

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7637058号  
(P7637058)

(45)発行日 令和7年2月27日(2025.2.27)

(24)登録日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	Z N A
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	

請求項の数 17 (全67頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-549291(P2021-549291)  
 (86)(22)出願日 令和2年2月21日(2020.2.21)  
 (65)公表番号 特表2022-523766(P2022-523766  
 A)  
 (43)公表日 令和4年4月26日(2022.4.26)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2020/019149  
 (87)国際公開番号 WO2020/172490  
 (87)国際公開日 令和2年8月27日(2020.8.27)  
 審査請求日 令和5年2月9日(2023.2.9)  
 (31)優先権主張番号 62/809,329  
 (32)優先日 平成31年2月22日(2019.2.22)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/923,812  
 (32)優先日 令和1年10月21日(2019.10.21)  
 最終頁に続く

(73)特許権者 502409813  
 ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバ  
 ーシティ・オブ・ペンシルベニア  
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1  
 0 4 フィラデルフィア・ナインスフロア  
 ー・シビックセンターブールバード 3 6  
 0 0  
 (74)代理人 110000741  
 弁理士法人小田島特許事務所  
 (72)発明者 ヒンデラー, ク里斯チャン  
 アメリカ合衆国ルイジアナ州 7 0 1 1 5  
 ニューオーリンズ・ローレルストリート  
 4 7 2 3  
 (72)発明者 ミラー, ニムロッド  
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 G R N関連成人発症性神経変性の治療のための組換えアデノ随伴ウイルス

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)であって、

(a) AAV1カプシドと、

(b)前記AAV1カプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、AA  
 V逆位末端反復(ITS)、ヒトプログラニュリンのコード配列、および前記コード配列  
 に作動可能に連結されている調節配列を含む、ベクターゲノムと、を含み、  
 前記コード配列が、配列番号1のアミノ酸配列をコードする配列番号3と少なくとも95  
 %同一の配列である、

組換えAAV。

10

## 【請求項2】

組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)であって、

(a) AAV1カプシドと、

(b)前記AAV1カプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、AA  
 V逆位末端反復(ITS)、配列番号1のアミノ酸配列を有するヒトプログラニュリンの  
 コード配列、および前記コード配列に作動可能に連結されているCB7プロモーターを含  
 む調節配列を含む、ベクターゲノムと、を含む、

組換えAAV。

## 【請求項3】

医薬組成物であって、髄腔内投与に好適な水性液体と、ヒト患者の神経変性の治療にお

20

ける使用に好適な組換え A A V と、を含み、前記組換え A A V が、

( a ) A A V 1 カプシドと、

( b ) 前記 A A V 1 カプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、A A V 逆位末端反復 ( I T R ) 、ヒトプログラニュリンのコード配列、および前記コード配列に作動可能に連結されている調節配列を含む、ベクターゲノムと、を含み、

前記コード配列が、配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする配列番号 3 と少なくとも 95 % 同一の配列である、

医薬組成物。

【請求項 4】

医薬組成物であって、髄腔内投与に好適な水性液体と、ヒト患者の神経変性の治療における使用に好適な組換え A A V と、を含み、前記組換え A A V が、

10

( a ) A A V 1 カプシドと、

( b ) 前記 A A V 1 カプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、A A V 逆位末端反復 ( I T R ) 、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するヒトプログラニュリンのコード配列、および前記コード配列に作動可能に連結されている C B 7 プロモーターを含む調節配列を含む、ベクターゲノムと、を含む、

医薬組成物。

【請求項 5】

前記ヒトプログラニュリンのコード配列が、配列番号 3 であるか若しくはそれと少なくとも 99 % 同一の配列である、請求項 1 若しくは 2 に記載の組換え A A V または請求項 3 若しくは 4 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 6】

前記調節配列が、

( i ) 配列番号 9 を含むエンハンサー配列；

( i i ) 配列番号 10 を含む C B 7 プロモーター配列；

( i i i ) 配列番号 11 を含むイントロン配列；および

( i v ) 配列番号 6 を含むポリアデニル化シグナル配列

を含む、請求項 1、2 若しくは 5 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 3、4 若しくは 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 7】

前記 A A V I T R が、 A A V 2 5 ' I T R および A A V 2 3 ' I T R であり、これらは、前記ヒトプログラニュリンのコード配列および調節配列に隣接する、請求項 6 に記載の組換え A A V 又は請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記ベクターゲノムが、配列番号 24 の配列を含む、請求項 1 若しくは 2 に記載の組換え A A V 又は請求項 3 若しくは 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記組成物が、界面活性剤を含む人工脳脊髄液を含む、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記界面活性剤が、ポロキサマー 188 である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 11】

成人発症性神経変性を有する患者を治療する方法に使用するための、請求項 8 に記載の組換え A A V または請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

G R N - ハプロ不全によって引き起こされる成人発症性神経変性を有するヒト患者を治療する方法に使用するための、請求項 1、2 若しくは 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の組換え A A V または請求項 3 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物であって、前記方法が、前記組換え A A V 又は前記医薬組成物を、前記患者の中枢神経系 ( C N S ) に送達することを含み、任意に、前記組換え A A V が上衣細胞を標的とし、且つ前記調節配列が前記上衣細胞において前記プログラニュリンの発現を指示する、組換え A A V 又は医薬組成物。

50

## 【請求項 1 3】

グラニュリン ( G R N ) ハプロ不全によって引き起こされる成人発症性神経変性に関連する脳病変を有するヒト患者を治療する方法に使用するための、請求項 1、2 若しくは 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の組換え A A V または請求項 3 ~ 1 0 に記載の医薬組成物であって、前記方法が、前記患者の C N S に前記組換え A A V 又は前記医薬組成物を投与することを含む、組換え A A V 又は医薬組成物。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の使用のための、請求項 1、2 若しくは 5 ~ 8 に記載の組換え A A V または請求項 3 ~ 1 0 に記載の医薬組成物であって、

( a ) 前記患者が、前記組換え A A V の  $1 \times 10^{10}$  ゲノムコピー ( G C ) / g 脳質量 ~ 3 . 3  $\times 10^{11}$  G C / g 脳質量の用量を、髄腔内に投与されるか、または、

( b ) 前記患者が、ヒト成人であり、前記組換え A A V の  $1 . 44 \times 10^{13} \sim 4 . 33 \times 10^{14}$  G C の用量を投与される、

組換え A A V または医薬組成物。

10

## 【請求項 1 5】

( a ) 脳病変の減少の予測因子として、網膜蓄積病変の減少について前記患者を非侵襲的に評価すること、( b ) 磁気共鳴画像法を行って脳体積を評価すること、および / または、( c ) 前記患者の脳脊髄液中のプログラニュリンの濃度を測定することのうちの 1 つ以上をさらに含む、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の使用のための、請求項 1、2 若しくは 5 ~ 8 に記載の組換え A A V または請求項 3 ~ 1 0 に記載の医薬組成物。

20

## 【請求項 1 6】

請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の使用のための、請求項 1、2 若しくは 5 ~ 8 に記載の組換え A A V または請求項 3 ~ 1 0 に記載の医薬組成物であって、

( a ) 前記プログラニュリンのコード配列を含む前記組換え A A V が、脳室内送達を介して、または実質内送達を介して、髄腔内に送達されるか、または、

( b ) 前記組換え A A V が、コンピュータ断層撮影 ( C T ) ガイドによる大槽内への ( 大槽内 ) 後頭下注入を介して、単回用量として投与される、

組換え A A V 又は医薬組成物。

## 【請求項 1 7】

請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の使用のための、請求項 1、2 若しくは 5 ~ 8 に記載の組換え A A V または請求項 3 ~ 1 0 に記載の医薬組成物であって、前記患者が、プログラニュリン関連前頭側頭型認知症 ( F T D ) を有する、組換え A A V 又は医薬組成物。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年2月22日に出願された米国仮出願第 6 2 / 8 0 9 , 3 2 9 号、2019年10月21日に出願された米国仮出願第 6 2 / 9 2 3 , 8 1 2 号、および2020年2月2日に出願された米国仮出願第 6 2 / 9 6 9 , 1 0 8 号の利益および優先権を主張し、これらは、あらゆる目的のために、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

40

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

前頭側頭型認知症 ( F T D ) は、致命的な神経変性疾患であり、典型的には、人生の 60 代または 70 代に現れ、実行機能、行動、発話、または言語理解の障害を伴う。これらの症状は、前頭皮質および側頭皮質に影響を及ぼす脳萎縮の特徴的なパターンに関連している。患者は、普遍的に進行性の経過を示し、症状の発症からの平均生存期間は 8 年である ( C o y l e - G i l c h r i s t I T , e t a l . N e u r o l o g y . 2 0 1 6 ; 8 6 ( 1 8 ) : 1 7 3 6 - 4 3 ) 。

50

## 【0003】

F T Dは、高度に遺伝性であり、患者の約40%が陽性の家族歴を有する (Rohrer J D, et al. *Neurology*. 2009; 73(18): 1451-6.)。5~10%のF T D患者では、遍在性のリソソームタンパク質であるプログラニュリン (P G R N) をコードするグラニュリン (G R N) 遺伝子において、病原性の機能喪失変異が特定され得る (Rohrer J D, et al. *Neurology*. 2009; 73(18): 1451-6.)。G R N変異の保因者は、急速かつ広範囲の脳萎縮を示し、進行性核上性麻痺、基底核症候群、パーキンソン病、レビー小体を伴う認知症、またはアルツハイマー病などの他の神経変性疾患の臨床的特徴を呈し得る (Le Ber I, et al. *Brain: a journal of neurology*. 2008; 131(3): 732-46.)。G R N変異は、常染色体優性形態で遺伝し、70歳までに90%を超える浸透率を有する (Gass J, et al. *Human molecular genetics*. 2006; 15(20): 2988-3001)。単一のG R N変異の遺伝は、F T Dおよび他の遅発性神経変性疾患を引き起こすが、ホモ接合性の機能喪失変異を有する患者は、人生のずっと早い時期に神経セロイドリポフスチン症 (N C L、バッテン病) を呈し、ニューロンのリソソーム内の自己蛍光物質 (リポフスチン) の蓄積、急速な認知低下および網膜変性を特徴とする (Smith Katherine R, et al. *American Journal of Human Genetics*. 2012; 90(6): 1102-7)。G R N変異に対してヘテロ接合の患者は、症状の発症がずっと遅延するが、最終的に、N C L患者と同一の脳および網膜におけるリソソーム蓄積病変を発症し、同様に、進行性神経変性を経験する (Ward M E, et al. *Science Translational Medicine*. 2017; 9(385): Gotz J K, et al. *Acta neuropathologica*. 2014; 127(6): 845-60)。プログラニュリンは、最近、リソソームの酸性化を促進し、カテプシンD (C T S D) を含むリソソームプロテアーゼのシャペロンとして機能することによって、リソソーム機能において重要な役割を果たすことが見出された (Beel S, et al. *Human molecular genetics*. 2017 Aug 1; 26(15): 2850-2863、Tanaka Y, et al. *Human molecular genetics*. 2017; 26(5): 969-88)。C T S Dをコードする遺伝子の変異もまた、N C L表現型をもたらし、欠損したリソソームプロテアーゼ活性に関連する一般的な病態生理を支持している (Siintola E, et al. *Brain: a journal of neurology*. 2006; 129(Pt 6): 1438-45)。

## 【0004】

現在、G R Nハプロ不全によって引き起こされる成人発症性神経変性の疾患を修飾する療法は存在しない。疾病管理は、疾患に関連する行動、認知、および/または運動の症状を低減することを目的とした支持ケアおよび適応症外治療を含む (Tsai and Boixer, 2016, *J Neurochem*. 138 Suppl 1: 211-21)。さらに、認知症の家族歴のある個人をスクリーニングすることによって、より多くの患者がより早い段階で到達する可能性があるが、現在、治療の欠如を考慮して適応されていない。したがって、この疾患スペクトルは、満たされていない医療ニーズの高い領域を表している。

## 【0005】

必要とされているものは、G R Nハプロ不全に関連する成人発症性神経変性疾患およびそれに関連する症状のための治療である。

## 【発明の概要】

## 【0006】

プログラニュリン (P G R N) 関連前頭側頭型認知症 (F T D) およびG R Nハプロ不全に関連する他の成人発症性神経変性疾患によって引き起こされる神経変性の治療に使用するための好適な組換えA A V (r A A V) が提供される。r A A Vは、アデノ随伴ウイ

10

20

30

40

50

ルス 1 カプシドと、 A A V カプシドにパッケージングされるベクターゲノムとを含み、当該ベクターゲノムは、 A A V 逆位末端反復 ( I T R ) 、ヒトプログラニュリンをコードするコード配列、およびプログラニュリンの発現を指示する調節配列を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、 A A V 5' 逆位末端反復 ( I T R ) 、ヒト P G R N コード配列、およびその発現を指示する調節エレメント、ならびに A A V 5' I T R を含む。

【 0 0 0 7 】

水性液体および組換え A A V ( r A A V ) を含む医薬組成物も提供される。特定の実施形態では、水性液体は、髄腔内投与に好適な界面活性剤を含む人工脳脊髄液を含む。

【 0 0 0 8 】

G R N ハプロ不全によって引き起こされるプログラニュリン関連前頭側頭型認知症 ( F T D ) 神経変性または他の成人発症性神経変性疾患有するヒト患者を治療する方法が提供される。本方法は、ヒトプログラニュリンのコード配列を含む r A A V を、中枢神経系 ( C N S ) に送達することを含む。アデノ随伴ウイルス 1 ( A A V 1 ) カプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) であって、当該 r A A V は、 A A V カプシド中にパッケージされるベクターゲノムをさらに含み、当該ベクターゲノムは、 A A V 逆位末端反復、ヒトプログラニュリンのコード配列、およびプログラニュリンの発現を指示する調節配列を含む、組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) 。

10

【 0 0 0 9 】

G R N ハプロ不全によって引き起こされる P G R N - F T D または他の成人発症性神経変性疾患有するヒト患者の治療方法で使用するための r A A V 1 . h P G R N が提供される。本方法は、上衣細胞を標的とするヒトプログラニュリンをコードするアデノ随伴ウイルス 1 カプシドを有する r A A V を、 C N S に投与することを含む。 r A A V 1 は、 A A V カプシド中にパッケージングされるベクターゲノムをさらに含み、当該ベクターゲノムは、 A A V 逆位末端反復、ヒトプログラニュリンのコード配列、上衣細胞においてプログラニュリンの発現を指示する調節配列を含む。一実施形態では、分泌可能なヒトプログラニュリンは、 r A A V 1 遺伝子療法の送達後に発現される。

20

【 0 0 1 0 】

G R N ハプロ不全によって引き起こされるプログラニュリン関連前頭側頭型認知症 ( F T D ) 神経変性または他の成人発症性神経変性疾患有するヒト患者を治療するための方法が提供される。本方法は、アデノ随伴ウイルス 1 ( A A V 1 ) カプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) を中枢神経系 ( C N S ) に投与することを含み、当該 r A A V は、 A A V カプシド中にパッケージされるベクターゲノムをさらに含み、当該ベクターゲノムは、 A A V 逆位末端反復、ヒトプログラニュリンのコード配列、およびプログラニュリンの発現を指示する調節配列を含む。

30

【 0 0 1 1 】

特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、 ( a ) 脳病変の減少の予測因子として網膜蓄積病変の減少について患者を非侵襲的に評価すること、 ( b ) 磁気共鳴画像法を行って脳体積を評価すること、および / または ( c ) C S F 中のプログラニュリン濃度の濃度を測定することをさらに含み得る。

【 0 0 1 2 】

40

本発明のこれらのおよび他の態様は、以下の本発明の詳細な説明から明らかとなるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 A A V 1 . h P G R N ベクターゲノムの線形マップである。 A A V 1 . C B 7 . C I . h P G R N . r B G ベクターゲノムは、遍在性 C B 7 プロモーターの制御下でヒト P G R N のコード配列を含み、これは、 C M V I E エンハンサーとニワトリ アクチンプロモーターとの間のハイブリッドで構成される。略語： B A : - アクチン、 b p : 塩基対、 C M V I E : サイトメガロウイルス最初期、 I T R : 逆位末端反復、 P o l y A : ポリアデニル化、 r B G : ウサギ - グロビン。

50

【図2】ベクターゲノムを担持するシスプラスミドの線形ベクターマップである。

【図3A-3D】G R N - / - マウスの脳におけるリポフスチン蓄積およびヘキソサミニダーゼ活性の自然歴を提供する。G R N - / - マウス (KO) または G R N + / + (WT) 対照は、示された齢で犠牲になった (n = 10 / 時点)。未染色の脳切片を、海馬、視床、および前頭皮質における自己蛍光物質 (リポフスチン) について画像化し、リポフスチン沈着物を 3 人の盲検レビューによって定量化および平均化した (図3A ~ 図3C)。リポフスチンの数は、関心領域の総面積に対して表される。ヘキソサミニダーゼ活性は、脳試料において測定され、総タンパク質濃度に対して正規化された (図3D)。値は、野生型対照に対する比率で表される。

【図4A-4G】AAV媒介性P G R N 発現による、若い成体G R N - / - マウスの脳におけるリソソーム病理の矯正を示す。G R N - / - マウス (KO) または G R N + / + (WT) 対照を、2ヶ月齢でビヒクル (PBS) またはヒトP G R N (10<sup>11</sup> G C) を発現するAAV h u 6 8 ベクターの単回I C V注入で処置した (群あたりn = 10)。動物は、注入60日目に犠牲にされ、E L I S A によって、C S F (図4A) および脳の前頭葉 (図4B) におけるヒトP G R Nを測定した。ヘキソサミニダーゼ活性は、脳試料で測定された (図4C)。脳P G R N濃度およびH e x活性は、総タンパク質に対して正規化された。海馬、視床、および前頭皮質における自己蛍光物質 (リポフスチン) について、未染色の脳切片を撮像した。海馬、視床、および前頭皮質におけるリポフスチン沈着物は、盲検レビューにより定量化された (図4D ~ 図4G)。リポフスチン数は、高倍率視野ごとに表される。KO + PBS 海馬 (n = 8) を除き、群あたりn = 10。\* p < 0.05、\*\* p < 0.005、\*\*\* p < 0.001、\*\*\*\* p < 0.0001、一元配置ANOVA、続いてテューキーの多重比較検定。ヘキソサミニダーゼ活性は、血清中で測定された (図4G)。

【図5A-5D】ヒトP G R NのAAV媒介性発現による、加齢G R N - / - マウスの脳におけるリソソーム病理の矯正を示す。生後7ヶ月で、G R N - / - マウス (KO) または G R N + / + (WT) 対照を、ビヒクル (PBS) またはヒトP G R N (10<sup>11</sup> G C) を発現するAAV h u 6 8 ベクターの単回I C V注入で処置した。動物は、注入4ヶ月後に犠牲にされた。ヘキソサミニダーゼ活性は、脳試料において測定され (図5A)、リポフスチン沈着物は、盲検レビューによって、海馬、視床、および皮質において定量化された (図5B ~ 図5D)。リポフスチン数は、高倍率視野ごとに表される。\* p < 0.05、\* \* p < 0.005、一元配置ANOVA、続いてテューキーの多重比較検定。

