

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6824169号  
(P6824169)

(45) 発行日 令和3年2月3日 (2021. 2. 3)

(24) 登録日 令和3年1月14日 (2021. 1. 14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/55 (2006. 01)

C 1 2 N 15/55 Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006. 01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 23 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-533845 (P2017-533845)  
 (86) (22) 出願日 平成27年12月22日 (2015. 12. 22)  
 (65) 公表番号 特表2018-501791 (P2018-501791A)  
 (43) 公表日 平成30年1月25日 (2018. 1. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/067338  
 (87) 国際公開番号 W02016/106303  
 (87) 国際公開日 平成28年6月30日 (2016. 6. 30)  
 審査請求日 平成30年10月23日 (2018. 10. 23)  
 (31) 優先権主張番号 62/096, 400  
 (32) 優先日 平成26年12月23日 (2014. 12. 23)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 508285606  
 ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメ  
 リカ, アズ リプレゼンテッド バイ  
 ザ セクレタリー, デパートメント オ  
 ブ ヘルス アンド ヒューマン サービ  
 シーズ  
 アメリカ合衆国, メリーランド 2089  
 2-7660, ベセスダ, エグゼクティ  
 ブ プールバード 6011, スイート  
 325, エムエスシー 7660  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変 G 6 P C をコードするアデノ随伴ウイルスベクターおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変グルコース - 6 - ホスファターゼ - ( G 6 P a s e - ) をコードする単離され  
 た核酸分子であって、前記改変 G 6 P a s e - のアミノ酸配列が配列番号 8 または配列  
 番号 9 を含む、単離された核酸分子。

【請求項 2】

前記改変 G 6 P a s e - のアミノ酸配列が、配列番号 8 を含むまたはそれからなる、  
 請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 6 または配列番号 7 のヌクレオチド配列を含む、請求項 2 に記載の単離された  
 核酸分子。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 5】

前記改変 G 6 P a s e - をコードする前記核酸分子がプロモーターに作動可能に連結  
 されている、請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 6】

前記プロモーターが G 6 P C プロモーターを含む、請求項 5 に記載のベクター。

【請求項 7】

前記 G 6 P C プロモーターが配列番号 4 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5 または配列番

10

20

号 5 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5 を含む、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

前記改変 G 6 P a s e - のアミノ酸配列が配列番号 8 を含み、前記ベクターが、配列番号 4 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 4 4 4 1 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 4 4 4 1 を含む、請求項 4 から 7 までのいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 9】

前記ベクターがアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターである、請求項 4 から 8 までのいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 10】

前記 A A V ベクターが A A V 血清型 8 ( A A V 8 ) ベクターである、請求項 9 に記載のベクター。

10

【請求項 11】

前記改変 G 6 P a s e - のアミノ酸配列が配列番号 8 を含み、前記ベクターが、配列番号 4 のヌクレオチド 1 7 ~ 4 8 1 9 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 7 ~ 4 8 1 9 を含む、請求項 9 または請求項 10 に記載のベクター。

【請求項 12】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の核酸分子または請求項 4 から 11 までのいずれか一項に記載のベクターを含む単離された宿主細胞。

【請求項 13】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の核酸分子を含む組換え A A V ( r A A V )

20

【請求項 14】

前記 r A A V が r A A V 8 である、請求項 13 に記載の r A A V。

【請求項 15】

薬学的に許容される担体中に請求項 13 または請求項 14 に記載の r A A V を含む組成物。

【請求項 16】

静脈内投与用に製剤化されている、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

糖原病と診断された被験体を処置するための、請求項 13 もしくは請求項 14 に記載の r A A V を含む組成物、または請求項 15 もしくは請求項 16 に記載の組成物であって、糖原病 I a 型 ( G S D - I a ) を有すると選択された被験体に投与されることを特徴とする、組成物。

30

【請求項 18】

グルコース - 6 - ホスファターゼ - ( G 6 P a s e - ) の欠乏を有する被験体において、グルコース恒常性を促進する；低血糖を阻害する；肝細胞腺腫 ( H C A ) の発症を阻害するもしくは予防する；肝細胞癌 ( H C C ) の発症を阻害するもしくは予防する；または腎臓の機能障害もしくは不全を阻害するもしくは予防するための、請求項 13 もしくは請求項 14 に記載の r A A V を含む組成物、または請求項 15 もしくは請求項 16 に記載の組成物。

40

【請求項 19】

G 6 P a s e - の欠乏を有する前記被験体が G S D - I a を有する、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

静脈内に投与されることを特徴とする、請求項 17 から 19 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記組成物が、約  $1 \times 10^{10}$  から約  $1 \times 10^{14}$  ウイルス粒子 ( v p ) / k g の前記 r A A V の用量で投与されることを特徴とする、請求項 17 から 20 までのいずれか一項に記載の組成物。

50

## 【請求項 2 2】

前記組成物が、単回用量の r A A V で投与されることを特徴とする、請求項 1 7 から 2 1 までのいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 2 3】

前記組成物が、複数回用量の r A A V で投与されることを特徴とする、請求項 1 7 から 2 1 までのいずれか一項に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

10

この出願は、2014年12月23日に提出された米国仮出願第62/096,400号（これは、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

## 【0 0 0 2】

本開示は、糖原病（GSD）およびGSDに伴う合併症を処置するためなどの、活性が増大した改変グルコース-6-ホスファターゼ-（G6PC）酵素をコードする遺伝子療法ベクターおよびその使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 3】

糖原病Ia型（GSD-Iaまたはフォン・ギールケ病、MIM232200）は、主に肝臓、腎臓、および腸において発現する酵素であるグルコース-6-ホスファターゼ-（G6Pase-またはG6PC）の欠損によって引き起こされる（Chouら、Nat Rev Endocrinol 6巻：676～688頁、2010年）。G6Pase-は、G6PC遺伝子によりコードされる、9つの膜貫通ヘリックスによって小胞体（ER）内に係留された疎水性タンパク質である（Chouら、Nat Rev Endocrinol 6巻：676～688頁、2010年）。この酵素は、グリコーゲン分解および糖新生の最終ステップにおけるグルコース-6-リン酸（G6P）からグルコースおよびリン酸への加水分解を触媒する。GSD-Iaに罹患している患者は、グルコース恒常性を維持することができず、空腹時性低血糖、成長遅延、肝腫大、腎肥大症、高脂血症、高尿酸血症、および乳酸血症（lactic acidemia）を示す（Chouら、Nat Rev Endocrinol 6巻：676～688頁、2010年）。 20

## 【0 0 0 4】

現在のところ、GSD-Iaは治癒しない。低血糖症は、食事療法を使用して管理することができ（Greeneら、N Engl J Med 294巻：423～425頁、1976年；Chenら、N Engl J Med 310巻：171～175頁、1984年）、これにより、患者がほぼ正常な成長および思春期発育を達成することが可能になる。しかし、長期間の臨床的合併症、およびそれらの基礎をなす病理学的プロセスは修正されないままである。最も重要な慢性リスクのうちの1つは肝細胞腺腫（HCA）であり、これは25歳を超えるGSD-I患者の70～80%で発生する（Chouら、Nat Rev Endocrinol 6巻：676～688頁、2010年；Labrunesら、J Pediatr Gastroenterol Nutr 24巻：276～279頁、1997年；Rakeら、Eur J Pediatr 161巻（補遺1）：S20～S34頁、2002年）。GSD-Ia患者におけるHCAは、小さく、多発性であり、非被包性であり、局所圧迫および腫瘍内出血を含めた合併症を伴う。GSD-Ia患者の10%で、HCAは悪性転換して肝細胞癌（HCC）になる（Chouら、Nat Rev Endocrinol 6巻：676～688頁、2010年；Rakeら、Eur J Pediatr 161巻（補遺1）：S20～S34頁、2002年；Francoら、J Inherit Metab Dis 28巻：153～162頁、2005年）。 40

GSD-Iaの動物モデルにおいて、G6Pase-を保有する組換えアデノ随伴ウ 50

イルス ( A A V ) を使用した遺伝子療法試験が以前実施されたが、肝臓 G 6 P a s e - 欠乏の完全な補正は誰にもできていない。そのため、G S D - I a およびその関連する合併症の処置のための遺伝子療法ベクターの改善に対する必要性がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【 0 0 0 5 】

【非特許文献 1】Chou ら、Nat Rev Endocrinol ( 2 0 1 0 年 ) 6 巻 : 6 7 6 ~ 6 8 8 頁

【非特許文献 2】Greene ら、N Engl J Med ( 1 9 7 6 年 ) 2 9 4 巻 : 4 2 3 ~ 4 2 5 頁

10

【非特許文献 3】Chen ら、N Engl J Med ( 1 9 8 4 年 ) 3 1 0 巻 : 1 7 1 ~ 1 7 5 頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

イヌ G 6 P a s e - 酵素がヒト G 6 P a s e - 酵素よりも活性であることが本明細書に開示されている。2 つのタンパク質のアミノ酸配列アラインメントは、それらが主に 1 8 残基で異なっていることを明らかにした。ホスホヒドロラーゼ活性が増大したヒト G 6 P a s e - 変異体を同定するために、イヌ G 6 P a s e - 由来の 1 つまたは 2 つの対応するアミノ酸を含有する変異体が生成された。

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明では、改変 G 6 P a s e - をコードする単離された核酸分子が提供される。一部の実施形態では、改変 G 6 P a s e - は、配列番号 8 の改変 G 6 P a s e - のように、セリンからシステインへの置換をヒト G 6 P a s e - のアミノ酸 2 9 8 に含む。いくつかの例では、核酸分子は、配列番号 6 または配列番号 7 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 0 8 】

改変ヒト G 6 P a s e - をコードする開示されている核酸分子を含むアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターなどのベクターがさらに提供される。いくつかの例では、ベクターは、ヒト G 6 P C プロモーター / エンハンサー ( G P E ) などのプロモーターをさらに含む。

30

【 0 0 0 9 】

改変ヒト G 6 P a s e - をコードする核酸分子を含む組換え A A V ( r A A V ) も提供される。さらに、本明細書に開示されている核酸分子またはベクターを含む単離された宿主細胞が提供される。例えば、単離された宿主細胞は、r A A V の増殖に適した細胞であってよい。

【 0 0 1 0 】

開示されている核酸分子、ベクターおよび r A A V を含む組成物は、本開示によりさらに提供される。

【 0 0 1 1 】

40

糖原病と診断された被験体を処置する方法がさらに提供される。一部の実施形態では、方法は、糖原病 I a 型 ( G S D - I a ) の被験体を選択するステップと、被験体に、治療有効量の本明細書に開示されている r A A V 、または r A A V を含む組成物を投与するステップとを含む。

【 0 0 1 2 】

G 6 P a s e - の欠乏を有する被験体において、被験体に治療有効量の本明細書に開示されている r A A V または r A A V を含む組成物を投与することによって、グルコース恒常性を促進する ; 低血糖を阻害する ; H C A の発症を阻害するもしくは予防する ; H C C の発症を阻害するもしくは予防する ; 腎臓の機能障害もしくは不全を阻害するもしくは予防する ; または G S D - I a に伴う任意の他の合併症を処置する方法も提供される。

50

## 【 0 0 1 3 】

本発明の前述および他の目的、特徴、および利点は、添付の図面を参照して進める以下の発明の詳細な説明からより明白なものになるう。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

( 項目 1 )

改変グルコース - 6 - ホスファターゼ - ( G 6 P a s e - ) をコードする単離された核酸分子であって、前記改変 G 6 P a s e - がセリンからシステインへの置換をヒト G 6 P a s e - ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 2 9 8 に含む、単離された核酸分子。

( 項目 2 )

前記改変 G 6 P a s e - のアミノ酸配列が、配列番号 8 を含むまたはそれからなる、項目 1 に記載の単離された核酸分子。

10

( 項目 3 )

配列番号 6 または配列番号 7 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 または項目 2 に記載の単離された核酸分子。

( 項目 4 )

項目 1 から 3 までのいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

( 項目 5 )

前記改変 G 6 P a s e - をコードする前記核酸分子がプロモーターに作動可能に連結されている、項目 4 に記載のベクター。

( 項目 6 )

前記プロモーターが G 6 P C プロモーターを含む、項目 5 に記載のベクター。

20

( 項目 7 )

前記 G 6 P C プロモーターが配列番号 4 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5 を含む、項目 6 に記載のベクター。

