(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-511024
(P2024-511024A)
(43)公表日　令和6年3月12日(2024.3.12)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		４Ｃ０５７
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０７２
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*9/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/08		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*38/13*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｃ０８６

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全64頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-557013(P2023-557013)
(86)(22)出願日　令和4年3月18日(2022.3.18)
(85)翻訳文提出日　令和5年10月3日(2023.10.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/020933
(87)国際公開番号　WO2022/198038
(87)国際公開日　令和4年9月22日(2022.9.22)
(31)優先権主張番号　63/163,634
(32)優先日　令和3年3月19日(2021.3.19)
(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　520237775
アドリーナス セラピューティクス， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０１， パロ アルト， キプリング スト リート ４２１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(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
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　２１－ヒドロキシラーゼ欠損症の遺伝子治療

(57)【要約】
本明細書に開示されているのは、２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質を発現する組換えアデノ随伴ウイルスベクター、及び２１ＯＨ欠損症を治療するための関連用途である。
【選択図】図１

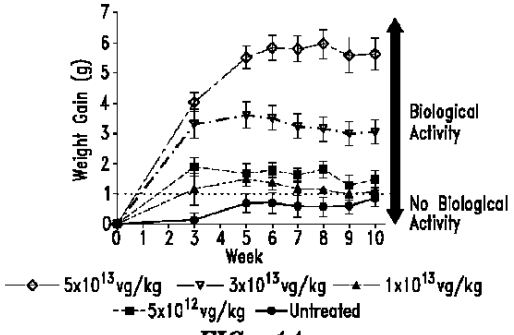


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを対象に投与することを含む方法であって、
前記ｒＡＡＶベクターが：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列がプロモーターに操作可能に連結され；
前記治療有効量が約10^{12}ベクターゲノム／キログラム（ｖｇ／ｋｇ）～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にある、前記方法。
【請求項２】
前記対象が２１ＯＨの発現を必要としている、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記対象が２１ＯＨ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記対象がプラダー分類ＩＶ型またはＶ型の２１ＯＨＤを有する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記対象が先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を有する、請求項３または４に記載の方法。
【請求項６】
前記ＣＡＨが古典的ＣＡＨである、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記ｒＡＡＶベクターの投与が前記対象にて２１ＯＨの発現をもたらす、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記２１ＯＨが、前記対象の副腎皮質、副腎髄質、副腎幹細胞、副腎前駆細胞、肝臓、または卵巣で発現される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記対象がコルチゾール及び／またはアルドステロンを必要としている、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記対象がコルチゾール欠損症及び／またはアルドステロン欠損症を有する、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記対象が過剰のプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）を有する、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記対象が血中及び／または尿中にて過剰のプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）を有する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）の発現を必要とする対象にて２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）を発現させる方法であって、
治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ｒＡＡＶベクターは：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列がプロモーターに操作可能に連結され；
前記治療有効量が約10^{12}ベクターゲノム／キログラム（ｖｇ／ｋｇ）～約10^{14}ｖ

ｇ／ｋｇの範囲内にあり、
それによって前記対象にて２１ＯＨを発現させる、前記方法。
【請求項１４】
前記２１ＯＨが、前記対象の副腎皮質、副腎髄質、副腎幹細胞、副腎前駆細胞、肝臓、または卵巣で発現される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ｒＡＡＶベクターは：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列がプロモーターに操作可能に連結され；
前記治療有効量が約10^{12}ベクターゲノム／キログラム（ｖｇ／ｋｇ）～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にあり、
それによって前記対象にて２１ＯＨＤを治療する、前記方法。
【請求項１６】
コルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルを高めることを必要とする対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルを高める方法であって、
治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ｒＡＡＶベクターは：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列がプロモーターに操作可能に連結され；
前記治療有効量が約10^{12}ベクターゲノム／キログラム（ｖｇ／ｋｇ）～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にあり、
それによって、前記対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンの前記レベルを高める、前記方法。
【請求項１７】
プロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルを低下させることを必要とする対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルを低下させる方法であって、
治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ｒＡＡＶベクターは：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列がプロモーターに操作可能に連結され；
前記治療有効量が約10^{12}ベクターゲノム／キログラム（ｖｇ／ｋｇ）～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にあり、
それによって、前記対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）の前記レベルを低下させる、前記方法。
【請求項１８】
前記対象がプラダー分類ＩＶ型またはＶ型の２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、請求項１３～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記対象が先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を有する、請求項１３～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】

前記ＣＡＨが古典的ＣＡＨである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記治療有効量が約１０^{13}ｖｇ／ｋｇ～約１０^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にある、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記治療有効量が約１．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
前記治療有効量が約３×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記治療有効量が約６×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
投与工程の前に、２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を選択することをさらに含む、請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
前記ｒＡＡＶベクターが、開腹手術もしくは腹腔鏡検査による副腎への直接注入によって、またはカテーテル挿入による副腎動脈もしくは副腎静脈への注入によって、前記対象に静脈内投与される、請求項１～２５のいずれか項に記載の方法。
【請求項２７】
前記副腎への直接注入が副腎皮質への直接注入である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記ｒＡＡＶベクターが静脈内（ＩＶ）注入によって投与される、請求項１～２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
前記２１ＯＨタンパク質がヒト２１ＯＨタンパク質である、請求項１～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
２１ＯＨタンパク質をコードする前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、ヒト２１ＯＨ（ＣＹＰ２１Ａ２）のｃＤＮＡを含む、またはそれから成る、請求項１～２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
２１ＯＨタンパク質をコードする前記非ＡＡＶヌクレオチド配列がコドン最適化ヌクレオチド配列を含む、またはそれから成る、請求項１～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
２１ＯＨタンパク質をコードする前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が配列番号５０を含む、または配列番号５０から成る、請求項１～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
２１ＯＨタンパク質をコードする前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、配列番号１のアミノ酸配列、または配列番号１と少なくとも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％同一であるアミノ酸配列をコードする、請求項１～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記プロモーターが宿主細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図する、請求項１～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
前記宿主細胞が副腎細胞または副腎皮質細胞である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記プロモーターがサイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーター、

ＰＧＫプロモーター、または副腎皮質細胞における発現に特異的なプロモーターである、請求項１～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記サイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーターがＣＡＧ、ＣＢ６、またはＣＢＡプロモーターである、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記プロモーターが、配列番号２、配列番号３、配列番号４８、または配列番号４９のヌクレオチド配列を含む、またはそれらから成る、請求項１～３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】
前記ＩＴＲが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、またはｒｈ７４血清型のＩＴＲである、請求項１～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
前記ｒＡＡＶが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、またはｒｈ７４の血清型である、請求項１～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記ｒＡＡＶがＡＡＶ５血清型である、請求項１～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４２】
前記核酸分子がさらにコザック配列を含む、請求項１～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
前記核酸分子がさらにｍｉＲ－１２２結合部位を含む、請求項１～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
キログラムあたり約10^{12}ベクターゲノム（ｖｇ／ｋｇ）～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターを対象に投与することを含む方法であって、前記ｒＡＡＶ５ベクターが、
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結される、前記方法。
【請求項４５】
約10^{13}ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に投与される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
約1.5×10^{13}ｖｇ／ｋｇの前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に投与される、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
約3×10^{13}ｖｇ／ｋｇの前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に投与される、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
約6×10^{13}ｖｇ／ｋｇの前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に投与される、請求項４５に記載の方法。
【請求項４９】
前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に静脈内投与される、請求項４５～４８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５０】
前記対象が２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、請求項４４～４９

のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５１】
２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、キログラムあたり約１．５×１０^{13}ベクターゲノム（ｖｇ／ｋｇ）の組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターを前記対象に静脈内投与することを含み、前記ｒＡＡＶ５ベクターが、
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結され、
それによって、前記対象にて２１ＯＨＤを治療する。前記方法。
【請求項５２】
２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、キログラムあたり約３×１０^{13}ベクターゲノム（ｖｇ／ｋｇ）の組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターを前記対象に静脈内投与することを含み、前記ｒＡＡＶ５ベクターが、
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結され、
それによって、前記対象にて２１ＯＨＤを治療する、前記方法。
【請求項５３】
２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、キログラムあたり約６×１０^{13}ベクターゲノム（ｖｇ／ｋｇ）の組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターを前記対象に静脈内投与することを含み、前記ｒＡＡＶ５ベクターが、
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結され、
それによって、前記対象にて２１ＯＨＤを治療する。前記方法。
【請求項５４】
前記プロモーターがサイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーター、ＰＧＫプロモーター、または副腎皮質細胞における発現に特異的なプロモーターである、請求項４４～５３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
前記サイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーターがＣＡＧ、ＣＢ６、またはＣＢＡプロモーターである、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記プロモーターが、配列番号２、配列番号３、配列番号４８、または配列番号４９のヌクレオチド配列を含む、またはそれらから成る、請求項４４～５５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５７】
前記ＩＴＲが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、またはｒｈ７４血清型のＩＴＲである、請求項４４～５６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５８】
前記核酸分子がさらにコザック配列を含む、請求項４４～５７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５９】

前記核酸分子がさらにｍｉＲ－１２２結合部位を含む、請求項４４～５８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６０】
前記対象がプラダー分類ＩＶ型またはＶ型の２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、請求項４４～５９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６１】
前記対象が先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を有する、請求項４４～５９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６２】
前記ＣＡＨが古典的ＣＡＨである、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記対象に治療有効量の免疫抑制剤を投与することをさらに含む、請求項１～６２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６４】
対象に治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクター及び治療有効量の免疫抑制剤を投与することを含む方法であって、
前記ｒＡＡＶ５が：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向端末反復（ＩＴＲ）と、
（ｉｉ）配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含む核酸分子を含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結される、前記方法。
【請求項６５】
前記対象が２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、前記対象に治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクター及び治療有効量の免疫抑制剤を静脈内投与することを含み、
前記ｒＡＡＶ５が：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）と、
（ｉｉ）配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含む核酸分子を含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結され、
それによって、前記対象にて２１ＯＨＤを治療する、前記方法。
【請求項６７】
前記免疫抑制剤が、前記ｒＡＡＶベクターの投与前に、投与と同時に、及び／または投与後に投与される、請求項６３～６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６８】
前記免疫抑制剤が前記ｒＡＡＶベクターの前記投与の前に投与される、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記免疫抑制剤が前記ｒＡＡＶベクターの前記投与の少なくとも１２時間前に投与される、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記免疫抑制剤が前記ｒＡＡＶベクターの前記投与の約２日前に投与される、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記免疫抑制剤が非グルココルチコイド免疫抑制剤である、請求項６３～７０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７２】

前記免疫抑制剤がカルシニューリンの阻害剤である、請求項６３～７０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７３】
前記免疫抑制剤が、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、エベロリムス、ゾタロリムス、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項６３～７２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７４】
前記免疫抑制剤がタクロリムスである、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記免疫抑制剤が経口投与される、請求項６３～７４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７６】
前記免疫抑制剤の前記治療有効量がキログラムあたり約０．０１ミリグラム（ｍｇ／ｋｇ）～約０．０５ｍｇ／ｋｇの範囲内にある、請求項６３～７５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７７】
前記免疫抑制剤の前記治療有効量が約０．０２５ｍｇ／ｋｇである、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記治療有効量の前記免疫抑制剤が１日２回投与される、請求項６３～７７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７９】
前記治療有効量のステロイドを前記対象に投与することを含む、請求項１～７８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８０】
前記ステロイドがミネラルコルチコイドである、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
前記ステロイドがグルココルチコイドである、請求項７９に記載の方法。
【請求項８２】
前記ステロイドがヒドロコルチゾンである、請求項７９に記載の方法。
【請求項８３】
前記ステロイドが前記ｒＡＡＶベクターの投与前に、投与と同時に、及び／または投与後に投与される、請求項７９～８２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８４】
前記ｒＡＡＶベクターの投与前に前記対象に投与される前記ステロイドの前記治療有効量が、前記ｒＡＡＶ投与後に前記対象に投与される前記ステロイドの前記治療有効量よりも多い、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
前記ｒＡＡＶの投与前と比べて、前記ｒＡＡＶの投与後に前記対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルが高くなる、請求項１～８４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８６】
前記ｒＡＡＶを投与されていない２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対照対象と比べて、前記ｒＡＡＶの投与後に前記対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルが高くなる、請求項１～８５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８７】
前記ｒＡＡＶの投与前と比べて前記ｒＡＡＶの投与後に前記対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、アンドロステンジオン（Ａ４）及び／または１１－ケトステロイドのレベルが低くなる、請求項１～８６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
前記ｒＡＡＶを投与されていない２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有す

る対照対象と比べて、前記ｒＡＡＶの投与後に前記対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、アンドロステンジオン（Ａ４）及び／または１１－ケトステロイドのレベルが低くなる、請求項１～８７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８９】
前記ｒＡＡＶベクターが配列番号５２の核酸配列を含む発現カセットを含む、請求項１～８８のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年３月１９日に出願された米国仮出願第６３／１６３，６３４号の優先権の利益を主張し、その内容はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【０００２】
電子提出されたテキストファイルの説明
本明細書と共に電子提出されたテキストファイルの内容は参照によってその全体が本明細書に組み込まれる：配列表のコンピューター可読形式のコピー（ファイル名：ＡＤＲＥ＿００２＿０１ＷＯ＿ＳＬ、記録日：２０２２年３月１７日、ファイルサイズ：２８．５キロバイト）。
［技術分野］
【０００３】
本開示は一般に、遺伝子治療の分野に関する。特に、本開示は、２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質を発現する組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクター及び粒子について記載する。ｒＡＡＶベクター及びｒＡＡＶ粒子は２１ＯＨ欠損症を治療するのに使用されてもよい。
【背景技術】
【０００４】
２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）は、ＣＹＰ２１Ａ２遺伝子によってコードされたシトクロムＰ４５０酵素であり、ステロイドホルモンのアルドステロン及びコルチゾールの生合成に関与する。これらの合成は副腎皮質で行われる。機能的なＣＹＰ２１Ａ２遺伝子と密接に連鎖した非機能的なＣＹＰ２１Ａ１Ｐ偽遺伝子との間の組換え率が高いため、点突然変異ではなく遺伝子変換によって引き起こされる先天性副腎過形成　（ＣＡＨ）とその異常な遺伝的特徴の発生率が比較的高くなる。ＣＹＰ２１Ａ２の欠陥は２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を引き起こし、それはｉ）女性の外生殖器の胎児男性化、グルココルチコイド及びミネラルコルチコイドの産生の低下または欠如、及びアンドロゲンの大量過剰を伴うＣＡＨ（「古典的」２１ＯＨＤ）、またはｉｉ）男性化がなく、臨床的に意味のあるコルチゾールやアルドステロンの欠乏もないが、アンドロゲン産生が増加する疾患のさらに軽度の形態（「非古典的」２１ＯＨＤ）いずれかにつながる。
【０００５】
何十年にもわたる治療戦略の後、重篤な形態の２１ＯＨＤの管理は臨床的に難題のままである。患者は外来性ステロイドで治療できるが、乳児及び成人の患者は副腎クリーゼ（日常的な感染症、外傷、または激しい労作のような身体的ストレスに副腎が反応できないこと）のリスクを抱えたままである。副腎クリーゼは、十分な教育を受け、治療を遵守している患者であっても、急速に重度のショックや死に至り得る。Ｈａｈｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ，Ｆｅｂ；１００（２）：４０７－４１６（２０１５）を参照のこと。さらに、成長、性別、及び性的能力に関連した重大な影響もある。女性患者の場合、超生理学的なグルココルチコイドの用量を使用して副腎のアンドロゲン産生を抑制することは本質的に困難である。その結果、アンドロゲン過剰とグルココルチコイド過剰が交互に繰り返され、低身長、肥満、小児期の性器手術の繰り返し、思春期の変化、及び慢性男性化につながる場合がある。高アンドロゲン症は、多毛症、男性の筋肉の発達、クリトリスのサイズの肥大、及び性的障害によって、この疾患

の古典的形態及び非古典的形態に罹患している女性患者にとって依然として主な美容上の負担となっている。Ｇａｓｔａｕｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ，９２（４），１３９１－１３９６（２００７）を参照のこと。男性患者は低身長及び早期男性化のリスクにさらされる。一部の患者では、治療の失敗は両側副腎摘出術につながる場合さえある（Ｇｍｙｒｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｅｄｉａｔｒｉｃｓ，１０９：Ｅ２８（２００２）；Ｂｒｕｉｎｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ，８６：４８２－４８４（２００１））。

２１ＯＨＤの持続的な矯正を可能にする治療法に対するニーズが残っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｈａｈｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ，Ｆｅｂ；１００（２）：４０７－４１６（２０１５）

【非特許文献２】Ｇａｓｔａｕｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ，９２（４），１３９１－１３９６（２００７）

【非特許文献３】Ｇｍｙｒｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｅｄｉａｔｒｉｃｓ，１０９：Ｅ２８（２００２）

【非特許文献４】Ｂｒｕｉｎｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ，８６：４８２－４８４（２００１）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本開示は、ホルモン不均衡、及び特に、先天性副腎過形成（ＣＡＨ）のような２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）欠損症（２１ＯＨＤ）の治療に使用するための方法及び組成物を提供する。本明細書で提供されている方法は、２１ＯＨタンパク質をコードする核酸分子を含むウイルスベクターの投与を含む。

【０００８】

一態様では、本開示は、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを対象に投与することを含む方法を提供し、その際、ｒＡＡＶベクターは：（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結され、治療有効量はキログラムあたり約10^{12}ベクターゲノム（ｖｇ／ｋｇ）～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲である。

【０００９】

いくつかの実施形態では、対象は２１ＯＨの発現を必要とする。いくつかの実施形態では、対象は２１ＯＨ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する。いくつかの実施形態では、対象は女性であり、プラダー分類による外性器異常を有する。いくつかの実施形態では、対象は先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＨは古典的ＣＡＨである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの投与は対象にて２１ＯＨの発現をもたらす。いくつかの実施形態では、２１ＯＨは対象の副腎皮質、副腎髄質、副腎幹細胞、副腎前駆細胞、肝臓、または卵巣で発現される。

【００１０】

いくつかの実施形態では、対象はコルチゾール及び／またはアルドステロンを必要としている。いくつかの実施形態では、対象はコルチゾール欠損症及び／またはアルドステロン欠損症を有する。いくつかの実施形態では、対象は過剰のプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、アンドロステンジオン（Ａ４）及び／または１１－ケトステロイドを有する。いくつかの実施形態では、対象は血中及び／または尿中に過剰のプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、アンドロステンジオン（Ａ４）及び／または１１－ケトステロイドを有する。

【００１１】

別の態様では、本開示は２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）の発現を必要とする対象にて２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）を発現させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、そのような方法は、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを対象に投与することを含み、その際、ｒＡＡＶベクターは：（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結され、治療有効量は約10^{12}ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲であり、それによって対象にて２１ＯＨを発現させる。

【００１２】

いくつかの実施形態では、２１ＯＨは、対象の副腎皮質、副腎髄質、副腎幹細胞、副腎前駆細胞、肝臓、または卵巣で発現される。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】Ａは、未処理対照マウスと比べた、２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードするＡＡＶ５の示された用量で処理したマウスにおける経時的な体重増加の上昇を示す。Ｂは、モデルマウス（三角形）または非ヒト霊長類（ＮＨＰ、四角形）の副腎にて検出された２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードするＡＡＶ５のウイルスゲノムの用量依存性の増加を示す。Ｃは、モデルマウス（三角形）または非ヒト霊長類（ＮＨＰ）の副腎における内在性２１－ＯＨの割合として表される、産生されたヒト２１－ＯＨの量を示す。

【図２】２１－ＯＨＤによる古典的ＣＡＨがある成人における第１／２相ヒト初、非盲検用量漸増試験の時系列表を示す。

【図３】第１／２相臨床試験における用量漸増と用量拡大の可能性の時系列表を示す。

【図４】ＢＢＰ－６３１の有効成分であるＡＡＶ－ｈＣＹＰ２１－Ｏｐｔベクターの設計を示し、それは５’から３’に以下の要素：ＡＡＶ５’ＩＴＲ、ＡＡＶパッケージングシグナル（Ψ）、サイトメガロウイルスエンハンサー、スプライスドナーを持つ標準的なコザック配列とスプライスアクセプターを持つウサギβ－グロビンイントロンを含むニワトリβ－アクチンプロモーター、コドンを最適化したヒト２１－ヒドロキシラーゼ（２１－ＯＨ）のｃＤＮＡ、ウサギβ－グロビンポリＡシグナル、及びＡＡＶ３’ＩＴＲを含む。

【発明を実施するための形態】

【００１４】

本開示は、２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）を発現するように操作され、先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を含む２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を治療するのに使用することができる、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターに関する。いくつかの態様では、本開示は、２１－ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列を含む組換えＡＡＶベクターの投与を含む、治療、２１ＯＨの発現、及び／またはホルモン調整の方法、ならびにそれらに使用するための組成物を提供する。

【００１５】

ＣＡＨの臨床管理に対する現在のアプローチは、原発性副腎不全に対処し、副腎アンドロゲンを正常化するために外来性グルココルチコイド（及び必要に応じてミネラルコルチコイド）で治療することであり、それは超生理学的な用量のグルココルチコイドを必要とすることが多い。副腎アンドロゲンレベルを適切に制御するには、超生理学的な用量のグルココルチコイドを必要とすることが多いので、ＣＡＨにおける生涯にわたるグルココルチコイド補充は、全寿命の短縮、心血管疾患、代謝性疾患、骨疾患、低身長を含む重大な罹患性と関連している。さらに、塩類喪失表現型を持つ古典的ＣＡＨ患者では、生涯にわたるミネラルコルチコイドの補充も必要である。