【図6A-6C】AAV媒介性P G R N 発現による、加齢G R N - / - マウスにおける脳ミクログリオーシスの矯正を示す。生後7ヶ月で、G R N - / - マウス (KO) または G R N + / + (WT) 対照を、ビヒクル (PBS) またはヒトP G R N (10<sup>11</sup> G C) を発現するAAV h u 6 8 ベクターの単回I C V注入で処置した。動物は、注入4ヶ月後に犠牲にされ、脳切片は、C D 6 8 について染色された。海馬、視床、および前頭皮質の画像におけるC D 6 8陽性領域は、ImageJソフトウェアを使用して、盲検レビューによって定量化された (図6A ~ 図6C)。領域は、高倍率視野ごとに表される。\* p < 0.05、\*\* p < 0.005、\*\*\* p < 0.001、\*\*\*\* p < 0.0001、一元配置ANOVA、続いてテューキーの多重比較検定。

【図7A-7C】AAV送達後のアカゲザル (r h e s u s m a c a q u e s) におけるヒトP G R N 発現を示す。試験0日目、成体アカゲザルに、ニワトリベータアクチングロモーターからヒトP G R Nを発現するAAV1、AAV5、またはAAV h u 6 8 ベクター (3 × 10<sup>13</sup> G C) を、I C M注入によって投与した (ベクターあたりn = 2)。2匹の追加のマカクに、ユビキチンCプロモーター (AAV h u 6 8 V 2) からh P G R Nを発現するAAV h u 6 8 ベクターを投与した。透視ガイダンス下、I C M注入を行った。蛍光透視による針の配置および造影剤のC S Fリターン注入を確認した後、大槽内の分布が示された。その後のベクター注入では、造影剤の変位が明らかであった。ヒトP G R Nを、処置されたマカク (図7A) および健康な成人ヒト対象 (図7B) のC S F、ならびに処置されたマカクの血清 (図7C)において、E L I S A によって測定した。図

10

20

30

40

50

7 A および図 7 B では、点線は、CSF 中 1 : 5 に希釈された hPGRN の定量下限を指す。

【図 8 A - 8 C】ベクター処置非ヒト霊長類におけるヒトPGRNに対する免疫応答を示す。ニワトリベータアクチンプロモーターまたはユビキチン C プロモーター (AAVhu68 V2) からヒトPGRNを発現するAAV1、AAV5 またはAAVhu68 ベクター ( $3 \times 10^{13}$  GC) のICM投与後、CSFを、化学検査および細胞診断の分析のために、毎週採取した。白血球数の増加（主に小リンパ球）は、ほとんどの動物において明らかであった（図 8 A）。ヒトPGRNに対する抗体応答を、AAVhu68 またはAAV1 で処置された動物のCSF（図 8 B）および血清（図 8 C）において、ELISA によって測定した。AAV5 で処置された動物由来の血清またはCSF の試料では、ヒトPGRNに対する抗体を評価しなかった。

【図 9】非ヒト霊長類へのAAV1 およびAAVhu68 ベクターのICM投与後の脳形質導入のレベルを示す。成体アカゲザルに、ニワトリベータアクチンプロモーターからGFP を発現する  $3 \times 10^{13}$  GC のAAVhu68 (n = 2) またはAAV1 (n = 2) ベクターを、ICM注入によって投与した。ベクター投与の28日後、動物を剖検し、脳の右半球の5つの領域の切片を、GFP 免疫組織化学またはGFP およびDAPI の染色による免疫蛍光によって分析した。特定の細胞型（NeuN、GFAP、およびOlig2）のマーカーによる共染色で、形質導入された、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトの定量を可能にした。すべてのサンプリングされた脳領域について、各細胞型の平均形質導入を計算した。エラーバー = 5つの切片のSEM。

【図 10】非ヒト霊長類へのAAV1（動物ID1826 および2068）およびAAVhu68（動物ID1518 および2076）ベクターのICM投与後の、ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの形質導入の割合を示す表を提供する。試験0日目、成体アカゲザルに、ニワトリベータアクチンプロモーターからGFP を発現する  $3 \times 10^{13}$  GC のAAVhu68 (n = 2) またはAAV1 (n = 2) ベクターを、ICM注入によって投与した。ベクター投与の28日後、動物を剖検し、脳の右半球の5つの領域の切片を、特定の細胞型（NeuN、GFAP、およびOlig2）に対する共染色によるGFP 免疫蛍光によって分析した。各細胞型の全細胞および各型のGFP 発現細胞の数を、HALO ソフトウェアを使用して定量した。各領域について、形質導入された各細胞型の割合を示す。一部の動物については、領域5からの2つの切片を分析した。

【図 11 A - 11 B】非ヒト霊長類における正中感覚神経伝導検査の結果を示す。Y 軸は、3つの異なる用量 ( $3 \times 10^{12}$  GC、 $1 \times 10^{13}$  GC、もしくは  $3 \times 10^{13}$  GC の rAAV1 . hPGRN またはビヒクル対照) の投与後に、経時的 (X 軸) に測定された開始からのピーク振幅 (ピーク潜時) までの潜時を表す。

【図 12 A - 12 D】rAAV1 . hPGRN による処置 90 日後の、非ヒト霊長類 (NHP) における後根神経節 (DRG)、正中神経、および脊髄 (SC) の神経病理学的研究の結果を示す。

【図 13】ベクター生成のための製造プロセスのフロー図を示す。略語：AEX：アニオニン交換、CRL：Charles River Laboratories、ddPCR：デジタルドップレットポリメラーゼ連鎖反応、DMEM：ダルベッコ改変イーグル培地、DNA：デオキシリボ核酸、FFB：最終製剤緩衝液、GC：ゲノムコピー、HEK293：ヒト胎児由来腎臓 293 細胞、ITFFB：髄腔内最終製剤緩衝液、PEI：ポリエチレンイミン、SDS-PAGE：ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、TFF：接線流過、USP：米国薬局方、WCB：作業用細胞バンク。

【図 14】ベクター製剤のための製造プロセスのフロー図を示す。GTP-205 医薬品を生産するための製造プロセス。略語：Ad5：アデノウイルス血清型 5、AUC：分析用超遠心分離、BDS：バルク原薬、BSA：ウシ血清アルブミン、CZ：Crysta1 Zenith、ddPCR：ドップレットデジタルポリメラーゼ連鎖反応、E1A：初期領域 1A（遺伝子）、ELISA：酵素結合免疫吸着アッセイ、FDP：最終製剤、GC：ゲノムコピー、HEK293：ヒト胎児由来腎臓 293 細胞、ITFFB：髄腔

10

20

30

40

50

内最終製剤緩衝液、K a n R : カナマイシン耐性（遺伝子）、M S : 質量分析、N G S : 次世代配列決定、q P C R : 定量的ポリメラーゼ連鎖反応、S D S - P A G E : ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、T C I D 5 0 5 0 % 組織培養感染量、U P L C : 超高速液体クロマトグラフィ、U S P : 米国薬局方。

【発明を実施するための形態】

【0014】

プログラニュリン（P G R N）関連前頭側頭型認知症（F T D）などの、G R N - ハプロ不全に関連する神経変性状態の治療における使用に好適な組換えA A V（r A A V）、およびそれらを含む組成物が提供される。特定の好ましい実施形態では、r A A Vは、アデノ随伴ウイルス1カプシドと、A A Vカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムとを含み、ベクターゲノムは、A A V逆位末端反復、ヒトプログラニュリンのコード配列、およびプログラニュリンの発現を指示する調節配列を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、A A V 5' 逆位末端反復（I T R）、ヒトP G R Nコード配列、およびその発現を指示する調節エレメント、ならびにA A V 3' I T Rを含む。水性液体および組換えA A V（r A A V）を含む医薬組成物も提供される。特定の実施形態では、水性液体は、髄腔内投与に好適な界面活性剤を含む人工脳脊髄液を含む。また、P G R N - F T Dを有するヒト患者を治療するための方法、および／またはP G R N - F T Dに関連する脳病変を有する患者を治療するための方法も提供される。特定の実施形態では、患者のミクログリオーシスを治療または低減するための方法が提供される。本方法は、r A A V . P G R Nを、中枢神経系（C N S）に送達することを含む。特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、（a）脳病変の減少の予測因子として網膜蓄積病変の減少について患者を非侵襲的に評価すること、（b）磁気共鳴画像法を行って脳体積を評価すること、および／または（c）C S F中のP G R N濃度の濃度を測定することによって、治療をモニタリングすることをさらに含み得る。任意選択的に、血漿中のP G R Nの濃度を測定してもよい。

【0015】

本明細書で使用される場合、用語「A A V . h P G R N」または「r A A V . h P G R N」は、調節配列の制御下でヒトプログラニュリンのコード配列を含むベクターゲノムをその中に有するA A Vカプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルスを指すために使用される。特定のカプシドの種類が特定されてもよく、例えば、A A V 1 . h P G R Nは、A A V 1カプシドを有する組換えA A Vを指し、A A V h u 6 8 . h P G R Nは、A A V h u 6 8カプシドを有する組換えA A Vを指し、A A V 5 . h P G R Nは、A A V 5カプシドを有する組換えA A Vを指す。

【0016】

「組換えA A V」または「r A A V」は、2つの要素、A A Vカプシド、およびA A Vカプシド内にパッケージされた少なくとも非A A Vコード配列を含むベクターゲノムを含むD N A s e耐性ウイルス粒子である。特に明記しない限り、この用語は「r A A Vベクター」という句と互換的に使用され得る。r A A Vは、任意の機能的A A V r e p遺伝子または機能的A A V c a p遺伝子を欠き、子孫を生成することができないため、「複製欠陥ウイルス」または「複製欠陥ウイルスベクター」である。特定の実施形態では、唯一のA A V配列は、A A V逆方向末端反復配列（I T R）であり、I T R間に位置する遺伝子および調節配列がA A Vカプシド内にパッケージされることを可能にするために、典型的にはベクターゲノムの5' および3' 最末端に位置する。

【0017】

本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」は、ウイルス粒子を形成するr A A Vカプシドの内側にパッケージされる核酸配列を指す。かかる核酸配列は、A A V逆方向末端反復配列（I T R）を含む。本明細書の実施例では、ベクターゲノムは、少なくとも5' から3' に、A A V 5' I T R、コード配列、およびA A V 3' I T Rを含む。A A V 2からのI T R、カプシドとは異なる供給源A A V、または完全長I T R以外が選択され得る。特定の実施形態では、I T Rは、產生中のr e p機能またはトランス相補A A Vを提供

10

20

30

40

50

する A A V と同じ A A V 供給源由来である。さらに、他の I T R が使用され得る。さらに、ベクターゲノムは、遺伝子産物の発現を指示する制御配列を含む。ベクターゲノムの好適な成分が本明細書でより詳細に考察される。

【 0 0 1 8 】

治療用タンパク質およびコード配列：

r A A V は、ヒトプログラニュリン ( h P G R N ) タンパク質またはそのバリアントのコード配列を含み、h P G R N の生物学的機能のうちの 1 つ以上を行う。このタンパク質のコード配列は、中枢神経系 ( C N S ) における発現のためにベクターゲノムへと操作される。

【 0 0 1 9 】

H u P G R N 1 は、最も一般的に、配列番号 1 に再現される G e n B a n k \_ N P \_ 0 0 2 0 7 8 の 5 9 3 アミノ酸の配列を特徴とする。この配列は、分泌プログラニュリンタンパク質またはアミノ酸 1 8 ~ 約 5 9 3 を含む分泌グラニュリンと共に 1 ~ 1 7 位にシグナルペプチドを有する。このタンパク質は、配列番号 1 の番号付けを参照して、グラニュリン 1 ( 別名グラニュリン G : 約 a a 5 8 約アミノ酸 1 1 3 ) 、グラニュリン 2 ( 約アミノ酸 1 2 3 ~ 約 1 7 9 ) 、グラニュリン 3 ( 約アミノ酸 2 0 6 ~ 約アミノ酸 2 6 1 ) 、グラニュリン 4 ( 約アミノ酸 2 8 1 ~ 約アミノ酸 3 3 6 ) 、グラニュリン 5 ( 約アミノ酸 3 6 4 ~ 約アミノ酸 4 1 7 ) 、グラニュリン 6 ( 約アミノ酸 4 4 2 ~ 約アミノ酸 4 9 6 ) 、およびグラニュリン 7 ( 約アミノ酸 5 1 8 ~ 約アミノ酸 5 7 3 ) の 8 つの鎖に切断され得る。特定の実施形態では、天然シグナルペプチドの代わりに、異種シグナルペプチドで置換され得る。しかしながら、他の実施形態は、外因性シグナルペプチド ( 例えば、ヒト I L 2 リーダー ) を有するプログラニュリンを包含し得る。また、例えば、 w w w . s i g n a l p e p t i d e . d e / i n d e x . p h p ? m = 1 i s t s p d b \_ m a m m a l i a を参照されたい。したがって、プログラニュリンおよび / またはその断片を含む融合タンパク質が企図される。かかる融合タンパク質は、互いと様々な組み合わせで活性 G R N ( 例えば、 G R N 1 、 2 、 3 、 4 、 4 、 6 、または 7 ) のうちの 1 つ以上を包含してもよく、あるいはこれらのペプチドのうちの 1 つ以上を、全長 P G R N または別のタンパク質もしくはペプチド ( 例えば、別の活性タンパク質もしくはペプチド、および / またはヒト P G R N に対して外因性のシグナルペプチド ) と組み合わせてもよい。

【 0 0 2 0 】

ベクターゲノムは、このタンパク質のコード配列を担持し、ヒト細胞において ( 特に、中枢神経系において ) タンパク質を発現するように操作される。特定の実施形態では、コード配列は、 G e n B a n k : N M \_ 0 0 2 0 8 7 . 3 に見出され、配列番号 2 に再現される。

【 0 0 2 1 】

特定の実施形態では、コード配列は、配列番号 3 に提供される。特定の他の実施形態は、配列番号 3 と 9 5 % ~ 9 9 . 9 % または 1 0 0 % 同一性のコード配列を包含し、それらの間の値を含む。一部の実施形態では、コード配列は、より良い治療転帰 ( 例えば、哺乳動物細胞における発現増強 ) のためにコドン最適化される。同一性は、シグナル ( リーダー ) 配列を有する全長プログラニュリンのコード配列にわたって、シグナル ( リーダー ) 配列を有さないプログラニュリンにわたって、または本明細書に定義される融合タンパク質のコード配列の長さにわたって評価され得る。特定の実施形態では、コード配列は、配列番号 3 に提供される。特定の他の実施形態は、配列番号 4 と 9 5 % ~ 1 0 0 % 未満同一性のコード配列を包含する。同一性は、シグナル ( リーダー ) 配列を有する全長プログラニュリンのコード配列にわたって、シグナル ( リーダー ) 配列を有さないプログラニュリンにわたって、または本明細書に定義される融合タンパク質のコード配列の長さにわたって評価され得る。

【 0 0 2 2 】

好適には、これらのコード配列は、全長プログラニュリンをコードする。しかしながら、他の実施形態は、異種シグナルペプチド ( 例えば、ヒト I L 2 リーダー ) を有する活性

10

20

30

40

50

グラニュリン鎖を包含し得る。また、例えば、[www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb\\_mammalia](http://www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia)を参照されたい。

#### 【0023】

特定の実施形態では、ヒトPGRNのコード配列（例えば、配列番号3もしくは配列番号4）の断片、またはそれと約95%～99.9%もしくは100%同一の配列を利用してもよい。かかる断片は、活性ヒトGPN（aa18～593）、または活性ヒトGPNと共に異種シグナルペプチドを含む融合ペプチドをコードし得る。特定の実施形態では、活性GPN（例えば、GPN1、2、3、4、4、6、または7）のうちの1つ以上のコード配列のうちの1つ以上は、互いに様々な組み合わせでベクターゲノムに含まれ得るか、またはこれらのペプチドのうちの1つ以上は、全長PGRNもしくは別のコード配列と組み合わせられ得る。

10

#### 【0024】

理論に束縛されることを意図するものではないが、CNSの細胞のサブセット（例えば、上衣細胞）におけるAAV媒介性PGRN発現は、分泌されたタンパク質のデポ（depot）を提供すると考えられる。分泌PGRNタンパク質（および/または1つ以上のGPN）は、ソーティリンまたはマンノース-6-リン酸受容体を介して他の細胞に取り込まれ、その後、リソソームに輸送される。特定の実施形態では、分泌タンパク質は、プログラニュリンである。特定の実施形態では、分泌タンパク質は、グラニュリンである。特定の実施形態では、分泌タンパク質は、プログラニュリンおよびグラニュリンの混合物を含む。

20

#### 【0025】

特定の実施形態では、プログラニュリンのコード配列に加えて、別の非AAVコード配列、例えば、目的のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、機能性RNA分子（例えば、miRNA、miRNA阻害剤）、または他の遺伝子産物を含んでもよい。有用な遺伝子産物としては、miRNAも含まれる。miRNAおよび他の低分子干渉核酸は、標的RNA転写産物の切断/分解または標的メッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳抑制を介して遺伝子発現を制御する。miRNAは、典型的には、最終的な19～25の非翻訳RNA産物として天然に発現される。miRNAは、標的mRNAの3'非翻訳領域（UTR）との配列特異的相互作用を通してこれらの活性を示す。これらの内因性発現miRNAはヘアピン前駆体を形成し、その後、miRNA二本鎖に、さらに「成熟」一本鎖miRNA分子に処理される。この成熟miRNAは、成熟miRNAとの相補性に基づいて、例えば、3'UTR領域内の標的mRNAの標的部位を特定する、多タンパク質複合体miRISCを誘導する。

30

#### 【0026】

特定の実施形態では、発現カセットは、後根神経節（drg）におけるhPGRNの発現を抑制する1つ以上のmiRNA標的配列をさらに含む。特定の実施形態では、発現カセットは、drg特異的miRNA標的配列の少なくとも2つのタンデム反復を含み、少なくとも2つのタンデム反復は、少なくとも第1のmiRNA標的配列と、同じまたは異なり得る少なくとも第2のmiRNA標的配列とを含む。特定の実施形態では、タンデムmiRNA標的配列は、連続的であるか、または1～10個の核酸のスペーサーによって分離されており、当該スペーサーは、miRNA標的配列ではない。特定の実施形態では、少なくとも2つのdrg特異的miRNA標的配列があり、hPGRNコード配列の3'に位置する。特定の実施形態では、少なくとも2つのdrg特異的miRNAタンデム反復の第1の開始は、hPGRNコード配列の3'末端から20ヌクレオチド以内である。特定の実施形態では、少なくとも2つのdrg特異的miRNAタンデム反復の第1の開始は、hPGRNコード配列の3'末端から少なくとも100ヌクレオチドである。特定の実施形態では、miRNAタンデム反復は、200～1200ヌクレオチド長を含む。特定の実施形態では、少なくとも2つのdrg特異的miRNA標的配列があり、hPGRNコード配列の5'に位置する。特定の実施形態では、少なくとも2つのdrg特異的miRNA標的配列は、hPGRNコード配列の5'および3'の両方に位置する。特定の実施形