( 項目 8 )

配列番号 4 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 4 4 4 1 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 4 4 4 1 を含む、項目 4 から 7 までのいずれか一項に記載のベクター。

( 項目 9 )

前記ベクターがアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターである、項目 4 から 8 までのいずれか一項に記載のベクター。

30

( 項目 1 0 )

前記 A A V ベクターが A A V 血清型 8 ( A A V 8 ) ベクターである、項目 9 に記載のベクター。

( 項目 1 1 )

配列番号 4 のヌクレオチド 1 7 ~ 4 8 1 9 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 7 ~ 4 8 1 9 を含む、項目 9 または項目 1 0 に記載のベクター。

( 項目 1 2 )

項目 1 から 3 までのいずれか一項に記載の核酸分子または項目 4 から 1 1 までのいずれか一項に記載のベクターを含む単離された宿主細胞。

( 項目 1 3 )

項目 1 から 3 までのいずれか一項に記載の核酸分子を含む組換え A A V ( r A A V ) 。

40

( 項目 1 4 )

前記 r A A V が r A A V 8 である、項目 8 に記載の r A A V 。

( 項目 1 5 )

薬学的に許容される担体中に項目 1 3 または項目 1 4 に記載の r A A V を含む組成物。

( 項目 1 6 )

静脈内投与用に製剤化されている、項目 1 5 に記載の組成物。

( 項目 1 7 )

糖原病と診断された被験体を処置する方法であって、糖原病 I a 型 ( G S D - I a ) を有する被験体を選択するステップと、前記被験体に、治療有効量の項目 1 3 もしくは項目

50

14に記載のrAAVまたは項目15もしくは項目16に記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

(項目18)

グルコース - 6 - ホスファターゼ - (G6Pase - )の欠乏を有する被験体において、前記被験体に、治療有効量の項目13もしくは項目14に記載のrAAVまたは項目15もしくは項目16に記載の組成物を投与するステップを含む、グルコース恒常性を促進する；低血糖を阻害する；肝細胞腺腫(HCA)の発症を阻害するもしくは予防する；肝細胞癌(HCC)の発症を阻害するもしくは予防する；または腎臓の機能障害もしくは不全を阻害するもしくは予防する方法。

(項目19)

G6Pase - の欠乏を有する前記被験体がGSD - Iaを有する、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記rAAVを静脈内に投与する、項目17から19までのいずれか一項に記載の方法。

(項目21)

前記rAAVを約 $1 \times 10^{10}$ から約 $1 \times 10^{14}$ ウイルス粒子(vp)/kgの用量で投与する、項目17から20までのいずれか一項に記載の方法。

(項目22)

前記rAAVを投与するステップが単回用量のrAAVの投与を含む、項目17から21までのいずれか一項に記載の方法。

(項目23)

前記rAAVを投与するステップが複数回用量のrAAVの投与を含む、項目17から21までのいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、イヌ(配列番号1)およびヒト(配列番号2)G6Pase - タンパク質配列のアラインメントである。イヌ配列とヒト配列との間で異なっている18個のアミノ酸残基は、矢印によって示されている。

【0015】

【図2】図2は、9つのヘリックス、H1からH9によって小胞体膜に係留されたヒトG6Pase - を示す(Panら、J Biol Chem 273巻:6144~6148頁、1998年)。ヒトG6Pase - とイヌG6Pase - との間のアミノ酸差異は列挙されている。

【0016】

【図3】図3は、2週齢時にヒトG6PC(AAV - G6PC)、コドン最適化(co)ヒトG6PC(AAV - co - G6PC)、ヒトG6PC - S298C変異体(AAV - G6PC - S298C)またはco - ヒトG6PC - S298C変異体(AAV - co - G6PC - S298C)を発現する組換えAAV8 - GPEベクター( $10^{13}$ vg/kg)を形質導入された4週齢GSD - Ia(G6pc<sup>-/-</sup>)マウスでの肝臓ミクロソームのG6Pase - 活性を示すグラフである。4週齢野生型マウスでの肝臓ミクロソームのG6Pase - 活性は平均 $227.5 \pm 17.6$ nmol/分/mgであった。データは平均 $\pm$ SEMとして示されている。\* \* P < 0.005。

【0017】

【図4】図4は、18個のヒトG6PC変異体それぞれの位置が示されているG6PC cDNA(配列番号11)のヌクレオチド配列を示す。部位特異的変異誘発について、20個のヌクレオチドセンスおよびアンチセンスプライマーは、変異されたコドンが各プライマーの中央に位置付けられるように設計された。

【0018】

【図5】図5は、10日齢時に $5 \times 10^{11}$ vg/kg AAV - co - G6PCベクタ

10

20

30

40

50

ー (n = 3) または rAAV8 - co - G6PC - S298C ベクター (n = 3) で形質導入した 24 日齢 G6pc<sup>-/-</sup> マウスでの肝臓 G6Pase - 活性を示すグラフである。野生型肝臓 G6Pase 活性は、平均  $174 \pm 18.3 \text{ nmol / 分 / mg}$  であった。データは平均  $\pm$  SEM を示している。\* \* P < 0.005。

【0019】

【図 6 - 1】図 6 A ~ 6 E は、rAAV - G6PC による肝臓 G6Pase - 欠乏の補正を実証するデータを示す。L - G6pc<sup>-/-</sup> マウスは 10 週齢時に  $1 \times 10^{12} \text{ vg / kg}$  の rAAV - G6PC で処置され、18 週齢時に分析された。図 6 A は、対照 (n = 7)、L - G6pc<sup>-/-</sup> (n = 7) および AAV マウス (n = 8) における肝臓 G6Pase - 活性を示すグラフである。図 6 B は、対照、L - G6pc<sup>-/-</sup> および AAV マウスの代表的な H & E 染色肝臓の画像である。図 6 C は、対照 (n = 13)、L - G6pc<sup>-/-</sup> (n = 6) および AAV マウス (n = 8) の空腹時耐糖能 (FGT) を示すグラフである。図 6 D は、対照、L - G6pc<sup>-/-</sup> および AAV マウス (n = 8) の肝臓重量を示すグラフである。図 6 E は、対照、L - G6pc<sup>-/-</sup> および AAV マウス (n = 8) のグリコーゲンおよびトリグリセリドの肝臓含有量を示すグラフである。データは平均  $\pm$  SEM を示している。\* P < 0.05、\* \* P < 0.005。

【図 6 - 2】図 6 A ~ 6 E は、rAAV - G6PC による肝臓 G6Pase - 欠乏の補正を実証するデータを示す。L - G6pc<sup>-/-</sup> マウスは 10 週齢時に  $1 \times 10^{12} \text{ vg / kg}$  の rAAV - G6PC で処置され、18 週齢時に分析された。図 6 A は、対照 (n = 7)、L - G6pc<sup>-/-</sup> (n = 7) および AAV マウス (n = 8) における肝臓 G6Pase - 活性を示すグラフである。図 6 B は、対照、L - G6pc<sup>-/-</sup> および AAV マウスの代表的な H & E 染色肝臓の画像である。図 6 C は、対照 (n = 13)、L - G6pc<sup>-/-</sup> (n = 6) および AAV マウス (n = 8) の空腹時耐糖能 (FGT) を示すグラフである。図 6 D は、対照、L - G6pc<sup>-/-</sup> および AAV マウス (n = 8) の肝臓重量を示すグラフである。図 6 E は、対照、L - G6pc<sup>-/-</sup> および AAV マウス (n = 8) のグリコーゲンおよびトリグリセリドの肝臓含有量を示すグラフである。データは平均  $\pm$  SEM を示している。\* P < 0.05、\* \* P < 0.005。

【発明を実施するための形態】

【0020】

配列表

添付の配列表に列挙されている核酸配列およびアミノ酸配列は、37 C. F. R. 1. 822 において定義されている通り、ヌクレオチド塩基については標準の文字略語、およびアミノ酸については 3 文字コードを使用して示されている。各核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、示されている鎖へのいずれの言及にも相補鎖が含まれると理解されたい。配列表は、2015 年 12 月 22 日に作成された、52.8 KB の ASCII テキストファイルとして提出され、これは、参照により本明細書に組み入れられる。添付の配列表では：

【0021】

配列番号 1 は、イヌ G6Pase - タンパク質のアミノ酸配列である。

【0022】

配列番号 2 は、ヒト G6Pase - タンパク質のアミノ酸配列である。

【0023】

配列番号 3 は、以下の特徴を有する pTR - GPE - ヒト G6PC のヌクレオチド配列である：

ITR - ヌクレオチド 17 ~ 163

G6PC プロモーター / エンハンサー - ヌクレオチド 182 ~ 3045

スタッパー - ヌクレオチド 3051 ~ 3184

イントロン - ヌクレオチド 3185 ~ 3321

スタッパー - ヌクレオチド 3322 ~ 3367

G6PC コード配列 - ヌクレオチド 3368 ~ 4441

I T R - ヌクレオチド 4 6 7 4 ~ 4 8 1 9

【 0 0 2 4 】

配列番号 4 は、以下の特徴を有する p T R - G P E - ヒト G 6 P C - S 2 9 8 C のヌクレオチド配列である：

I T R - ヌクレオチド 1 7 ~ 1 6 3

G 6 P C プロモーター / エンハンサー - ヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5

スタッファー - ヌクレオチド 3 0 5 1 ~ 3 1 8 4

イントロン - ヌクレオチド 3 1 8 5 ~ 3 3 2 1

スタッファー - ヌクレオチド 3 3 2 2 ~ 3 3 6 7

G 6 P C コード配列 - ヌクレオチド 3 3 6 8 ~ 4 4 4 1

S 2 9 8 C 変異 - ヌクレオチド 4 2 5 9 ~ 4 2 6 1 ( T C T から T G C )

I T R - ヌクレオチド 4 6 7 4 ~ 4 8 1 9

10

【 0 0 2 5 】

配列番号 5 は、以下の特徴を有する p T R - G P E - コドン最適化 ( c o ) G 6 P C - S 2 9 8 C のヌクレオチド配列である：

I T R - ヌクレオチド 1 7 ~ 1 6 3

G 6 P C プロモーター / エンハンサー - ヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5

スタッファー - ヌクレオチド 3 0 5 1 ~ 3 1 8 4

イントロン - ヌクレオチド 3 1 8 5 ~ 3 3 2 1

スタッファー - ヌクレオチド 3 3 2 2 ~ 3 3 6 7

コドン最適化 G 6 P C コード配列 - ヌクレオチド 3 3 6 8 ~ 4 4 4 1

S 2 9 8 C 変異 - ヌクレオチド 4 2 5 9 ~ 4 2 6 1 ( A G C から T G C )

I T R - ヌクレオチド 4 6 7 4 ~ 4 8 1 9

20

【 0 0 2 6 】

配列番号 6 は、S 2 9 8 C G 6 P a s e - をコードする改変ヒト G 6 P C のヌクレオチド配列である。

【 0 0 2 7 】

配列番号 7 は、S 2 9 8 C G 6 P a s e - をコードするコドン最適化、改変ヒト G 6 P C のヌクレオチド配列である。

【 0 0 2 8 】

配列番号 8 は、改変ヒト S 2 9 8 C G 6 P a s e - のアミノ酸配列である。

30

【 0 0 2 9 】

配列番号 9 は、改変ヒト S 2 9 8 C / A 3 0 1 V G 6 P a s e - のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 0 】

配列番号 1 0 は、ヒトおよびイヌ G 6 P a s e - のアラインメントに基づくアミノ酸コンセンサス配列である。

【 0 0 3 1 】

配列番号 1 1 は、ヒト G 6 P C コード領域のヌクレオチド配列である。

【 0 0 3 2 】

詳細な説明

I . 略語

A A V アデノ随伴ウイルス

C B A ニワトリ - アクチン

C M V サイトメガロウイルス

c o コドン最適化

F G T 空腹時耐糖能

G 6 P グルコース - 6 - リン酸

G 6 P a s e - グルコース - 6 - ホスファターゼ -

G 6 P C グルコース - 6 - ホスファターゼ、触媒サブユニット

40

50



G 6 P T グルコース - 6 - リン酸トランスポーター  
 G P E G 6 P C プロモーター / エンハンサー  
 G S D 糖原病  
 H C A 肝細胞腺腫  
 H C C 肝細胞癌  
 I T R 末端逆位配列  
 O R F オープンリーディングフレーム  
 r A A V 組換え A A V  
 S E M 標準誤差  
 v g ウイルスゲノム  
 v p ウイルス粒子  
 W T 野生型