【００１６】

アンドロステンジオン（Ａ４）に加えて、他の副腎ホルモン、特に１７－ＯＨＰも同様に管理を導くのに使用されることが多い。臨床管理の範例は簡単に思われてもよいが、臨床医は、ＣＡＨを患う小児と成人の双方にて、維持的なグルココルチコイドの投薬を調整

する際に、非常に難しいバランスをとる作業に直面している。たとえば、臨床医は、特に成長の可能性と最終的な成人身長を維持するために、可能な限り低用量で安全なグルココルチコイドの維持用量で小児を治療しようとする。超生理学的な高用量のグルココルチコイド補充療法は、小児と成人の双方の患者を高アンドロゲン症に関連する症状から守るのに役立ってもよいが、数えきれないほどの長期にわたる代謝、骨格、心血管系の後遺症のリスクも伴う。ＣＡＨ患者は乳児期から外来性グルココルチコイド及び／またはミネラルコルチコイドを服用しているので、現在の治療アプローチでは患者と介護者に高いケア負担がかかり、現在の標準治療を遵守できない傾向にある。

【００１７】

この疾患と現在の標準治療に関連する相当な罹患性があり、それには全寿命の短縮、心血管疾患、代謝性疾患、骨疾患、及び低身長が含まれる。さらに、副腎クリーゼは急速に重度のショックや死に至る可能性があり、グルココルチコイドのストレス投与に関する患者と介護者の十分な教育が必要である。現在の標準治療を受けている古典的ＣＡＨ患者では、全死因死亡率が５倍も高いことを含めて生涯にわたる疾患の負担が高いままである。したがって、長期にわたる超生理学的グルココルチコイドの必要性を回避し、内在性コルチゾール産生を回復させる可能性がある代替療法は、すべての古典的ＣＡＨ患者にとって非常に望ましいものである。

【００１８】

本開示は、２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）を発現するように操作され、２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を治療するのに使用することができる組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターを提供する。いくつかの態様では、本開示は、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列を含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクター、そのようなベクターを含むｒＡＡＶ粒子、ならびにそれを必要とする対象にて２１ＯＨＤを治療するためにそのようなベクター及び粒子を使用する方法を提供する。

【００１９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている組成物及び方法は、グルココルチコイド及びミネラルコルチコイドの合成のための内在性経路及び生理学的経路を提供することによって副腎皮質細胞機能を修復する。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている組成物及び方法は、疾患管理のための外来性グルココルチコイド（例えば、ヒドロコルチゾン）及び／またはミネラルコルチコイドへの依存を減らし、それによって過剰なグルココルチコイド補充または過剰レベルの血清アンドロゲンのいずれかによる有害効果を有意に減らす。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている組成物及び方法は、１７－ＯＨＰのような前駆体ならびにアンドロステンジオン（Ａ４）及び１１－オキソまたは１１－ケトステロール（例えば、１１－ケト－テストステロン）のようなアンドロゲンの高いレベルに関連するＣＡＨの少なくとも１つの症状または臨床的特徴を緩和する。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている組成物及び方法は２１－ＯＨＤに関連する高アンドロゲン症を軽減する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている組成物及び方法は、生命を脅かす副腎クリーゼのリスクを軽減する。

【００２０】

本明細書にて使用されている見出しは、単に編成目的のためであり、記載されている主題を限定するものとして解釈されるべきではない。特許、特許出願、論説、書籍及び論文を含むが、これらに限定されない、本明細書で引用されている文書または文書の一部はすべて、その全体があらゆる目的のために参照によって本明細書に明確に組み込まれる。組み込まれた文書または文書の一部の１以上が、ある用語を定義し、それが本出願でのその用語の定義と矛盾する場合、本出願に記載される定義が優先する。しかしながら、本明細書で引用された任意の参考文献、記事、刊行物、特許、特許公開、及び特許出願の言及は、それらが有効な先行技術を構成する、または世界の任意の国における一般的知識の一部を形成するという認識、または示唆の任意の形態ではなく、そのように受け取られるべき

ではない。

【００２１】

本明細書において、いかなる濃度範囲、百分率範囲、比範囲、または整数範囲も、特に明記しない限り、記載された範囲内の任意の整数の値、及び適切な場合には、その分数（例えば、整数の１０分の１及び１００分の１）を含むと理解されるべきである。用語「約」は、数または数字の直前にある場合、当該数または数字がプラスまたはマイナス１０％の範囲であることを意味する。本明細書で使用されるとき、用語「ａ」及び「ａｎ」は、特に明記しない限り、示される構成要素のうちの「１以上」を指すと理解されるべきである。選択肢（例えば、「または」）の使用は、選択肢のうちの一方、双方、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味すると理解されるべきである。用語「及び／または」は、選択肢のちの一方または双方のいずれかを意味すると理解されるべきである。本明細書で使用されるとき、用語「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」及び「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」は同義的に使用される。

【００２２】

組換えＡＡＶベクター及び粒子

一態様では、本開示は、治療を必要とする細胞に２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）の核酸配列を送達するためのウイルスベクターを提供する。したがって、一実施形態では、本開示は、少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列（異種ポリヌクレオチドとも呼ばれる）とを含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターに関するものであり、非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結される。本明細書で使用されるとき、「操作可能な連結」または「操作可能に連結される」という用語は、構成成分が意図された方法で機能することを可能にするように記載された構成成分の物理的または機能的な並置を指す。ポリヌクレオチドと操作可能に連結した発現制御要素（例えば、プロモーターまたはエンハンサー）の例では、その関係は、制御要素が核酸の発現を調節するようなものである。さらに具体的には、例えば、操作可能に連結された２つのＤＮＡ配列は、少なくとも一方のＤＮＡ配列が他方の配列に対して生理的効果を発揮することができるような関係で２つのＤＮＡが配置（シスまたはトランス）されていることを意味する。「操作可能に連結される」とは、連結される核酸配列が連続している、または実質的に連続していること、及び２つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合には、連続しており、リーディングフレーム内にあることを意味してもよい。

【００２３】

いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターはヒト２１ＯＨタンパク質である２１ＯＨタンパク質を発現する。ＣＹＰ２１Ａ２遺伝子は２１ＯＨタンパク質をコードする。本明細書で使用されるとき、２１ＯＨは２１ＯＨタンパク質または当該タンパク質をコードする核酸配列を指してもよい。場合によっては、本明細書に記載されているｒＡＡＶベクターによって発現される２１ＯＨタンパク質はネイティブの（例えば、野生型）２１ＯＨタンパク質である。ヌクレオチド配列によってコードされる２１ＯＨタンパク質または２１ＯＨポリペプチドには、天然に存在する２１ＯＨタンパク質と同様に完全長のネイティブ配列、ならびに部分配列、修飾型または変異体がネイティブの完全長２１ＯＨタンパク質の機能性をある程度保持している限り、機能的部分配列、修飾型または配列変異体が含まれる。本開示の方法及び使用では、ｒＡＡＶベクターにおけるヌクレオチド配列によってコードされる２１ＯＨタンパク質及び２１ＯＨポリペプチドは、治療される対象にて欠損している、またはその発現が不十分である、もしくは不足している内在性２１ＯＨタンパク質と同一であり得るが、同一である必要はない。

【００２４】

いくつかの実施形態では、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列（例えば、異種配列）は野生型ＣＹＰ２１遺伝子配列である。いくつかの実施形態では、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列（例えば、異種配列）は野生型ＣＹＰ２１遺伝子配列に関してコドンを最適化している。いくつかの実施形態では、本

開示の２１０Ｈをコードするヌクレオチド配列は、コドン最適化配列であり、配列番号５０を含む、または配列番号５０から成る（表１を参照のこと）。いくつかの実施形態では、２１０Ｈをコードするヌクレオチド配列は、配列番号５０と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、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％同一である。

【００２５】

コドン最適化は、遺伝暗号の冗長性を利用して、コードされたタンパク質の同じアミノ酸配列を維持しながらヌクレオチド配列を変更できるようにする。いくつかの実施形態では、コードされたタンパク質の発現の増加または減少を促進するためにコドン最適化が実行される。これは、ヌクレオチド配列内のコドン使用頻度を特定の細胞型に合わせて調整するので、細胞型内の特定のｔＲＮＡの相対存在量の偏りに対応する細胞のコドンの偏りを利用することによって達成される。ヌクレオチド配列のコドンを、対応するｔＲＮＡの相対存在量に合うように変更することで、発現量を増加させることができる。逆に、対応するｔＲＮＡが特定の細胞型ではまれであることがわかっているコドンを選択することによって、発現量を減少させることができる。

【００２６】

いくつかの実施形態では、２１０Ｈタンパク質をコードするコドン最適化ヌクレオチド配列は、野生型ｃＤＮＡ配列よりも安定であり、それによって、非ＡＡＶヌクレオチド配列が遺伝子治療を介して転写機構に導入された場合に、選択的にスプライスされた変異体または切り詰められたタンパク質の生成を回避する。

【００２７】

いくつかの実施形態では、２１０Ｈタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列（例えば、異種配列）は配列番号１のアミノ酸配列をコードする（表１を参照のこと）。他の実施形態では、２１０Ｈタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列は、配列番号１と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、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％同一であるアミノ酸配列をコードする。

【００２８】

【表１－１】

表１．２１ＯＨ（ＣＹＰ２１Ａ２）及びプロモーター配列の非限定的な例。

配列の説明	配列	配列番号
ＣＹＰ２１Ａ２、ホモ・サピエンス、ＮＣＢＩ参照配列ＮＰ＿０００４９１．４	MLLLGLLLLLPLLAGARLLWNWWKLRSLHLPPLAPGFLHLLQPDLPIY LLGLTQKFGPIYRLHLGLQDVVVLNSKRTIEEAMVKKWADFAGRPEP LTYKLVSRNYPDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGIRDSMEPVVEQ LTQEFCERMRAQPGTPVAIEEEFSLLTCSIICYLTFGDKIKDDNLMPAY YKCIQEVLKTWSHWSIQIVDVIPFLRFFPNPGLRRLKQAIEKRDHIVEM QLRQHKESLVAGQWRDMMDYMLQGVAQPSMEEGSGQLLEGHVHM AAVDLLIGGTETTANTLSWAVVFLLHHPEIQQRLQEELDHELGPGASS SRVPYKDRARLPLLNATIAEVLRLRPVVPLALPHRTTRPSSISGYDIPEG TVIIPNLQGAHLDETVWERPHEFWPDRFLEPGKNSRALAFGCGARVCL GEPLARLELFVVLTRLLQAFTLLPSGDALPSLQPLPHCSVILKMQPFQV RLQPRGMGAHSPGQSQ	１
ＣＡＧプロモーター	GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAA CGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCAT TATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCAC GTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTT TGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGG GGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGG GCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGA GCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG	２
ＰＧＫプロモーター	CCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTTCGCGCC ACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGCCCCGCAG CTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACT AGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTA GGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCT GGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGG GCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCC CGGCATTCTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTC CTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTCGACCTGCAGCC	３

【表１－２】

ＣＢ６プロモーター	CCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCC AATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGG CGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAG GGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCA GAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCG GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGG	４８
ＣＢＡプロモーター、	TGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCC CCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGC GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAG GTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTT TTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGC GCGCGGCGGGCGG	４９

【表１－３】

コドンが最適化されたＣＹＰ２１Ａ２遺伝子配列	ATGCTGCTGCTGGGGCTGCTGCTGCTGCCTCTGCTGGC TGGGGCTCGACTGCTGTGGAACTGGTGGAAACTGCGGTCC CTGCACCTGCCACCTCTGGCACCAGGCTTCCTGCACCTGCT GCAGCCAGACCTGCCCATCTACCTGCTGGGCCTGACCCAG AAGTTTGGCCCTATCTATAGGCTGCACCTGGGCCTGCAGG ACGTGGTGGTGCTGAACTCTAAGCGCACCATCGAGGAGGC CATGGTGAAGAAGTGGGCAGATTTCGCAGGCCGGCCAGA GCCACTGACATACAAGCTGGTGAGCAGAAATTATCCTGAC CTGTCCCTGGGCGATTACTCTCTGCTGTGGAAGGCCCACA AGAAGCTGACAAGGAGCGCCCTGCTGCTGGGCATCCGCG ACTCCATGGAGCCAGTGGTGGAGCAGCTGACCCAGGAGTT TTGCGAGAGGATGAGGGCACAGCCTGGAACACCAGTGGC CATCGAGGAGGAGTTCAGCCTGCTGACCTGCTCCATCATC TGTTATCTGACATTTGGCGATAAGATCAAGGACGATAACC TGATGCCAGCCTACTATAAGTGTATCCAGGAGGTGCTGAA GACCTGGAGCCACTGGAGCATCCAGATCGTGGACGTGATC CCCTTCCTGAGGTTCTTTCCTAATCCAGGCCTGCGGAGACT GAAGCAGGCCATCGAGAAGAGGGATCACATCGTGGAGAT GCAGCTGAGGCAGCACAAGGAGTCCCTGGTGGCAGGACA GTGGAGGGACATGATGGATTACATGCTGCAGGGAGTGGC ACAGCCATCTATGGAGGAGGGAAGCGGACAGCTGCTGGA GGGACACGTGCACATGGCAGCAGTGGATCTGCTGATCGGA GGAACCGAGACAACAGCCAACACACTGAGCTGGGCCGTG GTGTTTCTGCTGCACCACCCTGAGATCCAGCAGCGGCTGC AGGAGGAGCTGGACCACGAGCTGGGACCTGGAGCAAGCT CCTCTAGAGTGCCATACAAGGATCGGGCCAGACTGCCCCT GCTGAATGCCACCATCGCCGAGGTGCTGAGGCTGCGCCCC GTGGTGCCTCTGGCCCTGCCTCACAGGACCACAAGACCAA GCTCCATCTCCGGCTATGACATCCCAGAGGGCACCGTGAT CATCCCAAACCTGCAGGGAGCACACCTGGACGAGACAGT GTGGGAGCGGCCACACGAGTTCTGGCCCGATAGATTTCTG GAGCCTGGCAAGAACAGCCGGGCCCTGGCCTTCGGCTGCG GAGCCCGGGTGTGCCTGGGCGAGCCACTGGCCAGGCTGG AGCTGTTCGTGGTGCTGACCCGCCTGCTGCAGGCCTTTAC ACTGCTGCCCTCCGGCGATGCCCTGCCTTCTCTGCAGCCAC TGCCTCACTGCTCCGTGATCCTGAAGATGCAGCCCTTTCAG GTCCGCCTGCAGCCAAGGGGGATGGGGGCACATAGTCCA GGGCAGTCTCAGTAA	５０

【００２９】

いくつかの実施形態では、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列（例えば、異種配列）は、血球凝集素（ＨＡ）タグをコードするヌクレオチド配列に任意で連結されたヒト２１ＯＨのｃＤＮＡである。特定の場合では、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列（例えば、異種配列）は、タグ、例えば、血球凝集素（ＨＡ）、ＵＡ、ｃＭｙｃ、または任意の好適なタグをコードするヌクレオチド配列に連結される。「ＣＹＰＨＡ」は、ＨＡタグをコードする配列に融合された２１ＯＨ導入遺伝子を指してもよい。

【００３０】

「同一性」、「相同性」という用語、及びそれらの文法的変形は、２以上の参照される実体が「整列させた」配列である場合に、それらが同じであることを意味する。したがって、一例として、２つのポリペプチド配列が同一である場合、それらは少なくとも参照された領域内または部分内で同じアミノ酸配列を有する。２つのポリヌクレオチド配列が同一である場合、それらは少なくとも参照された領域内または部分内で同じポリヌクレオチド配列を有する。同一性は、配列の定義されたエリア（領域またはドメイン）にわたることができる。同一性の「エリア」または「領域」とは同じである２以上の参照された実体の部分を指す。したがって、２つのタンパク質配列または核酸配列が１以上の配列エリアまたは配列領域にわたって同一である場合、それらはその領域内で同一性を共有する。「整列させた」配列とは、複数のポリヌクレオチドまたはタンパク質（アミノ酸）の配列を指し、参照配列と比べて欠落または追加の塩基またはアミノ酸（ギャップ）の補正を含有することが多い。

【００３１】

同一性は配列の長さ全体または配列の一部に及ぶことができる。特定の態様では、同一性パーセントを共有する配列の長さは、２、３、４、５以上の連続したポリヌクレオチドまたはアミノ酸、例えば、少なくとも６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上の連続したアミノ酸である。追加の特定の態様では、同一性を共有する配列の長さは、２０以上の連続したポリヌクレオチドまたはアミノ酸、例えば、少なくとも２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、またはそれ以上の連続したアミノ酸である。さらなる特定の態様では、同一性を共有する配列の長さは、３５以上の連続したポリヌクレオチドまたはアミノ酸、例えば、少なくとも３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、またはそれ以上の連続したアミノ酸である。その上さらなる特定の態様では、同一性を共有する配列の長さは、５０以上の連続したポリヌクレオチドまたはアミノ酸、例えば、少なくとも５０～５５、５５～６０、６０～６５、６５～７０、７０～７５、７５～８０、８０～８５、８５～９０、９０～９５、９５～１００、１００～１１０、またはそれ以上の連続したポリヌクレオチドまたはアミノ酸である。

【００３２】

「相同な」または「相同性」という用語は、２以上の参照される実体が、所与の領域または部分にわたって少なくとも部分的な同一性を共有することを意味する。相同性または同一性の「エリア」、「領域」、または「ドメイン」は２以上の参照される実体の一部が相同性を共有する、または同じであることを意味する。したがって、２つの配列が１以上の配列領域にわたって同一である場合、それらはこれらの領域で同一性を共有する。「実質的な相同性」とは、分子が、参照分子の構造もしくは機能（例えば、生物学的機能もしくは活性）の１以上の少なくとも部分的な構造もしくは機能、または相同性を共有する参照分子の関連する／対応する領域もしくは部分を有する、または有すると予測されるように、分子が構造的または機能的に保存されていることを意味する。

【００３３】

２つの配列間の同一性（相同性）の程度は、コンピュータープログラムと数学的アルゴリズムを使用して確認することができる。同一性割合は、初期設定のパラメーターを使用するｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｃｌｕｓｔａｌｏで入手可能なアラインメントプログラムＣｌｕｓｔａｌ Ｏｍｅｇａを使用して算出することができる。Ｓｉｅｖｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，”Ｆａｓｔ，ｓｃａｌａｂｌｅ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｈｉｇｈ－ｑｕａｌｉｔｙ ｐｒｏｔｅｉｎ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｌｉｇｎｍｅｎｔｓ ｕｓｉｎｇ Ｃｌｕｓｔａｌ Ｏｍｅｇａ．”（２０１１，Ｏｃｔｏｂｅｒ，１１），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｓｙｓｔｅｍｓ ｂｉｏｌｏｇｙ，７：５３９を参照のこと。配列に対する同一性を計算する目的については、タグのような拡張は含まれない。

【００３４】

本明細書に記載されているｒＡＡＶベクターゲノム配列を含むベクターゲノム配列は、１以上の「発現制御要素」を含むことができる。通常、発現制御要素は、操作可能に連結されたポリヌクレオチドの発現に影響を与える核酸配列である。ベクター内に存在する、プロモーター及びエンハンサーのような本明細書に示されている発現制御要素を含む制御要素は、適切な異種ポリヌクレオチド（例えば、２１ＯＨ遺伝子）の転写及び／または翻訳（例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンのスプライシングシグナル、ｍＲＮＡのインフレーム翻訳を可能にする遺伝子の正しいリーディングフレームの維持など）を促進するために含められる。発現制御配列は、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーター及びエンハンサーの配列；スプライシングシグナル及びポリアデニル化（ポリＡ）シグナルのような効率的なＲＮＡプロセシングシグナル；細胞質ｍＲＮＡを安定させる配列；翻訳効率を高める配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を高める配列；及び場合によっては、コードされた産物（例えば、２１ＯＨ）の分泌を高める配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶベクターゲノム配列は、コザック配列（例えば、ＲＮＡコザック配列に転写されるＤＮＡ配列）のようなコンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶベクターゲノム配列は、２１ＯＨタンパク質をコードするヌクレオチド配列の上流にコザック配列を含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡコザック配列は、ＡＣＣＡＵＧＧ（配列番号４４）、ＧＣＣＧＣＣＡＣＣＡＵＧＧ（配列番号４５）、ＣＣＡＣＣＡＵＧ（配列番号４６）、またはＣＣＡＣＣＡＵＧＧ（配列番号４７）を含む、またはそれから成る。

【００３５】

発現制御は、転写、翻訳、スプライシング、メッセージ安定性などのレベルで行うことができる。通常、転写を調節する発現制御要素は転写されたポリヌクレオチドの５’末端近く（すなわち、「上流」）に並置される。発現制御要素は、転写された配列の３’末端（すなわち、「下流」）または転写物内（例えば、イントロン内）に位置することもできる。発現制御要素は、転写された配列から離れて（例えば、２１ＯＨを発現するヌクレオチド配列から１００～５００、５００～１０００、２０００～５０００、５０００～１０，０００ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチド）、かなり離れてさえ位置するができる。それにもかかわらず、ＡＡＶベクターの場合、ポリヌクレオチドの長さの制限によって、そのような発現制御要素は通常、２１ＯＨをコードするヌクレオチド配列から１～１０００ヌクレオチド以内にあるであろう。

