例は、ニワトリβアクチンプロモーター（ＣＢＡ）（配列番号９）、Ｐ５４６　ＭｅＣＰ２プロモーターと称される切断されたメチルＣｐＧ結合タンパク質２（ＭｅＣＰ２）プロモーター（配列番号１０）（例えば、ニューロン及び星状細胞での発現を駆動するため）、ヒトシナプシン（ｈＳｙｎ）プロモーター（配列番号１２）（例えば、ニューロンでの発現を駆動するため）、ヒトソマトスタチン（ｈＳＳＴ）プロモーター（配列番号１３）（例えば、抑制性ニューロンでの発現を駆動するため）、小型グリア線維性酸性タンパク質［ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ］プロモーター（配列番号１１）（例えば、星状細胞での発現を駆動するため）、グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）プロモーター（配列番号１４）、ＣＭＶプロモーター、及びＭｙｏ７Ａプロモーターである。シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）長い末端反復（ＬＴＲ）プロモーター、ＭｏＭｕＬＶプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、並びにヒト遺伝子プロモーター（例えば、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子－１ａプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーター）を含むが、これらに限定されない追加のプロモーターが、本明細書において企図される。加えて、それぞれ対応する配列番号９～１４のプロモーターヌクレオチド配列と少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％同一であり、転写促進活性を有する、ＣＢＡプロモーター、Ｐ５４６　ＭｅＣＰ２プロモーター、ｈＳｙｎプロモーター、ｈＳＳＴプロモーター、ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄプロモーター、及びＧＦＡＰプロモーターが、本明細書で提供される。

【００２７】

転写制御因子の例は、組織特異的制御因子、例えば、ニューロン内で特異的に、又は星状細胞内で特異的に発現を可能にするプロモーターである。例としては、ニューロン特異的エノラーゼ及び星状細胞特異的グリア線維性酸性タンパク質プロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターもまた、企図される。誘導性プロモーターの非限定的な例としては、限定されないが、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリン調節プロモーターが挙げられる。遺伝子カセットはまた、哺乳動物細胞中で発現されたときに導入遺伝子ＲＮＡ転写物のプロセシングを促進するためのイントロン配列も含み得る。そのようなイントロンの一例は、ＳＶ４０イントロンである。

【００２８】

「パッケージング」は、ＡＡＶ粒子の組み立て及びカプシド形成をもたらす一連の細胞内事象を指す。「産生」という用語は、パッキング細胞によるｒＡＡＶ（感染性の、カプシド化されたｒＡＡＶ粒子）の産生プロセスを指す。

【００２９】

ＡＡＶ「ｒｅｐ」及び「ｃａｐ」遺伝子は、それぞれアデノ随伴ウイルスの複製タンパク質及びカプシド形成タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を指す。ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐは、本明細書においてＡＡＶ「パッケージング遺伝子」と称される。

【００３０】

ＡＡＶの「ヘルパーウイルス」は、ＡＡＶ（例えば、野生型ＡＡＶ）が哺乳動物細胞によって複製及びパッケージングされることを可能にするウイルスを指す。アデノウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、及びワクシニア等のポックスウイルスを含む、様々なそのようなＡＡＶのヘルパーウイルスは、当該技術分野において既知である。アデノウイルスは、いくつかの異なるサブグループを包含し得るが、サブグループＣのアデノウイルス５型が最も一般的に使用される。ヒト、非ヒト哺乳動物、及びトリ起源の多数のアデノウイルスが既知であり、ＡＴＣＣ等の寄託機関から入手可能である。ヘルペス科のウイルスには、例えば、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）及びエプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、並びにサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）及び偽狂犬病ウイルス（ＰＲＶ）が含まれ、これらもまたＡＴＣＣ等の寄託機関から入手可能である。

【００３１】

「ヘルパーウイルス機能」は、（本明細書に記載の複製及びパッケージングのための他の要件と併せて）ＡＡＶの複製及びパッケージングを可能にするヘルパーウイルスゲノムにコードされている機能を指す。本明細書に記載されるように、「ヘルパーウイルス機能」は、ヘルパーウイルスを提供すること、又は例えば必要な機能をコードするポリヌクレオチド配列をトランスでプロデューサー細胞に提供することを含む、いくつかの方法で提供され得る。

【００３２】

本明細書で提供されるｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ　ＤＮＡを欠く。本明細書において企図されるｒＡＡＶゲノム内のＡＡＶ　ＤＮＡ（例えば、ＩＴＲ）は、ＡＡＶ血清型ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶＴＴ、Ａｎｃ８０、ＡＡＶ－７Ｍ８、Ａｎｃ８０Ｌ６５、ＡＡＶＲＨ１０、ＡＡＶＲＨ７４、及びＡＡＶ－Ｂ１、並びにそれらの誘導体を含むが、これらに限定されない組換えウイルスを得るのに好適な任意のＡＡＶ血清型に由来し得る。上述のように、様々なＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当該技術分野において既知である。カプシド変異を有するｒＡＡＶもまた、企図される。例えば、Ｍａｒｓｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，２２（１１）：１９００－１９０９（２０１４）を参照されたい。本明細書における修飾カプシドも企図され、グリコシル化及び脱アミド化等の様々な翻訳後修飾を有するカプシドを含む。アスパラギン又はグルタミン側鎖を脱アミド化してアスパラギン残基をアスパラギン酸又はイソアスパラギン酸残基に変換すること、及びグルタミンをグルタミン酸又はイソグルタミン酸に変換することが、本明細書に提供されるｒＡＡＶカプシドにおいて企図される。例えば、Ｇｉｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，２６（１２）：２８４８－２８６２（２０１８）を参照されたい。本明細書における修飾カプシドもまた、治療を必要とする罹患組織及び臓器にｒＡＡＶを指向させる標的化配列を含むことが企図される。

【００３３】

本明細書で提供されるＤＮＡプラスミドは、本明細書に記載されるｒＡＡＶゲノムを含む。ＤＮＡプラスミドは、ＡＡＶ９カプシドタンパク質を用いて感染性ウイルス粒子中にｒＡＡＶゲノムを組み立てるために、ＡＡＶのヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、Ｅ１欠失アデノウイルス、又はヘルペスウイルス）による感染を許容できる細胞に導入され得る。パッケージングされるべきｒＡＡＶゲノム、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が細胞に提供されるｒＡＡＶを産生するための技術は、当該技術分野において標準的である。ｒＡＡＶ粒子の産生は、以下の成分が単一細胞（本明細書においてパッケージング細胞と表される）内に存在することを必要とする：ｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムから分離した（すなわち、その中に存在しない）ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能。ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来してもよく、ｒＡＡＶゲノムＩＴＲとは異なるＡＡＶ血清型に由来してもよい。偽型ｒＡＡＶの産生は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ０１／８３６９２に開示されている。ＡＡＶカプシド

タンパク質は、組換えｒＡＡＶの送達を増強するように修飾され得る。カプシドタンパク質に対する修飾は、当該技術分野において一般的に既知である。例えば、参照によりその開示全体が本明細書に組み込まれる、ＵＳ２００５／００５３９２２及びＵＳ２００９／０２０２４９０を参照されたい。