10

## 【 0 0 3 3 】

## I I . 用語および方法

特に断りのない限り、技術用語は、従来の使用に従って使用されている。分子生物学において一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin、Genes V、Oxford University Press 刊、1994 年 (ISBN 0 - 19 - 854287 - 9) ; Kendrewら (編)、The Encyclopedia of Molecular Biology、published by Blackwell Science Ltd.、1994 年 (ISBN 0 - 632 - 02182 - 9) ; および Robert A. Meyers (編)、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc. 刊、1995 年 (ISBN 1 - 56081 - 569 - 8) に見出すことができる。

20

本開示の種々の実施形態の検討を容易にするために、以下の特定の用語の説明を提示する：

## 【 0 0 3 4 】

アデノ随伴ウイルス (A A V) : ヒトおよびいくつかの他の霊長類種に感染する、小さな、複製欠損性の、エンベロープを有さないウイルスである。A A V は、疾患を引き起こすことは知られておらず、また、非常に軽度の免疫応答を誘発する。A A V を利用した遺伝子療法ベクターは、分裂細胞と静止細胞の両方に感染させることができ、宿主細胞のゲノムに組み込まずに、染色体外の状態で持続させることができる。これらの特徴により、A A V は遺伝子療法のための魅力的なウイルスベクターになっている。現在、11 種類の A A V の血清型 (A A V 1 ~ 11) が認識されている。

30

## 【 0 0 3 5 】

投与 / 投与する：被験体に治療剤（例えば、組換え A A V）などの薬剤を任意の有効な経路によって提供するまたは与えること。例示的な投与経路としては、これだけに限定されないが、注射経路（皮下注射、筋肉内注射、皮内注射、腹腔内注射、および静脈内注射など）、経口経路、管内経路、舌下経路、直腸経路、経皮経路、鼻腔内経路、腔経路および吸入経路が挙げられる。

40

## 【 0 0 3 6 】

コドン最適化された：「コドン最適化された」核酸とは、コドンが特定の系（特定の種または種の群など）における発現に最適なものになるように変更された核酸配列を指す。例えば、核酸配列を、哺乳動物細胞における発現または特定の哺乳動物種（ヒト細胞など）における発現のために最適化することができる。コドン最適化により、コードされるタンパク質のアミノ酸配列は変更されない。

## 【 0 0 3 7 】

エンハンサー：プロモーターの活性を増大させることによって転写の速度を増大させる核酸配列。

## 【 0 0 3 8 】

50

G 6 P C : ヒト染色体 1 7 q 2 1 に位置する、グルコース - 6 - ホスファターゼ - ( G 6 P a s e - ) をコードする遺伝子である。G 6 P a s e - は、3 5 7 アミノ酸の疎水性タンパク質であり、それを小胞体内に固定する 9 つのヘリックスを有する ( C h o u ら、N a t R e v E n d o c r i n o l 6 巻 : 6 7 6 ~ 6 8 8 頁、2 0 1 0 年 ) 。 G 6 P a s e - は、図 2 に描示されている。G 6 P a s e - タンパク質は、糖新生およびグリコーゲン分解の最終ステップにおけるグルコース 6 - リン酸からグルコースおよびリン酸への加水分解を触媒し、また、グルコース恒常性において重要な酵素である。G 6 P C 遺伝子の欠失変異により、肝臓および腎臓におけるグリコーゲンおよび脂肪の蓄積に伴う重度の空腹時性低血糖を特徴とする代謝障害である糖原病 I a 型 ( G S D - I a ) が引き起こされる。

10

#### 【 0 0 3 9 】

糖原病 ( G S D ) : 筋肉、肝臓および他の組織内でのグリコーゲンの合成または分解のプロセシングの欠損に起因する疾患の群である。G S D は、遺伝的なものか、または後天性のもののかであり得る。遺伝的 G S D は、これらのプロセスに關与する代謝の任意の先天性なエラーによって引き起こされる。現在 1 1 種の糖原病 ( G S D I 型、I I 型、I I I 型、I V 型、V 型、V I 型、V I I 型、I X 型、X I 型、X I I 型および X I I I 型 ) が認識されている。G S D - I は、2 つの常染色体劣性障害、G S D - I a および G S D - I b からなる ( C h o u ら、N a t R e v E n d o c r i n o l 6 巻 : 6 7 6 ~ 6 8 8 頁、2 0 1 0 年 ) 。 G S D - I a は、グルコース - 6 - ホスファターゼ - の欠損によって生じる。グルコース - 6 - リン酸トランスポーター ( G 6 P T ) の欠損は G S D - I b の原因となる。

20

#### 【 0 0 4 0 】

糖原病 I a 型 ( G S D - I a ) : フォン・ギールケ病としても知られている G S D - I a は、最も一般的な糖原病であり、発生率は出生数 1 0 0 , 0 0 0 人に約 1 人である。G S D - I a は、酵素であるグルコース - 6 - ホスファターゼ - ( G 6 P a s e - ) の欠損によって生じる遺伝子疾患である。G 6 P a s e - の欠損により、グリコーゲンから、および糖新生から遊離のグルコースを産生する肝臓の能力が損なわれる。G S D - I a に罹患している患者は、グルコース恒常性を維持することができず、空腹時性低血糖、成長遅延、肝腫大、腎肥大症、高脂血症、高尿酸血症、および乳酸血症を示す ( C h o u ら、N a t R e v E n d o c r i n o l 6 巻 : 6 7 6 ~ 6 8 8 頁、2 0 1 0 年 ) 。

30

現在、G S D - I a は治癒できない。

#### 【 0 0 4 1 】

イントロン : タンパク質のコード情報を含有しない遺伝子内のひと続きの D N A である。イントロンは、メッセンジャー R N A の翻訳前に除去される。

#### 【 0 0 4 2 】

末端逆位配列 ( I T R ) : 効率的な複製のために必要な、アデノ随伴ウイルスのゲノム内の対称的な核酸配列である。I T R 配列は、A A V D N A ゲノムの各末端に位置する。I T R は、ウイルス D N A の合成のための複製起点としての機能を果たし、また、A A V 組み込みベクターを生成するために必須のシス成分である。

#### 【 0 0 4 3 】

40

単離された : 「単離された」生物学的成分 ( 核酸分子、タンパク質、ウイルスまたは細胞など ) は、生物の細胞もしくは組織内の他の生物学的成分、または、他の染色体および染色体外の D N A および R N A、タンパク質ならびに細胞などの成分が天然に存在する生物自体から実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸分子およびタンパク質とは、標準の精製方法によって精製されたものを含む。この用語は、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸分子およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸分子およびタンパク質も包含する。

#### 【 0 0 4 4 】

改変 : 本開示の内容では、「改変」G 6 P C または G 6 P a s e - は、野生型配列と比較して ( 配列番号 3 のヌクレオチド 3 3 6 8 ~ 4 4 4 1 として記載のヒト G 6 P C コー

50

ド配列と比較して、または配列番号2として記載のヒトG6Pase - アミノ酸配列と比べてなど)少なくとも1つの核酸またはアミノ酸置換、欠失または挿入を含むG6PC核酸配列またはG6Pase - アミノ酸配列を指す。

【0045】

作動可能に連結した：第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的な関係に置かれている場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と作動可能に連結している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列と作動可能に連結している。一般に、作動可能に連結したDNA配列は連続しており、必要であれば、同じ読み枠内の2つのタンパク質コード領域をつないでいる。

【0046】

薬学的に許容される担体：本開示において有用な薬学的に許容される担体（ビヒクル）は従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences、E. W. Martin著、Mack Publishing Co.、Easton、PA、第15版（1975年）には、1種または複数の治療用化合物、分子または薬剤の薬学的送達に適した組成物および製剤が記載されている。

【0047】

一般に、担体の性質は、使用される特定の投与形式に依存する。例えば、非経口用製剤は、通常、例えば、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどの薬学的かつ生理的に許容される流体をビヒクルとして含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、粉末、錠剤、またはカプセルの形態）に関しては、従来の非毒性固体担体は、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムを含み得る。生物学的に中性の担体に加えて、投与される医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートなどの非毒性の補助物質を微量に含有してよい。

【0048】

疾患を予防すること、処置することまたは好転させること：疾患（GSD-Iaなど）を「予防すること」とは、疾患の完全な発生を阻害することを指す。「処置すること」とは、疾患または病的状態の徴候または症状を、それが発生し始めた後に好転させる治療介入を指す。「好転させる」とは、疾患の徴候または症状の数または重症度を低減することを指す。

【0049】

プロモーター：核酸（例えば、遺伝子）の転写を指向/開始するDNAの領域である。プロモーターは、転写の開始部位の近くの必要な核酸配列を含む。一般には、プロモーターは、転写させる遺伝子の近くに位置する。プロモーターは、必要に応じて、転写の開始部位から数千塩基対ほどに位置し得る遠位のエンハンサーまたはリプレッサーエレメントも含む。

【0050】

精製された：「精製された」という用語は、絶対的な純度を求めるものではなく、相対的な用語として意図されている。したがって、例えば、精製されたペプチド、タンパク質、ウイルス、または他の活性化合物とは、天然に付随するタンパク質および他の混入物から全体的にまたは部分的に単離されたものである。ある特定の実施形態では、「実質的に精製された」という用語は、細胞、細胞培養培地、または他の粗調製物から単離し、分画に供して最初の調製物の種々の成分、例えば、タンパク質、細胞破片（cellular debris）、および他の成分などを除去したペプチド、タンパク質、ウイルスまたは他の活性化合物を指す。

【0051】

組換え：組換え核酸分子は、天然に存在しない配列を有するもの、または、そうでなければ分離している2つの配列のセグメントの人工的な組合せによってできた配列を有するものである。この人工的な組合せは、化学合成によって、または単離された核酸分子のセグメントを人工的に操作することによって、例えば、遺伝子工学の技法などによって成し

10

20

30

40

50

遂げることができる。

#### 【0052】

同様に、組換えウイルスは、天然に存在しないまたは起源が異なる少なくとも2つの配列の人工的な組合せによってできた配列（ゲノム配列など）を含むウイルスである。「組換え」という用語は、単に天然の核酸分子、タンパク質またはウイルスの一部の付加、置換、または欠失によって変更された核酸、タンパク質およびウイルスも含む。本明細書で使用される場合、「組換えAAV」とは、組換え核酸分子（G6Pase- をコードする組換え核酸分子など）がパッケージングされたAAV粒子を指す。

#### 【0053】

配列同一性：2つもしくはそれ超の核酸配列、または2つもしくはそれ超のアミノ酸配列の間の同一性または類似性は、配列間の同一性または類似性に関して表現される。配列同一性は、同一性の百分率の単位で測定することができ、百分率が高いほど、配列の同一性が高い。配列類似性は、類似性の百分率の単位で（保存的アミノ酸置換を考慮に入れる）測定することができ、百分率が高いほど、配列の類似性が高い。核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準の方法を使用してアラインした場合に、比較的高い程度の配列同一性／類似性を有する。この相同性は、オルソログなタンパク質またはcDNAが、より密接に関連する種に由来する場合（ヒト配列とマウス配列など）、関連性がより遠い種（ヒト配列とC. elegans配列など）と比較してより有意である。

#### 【0054】

比較のための配列のアラインメントの方法は当技術分野で周知である。種々のプログラムおよびアラインメントアルゴリズムは、SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2巻：482頁、1981年；NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48巻：443頁、1970年；PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻：2444頁、1988年；HigginsおよびSharp、Gene、73巻：237～44頁、1988年；HigginsおよびSharp、CABIOS 5巻：151～3頁、1989年；Corpetら、Nuc. Acids Res. 16巻：10881～90頁、1988年；Huangら、Computer Appls. in the Biosciences 8巻、155～65頁、1992年；ならびにPearsonら、Meth. Mol. Bio. 24巻：307～31頁、1994年に記載されている。Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403～10頁、1990年には、配列アラインメント方法および相同性の算出に関する詳細な考察が示されている。

#### 【0055】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403～10頁、1990年)は、配列分析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと関連して使用するために、National Center for Biological Information (NCBI)を含めたいくつかの供給源から、インターネット上で入手可能である。追加的な情報は、NCBIウェブサイトにおいて見出すことができる。