【００３６】

機能的には、２１ＯＨをコードする操作可能に連結されたヌクレオチド配列の発現は、要素がヌクレオチド配列の転写、及び適宜、転写物の翻訳を調節するように要素（例えば、プロモーター）によって少なくとも部分的に制御可能である。発現制御要素の具体的な例はプロモーターであり、それはふつう、転写された配列の５’に位置する。発現制御要素の別の例はエンハンサーであり、それは転写された配列の５’、転写された配列の３’、または転写配列内に位置することができる。

【００３７】

本明細書で使用されるとき「プロモーター」は、組換え産物（例えば、２１ＯＨ）をコードする核酸配列（例えば、異種ポリヌクレオチド）に隣接して位置する核酸配列を指すことができる。プロモーターは通常、隣接する配列、例えば、異種ポリヌクレオチドに操作可能に連結される。プロモーターは通常、プロモーターが存在しない場合に発現される量と比べて、異種ポリヌクレオチドから発現される量を増加させる。

【００３８】

本明細書で使用されるとき「エンハンサー」は２１ＯＨをコードするヌクレオチド配列に隣接して位置する配列を指すことができる。エンハンサー要素は通常、プロモーター要素の上流に位置するが、ＤＮＡ配列（例えば、２１ＯＨをコードするヌクレオチド配列）の下流またはＤＮＡ配列内にて機能もするし、位置することができる。したがって、エンハンサー要素は、例えば、異種ポリヌクレオチドの上流または下流の１００塩基対、２００塩基対、または３００以上の塩基対に位置することができる。エンハンサー要素は通常

、プロモーター要素によってもたらされる発現増加のレベルを超えて、異種ポリヌクレオチドの発現を増加させる。

【００３９】

いくつかの実施形態では、発現制御要素には、多くの異なる細胞型にてポリヌクレオチドの発現を駆動することができる遍在的な、構成的な、または無差別なプロモーター及び／またはエンハンサーが含まれる。そのような要素には、サイトメガロウイルス／β－アクチンのハイブリッド（例えば、ＣＡＧ、ＣＢ６またはＣＢＡ）プロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）前初期プロモーター及び／またはエンハンサー配列、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター及び／またはエンハンサー配列、ならびに種々の哺乳類細胞型にて活性がある他のウイルスのプロモーター及び／またはエンハンサー、あるいは自然界には存在しない合成要素（例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｅｌｌ，４１：５２１－５３０（１９８５））、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、ニワトリβ－アクチン（ＣＢＡ）プロモーター、ＥＦ１プロモーター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＣＢＡプロモーターと結合した前初期ＣＭＶエンハンサー（Ｂｅｌｔｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ，１７（９）：１１６２－１１７４（２０１０））、ならびにＣＢｈプロモーター（Ｇｒａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ，２２（９）：１１４３－１１５３（２０１１））が挙げられるが、これらに限定されない。特定の態様では、本開示のｒＡＡＶは、ＣＭＶエンハンサーの一部、ニワトリβアクチンプロモーターの一部、及びＵＢＣエンハンサーの一部を含む合成ＣＡＳＩプロモーターを含む。例えば、ＷＯ２０１２／１１５９８０を参照のこと。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターは配列番号２または配列番号２と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、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％同一であるヌクレオチド配列を含むＣＡＧプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターは配列番号３または配列番号３と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、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％同一であるヌクレオチド配列を含むＰＧＫプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターは配列番号４８、または配列番号４８と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、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％同一であるヌクレオチド配列を含むＣＢ６プロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、配列番号４９、または配列番号４９と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、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％同一であるヌクレオチド配列を含むＣＢＡプロモーター配列を含む。プロモーター配列の非限定的な例については、表１を参照のこと。

【００４０】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の制御を可能にし、外来性に供給される化合物、温度のような環境因子、特定の生理学的状態、急性期、細胞の特定の分化状態の存在によって、または複製している細胞のみにて調節され得る。誘導性プロモーター及び誘導性システムは、限定しないでＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ及びＣｌｏｎｔｅｃｈを含む、種々の商業的供給源から入手できる。他にも多くのシステムが記載されており、使用することができる。外来性に供給される化合物によって調節される誘導性プロモーターの例には、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオニン（ＭＴ）プロモーター、デキサメタゾン（Ｄｅｘ）－誘導性マウス乳癌ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、Ｔ７ポリメラーゼプロモーターシステム；エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制系、テトラサイクリン誘導系、ＲＵ４８６誘導系、及びラパマイシン誘導系が挙げられる。厳密に調節され、２１ＯＨ発現が意図される特定の標的細胞型に特異的である任意の種類の誘導性プロモーターが使用されて

もよい。

【００４１】

発現制御要素（例えば、プロモーター）には、本明細書にて「組織特異的発現制御要素／プロモーター」と呼ばれる、特定の組織または細胞型にて活性があるものが含まれる。組織特異的発現制御要素は通常、特定の細胞または組織（例えば、副腎、副腎皮質、肝臓、脳、中枢神経系、脊髄、眼、網膜、骨、筋肉、肺、膵臓、心臓、腎の細胞など）で活性がある。発現制御要素は、特定の細胞型、組織型、または臓器型に特有の転写活性化因子タンパク質、または他の転写調節因子によって認識されるので、通常、これらの細胞、組織、または臓器で活性がある。したがって、場合によっては、本開示のｒＡＡＶベクターは、宿主細胞（例えば、副腎細胞）における２１ＯＨタンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現を指図するプロモーターを含む。特定の実施形態では、副腎細胞は副腎皮質細胞である。いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶベクターは、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列を含み、非ＡＡＶヌクレオチド配列は、副腎皮質細胞または副腎髄質細胞における発現に特異的なプロモーターに操作可能に連結される。いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶベクターは、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列を含み、非ＡＡＶヌクレオチド配列は、対象の副腎（例えば、副腎皮質または副腎髄質）、肝臓または卵巣における発現に特異的なプロモーターに操作可能に連結される。いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶベクターは、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列を含み、非ＡＡＶヌクレオチド配列は、副腎幹細胞（例えば、副腎皮質幹細胞）または副腎前駆細胞における発現に特異的なプロモーターに操作可能に連結される。

【００４２】

いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶベクターで有用な調節配列はイントロンも含有し、このイントロンは任意で、プロモーター／エンハンサー配列と２１ＯＨ遺伝子との間に位置する。いくつかの実施形態では、イントロン配列はＳＶ－４０に由来し、ＳＤ－ＳＡと呼ばれる１００ｂｐのミニイントロンスプライスドナー／スプライスアクセプターである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターは転写後調節要素を含む。転写後調節要素の一例は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後要素（ＷＰＲＥ）である。（例えば、Ｗａｎｇ ａｎｄ Ｖｅｒｍａ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，９６：３９０６－３９１０（１９９９）を参照のこと）。特定の実施形態では、転写後調節要素は、Ｂ型肝炎ウイルス転写後調節要素（ＨＢＶＰＲＥ）またはＲＮＡ輸送要素（ＲＴＥ）である。いくつかの実施形態では、ＷＰＲＥ配列またはＨＢＶＰＲＥ配列は、米国特許第６，１３６，５９７号または米国特許第６，２８７，８１４号に開示されているＷＰＲＥ配列またはＨＢＶＰＲＥ配列のいずれかである。いくつかの実施形態では、ＷＰＲＥ配列は以下を含む、またはそれらから成る：

ａａｔｃａａｃｃｔｃ ｔｇｇａｔｔａｃａａ ａａｔｔｔｇｔｇａａ ａｇａｔｔｇａ
ｃｔｇ ａｔａｔｔｃｔｔａａ ｃｔａｔｇｔｔｇｃｔ
ｃｃｔｔｔｔａｃｇｃ ｔｇｔｇｔｇｇａｔａ ｔｇｃｔｇｃｔｔｔａ ａｔｇｃｃｔｃ
ｔｇｔ ａｔｃａｔｇｃｔａｔ ｔｇｃｔｔｃｃｃｇｔ
ａｃｇｇｃｔｔｔｃｇ ｔｔｔｔｃｔｃｃｔｃ ｃｔｔｇｔａｔａａａ ｔｃｃｔｇｇｔ
ｔｇｃ ｔｇｔｃｔｃｔｔｔａ ｔｇａｇｇａｇｔｔｇ
ｔｇｇｃｃｃｇｔｔｇ ｔｃｃｇｔｃａａｃｇ ｔｇｇｃｇｔｇｇｔｇ ｔｇｃｔｃｔｇ
ｔｇｔ ｔｔｇｃｔｇａｃｇｃ ａａｃｃｃｃｃａｃｔ
ｇｇｃｔｇｇｇｇｃａ ｔｔｇｃｃａｃｃａｃ ｃｔｇｔｃａａｃｔｃ ｃｔｔｔｃｔｇ
ｇｇａ ｃｔｔｔｃｇｃｔｔｔ ｃｃｃｃｃｔｃｃｃｇ
ａｔｃｇｃｃａｃｇｇ ｃａｇａａｃｔｃａｔ ｃｇｃｃｇｃｃｔｇｃ ｃｔｔｇｃｃｃ
ｇｃｔ ｇｃｔｇｇａｃａｇｇ ｇｇｃｔａｇｇｔｔｇ
ｃｔｇｇｇｃａｃｔｇ ａｔａａｔｔｃｃｇｔ ｇｇｔｇｔｔｇｔｃｇ ｇｇｇａａｇｃ
ｔｇａ ｃｇｔｃｃｔｔｔｃｃ ａｔｇｇｃｔｇｃｔｃ
ｇｃｃｔｇｔｇｔｔｇ ｃｃａａｃｔｇｇａｔ ｃｃｔｇｃｇｃｇｇｇ ａｃｇｔｃｃｔ

ｔｃｔ ｇｃｔａｃｇｔｃｃｃ ｔｔｃｇｇｃｔｃｔｃ
ａａｔｃｃａｇｃｇｇ ａｃｃｔｃｃｃｔｔｃ ｃｃｇａｇｇｃｃｔｔ ｃｔｇｃｃｇｇ
ｔｔｃ ｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔ ｃｃｃｇｃｇｔｃｔｔ
ｃｇｃｔｔｔｃｇｇｃ ｃｔｃｃｇａｃｇａｇ ｔｃｇｇａｔｃｔｃｃ ｃｔｔｔｇｇｇ
ｃｃｇ ｃｃｔｃｃｃｃｇｃｃ ｔｇ（配列番号５１）。

【００４３】

いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターはポリＡシグナルを含む。ポリＡシグナルは、限定しないでＳＶ－４０、ヒト及びウシを含む、多くの好適な種に由来してもよい。

【００４４】

ｒＡＡＶベクターに含まれてもよい別の有用な調節成分は内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）である。ＩＲＥＳ配列または他の好適なシステムを使用して、単一の遺伝子転写物から１を超えるポリペプチドを生成してもよい。ＩＲＥＳ（または他の好適な配列）を使用して、１より多くのポリペプチド鎖を含有するタンパク質を生成する、または同じ細胞からまたは同じ細胞内で２つの異なるタンパク質を発現させる。例示的なＩＲＥＳはポリオウイルス内部リボソーム侵入配列である。ＩＲＥＳはｒＡＡＶベクターにて２１ＯＨ導入遺伝子の５’または３’に位置してもよい。他の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、単一のプロモーターからの複数のポリペプチドの発現を可能にする２Ａペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

【００４５】

組換え「ベクター」または「ｒＡＡＶベクター」は、分子法を使用してウイルスから野生型ゲノムを除去し、それを非ネイティブ核酸、例えば、異種ポリヌクレオチド配列（例えば、２１ＯＨを発現する治療用遺伝子発現カセット）で置き換えることによってＡＡＶのようなウイルスの野生型ゲノムから導出される。通常、ＡＡＶについては、野生型ＡＡＶゲノムの一方または双方の逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列がＡＡＶベクターにて保持される。ウイルスゲノムのすべて（または一部）がウイルスゲノム核酸に関して非ネイティブ配列に置換されているので、ｒＡＡＶベクターはウイルスゲノムと区別することができる。したがって、異種ポリヌクレオチドのような非ネイティブ配列の組み込みは、ウイルスベクターを「組換え」ベクターとして定義し、ＡＡＶの場合は「ｒＡＡＶベクター」と呼ぶことができる。２１ＯＨをコードする核酸分子を含むｒＡＡＶベクターは、「ＣＹＰ２１ベクター」または「２１ＯＨベクター」とも呼ばれてもよい。文脈から明らかなように、「ベクター」は、単離された組換えヌクレオチド配列、または組換えヌクレオチド配列を含むＡＡＶ粒子もしくはＡＡＶビリオンを指してもよい。

【００４６】

いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターはｍｉＲＮＡ（マイクロＲＮＡ）に対するどんな結合部位も含まない。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、２１ＯＨタンパク質の発現が望ましくない（すなわち、標的解除）細胞にて発現されるｍｉＲＮＡに対する１、２、３、４、５またはそれ以上の結合部位を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターはｍｉＲ－１２２に対する１以上の結合部位を含む。ｍｉＲ－１２２の２１ＯＨをコードする配列への結合は、ｍｉＲ－１２２が高度に広まっている肝臓細胞におけるこの配列の発現を減らしてもよい（Ｔｈａｋｒａｌ ａｎｄ Ｇｈｏｓｈａｌ，Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１５；１５（２）：１４２－１５０）。

【００４７】

ｒＡＡＶ核酸配列は、その後の生体外、試験管内または生体内での細胞の感染（形質転換）のためにウイルス（本明細書では「粒子」または「ビリオン」とも呼ばれる）にパッケージングすることができる。組換えベクター配列がカプシドに包まれる、またはＡＡＶ粒子にパッケージングされる場合、その粒子は「ｒＡＡＶ」と呼ばれ得る。そのような粒子またはビリオンには通常、ベクターゲノムをカプシドで包むまたはパッケージングするタンパク質が含まれる。特定の例には、ウイルスエンベロープタンパク質、及びＡＡＶの場合はカプシドタンパク質が含まれる。

【００４８】

本明細書に記載されているｒＡＡＶベクター及びｒＡＡＶ粒子のＡＡＶ成分は、種々のＡＡＶ血清型から選択されてもよい。特定の場合では、ｒＡＡＶベクターは、ｒｈ１０、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、またはｒｈ７４の血清型に由来するＡＡＶ核酸配列を含んでもよい。これらのＡＡＶ成分は種々の技術を使用してＡＡＶ血清型から容易に単離されてもよい。そのようなＡＡＶは、学術的な、商業的な、または公的な情報源（例えば、ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）から単離されてもよいし、または得られてもよい。あるいは、ＡＡＶ配列は、文献または、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ（商標）、ＰｕｂＭｅｄなどのようなデータベースで入手可能である公開配列を参照することによって、合成手段または他の好適な手段を介して得られてもよい。

【００４９】

特定の実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第７，９０６，１１１号または米国特許第７，６２９，３２２号に開示されているようなＡＡＶ核酸配列またはＡＡＶタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第７，２８２，１９９号、同第９，５８７，２５０号または同第９，６７７，０８９号に開示されているようなＡＡＶ血清型ＡＡＶ８またはその変異体に由来するＡＡＶ核酸配列またはＡＡＶタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第７，１９８，９５１号に開示されているようなＡＡＶ血清型ＡＡＶ９またはその変異体に由来するＡＡＶ核酸配列またはＡＡＶタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第９，８４０，７１９号に開示されているようなＡＡＶ血清型ｒｈ７４またはその変異体に由来するＡＡＶ核酸配列またはＡＡＶタンパク質を含む。

【００５０】

いくつかの態様では、本開示のｒＡＡＶベクターは少なくとも１つのＡＡＶのＩＴＲ配列を含む核酸分子を含む。特定の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは２つのＩＴＲ配列を含み、これらのＩＴＲ配列は同じまたは異なるＡＡＶ血清型のものであってもよい。特定の場合では、ＡＡＶのＩＴＲは、限定しないで、ｒｈ１０、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ７４、及び他のＡＡＶ血清型を含む任意のＡＡＶ血清型の中から選択されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているｒＡＡＶベクターは１または２のＡＡＶ２のＩＴＲの配列を含むゲノムを含む。

【００５１】

本開示はさらに、本明細書に記載されているｒＡＡＶベクターを含むｒＡＡＶ粒子を提供する。したがって、いくつかの態様では、本開示は、少なくとも１つのＡＡＶのＩＴＲを含む核酸分子と、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列（異種ポリヌクレオチドとも呼ばれる）とを含むｒＡＡＶ粒子に関するものであり、該非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ血清型ｒｈ１０、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ７４、及び他のＡＡＶ血清型から成る群から選択される少なくとも１つのカプシドタンパク質を含む。

【００５２】

一実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ヒト２１ＯＨのｃＤＮＡと、ＡＡＶ２由来のＩＴＲと、サイトメガロウイルス前初期遺伝子由来のエンハンサー、プロモーター、ニワトリβ－アクチン遺伝子由来のスプライスドナー及びイントロン、及びウサギβ－グロビン遺伝子由来のスプライスアクセプターから成るＣＡＧプロモーターとを含むｒｈ１０　Ａ

ＡＶベクターである。さらなる実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、配列番号１を含む２１ＯＨタンパク質をコードする核酸配列及び配列番号２を含むまたは配列番号２から成るＣＡＧプロモーターを含む。一実施形態では、ｒＡＡＶベクターはヒト２１ＯＨのｃＤＮＡと、ＡＡＶ２由来のＩＴＲと、ＰＧＫプロモーターとを含むｒｈ１０　ＡＡＶベクターである。別の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、配列番号１を含む２１ＯＨタンパク質をコードする核酸配列及び配列番号３を含むまたは配列番号３から成るＰＧＫプロモーターを含む。

【００５３】

いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ１カプシドと、ヒト２１ＯＨのｃＤＮＡ；ＣＡＧ、ＰＧＫ、ＣＢＡまたはＣＢ６プロモーター；及び任意で１または２のＡＡＶ２のＩＴＲ配列を含む核酸分子とを含む。一実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ２のＩＴＲ配列を持つゲノムを含有し、ＡＡＶ１カプシドタンパク質をコードするｓｓＡＡＶ１－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１ＨＡベクターである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ１－ＣＡＧ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ１－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ１－ＣＢＡ－ＣＹＰ２１、またはＡＡＶ１－ＣＢ６－ＣＹＰ２１ベクターである。他の実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ５カプシドと、ヒト２１ＯＨのｃＤＮＡ；ＣＡＧ、ＰＧＫ、ＣＢＡまたはＣＢ６プロモーター；及び任意で１または２のＡＡＶ２のＩＴＲ配列を含む核酸分子とを含む。

【００５４】

一実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ２のＩＴＲ配列を持つゲノムを含有し、ＡＡＶ５カプシドタンパク質をコードするｓｓＡＡＶ５－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１ＨＡベクターである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ５－ＣＡＧ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ５－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ５－ＣＢＡ－ＣＹＰ２１、またはＡＡＶ５－ＣＢ６－ＣＹＰ２１ベクターである。さらに他の実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ヒト２１ＯＨのｃＤＮＡ；ＣＡＧ、ＰＧＫ、ＣＢＡまたはＣＢ６プロモーター；及び任意で１または２のＡＡＶ２のＩＴＲ配列を含むＡＡＶ６ベクターである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ６－ＣＡＧ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ６－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ６－ＣＢＡ－ＣＹＰ２１、またはＡＡＶ６－ＣＢ６－ＣＹＰ２１ウイルスである。さらなる実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ８カプシドと、ヒト２１ＯＨのｃＤＮＡ；ＣＡＧ、ＰＧＫ、ＣＢＡまたはＣＢ６プロモーター；及び任意で１または２のＡＡＶ２のＩＴＲ配列を含む核酸分子とを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ８－ＣＡＧ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ８－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ８－ＣＢＡ－ＣＹＰ２１、またはＡＡＶ８－ＣＢ６－ＣＹＰ２１ウイルスである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ヒト２１ＯＨのｃＤＮＡ；ＣＡＧ、ＰＧＫ、ＣＢＡまたはＣＢ６プロモーター；及び任意で１または２のＡＡＶ２のＩＴＲ配列を含むＡＡＶ９ベクターである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ９－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ９－ＣＢＡ－ＣＹＰ２１、またはＡＡＶ９－ＣＢ６－ＣＹＰ２１ベクターである。追加の実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ１０カプシドと、ヒト２１ＯＨのｃＤＮＡ；ＣＡＧ、ＰＧＫ、ＣＢＡまたはＣＢ６プロモーター；及び任意で１または２のＡＡＶ２のＩＴＲ配列を含む核酸分子とを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ１０－ＣＡＧ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ１０－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶ１０－ＣＢＡ－ＣＹＰ２１、またはＡＡＶ１０－ＣＢ６－ＣＹＰ２１ウイルスである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ１０カプシドと、ヒト２１ＯＨのｃＤＮＡ；ＣＡＧ、ＰＧＫ、ＣＢＡまたはＣＢ６プロモーター；及び任意で１または２のＡＡＶ２のＩＴＲ配列を含む核酸分子とを含む。

【００５５】

一実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ２のＩＴＲ配列を持つゲノムを含有し、ｒｈ１０カプシドタンパク質をコードするＡＡＶｒｈ１０－ＣＡＧ－ＣＹＰ２１Ａ２－ＨＡウイルスである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶｒｈ１０－ＣＡＧ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶｒｈ１０－ＰＧＫ－ＣＹＰ２１、ＡＡＶｒｈ１０－ＣＢＡ－ＣＹＰ２１、またはＡＡＶｒｈ１０－ＣＢ６－ＣＹＰ２１ウイルスである。これらの実施形態のいずれかでは、プロモーターは、配列番号２、配列番号３、配列番号４８、もしくは配列番号４９、または配列番号２、配列番号３、配列番号４８、もしくは配列番号４９と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、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％同一であるヌクレオチド配列を含んでもよく、またはそれから成ってもよい。これらの実施形態のいずれかでは、ｒＡＡＶベクターはコザック配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、コザック配列は、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、または配列番号４７を含んでもよく、またはそれらに転写されてもよい。これらの実施形態のいずれかでは、ｒＡＡＶベクターはさらに、ＨＢＶＰＲＥ配列またはＷＰＲＥ配列（例えば、配列番号５１）を含んでもよい。