【００３４】

パッケージング細胞を生成する方法は、ｒＡＡＶの産生に必要な全ての成分を安定に発現する細胞株を作製することである。例えば、ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠くｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムから分離したＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにネオマイシン耐性遺伝子等の選択可能なマーカーを含むプラスミド（又は複数のプラスミド）が、細胞のゲノムに組み込まれてもよい。ｒＡＡＶゲノムは、ＧＣテーリング（Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，１９８２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓ６．ＵＳＡ，７９：２０７７－２０８１）、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含有する合成リンカーの付加（Ｌａｕｇｈｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｇｅｎｅ，２３：６５－７３）、又は直接的な平滑末端ライゲーション（Ｓｅｎａｐａｔｈｙ＆Ｃａｒｔｅｒ，１９８４，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５９：４６６１－４６６６）等の手順により細菌プラスミドに導入され得る。次いで、パッケージング細胞株を、アデノウイルス等のヘルパーウイルスに感染させることができる。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、ｒＡＡＶの大規模産生に好適であることである。好適な方法の他の非限定的な例は、ｒＡＡＶゲノム並びに／又はｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をパッケージング細胞に導入するために、プラスミドではなくアデノウイルス、ヘルペスウイルス又はバキュロウイルスを用いる。

【００３５】

ｒＡＡＶ粒子産生の一般原理は、例えば、Ｃａｒｔｅｒ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１５３３－１５３９（１９９２）、及びＭｕｚｙｃｚｋａ，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ．ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５８：９７－１２９（１９９２）に概説されている。様々なアプローチが、Ｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２（１９８４）、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６４６６（１９８４）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１（１９８５）、ＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６２：１９６３（１９８８）、及びＬｅｂｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，７：３４９（１９８８）、Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６３：３８２２－３８２８（１９８９）、米国特許第５，１７３，４１４号、ＷＯ９５／１３３６５及び対応する米国特許第５，６５８．７７６号、ＷＯ９５／１３３９２、ＷＯ９６／１７９４７、ＰＣＴ／ＵＳ９８／１８６００、ＷＯ９７／０９４４１（ＰＣＴ／ＵＳ９６／１４４２３）、ＷＯ９７／０８２９８（ＰＣＴ／ＵＳ９６／１３８７２）、ＷＯ９７／２１８２５（ＰＣＴ／ＵＳ９６／２０７７７）、ＷＯ９７／０６２４３（ＰＣＴ／ＦＲ９６／０１０６４）、ＷＯ９９／１１７６４、Ｐｅｒｒｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ １３：１２４４－１２５０（１９９５）、Ｐａｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，４：６０９－６１５（１９９３）、Ｃｌａｒｋ ｅｔ ａｌ．（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ３：１１２４－１１３２（１９９６）、米国特許第５，７８６，２１１号、米国特許第５，８７１，９８２号、及び米国特許第６，２５８，５９５号に記載されている。上記文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、ｒＡＡＶ粒子産生に関連する文書のセクションに特に重点が置かれる。

【００３６】

感染性ｒＡＡＶ粒子を産生するパッケージング細胞が、本明細書で更に提供される。一実施形態では、パッケージング細胞は、ＨｅＬａ細胞、２９３細胞、及びＰｅｒＣ．６細胞（同種２９３株）等の安定に形質転換されたがん細胞であり得る。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換されたがん細胞ではない細胞、例えば、低継代２９３細胞（アデノウイルスのＥ１で形質転換されたヒト胎児腎細胞）、ＭＲＣ－５細胞（ヒト胎

児線維芽細胞）、ＷＩ－３８細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、Ｖｅｒｏ細胞（サル腎細胞）、及びＦＲｈＬ－２細胞（アカゲザル胎児肺細胞）であり得る。

【００３７】

本開示のｒＡＡＶゲノムを含むｒＡＡＶ（例えば、感染性カプシド形成ｒＡＡＶ粒子）も本明細書で提供される。ｒＡＡＶのゲノムは、ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ　ＤＮＡを欠いており、すなわち、ｒＡＡＶのゲノムのＩＴＲ間にＡＡＶのｒｅｐ又はｃａｐ　ＤＮＡが存在しない。ｒＡＡＶゲノムは自己相補的（ｓｃ）ゲノムであり得る。ｓｃゲノムを有するｒＡＡＶは、本明細書においてｓｃＡＡＶと称される。ｒＡＡＶゲノムは一本鎖（ｓｓ）ゲノムであり得る。一本鎖ゲノムを有するｒＡＡＶは、本明細書においてｓｓＡＡＶと称される。

【００３８】

ｒＡＡＶは、カラムクロマトグラフィー及び／又は塩化セシウム勾配等の当該技術分野で標準的な方法によって精製され得る。ヘルパーウイルスからｒＡＡＶを精製する方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｃｌａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，１０（６）：１０３１－１０３９（１９９９）、Ｓｃｈｅｎｐｐ　ａｎｄ　Ｃｌａｒｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，６９：４２７－４４３（２００２）、米国特許第６，５６６，１１８号、及びＷＯ９８／０９６５７に開示されている方法を含む。

【００３９】

組成物

ｒＡＡＶを含む組成物もまた提供される。組成物は、限定されないが、ＧＡＴ－１タンパク質を含む目的のポリペプチドをコードするｒＡＡＶを含む。組成物は、目的の異なるポリペプチドをコードする２つ以上のｒＡＡＶを含み得る。

【００４０】

本明細書で提供される組成物は、ｒＡＡＶと、薬学的に許容される単数又は複数の賦形剤とを含む。許容される賦形剤は、レシピエントにとって非毒性であり、好ましくは、用いられる投与量及び濃度で不活性であり、限定されないが、リン酸塩、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、クエン酸塩、若しくは他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸等の抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、若しくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤、マンニトール若しくはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；並びに／又はＴｗｅｅｎ等の非イオン性界面活性剤、ポロクサマー１８８、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（例えば、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８）若しくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等のコポリマーが挙げられる。本明細書で提供される組成物は、イオビトリドール、イオヘキソール、イオメプロール、イオパミドール、イオペントール、イオプロミド、イオベルソール、又はイオキシラン等の非イオン性の低浸透圧性化合物又は造影剤を含有する、薬学的に許容される水性賦形剤を含むことができ、非イオン性、低浸透圧性化合物を含有する水性賦形剤は、以下の特性のうちの１つ以上を有することができる：約１８０ｍｇＩ／ｍＬ、約３２２ｍＯｓｍ／ｋｇ水の蒸気圧浸透圧法によるオスモル濃度、約２７３ｍＯｓｍ／Ｌのオスモル濃度、２０℃で約２．３ｃｐ及び３７℃で約１．５ｃｐの絶対粘度、並びに３７℃で約１．１６４の比重。例示的な組成物は、約２０～４０％の非イオン性の低浸透圧性化合物、又は約２５～３５％の非イオン性の低浸透性圧化合物を含む。例示的な組成物は、２０ｍＭのトリス（ｐＨ８．０）、１ｍＭの$MgCl_2$、２００ｍＭのＮａＣｌ、０．００５％のポロクサマー１８８、及び約２５％～約３５％の非イオン性の低浸透圧性化合物中に配合されたｓｃＡＡＶ又はｒＡＡＶウイルス粒子を含む。別の例示的組成物は、１×ＰＢＳ及び０．００１％のＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８中に配合されたｓｃＡＡＶを含む。