40

50

態では、発現カセットmRNAまたはDNAプラス鎖の少なくとも第1のmiRNA標的配列および/または少なくとも第2のmiRNA標的配列は、(i)AGTGAATTCTACCAAGTGCCATA(miR183、配列番号：32)、(ii)AGCAAAATGTGCTAGTGCCAAA(配列番号：33)、(iii)AGTGTGAGTTCTACCAATTGCCAAA(配列番号：34)、および(iv)AGGGATTCTGGGAAACTGGAC(配列番号：35)から選択される。特定の実施形態では、2つ以上の連続したmiRNA標的配列は、連続しており、スペーサーによって分離されていない。特定の実施形態では、2つ以上のmiRNA標的配列は、スペーサーによって分離されており、各スペーサーは、独立して、(A)GGAT、(B)CACGTG、または(C)GCATGCのうちの1つ以上から選択される。特定の実施形態では、miRNA標的配列の間に位置するスペーサーは、第1のmiRNA標的配列の3'および/または最後のmiRNA標的配列の5'に位置し得る。特定の実施形態では、miRNA標的配列間のスペーサーは同じである。2018年12月21日に出願された米国仮特許出願第62/783,956号、および2020年2月12日に出願された国際特許出願第PCT/US19/67872号を参照されたい(これらは、参照により本明細書に援用される)。

#### 【0027】

AAV1

クレードF由来のAAVhu68は、CNS内でhPGRNを標的化および発現するベクターを生成するために使用することができる。しかしながら、AAV1媒介性PGRN送達は、同等の血漿中濃度が観察されたにもかかわらず、予想外に、AAVhu68よりもCNSにおける優れたPGRN発現を提供することが観察された。本発明者らは、rAAV1.PGRNの髄腔内送達が、本明細書に記載される療法のための魅力的な送達経路であることを発見した。したがって、特に望ましい実施形態では、AAV1カプシドが選択される。

#### 【0028】

特定の実施形態では、組成物が提供され、髄腔内注入に好適な水性液体と、上衣細胞を優先的に標的とするAAVカプシドを有するrAAVのストックとを含み、rAAVは、中枢神経系(CNS)への送達のためのPGRNコード配列を有するベクターゲノムをさらに含む。特定の実施形態では、組成物は、大槽への(大槽内)後頭下注入用に製剤化される。特定の実施形態では、rAAVは、コンピュータ断層撮影(CT)ガイドによるrAAV注入を介して投与される。特定の実施形態では、患者に、単回用量の組成物を投与する。

#### 【0029】

AAV1カプシドは、AAV vp1タンパク質、AAV vp2タンパク質、およびAAV vp3タンパク質を有するカプシドを指す。特定の実施形態では、AAV1カプシドは、約1:1:10の所定の比率のAAV vp1タンパク質、AAV vp2タンパク質、およびAAV vp3タンパク質で構成され、60個の総vpタンパク質のT1正二十面体カプシドに組み立てられる。AAV1カプシドは、ゲノム配列をパッケージングして、AAV粒子(例えば、ゲノムがベクターゲノムである組換えAAV)を形成することができる。典型的には、最も長いvpタンパク質(すなわち、VP1)をコードするカプシド核酸配列は、AAV1カプシドを有するrAAVの產生中にトランスで発現される。例えば、米国特許第6,759,237号、米国特許第7,105,345号、米国特許第7,186,552号、米国特許第8,637,255号、および米国特許第9,567,607号に記載されている(これらは、参照により本明細書に援用される)。

#### 【0030】

カプシドのコード配列は、最終的に組み立てられたrAAV1.hPGRNには存在しない。しかしながら、かかる配列は、組換えAAVの產生に利用される。特定の実施形態では、AAV1カプシドのコード配列は、配列番号26の全長AAV1 VP1タンパク質、またはそのVP2領域もしくはVP3領域をコードする任意の核酸配列である。例え

10

20

30

40

50

ば、米国特許第6,759,237号、米国特許第7,105,345号、米国特許第7,186,552号、米国特許第8,637,255号、および米国特許第9,567,607号を参照されたい（これらは、参照により本明細書に援用される）。特定の実施形態では、AAV1カプシドのコード配列は、配列番号25である。一部の実施形態では、AAV1カプシドは、翻訳後修飾を伴うかまたは伴わない配列番号25のコード配列から產生されるタンパク質である。しかしながら、このコード配列のバリエントは、操作され得、かつ／または他のコード配列は、AAV1 VP1、AAV1 VP2、および／またはAAV1 VP3のアミノ酸配列を使用して、所望の発現系のために逆翻訳され得る。

【0031】

特定の実施形態では、カプシドを有する組換えAAV1を含む組成物は、配列番号26に再現されるAAV1 VP1の一次配列の番号付けに基づいて、AAV1が、高度に脱アミド化された5つのアミノ酸（N57、N383、N512、およびN718）を含む。

【表1】

AAV1修飾								
酵素		トリプシン						
被覆度%	N+1	97.6	84.2	92.4	87.4	90.4	85.2	88.9
N35+脱アミド化	Q	9.5						
～N57+脱アミド化	G	100.0	100.0	100.0	92.0	89.3	86.1	85.5
～N94+脱アミド化	H				2.3	3.7	4.9	2.2
N113+脱アミド化	L		5.6					
～N214+脱アミド化	N				0.9	0.4	1.0	0.7
～N223+脱アミド化	A	21.4		25.9				
N227+脱アミド化	W	4.9		3.1				
～N253+脱アミド化	H		29.7					
Q259+脱アミド化	I	24.6		14.2				
～N269+脱アミド化	D			21.6			5.2	
～N271+脱アミド化	H	27.7						
N286+脱アミド化	R	5.4		5.2				
～N302+脱アミド化	<u>NNN</u>	43.7	48.6	18.8	12.4	28.7	16.3	11.9
～N303+脱アミド化	<u>NNN</u>		50.8	19.3				
～N383+脱アミド化	G	88.5	86.9	82.5	82.1	84.6	83.4	92.3
～N408+脱アミド化	N	58.2	43.2	40.5	30.1	25.7	28.3	22.8
～N451+脱アミド化	Q	20.5						
～Q452+脱アミド化	S	1.7						
N477+脱アミド化	W	4.4	3.1	39.7	1.2	1.3	1.1	1.8
～N496+脱アミド化	<u>NNN</u>	1.1		69.9				
N512+脱アミド化	G	93.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.3
N651+脱アミド化	T	2.0	2.1	1.6	0.6			
N691+脱アミド化	S			57.1				
～N704+脱アミド化	Y		9.4					
N718+脱アミド化	G	98.7	98.1	98.2	89.5	91.9	92.3	87.4

10

20

30

40

50

## 【0032】

特定の実施形態では、AAV1は、質量分析を使用して決定されたカプシド中のVPタンパク質の総量に基づいて、以下の表で定義されるように脱アミド化されたVPアイソフォームの異種集団のカプシド組成によって特徴付けられる。特定の実施形態では、AAVカプシドは、質量分析を使用して決定される、以下に提供される範囲で、以下の位置のうちの1つ以上で修飾される。残基番号は、配列番号26に再現される公開されたAAV1配列に基づく。

## 【表2】

表A	
VP1の番号付けに基づくAAV1カプシドの位置	%
N35+脱アミド化	1~15、5~10
~N57+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
N113+脱アミド化	0~8
~N223+脱アミド化	0~30、0、20~28
N227+脱アミド化	0、1~5
~N253+脱アミド化	0、1~35
Q259+脱アミド化	0、10~25
~N269+脱アミド化	0~25
~N271+脱アミド化	0~25
N286+脱アミド化	2~10
~N302+脱アミド化	10~50
~N303+脱アミド化	0~55
~N383+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~N408+脱アミド化	30~65
~N451+脱アミド化	0~25
~Q452+脱アミド化	0~5
N477+脱アミド化	0~45
~N496+脱アミド化	0~75
N512+脱アミド化	75~100、80~100、90~100
N651+脱アミド化	0~3
N691+脱アミド化	0、1~60
~N704+脱アミド化	0~10
N718+脱アミド化	75~100、80~100、90~100

## 【0033】

好適な修飾には、脱アミド化標識された上記段落に記載の修飾が含まれ、本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、以下の位置、またはNに続くグリシンのうちの1つ以上は、本明細書に記載されるように修飾される。特定の実施形態では、57位、383位、512位、および/または718位のNに続くグリシンが保存されている（すなわち、未修飾のままである）AAV1変異が構築される。特定の実施形態では、前文で示した4

10

20

30

40

50

つの位置の NG は、天然配列で保存される。残基番号は、配列番号 26 に再現される公開された AAV1 VP1 に基づく。特定の実施形態では、人工 NG は、上の表で特定される位置のうちの 1 つとは異なる位置に導入される。

【 0 0 3 4 】

r A A V ベクター

上述のように、AAV1 カプシドを有する組換え AAV は、FTD の治療のための本明細書に記載される好ましいベクターである。特定の実施形態では、例えば、以下の実施例では（例えば、AAVhu68 または AAV5）、他の AAV カプシドを使用して、r AAV が生成され得る。特定の実施形態では、AAV1 カプシドが選択され得、hPGRN のコード配列を含むベクターゲノムの要素のうちの 1 つ以上が置換され得る。

10

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用される場合、AAVhu68 カプシドは、WO 2018 / 160582 で定義されるカプシドを指す（参照により本明細書に援用される）。本明細書に記載されるように、rAAVhu68 は、rAAVhu68 カプシドを有し、配列番号 31 の vp1 アミノ酸配列をコードする AAVhu68 核酸配列（配列番号 30）、および任意選択的に、追加の核酸配列（例えば、vp1 および / または vp2 の固有領域を含まない vp3 タンパク質をコードする配列）からのカプシドを発現する産生システムで產生される。単一の核酸配列 vp1 を使用した産生から得られた rAAVhu68 は、vp1 タンパク質、vp2 タンパク質、および vp3 タンパク質の異種集団を产生する。AAVhu68 カプシドは、vp1 タンパク質内、vp2 タンパク質内、および vp3 タンパク質内に亜集団を含有し、配列番号 31 の予測されるアミノ酸残基からの修飾を有する。これらの亜集団は、少なくとも脱アミド化アスパラギン（N または Asn）残基が含まれる。例えば、アスパラギン - グリシン対中のアスパラギンは、高度に脱アミド化されている。一実施形態では、AAVhu68 vp1 核酸配列は、配列番号 30 の配列、またはそれに相補的な鎖、例えば、対応する mRNA もしくは tRNA を有する。特定の実施形態では、vp2 および / または vp3 タンパク質は、追加的または代替的に、例えば、選択された発現系において vp タンパク質の比を変化させるために、vp1 とは異なる核酸配列から発現され得る。特定の実施形態では、vp1 固有領域（約 aa1 ~ 約 aa137）および / または vp2 固有領域（約 aa1 ~ 約 aa202）を含まない配列番号 31 の AAVhu68 vp3 アミノ酸配列（約 aa203 ~ 736）もしくはそれに相補的な鎖、対応する mRNA もしくは tRNA（配列番号 30 の約 nt607 ~ 約 nt2211）をコードする核酸配列も提供される。特定の実施形態では、vp1 固有領域（約 aa1 ~ 約 137）を含まない配列番号 31 の AAVhu68 vp2 アミノ酸配列（約 aa138 ~ 736）またはそれに相補的な鎖、対応する mRNA もしくは tRNA（配列番号 30 の nt411 ~ 2211）をコードする核酸配列も提供される。

20

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される場合、AAV5 カプシドは、配列番号 29 の予測されたアミノ酸配列を有する。特定の実施形態では、AAV5 カプシドは、配列番号 28 の核酸配列から発現される。

30

【 0 0 3 7 】

AAV カプシドにパッケージングされ宿主細胞に送達されるゲノム配列は、典型的には、最低でもトランス遺伝子、およびその調節配列、および AAV 逆方向末端反復（ITR）から構成される。一本鎖 AAV および自己相補的（sc）AAV の両方が rAAV に含まれる。導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質、機能性 RNA 分子（例えば、miRNA、miRNA 阻害剤）、または他の遺伝子産物をコードするベクター配列とは異種の核酸コード配列である。核酸コード配列は、標的組織の細胞中で導入遺伝子の転写、翻訳、および / または発現を可能にする様式で調節要素に作動可能に連結される。

40

【 0 0 3 8 】

ベクターの AAV 配列は、典型的には、シス作用性 5' および 3' 逆位末端反復配列を含む（例えば、B. J. Carter, in "Handbook of Parvovirus

50

ses", ed., P. Tijsse, CRC Press, pp. 155 168 (1990) を参照されたい)。ITR配列は、約145bpの長さである。好ましくは、実質的にITRをコードする全体配列が分子内で使用されるが、これらの配列のある程度の軽微な修飾が許容される。これらのITR配列を修飾する能力は、当技術分野の範囲内である。(例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); and K. Fisher et al., J. Virol., 70: 520 532 (1996) を参照されたい)。本発明で利用されるかかる分子の一例は、選択された導入遺伝子配列および関連する調節要素が5'および3'AAV ITR配列に隣接する導入遺伝子を含む「シス作用性」プラスミドである。一実施形態では、ITRは、カプシドを供給するものとは異なるAAV由来である。一実施形態では、AAV2由来のITR配列である。D配列および末端分離部位(trs)が欠失している、ITRと称される5'ITRの短縮バージョンが記載されている。他の実施形態では、全長AAV 5'および3'ITRが使用される。しかしながら、他のAAV起源からのITRが選択されてもよい。ITRの起源がAAV2からであり、AAVカプシドが別のAAV起源からのものである場合、得られたベクターは、ショードタイプであると称され得る。しかし、これらの要素の他の構成も好適であり得る。

#### 【0039】

組換えAAVベクターについて上述した主要要素に加えて、ベクターは、プラスミドベクターでトランスフェクトされた、または本発明により産生されたウイルスに感染した細胞中でその転写、翻訳、および/または発現を可能にするような様式で導入遺伝子と作動可能に連結される必要な従来の制御要素も含む。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結される」配列は、目的の遺伝子と隣接する発現制御配列、および目的の遺伝子を制御するためにトランスでまたは離れて作用する発現制御配列の両方が含まれる。

#### 【0040】

調節制御要素は、典型的には、発現制御配列の一部として、例えば、選択される5'ITR配列とコード配列との間に位置するプロモーター配列を含む。構成的プロモーター、調節可能なプロモーター[例えば、WO 2011/126808およびWO 2013/04943を参照されたい]、組織特異的プロモーター、または生理学的ヒントに応答するプロモーターが、本明細書に記載されるベクターに使用され得る。プロモーターは、異なる供給源、例えば、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)最初期エンハンサー/プロモーター、SV40最初期エンハンサー/プロモーター、J Cポリモマウイルスプロモーター、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)または神経膠原線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーター、単純ヘルペスウイルス(HSV-1)潜伏関連プロモーター(LAP)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)長末端反復LTRプロモーター、ニューロン特異的プロモーター(NSE)、血小板由来成長因子(PDGF)プロモーター、hSYN、メラニン凝集ホルモン(MCH)プロモーター、CBA、マトリックス金属タンパク質プロモーター(MPP)、およびニワトリベータアクチンプロモーターから選択され得る。プロモーターに加えて、ベクターは、1つ以上の他の適切な転写開始、終結、エンハンサー配列、スプライシングおよびポリアデニル化(ポリA)シグナルなどの効率的なRNAプロセシングシグナル、細胞質mRNAを安定化させる配列、例えばWPRE、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増強する配列、および必要に応じて、コードされた産物の分泌を増強する配列を含み得る。好適なエンハンサーの例は、CMVエンハンサーである。他の適切なエンハンサーには、所望の標的組織適応症に適切なものが含まれる。一実施形態では、発現カセットは、1つ以上の発現エンハンサーを含む。一実施形態では、発現カセットは、2つ以上の発現エンハンサーを含む。これらのエンハンサーは同じであっても、互いに異なっていてもよい。例えば、エンハンサーは、CMV前初期エンハンサーを含み得る。このエンハンサーは、互いに隣接して位置する2つのコピーに存在し得る。代替的には、エンハンサーの二重コピーは、1つ

10

20

30

40

50

以上の配列によって分断される。さらに別の実施形態では、発現力セットは、イントロン、例えば、ニワトリベータアクチンイントロンをさらに含む。他の好適なイントロンとしては、当該技術分野で既知のものが含まれ、例えば、国際公開第WO 2011/126808号に記載されている。好適なポリA配列の例には、例えば、SV40、SV50、ウシ成長ホルモン(bGH)、ヒト成長ホルモン、および合成ポリAが含まれる。任意選択的に、1つ以上の配列を選択して、mRNAを安定化させ得る。かかる配列の一例は、修飾WPRE配列であり、これは、ポリA配列の上流およびコード配列の下流で操作され得る(例えば、MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619を参照されたい)。

#### 【0041】

一実施形態では、ベクターゲノムは、AAV 5'ITR、プロモーター、任意選択的なエンハンサー、任意選択的なイントロン、ヒトPGRNのコード配列、またはそれらを含む融合タンパク質、ポリA、およびAAV 3'ITRを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV 5'ITR、プロモーター、任意選択的なエンハンサー、任意選択的なイントロン、ヒトPGRNのコード配列、またはそれらを含む融合タンパク質、ポリA、およびAAV 3'ITRを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV 5'ITR、プロモーター、任意選択的なエンハンサー、任意選択的なイントロン、hUPGRNコード配列、ポリA、およびAAV 3'ITRを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5'ITR、EF1aプロモーター、任意選択的なエンハンサー、任意選択的なプロモーター、hUPGRN、SV40ポリA、およびAAV2 3'ITRを含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5'ITR、UbCプロモーター、任意選択的なエンハンサー、任意選択的なイントロン、hUPGRN、SV40ポリA、およびAAV2 3'ITRである。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5'ITR、CB7プロモーター、イントロン、hUPGRN、SV40ポリA、およびAAV2 3'ITRである。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5'ITR、CB7プロモーター、イントロン、hUPGRN、ウサギグロビンポリA、およびAAV2 3'ITRである。例えば、配列番号22(EF1a.hUPGRN.SV40)、配列番号23(UbC.PI.hUPGRN.SV40)、または配列番号24(CB7.CI.hPGRN1.rGB)を参照されたい。hUPGRNのコード配列は、本明細書で定義される配列から選択される。例えば、配列番号3もしくはそれと95%~99.9%同一の配列、または配列番号4もしくはそれと95%~99.9%同一の配列、あるいは本明細書に定義されるその断片を参照されたい。以下の実施例で使用されるベクターエレメントの例示的な配列は、例えば、配列番号6(ウサギグロビンポリA)、AAV ITR(配列番号7および8)、ヒトCMV IEプロモーター(配列番号9)、CBプロモーター(配列番号10)、キメライントロン(配列番号11)、UbCプロモーター(配列番号12)、EF-1aプロモーター(配列番号17)、イントロン(配列番号13)、およびSV40後期ポリA(配列番号14)で提供される。ベクターゲノムの他の要素またはこれらの配列上のバリエーションは、本発明の特定の実施形態について、ベクターゲノムに対して選択され得る。

#### 【0042】

##### ベクター產生

AAVウイルスベクター(例えば、組換え(r)AAV)の產生における使用のために、発現力セットは、パッケージング宿主細胞に送達される任意の好適なベクター、例えば、プラスミド上に担持され得る。本発明において有用なプラスミドは、とりわけ、原核細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞におけるインビトロでの複製およびパッケージングに適しているように操作され得る。好適なトランスフェクション技術およびパッケージ宿主細胞は、既知であり、かつ/または当業者によって容易に設計することができる。

#### 【0043】

ベクターとしての使用に好適なAAVを生成および単離するための方法は、当該技術分野において既知である。一般に、例えば、Grieger & Samulski, 2005