#### 【0056】

血清型：特徴的な抗原のセットによって区別される、密接に関連する微生物の群（ウイルスなど）である。

#### 【0057】

スタッパー配列：一般には、2つの核酸特徴の間（プロモーターとコード配列の間など）に所望の間隔を作るため、または核酸分子を所望の長さになるように伸長させるために使用される、より大きな核酸分子（ベクターなど）内に含有されるヌクレオチドの配列を指す。スタッパー配列は、タンパク質コード情報を含有せず、起源不明／合成起源で

10

20

30

40

50

あってよく、かつ／または、より大きな核酸分子内の他の核酸配列と無関係なものであってよい。

【0058】

被験体：ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含むカテゴリーである、生きている多細胞脊椎動物である。

【0059】

合成：実験室において人工的な手段によって作製されたものであり、例えば、合成核酸は、実験室において化学的に合成することができる。

【0060】

治療有効量：指定の医薬品または治療剤（例えば、組換えAAV）の、その剤を用いて処置する被験体、または細胞において所望の効果を実現するために十分な数量である。剤の有効量は、これだけに限定されないが、処置される被験体または細胞、および治療用組成物の投与様式を含めたいくつかの因子に左右される。

【0061】

ベクター：ベクターは、ベクターが複製し、かつ／または宿主細胞に組み込む能力を乱すことなく外来核酸の挿入を可能にする核酸分子である。ベクターは、複製起点などの、宿主細胞におけるベクターの複製を可能にする核酸配列を含み得る。ベクターは、1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および他の遺伝子エレメントも含み得る。発現ベクターは、挿入される遺伝子（複数可）の転写および翻訳を可能にするために必要な調節配列を含有するベクターである。本明細書の一部の実施形態では、ベクターは、AAVベクターである。

【0062】

特に説明がなければ、本明細書において使用され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分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。単数の用語「a（1つの）」、「an（1つの）」、および「the（その）」は、文脈によりそうでないことが明らかでない限り、複数の言及を含む。「AまたはBを含む」とは、Aを含む、またはBを含む、あるいはAおよびBを含むことを意味する。さらに、核酸またはポリペプチドに関して示されている全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量の値はおよそのものであり、説明のために提示されている。本明細書に記載のものと同様または同等である方法および材料を本開示の実施または試験において使用することができるが、適切な方法および材料が以下に記載されている。本明細書において言及されている全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。矛盾する場合は、本明細書が用語の説明を含め、支配する。さらに、材料、方法および実施例は単に例示的なものであり、それに限定されるものではない。

【0063】

III. 導入

糖原病 Ia 型（GSD - Ia）は、グルコース - 6 - ホスファターゼ - （G6Pase - またはG6PC）の欠乏によって生じる生命を脅かす低血糖、肝臓悪性疾患および腎不全に関連する代謝の遺伝性障害であり、主に肝臓および腎臓を侵す。現在の治療法は、成長不全、痛風、肺高血圧症、腎不全の危険がある腎機能障害、骨粗鬆症および、悪性転換して肝細胞癌になる場合がある肝細胞腺腫（HCA）を含む長期合併症を多くの患者において予防できない（Chouら、Curr Mol Med 2巻：121～143頁、2002年、Chouら、Nat Rev Endocrinol 6巻：676～688頁、2010年）。したがって遺伝子療法などの新規治療法の開発は、GSD - Iaのための根治的処置の可能性として正当化される（Chouら、Expert Opin Biol Ther 11巻：1011～1024頁、2011年）。

【0064】

機能性G6Pase - をコードする組換えAAV（rAAV）ベクターは記載されている（ChouおよびMansfield、Expert Opin Biol Ther

10

20

30

40

50

r 11 卷：1011～1024 頁、2011 年に総説されている)。GSD - Ia のマウスモデルを使用した以前の試験では、G6Pase - を発現する組換え AAV は、CBA プロモーター / CMV エンハンサー (Ghosh ら、Gene Ther 13 卷：321～329 頁、2006 年)、イヌ G6PC プロモーター (Koeberl ら、Gene Ther 13 卷：1281～1289 頁、2006 年)、または G6PC 5' フランキンク領域のヌクレオチド - 298～+128 にあるヒト G6PC プロモーター (Koeberl ら、Mol Ther 16 卷：665～672 頁、2008 年) により導かれ、G6Pase - 導入遺伝子を肝臓に送達し、この障害の長期の修正を実現することが示されている。しかし、これらの試験で見込みは示されたが、肝臓 G6Pase - 欠損の完全な修正は誰にもできていない。

10

#### 【0065】

先行研究の一例は、GSD - Ia マウスおよび GSD - Ia イヌ (dog) を処置できた 2 本鎖 rAAV ベクター (rAAV - G6Pase) を開発した Koeberl らによって記載されている (Mol Ther 16 卷：665～672 頁、2008 年)。さらに Yiu ら (Mol Ther 18 卷：1076～1084 頁、2010 年) および Lee ら (Hepatology 56 卷：1719～1729 頁、2012 年) は、同様に効果的な 1 本鎖 rAAV ベクター、rAAV - GPE - G6PC の開発を記載している。2 つのベクターは、いくつかの点で異なっている。第 1 に rAAV - GPE - G6PC は 1 本鎖 rAAV ベクターである一方で、rAAV - G6Pase は 2 本鎖 rAAV ベクターである。2 本鎖 rAAV ベクターは、1 本鎖 DNA ゲノムを 2 本鎖 DNA ゲノムに転換することによって AAV のライフサイクルにおける律速ステップを回避するために開発された (Chou ら、Expert Opin Biol Ther 11 卷：1011～1024 頁、2011 年)。第 2 に rAAV - G6Pase での G6Pase - の発現は、ヌクレオチド - 382 から - 1 のヒト G6PC 最小プロモーター / エンハンサーによって導かれる (Koeberl ら、Mol Ther 16 卷：665～672 頁、2008 年)。rAAV - GPE - G6PC での G6Pase - の発現は、ヌクレオチド - 2864 から - 1 のヒト G6PC プロモーター / エンハンサー (GPE) によって導かれる (Yiu ら、Mol Ther 18 卷：1076～1084 頁、2010 年、Lee ら、Hepatology 56 卷：1719～1729 頁、2012 年)。第 3 に rAAV - GPE - G6PC ベクターは rAAV - G6Pase ベクターに存在しないイントロンを含有している。両方のベクターは、G6Pase - 導入遺伝子を肝臓に効率的に送達し、マウス GSD - Ia を補正した (Koeberl ら、Mol Ther 16 卷：665～672 頁、2008 年、Yiu ら、Mol Ther 18 卷：1076～1084 頁、2010 年、Lee ら、Hepatology 56 卷：1719～1729 頁、2012 年)。

20

30

#### 【0066】

比較研究は、どちらのベクター、rAAV - G6Pase または rAAV - GPE - G6PC が、GSD - Ia を処置することにより効果的であるかを決定するために実施された。結果は、マウス GSD - Ia を補正することにおいて rAAV - GPE - G6PC ベクターが rAAV - G6Pase ベクターよりも効率的であったことを明白に示した。G6PC 最小プロモーターの上流のエンハンサーエレメントは効率的な肝臓導入遺伝子発現のために必要であったことが決定された (Lee ら、Mol Genet Metab 10 卷：275～280 頁、2013 年)。rAAV - GPE - G6PC ベクター内に含有されたイントロンが肝臓 G6Pase - 発現を導く役割を演じるかどうかを決定するために追加的研究が実行された。ヌクレオチド - 382 から - 1 のヒト G6PC 最小プロモーターによって導かれ、rAAV - GPE - G6PC ベクター中に存在するイントロンを含有するヒト G6Pase - を発現する 2 本鎖 rAAV ベクター (rAAV - miGPE - G6PC と称される) が生成された。結果は、マウス GSD - Ia を処置することにおいて rAAV - GPE - G6PC ベクターが rAAV - miGPE - G6PC ベクターよりも効率的であったことを示し、G6PC 最小プロモーターの上流のエンハンサーエ

40

50

メントが効率的な肝臓導入遺伝子発現のために必要であるという結論を支持している (Leeら、Mol Genet Metab 10巻: 275~280頁、2013年)。

#### 【0067】

G6PCプロモーター/エンハンサー (GPE) エレメントを含む組換えAAVベクターは、参照により本明細書に組み入れられるPCT公開第WO2015/081101号にさらに記載される。組換えベクターは、GPE、合成イントロン、およびG6PCコード領域を含む。G6PCコード領域は、必要に応じて、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化される。組換えベクターは、G6PCプロモーター/エンハンサーとイントロンの間ならびにイントロンとG6PCコード配列の間に置かれたスタッパー核酸配列；および5'および3'末端逆位配列 (ITR) 配列をさらに含む。

10

#### 【0068】

G6PCプロモーター/エンハンサー (rAAV-GPE-G6PC) を伴う、G6Pase-を発現する組換えAAVは、in vivoにおける肝臓導入遺伝子の発現の指向に関して、代替プロモーター/エンハンサー (すなわち、ニワトリ - アクチンプロモーター/CMVエンハンサー) を有する別のG6Pase-を発現する組換えAAVよりも著しく効率的であることがPCT公開WO2015/081101に開示されている。24週間の試験期間にわたって、rAAV-GPE-G6PCを用いて処置したG6PC欠損マウス (GSD-Iaに関するモデル) では、血中グルコース、血中代謝産物、肝臓グリコーゲンおよび肝臓脂肪のレベルが正常であることによって証明されるように、肝臓G6PC欠損の完全な正常化が示された (また、Yiuら、Mol Ther 18巻: 1076~1084頁、2010年を参照されたい)。さらに、rAAV-GPE-G6PCで処置したG6pc<sup>-/-</sup>マウスの長期試験により、rAAV-GPE-G6PCによって媒介される遺伝子療法が、3%超の肝臓G6Pase-を発現するマウスにおいて少なくとも70~90週間にわたって効果的であることが実証された。具体的には、rAAV-GPE-G6PCで処置したマウスでは、正常な肝臓脂肪の貯蔵、正常な血中代謝産物および耐糖能プロファイル、空腹時血中インスリンレベルの低下が示され、肝細胞腺腫などの肝臓の異常の証拠はなかった (また、Leeら、Hepatology 56巻: 1719~1729頁、2012年を参照されたい)。

20

#### 【0069】

さらに、G6PCプロモーターの上流のエンハンサーエレメントが、GSD-Iaの動物モデルにおける最適なG6PC発現のために極めて重要であるという所見がPCT公開WO2015/081101に開示された。詳細には、ヌクレオチド-2684~-1 (G6PC開始部位に対して) にG6PCプロモーター/エンハンサーを含むrAAV-GPE-G6PCを用いた処置により、383bpの最小G6PCプロモーター/エンハンサーのみを含有する、G6Pase-を発現する組換えAAVと比較して、GSD-Iaのマウスモデルにおいて、有意に高いレベルの肝臓G6Pase-発現が生じ、肝臓グリコーゲン蓄積のより大きな減少が実現され、また、より良好な絶食耐性 (toleration of fasting) につながることを実証された (また、Leeら、Mol Genet Metab. 110巻 (3号): 275~280頁、2013年を参照されたい)。

30

40

#### 【0070】

PCT公開WO2015/081101には、G6PCプロモーター/エンハンサーとイントロンの間ならびにイントロンとG6PCコード配列の間に存在するスタッパーヌクレオチド配列が、G6Pase-の肝臓形質導入および発現のために重要であるという所見も開示された。具体的には、スタッパー配列を欠くプラスミドUF11-K29-G6PCから作製した組換えAAVでは、7.3nmol/分/mgのG6Pase活性が示された。比較すると、プラスミドUF11-GPE-G6PCから作製した組換えAAVでは、33.0nmol/分/mgのG6Pase活性が示された。

#### 【0071】

50

さらに、PCT公開WO2015/081101に開示されているデータは、G6PCコード配列のコドン最適化により、rAAV-co-GPE-G6PC(コドン最適化されたG6PC核酸配列を含有する)の投与後には、野生型G6PCをコードするrAAV-GPE-G6PCの投与と比較して翻訳の効率がおよそ1.5~2.5倍上昇し、その結果、肝臓におけるG6Pase-発現が有意に大きくなることを実証した。