【００５６】

いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＣＢＡプロモーターの制御下にて及びさらにｍｉＲ－１２２結合配列の有無にかかわらず、ヒト２１ＯＨをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を含み、コザック配列を含むＡＡＶ５血清型ベクターまたは粒子である。一実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＣＢＡプロモーターと、コザック配列と、標的解除のためのｍｉＲ－１２２　ｍｉＲＮＡ結合部位（Ｔｈａｋｒａｌ及びＧｈｏｓｈａｌ，Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２０１５；１５（２）：１４２－１５０）と、コドン最適化（ＣＯ）ヒトＣＹＰ２１導入遺伝子（配列番号５０）とを含むＡＡＶ５－ＣＢＡ－Ｋｏｚａｋ－ＣＯｈＣＹＰ２１－ｍｉＲ１２２ベクターである。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ５－ＣＢＡ－Ｋｏｚａｋ－ｈＣＹＰ２１ベクター、ＡＡＶ５－ＣＢＡ－Ｋｏｚａｋ－ｈＣＹＰ２１－ｍｉＲ１２２ベクター、またはＡＡＶ５－ＣＢＡ－Ｋｏｚａｋ－ＣＯｈＣＹＰ２１ベクターである。これらの実施形態のいずれかでは、コドン最適化ヌクレオチド配列は配列番号５０を含んでもよく、コザック配列は配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、または配列番号４７を含んでもよく、またはそれらに転写されてもよい。これらの実施形態のいずれかでは、ｒＡＡＶベクターはさらに、ＨＢＶＰＲＥ配列またはＷＰＲＥ配列（例えば、配列番号５１）を含んでもよい。

【００５７】

いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、カプシド（「Ｃａｐ」）タンパク質（例えば、ｖｐ１、ｖｐ２、ｖｐ３及び超可変領域を含む）、ウイルス複製（「Ｒｅｐ」）タンパク質（例えば、ｒｅｐ７８、ｒｅｐ６８、ｒｅｐ５２、またはｒｅｐ４０）、及び／または１以上のそのようなタンパク質をコードする配列を含む。これらのＡＡＶ構成成分は種々のベクター系及び宿主細胞にて容易に利用されてもよい。そのような構成成分は、単独で、他のＡＡＶ血清型配列もしくは構成成分と組み合わせて、または非ＡＡＶウイルス配列由来の要素と組み合わせて使用されてもよい。本明細書で使用されるとき、人工ＡＡＶ血清型には限定しないで、天然に存在しないカプシドタンパク質を持つＡＡＶが含まれる。そのような人工カプシドは、選択されたＡＡＶ配列（例えば、ｖｐ１カプシドタンパク質の断片）を、異なる選択されたＡＡＶ血清型から、同じＡＡＶ血清型の非連続部分から、非ＡＡＶウイルス源から、または非ウイルス源から得られてもよい異種配列と組み合わせて使用して、任意の好適な技術によって生成されてもよい。人工ＡＡＶ血清型は、限定しないで、偽型ＡＡＶ、キメラＡＡＶカプシド、組換えＡＡＶカプシド、または「ヒト化」ＡＡＶカプシドであってもよい。１つのＡＡＶのカプシドが異種カプシドタンパク質で置換されている偽型ベクターは本開示にて有用である一実施形態では、ＡＡＶはＡＡＶ２／５である。別の実施形態では、ＡＡＶはＡＡＶ２／８である

。例えば、Ｍｕｓｓｏｌｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，１８（７）：６３７－６４５（２０１１）；Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ，７６（２）：７９１－８０１（２００２）を参照のこと。

【００５８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている組成物及び方法にて有用なベクターは、少なくとも、選択されたＡＡＶ血清型カプシドまたはその断片をコードする配列を含有する。いくつかの実施形態では、有用なベクターは、少なくとも、選択されたＡＡＶ血清型ｒｅｐタンパク質またはその断片をコードする配列を含有する。任意で、そのようなベクターはＡＡＶのｃａｐタンパク質とｒｅｐタンパク質の双方を含有してもよい。ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐの双方が提供されているベクターでは、ＡＡＶのｒｅｐ配列及びＡＡＶのｃａｐ配列は双方とも１つの血清型であることができる。あるいは、ｒｅｐ配列が１つのＡＡＶ血清型に由来し、ｃａｐ配列が異なるＡＡＶ血清型に由来するベクターが使用されてもよい。一実施形態では、ｒｅｐ配列及びｃａｐ配列は別個の供給源（例えば、別個のベクター、または宿主細胞とベクター）から発現される。別の実施形態では、これらのｒｅｐ配列は、異なるＡＡＶ血清型のｃａｐ配列にインフレームで融合されて、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第７，２８２，１９９号に記載されているＡＡＶ２／８のようなキメラＡＡＶベクターを形成する。

【００５９】

好適なｒＡＡＶは、本明細書に定義されているＡＡＶ血清型カプシドタンパク質またはその断片をコードする核酸配列と；機能的なｒｅｐ遺伝子と；少なくとも、ＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）及び２１ＯＨ（ＣＹＰ２１Ａ２）核酸配列で構成される核酸分子と；ＡＡＶカプシドタンパク質への核酸分子のパッケージングを可能にする十分なヘルパー機能とを含有する宿主細胞を培養することによって生成することができる。いくつかの態様では、本開示は本明細書に開示されているｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子を含む宿主細胞を提供する。ｒＡＡＶベクターをＡＡＶカプシド内にパッケージングするために宿主細胞内に存在する必要がある成分は、トランスで宿主細胞に提供されてもよい。あるいは、必要とされる成分（例えば、ベクター、ｒｅｐ配列、ｃａｐ配列、及び／またはヘルパー機能）のいずれか１以上は、種々の方法を使用して、必要とされる成分の１以上を含有するように操作されている安定な宿主細胞によって提供されてもよい。最も好適には、そのような安定な宿主細胞は、誘導性プロモーターの制御下に必要とされる成分（複数可）を含有するであろう。しかしながら、必要とされる成分（複数可）は構成的プロモーターの制御下にあってもよい。好適な誘導性プロモーター及び構成的プロモーターの例は、非ＡＡＶヌクレオチド配列、すなわち２１ＯＨと共に使用するのに好適な調節要素に関する上記の議論にて本明細書に提供されている。さらに別の代替例では、選択された安定な宿主細胞は構成的プロモーターの制御下にある選択された成分（複数可）と、１以上の誘導性プロモーターの制御下にある他の選択された成分（複数可）を含有してもよい。例えば、２９３細胞（構成的プロモーターの制御下にあるＥ１ヘルパー機能を含有する）に由来するが、誘導性プロモーターの制御下にあるｒｅｐタンパク質及び／またはｃａｐタンパク質を含有する安定な宿主細胞が生成されてもよい。さらに他の安定な宿主細胞が生成されてもよい。

【００６０】

本開示のｒＡＡＶを生成するために必要とされるｒＡＡＶベクター、ｒｅｐ配列、ｃａｐ配列、及びヘルパー機能は、その上に担持される配列を伝達する任意の遺伝要素の形態でパッケージング宿主細胞に送達されてもよい。選択された遺伝要素は、本明細書に記載されている方法を含む任意の好適な方法によって送達されてもよい。ｒＡＡＶ粒子の生成を含む、本開示の任意の実施形態を構築するのに使用される方法は、核酸操作の当業者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学及び合成技術を含む。そのそれぞれの全体が参照によって本明細書に組み込まれるＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ；Ｆｉｓｈ

ｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７０：５２０－５３２（１９９３）；及び米国特許第５，４７８，７４５号を参照のこと。

【００６１】

一態様では、本開示は、ｒＡＡＶ粒子を生成する方法を提供し、該方法は、（ａ）本明細書に記載されている２１ＯＨを発現するｒＡＡＶベクターゲノムを含む、またはそれから成る核酸分子と；（ｂ）ＡＡＶのｒｅｐをコードする核酸分子と；（ｃ）少なくとも１つのＡＡＶカプシドタンパク質をコードする核酸分子と；（ｄ）ｒＡＡＶベクターゲノムをｒＡＡＶ粒子にパッケージングするための十分なヘルパー機能とを含有する宿主細胞を培養することを含む。

【００６２】

本開示のｒＡＡＶ粒子は種々の方法によって精製されてもよい。一実施形態では、ｒＡＡＶウイルスはアニオン交換クロマトグラフィーによって精製されてもよい。例えば、米国特許公開第２０１８／０１６３１８３　Ａ１号を参照のこと。本明細書に開示されているＡＡＶベクター及びＡＡＶ粒子の構築及び特徴付けに関するさらなる詳細は、国際特許公開第ＷＯ２０１９／１４３８０３号に記載されており、その全体があらゆる目的で参照によって本明細書に組み込まれる。

【００６３】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているヒトＣＹＰ２１Ａ２導入遺伝子のための発現カセットを含有する非複製組換えＡＡＶ血清型５（ＡＡＶ５）ベクターを含む組成物は、図４に示すＡＡＶ－ｈＣＹＰ２１－Ｏｐｔベクターの設計を有する。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ５粒子にパッケージングされる導入遺伝子の配列は、５’から３’に列挙される以下の要素：ＡＡＶの５’逆方向末端反復（ＩＴＲ）と、ＡＡＶパッケージングシグナル（Ψ）と、サイトメガロウイルスエンハンサーと、スプライスドナーを持つ標準的なコザック配列及びスプライスアクセプターを持つウサギβ－グロビンイントロンを含むニワトリβ－アクチンプロモーターと、配列番号５０のコドン最適化ヒト２１－ヒドロキシラーゼ（２１－ＯＨ）のｃＤＮＡと、ウサギβ－グロビンポリＡシグナルと、ＡＡＶの３’逆方向末端反復ＩＴＲとで構成される一本鎖ＤＮＡである。

【００６４】

いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの発現カセットは配列番号５２の核酸配列を含む、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの発現カセットは配列番号５３の核酸配列を含む５’ＩＴＲを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの発現カセットは配列番号５４の核酸配列を含むＣＭＶＩＥエンハンサーを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの発現カセットは配列番号５５の核酸配列を含むＣＢＡプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの発現カセットは配列番号５６の核酸配列を含むイントロンを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの発現カセットは配列番号５７の核酸配列を含むコドン最適化ｈＣＹＰ２１を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの発現カセットは配列番号５８の核酸配列を含むβ－グロビンポリＡを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの発現カセットは配列番号５９の核酸配列を含む３’ＩＴＲを含む。

【００６５】

医薬組成物

本開示のｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる。一態様では、本開示は、本明細書に開示されているｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子（例えば、２１ＯＨをコードする核酸配列を含むｒＡＡＶ粒子）と、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される」という用語は、確立された経路を使用して投与した場合に一般にアレルギー反応または他の重篤な有害反応を生じない分子実体及び組成物を指す。動物、及びさらに具体的にはヒトで使用するために米国連邦政府もしくは米国州政府の規制当局によって承認された分子実体及び組成物、または米国薬局方もしくはその他の一般に認められた薬局方に列挙されている分子実体及び組成物は、「薬学的に許容され

る」と見なされる。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される担体」という用語は、医薬投与に適合する任意の及びあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含むことが意図されている。好適な担体は、この分野の標準参考文献であるＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓの最新版に記載されており、参照によって本明細書に組み込まれる。そのような担体または希釈剤のいくつかの例には、水、生理食塩水、緩衝生理食塩水、リンゲル液、ブドウ糖溶液、５％ヒト血清アルブミン及びｐＨを適切な生理学的レベルに維持するための他の緩衝液、例えば、ＨＥＰＥＳが挙げられるが、これらに限定されない。任意の媒体または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除き、組成物におけるそれらの使用が企図されている。補足の活性化合物を組成物に組み込むこともできる。

【００６６】

この説明全体を通して、「ｖｇ」は「ウイルスゲノム」または「ベクターゲノム」を指してもよい。

【００６７】

本明細書に開示されているｒＡＡＶの投与に使用されてもよい医薬組成物及び送達系の例は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ，（２００３），２０th ｅｄ．，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．；Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ．（１９９０），１８th ｅｄ．，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．；Ｔｈｅ　Ｍｅｒｃｋ　Ｉｎｄｅｘ．（１９９６），１２th ｅｄ．，Ｍｅｒｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ，Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ，Ｎ．Ｊ．；Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｏｆ　Ｓｏｌｉｄ　Ｄｏｓａｇｅ　Ｆｏｒｍｓ．（１９９３），Ｔｅｃｈｎｏｍｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｉｎｃ．，Ｌａｎｃａｓｔｅｒ，Ｐａ．；Ａｎｓｅｌ　ａｎｄ　Ｓｔｏｋｌｏｓａ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃａｌｃｕｌａｔｉｏｎｓ．（２００１），１１th ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．；ａｎｄ　Ｐｏｚｎａｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ．（１９８０），Ｒ．Ｌ．Ｊｕｌｉａｎｏ，ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ，Ｎ．Ｙ．，ｐｐ．２５３－３１５に見いだすことができる。

【００６８】

本開示の医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように製剤化されてもよい。投与経路の例には、非経口投与、例えば、静脈内の投与または注入が挙げられる。注入には、開腹手術もしくは腹腔鏡による副腎への直接注入、またはカテーテル挿入による副腎動脈または副腎静脈への注入が含まれてもよい。非経口（例えば、静脈内または注射を介した）適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分：注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒のような無菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸または重硫酸ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）のようなキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩のような緩衝液、ならびに塩化ナトリウムまたはデキストロースのような等張性調節のための薬剤を含むことができる。ｐＨは塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基で調整することができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨て注射器、またはガラスもしくはプラスチックで出来た複数回用量バイアルに封入され得る。

【００６９】

注射可能な使用に好適な医薬組成物には、無菌水溶液（水溶性の場合）または分散系及び無菌注射用溶液もしくは分散系の即時調製のための無菌粉末が含まれる。静脈内投与については、好適な担体には、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（登録商標）（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）、またはリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。全ての場合にて、組成物は無菌でなければならず、容易に注射できる程度に流動性でなければならない。組成物は、製造及び保管の条件下で安定でなければならず

、細菌及び真菌のような微生物の混入作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物を含有する、溶媒または分散媒であることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散系の場合には必要とされる粒度の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって達成され得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖類、例えば、マンニトール、ソルビトールのような多価アルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましいであろう。注射用組成物の持続的吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによってもたらすことができる。

【００７０】

無菌注射液は、必要な量の活性化合物を、必要に応じて、上に列挙された成分のうちの１つまたはその組み合わせと共に適切な溶媒中に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散系は、基本的な分散媒及び上で列挙されたもの由来の必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化合物を組み込むことによって調製される。無菌注射液の調製のための無菌粉末の場合、調製方法は、活性成分に、予め滅菌濾過したその溶液からの任意の追加的な成分を加えた粉末が得られる、真空乾燥及び凍結乾燥である。

【００７１】

注射については、薬学的に許容される担体は液体であることができる。例示的な生理学的に許容される担体には、発熱物質を含まない無菌水及び発熱物質を含まない無菌リン酸緩衝生理食塩水が含まれる。種々のそのような既知の担体は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第７，６２９，３２２号に提供されている。一実施形態では、担体は等張塩化ナトリウム溶液である。別の実施形態では、担体は平衡塩類溶液である。一実施形態では、担体にはＴＷＥＥＮ（登録商標）（ポリソルベート）が含まれる。ｒＡＡＶを長期保存する場合、ｒＡＡＶは、例えば、グリセロールまたはＴＷＥＥＮ（登録商標）（ポリソルベート）２０の存在下でそれが凍結されてもよい。

【００７２】

投与の容易性及び投与量の均一性のために非経口組成物を単位剤形で製剤化することが特に有利である。本明細書で使用されるとき単位剤形は、治療される対象のための単位の投与量として適した、物理的に個別的な単位を指し、各単位は、必要とされる医薬担体に関連して所望の治療効果を生じるように算出された所定量の活性剤（例えば、ｒＡＡＶ）を含有する。本開示の単位剤形の仕様は、活性剤（例えば、ｒＡＡＶ）の固有の特徴及び達成されるべき特定の治療効果、ならびに個体の治療のためにそのような活性剤（例えば、ｒＡＡＶ）を配合する技術分野の本質的な制限によって決定され、且つそれに直接依存する。単位剤形は、液体組成物、または凍結乾燥もしくは凍結乾燥状態の組成物を含んでもよく、例えば、アンプル内及びバイアル内にあってもよく；例えば、生体内での投与または送達に先立って無菌液体担体を加えることができる。個々の単位剤形は複数回用量のキットまたは容器に含めることができる。組換えベクター（例えば、ｒＡＡＶ）配列、プラスミド、ベクターゲノム、組換えウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ）、及びそれらの医薬組成物は、投与の容易性及び投与量の均一性のために単一または複数の単位剤形に包装することができる。

【００７３】

２１ＯＨをコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子を含む医薬組成物は、投与説明書と共に容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

【００７４】

いくつかの実施形態では、組成物は５．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ（３．０×１０^{13}～

７．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ）の目標濃度で本明細書に開示されている非複製の組換えＡＡＶ５ベクターの単回投与、保存剤なしで無菌の不透明、無色のＩＶ注射溶液である。いくつかの実施形態では、組成物は１０ｍＭのリン酸ナトリウム、１８０ｍＭの塩化ナトリウム、０．００５％ｗ／ｖのポロキサマー１８８及び注射用水を含有する。いくつかの実施形態では、組成物は２．５ｍＬの公称充填容積で５ｍＬのＣｒｙｓｔａｌ Ｚｅｎｉｔｈ（登録商標）（ＣＺ、環状オレフィンポリマー）バイアルに充填され、－６０℃以下で保存される。

【００７５】

一態様では、本開示は、ｒＡＡＶベクター、またはそれを含む粒子を含むキットを提供し、その際、ｒＡＡＶベクターは、少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、該非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結され；治療有効量は約１０^{12}ｖｇ／ｋｇ～約１０^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効量は約１．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量は約３×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量は約６×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、キットはさらに、ｒＡＡＶベクターを対象に投与するための説明書を含む。いくつかの実施形態では、キットはさらに、開腹手術もしくは腹腔鏡検査による副腎への直接注入によって、または対象へのカテーテル挿入による副腎動脈もしくは副腎静脈への注入によって、ｒＡＡＶベクターを静脈内投与するための説明書を含む。

【００７６】

別の態様では、本開示は、ｒＡＡＶベクター、またはそれを含む粒子を含む単位用量を提供し、その際、ｒＡＡＶベクターは、少なくとも１つのＡＡＶ逆転末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、該非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結され；治療有効量は１０^{12}ｖｇ／ｋｇ～約１０^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効量は約１．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量は約３×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量は約６×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、単位用量は液体製剤を含む。いくつかの実施形態では、単位用量は、開腹手術もしくは腹腔鏡検査を介した副腎への直接注入によって、またはカテーテル挿入を介した副腎動脈もしくは副腎静脈への注入によって、対象に静脈内投与するように構成される。

【００７７】

上記の態様のいくつかの実施形態では、２１ＯＨタンパク質はヒト２１ＯＨタンパク質である。上記の態様のいくつかの実施形態では、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列は、ヒト２１ＯＨ（ＣＹＰ２１Ａ２）のｃＤＮＡを含む、またはヒト２１ＯＨ（ＣＹＰ２１Ａ２）のｃＤＮＡから成る。上記の態様のいくつかの実施形態では、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列は、コドン最適化ヌクレオチド配列を含む、またはそれから成る。上記の態様のいくつかの実施形態では、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列は、配列番号５０を含む、または配列番号５０から成る。上記の態様のいくつかの実施形態では、２１ＯＨタンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列は、配列番号１のアミノ酸配列、または配列番号１と少なくとも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％同一であるアミノ酸配列をコードする。上記の態様のいくつかの実施形態では、プロモーターは宿主細胞にて２１ＯＨタンパク質の発現を指図する。上記の態様のいくつかの実施形態では、宿主細胞は副腎細胞または副腎皮質細胞である。上記の態様のいくつかの実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーター、ＰＧＫプロモーター、または副腎皮質細胞における発現に特異的なプロモーターである。上記の態様のいくつかの実施形態では、サイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーターは、ＣＡＧ、ＣＢ６、またはＣＢＡプロモーターである。

上記の態様のいくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号２、配列番号３、配列番号４８、または配列番号４９のヌクレオチド配列を含む、またはそれから成る。上記の態様のいくつかの実施形態では、ＩＴＲは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、またはｒｈ７４の血清型のＩＴＲである。上記の態様のいくつかの実施形態では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、またはｒｈ７４の血清型である。上記の態様のいくつかの実施形態では、ｒＡＡＶはＡＡＶ５血清型である。上記の態様のいくつかの実施形態では、核酸分子はさらにコザック配列を含む。上記の態様のいくつかの実施形態では、核酸分子さらにはｍｉＲ－１２２結合部位を含む。

【００７８】

組換えＡＡＶベクター及び粒子の使用方法

本開示は、必要とする対象の治療などにおける、ＡＡＶ（例えば、組換えＡＡＶ）ベクターの使用を含む方法を提供する。本明細書に提供されている方法は、例えば、治療有効量の本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物のいずれか１つを対象に投与することを含む。