10

20

30

40

50

, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119 - 145, Buning et al., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10: 717 - 733、および以下に引用される参考文献を参照されたい(これら  
の各々は、その全体が参考により本明細書に援用される)。導入遺伝子をビリオンにパッケージするために、ITRは、発現力セットを含む核酸分子と同じ構築物中でシスに必要とされる唯一のAAV成分である。capおよびrep遺伝子は、トランスで供給され得る。

#### 【0044】

一実施形態では、本明細書に記載される発現力セットは、ウイルスベクターを產生するために、その上に運ばれる免疫グロブリン構築物配列をパッケージング宿主細胞に導入する遺伝要素(例えば、シャトルプラスミド)に操作される。一実施形態では、選択される遺伝子要素は、トранスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染、およびプロトプラスト融合を含む任意の好適な方法によってAAVパッケージ細胞に送達され得る。安定したAAVパッケージ細胞も作製することができる。代替的には、発現力セットは、AAV以外のウイルスベクターを生成するために、またはインビトロでの抗体の混合物の產生のために使用され得る。かかる構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作における技術者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、および合成技術を含む。例えば、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)を参照されたい。

#### 【0045】

用語「AAV中間体」または「AAVベクター中間体」は、それにパッケージされた所望のゲノム配列を欠失している組み立てられたrAAVカプシドを指す。これらは、「空の」カプシドと称され得る。かかるカプシドは、発現力セットの検出可能なゲノム配列を含んでいなくてもよく、または遺伝子産物の発現を達成するには不十分な部分的にパッケージングされたゲノム配列のみを含んでいてもよい。これらの空のカプシドは、宿主細胞に目的の遺伝子を導入するために非機能的である。

#### 【0046】

本明細書に記載の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)は、既知の技法を使用して產生されてもよい。例えば、WO 2003/042397; WO 2005/033321、WO 2006/110689、US 7588772 B2を参照されたい。かかる方法は、AAVカプシドタンパク質をコードする核酸配列、機能的rep遺伝子、最低限でもAAV逆方向末端反復(ITR)および導入遺伝子からなる発現力セット、ならびに発現力セットをAAVカプシドタンパク質にパッケージングするのを許可する十分なヘルパー機能を含む宿主細胞を培養することを含む。カプシドを產生する方法、そのためのコード配列、およびrAAVウイルスベクターを產生するための方法が記載されている。例えば、Gao, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (10), 6081 - 6086 (2003)およびUS 2013/0045186 A1を参照されたい。

#### 【0047】

一実施形態では、組換えAAVを產生するために有用な產生細胞培養物が提供される。かかる細胞培養物は、宿主細胞中でAAVカプシドタンパク質を発現する核酸、AAVカプシド中にパッケージするのに好適な核酸分子、例えば、AAV-ITRを含むベクターゲノム、および宿主細胞中の産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される遺伝子産物をコードする非AAV核酸配列、ならびに組換えAAVカプシドへの核酸分子のパッケ

10

20

30

40

50

ージングを可能にするのに十分な A A V r e p 機能およびアデノウイルスヘルパー機能を含む。一実施形態では、細胞培養物は、哺乳動物細胞（例えば、とりわけヒト胚性腎臓 293 細胞）または昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス）で構成される。

【 0 0 4 8 】

典型的には、r e p 機能は、ベクターゲノムに隣接する I T R を提供する A A V と同じ A A V ソースに由来する。本明細書の実施例では、A A V 2 I T R を選択し、A A V 2 r e p を使用する。コード配列は、配列番号 27 に再現される。任意選択的に、他の r e p 配列または別の r e p ソース（および任意選択的に別の I T R ソース）が選択されてもよい。例えば、r e p は、これらに限定されないが、A A V 1 r e p タンパク質、A A V 2 r e p タンパク質、または r e p 78、r e p 68、r e p 52、r e p 40、r e p 68 / 78、および r e p 40 / 52、もしくはそれらの断片であり得る。任意で、r e p および c a p 配列は、細胞培養物中の同じ遺伝子要素上にある。r e p 配列と c a p 遺伝子との間にスペーサーが存在し得る。これらの A A V または変異 A A V カプシド配列のいずれかは、宿主細胞中でそれらの発現を指示する外因性制御性調節配列の調節下にあり得る。

【 0 0 4 9 】

一実施形態では、細胞は、適切な細胞培養（例えば、H E K 293）細胞において製造される。本明細書に記載される遺伝子療法ベクターを製造するための方法は、当該分野においてよく知られている方法、例えば、遺伝子療法ベクターの產生のために使用されるプラスミド D N A の產生、ベクターの產生、およびベクターの精製を含む。一部の実施形態では、遺伝子療法ベクターは、A A V ベクターであり、生成されたプラスミドは、A A V ゲノムおよび目的の遺伝子をコードする A A V のシス - プラスミド、A A V r e p および c a p 遺伝子を含む A A V のトランス - プラスミド、ならびにアデノウイルスのヘルパー - プラスミドである。ベクター生成プロセスは、細胞培養の開始、細胞の継代、細胞の播種、プラスミド D N A による細胞のトランスフェクション、トランスフェクション後の無血清培地への培地交換、ベクターを含む細胞および培養培地の回収などの方法ステップを含み得る。

【 0 0 5 0 】

特定の実施形態では、r A A V . h P G R N の製造プロセスは、プラスミド D N A による H E K 293 細胞の一過性トランスフェクションを伴う。単一バッチまたは複数バッチは、P A L L i C E L L i s バイオリアクターで、H E K 293 細胞の P E I 媒介性三重トランスフェクションによって產生される。回収した A A V 材料は、可能な場合、使い捨ての閉鎖型バイオプロセッシングシステムにおいて、清澄化、T F F 、アフィニティクロマトグラフィ、およびアニオン交換クロマトグラフィによって順次精製される。

【 0 0 5 1 】

回収されたベクターを含む細胞および培養培地は、本明細書では、粗細胞回収物と称される。さらに別のシステムでは、遺伝子治療ベクターは、バキュロウイルスベースベクターによる感染によって昆虫細胞に導入される。これらの产生システムに関するレビューについては、概して、例えば、Zhang et al. , 2009, "Adenovirus - adeno - associated virus hybrid for large - scale recombinant adeno - associated virus production," Human Gene Therapy 20 : 922 - 929 を参照されたい（各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に援用される）。これらおよび他の A A V 生産システムの製造および使用方法は、以下の米国特許にも記載され、それらの内容は参照によりその全体が本明細書に援用される：5,139,941、5,741,683、6,057,152、6,204,059、6,268,213、6,491,907、6,660,514、6,951,753、7,094,604、7,172,893、7,201,898、7,229,823、および 7,439,065（これらは、参照により本明細書に援用される）。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

粗細胞回収物は、その後、ベクター回収物の濃縮、ベクター回収物の透析濾過、ベクター回収物の顕微溶液化、ベクター回収物のヌクレアーゼ消化、顕微溶液化された中間体の濾過、クロマトグラフィによる粗精製、超遠心分離による粗精製、接線流濾過による緩衝液交換、および／またはバルクベクターを調製するための製剤化および濾過などの、追加の方法ステップに供される。

#### 【0053】

2工程の高塩濃度でのアフィニティクロマトグラフィ精製、続いて、アニオン交換樹脂クロマトグラフィを用いて、ベクター薬物製品を精製し、空のカプシドを除去する。これらの方法は、2016年12月9日に出願された国際特許出願第PCT/US2016/065970号にさらに詳細に記載されている（これは、参照により本明細書に援用される）。AAV8の精製方法：2016年12月9日に出願された国際特許出願第PCT/US2016/065976号、およびrh10の精製方法：2016年12月9日に出願され、「Scalable Purification Method for AAV rh10」と題する国際特許出願第PCT/US16/66013号（2015年12月11日にも出願されている）、ならびにAAV1の精製方法：2016年12月9日に出願された国際特許出願第PCT/US2016/065974号、2015年12月11日に出願された「Scalable Purification Method for AAV1」は、すべて参照により本明細書に援用される。

10

#### 【0054】

空および充填粒子の含有量を算出するために、選択された試料（例えば、本明細書の実施例では、イオジキサノール勾配で精製された調製物、ここで、GCの数=粒子の数）についてのVP3バンド容量が、ロードされたGC粒子に対してプロットされる。得られた線型方程式（ $y = mx + c$ ）を用いて、試験物ピークのバンド容量中の粒子の数を算出する。次いで、ロードした20 μLあたりの粒子の数（pt）に50を掛けて、粒子（pt）/mLを得る。Pt/mLをGC/mLで除算して、ゲノムコピーに対する粒子の比（pt/GC）を得る。Pt/mL～GC/mLは、空pt/mLを与える。空pt/mLをpt/mLで割って、次いで100を掛けることによって、空粒子のパーセンテージを得る。

20

#### 【0055】

一般に、空のカプシドおよびパッケージされたゲノムを含むAAVベクター粒子をアッセイするための方法は、当該分野において既知である。例えば、Grimm et al., Gene Therapy (1999) 6:1322-1330, Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7:122-128を参照されたい。変性したカプシドについて試験するために、本方法は、3つのカプシドタンパク質を分離することができる任意のゲル（例えば、緩衝液中に3～8%のTris-アセテートを含む勾配ゲル）からなるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に処理済みAAVストックを供し、次いで、試料材料が分離するまでゲルを泳動し、ナイロンまたはニトロセルロースの膜（好ましくは、ナイロン）にゲルをプロットすることを含む。抗AAVカプシド抗体は、次いで、変性したカプシドタンパク質に結合する一次抗体、好ましくは、抗AAVカプシドモノクローナル抗体、最も好ましくは、B1抗AAV-2モノクローナル抗体として使用される（Wobus et al., J. Virol. (2000) 74:9281-9293）。次いで、一次抗体に結合し、一次抗体、より好ましくは、抗体に共有結合した検出分子を含有する抗-IgG抗体、最も好ましくは、西洋ワサビペルオキシダーゼに共有結合したヒツジ抗マウスIgG抗体との結合を検出するための手段を含む、二次抗体が使用される。一次抗体と二次抗体との間の結合を半定量的に決定するために、結合を検出するための方法が使用され、好ましくは、放射性アイソトープ放射、電磁放射、または比色変化を検出することができる検出方法、最も好ましくは、化学発光検出キットが使用される。例えば、SDS-PAGEでは、カラムフラクションからの試料を取って、還元剤（例えば、DTT）を含有するSDS-PAGE充填緩衝液中で加熱することができ、カプシドタンパク質は、プレキャスト勾配ポリアクリルアミドゲル（例えば、Nov

30

40

50

ex) 中で分解された。Silver Xpress (Invitrogen, CA) を製造元の指示に従って用いて、銀染色を実施してもよく、または他の適切な染色方法、すなわち、SYPRO ルビーもしくはクーマシー染色を実施してもよい。一実施形態では、カラムフラクション中のAAVベクターゲノム (vg) の濃度は、定量的リアルタイムPCR (Q-PCR) により測定することができる。試料は希釈され、DNase I (または別の適切なヌクレアーゼ) で消化されて、外因性DNAが除去される。ヌクレアーゼの不活化後、試料はさらに希釈され、プライマーおよびプライマー間のDNA配列に特異的なTaqMan (商標) 蛍光発生プローブを用いて増幅される。規定レベルの蛍光 (閾値サイクル、Ct) に到達するのに必要とされるサイクル数は、Applied Biosystems Prism 7700配列検出システム上で各試料について測定される。AAVベクター中に含有されるものと同一の配列を含有するプラスミドDNAを利用して、Q-PCR反応における標準曲線を作成する。試料から得られたサイクル閾値 (Ct) 値を用いて、プラスミド標準曲線のCt値に対してそれを正規化することにより、ベクターゲノム力値を決定した。デジタルPCRに基づくエンドポイントアッセイも使用されることができる。

#### 【0056】

一態様では、広域スペクトルのセリンプロテアーゼ、例えば、プロテイナーゼK (例えば、Qiaqenから商業的に入手可能なものの) を利用する最適化されたq-PCR方法が使用される。より具体的には、最適化されたqPCRゲノム力値アッセイは、DNase I消化の後に、試料をプロテアーゼK緩衝液で希釈し、プロテアーゼKで処理し、続いて、熱失活させることを除き、標準的なアッセイと同様である。適切には、試料は、試料サイズと等しい量のプロテアーゼK緩衝液で希釈される。プロテアーゼK緩衝液は、2倍以上に濃縮され得る。典型的には、プロテアーゼK処理は、約0.2mg/mLであるが、0.1mg/mL～約1mg/mLで変動し得る。処理ステップは、一般に、約55で約15分間実施されるが、より低い温度で (例えば、約37～約50) より長い時間にわたって (例えば、約20分間～約30分間) 、またはより高い温度で (例えば、最高約60) より短い時間にわたって (例えば、約5～10分間) 実施されてもよい。同様に、熱失活は、一般に、約95で約15分間であるが、温度を下げてもよく (例えば、約70～約90) 、時間を延ばしてもよい (例えば、約20分間～約30分間)。次いで、試料は希釈され (例えば、1000倍) 、標準的なアッセイで記載されるように、TaqMan分析に供される。

#### 【0057】

追加的に、または代替的に、ドロップレットデジタルPCR (ddPCR) が使用されてもよい。例えば、ddPCRによる一本鎖および自己相補的なAAVベクターゲノム力値を測定するための方法が記載されている。例えば、M. Lock et al., *Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr; 25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14を参照されたい。

#### 【0058】

簡潔に言うと、パッケージされたゲノム配列を有するrAAV粒子をゲノム欠損AAV中間体から分離するための方法は、組換えAAVウイルス粒子およびAAVカプシド中間体を含む懸濁液を高性能液体クロマトグラフィに供することを含み、AAVウイルス粒子およびAAV中間体は、高pHで平衡化された強力アニオン交換樹脂に結合され、約260および約280で紫外吸光度のために溶出液をモニタリングしながら、塩勾配に供される。pHは、選択されたAAVに応じて調整され得る。例えば、WO2017/160360 (AAV9)、WO2017/100704 (AAVrh10)、WO2017/100676 (AAV8)、およびWO2017/100674 (AAV1) を参照されたい (これらは、参照により本明細書に援用される)。この方法では、AAV完全カプシドは、A260/A280の比が感染ポイントに到達した場合に溶出するフラクションから回収される。一実施例では、アフィニティクロマトグラフィステップのために、

10

20

30

40

50

透析濾過された産物を、AAV2血清型を効率的に捕捉するCapture Select（商標）Poros-AAV2/9アフィニティ樹脂（Life Technologies）に適用してもよい。これらのイオン条件下、残留細胞DNAおよびタンパク質の有意なパーセンテージは、カラムの中を流れ、AAV粒子は効率的に捕捉する。

#### 【0059】

##### 組成物

本明細書では、少なくとも1つのrAAV.hPGRNストック（例えば、rAAVストック）、および任意選択的な担体、賦形剤および/または防腐剤を含む組成物が提供される。rAAVストックは、同じである複数のrAAVベクターを指し、例えば、濃度および用量単位の考察において以下に記載される量である。

10

#### 【0060】

特定の実施形態では、組成物は、プログラニュリン関連前頭側頭型認知症（FTD）を治療する際の使用に好適な組換えAAV（rAAV）であるウイルスストックを含み、当該rAAVは、（a）アデノ随伴ウイルス1カプシドと、（b）AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、当該ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復、ヒトプログラニュリンのコード配列、およびプログラニュリンの発現を指示する調節配列を含む、ベクターゲノムと、を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、プロモーター、エンハンサー、イントロン、ヒトPGRNのコード配列、およびポリアデニル化シグナルを含む。特定の実施形態では、イントロンは、ニワトリベータアクチヌスプライスドナーおよびウサギスプライスアクセプターのエレメントからなる。特定の実施形態では、ベクターゲノムは、AAV2 5'ITRおよびAAV2 3'ITRをさらに含み、これらは、ベクターゲノムのすべてのエレメントに隣接する。

20

#### 【0061】

rAAV.hPGRNは、好ましくは生理学的に適合する担体に懸濁され、ヒト患者または非ヒト哺乳動物患者に投与され得る。特定の実施形態では、ヒト患者への投与のために、rAAVは、食塩水、界面活性剤、および生理学的に適合性のある塩、または塩の混合物を含有する水性溶液中に好適に懸濁される。好適には、製剤は、生理学的に許容されるpH、例えば、pH 6~9、またはpH 6.5~7.5、pH 7.0~7.7、またはpH 7.2~7.8の範囲に調整される。脳脊髄液のpHは、約7.28~約7.32、または髄腔内送達の場合、約7.2~約7.4であるので、この範囲内のpHが望ましいが、静脈内送達の場合、約6.8~約7.2のpHが望ましい場合がある。しかし、最も広い範囲内の他のpH、およびこれらの部分範囲が、他の送達経路のために選択されてもよい。

30

#### 【0062】

特定の実施形態では、製剤は、重炭酸ナトリウムを含まない緩衝生理食塩水溶液を含有し得る。かかる製剤は、ハーバード緩衝液などの緩衝生理食塩水溶液を含有してもよく、水中に、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、およびそれらの混合物のうちの1つ以上を含む。水溶液は、ポロキサマーであるKolliphor（登録商標）P188をさらに含んでもよく、これは、BASFから市販され、以前、Lutrol（登録商標）F68という商品名で販売されていた。水溶液は、7.2のpHまたは7.4のpHを有し得る。

40

#### 【0063】

別の実施形態では、製剤は、緩衝生理食塩水溶液を含み得、1mMのリン酸ナトリウム（Na3PO4）、150mMの塩化ナトリウム（NaCl）、3mMの塩化カリウム（KCl）、1.4mMの塩化カルシウム（CaCl2）、0.8mMの塩化マグネシウム（MgCl2）、および0.001%のKolliphor（登録商標）188が含まれる。例えば、harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.htmlを参照されたい。特定の実施形態では、ハーバード緩衝液が好ましい。

#### 【0064】

50

他の実施形態では、製剤は、1つ以上の透過促進剤を含んでもよい。好適な透過促進剤の例としては、例えば、マンニトール、グリココール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、カプリル酸ナトリウム、カプリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、またはEDTAを含んでもよい。

#### 【0065】

別の実施形態では、組成物は、担体、希釈剤、賦形剤および/またはアジュバントを含む。好適な担体は、導入ウイルスが向けられる適応症を考慮して、当業者により容易に選択され得る。例えば、1つの好適な担体は、生理食塩水を含み、様々な緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝食塩水）と共に製剤化され得る。他の例示的な担体としては、滅菌生理食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油、および水が含まれる。緩衝液/担体は、rAAVが注入チューブに付着するのを防ぐが、インピボでrAAV結合活性を妨げない成分を含むべきである。

10

#### 【0066】

任意選択的に、組成物は、rAAVおよび担体に加えて、防腐剤または化学安定剤などの他の従来の医薬成分を含み得る。好適な例示的な防腐剤としては、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、およびパラクロロフェノールが含まれる。好適な化学安定剤としては、ゼラチンおよびアルブミンが含まれる。

20

#### 【0067】

本明細書で使用される場合、「担体」は、任意のおよびすべての溶媒、分散媒体、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイドなどを含む。薬学的活性物質に対するかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。補足有効成分を組成物中に組み込むこともできる。「薬学的に許容される」という語句は、宿主に投与されるときにアレルギーまたは類似の有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。リポソーム、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞などの送達ビヒクルが、本発明の組成物を好適な宿主細胞に導入するために使用され得る。詳細には、rAAVベクター送達導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフィア、またはナノ粒子などに封入化された送達のいずれかのために製剤化され得る。