#### 【0072】

したがって、ヌクレオチド-2684~-1におけるG6PCプロモーター/エンハンサー、合成イントロン、イントロンに隣接するスタッパー配列、およびG6PCコード領域(野生型またはコドン最適化された)を含む組換えAAVが、効率的な肝臓導入遺伝子の発現およびin vivoにおけるGSD-Iaの処置のために重要な特徴である。

10

#### 【0073】

本開示は、ヒトG6PCが、コードされるG6Pase-酵素のホスホヒドロラーゼ活性を増強するために特異的位置で改変され得ることを初めて示す。改変G6Pase-コード配列は、糖原病の処置有効性を増強するためにrAAV遺伝子療法ベクターに組み入れられてよい。

#### 【0074】

IV.いくつかの実施形態の概要

本明細書では、イヌG6Pase-酵素がヒトG6Pase-酵素よりも活性であることが開示される。2つのタンパク質のアミノ酸アラインメントは、それらが18個の残基で配列において異なっていることを明らかにした。ホスホヒドロラーゼ活性が増大しているヒトG6Pase-変異体を同定するために、イヌG6Pase-由来の少なくとも1つの対応するアミノ酸を含有する変異体が生成された。

20

#### 【0075】

本明細書では、糖原病、特にGSD-Iaを処置するための遺伝子療法の適用において使用することができる組換え核酸分子、AAVベクターおよび組換えAAVが提供される。

#### 【0076】

一部の実施形態では、改変G6Pase-をコードする単離された核酸分子であって、改変G6Pase-がセリンからシステインへの置換をヒトG6Pase-のアミノ酸298(野生型ヒトG6Pase-のアミノ酸配列は本明細書で配列番号2として記載される)に含む単離された核酸分子が提供される。改変G6Pase-は、タンパク質が酵素活性を保持している限り追加的残基に改変を含んでよい。例えば改変G6Pase-は、イヌG6Pase-配列とヒトG6Pase-配列との間で異なる他の残基に置換を含んでよく、そのような残基は、ヒトG6Pase-(配列番号2として記載)の3、54、139、196、199、242、247、292、301、318、324、332、347、349、350および/または353位を含む。図1は、ヒトG6Pase-タンパク質配列とイヌG6Pase-タンパク質配列のアラインメントを示し、表2は、ヒトG6Pase-とイヌG6Pase-との間のアミノ酸差異の要約を提供する。本開示は、上および表2に列挙されている残基の1つまたは複数でアミノ酸配列を変更させるヌクレオチド置換を企図する。

30

40

#### 【0077】

いくつかの例では、核酸分子は、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一であり、アミノ酸298にセリンからシステインへの置換を有するアミノ酸配列を有する改変G6Pase-をコードする。具体的な例では、改変G6Pase-のアミノ酸配列は、配列番号8(ヒトS298C-G6Pase-)を含むまたはそれからなる。他の具体的な例では、改変G6Pase-のアミノ酸配列は、配列番号9(ヒトS298C/A301V-G6Pase-)を含むまたはそれからなる。非限定的な例では、単離された核酸分子は、配列番号6(S298C-G6Pase-)をコードする改変ヒトG6PC)または配列番号7(S298C-G6

50



P a s e - をコードするコドン最適化改変ヒト G 6 P C ) のヌクレオチド配列を含む。  
【 0 0 7 8 】

本発明では改変 G 6 P a s e - をコードする単離された核酸分子を含むベクターも提供される。一部の実施形態では、改変 G 6 P a s e - をコードする核酸分子は、G 6 P C プロモーターなどのプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの例では、G 6 P C プロモーターは、配列番号 4 ( ヒト G 6 P C プロモーター / エンハンサー ) のヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % 同一である、または配列番号 5 ( ヒトコドン最適化 G 6 P C プロモーター / エンハンサー ) の 1 8 2 ~ 3 0 4 5 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % 同一である。非限定的な例では、G 6 P C プロモーターは、配列番号 4 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 3 0 4 5 を含む。

10

【 0 0 7 9 】

いくつかの例では、ベクターは、配列番号 4 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 4 4 4 1 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 4 4 4 1 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を含む。特定の非限定的な例では、ベクターは、配列番号 4 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 4 4 4 1 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 8 2 ~ 4 4 4 1 を含む。

20

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態では、ベクターは、A A V ベクターである。A A V 血清型は、導入遺伝子を被験体に送達するのに適した任意の血清型であってよい。いくつかの例では、A A V ベクターは、血清型 8 A A V ( A A V 8 ) である。他の例では、A A V ベクターは、血清型 1、2、3、4、5、6、7、9、10、11 または 12 ベクター ( すなわち、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 9、A A V 10、A A V 11 または A A V 12 ) である。さらに他の例では、A A V ベクターは、2 つまたはそれ超の A A V 血清型のハイブリッド ( これだけに限定されないが、A A V 2 / 1、A A V 2 / 7、A A V 2 / 8 または A A V 2 / 9 など ) である。A A V 血清型の選択は、遺伝子療法の標的とされる細胞型 ( 複数可 ) に一部依存する。G S D - I a の処置に関しては、肝臓および腎臓が関連する標的器官である。

30

【 0 0 8 1 】

A A V ベクターが使用される場合、ベクターは、末端逆位配列 ( I T R ) を含む場合がある。一部の実施形態では、A A V ベクターは、配列番号 4 のヌクレオチド 1 7 ~ 4 8 1 9 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 7 ~ 4 8 1 9 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの例では、A A V ベクターは、配列番号 4 のヌクレオチド 1 7 ~ 4 8 1 9 または配列番号 5 のヌクレオチド 1 7 ~ 4 8 1 9 を含む。

40

【 0 0 8 2 】

本明細書では、本明細書に開示されている核酸分子またはベクターを含む単離された宿主細胞も提供される。例えば、単離された宿主細胞は、組換え A A V ( r A A V ) を作製するのに適した細胞 ( または細胞株 ) であってよい。いくつかの例では、宿主細胞は、H E K - 2 9 3 細胞、B H K 細胞、V e r o 細胞、R D 細胞、H T - 1 0 8 0 細胞、A 5 4 9 細胞、C o s - 7 細胞、A R P E - 1 9 細胞、または M R C - 5 細胞などの哺乳動物細胞である。

【 0 0 8 3 】

さらに、本明細書に開示されている核酸分子を含む r A A V が提供される。一部の実施形態では、r A A V は、r A A V 8 および / または r A A V 2 である。しかし、A A V 血

50

清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV9、AAV10、AAV11もしくはAAV12などの任意の他の適切なAAV血清型、または2つもしくはそれ超のAAV血清型のハイブリッド（これだけに限定されないが、AAV2/1、AAV2/7、AAV2/8またはAAV2/9など）であってよい。本明細書に開示されているrAAVと薬学的に許容される担体とを含む組成物も本開示により提供される。一部の実施形態では、組成物を静脈内投与または筋肉内投与用に製剤化する。rAAVを投与するための適切な医薬製剤は、例えば、米国特許出願公開第2012/0219528号（参考として本明細書に援用される）に見出すことができる。

#### 【0084】

さらに、糖原病と診断された被験体を処置する方法であって、GSD-Iaの被験体を選択するステップと、被験体に、治療有効量の本明細書に開示されているrAAV（またはrAAVを含む組成物）を投与するステップとを含む方法が提供される。

#### 【0085】

グルコース-6-ホスファターゼ（G6Pase-）の欠乏を有する被験体において、グルコース恒常性を促進する；低血糖を阻害する；肝細胞腺腫（HCA）の発症を阻害するもしくは予防する；肝細胞癌（HCC）の発症を阻害するもしくは予防する；腎臓の機能障害もしくは不全を阻害するもしくは予防する；成長遅延を阻害するもしくは予防する；肝腫大を阻害するもしくは予防する；腎肥大症を阻害するもしくは予防する；高脂血症を阻害するもしくは予防する；肺高血圧症を阻害するもしくは予防する；またはGSD-Iaに伴う任意の他の合併症を処置する、予防するもしくは阻害する方法も、本開示によって提供される。一部の実施形態では、方法は、被験体に、治療有効量の本明細書に開示されているrAAV（またはrAAVを含む組成物）を投与するステップを含む。一部の実施形態では、G6Pase-の欠乏を有する被験体は、GSD-Iaを有する被験体である。したがって、いくつかの例では、方法は、GSD-Iaを有する被験体を選択するステップを含む。

#### 【0086】

本明細書に開示されている方法の一部の実施形態では、rAAVは、静脈内に投与される。

#### 【0087】

一部の実施形態では、rAAVを、約 $1 \times 10^{10}$ ～約 $1 \times 10^{14}$ ウイルス粒子（vp）/kgの用量で投与する。いくつかの例では、rAAVを、約 $1 \times 10^{11}$ ～約 $8 \times 10^{13}$ vp/kgまたは約 $1 \times 10^{12}$ ～約 $8 \times 10^{13}$ vp/kgの用量で投与する。他の例では、rAAVを、約 $1 \times 10^{13}$ ～約 $6 \times 10^{13}$ vp/kgの用量で投与する。特定の非限定的な例では、rAAVを、少なくとも約 $1 \times 10^{10}$ vp/kg、少なくとも約 $5 \times 10^{10}$ vp/kg、少なくとも約 $1 \times 10^{11}$ vp/kg、少なくとも約 $5 \times 10^{11}$ vp/kg、少なくとも約 $1 \times 10^{12}$ vp/kg、少なくとも約 $5 \times 10^{12}$ vp/kg、少なくとも約 $1 \times 10^{13}$ vp/kg、少なくとも約 $5 \times 10^{13}$ vp/kg、または少なくとも約 $1 \times 10^{14}$ vp/kgの用量で投与する。他の非限定的な例では、rAAVを、約 $1 \times 10^{10}$ vp/kg以下、約 $5 \times 10^{10}$ vp/kg以下、約 $1 \times 10^{11}$ vp/kg以下、約 $5 \times 10^{11}$ vp/kg以下、約 $1 \times 10^{12}$ vp/kg以下、約 $5 \times 10^{12}$ vp/kg以下、約 $1 \times 10^{13}$ vp/kg以下、約 $5 \times 10^{13}$ vp/kg以下、または約 $1 \times 10^{14}$ vp/kg以下の用量で投与する。1つの非限定的な例では、rAAVを、約 $1 \times 10^{12}$ vp/kgの用量で投与する。別の非限定的な例では、rAAVを、約 $1 \times 10^{11}$ vp/kgの用量で投与する。rAAVは、所望の治療結果のために、必要に応じて、単回用量で、または複数回用量（2用量、3用量、4用量、5用量、6用量、7用量、8用量、9用量または10用量など）で投与することができる。

#### 【0088】

V. 改変ヒトG6PC/G6Pase- 配列

イヌG6Pase- 酵素がヒトG6Pase- 酵素よりも活性であることが本明細

書に開示されている。図 1 および表 2 に示す通り、2 つのタンパク質は、18 残基で配列において異なっている。部位特異的変異誘発を使用して、ホスホヒドロラーゼ活性が増大しているヒト G 6 P a s e - 変異体が同定された。生成されたヒト G 6 P a s e - 変異体は、イヌ G 6 P a s e - 由来の 1 つまたは複数の対応するアミノ酸を配列番号 2 の 3、54、139、196、199、242、247、292、298、301、318、324、332、347、349、350 および / または 353 位 (複数可) に含有した。ヒト G 6 P a s e - 配列およびヒト / イヌ G 6 P a s e - コンセンサス配列は、下に記載される。

#### 【化 1】

##### ヒト G6Pase- $\alpha$ (配列番号 2):

MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDWF ILVSVIADLR NAFYVLFPIW FHLQEAVGIK	60
LLWVAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPSPSGHA	120
MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRC LNVILWLGFW AVQLNVCLSR IYLAHFPHQ	180
VVAGVLSGIA VAETFSHIHS IYNASLKKYF LITFFLFSA IGFYLLKGL GVDLLWTLEK	240
AQRWCEQPEW VHIDTTPFAS LLKNLGTFLG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLSSIV	300
ASLVLLHVFD SLKPPSQVEL VFYVLSFCKS AVVPLASVSV IPYCLAQVLG QPHKKSL	357