【００７９】

特定の実施形態では、対象は、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ハムスター、マウスまたはラットである。特定の実施形態では、対象はヒトである。ヒト対象はヒト女性またはヒト男性であってもよい。いくつかの実施形態では、対象は、以前にホルモン療法プログラムを受けたことがあるヒトである。いくつかの実施形態では、対象はヒト乳児である。特定の場合では、対象は、生後約１ヵ月、生後約２ヵ月、生後約３ヵ月、生後約４ヵ月、生後約５ヵ月、生後約６ヵ月、生後約７ヵ月、生後約８ヵ月、生後９ヵ月頃、生後１０ヵ月頃、生後１１ヵ月頃、または約１歳のヒト乳児である。いくつかの実施形態では、対象は、生後３ヵ月未満、生後６ヵ月未満、生後９ヵ月未満、生後１歳未満、または生後１８ヵ月未満のヒト乳児である。

【００８０】

本明細書で使用されるとき、「必要としている患者」または「必要としている対象」という用語は、２１ＯＨをコードする核酸配列を含むｒＡＡＶまたは本明細書で提供されているそのようなｒＡＡＶを含む組成物による治療または改善が可能である疾患、障害または状態のリスクがある、またはそれに罹患している患者または対象を指す。必要としている患者または対象は、例えば、ＣＡＨのような２１ＯＨＤのような２１ＯＨの機能不全に関連する疾患と診断された患者または対象であってもよい。対象は２１ＯＨの遺伝子またはタンパク質に突然変異または機能不全を有してもよい。「対象」及び「患者」は本明細書では相互交換可能に使用される。

【００８１】

本明細書で使用されるとき、「有効量」または「治療有効量」という用語は、障害、例えば、２１ＯＨＤまたはその１以上のその症状の重症度及び／または持続期間を軽減するもしくは改善するのに、障害の進行を予防するのに、障害の後退を引き起こすのに、障害に関連する１以上の症状の再発、発生、発症または進行を防止するのに、障害を検出するのに、または別の療法（例えば、予防剤または治療剤）の予防効果（複数可）または治療効果（複数可）を増強するもしくは改善するのに十分である医薬剤、例えば、ｒＡＡＶの量を指す。有効量のｒＡＡＶは、例えば、２１ＯＨの発現を増やしてもよく、及び／または２１ＯＨＤに関連する症状の１以上をある程度軽減してもよい。

【００８２】

本開示は、２１ＯＨの欠損または機能不全を特徴とする障害または疾患を持つ対象に治療効果を提供するための、本明細書に記載されている２１ＯＨをコードする核酸分子を含むｒＡＡＶの方法及び使用を提供する。いくつかの態様では、方法は、ｒＡＡＶまたは組成物を投与することを必要とする対象に治療有効量の本明細書に記載されているｒＡＡＶ

または組成物を投与し、それによって対象にて２１ＯＨの欠損または機能不全を特徴とする当該障害または当該疾患を治療することを含む。

【００８３】

場合によっては、本開示は、治療有効量の本明細書に記載されているｒＡＡＶ粒子または本明細書に記載されている医薬組成物を対象に投与し、それによって対象にて２１ＯＨを発現させることを含む、２１ＯＨを発現させることを必要とする対象にて２１ＯＨを発現させる方法を提供する。特定の実施形態では、本開示は、治療有効量の本明細書に記載されているｒＡＡＶ粒子または当該粒子を含む医薬組成物を対象に投与し、それによって対象にて２１ＯＨの発現を増加させることを含む、２１ＯＨを発現させることを必要とする対象にて２１ＯＨの発現を増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、対象の副腎（例えば、副腎皮質または副腎髄質）、肝臓または卵巣にて２１ＯＨの発現をもたらす、または２１ＯＨの発現を増加させる。特定の実施形態では、本明細書に開示されている方法は、対象の副腎幹細胞（例えば、副腎皮質幹細胞）または副腎前駆細胞にて２１ＯＨの発現をもたらす、または２１ＯＨの発現を増加させる。特定の実施形態では、本明細書に開示されている方法は、対象の肝臓もしくは卵巣にて２１ＯＨの発現をもたらす、または２１ＯＨの発現を増加させる。

【００８４】

本開示は、該方法は治療有効量の本明細書に記載されているｒＡＡＶ粒子または当該粒子を含む医薬組成物を対象に投与し、それによって対象にて２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を治療することを含む、２１ＯＨＤがある対象を治療する方法を提供する。本開示は、治療有効量の本明細書に開示されているｒＡＡＶ粒子または組成物を対象に投与し、それによって対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルを増加させることを含む、コルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルの増加を必要とする対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルを増加させる方法を提供する。本開示は、治療有効量の本明細書に開示されているｒＡＡＶ粒子または組成物を対象に投与し、それによって、対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルを低下させることを含む、プロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルの低下を必要とする対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルを低下させる方法を提供する。

【００８５】

本開示はさらに、治療有効量の本明細書に記載されているｒＡＡＶ粒子または当該粒子を含む医薬組成物を対象に投与し、それによって、対象にて２１ＯＨＤの症状を治療する、軽減する、改善する、進行を遅延させる、または予防することを含む、２１ＯＨＤ（またはまたは先天性副腎過形成、ＣＡＨ）を有する対象にて２１ＯＨＤ（またはＣＡＨ）の症状を治療する、軽減する、改善する、進行を遅延させる、または予防する方法を提供する。２１ＯＨＤ（またはＣＡＨ）の症状の非限定的な例には、生殖器及び筋肉量の男性化、乳児期の塩類喪失と脱水症、性機能障害（古典型）及び多毛症、座瘡、及び生殖能力の低下（古典型及び非古典型）が挙げられる。男性患者では、２１ＯＨＤ（またはＣＡＨ）の症状の非限定的な例には、低身長及び早期男性化が挙げられる。プラダー分類システムを使用して、人体の生殖器の男性化の程度を測定する。いくつかの実施形態では、本開示の方法によって治療される対象（例えば、女性対象）はプラダー分類による外性器異常を有する（例えば、対象は、プラダー分類ＩＶ型またはＶ型の２１ＯＨＤ（またはＣＡＨ）に罹患している）。

【００８６】

いくつかの実施形態では、対象は２１ＯＨの発現を必要としている。いくつかの実施形態では、対象は２１ＯＨ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する。いくつかの実施形態では、対象（例えば、女性対象）はプラダー分類による外性器異常を有する（例えば、対象はプラダー分類ＩＶ型またはＶ型の２１ＯＨＤ（またはＣＡＨ）に罹患している）。いくつかの実施形態では、対象は先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を有する。いくつかの実施形態では、Ｃ

ＡＨは古典的ＣＡＨである。いくつかの実施形態では、対象はコルチゾール及び／またはアルドステロンを必要としている。いくつかの実施形態では、対象はコルチゾール欠損症及び／またはアルドステロン欠損症を有する。いくつかの実施形態では、対象は過剰のプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）を有する。いくつかの実施形態では、対象は血中及び／または尿中に過剰のプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）を有する。

【００８７】

いくつかの実施形態では、対象は、１７－ＯＨＰのＵＬＮ（正常上限値）の約５倍～約１０倍を超える値を有する。いくつかの実施形態では、対象はＵＬＮを超えるアンドロステンジオン（Ａ４）値を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ＵＬＮを超える１１－オキソまたは１１－ケトステロール（例えば、１１－ケトテストステロン）値を有する。いくつかの実施形態では、対象は、唯一のグルココルチコイド維持療法として、ヒドロコルチゾン１日あたり約３０ミリグラム（ｍｇ／日）の１日総用量で経口ヒドロコルチゾンの安定した投与計画を受けている。いくつかの実施形態では、対象は、唯一のグルココルチコイド維持療法として、約１０ｍｇ／日～約５０ｍｇ／日のヒドロコルチゾンの１日総用量で経口ヒドロコルチゾンの安定した投与計画を受けている。

【００８８】

いくつかの実施形態では、方法はさらに、投与工程の前に２１ＯＨＤを有する対象を選択することを含む。いくつかの実施形態では、対象が疾患の１以上の症状を有していなくても、対象はスクリーニングされ、（例えば、遺伝子検査または生理学的検査によって）２１ＯＨＤを有すると特定または診断されてもよい。他の実施形態では、対象は２１ＯＨＤの１以上の症状を有する。特定の実施形態では、対象はＣＹＰ２１Ａ２遺伝子に変異を有する。一実施形態では、対象はＣＹＰ２１Ａ２遺伝子に機能喪失型変異を有する。特定の実施形態では、対象は、機能的ＣＹＰ２１Ａ２遺伝子と密接に連鎖し機能しないＣＹＰ２１Ａ１Ｐ偽遺伝子との間の遺伝子の変換または組換えによって引き起こされるＣＹＰ２１Ａ２遺伝子の欠損を有する。

【００８９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物の投与前と比べて、ｒＡＡＶまたは組成物の投与後の対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルは高い。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物を投与されていない２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対照対象と比べて、ｒＡＡＶまたは組成物の投与後の対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルは高い。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物の投与前と比べて、ｒＡＡＶまたは組成物の投与後の対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルは低い。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物を投与されていない２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対照対象と比べて、ｒＡＡＶまたは組成物の投与後の対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルは低い。

【００９０】

本明細書に開示されている方法のいくつかの実施形態では、肝毒性物質（例えば、ケタミン、ハロゲン化麻酔薬）は、本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物と併用して対象に投与されない。本明細書に開示されている方法のいくつかの実施形態では、肝毒性物質は、本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物の投与後少なくとも１２週間投与されない。本明細書に開示されている方法のいくつかの実施形態では、アセトアミノフェン（及び他の類似の薬剤）は、本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物と併用して対象に投与されない。本明細書に開示されている方法のいくつかの実施形態では、グレープフルーツジュースを含む、ＣＹＰ３ＡまたはＣＹＰ３Ａ４経路を介してタクロリムス代謝を阻害するまたは誘導する物質は、本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物と併用して対象に投与されない。

【００９１】
投与様式
本明細書に記載されている任意の治療方法では、２１ＯＨをコードする核酸分子を含むｒＡＡＶ粒子、または当該粒子を含む医薬組成物は、当該ｒＡＡＶ粒子を副腎皮質血管系または副腎皮質自体に導入する任意の手段によって対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、２１ＯＨをコードする核酸分子を含むｒＡＡＶ粒子、または当該粒子を含む医薬組成物は、対象に全身性に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、２１ＯＨをコードする核酸分子を含むｒＡＡＶ粒子、または当該粒子を含む医薬組成物は、静脈内に；開腹手術または腹腔鏡検査を介した副腎への直接注入によって；カテーテル挿入を介した副腎動脈または副腎静脈への注入によって対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、副腎への直接注入は副腎皮質への直接注入である。

【００９２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている２１ＯＨをコードする核酸分子を含むｒＡＡＶ粒子、または当該粒子を含む医薬組成物を使用して、先天性副腎過形成（ＣＡＨ）に罹患している対象を治療してもよい。２１ＯＨの欠損は、副腎に影響を及ぼす遺伝性疾患のファミリーであるＣＡＨを引き起こすことが多い。ＣＡＨは重度または軽度の形態で対象に存在してもよい。古典的ＣＡＨと呼ばれる重症型または古典的ＣＡＨはふつう、新生児期または幼児期に検出される。非古典的ＣＡＨ（ＮＣＡＨまたはＮＣＣＡＨ）または遅発性ＣＡＨと呼ばれる、さらに軽度の形態は、乳児期から成人期までのいつでも症状を引き起こす場合がある（例えば、Ｋｕｒｔｏｇｌｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｒｅｓ．Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ，９（１）：１－７（２０１７）を参照のこと）。本開示のｒＡＡＶは、古典的ＣＡＨまたは非古典的ＣＡＨを有する対象を治療するのに使用されてもよい。古典的ＣＡＨの対象は、外生殖器の胎児男性化、グルココルチコイド及びミネラルコルチコイドの産生の低下または欠如、及び／または大過剰のアンドロゲンの産生を経験する場合がある。非古典的ＣＡＨの対象は、胎児性男性化及びコルチゾールやアルドステロンの欠乏を伴わずに、アンドロゲン産生の増加を経験する場合がある。

【００９３】
コルチゾールは副腎で産生されるステロイドである。コルチゾールは、身体的及び感情的ストレスに反応し、適切なエネルギー供給と血糖値を維持するために体内で使用される。副腎は脳の基部にある豆粒大の小さな腺である下垂体によって制御されている。健康な人では、血流中に存在するコルチゾールが不十分になると、下垂体から副腎皮質刺激ホルモン（ＡＣＴＨ）が放出される。ＡＣＴＨは副腎を刺激してさらに多くのコルチゾールを生成する。しかしながら、ＣＡＨを有する人は、前駆体１７－ヒドロキシプロゲステロン（１７－ＯＨＰ）をコルチゾールに変換するのに必要な２１ＯＨの量が不十分である。その結果、下垂体はコルチゾールの必要性を感知し続け、さらに多くのＡＣＴＨを放出する。これによって１７－ＯＨＰが過剰になり、副腎で過剰なアンドロゲン（男性化ステロイドホルモン）に変換される。したがって、対象は、影響を受けたステロイドホルモンの循環レベルの増加を測定することによってＣＡＨと診断される場合がある。２１ＯＨＤの新生児スクリーニングは通常、１７－ＯＨＰ測定を使用して達成される。さらに、ＣＡＨを有する対象は１７－ＯＨＰの循環レベルを追跡することによってモニターされてもよい。したがって、いくつかの実施形態では、影響を受けたステロイドホルモンの循環レベルは、本明細書に記載されている２１ＯＨをコードする核酸分子を含むｒＡＡＶ粒子または当該粒子を含む医薬組成物による治療前、治療中及び／または治療後に、ＣＡＨを有する対象にて測定されてもよい。対象における１７－ＯＨＰの循環レベルは、対象の診断のために使用されてもよく、及び本明細書に記載されているｒＡＡＶ粒子または医薬組成物による対象の治療を開始するか、または継続するかについての決定を知らせるのに使用されてもよい。

【００９４】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、以下の効果：（１）生理

学的な内在性コルチゾール生合成を回復することによって外来性グルココルチコイド（ＧＣ）への依存を減らし、または排除し、それによって超生理学的ＧＣ療法の続発症を軽減する；（２）外来性ＧＣ投与量を増やすことなく、２１－ＯＨＤに関連するアンドロゲン過剰症を軽減し、それによってアンドロゲン過剰症の後遺症も軽減する；（３）内在性コルチゾール及び／またはアルドステロンの生合成を回復することによって、関連する生命を脅かす副腎クリーゼのリスクを軽減する；ならびに（４）超生理学的ＧＣ及び／またはミネラルコルチコイド（ＭＣ）補充療法の毎日の投与に関連する患者の負担と服薬不履行を軽減する、のうちの１以上を有するしたがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法はＣＡＨにおける副腎ホルモン欠損を緩和し、それによって、疾患の根底にある病理生物学を改善するのに役立つ。

【００９５】

本開示はさらに、対象における２１ＯＨの機能不全または欠損を特徴とする障害または疾患を治療するための薬物の製造における、本明細書に記載されている医薬剤（例えば、ｒＡＡＶまたはｒＡＡＶを含む医薬組成物）の使用を企図する。本開示はまた、対象における２１ＯＨの機能不全または欠損を特徴とする障害または疾患を治療するための、本明細書に記載されている医薬剤（例えば、ｒＡＡＶまたはｒＡＡＶを含む医薬組成物）の使用も含む。

投与量

【００９６】

組成物は、治療される領域のサイズ、使用されるウイルス力価、投与経路、及び方法の所望の効果に応じて、範囲内のすべての数値を含めて、約５０マイクロリットル（μＬ）～約１ミリリットル（ｍＬ）の容量で送達されてもよい。一実施形態では、容量は約５０μＬである。別の実施形態では、容量は約７０μＬである。別の実施形態では、容量は約１００μＬである。別の実施形態では、容量は約１２５μＬである。別の実施形態では、容量は約１５０μＬである。別の実施形態では、容量は約１７５μＬである。さらに別の実施形態では、容量は約２００μＬである。別の実施形態では、容量は約２５０μＬである。別の実施形態では、容量は約３００μＬである。別の実施形態では、容量は約４５０μＬである。別の実施形態では、容量は約５００μＬである。別の実施形態では、容量は約６００μＬである。別の実施形態では、容量は約７５０μＬである。別の実施形態では、容量は約８５０μＬである。別の実施形態では、容量は約１０００μＬである。

【００９７】

いくつかの実施形態では、プロモーター配列の制御下で特定の導入遺伝子（例えば、２１ＯＨ）をコードする核酸配列を保有するｒＡＡＶの有効濃度は、１ミリリットルあたり約10^{8}～約10^{13}ベクターゲノム（ｖｇ／ｍＬ）の範囲である。例えば、ｒＡＡＶ感染単位は、ＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６２：１９６３（１９８８）に記載されているように測定されてもよい。いくつかの実施形態では、濃度は約1.5×10^{9}ｖｇ／ｍＬ～約1.5×10^{12}ｖｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、濃度は約1.5×10^{9}ｖｇ／ｍＬ～約1.5×10^{11}ｖｇ／ｍＬである。一実施形態では、有効濃度は約1.5×10^{10}ｖｇ／ｍＬである。別の実施形態では、有効濃度は約1.5×10^{11}ｖｇ／ｍＬである。別の実施形態では、有効濃度は約2.8×10^{11}ｖｇ／ｍＬである。さらに別の実施形態では、有効濃度は約1.5×10^{12}ｖｇ／ｍＬである。さらなる実施形態では、有効濃度は約1.5×10^{13}ｖｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、濃度は、それらの間にあるすべての値及び部分範囲を含めて、約10^{13}ｖｇ／ｍＬ～約7.0×10^{13}ｖｇ／ｍＬの範囲内にあり、例えば、約2×10^{13}ｖｇ／ｍＬ、約3×10^{13}ｖｇ／ｍＬ、約4×10^{13}ｖｇ／ｍＬ、約5×10^{13}ｖｇ／ｍＬ、約6×10^{13}ｖｇ／ｍＬ、約7×10^{13}ｖｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、濃度は約5×10^{13}ｖｇ／ｍＬである。

【００９８】

いくつかの実施形態では、毒性または有害な免疫応答のような望ましくない影響のリスクを減らすために、ウイルスの最低有効濃度が利用される。これらの範囲内のさらに他の

投与量は、治療を受ける対象（例えば、ヒト）の身体状態、対象の年齢、特定の２１ＯＨ欠損症及び進行性であれば発生している障害の程度を考慮して、主治医によって選択されてもよい。

【００９９】

いくつかの実施形態では、２１ＯＨをコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、対象の体重１ｋｇあたり約10^{11}～約10^{14}ｖｇ／ｋｇ、例えば、対象の体重１ｋｇあたり約10^{12} ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲の用量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、２１ＯＨをコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶ粒子は、約１．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、３×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、または６×10^{13}ｖｇ／ｋｇの用量で対象に投与される。

【０１００】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、その間にあるすべての値と部分範囲を含めて、約10^{12}ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲、例えば、約５×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、約10^{13}ｖｇ／ｋｇ、または約５×10^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量は、その間のすべての値と部分範囲を含めて、約10^{13}ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲、例えば、約１．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、２×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、２．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、３×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、３．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、４×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、４．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、５．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、６×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、６．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、７×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、７．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、８×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、８．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、９×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、または９．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量は約１．５×10^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量は約３×10^{13}ｖｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量は約６×10^{13}ｖｇ／ｋｇである。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、対象には、本明細書に開示されているｒＡＡＶベクター、ｒＡＡＶ粒子、または組成物の単回用量が投与される。いくつかの実施形態では、対象には、本明細書に開示されているｒＡＡＶベクター、ｒＡＡＶ粒子、または組成物の複数回用量、例えば、２回、３回、４回、または５回の用量が投与される。

【０１０２】

本明細書に開示されている組成物はどんな頻度で対象に投与してもよい。いくつかの実施形態では、組成物は１日１回または１日２回以上対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、１日２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、毎日、隔日、３日ごと、４日ごと、５日ごと、または６日ごとに対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、毎週、隔週、または３週ごとに対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１ヵ月ごとに対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、組成物は毎年対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、１、２、３、４、５、１０、１５または２０年ごとに対象に投与されてもよい。特定の実施形態では、組成物は対象の生涯中に１回だけ対象に投与されてもよい。