30

#### 【0068】

一実施形態では、組成物は、対象への送達に適した最終製剤を含み、例えば、生理的に適合するpHおよび塩濃度に緩衝される水性液体懸濁液である。任意で、1つ以上の界面活性剤が製剤中に存在する。別の実施形態では、組成物は、対象への投与のために希釈される濃縮物として輸送され得る。他の実施形態では、組成物は、投与時に凍結乾燥され、再構成され得る。

#### 【0069】

好適な界面活性剤または界面活性剤の組み合わせが、非毒性である非イオン界面活性剤の中から選択されてもよい。一実施形態では、例えば、中性pHを有し、平均分子量8400を有するポロキサマー-188としても知られているPluronnic F68 [BASF]などの、一級ヒドロキシル基末端の二機能的ブロックコポリマー界面活性剤が選択される。他の界面活性剤および他のポロキサマー、すなわち、ポリオキシエチレン（ポリ（エチレンオキシド））の2つの親水性鎖に隣接するポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中心疎水性鎖からなる非イオン性トリブロックコポリマー、SOLUTOL HS15（マクロゴール-15ヒドロキシステアレート）、LA BRASOL（ポリオキシカプリル酸グリセリド）、ポリオキシ10オレイルエーテル、TWEEN（ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル）、エタノール、およびポリエチレングリコールが選択され得る。一実施形態では、製剤は、ポロキサマーを含有する。これらのコポリマーは一般に、文字「P」（ポロキサマーについて）に続いて、3桁数

40

50

字を用いて命名され、初めの 2 桁数字  $\times 10^0$  は、ポリオキシプロピレンコアのおおよその分子質量を与えるものであり、最後の数字  $\times 10$  は、ポリオキシエチレン含有量のパーセンテージを与えるものである。一実施形態では、ポロキサマー 188 が選択される。界面活性剤は、懸濁液の最高約 0.0005% ~ 約 0.001% の量で存在してもよい。

#### 【0070】

ベクターは、細胞をトランスフェクトするのに十分な量で投与され、十分なレベルの遺伝子導入および発現を提供して、過度の悪影響なしに、または医学的に許容される生理学的効果を伴う治療効果を提供し、これは当業者によって決定され得る。任意選択的に、髄腔内投与以外の経路、例えば、所望の臓器（例えば、肝臓（任意選択的に肝動脈を介して）、肺、心臓、眼、腎臓）への直接送達、経口、吸入、鼻腔内、気管内、動脈内、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、および他の親の投与経路などを使用することができる。投与経路は、所望される場合、組み合わされてもよい。

#### 【0071】

ウイルスベクターの用量は、主に、治療される状態、患者の年齢、体重、および健康状態などの要因に依存し、したがって、患者間で異なり得る。例えば、ウイルスベクターの治療上有効なヒト投薬量は、概して、約 25 ~ 約 1000 マイクロリットル ~ 約 100 mL の範囲の、（体重が 70 kg の平均的な対象を治療するために）約  $1 \times 10^9$  ~  $1 \times 10^{16}$  ゲノムウイルスベクターの濃度（その範囲内のすべての整数または分数量を含み、好みしくは、ヒト患者に対して、 $1.0 \times 10^{12}$  GC ~  $1.0 \times 10^{14}$  GC）を含む溶液である。一実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも  $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、または  $9 \times 10^9$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも  $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、または  $9 \times 10^{10}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも  $1 \times 10^{11}$ 、 $2 \times 10^{11}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 、 $4 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$ 、 $7 \times 10^{11}$ 、 $8 \times 10^{11}$ 、または  $9 \times 10^{11}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも  $1 \times 10^{12}$ 、 $2 \times 10^{12}$ 、 $3 \times 10^{12}$ 、 $4 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、または  $9 \times 10^{12}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも  $1 \times 10^{13}$ 、 $2 \times 10^{13}$ 、 $3 \times 10^{13}$ 、 $4 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{13}$ 、 $6 \times 10^{13}$ 、 $7 \times 10^{13}$ 、 $8 \times 10^{13}$ 、または  $9 \times 10^{13}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも  $1 \times 10^{14}$ 、 $2 \times 10^{14}$ 、 $3 \times 10^{14}$ 、 $4 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^{14}$ 、 $6 \times 10^{14}$ 、 $7 \times 10^{14}$ 、 $8 \times 10^{14}$ 、または  $9 \times 10^{14}$  GC を含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも  $1 \times 10^{15}$ 、 $2 \times 10^{15}$ 、 $3 \times 10^{15}$ 、 $4 \times 10^{15}$ 、 $5 \times 10^{15}$ 、 $6 \times 10^{15}$ 、 $7 \times 10^{15}$ 、 $8 \times 10^{15}$ 、または  $9 \times 10^{15}$  GC を含むように製剤化される。一実施形態では、ヒト適用のために、用量は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり  $1 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{12}$  GC の範囲であり得る。

#### 【0072】

特定の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^9$  GC / g 脳質量 ~ 約  $1 \times 10^{12}$  GC / g 脳質量の範囲である。特定の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量 ~ 約  $3.3 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量の範囲である。特定の実施形態では、用量は、約  $3.3 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量 ~ 約  $1.1 \times 10^{12}$  GC / g 脳質量の範囲である。特定の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^{12}$  GC / g 脳質量 ~ 約  $3.3 \times 10^{13}$  GC / g 脳質量の範囲である。特定の実施形態では、用量は、 $3.3 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量よりも低い。特定の実施形態では、用量は、 $1.1 \times 10^{12}$  GC / g 脳質量よりも低い。特

10

20

30

40

50

定の実施形態では、用量は、 $3.33 \times 10^{13}$  GC / g 脳質量よりも低い。

【0073】

特定の実施形態では、用量は、約 $1 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $2 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $2 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $3 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $4 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $5 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $6 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $7 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $8 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $9 \times 10^{10}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $1 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $2 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $3 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量である。特定の実施形態では、用量は、約 $4 \times 10^{11}$  GC / g 脳質量である。

10

【0074】

特定の実施形態では、用量は、rAAV の約 $1.44 \times 10^{13} \sim 4.33 \times 10^{14}$  GC の範囲の均一用量として、ヒトに投与される。特定の実施形態では、用量は、rAAV の約 $1.44 \times 10^{13} \sim 2 \times 10^{14}$  GC の範囲の均一用量として、ヒトに投与される。特定の実施形態では、用量は、rAAV の約 $3 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$  GC の範囲の均一用量として、ヒトに投与される。特定の実施形態では、用量は、rAAV の約 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$  GC の範囲の均一用量として、ヒトに投与される。

20

【0075】

一部の実施形態では、組成物は、投薬量単位で製剤化され、rAAV の約 $1 \times 10^{13} \sim 8 \times 10^{14}$  GC の範囲にある量のAAVを含み得る。一部の実施形態では、組成物は、投薬量単位で製剤化され、rAAV の約 $1.44 \times 10^{13} \sim 4.33 \times 10^{14}$  GC の範囲にある量のrAAVを含み得る。一部の実施形態では、組成物は、投薬量単位で製剤化され、rAAV の約 $3 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$  GC の範囲にある量のrAAVを含み得る。一部の実施形態では、組成物は、投薬量単位で製剤化され、rAAV の約 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$  GC の範囲にある量のrAAVを含み得る。

【0076】

30

特定の実施形態では、rAAV は、単回用量で対象に投与される。特定の実施形態では、複数回の用量（例えば、2用量）が所望される。

【0077】

任意の副作用に対する治療的利益のバランスをとるために、投薬量を調整してもよく、そのような投薬量は、組換えベクターが利用されるための治療用途に応じて変化し得る。導入遺伝子の発現レベルをモニタリングして、ウイルスベクター、好ましくはミニ遺伝子を含有するAAVベクターをもたらす投薬頻度を決定することができる。任意で、治療目的で記載されるものと同様の投薬レジメンは、本発明の組成物を使用した免疫に利用され得る。

【0078】

40

本明細書で使用される場合、用語「髄腔内送達」または「髄腔内投与」は、脊柱管への注入を介する、より具体的には、脳脊髄液(CSF)へ到達するようにクモ膜下腔への注入による、薬物の投与経路を指す。髄腔内送達は、腰部穿刺、脳室内（側脳室内(IVC)を含む）、後頭下/槽内、および/またはC1-2穿刺を含み得る。例えば、材料は、腰部穿刺により、クモ膜下腔空間にわたって拡散させるために導入され得る。別の実施例では、注入は、大槽内であってもよく、または実質内送達を介してもよい。特定の実施形態では、rAAVは、コンピュータ断層撮影(CT)ガイドによる大槽への(大槽内)後頭下注入を介して投与される。特定の実施形態では、患者は、単回用量で投与される。

【0079】

本明細書で使用される場合、用語「大槽内送達」または「大槽内投与」は、小脳延髄大

50

槽の脳脊髄液への直接的な薬物の投与経路、より具体的には、後頭下穿刺による、もしくは大槽内への直接注入による、または永続的に配置されたチューブによる、薬物の投与経路を指す。

#### 【 0 0 8 0 】

特定の実施形態では、r A A V . h P G R N のストックは、髄腔内最終製剤緩衝液 ( I T F F B ; 0 . 0 0 1 % の P l u r o n i c F - 6 8 を含む人工 C S F ) 中に製剤化される。バッチを凍結し、その後解凍し、必要に応じてプールし、標的濃度に調整し、0 . 2 2  $\mu$  m フィルターを通して滅菌濾過し、バイアルを充填する。特定の実施形態では、r A A V 1 . h P G R N の製剤緩衝液を含む懸濁液は、p H 7 . 2 ~ 7 . 4 に調整される。

#### 【 0 0 8 1 】

一実施形態では、本明細書で提供されるr A A V 1 . h P G R N の用量の送達のための容量は、当業者により決定され得る。例えば、約 1  $\mu$  L ~ 1 5 0 m L の容量が選択されてもよく、成人用に、より高容量が選択されてもよい。典型的には、新生児用の好適な容量は、約 0 . 5 m L ~ 約 1 0 m L 、より年長の乳児のために、約 0 . 5 m L ~ 約 1 5 m L が選択されてもよい。幼児のためには、約 0 . 5 m L ~ 約 2 0 m L の容量が選択されてもよい。小児用に、最高約 3 0 m L の容量が選択されてもよい。プレティーンおよびティーン世代のためには、最高約 5 0 m L の容量が選択されてもよい。さらに他の実施形態では、患者は、選択された約 5 m L ~ 約 1 5 m L 、または約 7 . 5 m L ~ 約 1 0 m L の容量で、髄腔内投与を受けることができる。他の好適な容量および投薬量が決定されてもよい。任意の副作用に対する治療的利益のバランスをとるために、投薬量を調整してもよく、そのような投薬量は、組換えベクターが利用されるための治療用途に応じて変化し得る。

#### 【 0 0 8 2 】

特定の実施形態では、組成物は、r A A V . E F 1 a . h u P G R N . S V 4 0 、 r A A V . U b C . P I . h u P G R N . S V 4 0 、または r A A V C B 7 . C I . h P G R N 1 . r G B を含む。r A A V カプシドが A A V h u 6 8 、 A A V 5 、または A A V 1 である組成物は、以下の実施例に例示される。特に好ましい実施形態では、r A A V は、 A A V 1 である。特定の実施形態では、h u P G R N のコード配列は、本明細書で定義される配列から選択される。例えば、配列番号 3 もしくはそれと 9 5 % ~ 9 9 . 9 % 同一の配列、または配列番号 4 もしくはそれと 9 5 % ~ 9 9 . 9 % 同一の配列、あるいは本明細書に定義されるその断片を参照されたい。以下の実施例で使用されるベクターエレメントの例示的な配列は、例えば、配列番号 6 ( ウサギグロビンポリ A ) 、 A A V I T R ( 配列番号 7 および 8 ) 、ヒト C M V I E プロモーター ( 配列番号 9 ) 、 C B プロモーター ( 配列番号 1 0 ) 、キメライントロン ( 配列番号 1 1 ) 、 U b C プロモーター ( 配列番号 1 2 ) 、 E F - 1 a プロモーター ( 配列番号 1 7 ) 、イントロン ( 配列番号 1 3 ) 、および S V 4 0 後期ポリ A ( 配列番号 1 4 ) で提供される。

#### 【 0 0 8 3 】

##### 使用

本明細書で使用される場合、P G R N ハプロ不全は、欠乏した P G R N および / または G R N のレベルをもたらす、P G R N 遺伝子の変異を有する患者を指す。r A A V 1 - P G R N 療法の標的集団には、P G R N ハプロ不全を有する患者、および / またはその他の欠乏した P G R N または G R N のレベルを有する患者が含まれる。特定の実施形態では、患者は、P G R N 変異についてヘテロ接合である。さらに別の実施形態では、患者は、P G R N 変異由来のホモ接合である。特定の実施形態では、患者は、本明細書で提供される r A A V 1 媒介性 h P G R N 療法と組み合わせた免疫抑制レジメンが投与される。

#### 【 0 0 8 4 】

特定の実施形態では、r A A V 1 . P G R N は、G R N ハプロ不全を有する患者の治療に有用である。かかる患者は、G R N ハプロ不全によって引き起こされる成人発症性神経変性症と診断された可能性があるか、または症状前である可能性がある。r A A V 1 . P G R N は、コンピュータ断層撮影 ( C T ) ガイドによる大槽への ( 大槽内 [ I C M ] ) 後頭下注入を介して、単回用量として投与することができる。単回用量は、所定の用量レベ

10

20

30

40

50

ルで投与される。N H P における単回 I C M 注入により達成された優れた脳形質導入により、この投与経路が選択された。特定の実施形態では、ベクターの I C M への投与はまた、別の投与経路（例えば、側脳室への注入）と比較して、抗 P G R N T 細胞応答の低下をもたらす。一般的な手順では、I C M 注入（後頭下穿刺としても知られている）は、以前は腰椎穿刺によって置き換えられていた。しかしながら、他の投薬レベルおよび送達経路は、この r A A V 1 媒介性 h P G R N 療法と併せて選択および / または使用されてもよい。

#### 【 0 0 8 5 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の r A A V 1 媒介性療法は、G R N 変異を有しないヒト（ハプロ不全）に対して、およそ平均的で正常な生理学的レベルで、P G R N 発現を提供し得る。しかしながら、治療は、P G R N 発現の増加が正常レベルよりも低い場合であっても、治療効果を提供し得、正常な平均レベルの約 4 0 % ~ 9 9 %、例えば、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、またはこれらの間の他の値を提供する。特定の実施形態では、これは、治療前の患者の発現レベルを上回る、少なくとも 5 % ~ 約 7 0 %、またはそれ以上のP G R N レベルの増加から生じ得る。特定の実施形態では、治療は、r A A V 1 媒介性 h P G R N の投与が、C S F 中のP G R N のレベルの上昇（例えば、正常レベルよりも 1 0 倍 ~ 4 0 倍高い）をもたらす治療有効性を提供する。

#### 【 0 0 8 6 】

特定の実施形態では、有効性は、C S F におけるP G R N タンパク質のレベルの増加、および / または脳皮質の厚さの変化のうちの 1 つ以上によって評価される。特定の実施形態では、r A A V 1 媒介療法の有効性は、単回 I C M 用量の投与後に評価され、長期生存、ならびにミニメンタルステート検査（M M S E）、臨床全般印象変化（C G I - C）、前頭葉機能検査（F A B）、前頭側頭型認知症評価尺度（F R S）、前頭葉性行動質問紙（F B I）、統一パーキンソン病評価尺度（U P D R S）、言語流暢性検査、前頭側頭葉変性症の臨床認知症尺度評価項目合計（C D R - F T L D s b）、および / または神経精神症状質問紙（N P I）によって評価される臨床症状および日常機能の改善のうちの 1 つ以上によって測定される。特定の実施形態では、有効性は、神経フィラメント軽鎖（N F L）、タウ、リン酸化タウ、および炎症マーカーのC S F レベルの改善、ならびに / またはP G R N の血漿中レベルの増加によって実証される。特定の実施形態では、有効性は、ミクログリオーシスのレベルの減少または逆転を測定することによって評価される。

#### 【 0 0 8 7 】

特定の実施形態では、有効性は、G R N 患者に関連する臨床症状のうちの 1 つ以上の改善によって測定され、これには、例えば、行動上の欠陥（脱抑制、無気力、同情または共感の喪失、強迫的または常団的な行動、または口唇傾向）および認知上の欠陥（エピソード記憶または視覚空間スキルに重大な影響を及ぼさない実行機能の低下）が含まれる。

#### 【 0 0 8 8 】

特定の実施形態では、改善は、いくつかの他のより非定型的な症状において観察され、精神医学的特徴（妄想、幻覚、および強迫行動）および / または他の認知障害（エピソード記憶障害、失行、および視空間機能障害）を含む、評価は、F T D C 基準を使用して行われてもよく、前頭葉変性および / または側頭葉変性の徵候についての脳イメージング、臨床評価尺度（前頭側頭葉変性症の臨床認知症尺度 [ C D R - F T L D ]、前頭葉性行動質問紙 [ F B I ]、神経精神症状質問紙 [ N P I ]、および前頭側頭型認知症評価尺度 [ F R S ] など）での減少の評価、および最終的には、病原性 G R N 変異を確認するための遺伝子検査を含む。脳脊髄液（C S F）のバイオマーカーを使用してもよく、タウおよびアミロイド - 、ならびにアミロイドの陽電子放出断層撮影（P E T）イメージングが含まれる。

#### 【 0 0 8 9 】

特定の実施形態では、改善は、原発性進行性失語（P P A）を有するG R N 変異保因者において観察され、これは、発話および言語に関連する症状によって特徴付けられる。こ

10

20

30

40

50

10  
彼らは、PPAの3つの臨床型である意味型PPA(svPPA)、非流暢型PPA(nf vPPA)、およびロゴペニック型PPA(lvPPA)を区別するメスラム基準に基づくガイドラインを使用して診断され得る(Gorno-Tempini et al., (2011) "Classification of primary progressive aphasia and its variants." *Neurology*. 76 (11): 1006-14)。nf vPPAは、発話を生成する能力の欠陥を呈し、基本的な特徴としては、言語生成における失文法、努力性発話、および発話の失行が挙げられる。svPPAは、単語の意味を理解する能力の欠陥を呈し、基本的な特徴としては、単語の呼称および単語の理解の障害が挙げられる。lvPPAは、会話中に適切な単語を見つけることが困難であることを特徴とするが、単語の理解の低下を伴わない。lvPPAの基本的な特徴は、単語の想起および文の復唱の能力の欠陥である。GRN変異保因者は、nf vPPAで最も一般的であるが、PPAの臨床スペクトルにわたってより広範な症状を有する場合があり、「PPA - 特定不能(not otherwise specified)」の診断をもたらす(Gorno-Tempini et al., 2011; Woolacott and Rohrer, 2016)。

#### 【0090】

GRNハプロ不全に関連する神経変性状態を有するヒト患者を治療する方法が提供される。特定の実施形態では、この状態は、プログラニュリン関連前頭側頭型認知症(FTD)である。本方法は、アデノ随伴ウイルス1(AAV1)カプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を介して、プログラニュリンのコード配列を中枢神経系(CNS)に送達することを含み、当該rAAVは、AAVカプシド中にパッケージされるベクターゲノムをさらに含み、当該ベクターゲノムは、AAV逆位末端反復、ヒトプログラニュリンのコード配列、およびプログラニュリンの発現を指示する調節配列を含む。