10

##### ヒト / イヌ G6Pase- $\alpha$ コンセンサス配列 (配列番号 10):

MEXGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDWF ILVSVIADLR NAFYVLFPIW FHLXEAVGIK	60
LLWVAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPSPSGHA	120
MGTAGVYYVM VTSTLSIFXG KXKPTYRFRC LNVILWLGFW AVQLNVCLSR IYLAHFPHQ	180
VVAGVLSGIA VAETFXHIXS IYNASLKKYF LITFFLFSA IGFYLLKGL GVDLLWTLEK	240
AXRWCEXPEW VHIDTTPFAS LLKNLGTFLG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WXPFRSLXIV	300
XSLVLLHVFD SLKPPSQXEL VFYXLSFCKS AXVPLASVSV IPYCLAXVXX QPXKKSL	357

20

#### 【0089】

一部の実施形態では、配列番号 10 を含む改変 G 6 P a s e - が本明細書で提供され、式中アミノ酸残基 3 の X = K もしくは E ; アミノ酸残基 54 の X = R もしくは Q ; アミノ酸残基 139 の X = R もしくは Q ; アミノ酸残基 142 の X = K もしくは I ; アミノ酸残基 196 の X = R もしくは S ; アミノ酸残基 199 の X = Q もしくは H ; アミノ酸残基 242 の X = R もしくは Q ; アミノ酸残基 247 の X = R もしくは Q ; アミノ酸残基 292 の X = F もしくは L ; アミノ酸残基 298 の X = C もしくは S ; アミノ酸残基 301 の X = V もしくは A ; アミノ酸残基 318 の X = T もしくは V ; アミノ酸残基 324 の X = T もしくは V ; アミノ酸残基 332 の X = A もしくは V ; アミノ酸残基 347 の X = R もしくは Q ; アミノ酸残基 349 の X = F もしくは L ; アミノ酸残基 350 の X = D もしくは G ; またはアミノ酸残基 353 の X = D もしくは H、またはこれらの任意の組合せ。

30

#### 【0090】

具体的な例では、改変 G 6 P a s e - 配列は、下に記載の通り S 298 C 変異を含む、または S 298 C および A 310 V 変異を含む。非限定的な例では、改変 G 6 P a s e - 配列は、配列番号 8 または配列番号 9 を含むまたはそれからなる。

## 【化 2】

ヒトG6Pase- $\alpha$  S298C(配列番号8):

```

MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDWF ILVSVIADLR NAFYVLFPIW FHLQEAVGIK      60
LLWVAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPSPSPGHA      120
MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRC LNVILWLGFV AVQLNVCLSR IYLAHFPHQ        180
VVAGVLSGIA VAETFSHIHS IYNASLKKYF LITFFLFSFA IGFYLLKGL GVDLLWTLEK        240
AQRWCEQPEW VHDITTPFAS LLKNLGTFLG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLSCIV      300
ASLVLLHVFD SLKPPSQVEL VFYVLSFCKS AVVPLASVSV IPYCLAQVLG QPHKKSL          357

```

ヒトG6Pase- $\alpha$  S298C/A310V(配列番号9):

```

MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDWF ILVSVIADLR NAFYVLFPIW FHLQEAVGIK      60
LLWVAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPSPSPGHA      120
MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRC LNVILWLGFV AVQLNVCLSR IYLAHFPHQ        180
VVAGVLSGIA VAETFSHIHS IYNASLKKYF LITFFLFSFA IGFYLLKGL GVDLLWTLEK        240
AQRWCEQPEW VHDITTPFAS LLKNLGTFLG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLSCIV      300
VSLVLLHVFD SLKPPSQVEL VFYVLSFCKS AVVPLASVSV IPYCLAQVLG QPHKKSL          357

```

## 【 0 0 9 1】

一部の実施形態では、S 2 9 8 C 変異を含む改変 G 6 P a s e - は、下に記載の核酸配列によってコードされる。

## 【化 3】

## ヒトG6PC S298C(配列番号6):

```

      ATG GAGGAAGGAA TGAATGTTCT CCATGACTTT GGGATCCAGT CAACACATTA CCTCCAGGTG AATTACCAAG
ACTCCCAGGA CTGGTTCATC TTGGTGTCCG TGATCGCAGA CCTCAGGAAT GCCTTCTACG TCCTCTTCCC CATCTGGTTC
CATCTTCAGG AAGCTGTGGG CATTAACTC CTTTGGGTAG CTGTGATTGG AGACTGGCTC AACCTCGTCT TTAAGTGGAT
TCTCTTTGGA CAGCGTCCAT ACTGGTGGGT TTTGGATACT GACTACTACA GCAACACTTC CGTGCCCTCG ATAAAGCAGT
TCCCTGTAA C TG TGAGACT GGACAGGGA GCCCCTCTGG CCATGCCATG GGCACAGCAG GTGTATACTA CGTGATGGTC
ACATCTACTC TTTCCATCTT TCAGGAAAG ATAAAGCCGA CCTACAGATT TCGGTGCTTG AATGTCATTT TGTGGTTGGG
ATTCTGGGCT GTGCAGCTGA ATGTCTGTCT GTCACGAATC TACCTTGCTG CTCATTTTCC TCATCAAGTT GTTGCTGGAG
TCCTGTCAGG CATTGCTGTT GCAGAAACTT TCAGCCACAT CCACAGCATC TATAATGCCA GCCTCAAGAA ATATTTTCTC
ATTACCTTCT TCCTGTTTCA CTTCGCCATC GGATTTTATC TGCTGCTCAA GGGACTGGGT GTAGACCTCC TGTGGACTCT
GGAGAAAGCC CAGAGGTGGT GCGAGCAGCC AGAATGGGTC CACATTGACA CCACACCCTT TGCCAGCCTC CTCAAGAACC
TGGGCACGCT CTTTGGCCTG GGGCTGGCTC TCAACTCCAG CATGTACAGG GAGAGCTGCA AGGGGAAACT CAGCAAGTGG
CTCCCATTC GCCTCAGCTG CATTGTAGCC TCCCTCGTCC TCCTGCACGT CTTTGACTCC TTGAAACCCC CATCCCAAGT
CGAGCTGGTC TTCTACGTCT TGTCTTCTG CAAGAGTGCG GTAGTGCCCC TGGCATCCGT CAGTGTCTAT CCCTACTGCC
TCGCCCAGGT CCTGGGCCAG CGCACACAAGA AGTCGTTGTA A

```

## ヒトコドン最適化G6PC S298C(配列番号7):

```

      ATG GAAGAGGGCA TGAACGTGCT GCACGACTTC GGCATCCAGA GCACCCACTA TCTGCAGGTC AACTACCAGG ACAGCCAGGA
CTGGTTCATC CTGGTGTCCG TGATCGCCGA CCTGCGGAAC GCCTTCTACG TGCTGTTCCT CATCTGGTTC CATCTGCAAG AAGCCGTCGG
CATCAAGCTG CTGTGGGTGG CCGTGATCGG CGATTGGCTG AACCTGGTGT TCAAGTGGAT CCTGTTCCGG CAGCGGCCCT ATTGGTGGGT
GCTGGACACC GACTACTACA GCAACACCAG CGTGCCCTCG ATCAAGCAGT TCCCGTGAC CTGCGAGACA GGCCCTGGCT CTCCTTCTGG
CCACGCCATG GGAACAGCCG GCGTGTACTA CGTGATGGTC ACCAGCACCC TGAGCATCTT CCAGGGCAAG ATCAAGCCCA CCTACCGGTT
CCGGTGCCCT AACCTGATCC TGTGGCTGGG CTTCTGGGCC GTGCAGCTGA ACGTGTGCCT GAGCCGGATC TACCTGGCCG CCCACTTCCC
ACATCAAGTG GTGGCCGGCG TGCTGAGCGG AATCGCCGTG GCCGAGACAT TCAGCCACAT CCACAGCATC TACAACGCCA GCCTGAAGAA
GTACTTCTG ATCACATTCT TTCTGTTTCA CTTCGCCATC GGCTTCTACC TGCTGCTGAA GGGCCTGGGC GTGGACCTGC TGTGGACCCT
GGAAAAGGCC CAGCGGTGGT GCGAGCAGCC CGAGTGGGTG CACATCGACA CCACCCCTT CGCCAGCCTG CTGAAGAACC TGGGCACCCT
GTTTGGACTG GGCCTGGCCC TGAACAGCAG CATGTACAGA GAGAGCTGCA AGGGCAAGCT GAGCAAGTGG CTGCCCTTCC GGCTGAGCTG
CATCGTGGCC AGCCTGGTGC TGCTGCACGT GTTCGACAGC CTGAAGCCCC CCAGCCAGGT GGAAGTGGT TTTTACGTGC TGAGCTTCTG
CAAGAGCGCC GTGGTGCCCC TGGCTCCGT GTCTGTGATC CCCTACTGCC TGGCTCAGGT GCTGGGCCAG CCCACAAGA AGTCCTCTG A

```

## 【 0 0 9 2】

VI. 遺伝子療法の適用のための組換え AAV

AAVは、Parvoviridae科Dependovirus属に属する。AAV

10

20

30

40

50

は、直鎖状の一本鎖DNAゲノムをパッケージングする、小さな、エンベロープを有さないウイルスである。AAV DNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖はどちらも同等の頻度でAAVカプシドにパッケージングされる。

#### 【0093】

AAVゲノムは、2つのオープンリーディングフレーム(ORF)に隣接する2つの末端逆位配列(ITR)を特徴とする。AAV2ゲノムでは、例えば、ITRの最初の125ヌクレオチドはパリンドロームであり、それ自体の上に折り重なって塩基対形成を最大にし、T字形ヘアピン構造を形成する。D配列と称されるITRの他の20塩基は対形成しないままである。ITRは、AAV DNA複製に重要なシス作用性配列であり、ITRは、複製起点であり、DNAポリメラーゼによる第2の鎖の合成のためのプライマーとしての機能を果たす。複製型単量体と称される、この合成の間に形成される二本鎖DNAを第2のラウンドの自己プライミング複製に使用し、複製型二量体を形成する。これらの二本鎖中間体は鎖置換機構によってプロセッシングされ、その結果、パッケージングのために使用される一本鎖DNAと転写のために使用される二本鎖DNAがもたらされる。ITR内には、Rep結合性エレメントおよび末端分解部位(terminal resolution site)(TRS)が位置する。これらの特徴は、ウイルス調節タンパク質Repにより、AAV複製の間に二本鎖中間体をプロセッシングするために使用される。AAV複製における役割に加えて、ITRは、AAVゲノムのパッケージング、転写、非許容条件下での負の調節、および部位特異的組み込みにも必須である(DayaおよびBerns、Clin Microbiol Rev 21巻(4号):583~593頁、2008年)。

10

20

#### 【0094】

AAVの左側のORFは、4種のタンパク質-Rep78、Rep68、Rep52およびRep40をコードするRep遺伝子を含む。右側のORFは、3種のウイルスカプシドタンパク質(VP1、VP2およびVP3)を産生させるCap遺伝子を含む。AAVカプシドは、正二十面体対称に配置された60種のウイルスカプシドタンパク質を含む。VP1、VP2およびVP3は、1:1:10のモル比で存在する(DayaおよびBerns、Clin Microbiol Rev 21巻(4号):583~593頁、2008年)。

30

#### 【0095】

AAVは、現在、遺伝子療法のために最も頻繁に使用されているウイルスのうちの1つである。AAVは、ヒトおよびいくつかの他の霊長類種に感染するが、疾患を引き起こすことは知られておらず、また、非常に軽度の免疫応答を誘発する。AAVを利用した遺伝子療法ベクターは、分裂細胞と静止細胞の両方に感染させることができ、宿主細胞のゲノムに組み込まずに染色体外の状態で持続させることができる。AAVの有利な特徴に起因して、本開示は、本明細書に開示されている組換え核酸分子および方法のためのAAVの使用を企図する。

#### 【0096】

AAVは、標的細胞に結合し、侵入する能力、核に侵入する能力、核内で長期間にわたって発現させる能力、および毒性が低いことを含めた、遺伝子療法ベクターに望ましい特徴をいくつか有する。しかし、AAVゲノムのサイズが小さいことにより、組み入れることができる異種DNAのサイズが限定される。この問題を最小限にするために、Repおよび組み込み効率エレメント(integration efficiency element)(IEE)をコードしないAAVベクターが構築されている。ITRは、パッケージングのために必要なシスシグナルであるので、保持される(DayaおよびBerns、Clin Microbiol Rev 21巻(4号):583~593頁、2008年)。