【０１０３】

免疫抑制剤との併用

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法のいずれか１つはさらに、治療有効量の免疫抑制剤を投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、治療有効量の本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物、及び治療有効量の免疫抑制剤を対象に投与することを含む。本開示は、治療有効量の本明細書に開示されているｒＡＡＶまたは組成物、及び治療有効量の免疫抑制剤を対象に投与することを含む、治療方法を提供する。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、免疫抑制剤はｒＡＡＶベクターの投与前に、投与と同時に、及び／または投与後に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤はｒＡＡＶベクターの投与前に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤はｒＡＡＶベクターの投与の少なくとも１２時間前に投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤はｒＡＡＶベクターの投与の約２日前に投与される。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は非グルココルチコイド免疫抑制剤である。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤はカルシニューリンの阻害剤である。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、エベロリムス、ゾタロリムス、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤はタクロリムスである。免疫抑制剤の他の非限定的な例には、ナイトロジェンマスタード（シクロホスファミド）のようなアルキル化剤、ニトロソウレア、白金化合物、メソトレキセートのような葉酸類似体、アザチオプリン及びメルカプトプリンのようなプリン類似体、フルオロウラシルのようなピリミジン類似体、タンパク質合成阻害剤、ダクチノマイシン、アントラサイクリン、マイトマイシンＣ、ブレオマイシン、ミトラマイシンのような細胞傷害性抗体、Ｔリンパ球を阻害するポリクローナル抗体、バシリキシマブまたはダクリズマブのようなＩＬ－２受容体に向けられたモノクローナル抗体、ムロモナブのような抗ＣＤ３モノクローナル抗体、オピオイド、インフリキシマブ、エタネルセプト、またはアダリムマブのようなＴＮＦ－アルファ結合タンパク質、ミコフェノール酸エステル、フィンゴリモド、及びミリオシンが挙げられる。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は経口投与される。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤の治療有効量は、それらの間にあるすべての値及び部分範囲を含めて、約０．００５ミリグラム／キログラム（ｍｇ／ｋｇ）～約０．１ｍｇ／ｋｇの範囲、例えば、約０．０１ｍｇ／ｋｇ、約０．０１５、約０．０２、約０．０２５、約０．０３、約０．０３５、約０．０４、約０．０４５、約０．０５、約０．０６、約０．０７、約０．０８、約０．０９、または約０．１ｍｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤の治療有効量は約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約０．０５ｍｇ／ｋｇの範囲内にある。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤の治療有効量は約０．０２５ｍｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態では、治療有効量の免疫抑制剤は１日２回投与される。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、方法は治療有効量のステロイドを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、ステロイドはミネラルコルチコイドである。いくつかの実施形態では、ステロイドはグルココルチコイドである。いくつかの実施形態では、ステロイドはヒドロコルチゾンである。いくつかの実施形態では、ステロイドはｒＡＡＶベクターの投与前に、投与と同時に、及び／または投与後に投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターの投与前に対象に投与されるステロイドの治療有効量は、ｒＡＡＶ投与後に対象に投与されるステロイドの治療有効量よりも多い。

【実施例】

【０１０８】

実施例１：マウスにおける先天性副腎過形成（ＣＡＨ）症状の救済

２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードするＡＡＶベクターの構築は、あらゆる目的でその全体が参照によって本明細書に組み込まれる国際特許公開第ＷＯ２０１９／１４３８０３号に記載されているように行った。

【０１０９】

Ｈ－２^{aw18}（Ｃｙｐ２１$^{-/-}$）マウスはヒトＣＡＨの臨床状態の重要な病態生理学的特徴を模倣する、すなわち、グルココルチコイド（ＧＣ）とミネラルコルチコイド（ＭＣ）の欠乏に起因する出生後の罹患性につながる発育障害を呈する、２１－ＯＨＤによるヒトＣＡＨの唯一の動物モデルである。ＣＢＡプロモーターの制御下にある配列番号５０のコドン最適化ヒトＣＹＰ２１Ａ２導入遺伝子を含有するＡＡＶ血清型５（ＡＡＶ５）

ベクター（本明細書では「ＢＢＰ－６３１」とも呼ばれる）を、１５週齢のＣＹＰ２１－／－マウスに投与し、疾患表現型を少なくとも１０週間、未処理のＣＹＰ２１－／－マウスと比較した。ヒトＣＹＰ２１Ａ２導入遺伝子のベクターゲノムのコピー（ＶＧＣ）とマウスＧＡＰＤＨに対して基準化したｍＲＮＡを副腎及び他の臓器で測定した。副腎２１－ＯＨタンパク質の発現は、ＧＡＰＤＨに対して基準化したヒト２１－ＯＨに特異的なペプチド及び内在性マウス２１－ＯＨペプチドを検出するために特注したナノＬＣＭＳＭＳプロテオミクスを使用して評価した。

【０１１０】

その結果は、ヒトＣＹＰ２１Ａ２遺伝子の機能的コピーを含むＡＡＶ５の投与が、ＣＹＰ２１－／－マウスの早期且つ持続的な疾患救済をもたらすことを示したが、それには以下：（ｉ）プロゲステロンの２１－ヒドロキシル化の回復と一致する１０週間全体にわたる尿中プロゲステロンレベルの低下；（ｉｉ）ＭＣ機能の改善を示唆する腎臓におけるレニン発現の低下；ならびに（ｉｉｉ）副腎におけるベクターゲノム、ヒトＣＹＰ２１Ａ２ｍＲＮＡ、及びヒト２１－ＯＨタンパク質の用量依存性の検出が伴った。処理したマウスは、副腎ＶＧＣ、導入遺伝子のｍＲＮＡレベル、及びヒト２１－ＯＨタンパク質の発現と相関する用量依存性の体重増加を示した。マウスの副腎における用量依存性の体重増加及びベクターゲノムの用量依存性の検出をそれぞれ図１Ａ及び図１Ｂに示す。

【０１１１】

結論として、ＣＢＡプロモーター制御下のコドンが最適化されたヒトＣＹＰ２１Ａ２導入遺伝子を含有するＡＡＶ血清型５（ＡＡＶ５）ベクターによるＣＹＰ２１－／－マウスの遺伝子治療は、分子レベルにて及び疾患表現型の矯正について頑強且つ用量依存性であった。

【０１１２】

ＷＴマウスでは、ＧＬＰ準拠の毒物学試験によって４週目、１２週目、及び２４週目の安全性（臨床観察、病理学、血液学、臨床化学、組織病理学、及び免疫応答）及び生体内分布が評価された。ベクターゲノムと導入遺伝子の発現は副腎及びその他の組織で検出された。ＷＴのＣ５７ＢＬ／６マウスでは、調べた任意の用量でのＢＢＰ－６３１の単回ＩＶ投与後のどの試験時点でも、被験物質に関連した毒性は観察されなかった。この試験は、ＢＢＰ－６３１が３．０×１０^{14}ｖｇ／ｋｇの無毒性量（ＮＯＡＥＬ）で良好な忍容性を示し、副腎における持続的な導入遺伝子の導入と発現を有することを実証している。

【０１１３】

実施例２：非ヒト霊長類（ＮＨＰ）における２１－ＯＨの発現

２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードするＡＡＶベクター（ＢＢＰ－６３１）を１用量投与したＮＨＰの副腎におけるヒト２１－ＯＨタンパク質の持続的な用量依存性の発現を図１Ｂ及び図１Ｃに示す。ＮＨＰにおける内在性２１－ＯＨの割合として表される、産生されたヒト２１－ＯＨの量は、古典的ＣＡＨ患者における臨床的に意味のある疾患への影響の可能性を示唆している（図１Ｃ）。マウス及びＮＨＰにおける生物学的に活性がある用量の特定は、ＣＢ６プロモーター制御下でのコドンが最適化されたヒトＣＹＰ２１Ａ２導入遺伝子を含有する、開示されたＡＡＶ血清型５（ＡＡＶ５）ベクターによる第１／２相臨床試験における開始用量を裏付けている。

【０１１４】

生体内分布と安全性の試験が２～２．５歳のＮＨＰ（カニクイザル）で実施された。ヒトＣＹＰ２１Ａ２遺伝子の機能的コピーを含むＡＡＶ５のＩＶ投与後、臨床観察、体重または臓器重量、尿検査、血液学、血清化学、肉眼的病理学、組織病理学（胸部脊髄を含む）、免疫組織化学（ＣＤ４リンパ球浸潤なし）、または抗薬物反応（ＡＡＶ５カプシドまたはヒト２１－ＯＨに対する細胞介在性免疫反応）についてすべての用量にわたって有害な安全性シグナルは見られなかった。副腎では２４週目まで用量依存性のウイルスゲノムコピー（ＶＧＣ）及び安定したｍＲＮＡ転写発現が検出された。プロテオミクス法によって、内在性２１－ＯＨレベルの最大９～２４％までのヒト２１－ＯＨタンパク質の用量依存性かつ持続的な発現が示された。全体として、結果は、ヒトＣＹＰ２１Ａ２遺伝子の機

能的コピーを含むＡＡＶ５の送達が良好な忍容性を示し、ＮＨＰの副腎にて少なくとも２４週間持続的に発現することを示している。

【０１１５】

実施例３：第１／２相臨床試験

概要

第１／２相ヒト初、非盲検用量漸増試験は、古典的先天性副腎過形成（ＣＡＨ）（単純性男性化または塩類喪失、第１群）と診断された、または２１ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）が原因で古典的塩類喪失ＣＡＨ（第２群）と診断された且つ治療後５２週間モニターされている最大２５人の成人参加者に投与された、ＣＢ６プロモーター制御下でのコドンが最適化ヒトＣＹＰ２１Ａ２導入遺伝子を含有するＡＡＶ血清型５（ＡＡＶ５）ベクター（本明細書では「ＢＢＰ－６３１」とも呼ばれる）の安全性、忍容性、及び有効性を評価するために設計された。ＢＢＰ－６３１治療を受ける参加者はすべて、安全性及び有効性についてさらに４年間経過観察されるであろう。合計すると、すべての参加者はＢＢＰ－６３１による治療日から少なくとも５年間経過観察されるであろう。図２は試験の時系列表を示す。

【０１１６】

ＢＢＰ－６３１は、希釈せずに容積注入ポンプを介して１回の単回ＩＶ注入として投与されるであろう。ＢＢＰ－６３１の活性物質は、ヒトＣＹＰ２１Ａ２導入遺伝子のための発現カセットを含有する非複製の組換えＡＡＶ血清型５（ＡＡＶ５）ベクターである。ＡＡＶ－ｈＣＹＰ２１－Ｏｐｔベクターの設計を図４に示す。ｒＡＡＶ５粒子にパッケージングされる導入遺伝子の配列は、５’から３’に列挙される以下の要素：ＡＡＶ５’逆方向末端反復（ＩＴＲ）と、ＡＡＶパッケージングシグナル（Ψ）と、サイトメガロウイルスエンハンサーと、スプライスドナーを持つ標準的なコザック配列及びスプライスアクセプターを持つウサギβ－グロビンイントロンを含むニワトリβ－アクチンプロモーターと、コドン最適化ヒト２１－ヒドロキシラーゼ（２１－ＯＨ）のｃＤＮＡと、ウサギβ－グロビンポリＡシグナルと、ＡＡＶ３’逆方向末端反復ＩＴＲとで構成される一本鎖ＤＮＡである。ＣＡＧと呼ばれるこの最適化されたプロモーター設計は、宿主組織における導入遺伝子の発現を最大化することを目的とする。

【０１１７】

ＢＢＰ－６３１製剤（ＤＰ）は、５．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ（３．０×１０^{13}～７．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ）の標的濃度での非複製型の組換えＡＡＶ５ベクターの単回投与で保存剤を含まず、無菌で不透明の無色のＩＶ注射溶液である。ＢＢＰ－６３１ＤＰ溶液は１０ｍＭリン酸ナトリウム、１８０ｍＭの塩化ナトリウム、０．００５％ｗ／ｖのポロキサマー１８８及び注射用水を含有する。ＢＢＰ－６３１ＤＰは公称充填量２．５ｍＬである５ｍＬのＣｒｙｓｔａｌ　Ｚｅｎｉｔｈ（登録商標）（ＣＺ、環状オレフィンポリマー）バイアルに充填され、－６０℃以下で保存される。

【０１１８】

スクリーニング期間

すべての参加者について、スクリーニング期間は最初のスクリーニング評価の時点から始まるであろう。スクリーニング期間はＢＢＰ－６３１による治療前（０日目）の最大４２日間である。適格性は、安全性とスクリーニング検査試料と１７－ＯＨＰ、アンドロステンジオン（Ａ４）、副腎皮質刺激ホルモン（ＡＣＴＨ）、及びコルチゾールの閾値レベルとの評価によって決定される。１７－ＯＨＰの変動性を測定するには、１７－ＯＨＰの評価を少なくとも３回行い、少なくとも５日間の間隔をあける。１７－ＯＨＰ評価の時点で、肝機能を評価するためにも試料を採取する。スクリーニング期間中、参加者は通常予定されている経口ヒドロコルチゾンと、該当する場合にはＣＡＨに対するミネラルコルチコイド治療を服用し続ける。特に指定がない限り、スクリーニング試料は、参加者が通常予定されている最初の経口ヒドロコルチゾン治療及び該当する場合はミネラルコルチコイド治療を服用する前の朝に採取する。１７－ＯＨＰ及びアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルに加えて、コルチゾール、視床下部－下垂体－副腎（ＨＰＡ）軸、視床下部－下垂

体－性腺（ＨＰＧ）軸、他の生理学的機能または調節機能に関連するホルモン、レニン及びアルドステロン、及びステロイドホルモンのパネルを含む他のホルモンレベルを評価する。必要に応じて、免疫アッセイ、液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）、または双方の方法によって試料を分析する。すべてのホルモンレベルの測定は中央検査室で行われる。

【０１１９】

ベースライン、治療、経過観察の期間

ベースライン期間、治療期間、経過観察期間の合計期間は約５２週間となる予定である。

【０１２０】

ベースライン（ＢＢＰ－６３１による治療前）：入院患者（－４日目から０日目）

他の内在性ホルモンのベースラインレベル、生活の質（ＱＯＬ）、骨格及び体組成の評価、ならびに骨代謝回転、多毛症、排卵、精巣機能及び精巣副腎遺残腫瘍（ＴＡＲＴ）体積のバイオマーカーを評価する。特に指定のない限り、評価はベースライン測定を確立するために可能な限り０日目（投薬）に近いときに行われる予定である。適宜、免疫アッセイ、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ、または双方の方法によって試料を分析する。すべてのホルモンレベルの測定は中央検査室で行われる。

【０１２１】

－３日目に、参加者はコルチゾールクリアランス、ＡＣＴＨ、１７－ＯＨＰ、及びアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルを評価するために連続採血を受ける。経口のヒドロコルチゾン及び該当する場合にはミネラルコルチコイド治療は、－３日目の定期的に予定された朝の投与後に見合わせる。

【０１２２】

－２日目の朝、通常予定されているヒドロコルチゾン及び該当する場合はミネラルコルチコイドの服用前に、参加者はＨＰＡ軸及びレニン－アルドステロン軸を含むが、これらに限定されないホルモンプロファイルについて試料採取を受ける。これらの試料は、１７－ＯＨＰ、アンドロステンジオン（Ａ４）、及び内在性ＡＣＴＨを含むが、これらに限定されないほとんどのホルモンのベースライン評価として役立つ。その後、参加者は朝の内在性コルチゾールと１７－ＯＨＰのレベルのＡＣＴＨ刺激試験を完了し、通常予定されている朝の用量のヒドロコルチゾンと、該当する場合はミネラルコルチコイドのみを服用する。－２日目の夕方、２４時間にわたり２時間ごとに試料を採取し、コルチゾール、１７－ＯＨＰ、アンドロステンジオン（Ａ４）、及びＡＣＴＨを含むが、これらに限定されないＨＰＡ軸ホルモンのレベルを測定することによって参加者の日内ホルモンプロファイルを確立する。

【０１２３】

－２日目の朝、参加者はＢＢＰ－６３１投与後の免疫反応の可能性を予防するまたは抑制するためにタクロリムスによる予防的免疫抑制投薬計画を開始する。このタクロリムス投薬計画は、開始用量０．０２５ｍｇ／ｋｇを１日２回経口服用し、５～８ｎｇ／ｍＬの目標トラフ濃度を有する。トラフ濃度は選択された血液化学分析物と同時に測定される。

【０１２４】

－１日目の夕方、２４時間の日内ホルモンプロファイルの試料採取期間が完了した後、参加者は通常予定されているヒドロコルチゾンと、該当する場合はミネラルコルチコイドの投薬を再開する。

【０１２５】

ベースライン：ＢＢＰ－６３１による治療（０日目）

０日目、ＢＢＰ－６３１とタクロリムスの投与前に、タクロリムスのトラフ濃度を測定し、参加者は注入反応を防ぐために、ジフェンヒドラミン（ＩＶ）、ヒドロキシジン（ＩＭ）、及びクロルフェニラミン（ＩＶ）のような予防的抗ヒスタミン剤も投与される。ＢＢＰ－６３１は静脈内（ＩＶ）点滴として投与され、参加者の定期的に予定されている朝のヒドロコルチゾン投与の２～６時間後に開始する。参加者はＢＢＰ－６３１の投与を１

回のみ受ける。
【０１２６】
経過観察
検査室、免疫原性、及びベクター排出を含む安全性を継続して評価する。用量の漸増と拡大に関する決定について安全性と有効性のデータを評価する。予防的免疫抑制を維持するスケジュールに従って、また医学的に必要な場合には肝機能評価を含む反応性免疫抑制計画の一部として、タクロリムスのトラフ濃度を測定する。
【０１２７】
入院患者と外来患者（在宅）の設定の双方で採取された試料を介して、ＢＢＰ－６３１による治療の有効性と持続性を評価する。ＨＰＡ軸、ＨＰＧ軸、他の生理的機能または調節機能、レニン及びアルドステロン、及びステロイドホルモンのパネルに関連する内在性ホルモンの評価のために、試料を採取する。特に指定がない限り、参加者が通常予定されている朝の用量のヒドロコルチゾンと、該当する場合はミネラルコルチコイドを服用する前の朝に、試料を採取する。朝の外来性ＡＣＴＨ刺激の前後にも試料を採取する。参加者はコルチゾールクリアランス、ＡＣＴＨ、１７－ＯＨＰ、及びアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルを評価するために連続採血を受ける。１１－ケトテストステロンのような１１－オキソ／１１－ケトステロールを含む追加のマーカーも評価されてもよい。適宜、免疫アッセイ、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ、または双方の方法によって試料を分析する。
【０１２８】
短縮形式（３６）健康調査（ＳＦ－３６）、世界保健機関の生活の質１００簡易版（ＷＨＯＱＯＬ－ＢＲＥＦ）、及びアジソン病特有の生活の質に関する質問票（ＡｄｄｉＱＯＬ）を介して、ＱＯＬの評価を測定する。骨格及び身体組成はＤＥＸＡ及び骨代謝回転のバイオマーカーによって評価する。女性の多毛症は、修正されたＦｅｒｒｉｍａｎ－Ｇａｌｌｗｅｙスケール及び／または身体の種々の領域における自己申告の脱毛頻度によって評価する。女性の場合、排卵周期をモニターする。男性の場合、テストステロン（性ホルモン結合グロブリンで調整）レベルを測定し、ＴＡＲＴの存在を超音波によってモニターし、精子の数、運動性、及び形態によって精巣機能を評価する。
【０１２９】
ヒドロコルチゾン及びミネラルコルチコイド治療の漸減
ヒドロコルチゾン治療の漸減は、治験責任医師の裁量に加えて、利用可能な臨床データ及び検査データによって裏付けられている場合、ＢＢＰ－６３１による治療後いつでも開始されてもよい。
【０１３０】
以下の漸減順序は、参加者のＨＰＡ軸ホルモンレベルに応じたヒドロコルチゾン投薬調整の一般的なガイダンスとして使用される：（１）１７－ＯＨＰレベルが≦１２００ｎｇ／ｄＬ、またはアンドロステンジオン（Ａ４）レベルが≦正常であれば、ヒドロコルチゾン用量を最大２５％まで（１日の最小総用量１５ｍｇまで）減らす；（２）免疫アッセイでＡＣＴＨ刺激コルチゾールが＞１４μｇ／ｄＬであれば、ヒドロコルチゾン治療を中止する（または１日の総用量を１５ｍｇ未満に減らすことを検討する）。それ以外の場合、ヒドロコルチゾン治療は１５ｍｇ／日の最小用量で維持し、免疫アッセイでＡＣＴＨ刺激コルチゾールが＞１４μｇ／ｄＬにならない限り、さらなる減量は行われない。
【０１３１】
参加者がヒドロコルチゾンの漸減（または中止）に耐えられることを確認するために：朝の１７－ＯＨＰ、アンドロステンジオン（Ａ４）、コルチゾール、及びＡＣＴＨ、及び任意で１１－ケトテストステロンの臨床検査値を、漸減開始から２週間以内に取得する。臨床状態及び漸減に対する忍容性について質問するための施設から参加者への経過観察連絡は、漸減開始後少なくとも２週間は毎週加えられる。
【０１３２】
副腎不全の兆候と症状を注意深くモニターする。参加者の臨床検査結果の傾向及び／または臨床状態に基づいて、兆候及び症状が臨床的に明らかとなった場合、ヒドロコルチゾ

ンの投薬を増やすかどうか、または再開するかどうかを決定する。

【０１３３】

ミネラルコルチコイドを服用している参加者については、治験責任医師の裁量によって、６週目の評価後にのみ漸減が許可される。以下の漸減順序は、参加者のホルモンレベル及び臨床症状に応じて治験責任医師の裁量でミネラルコルチコイド治療の投薬調整を行うための一般的なガイダンスとして使用される：（１）血漿レニン活性＜正常であれば、ミネラルコルチコイド治療を５０％減らす；（２）ミネラルコルチコイド過剰の兆候または症状（例えば、血圧の著しい上昇）があれば、受診してミネラルコルチコイド治療を減らし；且つＡＣＴＨ刺激中にピーク血漿アルドステロン濃度が９ｎｇ／ｄＬ以上の場合にのみ、ミネラルコルチコイド治療の中止を検討する。

【０１３４】

ミネラルコルチコイドの投薬を漸減する際には、ミネラルコルチコイド欠損症の兆候と症状を注意深くモニターする。試験中に、副腎機能不全の兆候や症状が臨床的に明らかになった場合、ミネラルコルチコイド治療を増量または再開することができる。

【０１３５】

長期経過観察期間

この試験が完了したら直ちに、同意を得た後、参加者は別の長期経過観察試験を開始し、ＢＢＰ－６３１治療の安全性と有効性を継続的に評価するためにさらに４年間適切な間隔で経過観察を行う。合計すると、参加者はすべてＢＢＰ－６３１による治療日から少なくとも５年間経過観察されるであろう。