#### 【0091】

プログラニュリンに関連する前頭側頭型認知症またはGRNハプロ不全に関連する別の神経変性状態、に関連する脳病変を有するヒト患者を治療するための方法が提供される。本方法は、アデノ随伴ウイルス1(AAV1)カプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を介して、プログラニュリンのコード配列を中枢神経系(CNS)に投与することを含み、当該rAAVは、AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムをさらに含み、当該ベクターゲノムは、AAV逆位末端反復、ヒトプログラニュリンのコード配列、およびプログラニュリンの発現を指示する調節配列を含む。

#### 【0092】

特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、(a)脳病変の減少の予測因子として網膜蓄積病変の減少について患者を非侵襲的に評価すること、(b)磁気共鳴画像法を行って脳体積を評価すること、および/または(c)CSF中のプログラニュリンの濃度を測定することによって、治療をモニタリングすることをさらに含み得る。任意選択的に、血漿中のプログラニュリン濃度を評価してもよい。

#### 【0093】

特定の実施形態では、rAAV.hPGRN組成物の有効性は、主に認知的方法、主に行動的方法、または認知/他の方法のうちの1つ以上によって評価される。以下に、好適な評価について説明する。

#### 【0094】

主な認知評価には、言語流暢性検査、FTLDの臨床認知症比率、またはミニメンタルステート検査(MMSE)がある。言語流暢性検査は、各対象に同じ絵/写真を提示し、口頭での説明を求めるこことによって実施される可能性がある。説明中に、発話速度(単語/分)がカウントされ、記録され、最終的に定型発達の成人を反映する速度と比較される。CDR-FTLDは、古典的なCDRの拡張版であり、歴史的に、アルツハイマー病のスペクトル障害の重症度を評価するために使用されている。この評価には、CDRの元の6つのドメイン(記憶、見当識、判断力と問題解決、社会適応、家庭状況と趣味、介護状況)、ならびに言語および行動という2つの追加のドメインが含まれ、FTLDの低下を

10

20

30

40

50

検出する際に、感度がより高くなる。「0」の評価は、正常な行動または言語を示し、「1」、「2」、または「3」のスコアは、軽度から重度の障害を示す。「評価項目合計 (sum of boxes)」、または個々のドメインスコアの合計は、全体的な認知症の重症度を決定するために使用される。M M S E は、臨床および研究の実践で広く使用されている 11 問の全体的な認知評価である。質問としては、例えば、「今年は何年ですか？季節はいつですか？何日ですか？何曜日ですか？何月ですか？」と尋ねられ、正解ごとに 1 ポイントが与えられ、質問ごとに最高得点が与えられる。総得点の上限は 30 点で、24 点と 27 点の 2 つのカットオフがある。これらのカットオフは、認知機能低下の指標である。

#### 【 0 0 9 5 】

主な運動評価には、例えば、統一パーキンソン病評価尺度 (U P D R S) が含まれる。U P D R S は、メンテーション、行動、日常生活の気分と活動など、パーキンソニズムに関連するいくつかのドメインの 42 項目の 4 部構成の評価である。各項目は、典型的には、0 (典型的には障害なしを示す) から 4 (典型的には最も重度の障害を示す) の範囲の評価尺度を含む。各部のスコアは、疾患の重症度を提供するために集計され、高スコアの 199 点は、最悪 / 最も完全な障害を示す。

#### 【 0 0 9 6 】

主な行動評価としては、例えば、神経精神症状質問紙 (N P I) または前頭葉性行動質問紙 (F B I) が含まれる。N P I は、脳の障害を有する患者における精神病理の存在を解明するために使用される。当初、これはアルツハイマー病の集団で使用するために開発されたが、他の条件における行動の変化を評価するのに役立つ場合がある。この評価は、10 の行動ドメインと 2 つの自律神経領域で構成され、その中には、4 つのスコア：頻度、重症度、総合的な負担、および介護者の負担がある。N P I の総スコアは、行動ドメインのドメインスコアを加算し、介護者負担のスコアを減算することによって得られる。F B I は、b v F T D に特に関連する行動および人格の変化を評価し、F T D と他の認知症間を区別することを目的とした 24 項目の評価である。b v F T D と診断された患者は、一般に、これらのタイプの変化について十分な洞察を有していないため、これは、主介護者との対面面接として実施される。行動と人格に関連するいくつかの分野に焦点を当て、各質問を 0 (なし) から 3 (重度 / ほとんどの場合) まで採点する。総スコアは、病気の重症度に関する洞察を提供し、経時的な変化を評価するために使用することができる。

#### 【 0 0 9 7 】

他の / 認知および運動評価の両方には、例えば、コロンビア自殺重症度評価尺度 (C - S S R S)、臨床全般印象度変化 (C G I - C)、前頭葉機能検査 (F A B)、および / または前頭側頭型認知症評価尺度 (F D R) が含まれる。C - S S R S は、自殺の念慮と行動を評価するための質問を通して、自殺念慮、念慮の強度、自殺行動を測定する 3 部構成の尺度である。この評価の結果は、尺度から直接取得される自殺行動致死率評価、自殺念慮スコア、および自殺念慮強度評価で構成される。0 を超える念慮スコアは、評価ガイドラインに基づいて、介入の必要性を示し得る。強度評価は、0 ~ 25 の範囲であり、0 は、自殺念慮の支持なしを表す。C G I - C は、3 部の簡潔で広く使用されている評価のうちの 1 つであり、3 項目で構成され、臨床医と観察者によって評価される。C G I - C は、改善が完全に治療によるものであるかどうかにかかわらず、研究への登録から始まり、1 (非常に改善された) から 7 (非常に悪化した) の範囲の 7 段階で評価される。F A B は、前頭葉性遂行機能障害表現型認知症とアルツハイマー型認知症間の区別を補助するための簡易評価である。これは、軽度の痴呆患者 (M M S E > 24) において特に有用である。評価は、認知、運動、および行動の領域に対処する 6 部で構成され、総スコアが 18 で、より高いスコアは、より良好なパフォーマンスを示す。F D R は、前頭側頭型認知症の患者のための簡易病期分類評価であり、経時的な F T D サブタイプの疾患進行の差異を検出する。この簡単な面接は、主介護者と共に実施され、30 項目からなり、「起こらない」、「時々起こる」、または「常に起こる」に分類される。次いで、パーセンテージスコアが計算され、ロジットスコア (logit score)、そして最終的には、重

10

20

30

40

50

症度スコアに変換される。重症度スコアは、「非常に軽度」から「最重度」までの範囲である。

【0098】

有効性の他の尺度としては、症状の発症後、診断時点からの生存期間の増加が挙げられ、有効性の尺度である。現在、G R N 変異によって引き起こされる神経変性と診断された患者の平均寿命は、症状の発症から7～11年である。有効性の別の尺度は、標的集団におけるすべての臨床症状にわたって最も一般的に影響を受ける脳領域である内側前頭皮質および頭頂領域の厚さにおける萎縮の安定化および／または増加である。これは、M R I または他の画像診断技術を使用して評価することができる。さらに他の評価には、生化学的バイオマーカーが含まれる。C S F 中および血漿中のP G R N タンパク質のレベルは、A A V 形質導入の読み出しがして測定され、r A A V 1 . h P G R N の投与後、患者において増加することが予想される。他の実施形態では、神経フィラメント軽鎖 (N F L )、タウ、リン酸化タウ、および他の炎症マーカーのC S F レベルが評価される。特定の実施形態では、これらのバイオマーカーのレベルの調節および／または減少は、有効性と相關する。

10

【0099】

以下の実施例は、ヘテロ接合G R N ハプロ不全に関連する特定の状態の治療に焦点を当てているが、特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターおよび組成物は、他の疾患、例えば、神経セロイドリポフスチン症、癌（例えば、卵巣癌、乳癌、副腎癌、および／または膵臓癌）、アテローム性動脈硬化症、2型糖尿病、および代謝性疾患などのG R N 遺伝子のホモ接合性変異に関連する疾患の治療に使用され得る。

20

【0100】

本明細書で使用される場合、コンピュータ断層撮影 (C T) という用語は、軸に沿って作成された一連の平面断面画像から、コンピュータによって身体構造の三次元画像が構築される放射線撮影を指す。

【0101】

「実質的相同性」または「実質的類似性」という用語は、核酸またはその断片に言及する場合、適切なヌクレオチドの挿入または欠失を伴って別の核酸（またはその相補鎖）と最適に整列した場合、整列した配列の少なくとも約95～99%においてヌクレオチド配列の同一性がある。好ましくは、相同性は、全長配列、またはそのオープンリーディングフレーム、または少なくとも15ヌクレオチド長である別の好適な断片にわたる。好適な断片の例は、本明細書に記載されている。

30

【0102】

核酸配列の文脈で「配列同一性」、「パーセント配列同一性」、または「パーセント同一」という用語は、最大限対応するように整列させたときと同じである2つの配列中の残基を指す。配列同一性の比較の長さは、ゲノムの全長、遺伝子コード配列の全長、または、望ましくは、少なくとも約500～5000個のヌクレオチドの断片にわたり得る。しかしながら、例えば、少なくとも約9個のヌクレオチド、通常は少なくとも約20～24個のヌクレオチド、少なくとも約28～32個のヌクレオチド、少なくとも約36個以上のヌクレオチドの、より小さい断片間の同一性も望まれ得る。同様に、「パーセント配列同一性」は、タンパク質の全長わたるアミノ酸配列またはその断片について容易に決定することができる。好適には、断片は、少なくとも約8アミノ酸長であり、最大で約700アミノ酸長であり得る。好適な断片の例は、本明細書に記載されている。

40

【0103】

「実質的相同性」または「実質的類似性」という用語は、アミノ酸またはその断片に対して言及される場合、適切なアミノ酸の挿入または欠失を伴って別のアミノ酸（またはその相補鎖）と最適に整列した場合、整列した配列の少なくとも約95～99%においてアミノ酸配列の同一性がある。好ましくは、相同性は、全長配列、もしくはそのタンパク質、例えば、c a p タンパク質、r e p タンパク質、または少なくとも8アミノ酸長であるそれらの断片、もしくはより好ましくは、少なくとも15アミノ酸長にわたる。好適な断

50

片の例は、本明細書に記載されている。

【0104】

「高度に保存された」という用語は、少なくとも 80% の同一性、好ましくは、少なくとも 90% の同一性、より好ましくは 97% 超の同一性を意味する。同一性は、当業者に既知のアルゴリズムおよびコンピュータプログラムを用いることによって、当業者によって容易に決定される。

【0105】

一般に、2つの異なるアデノ随伴ウイルス間の「同一性」、「相同性」、または「類似性」に言及する場合、「同一性」、「相同性」、または「類似性」は、「整列された」配列を参照して決定される。「整列した」配列または「整列」とは、複数の核酸配列またはタンパク質（アミノ酸）配列を指し、参照配列と比較して、多くの場合、欠損または追加の塩基またはアミノ酸についての補正を含む。実施例では、公開された AAV9 配列を参照点として使用して AAV 整列を行う。整列は、公共のまたは市販のいずれかの様々な多重配列整列プログラムを用いて行われる。かかるプログラムの例としては、インターネット上のウェブサーバを通してアクセス可能な「Clustal Omega」、「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「MAP」、および「MEME」が挙げられる。かかるプログラムの他のソースは、当業者に既知である。あるいは、Vector NTI ユーティリティもまた使用される。また、当該技術分野で既知のいくつかのアルゴリズムが存在し、上に記載のプログラムに含まれるものも含め、ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用することができる。別の例として、ポリヌクレオチド配列は、GCG バージョン 6.1 のプログラムである FastA（商標）を用いて比較することができる。FastA（商標）は、照会配列（query sequence）および検索配列（search sequence）の間の最良の重複領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する。例えば、核酸配列間のパーセント配列同一性は、GCG バージョン 6.1（参照により本明細書に組み込まれる）に提供されるよう、FastA（商標）をそのデフォルトパラメータ（ワードサイズ 6 およびスコアリングマトリックスのための NOPAM 因子）と共に使用して決定することができる。「Clustal Omega」、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、および「Match-Box」プログラムなどの多重配列整列プログラムもまた、アミノ酸配列に対して利用可能である。一般に、これらのプログラムのいずれかがデフォルト設定で使用されるが、必要に応じて、当業者は、これらの設定を変更することができる。あるいは、当業者は、別のアルゴリズムまたはコンピュータプログラムを利用することができ、参照のアルゴリズムおよびプログラムによって提供されるように、少なくとも同一性のレベルまたは整列が提供される。例えば、J. D. Thomson et al., Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27 (13) : 2682 - 2690 (1999) を参照されたい。

【0106】

「a」または「an」という用語は、1つ以上を指すことに留意されたい。したがって、「a」（または「an」）、「1つ以上（one or more）」、および「少なくとも1つ（at least one）」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0107】

「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、および「含んでいる（comprising）」という用語は、排他的ではなく包括的に解釈されるべきである。「なる（consist）」、「なっている（consisting）」という用語、およびその変形は、包括的ではなく排他的に解釈されるべきである。本明細書の様々な実施形態は、「含む（comprising）」という言葉を用いて示されているが、他の状況では、関連する実施形態は、「からなる（consisting of）」また

10

20

30

40

50

は「本質的にからなる (consisting essentially of)」という言葉を用いて解釈および記載されるべきことも意図される。

【0108】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、別途指定されない限り、与えられた参照から 10% ( $\pm 10\%$ 、例えば、 $\pm 1$ 、 $\pm 2$ 、 $\pm 3$ 、 $\pm 4$ 、 $\pm 5$ 、 $\pm 6$ 、 $\pm 7$ 、 $\pm 8$ 、 $\pm 9$ 、 $\pm 10$ 、またはそれらの間の値) の可変性を意味する。

【0109】

本明細書で使用される場合、「疾患」、「障害」、および「状態」は、対象における異常な状態を示すために互換的に使用される。

【0110】

本明細書で別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、当業者によって、および本明細書で使用されている多数の用語に対して当業者に一般的な手引きを提供する公開された文書を参照することによって、一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

10

【0111】

「発現」という用語は、本明細書で最も広い意味で使用され、RNA または RNA およびタンパク質の産生を含む。RNA に関して、「発現」または「翻訳」という用語は、特に、ペプチドまたはタンパク質の産生に関する。発現は、一過性または安定であり得る。

【0112】

本明細書で使用される場合、「発現力セット」は、コード配列、プロモーターを含む核酸分子を指し、それらのための他の調節配列を含み得、その力セットは、遺伝子要素（例えば、プラスミド）によりパッケージング宿主細胞に送達され得、ウイルスベクターの力プシド（例えば、ウイルス粒子）へパッケージされる。典型的に、ウイルスベクターを產生するためのかかる発現力セッは、ウイルスゲノムのパッケージングシグナルに隣接する本明細書に記載される遺伝子産物のコード配列、および本明細書に記載のものなどの他の発現制御配列を含む。

20

【0113】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、目的の遺伝子に連続している発現制御配列、およびトランスでまたは離れて作用して目的の遺伝子を制御する発現制御配列の両方を指す。

30

【0114】

タンパク質または核酸を参照して使用される場合、「異種性」という用語は、タンパク質または核酸が、天然では互いに同じ関係で見出されない、2つ以上の配列または部分配列を含むことを示す。例えば、新規の機能的核酸を作製するために配置された関連のない遺伝子からの2つ以上の配列を有する核酸は、典型的に、組換えにより產生される。例えば、一実施形態では、核酸は、異なる遺伝子からコード配列の発現を指示するように配置された1つの遺伝子由来のプロモーターを有する。したがって、コード配列に関して、プロモーターは、異種性である。

【0115】

本発明の文脈における「翻訳」という用語は、リボソームでのプロセスに関し、mRNA 鎖は、アミノ酸配列の集合を制御して、タンパク質またはペプチドを生成する。

40

【0116】

以下の実施例は、例示的なものに過ぎず、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0117】

50

【表3-1】

略語:	説明
A	吸光度
aa	アミノ酸
AAV	アデノ随伴ウイルス
AAV1	アデノ随伴ウイルス血清型1
AAV2	アデノ随伴ウイルス血清型2
AAV5	アデノ随伴ウイルス血清型5
AAVhu68	アデノ随伴ウイルス血清型hu68
ACMG	米国臨床遺伝学会
AD	アルツハイマー病
AD&FDM	アルツハイマー病および前頭側頭型認知症変異データベース
Ad5	アデノウイルス血清型5
AE	有害事象
AEX	アニオノ交換
AmpR	アンピシリン耐性(遺伝子)
ANOVA	分散分析
ARTFL	前頭側頭葉変性症の研究と治療の進歩
AUC	分析用超遠心
BA	$\beta$ アクチシン
BCA	ビシンコニン酸
BDS	バルク原薬
BMCB	細菌マスター細胞バンク
bp	塩基対
BRF	バッチレコードフォーム
BSA	ウシ血清アルブミン
BSE	ウシ海綿状脳症
BSC	バイオセーフティキャビネット
bvFTD	行動障害型前頭側頭型認知症
BWCB	細菌作業用細胞バンク
C9orf72	9番染色体オープンリーディングフレーム72(遺伝子、ヒト)
cap	カプシド(遺伝子)
CB7	ニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターおよびCMVエンハンサー
CBC	全血球数
CBER	生物製剤評価研究センター
CBS	大脑皮質基底核症候群

10

20

30

40

50

【表3-2】

略語:	説明
CDR-FTLDsb	前頭側頭葉変性症の臨床認知症尺度(CDR)評価項目合計
CFR	連邦規則集
CFU	コロニー形成単位
CGI-C	臨床全般印象度変化
CI	キメライントロン
CMC	化学、製造および品質管理
CMO	医薬品製造受託機関
CMV IE	サイトメガロウイルス最初期エンハンサー
CNS	中枢神経系
COA	分析証明書
CPE	細胞傷害活性
CRL	Charles River Laboratories
CRO	医薬品開発業務受託機関
CSF	脳脊髄液
C-SSRS	コロンビア自殺重症度評価尺度
CT	コンピュータ断層撮影
CTL	細胞傷害性Tリンパ球
CTSD	カテプシンD
ddPCR	ドロップレットデジタルポリメラーゼ連鎖反応
DLS	動的光散乱
DMEM	ダルベッコ改変イーグル培地
DMF	ドラッグマスターファイル
DNA	デオキシリボ核酸
DO	溶存酸素
DP	製剤
DRG	後根神経節
DS	原薬
E1A	初期領域1A(遺伝子)
ECG	心電図
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
ELISpot	酵素結合免疫スポット
EU	エンドトキシン単位
F	雌

10

20

30

40

50

【表3-3】

略語:	説明
F/U	フォローアップ
FAB	前頭葉機能検査
FBI	前頭葉性行動質問紙
FBS	ウシ胎児血清
FDA	食品医薬品局
FDP	充填済製剤
FFB	最終製剤緩衝液
FIH	ヒト初回
FRS	前頭側頭型認知症評価尺度
FTD	前頭側頭型認知症
FTLD	前頭側頭葉変性症
FTDC	国際行動障害型FTD基準コンソーシアム
GC	ゲノムコピー
GENFI	遺伝性前頭側頭型認知症イニシアチブ
GLP	優良試験所基準
GMP	優良製造基準
GRN	グラニュリン前駆体(遺伝子、ヒト)
Grn	グラニュリン前駆体(遺伝子、マウス)
GTP	遺伝子療法プログラム
HCDNA	宿主細胞デオキシリボ核酸
HCP	宿主細胞タンパク質
HEK293	ヒト胎児由来腎臓293
HEX	ヘキソサミニダーゼ(タンパク質)
hPGRN	ヒトプログラニュリン
hPGRN v2	ヒトプログラニュリン バージョン2
ICH	医薬品規制調和国際会議
ICM	大槽内
ICP	頭蓋内圧
ICV	脳室内
IDS	イズロン酸-2-スルファターゼ
IDUA	イズロニダーゼ
IFN- $\gamma$	インターフェロン- $\gamma$
IND	治験薬
IT	髄腔内