40

#### 【0097】

遺伝子療法に適したrAAVを作製するための方法は当技術分野で周知であり(例えば

50

、米国特許出願第2012/0100606号；同第2012/0135515号；同第2011/0229971号；および同第2013/0072548号；およびGhoshら、Gene Ther 13巻(4号)：321～329頁、2006年を参照されたい)、本明細書に開示されている組換え核酸分子、ベクターおよび方法と共に利用することができる。

#### 【0098】

以下の実施例は、ある特定の特徴および/または実施形態を例示するために提供される。これらの実施例は、本開示を、記載されている特定の特徴または実施形態に限定するものと解釈されるべきではない。

#### 【実施例】

10

#### 【0099】

(実施例1：AAV媒介遺伝子療法における使用のためのヒトG6PC(G6Pase-)変異体の構築および特徴付け)

この実施例は、18個のヒトG6PC変異体の生成およびホスホヒドロラーゼ活性が増大した特異的なG6Pase-変異体の同定を記載する。

#### 【0100】

##### G6PC変異体の構築

ヒトG6PC変異体を構築するために、ヒトG6PC cDNA(配列番号11；ヌクレオチド1～3に開始コドンATGを含むコード領域全体)のヌクレオチド1から1074を含むpSVLベクターを鋳型として使用した。PCR誘導変異誘発のために鋳型を、中央で変異されたコドンを含む20ヌクレオチド長センスおよびアンチセンス変異体プライマーに隣接したヌクレオチド1から20(センス)および1055から1074(アンチセンス)に一致する2つの外側PCRプライマーを使用して増幅した(図4および下の表1を参照されたい)。hG6PC-S298C/A301V二重変異体のための鋳型はpSVL-hG6PC-S298C変異体であった。変異された配列をpSVLにクローニングし、DNA配列決定によって検証した。

20

## 【表 1】

表 1. ヒト G6PC 変異体中のヌクレオチド変化

変異	ヌクレオチド/コドン変化	ヒト G6PC 中の配列
R3K	GAA (R) → AAA (K)	ヌクレオチド 7-9
Q54R	CAG (Q) → CGT (R)	ヌクレオチド 160-162
Q139R	CAG (Q) → CGG (R)	ヌクレオチド 415-417
I142K	ATA (I) → AAA (K)	ヌクレオチド 424-426
S196R	AGC (S) → CGC (R)	ヌクレオチド 586-588
H199Q	CAC (H) → CAG (Q)	ヌクレオチド 595-597
Q242R	CAG (Q) → AGG (R)	ヌクレオチド 724-726
Q247R	CAG (Q) → CGG (R)	ヌクレオチド 739-741
L292F	CTC (L) → TTC (F)	ヌクレオチド 874-876
S298C	TCT (S) → TGC (C)	ヌクレオチド 892-894
A301V	GCC (A) → GTG (V)	ヌクレオチド 901-903
V318T	GTC (V) → ACT (T)	ヌクレオチド 952-954
V324T	GTC (V) → ACC (T)	ヌクレオチド 970-972
V332A	GTA (V) → GCA (A)	ヌクレオチド 994-996
Q347R	CAG (Q) → CGG (R)	ヌクレオチド 1039-1041
L349F	CTG (L) → TTC (F)	ヌクレオチド 1045-1047
G350D	GGC (G) → GAC (D)	ヌクレオチド 1048-1050
H353D	CAC (H) → GAC (D)	ヌクレオチド 1057-1059

## 【 0 1 0 1 】

COS-1 細胞における発現およびホスホヒドロラーゼアッセイ

COS-1 細胞を 4 % ウシ胎児血清を補充した HEPES 緩衝ダルベッコ改変最小基礎培地において、37 °C で増殖させた。G6PC 構築物を DEAE デキストラン / クロロキン法によって COS-1 細胞にトランスフェクトした。37 °C、2 日間のインキュベーション後、トランスフェクトした培養物をホスホヒドロラーゼ活性のために回収した。簡潔には、50 mM カコジル酸緩衝液、pH 6.5、10 mM の G6P および適量の細胞ホモジネートを含む反応混合物 (50 µl) を 37 °C、10 分間、以前に記載されている通りインキュベートした (Lei ら、Science 262 巻: 580 ~ 583 頁、1993 年)。

## 【 0 1 0 2 】

統計分析

独立 t 検定を、GraphPad Prism Program、version 4 (GraphPad Software、San Diego、CA) を使用して実施した。値は、p < 0.05 であれば統計学的に有意とみなした。

## 【 0 1 0 3 】

結果

ヒトおよびイヌ G 6 P a s e - のホスホヒドロラーゼ活性を *in vitro* 発現アッセイによって比較した。結果はイヌ酵素がヒト酵素の約 5 倍の活性であったことを実証した。イヌおよびヒト配列の配列アラインメントは、2 つの酵素が 18 個のアミノ酸残基だけ異なっていることを示した (図 1 および表 2)。

【表 2】

表 2. ヒト G6Pase- $\alpha$  とイヌ G6Pase- $\alpha$  との間のアミノ酸差異

	アミノ酸	アミノ酸	アミノ酸	アミノ酸	アミノ酸
イヌ	K3	R54	R139	K142	R196
ヒト	E3	Q54	Q139	I142	S196
イヌ	Q199	R242	R247	F292	<b>C298</b>
ヒト	H199	Q242	Q247	L292	S298
イヌ	V301	T318	T324	A332	R347
ヒト	A301	V318	V324	V332	Q347
イヌ	F349	D350	D353		
ヒト	L349	G350	H353		

【 0 1 0 4 】

どのアミノ酸置換がイヌ G 6 P a s e - の酵素活性の増大を生じたかを決定するために、18 個のヒト G 6 P C 変異体を部位特異的変異誘発によって構築した。各変異体はイヌ G 6 P a s e - 由来の対応するアミノ酸の 1 つを保有していた。18 個のヒト G 6 P a s e - 変異体のホスホヒドロラーゼ活性を一過性発現アッセイによって調査した。結果は、G 6 P C - W T 構築物の活性より 2 . 1 4 倍高い活性を有して、ヒト G 6 P C - S 2 9 8 C 構築物が最も活性であったことを示した (表 3)。G 6 P C - A 3 0 1 V 変異体もより活性であり、G 6 P C - W T より 1 . 3 5 倍活性であった。次いで二重 S 2 9 8 C / A 3 0 1 V 変異体 (h G 6 P C - S 2 9 8 C / A 3 0 1 V) を構築した。この二重変異体は単一 h G 6 P C - S 2 9 8 C 変異体と同等に活性であった (表 3)。



【表 3】

表 3. ヒト G6PC 変異体のホスホヒドロラーゼ活性

G6PC 構築物	位置	ホスホヒドロラーゼ活性 (nmol/分/mg)
pSVL-hG6PC-WT		164.5 ± 9.5 (100%)
pSVL-hG6PC-E3K	N 末端	156.0 ± 6.3
pSVL-hG6PC-Q54R	C1	169.6 ± 7.3
pSVL-hG6PC-Q139R	C2	113.1 ± 6.7
pSVL-hG6PC-I142K	C2	141.0 ± 4.4
pSVL-hG6PC-S196R	H5	90.5 ± 2.5
pSVL-hG6PC-H199Q	C3	154.0 ± 7.4
pSVL-hG6PC-Q242R	L3	174.5 ± 4
pSVL-hG6PC-Q247R	L3	143.8 ± 16.4
pSVL-hG6PC-L292F	H8	140.3 ± 20.3
<b>pSVL-hG6PC-S298C</b>	<b>H8</b>	<b>351.8 ± 16.4 (214%)</b>
pSVL-hG6PC-A301V	H8	221.7 ± 12.5 (135%)
pSVL-hG6PC-S298C/A301V	H8	353.7 ± 18.8 (215%)
pSVL-hG6PC-V318T	L4	156.7 ± 16.3
pSVL-hG6PC-V324T	H9	117.6 ± 8.2
pSVL-hG6PC-V332A	H9	160.5 ± 13.1
pSVL-hG6PC-Q347R	C 末端	162.5 ± 7.9
pSVL-hG6PC-L349F	C 末端	186.4 ± 5.9 (113%)
pSVL-hG6PC-G350D	C 末端	146.6 ± 16.7
pSVL-hG6PC-H353D	C 末端	164.7 ± 2.8

## 【 0 1 0 5 】

pSVL ベクター中のヒト (h) G6PC 野生型 (WT) または hG6PC 変異体構築物でトランスフェクトした COS-1 細胞のホスホヒドロラーゼ活性。データは平均 ± SEM を示している。H、L および C は、それぞれヘリックス 1 から 9、内腔ループ 1 から 4 または細胞質性ループ 1 から 4 中の変異の位置を記している (図 2)。括弧内の数字は hG6PC-WT 活性に対する % である。ホスホヒドロラーゼアッセイは二連で実施した。

## 【 0 1 0 6 】

膜貫通ヘリックスの構造的完全性が G6PC の安定性および酵素活性に不可欠であり、非ヘリックス性変異体は G6PC の安定性に本質的な役割を果たさないことが以前に示されている (Shiehら、J Biol Chem 277 巻: 5047 ~ 5053 頁、2002 年)。これらの以前の観察により、G6PC のヘリックス 8 中のアミノ酸残基の変異は酵素活性を著しく変更した。

## 【 0 1 0 7 】

hG6PC-S298C 構築物の有効性をさらに確認するために、2 つのヒト G6PC 構築物、pSVL-G6PC-WT および pSVL-G6PC-S298C のホスホヒド

ロラーゼ活性を比較した。一過性発現アッセイは、pSVL-G6PC-S298C構築物がpSVL-G6PC構築物よりも1.7倍効果的であったことを示した(表4)。

#### 【0108】

研究は、コドン最適化戦略が翻訳効率を増大できることを示している(Hustonら、Mol Ther 9巻:1867~1877頁、2011年)。コドン最適化(co)ヒトG6PCは、G6PC-WT構築物より1.46倍活性である(表4)。コドン最適化の影響を調査するために、コドン最適化ヒトG6PC-S298Cを発現するpSVL-co-G6PC-S298Cを構築した。一過性発現アッセイは、pSVL-co-G6PC-S298C構築物がpSVL-G6PC-WT構築物よりも2.9倍有効であったことを示した(表4)。

#### 【表4】

表4.hG6PC-WT、hG6PC-S298C、co-hG6PC、co-hG6PC-S298CおよびイヌG6PCのホス

ホヒドロラーゼ活性

hG6PC 構築物	ホスホヒドロラーゼ活性 (nmol/分/mg)
pSVL-hG6PC-WT	131.1 ± 3.8 (100%)
pSVL-hG6PC-S298C	223.1 ± 7.1 (170%)
pSVL-co- hG6PC	191.5 ± 6.0 (146%)
pSVL-co- hG6PC-S298C	382.8 ± 23.5 (292%)
pSVL-イヌ G6PC	725.7 ± 66.5 (554%)

#### 【0109】

pSVLベクター中のhG6PC-WT、hG6PC-S298C、co-hG6PC、co-hG6PC-S298CまたはイヌG6PC構築物でトランスフェクトしたCOS-1細胞のホスホヒドロラーゼ活性。データは、各構築物の3個の別々のバッチを使用する3回の独立した実験の平均±SEMを表している。ホスホヒドロラーゼアッセイを二連で実施した。括弧内の数字はhG6PC-WT活性に対する%である。

#### 【0110】

組換えAAV8-GPE-G6PC、AAV8-GPE-co-G6PC、AAV8-GPE-G6PC-S298CおよびAAV8-GPE-co-G6PC-S298Cベクターを構築した。肝臓G6Pase活性を、AAV8-GPE-G6PC、AAV8-GPE-G6PC-S298C、AAV8-GPE-co-G6PCまたはAAV8-GPE-co-G6PC-S298Cベクターの注入を受けたGSD-Ia(G6pc/-)マウスで調査した。in vitro発現研究と一致して、in vivo研究は、AAV8-GPE-G6PC-S298CおよびAAV8-co-G6PC-S298CベクターがAAV8-GPE-G6PCベクターのものの3.4倍超の肝臓G6PC発現を導いたことを示した(図3)。