【０１３６】

用量漸増及び登録拡大スキーム

すべての用量レベルは、ＢＢＰ－６３１の安全性と忍容性によって決定される漸増及び拡大のスキームに基づいて調査される予定である。参加者は、用量レベル３よりも高い用量では治療されない。図３を参照のこと。

【０１３７】

用量漸増相では、第１群（すなわち、古典的ＣＡＨでヒドロコルチゾン用量が３０ｍｇ／日以下）の少なくとも３人（最大６人）の参加者が各用量レベルで登録され、第１群からは合計で少なくとも９人（最大１８人）の参加者がＢＢＰ－６３１を投与される。ＢＢＰ－６３１の忍容性に基づいて用量漸増を継続する。ＨＰＡ軸ホルモンに対するＢＢＰ－６３１の効果に関する、第１群参加者からの忍容性及び入手可能なデータによって、用量の拡大を決定する。

【０１３８】

各ＢＢＰ－６３１用量レベルのセンチネル参加者は、少なくとも一方の対立遺伝子に非ヌルＣＹＰ２１Ａ２変異を持つ参加者であるので、免疫学的物質の交差反応性から検出されてもよい交絡シグナルの可能性を減らす。各用量レベルの非センチネル参加者は遺伝子型を除外しないで登録される。最初の参加者が開始用量（用量レベル１）でＢＢＰ－６３１を投与された後、少なくとも投与後２８日目の外来受診までの最初の参加者の安全性データを確認した後にのみに、２人目の参加者の治療が行われる。試験が進むにつれて、少なくとも投与後２８日目の外来受診までのすべての参加者の累積安全性データを確認した後、後続の参加者の治療が許可される。

【０１３９】

漸増の前、及び用量コホートにおける２人目の参加者に投薬する前に、すべての参加者の累積投与後安全性データの少なくとも４週間の再検討が必要である。さらに用量を漸増する場合も同じアルゴリズムに従い、用量レベル３までにのみ進む。

【０１４０】

安全性モニタリング

免疫原性モニタリング及び反応性免疫調節計画

【０１４１】

ＢＢＰ－６３１の投与から５週目の安全性評価の完了まで週に１回、その後は試験終了

まで３週ごとに、抗体の発生とカプシド及び導入遺伝子産物に対するＴ細胞の反応性とについて、各参加者を治療後モニターする。

【０１４２】

タクロリムスの予防的投薬計画を４週間維持し、その後約２週間かけて漸減する。試験中いつでも、トランスアミナーゼレベルが正常範囲の上限（ＵＬＮ）の２倍以上に、または治験責任医師の意見で臨床的に関連するレベルまで増加した場合、タクロリムスの投与を再開する（トラフ濃度を目標とする）、または増やす。加えて、高用量のプレドニゾン（または治験責任医師の裁量によってヒドロコルチゾン）を開始し、トランスアミナーゼレベルが正常化したら、その後、ベースラインのグルココルチコイド用量レベルまで３週間かけて急速に漸減する。同時に、ＬＦＴレベルがＵＬＮ以下に戻るまで毎週またはそれ以上の頻度で肝機能検査（ＬＦＴ）をモニターする。このモニタリング期間中、観察されたＬＦＴレベルに応じてタクロリムスとプレドニゾンの投与量が調整されてもよい。参加者がグルココルチコイドを４週間中止し、ＬＦＴが正常化した場合は、タクロリムスの漸減を再開してもよい。必要に応じて、タクロリムスの目標トラフ濃度を増やすまたは他の免疫調節剤の投与を含む治療計画を開始してもよい。

【０１４３】

他の検討事項

どんな肝毒性物質（例えば、ケタミン、ハロゲン化麻酔薬）もＢＢＰ－６３１の投与後少なくとも１２週間禁止する。参加者には、同じ期間にアセトアミノフェン（及び他の類似の薬物）の服用を回避するように助言する。参加者は、グレープフルーツジュースを含む、ＣＹＰ３ＡまたはＣＹＰ３Ａ４の経路を介してタクロリムスの代謝を阻害または誘導する物質を避ける必要がある。

【０１４４】

日内ホルモンプロファイル（１７－ＯＨＰ及びＡ４を含む）、コルチゾールクリアランス、ＡＣＴＨ刺激試験、レニン及びアルドステロン、及びその他の調査ホルモンを詳細に評価するベースライン（５日間の入院のような５日間の評価期間）を実施する。

【０１４５】

患者集団の主な適格基準には以下が含まれる。患者はＣＡＨと診断されている：第１群：十分に文書化されたＣＡＨ病歴データ（すなわち、病歴、長期的な検査値、及び投薬歴）を含む臨床的な及び遺伝的な証拠に基づく、小児期からの古典的ＣＡＨ（単純男性化または塩類喪失）の診断；または第２群：十分に文書化されたＣＡＨ病歴データ（すなわち、病歴、長期的な検査値、及び投薬歴）を含む臨床的な及び遺伝的な証拠に基づく、小児期からの古典的な塩類喪失型ＣＡＨの診断。患者は最初のスクリーニング外来受診時に１７－ＯＨＰレベルの閾値を満たす：第１群：１７－ＯＨＰレベル≧１０×ＵＬＮ（正常の上限）、ただし４０×ＵＬＮ未満、または第２群：１７－ＯＨＰレベル≧５×ＵＬＮ、ただし、４０×ＵＬＮ未満。患者のアンドロステンジオン（Ａ４）値はＵＬＮを上回る。患者は、唯一のグルココルチコイド維持療法として、以下の１日総用量：第１群：スクリーニング前の３ヵ月間、ＣＡＨの治療として≦３０ｍｇ／日のヒドロコルチゾン、または第２群：スクリーニング前の３ヵ月間、ＣＡＨの治療として＞３０ｍｇ／日のヒドロコルチゾンで経口ヒドロコルチゾンの安定した投与計画を受けている。患者がすでにミネラルコルチコイド作動薬療法を受けている場合、その患者はミネラルコルチコイド作動薬療法（例えば、フルドロコルチゾン）を必要とし、スクリーニング前の３ヵ月間このミネラルコルチコイド作動薬を安定用量で服用したという文書化された病歴を有する。

【０１４６】

投与量

この試験では、ＢＢＰ－６３１の３つの用量レベルが使用される：（ｉ）用量レベル１：１．５×１０１３ｖｇ／ｋｇ体重；（ｉｉ）用量レベル２：３．０×１０１３ｖｇ／ｋｇ体重；及び（ｉｉｉ）用量レベル３：６．０×１０１３ｖｇ／ｋｇ体重。各治療適格参加者は、試験の０日目にＢＢＰ－６３１の単回投与をＩＶ点滴によって受ける。点滴の期間は、参加者の体重に応じて算出される治療量によって異なる。

【０１４７】
安全性及び有効性の分析
最適な用量は以下：（ｉ）有害事象（ＡＥ）、臨床検査の測定値（化学、血液学、尿検査）；（ｉｉ）内在性コルチゾール（ＡＣＴＨ刺激の前後、質量分析と免疫アッセイの双方で測定される）、１７－ＯＨＰ、Ａ４、及び視床下部－下垂体－副腎（ＨＰＡ）及び視床下部－下垂体－生殖腺（ＨＰＧ）の軸に関連するその他のホルモンのレベル；（ｉｉｉ）レニン及びアルドステロンのレベル；（ｉｖ）ヒドロコルチゾン（ＨＣ）及びミネラルコルチコイド（ＭＣ）薬物使用での変化；ならびに（ｖ）ホルモンの不均衡による身体的及び生理学的影響を測定する生活の質の評価に基づいて選択される。
【０１４８】
身体検査所見における臨床的に重大な変化はＡＥとして報告する。古典的ＣＡＨの成人参加者におけるＢＢＰ－６３１の安全性と忍容性を評価するために、臨床検査評価（臨床化学、凝固、血液学、及び尿検査）を回収する。臨床検査及びバイタルサイン、１２誘導心電図、及び身体検査所見を回収する。将来の研究用にＢＢＰ－６３１の最適な用量または用量範囲を選択するために、安全性及び忍容性の評価、及びホルモン及びその他の有効性の評価を行う。
【０１４９】
以下の安全性と有効性の評価は以下に列挙されているように評価する。
【０１５０】

【表２－１】

表２：

安全性及び／または有効性の評価	安全性／有効性の変数の実験的決定
古典的ＣＡＨの成人参加者におけるＢＢＰ－６３１の安全性と忍容性を評価すること	ＡＥ、ＳＡＥ、死亡、及びＡＥによる中止 臨床検査（血液学、凝固、化学及び尿検査） バイタルサイン、１２誘導心電図、及び身体検査所見
将来の研究用にＢＢＰ－６３１の最適な用量または用量範囲を選択すること	安全性及び忍容性の評価 ホルモン及び他の有効性の評価
古典的ＣＡＨの成人参加者（第１群）の１７－ＯＨＰレベルに対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	１７－ＯＨＰレベルでの治療前から５２週目までの変化
古典的ＣＡＨの成人参加者における内在性コルチゾール産生に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	外来性ＡＣＴＨによる刺激前と刺激後の双方で測定した内在性コルチゾールレベル（外来性ステロイドは保持）の治療前から５２週目までの変化
古典的ＣＡＨの成人参加者におけるアンドロステンジオン（Ａ４）産生に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	アンドロステンジオン（Ａ４）の治療前から５２週目までの変化
古典的ＣＡＨの成人参加者におけるレニン－アルドステロン経路に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	外来性ＡＣＴＨによる刺激前と刺激後の双方で測定した内在性コルチゾール（外来性ステロイドは保持）と同時に測定したアルドステロン及びレニン（ミネラルコルチコイドは保持）の治療前から５２週目までの変化
古典的ＣＡＨの成人参加者におけるＢＢＰ－６３１の免疫原性を評価すること	免疫原性のバイオマーカー
古典的ＣＡＨの成人参加者における他の副腎アンドロゲンに対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	ＤＨＥＡ、ＤＨＥＡ－Ｓ（男性及び女性）、及びテストステロン（女性のみ）の治療前から５２週目までの変化
古典的ＣＡＨの成人参加者におけるＡＣＴＨに対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	ＡＣＴＨの治療前から５２週目までの変化
古典的ＣＡＨの成人参加者における他の副腎ホルモンに対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	Ｄ４及びＤ５ステロイドのフルパネルでの治療前から５２週目までの変化

【表２－２】

コルチゾールクリアランスに対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	コルチゾールクリアランスの治療前から５２週目までの変化
ＢＢＰ－６３１による治療後の経口グルココルチコイド使用量の変化を評価すること	ＢＢＰ－６３１点滴後５２週目に経口グルココルチコイド治療を減らしているまたは中止している参加者の比率
ＢＢＰ－６３１による治療後の経口ミネラルコルチコイド使用量の変化を評価すること	ＢＢＰ－６３１点滴後５２週目に経口ミネラルコルチコイド治療を減らしているまたは中止している参加者の比率
排卵周期に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること（月経周期に影響を与える外来性薬物［例えば、経口避妊薬］を使用していない妊娠の可能性のある女性）	治療前からの月経状態の変化
ＢＢＰ－６３１投与後の認知されたＱＯＬの変化を評価すること	ＳＦ－３６スコアの治療前からの変化 ＷＨＯＱＯＬ－ＢＲＥＦスコアの治療前からの変化 ＡｄｄｉＱＯＬの治療前からの変更
内在性グルココルチコイド産生の日内パターンの変化を評価すること	外来性ステロイドを投与してから１日後、２４時間にわたって測定したコルチゾールレベルの治療前からの変化
ＨＰＧ軸に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	すべての参加者におけるＬＨ、ＦＳＨ、ＡＭＨ、及びインヒビン；女性参加者におけるエストラジオール（Ｅ２）とプロゲステロン；及び男性参加者におけるテストステロン（性ホルモン結合グロブリン調整済み）の治療前から５２週目までの変化
インスリン及びグルコースの恒常性に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	空腹時血糖、空腹時インスリン、及びインスリン感受性の関連する測定値の治療前から５２週目までの変化（ＨＯＭＡ－ＩＲ）
体組成に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	ＤＥＸＡで測定したときの、脂肪及び除脂肪量の治療前から５２週目までの変化
骨密度に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	ＤＥＸＡで測定したときの股関節全体、大腿骨頸部、腰椎の骨塩密度の治療前から５２週目までの変化
骨代謝回転マーカーに対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること	血清ＣＴＸ、血清ＮＴＸ、及び血清ＰＩＮＰの治療前から５２週目までの変化
多毛症に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること（女性のみ）	修正Ｆｅｒｒｉｍａｎ－Ｇａｌｌｗｅｙスコア（多毛症）及び／または種々の体領域における自己申告の脱毛頻度における治療前からの変化（女性のみ）

【表２－３】

ＴＡＲＴ容積に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること（男性のみ）	適宜、超音波によるＴＡＲＴサイズを含む精巣容積の治療前からの変化（男性のみ）
精子形成に対するＢＢＰ－６３１の効果を評価すること（男性のみ）	精子の数、運動性、及び形態における治療前からの変化（男性のみ）
略語：ＡＣＴＨ：副腎皮質刺激ホルモン；ＡｄｄｉＱＯＬ：アジソン病特有の生活の質に関する質問票；ＡＥ：有害事象；ＡＭＨ：抗ミュラー管ホルモン；ＣＡＨ：先天性副腎過形成；ＣＴＸ：カルボキシ末端コラーゲン架橋（Ｃ末端テロペプチド）；ＤＥＸＡ：二重エネルギーＸ線吸収測定法；ＤＨＥＡ：デヒドロエピアンドロステロン；ＤＨＥＡ－Ｓ：デヒドロエピアンドロステロン－硫酸塩；ＥＣＧ：心電図；ＦＳＨ：卵胞刺激ホルモン；ＨＯＭＡ－ＩＲ：インスリン抵抗性の恒常性モデル評価；ＨＰＡ：視床下部－下垂体－副腎；ＨＰＧ：視床下部－下垂体－生殖腺；ＬＨ：黄体形成ホルモン；ＮＴＸ：アミノ末端コラーゲン架橋（血清Ｎ末端テロペプチド）；ＯＨＰ：ヒドロキシプロゲステロン；ＰＩＮＰ：Ｉ型プロコラーゲンの血清Ｎ末端プロペプチド；ＱＯＬ：生活の質；ＳＡＥ：重篤な有害事象；ＳＦ－３６：短い形式（３６）の健康調査；ＴＡＲＴ：精巣副腎遺残腫瘍。ＷＨＯＱＯＬ－ＢＲＥＦ：世界保健機関の生活の質１００簡易版 注：治療前の値からの評価変数の変化は、スクリーニング中または試験のベースライン時点で得られた測定値を使用して決定されてもよい。	

番号付けされた実施形態

【０１５１】

実施形態１．治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを対象に投与することを含む方法であって、

前記ｒＡＡＶベクターが：

（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、

（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列がプロモーターに操作可能に連結され；

前記治療有効量が約10^{12}ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にある、前記方法。

【０１５２】

実施形態２．前記対象が２１ＯＨの発現を必要としている、実施形態１に記載の方法。

【０１５３】

実施形態３．前記対象が２１ＯＨ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、実施形態１または２に記載の方法。

【０１５４】

実施形態４．前記対象が２１ＯＨＤのプラダー分類ＩＶ型またはＶ型を有する、実施形態３に記載の方法。

【０１５５】

実施形態５．前記対象が先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を有する、実施形態３または４に記載の方法。

【０１５６】

実施形態６．前記ＣＡＨが古典的ＣＡＨである実施形態５に記載の方法。

【０１５７】

実施形態７．前記ｒＡＡＶベクターの投与が前記対象にて２１ＯＨの発現をもたらす、実施形態１～６のいずれか１つに記載の方法。

【０１５８】

実施形態８．前記２１ＯＨが、前記対象の副腎皮質、副腎髄質、副腎幹細胞、副腎前駆細胞、肝臓、または卵巣で発現される、実施形態７に記載の方法。

【０１５９】

実施形態９．前記対象がコルチゾール及び／またはアルドステロンを必要としている、実施形態１～８のいずれか１つに記載の方法。

【０１６０】

実施形態１０．前記対象がコルチゾール欠損症及び／またはアルドステロン欠損症を有する、実施形態１～９のいずれか１つに記載の方法。

【０１６１】

実施形態１１．前記対象が過剰のプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）を有する、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の方法。

【０１６２】

実施形態１２．前記対象が血中及び／または尿中にて過剰のプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）を有する、実施形態１１に記載の方法。

【０１６３】

実施形態１３．２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）の発現を必要とする対象にて２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）を発現させる方法であって、
治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ｒＡＡＶベクターは：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と
（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結され；
前記治療有効量は約10^{12}ｖｇ／ｋｇから約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にあり、それによって前記対象にて２１ＯＨを発現させる、前記方法。

【０１６４】

実施形態１４．前記２１ＯＨが、前記対象の副腎皮質、副腎髄質、副腎幹細胞、副腎前駆細胞、肝臓、または卵巣で発現される、実施形態１３に記載の方法。

【０１６５】

実施形態１５．２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ｒＡＡＶベクターは、
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結され；前記治療有効量は約10^{12}ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にあり、それによって前記対象にて２１ＯＨＤを治療する、前記方法。

【０１６６】

実施形態１６．コルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルを高めることを必要とする対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルを高める方法であって、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ｒＡＡＶベクターは：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、
（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結され

；前記治療有効量は約１０^{12}ｖｇ／ｋｇ～約１０^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にあり、それによって前記対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンの前記レベルを高める、前記方法。

【０１６７】

実施形態１７．プロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルを下げることを必要とする対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルを下げる方法であって、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ｒＡＡＶベクターは：

（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、

（ｉｉ）２１－ヒドロキシラーゼ（２１ＯＨ）タンパク質をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列はプロモーターに操作可能に連結され；前記治療有効量は約１０^{12}ｖｇ／ｋｇ～約１０^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にあり、それによって前記対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン、及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）の前記レベルを下げる、前記方法。

【０１６８】

実施形態１８．前記対象がプラダー分類ＩＶ型またはＶ型の２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、実施形態１３～１７のいずれか１つに記載の方法。

【０１６９】

実施形態１９．前記対象が先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を有する、実施形態１３～１７のいずれか１つに記載の方法。

【０１７０】

実施形態２０．前記ＣＡＨが古典的ＣＡＨである実施形態１９に記載の方法。

【０１７１】

実施形態２１．前記治療有効量が約１０^{13}ｖｇ／ｋｇ～約１０^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内にある、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の方法。

【０１７２】

実施形態２２．前記治療有効量が約１．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の方法。

【０１７３】

実施形態２３．前記治療有効量が約３×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の方法。

【０１７４】

実施形態２４．前記治療有効量が約６×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の方法。

【０１７５】

実施形態２５．投与工程の前に、２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を選択することをさらに含む、実施形態１～２４のいずれか１つに記載の方法。

【０１７６】

実施形態２６．前記ｒＡＡＶベクターが、開腹手術もしくは腹腔鏡検査による副腎への直接注入によって、またはカテーテル挿入による副腎動脈もしくは副腎静脈への注入によって、前記対象に静脈内投与される、実施形態１～２５のいずれか１つに記載の方法。

【０１７７】

実施形態２７．前記副腎への直接注入が副腎皮質への直接注入である、実施形態２６に記載の方法。

【０１７８】

実施形態２８．前記ｒＡＡＶベクターは静脈内（ＩＶ）注入によって投与される、実施形態１～２５のいずれか１つに記載の方法。

【０１７９】

実施形態２９．前記２１ＯＨタンパク質がヒト２１ＯＨタンパク質である、実施形態１

～２８のいずれか１つに記載の方法。
【０１８０】
実施形態３０．２１ＯＨタンパク質をコードする前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、ヒト２１ＯＨ（ＣＹＰ２１Ａ２）のｃＤＮＡを含む、またはそれから成る、実施形態１～２９のいずれか１つに記載の方法。
【０１８１】
実施形態３１．２１ＯＨタンパク質をコードする前記非ＡＡＶヌクレオチド配列がコドン最適化ヌクレオチド配列を含む、またはそれから成る、実施形態１～３０のいずれか１つに記載の方法。
【０１８２】
実施形態３２．２１ＯＨタンパク質をコードする前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が配列番号５０を含む、または配列番号５０から成る、実施形態１～３１のいずれか１つに記載の方法。
【０１８３】
実施形態３３．２１ＯＨタンパク質をコードする前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、配列番号１のアミノ酸配列、または配列番号１と少なくとも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％同一であるアミノ酸配列をコードする、実施形態１～３２のいずれか１つに記載の方法。
【０１８４】
実施形態３４．前記プロモーターが宿主細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図する、実施形態１～３３のいずれか１つに記載の方法。
【０１８５】
実施形態３５．前記宿主細胞が副腎細胞または副腎皮質細胞である、実施形態３４に記載の方法。
【０１８６】
実施形態３６．前記プロモーターがサイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーター、ＰＧＫプロモーター、または副腎皮質細胞における発現に特異的なプロモーターである、実施形態１～３５のいずれか１つに記載の方法。
【０１８７】
実施形態３７．前記サイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーターがＣＡＧ、ＣＢ６、またはＣＢＡプロモーターである、実施形態３６に記載の方法。
【０１８８】
実施形態３８．前記プロモーターが、配列番号２、配列番号３、配列番号４８、または配列番号４９のヌクレオチド配列を含む、またはそれらから成る、実施形態１～３７のいずれか１つに記載の方法。
【０１８９】
実施形態３９．前記ＩＴＲが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、またはｒｈ７４血清型のＩＴＲである、実施形態１～３８のいずれか１つに記載の方法。
【０１９０】
実施形態４０．前記ｒＡＡＶが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、またはｒｈ７４の血清型である、実施形態１～３９のいずれか１つに記載の方法。
【０１９１】
実施形態４１．前記ｒＡＡＶがＡＡＶ５血清型である、実施形態１～３９のいずれか１つに記載の方法。
【０１９２】
実施形態４２．前記核酸分子がさらにコザック配列を含む、実施形態１～４１のいずれ