10

20

30

40

50

【表3-4】

略語:	説明
ITFFB	髄腔内最終製剤緩衝液
ITR	逆位末端反復
IU	感染単位
IV	静脈内
KanR	カナマイシン耐性遺伝子
kb	キロ塩基
KO	ノックアウト
LAL	カブトガニ・アメーバ様細胞溶解物
LBD	レビー小体認知症
LEFFTDS	家族性前頭側頭型認知症対象の縦断的評価
LFT	肝機能検査
LLOQ	定量下限
LOD	検出限界
LP	腰部穿刺
LTFU	長期フォローアップ
lvPPA	ロゴペニック型原発性進行性失語症
M	雄
MAPT	微小管関連タンパク質タウ(遺伝子、ヒト)
MBR	マスター・バッチレコード
MCB	マスター細胞バンク
MED	最小有効用量
MMSE	ミニメンタルステート検査
MRI	磁気共鳴画像法
mRNA	メッセンジャー・リボ核酸
MS	質量分析
MTD	最大耐容用量
N	対象または動物の数
N/A	該当なし
NAbs	中和抗体
NCL	神経セロイドリポフスチン症
nfvPPA	非流暢型原発性進行性失語
NFL	ニューロフィラメント・軽鎖
NGS	次世代配列決定
NHP	非ヒト靈長類

10

20

30

40

50

【表3-5】

略語:	説明
NHS	自然歴研究
NPI	神経精神症状質問紙
NSAID	非ステロイド性抗炎症薬
OL	非盲検
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PD	パーキンソン病
PEI	ポリエチレンイミン
PES	ポリエーテルスルホン
PET	ポジトロン放射断層撮影
PGRN	プログラニュリン
PI	治験責任医師
POC	概念実証
ポリA	ポリアデニル化
PPA	原発性進行性失語症
PSP	進行性核上性麻痺
QA	品質保証
QC	品質管理
qPCR	定量的ポリメラーゼ連鎖反応
rAAV	組換えアデノ随伴ウイルス
ROA	投与経路
rcAAV	複製可能アデノ随伴ウイルス
rBG	ウサギ $\beta$ グロビン
rDNA	リボソームデオキシリボ核酸
rep	レプリカーゼ(遺伝子)
RNA	リボ核酸
SA	シングルアーム
SAE	重篤有害事象
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
SOP	標準作業手順書
SRT	安全審査トリガー
ssDNA	一本鎖デオキシリボ核酸
svPPA	意味型原発性進行性失語症
TBD	未決定

10

20

30

40

50

【表3-6】

略語:	説明
TCID <sub>50</sub>	50%組織培養感染線量
TDP-43	TAR DNA結合タンパク質43(タンパク質)
TE	Tris-EDTA
TFF	接線流瀝過
UbC	ユビキチンC
UCSF	カリフォルニア大学サンフランシスコ校
UPenn	ペンシルベニア大学
UPenn-GTP	ペンシルベニア大学-遺伝子療法プログラム
UPDRS	統一パーキンソン病評価尺度
UPLC	超高性能液体クロマトグラフィ
US	アメリカ合衆国
USP	米国薬局方
WCB	作業用細胞バンクワーキングセルバンク
WT	野生型

10

20

30

40

## 【0118】

実施例1：材料および方法：

## ベクター

操作されたヒトPGRN cDNAを、サイトメガロウイルス初期エンハンサーを有するニワトリベータアクチングリコナーゼ、キメライントロン、およびウサギグロビンポリアデニル化配列を含む発現構築物にクローニングした(図1)。第2の操作されたヒトPGRN cDNAを、ヒトユビキチンCプロモーターを含む発現構築物にクローニングした。発現構築物は、AAV2逆位末端反復に隣接した。アデノ随伴ウイルス血清型1、5およびヒト68(AAVhu68)は、前述のようにHEK293細胞の三重トランسفェクションおよびイオジキサノール精製によって、この構築物から生成された(Lock, M, et al. Hum Gene Ther. 2010; 21(10): 1259-71)。

## 【0119】

## 動物手順

すべての動物プロトコルは、the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Pennsylvaniaにより認可された。つがいのGRNノックアウトマウスを、The Jackson Laboratory(ストック番号013175)から購入し、コロニーをペンシルベニア大学で維持した。野生型C57BL/6(ストック番号000664)は、対照として機能した。最初の研究では、2ヶ月齢のマウスをイソフルランで麻酔し、 $1 \times 10^{11}$ ベクターゲノムコピー(GC)を $5 \mu\text{L}$ の量で側脳室(ICV)に注入した。注入60日後、マウスを、ケタミン/キシラジン麻酔下、失血により安楽死させ、頸椎脱臼により、死亡を確認した。第2の研究では、マウスは、7ヶ月齢で処置され、11ヶ月齢で犠牲にされた。剖検時に、血清を、心臓穿刺により採取し、CSFを、ポリエチレンチューブに連結された32ゲージ針を用いて、後頭下穿刺により採取した。血清およびCSF試料を、ドライアイス上で即時凍結し、分析時まで-80度で保存した。前頭皮質を、生化学用に回収し、ドライアイス上で即時凍結し、残りの脳は、組織学用に10%のホルマリンで固定した。

## 【0120】

50

3～4歳齢のアカゲザルを、Covanceから購入した。ベクター投与のために、動物を筋肉内デクスメトミジンおよびケタミンで鎮静し、1mLの人工CSF中の3×10<sup>13</sup>GCのAAVベクターを、単回大槽内(ICM)注入で投与した。針の配置は、前述のように、透視装置(OEC 9800 C-Arm, GE)を用いた脊髄造影法により検証した(Katz N, et al. *Hum Gene Ther Methods*. 2018 Oct; 29(5): 212-219)。動物は、バルビツール酸過剰投与により、安樂死させた。回収した組織を、ドライアイス上で即時凍結するか、または組織学用に10%ホルマリンで固定した。

### 【0121】

#### 組織学および画像診断

マウスの脳を10%ホルマリンで固定し、スクリース中で凍結保存し、最適切断温度(OCT)化合物中に包埋し、クリオスタッフで切片化した。目的の領域の自己蛍光物質(リポフスチン)の低倍率画像を撮影した。ImageJソフトウェアを使用して、リポフスチン沈着物を盲検で定量した。非ヒト靈長類組織を10%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色した。スライドは、委員会認定の獣医病理学者(ELB)によって審査された。GFPベクターで処置された動物の場合、脳切片を、olig2、GFP、またはNeuNに対する抗体で染色した。すべての切片を、DAPIおよびGFPに対する抗体、続いて蛍光二次抗体で共染色した。スライドをLeica Aperio Versa 200スライドスキャナーでスキャンし、eSlide Managerからダウンロードして、HALOイメージングソフトウェア(Indica Labs)で分析した。各動物について右半球の5つの領域をサンプリングし、各細胞型マーカーを用いて細胞を定量した。細胞を、以下の設定を調整することによって検出した:核検出タブの下で「最小核強度」、「核サイズ」、「核セグメントーションアグレッシブネス」、および「最小核ラウンドネス」。次いで、個々の色素ごとに基準を定義して、細胞をさらに同定し、各マーカーの定量的な総細胞数を生成した。設定は、所望の細胞型の検出の感度および信頼性に基づいて経験的に決定された。一部の場合、細胞質におけるNeuNの検出などの設定は、マーカーの真の細胞内局在を反映しなかったが、より高い特異性および感度の検出を提供した。自動化された手段によって検出されたすべての細胞は、手動で検証された。ニューロンについては、「色素1」タブの下、「核陽性閾値」および「細胞質陽性閾値」を調整して、核および細胞質の両方に存在するNeuNを有する細胞のみを検出した。アストロサイトについては、DAPIおよびGFPマーカーを選択し、細胞の核および細胞質の両方に存在する場合、カウントに含めた。オリゴデンドロサイトについては、DAPIとolig2の両方が核に存在するが、細胞の細胞質には存在しない場合、細胞をカウントした。共局在については、同じ設定が使用されたが、ニューロンでは核、ならびにアストロサイトでは核および細胞質の両方で、GFPが追加の色素として含まれた。すべての選択されたマーカーを発現しなかった細胞は、核または細胞質の「マスク」機能を使用して「マスキング」することによって、生成される結果表から除外された。olig2と共に局在するGFP陽性細胞が稀なため、形質導入されたオリゴデンドロサイトは手動でカウントした。場合によって、自己蛍光を示す血管または脈絡叢の一部は、「はさみ」ツールを使用して手動で、輪郭を描き、除外した。得られた値を、各細胞型マーカーのGFP陽性細胞の割合として表した。

### 【0122】

#### ヘキソサミニダーゼ(Hex)アッセイのための試料調製

血清は、Hex活性アッセイに直接使用したが、脳試料は、溶解緩衝液(0.2%のTriton-X100、0.9%のNaCl、pH 4.0)中でホモジナイズした後、3回の凍結融解サイクルおよび遠心分離による清澄化を行った。タンパク質濃度は、ブラッドフォードアッセイによって決定した。Hexの活性測定は、以前に記載されているように実行した(Hinderer C, et al. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2014; 22(12): 2018-27)。

10

20

30

40

50

## 【0123】

## ELISA

ヒトPGRNは、わずかな修正を加えて、DuoSet ELISAキット(R&D #DY2420)を使用して測定した。簡潔には、高結合ポリスチレンELISAプレートを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に希釈された5ug/mlのヒトPGRN捕捉抗体で、4で一晩コーティングした。洗浄後、PBS中の1%ウシ血清アルブミン(BSA)で2時間プレートをブロッキングし、続いて、試料を1時間インキュベートした。PBS中で、ヒトおよび非ヒト靈長類のCSFを1:5に希釈し、一方、マウスのCSF試料を1:40に希釈した。脳試料を、総タンパク質濃度が2mg/mlになるように、溶解緩衝液に希釈した。結合した抗体は、ビオチン化マウス抗ヒトプログラニュリン抗体およびストレブトアビシン-HRPを用いて検出した。プレートを、テトラメチルベンジジン基質を使用して20分間現像し、2Nの硫酸で反応を停止させた後、450nmで吸光度を測定した。

10

## 【0124】

## 中和抗体アッセイ

AAVh68に対する中和抗体は、前述のように評価された(Calcedo R, et al. J Infect Dis. 2009; 199(3): 381-90)。

## 【0125】

## 統計

野生型マウス、GPNノックアウトマウス、およびAAV処置GPNノックアウトマウスにおけるHex酵素活性、リポフスチン数、およびCD68+領域の比較は、一元配置ANOVA、続いて事後テューキーの多重比較検定を使用して行った。

20

## 【0126】

## 実施例2：マウス疾患モデルにおけるヒトGPN導入遺伝子のAAV媒介性送達

CB7プロモーターおよびキメライントロンの制御下でヒトPGRN(配列番号3)を発現するAAVh68カプシドを有する組換えAAVベクター(CB7.CI.hPGN.rBG)は、例えば、WO2018/160582に記載されている公開された三重トランسفエクション技術を使用して產生された。

## 【0127】

本発明者らは、GPNノックアウトマウスモデルにおけるヒトGPN導入遺伝子のAAV媒介性送達を評価した。ヘテロ接合のGPN変異のマウスは(GPN<sup>+/−</sup>)、GPN関連神経変性疾患の病理学的特徴を示さない。これは、おそらく、マウスの寿命では、ヒトにおいて数十年後に初めて現れるGPNハプロ不全の後遺症の発生が不可能であるためである。対照的に、GPN<sup>−/−</sup>マウスにおける完全なPGRN欠損では、ヒトにおけるGPNハプロ不全のいくつかの初期の特徴(例えば、リソソーム機能の障害、自己蛍光リソソーム蓄積物質(リポフスチン)の蓄積、およびミクログリアの活性化)が再現されるが、GPN<sup>−/−</sup>マウスは、2歳齢まででさえニューロン損失が示さない(Lui H, et al. Cell. 2016; 165(4): 921-35、Ward ME, et al. Sci Transl Med. 2017 Apr 12; 9(385): pii: eaah5642)。GPN<sup>+/−</sup>マウスおよびGPN<sup>−/−</sup>マウスの両方とも、行動異常を示すことが報告されているが、所見は群間で一致していない(Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010; 177(1): 311-24、Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012; 228(1): 67-76、Ghoshal N, et al. Neurobiology of Disease. 2012; 45(1): 395-408、Filiiano AJ, et al. The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. 2013; 33(12): 5352-61、Yin F, et al. The FASEB Journal. 2010; 24(12): 4639-47)。同様に、一部の報告は、GPN<sup>−/−</sup>マウスにおける生存率の低下が示されたが、他の

30

40

50

報告では、GRN<sup>-/-</sup>マウスが、正常な寿命を有することが見出され、本発明者ら経験と一致した(Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010; 177(1): 311-24、Wills H, et al. The Journal of Pathology. 2012; 228(1): 67-76)。GRN<sup>-/-</sup>マウスは、明らかな神経変性または神経学的徵候を示さないが、ヒトにおけるGRNハプロ不全との顕著な生化学的および組織学的類似性から、新規療法を評価するための潜在的に有益なモデルとなる。したがって、本発明者らは、GRN<sup>-/-</sup>マウスにおけるこれらの生化学的および組織学的所見に焦点を当てて分析を行った。

#### 【0128】

この研究の目的は、ヒトGRN遺伝子の脳への送達が、既存のリソソーム蓄積物質を排除し、GRN<sup>-/-</sup>マウスにおけるリソソーム機能を正常化することができるかどうかを評価することであった。リソソーム蓄積に応答して、細胞は、リソソーム酵素の発現を上方制御し、リソソーム蓄積症のバイオマーカーとして使用され得る(Hinderer C, et al. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2014; 22(12): 2018-27、Gurda BL, et al. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016; 24(2): 206-16、Kara georgos LE, et al. Experimental Cell Research. 1997; 234(1): 85-97)。我々は、異なる年齢のGRN<sup>-/-</sup>およびGRN<sup>+/+</sup>マウス、ならびに皮質、海馬、および視床におけるリポフスチン沈着物から、脳組織におけるリソソーム酵素ヘキソサミニダーゼの活性を評価した(図3A～図3D)。ヘキソサミニダーゼ活性の上昇は、生涯を通して明らかであったが、リポフスチンは進行性の蓄積を示した。リポフスチンは、早くも2ヶ月齢で明らかであり、以前の所見と一致した(Klein ZA, et al. Neuron 2017; 95(2): 281-96)。本発明者らの最初の研究は、天然分離株であるAAVh68に基づくAAVベクターを用いて実施され、これは、クレードFの分離株であるAAV9と密接に関連している。2～3ヶ月齢のGRN<sup>-/-</sup>マウスを、ヒトGRNを発現するAAVh68ベクターまたはビヒクル(PBS)のいずれかの脳室内(ICV)注入で処置した(群あたりN=10)。さらに、野生型マウスのコホートに、ビヒクル(N=10)を注入した。小規模の2ヶ月齢マウスでは、ICM経路(NHP研究および提案されたFIH臨床試験に使用されるROAである)を介してベクターを確実に投与することが困難になるため、ICV ROA(脳室のCSFにAAVベクターを直接注入することを伴う)を使用した。以前の研究では、この研究に選択された用量(10<sup>11</sup>GC)でのAAVh68のICV投与では、形質導入が注入された脳室近くの脳領域に限定されることが示され、小さな細胞集団によるPGRNの分泌によって、脳病変の全体的な改善が達成され得るかどうかを評価するための有用なシステムとなる。

#### 【0129】

ベクター投与の2ヶ月後、動物を安楽死させ、脳、CSF、および血清を回収した。脳におけるヒトPGRNタンパク質レベルの定量化により、AAV処置群における形質導入を確認した(図4A～図4F)。PGRNは、CSF中の測定可能な分泌タンパク質であり、ヒトGRN変異保因者のCSF中で減少している(Lui H, et al. Cell. 2016; 165(4): 921-35、Meeter LH, et al. Dement Geriatr Cogn Dis Extra. 2016; 6(2): 330-40)。したがって、本発明者らは、AAV処置GRN<sup>-/-</sup>マウスのCSFにおけるPGRNタンパク質レベルを評価し、平均CSF濃度が14ng/mLであることを明らかにしたが、一方、ビヒクル処置群では、ヒトPGRNは検出レベル未満であった(図4A～図4F)。PGRNの発現は、リソソーム酵素の発現の正常化を伴い、AAV処置GRN<sup>-/-</sup>マウスの脳におけるHex活性レベルが、ほぼ正常レベルに戻った(図4A～図4F)。

#### 【0130】

10

20

30

40

50

GRN-/-マウスの脳におけるPGRN発現を確認した後、PGRN発現が海馬、視床、および皮質におけるリポフスチン沈着物の数を減少させたかどうかを評価した。その目的で、未染色の固定脳切片をカバーガラスに載せ、盲検で自己蛍光リポフスチンを撮像した。AAV処置GRN-/-マウスは、ビヒクル処置GRN-/-マウスと比較して、すべての脳領域においてリポフスチンの減少を示し、同齢の野生型対照と同様のレベルを示した(図4A～図4F)。

#### 【0131】

概念研究の最初の証明は、蓄積物質が脳に現れ始めたばかりの早い時期に、処置マウスにおいてAAV媒介性PGRN発現の治療活性を実証した。その後、より重篤な既存病態を有する高齢マウスにおける遺伝子導入の影響を評価した。この研究では、7ヶ月齢のGRN-/-マウスは、ヒトPGRNまたはビヒクルを発現するAAVhu68ベクターの単回ICV注入を受け、11ヶ月齢で犠牲になった。広範囲の脳リポフスチン沈着物(図5A～図5D)に加えて、11ヶ月齢のGRN-/-マウスは、GRN変異によって引き起こされるFTDを有する患者(図6A～図6C)と同様に、広範囲のミクログリオーシスを示した(Ahmed Z, et al. Journal of neuroinflammation. 2007 Feb 11; 4: 7)。GRN遺伝子導入は、より若い動物における所見と同様に、老化マウスにおいて、脳Hex活性およびリポフスチン沈着物を減少させた(図5A～図5D)。さらに、処置マウスの脳において、ミクログリアのサイズおよび数が正常化された(図6A～図6C)。

#### 【0132】

併せると、ヒトPGRNを発現するAAVベクターをGRN-/-マウスの脳にICV送達することで、リポフスチン凝集物が除去され、リソソーム酵素の活性がほぼ完全に正常化され、PGRN遺伝子送達によって、GRN関連神経変性疾患の基礎となる病態生理の重要な側面が、効果的に修正され得ることを実証する。