【００４１】

髄腔内送達を含むが、これに限定されないＣＳＦ送達のために、ウイルスベクターは、造影剤（Ｏｍｎｉｐａｑｕｅ又は同様のもの）と混合され得る。例えば、組成物は、イオビトリドール、イオヘキソール、イオメプロール、イオパミドール、イオペントール、イオプロミド、イオベルソール、イオキシラン、又はそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない非イオン性の低浸透圧性造影剤を含み得る。

【００４２】

投与量は、ウイルスゲノム（ｖｇ）の単位で表されてもよい。本明細書において企図される投与量は、約１×１０$^{7}$ｖｇ、約１×１０$^{8}$ｖｇ、約１×１０$^{9}$ｖｇ、約５×１０$^{9}$ｖｇ、約６×１０$^{9}$ｖｇ、約７×１０$^{9}$ｖｇ、約８×１０$^{9}$ｖｇ、約９×１０$^{9}$ｖｇ、約１×１０$^{10}$ｖｇ、約２×１０$^{10}$ｖｇ、約３×１０$^{10}$ｖｇ、約４×１０$^{10}$ｖｇ、約５×１０$^{10}$ｖｇ、約１×１０$^{11}$ｖｇ、約１．１×１０$^{11}$ｖｇ、約１．２×１０$^{11}$ｖｇ、約１．３×１０$^{11}$ｖｇ、約１．２×１０$^{11}$ｖｇ、約１．３×１０$^{11}$ｖｇ、約１．４×１０$^{11}$ｖｇ、約１．５×１０$^{11}$ｖｇ、約１．６×１０$^{11}$ｖｇ、約１．７×１０$^{11}$ｖｇ、約１．８×１０$^{11}$ｖｇ、約１．９×１０$^{11}$ｖｇ、約２×１０$^{11}$ｖｇ、約３×１０$^{11}$ｖｇ、約４×１０$^{11}$ｖｇ、約５×１０$^{11}$ｖｇ、約１×１０$^{12}$ｖｇ、約１×１０$^{13}$ｖｇ、約１．１×１０$^{13}$ｖｇ、約１．２×１０$^{13}$ｖｇ、約１．３×１０$^{13}$ｖｇ、約１．５×１０$^{13}$ｖｇ、約２×１０$^{13}$ｖｇ、約２．５×１０$^{13}$ｖｇ、約３×１０$^{13}$ｖｇ、約３．５×１０$^{13}$ｖｇ、約４×１０$^{13}$ｖｇ、約４．５×１０$^{13}$ｖｇ、約５×１０$^{13}$ｖｇ、約６×１０$^{13}$ｖｇ、約１×１０$^{14}$ｖｇ、約２×１０$^{14}$ｖｇ、約３×１０$^{14}$ｖｇ、約４×１０$^{14}$ｖｇ、約５×１０$^{14}$ｖｇ、約１×１０$^{15}$ｖｇ～約１×１０$^{16}$ｖｇ、又はそれより多くの全ウイルスゲノムを含む。約１×１０$^{9}$ｖｇ～約１×１０$^{10}$ｖｇ、約５×１０$^{9}$ｖｇ～約５×１０$^{10}$ｖｇ、約１×１０$^{10}$ｖｇ～約１×１０$^{11}$ｖｇ、約１×１０$^{11}$ｖｇ～約１×１０$^{15}$ｖｇ、約１×１０$^{12}$ｖｇ～約１×１０$^{15}$ｖｇ、約１×１０$^{12}$ｖｇ～約１×１０$^{14}$ｖｇ、約１×１０$^{13}$ｖｇ～約６×１０$^{14}$ｖｇ、及び約６×１０$^{13}$ｖｇ～約１．０×１０$^{14}$ｖｇ、２．０×１０$^{14}$ｖｇ、３．０×１０$^{14}$ｖｇ、５．０×１０$^{14}$の投与量も企図される。本明細書に例示される１つの用量は、１．６５×１０$^{11}$ｖｇである。

【００４３】

例えば、ＣＳＦ用量は、年齢群に基づいて、約１×１０$^{13}$ｖｇ／患者～約１×１０$^{15}$ｖｇ／患者の範囲であり得る。例えば、静脈内送達用量は、１×１０$^{13}$ｖｇ／キログラム（ｋｇ）体重～２×１０$^{14}$ｖｇ／ｋｇの範囲であり得る。

【００４４】

治療方法

本明細書における治療方法は、ＧＡＴ－１タンパク質のＧＡＢＡトランスポーター活性の低下した細胞を標的とする。本明細書における治療方法は、「欠陥のある」ＳＬＣ６Ａ１遺伝子、すなわち、ＧＡＢＡトランスポーター活性を欠くＧＡＴ－１タンパク質をコードする少なくとも１つの「欠陥のある」（すなわち、変異した）対立遺伝子を有する遺伝子を有する細胞を標的とすることができる。当該技術分野で理解されるように、ヒト対象等の二倍体の対象は、一般に、対立遺伝子と称される各遺伝子の２つのコピーを有する。対象（例えば、ヒト対象）においてそのような細胞を標的とする形質導入の方法が提供される。対象（例えば、ヒト対象）における、例えば、ニューロン、星状細胞及び／又は中枢神経系組織のうちの１つ以上を形質導入する方法が提供される。

【００４５】

本明細書に記載の治療方法の使用は、例えば、小児てんかん性脳症等のてんかん性脳症におけるＧＡＴ－１タンパク質のＧＡＢＡトランスポーター活性の低下に適応される。この方法は、ＧＡＴ－１のｍＲＮＡ及びタンパク質の発現レベルを増加させる。

【００４６】

「形質導入すること」及び「形質導入」という用語は、標的細胞による機能性ＧＡＴ－１タンパク質の発現をもたらす、インビボ又はインビトロのいずれかでＧＡＢＡトランスポーター活性を有するＧＡＴ－１タンパク質を標的細胞にコードする本開示のｒＡＡＶの

投与／送達を指すために使用される。本開示のｒＡＡＶによる細胞の形質導入は、ｒＡＡＶによってコードされるポリペプチドの持続的発現をもたらす。

【００４７】

本明細書で提供される方法は、標的細胞に、本明細書に記載の１つ以上のｒＡＡＶを形質導入する。いくつかの実施形態では、導入遺伝子を含むｒＡＡＶウイルス粒子は、例えば、脳室内注射、大槽内注射若しくは腰椎髄腔内注射によって、又はＣＳＦにアクセスする他の注射方法によって、あるいは静脈内送達を介して、あるいはそのような経路の組み合わせを介して、対象のＣＳＦに投与又は送達される。髄腔内投与は、脳又は脊髄のくも膜の下の空間への送達を指す。特に脳への髄腔内投与は、脳室内注射によって実施することができる。送達が企図される脳の領域としては、限定されないが、運動皮質、視覚野、小脳、及び脳幹が挙げられる。