#### 【0111】

(実施例2:肝臓G6Pase- 欠乏を補正するために必要な最小ベクター用量の評価)

この実施例は、HCA/HCC発症を予防し、グルコース恒常性を維持するレベルにG6Pase- 活性を回復させるために必要な最小用量を決定する研究を記載している。

#### 【0112】

GSD-Iaは、グルコース恒常性の障害および肝細胞腺腫(HCA)の長期合併症を特徴とする(Chouら、Nat Rev Endocrinol 6巻:676~688頁、2010年)。本発明者は、正常肝臓G6Pase- 活性の3%を発現する(G6Pase- 活性の5単位と同等である;1nmol/分/mgはG6Pase-

活性1単位と定義される) rAAV8-G6PC処置G6pc-/-マウスがP70~P90週齢までグルコース恒常性を維持し、HCAを発症しないことを以前示した(Leeら、Hepatology 56巻:1719~1729頁、2012年、PCT公開第WO2015/081101号、参照により本明細書に組み入れられる)。

#### 【0113】

本研究は、G6pc-/-マウスを使用して肝臓G6Pase- 欠乏を補正するために必要なrAAVベクターの最小投与量を決定するために、精製し、正確に力価測定したrAAV8ベクター(Dimension Therapeutics、Cambridge、MAによって供給)を使用して実施した。10日齢G6pc-/-マウスは $5 \times 10^{11}$ vg/kgのrAAV8-co-G6PCまたはrAAV8-co-G6PC-S298Cの注入を受けた。24日齢時(注入2週間後)に、rAAV-co-G6PC-S298C-およびrAAV8-co-G6PC-処置G6pc-/-マウスにおける肝臓G6Pase- 活性はそれぞれ $18.6 \pm 1.1$ および $7.7 \pm 1.1$ 単位であった(図5)。

#### 【0114】

AAVに媒介される肝臓の遺伝子移入の効率および持続が、初期発生の間は、肝臓の成長に関連する肝細胞増殖の大きい速度がAAVに有効に感染した細胞の数を希釈し得ることに起因して少ないことが示されている(Yiuら、Mol. Ther. 18巻:1076~1084頁、2010年)。 $1.5 \times 10^{13}$ vg/kgのrAAV-G6PCの注入を受けた2週齢G6pc-/-マウスでは、肝臓G6Pase- 活性は24週齢時に $174.0 \pm 22.4$ 単位であった。 $1 \times 10^{13}$ vg/kgのrAAV-G6PCの注入を受けた4週齢G6pc-/-マウスでは、肝臓G6Pase- 活性は、同じベクター投与量を2週齢時に注入されたマウスでのG6Pase- 活性より2.9倍高く、24週齢時に $335.6 \pm 40.2$ 単位であった。

#### 【0115】

したがって、rAAV-co-G6PC-S298Cの同じ投与量を4週齢G6pc-/-マウスに注入する場合、肝臓G6Pase- 活性は、グルコース恒常性を維持し、HCA/HCC形成を予防するために必要な最小肝臓G6Pase- 活性(5単位)を優に上回る、24週齢時に $53.94(18.6 \times 2.9)$ 単位に回復することが予測される。これは $1 \times 10^{12}$ vg/kg AAVの投与を必要とするGSD-Iaの処置についてのrAAV媒介ヒト臨床遺伝子療法治験の要件にも合致する。

#### 【0116】

4つの異なるベクターの相対有効性を比較するために、10日齢G6pc-/-マウスに $5 \times 10^{11}$ vg/kgの正確に力価測定したrAAV8-G6PCまたはrAAV8-G6PC-S298Cベクターを注入し、処置G6pc-/-マウスの肝臓G6Pase- 活性を24日齢時に調査する。さらに10日齢G6pc-/-マウスに $5 \times 10^{12}$ vg/kgの正確に力価測定したrAAV8-G6PC、rAAV8-G6PC-S298C、rAAV8-co-G6PCまたはrAAV8-co-G6PC-S298Cを注入し、処置G6pc-/-マウスの肝臓G6Pase- 活性を12週齢時に調査する。この研究の結果は、24日齢から12週齢の導入遺伝子発現の安定性を実証する。

#### 【0117】

無処置G6pc-/-マウスは寿命が短い。成体マウスにおける肝臓G6Pase- 欠乏を補正するために必要なrAAVベクターの最小投与量をより正確に決定するために、肝臓特異的G6Paseノックアウトを有し、成体まで生存するL-G6pc-/-マウスを下に記載の通り使用した。

#### 【0118】

G6pc<sup>f x / f x</sup>マウスは、loxP部位に隣接したG6pc遺伝子のエクソン3を含有している(Pengら、Genesis 47巻:590~594頁、2009年)。G6pc<sup>f x / f x</sup>マウスを、G6pc<sup>f x / f x</sup>.SACreERT2/wマウスを産生するように血清アルブミンプロモーターの制御下にタモキシフェン依存性Cre-リ

10

20

30

40

50

コンビナーゼを発現する  $SA^{CreERT2/w}$  マウスと交配した (Schulerら、Genes 39 巻: 167 ~ 172 頁、2004 年)。肝臓特異的  $G6pc$  ノックアウト ( $L-G6pc^{-/-}$ ) を 3 週齢  $G6pc^{fx/fx}$ 、 $SA^{CreERT2/w}$  マウスにおける  $G6pc$  エクソン 3 のタモキシフェン媒介除去によって生成した。100% の  $L-G6pc^{-/-}$  マウスが 54 週齢時 ( $G6pc$  遺伝子除去後 51 週間) に  $HCA/HCC$  を発症することが予測される。

#### 【0119】

10 週齢  $L-G6pc^{-/-}$  マウスを  $10^{1.2}$   $vg/kg$  の  $rAAV-G6PC$  で処置した。結果は、18 週齢時に肝臓  $G6Pase$  活性が  $68.9 \pm 12.8$  単位に回復したことを示した (図 6A)。 $AAV$  処置マウス ( $AAV$  マウス) は、軽度のグリコーゲン貯蔵以外は肝臓組織学的異常を示さず (図 6B)、空腹時耐糖能 ( $FGT$ ) の正常プロファイルを示した (図 6C)。さらに  $AAV$  マウスは、肝臓重量の正常化 (図 6D) ならびにグリコーゲンおよびトリグリセリドの肝臓レベルの正常化を示した (図 6E)。これらのデータは、 $GSD-Ia$  の処置のためのヒト臨床遺伝子療法治験のためのより最適な投与量に減らすことができることを示している。

#### 【0120】

肝臓  $G6Pase$  欠乏を補正し、 $HCA/HCC$  発症を予防するために必要な  $rAAV8-G6PC$ 、 $rAAV8-co-G6PC$ 、 $rAAV8-G6PC-S298C$  および  $rAAV8-co-G6PC-S298C$  の最小投与量を調査するために、各ベクターの種々の用量 (例えば  $1 \times 10^{1.0}$ 、 $3 \times 10^{1.0}$ 、 $1 \times 10^{1.1}$ 、 $3 \times 10^{1.1}$ 、 $1 \times 10^{1.2}$ 、 $3 \times 10^{1.2}$  および  $1 \times 10^{1.3}$ ) を 10 ~ 12 週齢  $L-G6pc^{-/-}$  マウスに注入する。54 週齢時に  $G6Pase$  活性を測定する。肝組織学、 $FGT$ 、肝臓重量ならびにグリコーゲンおよびトリグリセリドの肝臓レベルも測定および/または評価する。

#### 【0121】

(実施例 3:  $AAV$  に基づく遺伝子療法を使用したヒト  $GSD-Ia$  の処置)

この実施例は、改変  $G6PC$  をコードする  $AAV$  ベクターを  $GSD-Ia$  の処置のために臨床使用する例示的な方法を記載している。

#### 【0122】

$GSD-Ia$  と診断された患者を処置のために選択する。一般には、患者は少なくとも 18 歳であり、免疫調節に前曝露したことがあってもよくまたはなくてもよい。患者に、本明細書に開示されている配列番号 4 または配列番号 5 を含む  $rAAV$  などの、改変  $G6PC$  を発現する組換え  $AAV$  を治療有効量で投与する。組換え  $AAV$  は、静脈内に投与することができる。適切な治療量は、医師が選択することができる。いくつかの場合には、治療有効用量は、 $1 \times 10^{1.0} \sim 1 \times 10^{1.4}$  ウイルス粒子 ( $vp$ ) /  $kg$  の範囲、例えば、約  $1 \times 10^{1.1}$  または  $1 \times 10^{1.2}$   $vp/kg$  などである。ほとんどの場合、単回用量を患者に投与する。免疫調節の非存在下では、患者は  $rAAV$  の単回注入のみを許容する可能性がある。被験体が免疫調節に前曝露したことがある場合、2 またはそれ超の用量を投与することができる。処置の有効性を決定するために被験体の健康を経時的にモニターすることができる。

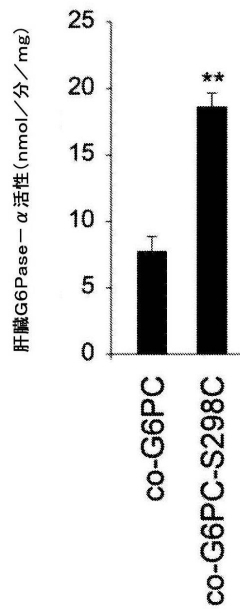
#### 【0123】

開示されている発明の原理を適用することができる多くの可能性のある実施形態を考慮して、例示されている実施形態は単に本発明の好ましい例であり、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではないことが理解されるべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の請求項によって定義される。したがって、これらの請求項の範囲および精神の範囲内に入る発明の全てを特許請求する。



【図5】

FIG. 5



【図6-1】

FIG. 6B

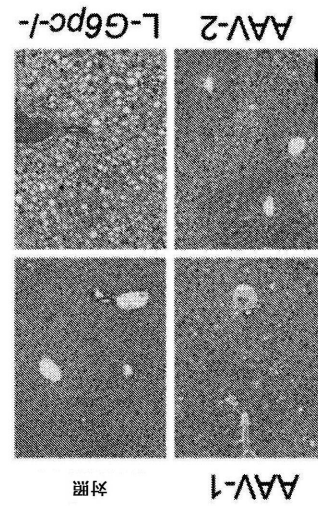
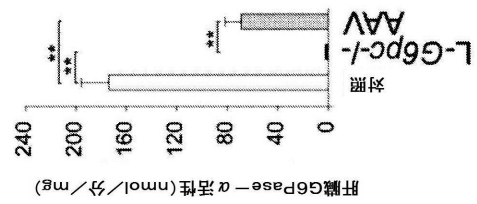


FIG. 6A



【図6-2】

FIG. 6E

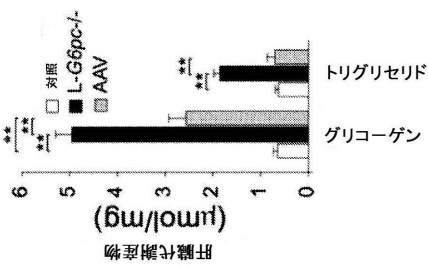


FIG. 6D

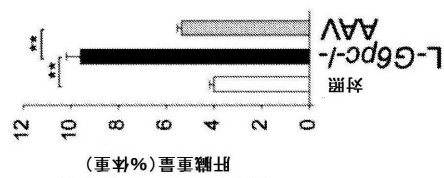
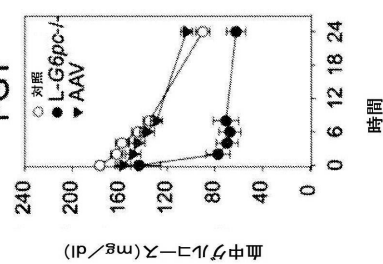


FIG. 6C

FGT



【配列表】

0006824169000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	7/01	(2006.01)	C 1 2 N	7/01
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	3/08	(2006.01)	A 6 1 P	3/08
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 チョウ, ジャニス ジェイ.

アメリカ合衆国 メリーランド 20892, ベセスダ, ビルディング 10, ルーム 9  
ディー42, エヌアイエイチ/エヌアイシーエイチディー

審査官 坂井田 京

(56)参考文献 国際公開第01/092497(WO, A1)

Gene Ther., 2012, 19(4), pp.443-452

Hepatology, 2012, 56(5), pp.1593-1595

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

UniProt/GeneSeq