か１つに記載の方法。
【０１９３】
実施形態４３．前記核酸分子がさらにｍｉＲ－１２２結合部位を含む、実施形態１～４２のいずれか１つに記載の方法。
【０１９４】
実施形態４４．約10^{12}ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターを対象に投与することを含む方法であって、前記ｒＡＡＶ５ベクターが：少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結されている、前記方法。
【０１９５】
実施形態４５．約10^{13}ｖｇ／ｋｇ～約10^{14}ｖｇ／ｋｇの前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に投与される、実施形態４４に記載の方法。
【０１９６】
実施形態４６．約1.5×10^{13}ｖｇ／ｋｇの前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に投与される、実施形態４５に記載の方法。
【０１９７】
実施形態４７．約3×10^{13}ｖｇ／ｋｇの前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に投与される、実施形態４５に記載の方法。
【０１９８】
実施形態４８．約6×10^{13}ｖｇ／ｋｇの前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に投与される、実施形態４５に記載の方法。
【０１９９】
実施形態４９．前記ｒＡＡＶ５ベクターが前記対象に静脈内投与される、実施形態４５～４８のいずれか１つに記載の方法。
【０２００】
実施形態５０．前記対象が２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、実施形態４４～４９のいずれか１つに記載の方法。
【０２０１】
実施形態５１．２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、約1.5×10^{13}ｖｇ／ｋｇの組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターを前記対象に静脈内投与することを含み、前記ｒＡＡＶ５ベクターが少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結され、それによって前記対象にて２１ＯＨＤを治療する、前記方法。
【０２０２】
実施形態５２．２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、約3×10^{13}ｖｇ／ｋｇの組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターを前記対象に静脈内投与することを含み、前記ｒＡＡＶ５ベクターが少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結され、それによって前記対象にて２１ＯＨＤを治療する、前記方法。
【０２０３】
実施形態５３．２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、約6×10^{13}ｖｇ／ｋｇの組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターを前記対象に静脈内投与することを含み、前記ｒＡＡＶ５ベクターが：
（ｉ）少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む核酸分子と、

（ｉｉ）配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が、副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結され、それによって、前記対象にて２１ＯＨＤを治療する、前記方法。

【０２０４】

実施形態５４．前記プロモーターがサイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーター、ＰＧＫプロモーター、または副腎皮質細胞における発現に特異的なプロモーターである、実施形態４４～５３のいずれか１つに記載の方法。

【０２０５】

実施形態５５．前記サイトメガロウイルス／β－アクチンハイブリッドプロモーターがＣＡＧ、ＣＢ６、またはＣＢＡプロモーターである、実施形態５４に記載の方法。

【０２０６】

実施形態５６．前記プロモーターが、配列番号２、配列番号３、配列番号４８、または配列番号４９のヌクレオチド配列を含む、またはそれらから成る、実施形態４４～５５のいずれか１つに記載の方法。

【０２０７】

実施形態５７．前記ＩＴＲが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、またはｒｈ７４血清型のＩＴＲである、実施形態４４～５６のいずれか１つに記載の方法。

【０２０８】

実施形態５８．前記核酸分子がさらにコザック配列を含む、実施形態４４～５７のいずれか１つに記載の方法。

【０２０９】

実施形態５９．前記核酸分子がさらにｍｉＲ－１２２結合部位を含む、実施形態４４～５８のいずれか１つに記載の方法。

【０２１０】

実施形態６０．前記対象がプラダー分類ＩＶ型またはＶ型の２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、実施形態４４～５９のいずれか１つに記載の方法。

【０２１１】

実施形態６１．前記対象が先天性副腎過形成（ＣＡＨ）を有する、実施形態４４～５９のいずれか１つに記載の方法。

【０２１２】

実施形態６２．前記ＣＡＨが古典的ＣＡＨである実施形態６１に記載の方法。

【０２１３】

実施形態６３．前記対象に治療有効量の免疫抑制剤を投与することをさらに含む、実施形態１～６２のいずれか１つに記載の方法。

【０２１４】

実施形態６４．治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターと治療有効量の免疫抑制剤とを対象に投与することを含む方法であって、前記ｒＡＡＶ５が少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）と配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含む核酸分子を含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結されている、前記方法。

【０２１５】

実施形態６５．前記対象が２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する、実施形態６４に記載の方法。

【０２１６】

実施形態６６．２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対象を治療する方法であって、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス５（ｒＡＡＶ５）ベクターと治療

有効量の免疫抑制剤とを前記対象に静脈内投与することを含み、前記ｒＡＡＶ５が少なくとも１つのＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）と配列番号１のアミノ酸配列をコードする非ＡＡＶヌクレオチド配列とを含む核酸分子を含み、前記非ＡＡＶヌクレオチド配列が副腎細胞または副腎皮質細胞にて前記２１ＯＨタンパク質の発現を指図するプロモーターに操作可能に連結され、それによって前記対象にて２１ＯＨＤを治療する、前記方法。

【０２１７】

実施形態６７．前記免疫抑制剤が、前記ｒＡＡＶベクターの投与前に、投与と同時に、及び／または投与後に投与される、実施形態６３～６６のいずれか１つに記載の方法。

【０２１８】

実施形態６８．前記免疫抑制剤が前記ｒＡＡＶベクターの前記投与の前に投与される、実施形態６７に記載の方法。

【０２１９】

実施形態６９．前記免疫抑制剤が前記ｒＡＡＶベクターの前記投与の少なくとも１２時間前に投与される、実施形態６８に記載の方法。

【０２２０】

実施形態７０．前記免疫抑制剤が前記ｒＡＡＶベクターの前記投与の約２日前に投与される、実施形態６９に記載の方法。

【０２２１】

実施形態７１．前記免疫抑制剤が非グルココルチコイド免疫抑制剤である、実施形態６３～７０のいずれか１つに記載の方法。

【０２２２】

実施形態７２．前記免疫抑制剤がカルシニューリンの阻害剤である、実施形態６３～７０のいずれか１つに記載の方法。

【０２２３】

実施形態７３．前記免疫抑制剤が、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、エベロリムス、ゾタロリムス、またはそれらの任意の組み合わせである、実施形態６３～７２のいずれか１つに記載の方法。

【０２２４】

実施形態７４．前記免疫抑制剤がタクロリムスである、実施形態７３に記載の方法。

【０２２５】

実施形態７５．前記免疫抑制剤が経口投与される、実施形態６３～７４のいずれか１つに記載の方法。

【０２２６】

実施形態７６．前記免疫抑制剤の前記治療有効量が約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約０．０５ｍｇ／ｋｇの範囲内にある、実施形態６３～７５のいずれか１つに記載の方法。

【０２２７】

実施形態７７．前記免疫抑制剤の前記治療有効量が約０．０２５ｍｇ／ｋｇである、実施形態７６に記載の方法。

【０２２８】

実施形態７８．前記治療有効量の前記免疫抑制剤が１日２回投与される、実施形態６３～７７のいずれか１つに記載の方法。

【０２２９】

実施形態７９．前記治療有効量のステロイドを前記対象に投与することを含む、実施形態１～７８のいずれか１つに記載の方法。

【０２３０】

実施形態８０．前記ステロイドがミネラルコルチコイドである、実施形態７９に記載の方法。

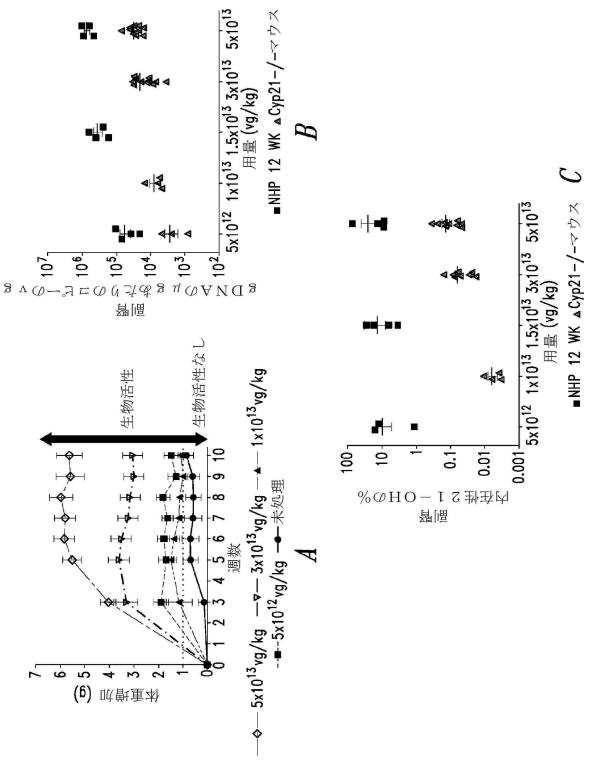
【０２３１】

実施形態８１．前記ステロイドがグルココルチコイドである、実施形態７９に記載の方法。

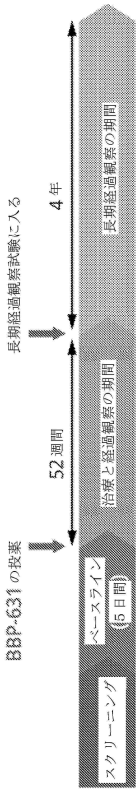
【０２３２】
実施形態８２．前記ステロイドがヒドロコルチゾンである、実施形態７９に記載の方法。
【０２３３】
実施形態８３．前記ステロイドが前記ｒＡＡＶベクターの投与前に、投与と同時に、及び／または投与後に投与される、実施形態７９～８２のいずれか１つに記載の方法。
【０２３４】
実施形態８４．前記ｒＡＡＶベクターの投与前に前記対象に投与される前記ステロイドの前記治療有効量が、前記ｒＡＡＶ投与後に前記対象に投与される前記ステロイドの前記治療有効量よりも多い、実施形態８３に記載の方法。
【０２３５】
実施形態８５．前記ｒＡＡＶの投与前と比べて、前記ｒＡＡＶの投与後に前記対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルが高くなる、実施形態１～８４のいずれか１つに記載の方法。
【０２３６】
実施形態８６．前記ｒＡＡＶを投与されていない２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対照対象と比べて、前記ｒＡＡＶの投与後に前記対象にてコルチゾール及び／またはアルドステロンのレベルが高くなる、実施形態１～８５のいずれか１つに記載の方法。
【０２３７】
実施形態８７．前記ｒＡＡＶの投与前と比べて前記ｒＡＡＶの投与後に前記対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルが低くなる、実施形態１～８６のいずれか１つに記載の方法。
【０２３８】
実施形態８８．前記ｒＡＡＶを投与されていない２１－ヒドロキシラーゼ欠損症（２１ＯＨＤ）を有する対照対象と比べて、前記ｒＡＡＶの投与後に前記対象にてプロゲステロン、１７－ＯＨＰ、レニン及び／またはアンドロステンジオン（Ａ４）のレベルが低くなる、実施形態１～８７のいずれか１つに記載の方法。
【０２３９】
実施形態８９．前記ｒＡＡＶベクターが配列番号５２の核酸配列を含む発現カセットを含む、実施形態１～８８のいずれか１つに記載の方法。

【図面】

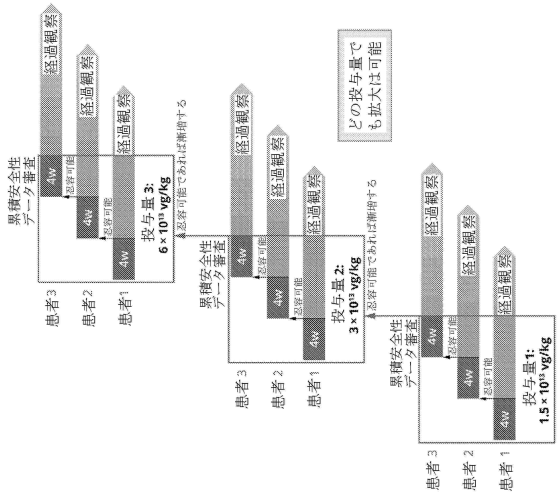
【図１】


体重増加 (g)
週数
生物活性
生物活性なし
5x10^13vg/kg
3x10^13vg/kg
1x10^13vg/kg
5x10^12vg/kg
未処理
A
血清DNAコピー数/mL
用量 (vg/kg)
NHP 12 WK
Cyp21−/−マウス
B
生存率21−OH%
用量 (vg/kg)
NHP 12 WK
Cyp21−/−マウス
C

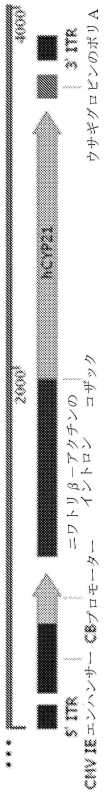
【図２】


BBP-631の投薬
52週間
長期経過観察試験に入る
4年
スクリーニング
ベースライン
(15日間)
治療と経過観察の期間
長期経過観察の期間

【図３】


累積安全性データ審査
患者3
患者2
患者1
4w
忍容可能
経過観察
投与量 3: 6×10^13 vg/kg
忍容可能であれば漸増する
投与量 2: 3×10^13 vg/kg
投与量 1: 1.5×10^13 vg/kg
どの投与量でも拡大は可能

【図４】


5' ITR
CMV IE エンハンサー
CBプロモーター
ニワトリβ−アクチンのイントロン
2000
hCYP21
コザック
4000
3' ITR
ウサギグロビンのポリA

【配列表】
20245110240000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/020933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/86 C12N15/87 C12N9/02
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/143803 A1 (ADRENAS THERAPEUTICS INC [US]) 25 July 2019 (2019-07-25) paragraphs [0007], [0144] claim 22 -----	1-15, 18-43, 63,67-89
X	Eclov R J: "Durable CYP21A2 Gene Therapy in Non-Human Primates for Treatment of Congenital Adrenal Hyperplasia", , 1 January 2019 (2019-01-01), XP055934324, 2019 European Society of Gene & Cell Therapy, Poster Retrieved from the Internet: URL:https://adrenastx.com/wp-content/uploads/BBIO-CAH-GTx-BBP-631-ESGCT-NHP.pdf [retrieved on 2022-06-22] the whole document -----	1-15, 18-43, 63,67-89

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 June 2022	06/09/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Herrmann, Klaus

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/020933

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. [X] forming part of the international application as filed:

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

      [ ] on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/020933

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.:
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:

see additional sheet

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

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an 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.:
1-15(completely); 18-43, 63, 67-89(partially)

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/020933

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019143803 A1	25-07-2019	BR 112020014404 A2	29-12-2020
		CA 3088323 A1	25-07-2019
		CN 111601620 A	28-08-2020
		EP 3740244 A1	25-11-2020
		JP 2021511020 A	06-05-2021
		KR 20200110376 A	23-09-2020
		US 2021277365 A1	09-09-2021
		WO 2019143803 A1	25-07-2019

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

International Application No. PCT/US2022/020933

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15(completely); 18-43, 63, 67-89(partially)

Methods, comprising: administering to a subject a therapeutically effective amount of a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector, wherein the rAAV vector comprises:(i) a nucleic acid molecule comprising at least one AAV inverted terminal repeat (ITR) and(ii) a non-AAV nucleotide sequence encoding any 21-hydroxylase (21OH) protein, wherein the non-AAV nucleotide sequence is operably linked to a promoter; and wherein the therapeutically effective amount is in the range of about 1012 vector genomes per kilogram (vg/kg) to about 1014 vg/kg, and subject-matter relating thereto.

---

2. claims: 16(completely); 18-43, 63, 67-89(partially)

A method of increasing the level of cortisol and/or aldosterone in a subject in need thereof, comprising: administering to the subject a therapeutically effective amount of a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector, wherein the rAAV vector comprises: (i) a nucleic acid molecule comprising at least one AAV inverted terminal repeat (ITR) and (ii) a non-AAV nucleotide sequence encoding a 21-hydroxylase (21OH) protein, wherein the non-AAV nucleotide sequence is operably linked to a promoter; and wherein the therapeutically effective amount is in the range of about 1012 vector genomes per kilogram (vg/kg) to about 1014 vg/kg, thereby increasing the level of cortisol and/or aldosterone in the subject, and subject-matter relating thereto.

---

3. claims: 17(completely); 18-43, 63, 67-89(partially)

A method of decreasing the level of progesterone, 17-OHP, renin and/or androstenedione (A4) in a subject in need thereof, comprising: administering to the subject a therapeutically effective amount of a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector, wherein the rAAV vector comprises:(i) a nucleic acid molecule comprising at least one AAV inverted terminal repeat (ITR) and(ii) a non-AAV nucleotide sequence encoding a 21-hydroxylase (21OH) protein, wherein the non-AAV nucleotide sequence is operably linked to a promoter; and wherein the therapeutically effective amount is in the range of about 1012 vector genomes per kilogram (vg/kg) to about 1014 vg/kg, thereby decreasing the level of progesterone, 17-OHP, renin and/or androstenedione (A4) in the subject.

---

4. claims: 44-62(completely); 63, 67-89(partially)

International Application No. PCT/US2022/020933

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Method, comprising: administering to a subject about 1012 vector genomes per kilogram (vg/kg) to about 1014 vg/kg of a recombinant adeno-associated virus 5 (rAAV5) vector, wherein the rAAV5 vector comprises: (i) a nucleic acid molecule comprising at least one AAV inverted terminal repeat (ITR), and(ii) a non-AAV nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, wherein the non-AAV nucleotide sequence is operably linked to a promoter that directs expression of the 21OH protein in an adrenal gland cell or an adrenal cortex cell, and subject-matter relating thereto.

---

5. claims: 64-66(completely); 67-89(partially)

Method, comprising: administering to the subject a therapeutically effective amount of a recombinant adeno-associated virus 5 (rAAV5) vector and a therapeutically effective amount of an immunosuppressant, wherein the rAAV5 comprises a nucleic acid molecule comprising: (i) at least one AAV inverted terminal repeat (ITR) and (ii) a non-AAV nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, wherein the non-AAV nucleotide sequence is operably linked to a promoter that directs expression of the 21OH protein in an adrenal gland cell or an adrenal cortex cell, and subject-matter relating thereto.

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）
A61K	*31/706(2006.01)*	A61K	38/13		4C087
A61K	*31/436(2006.01)*	A61K	31/706		4C091
A61K	*31/573(2006.01)*	A61K	31/436		
A61P	*15/00 (2006.01)*	A61K	31/573		
C12N	*15/864(2006.01)*	A61P	15/00		
C12N	*15/53 (2006.01)*	C12N	15/864	100Z	
C12N	*15/11 (2006.01)*	C12N	15/53		
C12N	*9/02 (2006.01)*	C12N	15/11	Z	
C07H	*15/04 (2006.01)*	C12N	9/02		
C07D	*498/18 (2006.01)*	C07H	15/04	B	
C07J	*5/00 (2006.01)*	C07D	498/18		
		C07J	5/00		

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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,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

弁護士　山本 健策

(72)発明者　ビアード， クレイトン
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７０７， ダーラム， ラグビー ロード ３５３４

(72)発明者　バルーチャ， カマル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５６８， ダブリン， ムアジャニ ストリート ５７８３

(72)発明者　ブニェール， ピエール
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０１， パロ アルト， キプリング ストリート ４２１， アドリーナス セラピューティクス， インコーポレイテッド 気付

(72)発明者　デイビッド， エリック
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０６７， ランチョ サンタ フェ， サーカ デル ノルト １６７９４

(72)発明者　エクロフ， レイチェル
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７５１８，ケーリー，フォックス ブライヤー レーン ２０３

(72)発明者　エスカンドン， ラファエル
アメリカ合衆国 ワシントン ９８１１０， ベインブリッジ アイランド， エヌイー オールド ミル ロード ５２５６

(72)発明者　ラフォレ， ジェネビーブ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７４０， ボルトン， ゴールデン ラン ロード ９２

(72)発明者　シェイウィッツ， アダム
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２６１８， アーバイン， トリリアム １７９

(72)発明者　ル フュール， ソフィー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０１， パロ アルト， キプリング ストリート ４２１， アドリーナス セラピューティクス， インコーポレイテッド 気付

Fターム（参考）　4C057 BB02 DD02 JJ03
4C072 AA03 BB03 CC01 CC12 DD07 EE09 FF15 GG07 HH01 UU01
4C076 AA11 AA16 BB01 BB11 BB13 CC29
4C084 AA02 AA03 AA13 BA44 DA11 MA02 MA16 MA52 MA65 MA66 NA05 ZA81 ZC41 ZC75
4C086 AA01 AA02 CB22 DA10 EA04 MA01 MA02 MA04 MA07 MA16 MA52 MA65 MA66 NA05 NA14 ZA81 ZC41 ZC75
4C087 AA01 AA02 CA12 CA20 MA01 MA02 MA16 MA65 MA66 NA05 NA14 ZA81 ZC41 ZC75

Fターム（参考） 5
4C091 AA01 BB05 CC01 DD01 EE07 FF01 GG01 HH01 JJ03 KK02
KK12 LL01 MM03 NN01 PA03 PA05 PA09 PB02 QQ01