【００４８】

髄腔内投与の場合、対象は、ｒＡＡＶの注射後（例えば、約５、約１０、約１５又は約２０分間）、トレンデレンブルグ体位（頭低位）に維持され得る。例えば、患者は、頭低位で約１度～約３０度、約１５～約３０度、約３０～約６０度、約６０～約９０度、又は約９０～約１８０度傾けられてもよい。

【００４９】

本明細書で提供される治療方法は、有効用量又は有効複数用量の本明細書で提供されるｒＡＡＶを含む組成物を、それを必要とする対象（例えば、ヒト患者を含むが、これに限定されない動物）に投与するステップを含む。用量が症状の発症前に投与される場合、投与は予防的である。用量が症状の発症後に投与される場合、投与は治療的である。有効用量は、ＧＡＴ－１のＧＡＢＡトランスポーター活性レベル低下の状態に関連する少なくとも１つの症状を緩和（排除若しくは軽減）し、状態の進行を遅延若しくは予防し、状態の程度を軽減し、状態の寛解（部分若しくは完全）をもたらし、かつ／又は生存を延長する用量である。

【００５０】

てんかん性脳症の治療のための有効な用量は、発作、認知発達障害、及び運動失調を緩和（排除又は軽減）する用量である。

【実施例】

【００５１】

以下の実施例により特定の実施形態を説明するが、当業者は変更及び修正を想起するであろう。したがって、請求項に見られるそのような制限のみが、本発明に課せられるべきである。

【００５２】

実施例１

ＧＡＴ－１を発現するｒＡＡＶの産生

ＳＬＣ６Ａ１病理学のための遺伝子治療の再発現アプローチで使用するために、ヒトＳＬＣ６Ａ１　ｃＤＮＡ（配列番号１）（Ｏｒｉｇｅｎｅカタログ番号ＳＣ１２６７６９）を発現する導入遺伝子を使用してｒＡＡＶを産生した。４４９４塩基対では、ＳＬＣ６Ａ１はＡＡＶの範囲内に収まる。

【００５３】

ＡＡＶ９は、主にニューロンを標的とし、二次的に星状細胞を標的とする。発現レベル及び細胞型特異的形質導入は、導入遺伝子発現を駆動するための異なるプロモーターを使用することによって更に調整される。第１の構築物は、ＣＡＧプロモーターを用いてＳＬＣ６Ａ１発現を駆動することによって、強力なユビキタス発現をもたらす。興奮性ニューロンと比較して抑制性ニューロンに対するバイアスが強いため、ＣＢＡ等の他のユビキタスプロモーターではなくＣＡＧが選択された［Ｎａｔｈａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，１６１（２）：４４１－４５０（２００９）］。次に、ｐ５４６として知られる、ＭＥＣＰ２プロモーターの切断バージョンを使用してニューロン及び星状細胞を標的とするが、効力は低い。第３の構築物は、シナプシンプロモーター（Ｎａｔ

ｈａｎｓｏｎ，Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ、上記を参照）の使用により発現をニューロンに限定し、ソマトスタチンプロモーターにより、発現を抑制性ＧＡＢＡ作動性ニューロンに更に限定する［Ｎａｇａｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ．，５１８（４）：６１９－６２４（２０１９）；Ｎａｔｈａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ　Ｎｅｕｒａｌ　Ｃｉｒｃｕｉｔｓ．，３：１９（２００９）］。最後に、ＧＦＡＰを使用して星状細胞を標的とする［Ｌａｗｌｏｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．，１７（１０）：１６９２－１７０２（２００９）］。クローニング後、５つの構築物を配列決定し、２９３細胞で発現を確認し、小規模なＡＡＶ９ウイルス調製物を生成した。

【００５４】

図１に示される導入遺伝子は、前述のプロモーターを使用して、ヒトＳＬＣ６Ａ１　ｃＤＮＡからのＧＡＴ－１タンパク質の発現を駆動する。配列番号３の導入遺伝子は、ＣＢＡプロモーター（ユビキタスプロモーター）を含み、配列番号４の導入遺伝子は、Ｐ５４６　ＭｅＣＰ２プロモーター（ユビキタスプロモーター）を含み、配列番号６の導入遺伝子は、ｈＳｙｎプロモーター（ニューロン特異的プロモーター）を含み、配列番号７の導入遺伝子は、ｈＳＳＴプロモーター（抑制性ニューロン特異的プロモーター）を含み、配列番号５の導入遺伝子は、ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄプロモーター（星状細胞特異的プロモーター）を含み、配列番号８の導入遺伝子は、ＧＦＡＰプロモーター（星状細胞特異的プロモーター）を含む。本明細書における方法で使用することが企図されるプロモーターは、導入遺伝子構築物がｒＡＡＶに良好に適合することを可能にするサイズであり、また、導入遺伝子発現を駆動して、形質導入細胞におけるＧＡＴ－１タンパク質発現を少なくとも１０％増加させ、ニューロン及び星状細胞における発現を増加させることに集中する。

【００５５】

導入遺伝子を、ＡＡＶ９産生プラスミド、すなわち、ｐｓｃＡＡＶ．ＳＬＣ６Ａ１．ＣＢＡ、ｐｓｃＡＡＶ．ＳＬＣ６Ａ１．Ｐ５４６、ｐｓｃＡＡＶ．ＳＬＣ６Ａ１．ｈＳｙｎ、ｐｓｃＡＡＶ．ＳＬＣ６Ａ１．ＳＳＴ、ｐｓｃＡＡＶ．ＳＬＣ６Ａ１．ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ、ｐｓｓＡＡＶ．ＳＬＣ６Ａ１．ＧＦＡＰにサブクローニングし、２本鎖ＡＡＶ２－ＩＴＲベースの産生プラスミド、Ｒｅｐ２Ｃａｐ９配列をコードするプラスミド、及びアデノウイルスヘルパープラスミドｐＨｅｌｐｅｒを使用した２９３細胞の一過性３重トランスフェクションにより、Ｆｏｕｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２７（１）：５９－６５（２００９）に記載されるようにｓｃＡＡＶ及びｓｓＡＡＶを産生した。

【００５６】

得られたＳＬＣ６Ａ１　ｒＡＡＶは、ｓｓＡＡＶ．ＣＢＡ．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｓＡＡＶ．Ｐ５４６．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｓＡＡＶ．ｈＳｙｎ．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｓＡＡＶ．ｈＳＳＴ．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｓＡＡＶ．ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｓＡＡＡ．ＧＦＡＰ．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｃＡＡＶ．ＣＢＡ．ＳＬＣ６Ａ１（本明細書では時にｓｃＡＡＶ．ＣＡＧ．ＳＬＣ６Ａ１と称される）、ｓｃＡＡＶ．Ｐ５４６．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｃＡＡＶ．ｈＳｙｎ．ＳＬＣ６Ａ１（本明細書では時にｓｃＡＡＶ．Ｓｙｎ．ＳＬＣ６Ａ１と称される）、ｓｃＡＡＶ．ｈＳＳＴ．ＳＬＣ６Ａ１（本明細書では時にｓｃＡＡＶ．ＳＳＴ．ＳＬＣ６Ａ１と称される）、ｓｃＡＡＶ．ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ＳＬＣ６Ａ１、及びｓｃＡＡＡ．ＧＦＡＰ．ＳＬＣ６Ａ１と名付けられた。

【００５７】

実施例２

インビトロ発現分析

実施例１で生成されたＡＡＶ産生プラスミドからのＳＬＣ６Ａ１　ｍＲＮＡの発現を、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において評価した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ＳＬＣ６Ａ１　ｃＤＮＡを発現するＡＡＶ産生プラスミド、又は緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現する対照ｓｃＡＡＶのうちの１つでトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後に細胞を採取し、ＰＣＲ及びｑＰＣＲによってＳＬＣ６Ａ１　ｍＲＮＡの発現を分析した。

【００５８】
ＳＬＣ６Ａ１　ｍＲＮＡの発現レベルを、対照ＧＦＰ　ｍＲＮＡの発現レベルに対する相対的な倍率変化として図２に示す。
実施例３
野生型マウスにおける発現
実施例１で生成されたｓｃＡＡＶ及びｓｓＡＡＶからのＳＬＣ６Ａ１　ｍＲＮＡの発現を、野生型マウスで評価した。ＳＬＣ６Ａ１を発現するＡＡＶ９構築物のそれぞれを、２．９５×１０$^{１０}$～１．５×１０$^{１１}$ｖｇ／マウスの脳室内注射によって、４匹の新生仔野生型マウス（各ｒＡＡＶ９でｎ＝４）に投与した。ＷＴマウスを、約４週齢（短期）又は約４ヶ月例（長期）で、非注射ＷＴ対照マウスとともに　殺した。ＳＬＣ６Ａ１　ｍＲＮＡ発現、タンパク質発現、及び組織学のために組織を採取した。
【００５９】
注射したマウスにおけるＳＬＣ６Ａ１　ｍＲＮＡの発現レベルを、対照である年齢を一致させた非注射マウスのｍＲＮＡ発現レベルに対する相対的な倍率変化として図３Ａ～図３Ｅに示す。臨床的にも血液検査でも毒性の兆候はなかった。
【００６０】
実施例４
ＳＬＣ６Ａ１のマウスモデルにおけるＡＡＶ遺伝子治療構築物の投与
ＧＡＴ－１ノックアウトマウスが生存するが［Ｊｅｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｎｅｕｒｏｐｈｙｓｉｏｌ，９０（４）：２６９０－２７０１（２００３）及びＣｈｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ，２２（２３）：１０２５１－１０２６６（２００２］、ヘテロ接合性マウスは、表現型を有さず、したがってヒト患者における疾患を再現しない。ホモ接合性マウスは、ＥＥＧによって定量化され得る、出生後１９日目に始まった行動的及び認知的欠陥並びに発作を呈する。２つの追加のマウスモデルは、既知のヒト点変異と同等であるミスセンス変異Ａ２８８Ｖ及びＳ２９５Ｌを有する。ノックアウトマウスとは異なり、Ａ２８８Ｖ及びＳ２９５Ｌマウスの両方が、発作の存在等、ヘテロ接合体として表現型的に異常である。ＳＬＣ６Ａ１のＡ２８８Ｖ及びＳ２９５Ｌマウスモデルは、遺伝子置換戦略の安全性及び有効性を評価するのに有用である。
【００６１】
全てのウイルスベクターを、Ｓ２９５Ｌマウスモデルを使用して評価した。ｓｃＡＡＶ．Ｐ５４６．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｃＡＡＶ．ｈＳｙｎ．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｃＡＡＶ．ｈＳＳＴ．ＳＬＣ６Ａ１、ｓｃＡＡＶ．ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ＳＬＣ６Ａ１（配列番号５のｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ｖ２導入遺伝子を有する）及びｓｓＡＡＡ．ＧＦＡＰ．ＳＬＣ６Ａ１の影響を、対照の空のウイルス粒子と比較した。ｒＡＡＶ９の各々を、３×１０$^{１０}$ｖｇ／マウスの脳室内注射によって新生仔マウスに投与した。
【００６２】
毎週の体重測定、隔週のロータロッド、ケージハング、及び２１～２８日から開始したクラスピング試験を含む様々な行動試験をマウスに行った。人道的又は所定の時点で、導入遺伝子発現分析を含む、死後の生化学的、分子的、及び組織学的分析のために動物を殺にした。
【００６３】
結果を図４Ａ～図４Ｄ（体重）、図５Ａ～図５Ｃ（ロータロッド及びケージハング）、及び図６（クラスピング）に示す。
雄及び雌の体重増加を、野生型動物、ヘテロ接合性動物、及びＳＬＣ６Ａ１遺伝子にＳ２９５Ｌ変異を含有するホモ接合性動物間で比較した。未処理のホモ接合性変異雄マウスは、体重増加の低下を示した。重要なことに、ホモ接合性変異雄マウスの体重増加は、ＡＡＶ－ｐ５４６－ＳＬＣ６Ａ１（すなわち、ｓｃＡＡＶ．Ｐ５４６．ＳＬＣ６Ａ１）で処理したときに正常化した。野生型動物と比較して、任意の構築物で処理された雌のホモ接合性変異マウスにおいて差は見られなかったが、未処理の雌と野生型雌との間にも差がないため、そのことは予想されていた。図４Ａ～図４Ｄを参照されたい。

【００６４】
実施されたロータロッドアッセイでは、マウスを加速的に回転し続ける回転ホイールの上に置いた。マウスが落下するまでの時間を測定した。４０日齢の野生型動物とホモ接合性変異動物との間で、ロータロッドに留まる能力に非常に有意な差が見られた。加えて、金属ワイヤーを含むケージの蓋の上にマウスを置き、次いで蓋を逆さまにする、ワイヤーハング試験が行われた。動物が落下する前にグリッドにぶら下がることができる時間を測定する。１５０日目に、非常に有意な差が雄及び雌の両方に見られた。その時点で、ホモ接合性変異マウスは、ケージにぶら下がる能力の大きな低下を示した。異なるＡＡＶ－ＳＬＣ６Ａ１構築物は、変異マウスのより長い期間ぶら下がる能力の向上に様々な影響を与えた。最も有効な構築物は、ＡＡＶ－Ｐ５４６－ＳＬＣ６Ａ１（すなわち、ｓｃＡＡＶ．Ｐ５４６．ＳＬＣ６Ａ１）であり、正常な野生型のレベルまで潜時を短縮させた。図５Ａ～図５Ｃを参照されたい。図７Ａ～図７Ｃは、追加のマウスからのデータを示す。
【００６５】
未処理のホモ接合体変異マウスは、尾で懸垂されたときに後肢を適切に広げることができないクラスピング表現型を示す。図６に示すように、野生型マウス（左画像）と処理された変異マウスとは区別することができず（右画像）、両方ともこのアッセイで正常な後肢位置を示していた。
【００６６】
実施例５
マウスにおけるてんかん様放電の定量化
発作活動はＳＬＣ６Ａ１対象において共通の疾患表現型であるため、上記のマウスも脳波（ＥＥＧ）による試験を行った。
【００６７】
１ｍｇ／ｋｇの注射用ブプレノルフィンＨＣＬ及び５ｍｇ／ｋｇのカルプロフェンを使用してマウスを前投薬した。次いで、誘導チャンバを介してイソフルランを使用して動物を誘導した。麻酔の維持は、ノーズコーンを介して１～３％のイソフルランを使用して行った。動物が外科的な麻酔深度に到達してから、手術部位を無菌的に調製した。肩甲骨から頭側に、眼の基部のすぐ尾側まで伸びる約２．５ｃｍの長さの切開を行った。ＤＳＩ社製の遠隔操作インプラントを皮下に挿入した。ＥＭＧモニタリングのために、生体電位リードを僧帽筋に外科的に配置した。更に、ＥＥＧモニタリングのために、頭蓋骨にドリル穴を開け、定位固定デバイスを使用して以下の座標に電極を配置した：ＡＰ＋１．０／ＭＬ－１．５（ＬＨ）及びＡＰ－２．０／ＭＬ＋２．０（ＲＨ）。切開は、単純な連続縫合パターンを用いて閉じた。
【００６８】
術後、マウスに１ｍＬの温かいＮａＣＬを与え、２ｍｇ／ｋｇのカプロモレリンを経口投与し、少なくとも１２時間インキュベーターに入れた。マウスを少なくとも７２時間回復させ、飲料水を通して経口カーポフェンで維持した。次いで、無線テレメトリ受信機のプレートシステム上にマウスを２４時間直接配置することによってデータを取得した。次いで、ＤＳＩ　ＮｅｕｒｏＳｃｏｒｅ（商標）ソフトウェアでデータを分析した。
【００６９】
結果を図８に示す。ホモ接合体変異マウスは、ヘテロ接合体対照マウスと比較して、スパイクトレイン／２４時間の有意な増加を呈した。ＡＡＶ９－Ｐ５４６－ＳＬＣ６Ａ１（すなわち、ｓｃＡＡＶ．Ｐ５４６．ＳＬＣ６Ａ１）で処理したホモ接合体変異マウスは、未処理のホモ接合体変異マウスと比較してスパイクトレイン／２４時間の有意な減少を呈した。
【００７０】
実施例６
ヒト患者のためのＡＡＶ遺伝子治療
ＡＡＶ遺伝子療法は、ＳＬＣ６Ａ１遺伝子の１つのコピーにおける変異に起因するハプロ不全に対処するために、患者にＳＬＣ６Ａ１の野生型コピーを提供する。

【００７１】

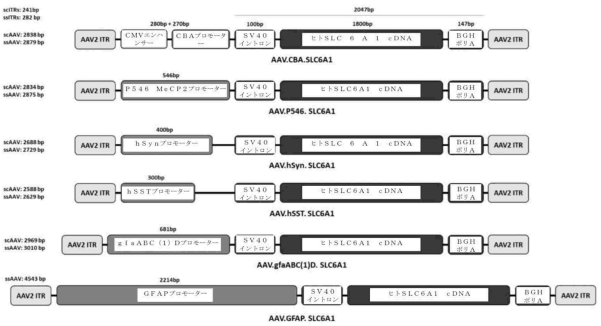
本発明を特定の実施形態に関して説明してきたが、当業者は、その変更及び修正を想起することを理解されたい。したがって、請求項に見られるそのような制限のみが、本発明に課せられるべきである。

【００７２】

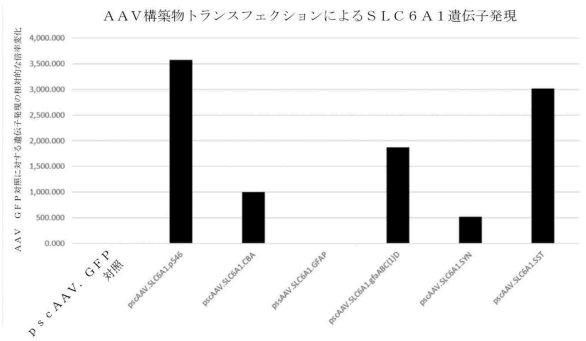
本出願で参照される全ての文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【図面】

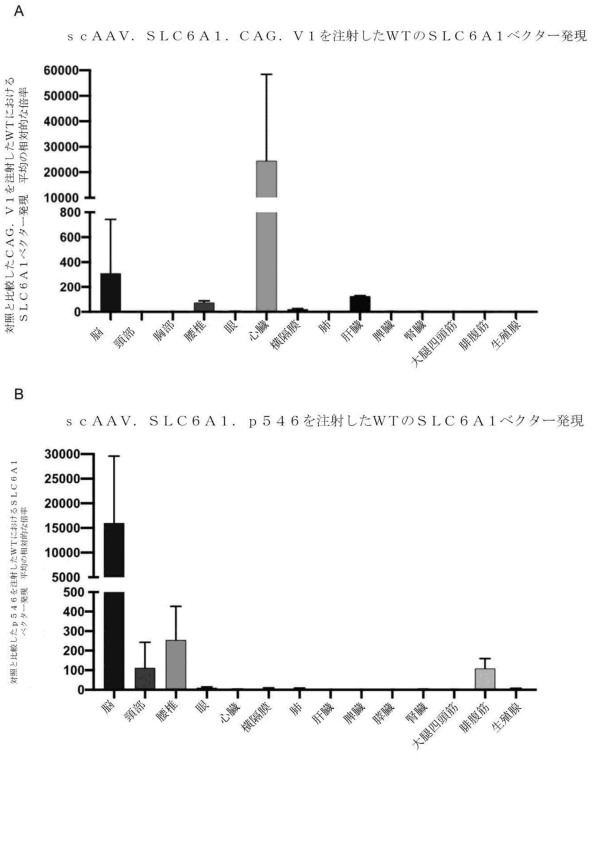
【図１】



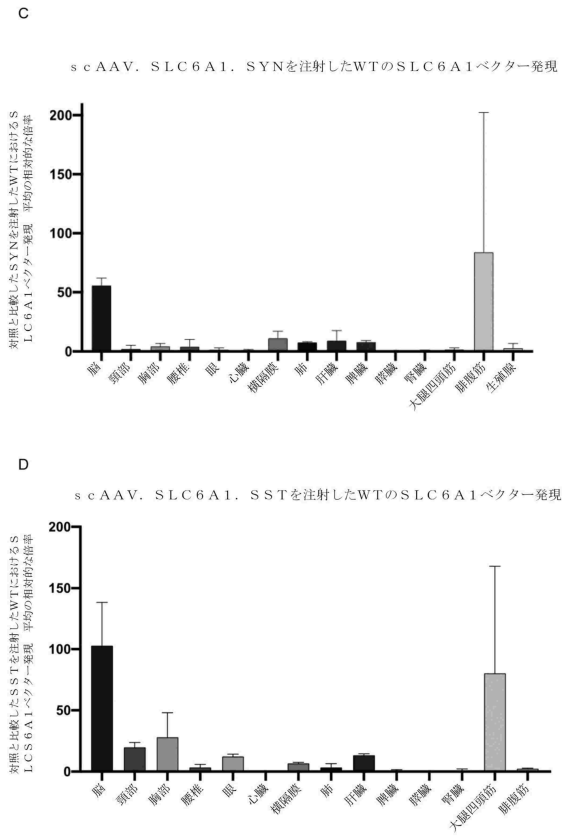

【図２】



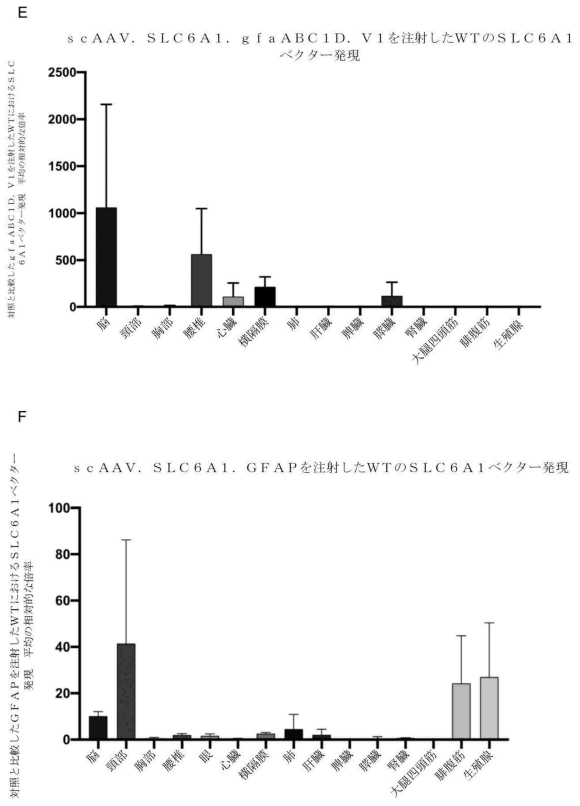

【図３－１】



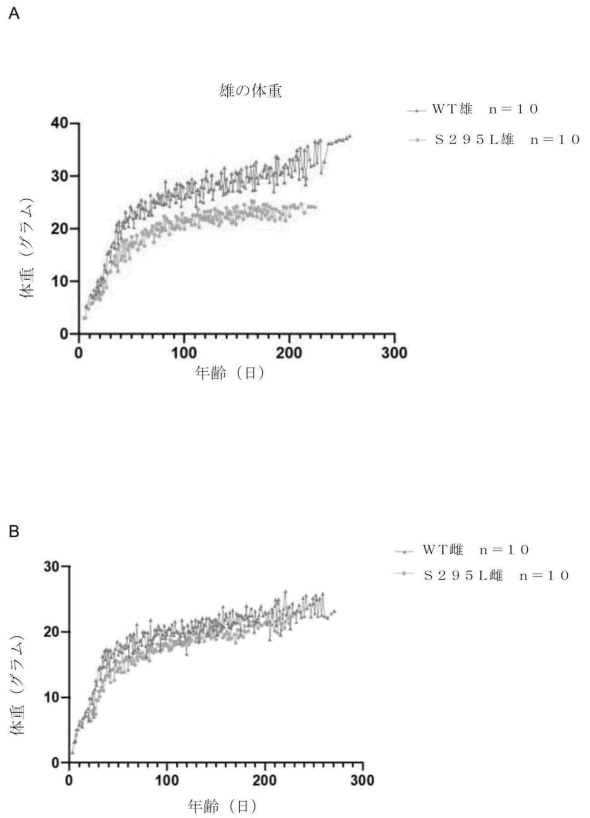

【図３－２】



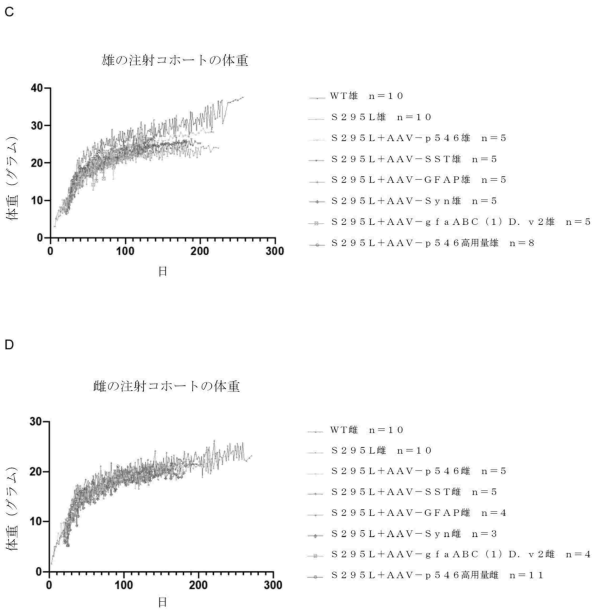
【図３－３】



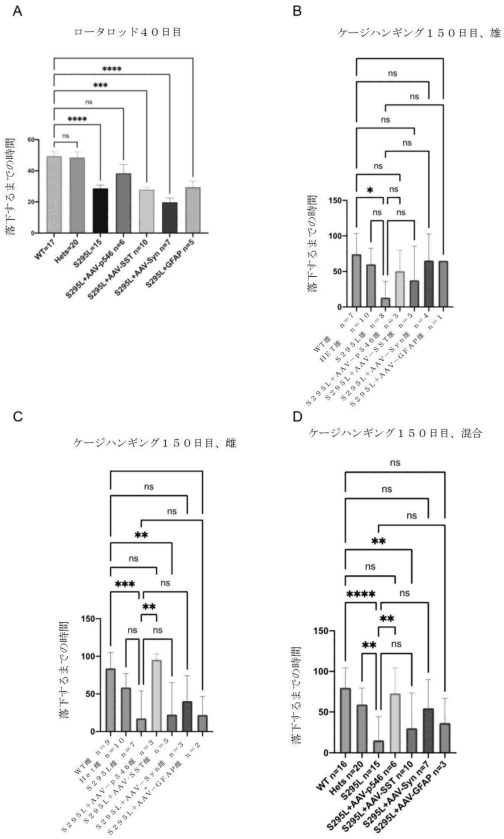

【図４－１】



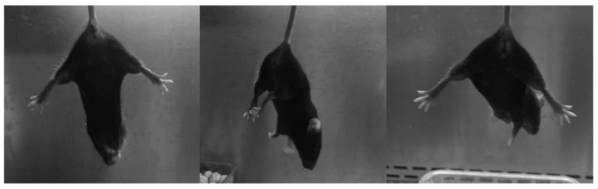

【図４－２】



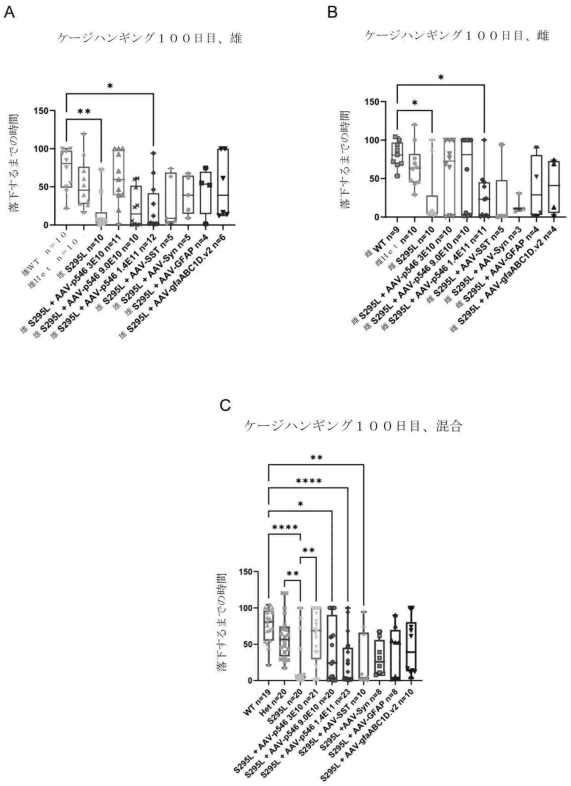

【図５】



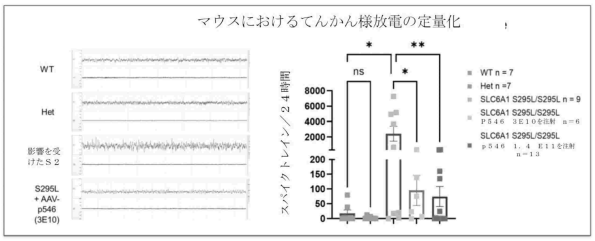
【図６】




【図７】




【図８】




【配列表】

<u>2024543253000001.xml</u>

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/79756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A61K 48/00, C12N 15/86 (2023.01)
ADD. A61K 38/17 (2023.01)
CPC - INV. A61K 48/0083, A61K 48/00, C12N 15/86
ADD. A61K 38/1787, C07K 14/70571
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. |
|---|---|---|
| Y | US 2021/0139934 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 13 May 2021 (13.05.2021) para [0003]; [0004]; [0263]; [0269]; [0274]; [0284]; [0292] | 1-3 |
| Y | US 2006/0024700 A1 (CARGILL et al.) 02 February 2006 (02.02.2006) para [0022]; SEQ ID NO: 128 | 1-3 |

☐ 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 25 January 2023 (25.01.2023) | APR 05 2023 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer<br>Kari Rodriquez<br>Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/79756

**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/US 22/79756

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-13
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:.
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-3, directed to a method of delivering a transgene encoding a GAT-1 protein with GABA transporter activity to a subject in need of GAT-1 protein GABA transporter activity.

Group II, claims 14-19, directed to a transgene comprising a polynucleotide that encodes a GAT-1 protein with GABA transporter activity, or a recombinant adeno-associated virus (rAAV) with a genome comprising said transgene.

---- See Extra Pages -----

I. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/79756

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

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

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a method comprising administering a gene therapy vector comprising a transgene to the cerebrospinal fluid of a subject by intracerebroventricular injection, cisternal injection, lumbar intrathecal injection, or by intravenous delivery, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a composition comprising or consisting of a transgene, that is not required by Group I.

Common technical features:

Groups I-II share the common technical features of a transgene comprising a polynucleotide of SEQ ID NO: 1, or a polynucleotide at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to SEQ ID NO: 1 that encodes a GAT-1 protein with GABA transporter activity.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is previously made obvious over US 2021/0139934 A1 to the Board of Regents of the University of Texas System, (13 May 2021), (hereinafter 'Texas'), in view of US 2006/0024700 A1 to Cargill et al. (hereinafter "Cargill").

Texas teaches a method of delivering a transgene encoding a GAT-1 protein with GABA transporter activity to a subject in need of GAT-1 protein GABA transporter activity (para [0004] - "The present disclosure relates generally to the field of gene therapy and in particular, to recombinant adeno-associated viral (AAV) vector particles (also known as rAAV viral vectors) comprising transgene sequences encoding for GAT1 polypeptides, their manufacture, and their use to deliver transgenes to treat or prevent a disease or disorder, including diseases associated with loss and/or misfunction of the SLC6A1 gene"),
wherein the method comprises administering a gene therapy vector comprising the transgene to the cerebrospinal fluid of a subject by intracerebroventricular injection, cisternal injection, lumbar intrathecal injection, or by intravenous delivery (para [0004]; para [0023] - "An rAAV viral vector or pharmaceutical composition of the present disclosure can be administered to the subject intravenously"); but does not explicitly teach wherein the transgene comprises the polynucleotide of SEQ ID NO: 1, or a polynucleotide at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to SEQ ID NO: 1 that encodes a GAT-1 protein with GABA transporter activity.
Cargill teaches a transgene comprising the polynucleotide of SEQ ID NO: 1 (para [0022] - "In Tables 1-2, the present invention provides gene information, transcript sequences (SEQ ID NOS:1-261)...that contain the SNPs of the present invention"; SEQ ID NO: 128 (nts 216 -2015) exhibits 100% identity to claimed SEQ ID NO: 1). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to apply a known transgene sequence that encodes a GAT polypeptide as taught by Cargill to the method taught by Texas, in order to increase GAT-1 expression a subject with defective GAT-1.

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

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

**Continuation of number 4 above: claims 4-13 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ｃ０７Ｋ* | *14/47* | *(2006.01)* | Ｃ０７Ｋ | 14/47 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *38/17* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 38/17 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *48/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 48/00 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *35/76* | *(2015.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/76 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/28* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/28 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/08* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/08 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/14* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/14 | |

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

２．ＰＬＵＲＯＮＩＣ

(72)発明者　マイヤー、キャスリン クリスティン
アメリカ合衆国 ４３２０５ オハイオ州 コロンバス チルドレンズ ドライブ ７００
(72)発明者　ブラッドベリ、アリソン マリー
アメリカ合衆国 ４３２０５ オハイオ州 コロンバス チルドレンズ ドライブ ７００
(72)発明者　リカイト、シビ
アメリカ合衆国 ４３２０５ オハイオ州 コロンバス チルドレンズ ドライブ ７００

Ｆターム（参考）　4B065 AA90Y AA93X AB01 BA02 CA44
4C084 AA02 AA13 BA01 MA66 NA14 ZA06 ZA15 ZA22 ZC51
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA14 ZA06 ZA15 ZA22 ZC51
4H045 AA10 BA09 CA40 EA21 FA74