#### 【0133】

##### 実施例3：非ヒト霊長類におけるAAV媒介性GRN遺伝子導入

GRN-/-マウスにおける所見は、AAVベクターのCSFへの送達が、治療レベルのPGRNを産生し、PGRN欠乏に関連する生化学的および組織学的所見を予防または逆転させるのに十分な脳形質導入を達成できることを実証する。このアプローチをヒトに置き換えるために、臨床的に関連するベクター投与経路であるICM送達を使用して、非ヒト霊長類で研究を実施した。大槽内への注入による髄腔内AAV送達は、低侵襲性のアプローチであり、腰椎穿刺による投与よりも広範な脳形質導入をもたらす(Hindere C, et al. Molecular therapy Methods & clinical development. 2014; 1: 14051)。3～10歳のNHPを利用したのは、この年齢が意図される成人患者集団を表すためである。アカゲザル(1群あたりN=2)は、AAV1、AAV5、またはAAVhu68ベクターのイメージガイドによる単回ICM注入が投与され、これらのベクターは、ニワトリBAプロモーターおよびCMV IEエンハンサー(CB7プロモーターと称される)の制御下で、hPGRN(配列番号3)と称される導入遺伝子からヒトGRNを発現する。さらなる群が、ユビキチンCプロモーター(UBC)から発現される異なる操作導入遺伝子配列(hPGRNv2、配列番号4)を担持するAAVhu68ベクターで処置された。CSF中のヒトプログラニュリンのレベルは毎週測定され、注入の35日後、組織病理学の分析のために、動物が犠牲になった。予備的な安全性分析が実施され、毎日のケージぎわでの観察、一連の身体検査、全血球数、血清化学パネル、CSF化学検査および細胞診断、および脳および脊髄の顕微鏡評価を伴う完全な剖検が含まれた。以下の表に、処置群を要約する。

10

20

30

40

50

【表4】

カプシド	導入遺伝子	プロモーター	種	N	ROA	用量	注入量
AAVhu68	hPGRN	CB7	成体 アカゲザル	2	ICM	3.00× 10 <sup>13</sup> GC	1mL
AAVhu68	hPGRN v2	UbC		2			
AAV1	hPGRN	CB7		2			
AAV5	hPGRN	CB7		2			

10

## 【0134】

ベクター投与後のすべてのNHPのCSFにおいて、堅牢なPGRN発現が検出された(図7A)。AAVhu68ベクターで処置された2匹の動物は、健常なヒト対照のレベルよりも最大10倍高いCSFのヒトPGRNレベルを示し、GRN-/-マウスの脳におけるリソソーム異常を逆行させるレベルと類似していた。AAV5処置は、AAVhu68とほぼ同等のCSF発現レベルをもたらした。ヒトPGRNの発現は、AAV1ベクターで処置された動物において最大であり、正常なヒトレベルの40倍超に達した。AAVhu68およびAAV1ベクターで処置されたNHP由来のCSFおよび血漿の試料を、ヒトPGRNに対する抗体について試験した。4匹の動物は、すべて、ヒト導入遺伝子産物に対する抗体を発現し(図8A～図8C)、研究の終了時の発現レベルの低下を説明し得る。CSF中の抗ヒトPGRN抗体の応答の開始は、導入遺伝子の発現レベルと相関し、AAV1群では早い段階でピークに達した。

## 【0135】

AAVのICM送達は、すべての処置群で良好な耐容性を示した。毎日の観察、身体検査、全血球数、または血清化学パネルでは、処置関連の異常は確認されなかった。異種導入遺伝子を利用した他のICM AAV研究と同様に(Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018; 10: 79-88)、CSF分析から、すべてのベクター血清型について、注入の7～21日後に始まる無症候性リンパ球増加が明らかになり、導入遺伝子産物に対する抗体応答を反映した(図8A～図8C)。CSF細胞数は、ピークレベルから減少したが、ほとんどの動物について、剖検時も上昇したままであった。脳および脊髄の組織病理は、AAV1およびAAVhu68で処置された群について評価された。所見は、以前のICM AAV研究(Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018; 10: 79-88, Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018; 10: 68-78)と同様であり、髄膜および脈絡叢において時折確認される最小限のリンパ球浸潤、ならびにいくつかの後根神経節(DRG)および脊髄切片における感覚ニューロンおよびそれらに関連する軸索の変性を伴う。以前のICM AAV研究と同様に、感覚ニューロンの所見は、典型的には、重症度が最小限から軽度であり、臨床徴候を伴わなかった(Gurdab L, et al. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016; 24(2): 206-16, Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018; 10: 79-88, Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018; 10: 68-78)。いずれの動物の脳実質においても、ベクター関連の異常は認められなかった。

20

【0136】

非ヒト靈長類へのAAV1およびAAVhu68ベクターのICM投与後のCNS形質導

40

30

40

50

### 入の異なるパターン

本研究者らは、AAV1ベクターで処置されたNHPのCSFにおける著しく高いPGRN発現から、AAV1、AAV5、およびAAVhu68ベクターの形質導入パターンの差異をさらに探求することにした。GFPレポーター遺伝子を発現するAAV1、AAV5、またはAAVhu68ベクター( $3 \times 10^{13}$ GC、ベクターあたりn=2)の単回ICM注入がNHPに投与された。脳形質導入の組織学的分析のために、注入の28日後に動物が犠牲になった。

#### 【0137】

免疫組織化学では、AAV1およびAAVhu68ベクターで処置されNHPの脳全体にわたって、散在的なパッチ状の形質導入が明らかになった(未掲載)。最小限の形質導入は、AAV5ベクターを受けた動物の脳において顕著であった。AAV1とAAVhu68との間の形質導入における差異をより正確に特徴付けるために、複数の脳領域から回収された切片で形質導入細胞を定量化する半自動化方法を開発した。GFPおよび特定の細胞型のマーカーに対する蛍光標識抗体で染色された切片を使用して、NeuN、oli2、およびGFPの染色、続いて各タイプのGFP発現細胞の定量によって、それぞれ、ニューロン、オリゴデンドロサイト、およびアストロサイトの総数を定量した(図9、図10)。AAV1およびAAVhu68は、それぞれ、調べたすべての領域で、各細胞型の1パーセント未満を形質導入した。ニューロンの形質導入は、2つのベクター間でほぼ同等であったが、AAVhu68は、わずかに多くのアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトを形質導入したように見えた。

10

#### 【0138】

AAV1で達成された劇的に高いCSFのPGRNレベルを考慮すると、AAV1およびAAVhu68ベクターで観察されたほぼ同等の脳形質導入は、予想外であった。上衣細胞の形質導入は、AAVhu68で処置された動物およびAAV1で処置された動物RA1826の側脳室および第4脳室の複数の領域において、免疫組織化学によって評価された。興味深いことに、AAV1処置動物(RA1826)からの複数の脳切片は、脳室系の一部を含み、脳室に沿って並ぶ上衣細胞の広範な形質導入を示したが、これは、AAVhu68処置動物のいずれにおいても観察されなかった(未掲載)。側脳室の前角、側角および後角と第4の脳室とを含む、すべてのサンプリングされた領域にわたって、平均48%の上衣細胞が形質導入された。対照的に、AAVhu68ベクターを与えられた動物の同じ脳領域では、1~2%の上衣細胞のみが形質導入された。第2のAAV1処置動物において1つの側脳室の小さなセグメントのみが評価可能であり、約1%の上衣細胞の形質導入を示したもの、分析は、小さなサンプリング領域に限定された。これらの知見は、他の細胞型の形質導入が2つの血清型間で類似しているように見えることを考慮すると、AAV1処置動物において高度に形質導入される上衣細胞が、CSFにおける高レベルのPGRNの供給源であり得ることを示唆する。分泌されたPGRNによって媒介される傍観者効果により、GRN変異によって引き起こされるFTDは、例外的に、AAV遺伝子療法に適している。細胞外PGRNはニューロンに取り込まれ得るため、AAV1ベクターで達成される高いCSFのPGRNレベル(明らかに、頑強な上衣細胞の形質導入によって媒介されている)により、AAV1が、GRN遺伝子療法のための理想的な選択肢となる。

20

30

#### 【0139】

##### 実施例4：組換えAAV1.PGRN

rAAV1.PGRNは、1)AAV-ITRに隣接する導入遺伝子カセットをコードするAAVシスプラスミド(pENN-AAV.CB7.CI.hPGRN.rBG.KanRと称される)、2)AAV2-repおよびAAV1-capの遺伝子をコードするAAVトランスプラスミド(pAAV2/1.KanRと称される)、および3)ヘルペスアデノウイルスプラスミド(pAd-F6.KanRと称される)を用いたHEK293細胞の三重プラスミドトランスフェクションによって生成される。rAAV1.PGRNにパッケージングされたベクターゲノムのサイズは、4129塩基である。

40

50

## 【0140】

A . A A V ベクターゲノムプラスミドの配列エレメント

シスプラスミド ( p E N N . A A V . C B 7 . C I . h P G R N . r B G . K a n R ( p 4 8 6 2 ) と称される) 由来のベクターゲノムの線形マップは、図 2 を参照されたい。

## 【0141】

シスプラスミドは、以下のベクターゲノム配列エレメントを含む：

1 . 逆位末端反復 ( I T R ) : I T R は、同一の逆相補配列であり、 A A V 2 ( 1 3 0 塩基対 [ b p ] 、 G e n B a n k : N C \_ 0 0 1 4 0 1 ) は、ベクターゲノムのすべての要素に隣接する。 I T R 配列は、 A A V およびアデノウイルスヘルパー機能がトランスで提供される場合、ベクター D N A の複製起点およびベクターゲノムのパッケージングシグナルの両方として機能する。したがって、 I T R 配列は、ベクターゲノムの複製およびパッケージングに必要とされるシス配列のみを表す。

2 . ヒトサイトメガロウイルス最初期エンハンサー ( C M V I E ) : このエンハンサー配列は、ヒト由来の C M V ( 3 8 2 b p 、 G e n B a n k : K 0 3 1 0 4 . 1 ) は、下流の導入遺伝子の発現を増加させる。

3 . ニワトリ アクチングロモーター ( B A ) : この遍在性プロモーター ( 2 8 2 b p 、 G e n B a n k : X 0 0 1 8 2 . 1 ) を選択して、任意の C N S 細胞型における導入遺伝子の発現を駆動させた。

4 . キメライントロン ( C I ) : ハイブリッドイントロンは、ニワトリ アクチングロモーター ( 9 7 3 b p 、 G e n B a n k : X 0 0 1 8 2 . 1 ) およびウサギ グロビンスプライスアクセプターのエレメントを含む。イントロンは転写されるが、その両端のいずれかにある配列と合わせて、スプライシングによって成熟メッセンジャー R N A ( m R N A ) から除去される。発現カセットにおけるイントロンの存在は、核から細胞質への m R N A 輸送を促進し、それにより、翻訳のための m R N A の一定レベルの蓄積を高めることが示されている。これは、遺伝子発現レベルの増加を意図した遺伝子ベクターにおいて共通の特徴である。

5 . コード配列 : ヒト G R N 遺伝子の操作 c D N A は、ヒト P G R N ( h P G R N ) タンパク質をコードし、リソソーム機能および他の神経系の役割に関する ( 1 7 8 5 b p 、 G e n B a n k : N M \_ 0 0 2 0 8 7 . 3 、 5 9 3 アミノ酸 [ a a ] 、 G e n B a n k : N P \_ 0 0 2 0 7 8 ) 。

6 . ウサギ グロビンのポリアデニル化シグナル ( r B G P o l y A ) : r B G P o l y A シグナル ( 1 2 7 b p 、 G e n B a n k : V 0 0 8 8 2 . 1 ) は、 c i s で導入遺伝子の m R N A の効率的なポリアデニル化を促進する。このエレメントは、転写終結、新生転写物の 3 ' 末端での特異的切断事象、および長いポリアデニル鎖付加のためのシグナルとして機能する。

## 【0142】

B . A A V 1 トランスプラスミド : p A A V 2 / 1 . K a n R ( p 0 0 6 9 )

A A V 2 / 1 トランスプラスミドは、 p A A V 2 / 1 . K a n R ( p 0 0 6 9 ) である。 p A A V 2 / 1 . K a n R プラスミドは、鎖長が 8 1 1 3 b p であり、 A A V ベクターゲノムの複製およびパッケージングに必要とされる 4 つの野生型 A A V 2 レプリカーゼ ( R e p ) タンパク質をコードする。 p A A V 2 / 1 . K a n R はまた、 3 つの野生型 A A V 1 ビリオンタンパク質カプシド ( C a p ) タンパク質をコードし、 A A V ベクターゲノムを収容するために A A V 血清型 1 ( A A V 1 ) のビリオンシェルに組み立てられる。 p A A V 2 / 1 . K a n R に含まれる A A V 1 c a p 遺伝子は、サル源から単離された。

## 【0143】

p A A V 2 / 1 . K a n R 構築物を作製するために、 p 5 E 1 8 ( 2 / 2 ) からの 3 . 0 キロ塩基 ( k b ) 断片、 p A V 1 H からの 2 . 3 k b 断片、および p 5 E 1 8 ( 2 / 2 ) からの 1 . 7 k b 断片を組み込んで、 p A A V 2 / 1 ( p 0 0 0 1 ) を形成し、これは、アンピシリン耐性 ( A m p R ) カセット ( 文献では p 5 E 1 8 [ 2 / 1 ] と称される ) 中に A A V 2 r e p および A A V 1 c a p を含む。このクローニング戦略では、 A A

10

20

30

40

50

V p 5 プロモーター（通常rep発現を駆動する）を、repの5'末端からcapの3'末端へと移し、repの上流の切断型p5プロモーターを残す。この切断型プロモーターは、repの発現を下方制御し、結果として、ベクター產生を最大化する役割を果たす（Xiao et al., (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J Virol. 73 (5) : 3994 - 4003）。

#### 【0144】

臨床製品の製造のためのpAAV2/1.KanRを生成するために、pAAV2/1の骨格配列におけるアンピシリン耐性（AmpR）遺伝子をカナマイシン耐性（KanR）遺伝子で置換した。トランスプラスミドのすべての構成部品は、直接配列決定によって検証された。

#### 【0145】

C. アデノウイルスヘルパープラスミド：pAdDeltaF6 (KanR)

プラスミドpAdDeltaF6 (KanR)は、ペンシルベニア大学のJames M. Wilson博士および同僚の研究室内で構築され、サイズは15,774 bpである。このプラスミドには、AAV複製に重要なアデノウイルスゲノムの領域、すなわちE2A、E4、およびVA RNAが含まれている（アデノウイルスE1の機能は、HEK293細胞によって提供される）。しかしながら、このプラスミドには、他のアデノウイルスの複製遺伝子または構造遺伝子は含まれていない。プラスミドは、アデノウイルスITRなどの複製に重要なシスエレメントを含んでおらず、したがって、感染性のアデノウイルスが產生されることは予想されない。プラスミドは、Ad5のE1、E3欠失分子クローン（pBHG10、pBR322ベースのプラスミド）に由来した。Ad5に欠失を導入して、不要なアデノウイルス遺伝子の発現を除去し、かつアデノウイルスDNAの量を削減した（32 kbから12 kbへ）。最後に、アンピシリン耐性遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子によって置換して、pAdeltaF6 (KanR)を作製した。このプラスミドに残るE2、E4、およびVAIのアデノウイルス遺伝子は、HEK293細胞に存在するE1と共に、AAVベクター產生に必要である。ベクターは、図13および図14に示される以下のフローチャートに従って生成される。

#### 【0146】

最終生成物は、USP<791>によって決定される6.2~7.7の範囲のpH、USP<785>によって決定される260~320mOsm/kgの浸透圧、およびddPCRによって決定される $2.5 \times 10^{13}$  GC/mL以上のGC力値を有する必要がある（Lock et al., (2014). "Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR." Hum Gene Ther Methods. 25 (2) : 115 - 25。

#### 【0147】

実施例5：GRN-/-マウスにおけるrAAV1.PGRNの最小有効用量の特定

#### 【表5】

・用量 ・(GC/g脳質量)	・マウス(GC)	・NHP(GC)	・ヒト(GC)
$3.33 \times 10^{11}$	$1.30 \times 10^{11}$	$3.00 \times 10^{13}$	$4.33 \times 10^{14}$
$1.11 \times 10^{11}$	$4.40 \times 10^{10}$	$1.00 \times 10^{13}$	$1.44 \times 10^{14}$
$3.33 \times 10^{10}$	$1.30 \times 10^{10}$	$3.00 \times 10^{12}$	$4.33 \times 10^{13}$
$1.11 \times 10^{10}$	$4.40 \times 10^9$	-	$1.44 \times 10^{13}$

#### 【0148】

10

20

30

40

50

G r n - / - マウスモデルにおけるC N S 病変に対する、異なる用量のr A A V 1 . P G R N の影響を、以下のように評価する。有効性は、疾患病態生理に直接関連する定量的アウトカム尺度として機能する脳の蓄積病理（リポフスチン）の減少の程度によって評価される。さらに、N H P 毒性試験で検出されない可能性のある疾患特異的な毒性を特定するために、全血球数および血清化学パネル用の最後の採血、ならびに標的臓器の組織病理が含まれる。マウスは、G R Nハプロ不全を有する高齢の対象における疾患状態を再現するために、広範囲にわたるリポフスチン蓄積が存在する場合、5 ~ 6 ヶ月齢で処置される。G r n - / - マウスは、I C V 注入によって、4 回用量のr A A V 1 . P G R N ( 1 . 3 0 × 1 0 1 1 G C 、 4 . 4 0 × 1 0 1 0 G C 、 1 . 3 0 × 1 0 1 0 G C 、 または 4 . 4 0 × 1 0 9 G C ) またはビヒクル ( I T F F B [ 0 . 0 0 1 % の P l u r o n i c F - 6 8 を含む人工C S F ] ) のうちの1つを受ける（群あたりN = 1 5 ）。ビヒクル ( N = 1 5 ) で処置されたG r n + / + マウスは、正常な対照として機能する。処置9 0 日後、動物を犠牲にし、脳を回収し、切片化し、リポフスチン病変を定量する。M E D は、ビヒクル処置G r n - / - マウスと比較して、脳蓄積病変の有意な減少を示す用量によって決定された。有意性は、一元配置A N O V A 、続いて、該当する場合、テューキーの多重比較検定 ( = 0 . 0 5 ) を使用して決定される。

#### 【 0 1 4 9 】

##### 実施例6：非ヒト靈長類における毒性試験

r A A V 1 . C B 7 . C I . h P G R N . r B G は、血清型A A V 1 からなる非複製組換えアデノ随伴 ( A A V ) ベクターであり、これは、サイトメガロウイルスエンハンサーを有するニワトリベータアクチンプロモーターの制御下にある操作されたヒトプログラニユリン ( P G R N ) c D N A と、A A V 血清型2逆位末端反復に隣接するウサギ グロビンポリアデニル化配列とを含み、髄腔内最終製剤緩衝液 ( I T F F B ) 中で製剤化された。d d P C R 力価は、2 . 0 4 × 1 0 1 3 G C / m L であった。I T F F B のp H をp H 7 . 4 に調整して、試験物品生成物の溶解度を最大化した。対照物品は、投与日に調製した。希釈された物品は、同日の投薬まで、湿った氷上または2 ~ 8 で保たれる。

#### 【 0 1 5 0 】

I C M 投与後のr A A V 1 . P G R N の毒性を調査するために、9 0 日間のG L P 準拠安全試験を、成体アカゲザルで実施した。3 ~ 1 0 歳のN H P をこの研究に利用したのは、この年齢が意図される成人ヒト患者集団を表すためである。I C M のA A V 投与後、分泌された導入遺伝子産物が安定した定常レベルに到達するのに十分な時間を与えるために、9 0 日間の評価期間を選択した。アカゲザルは、3 つの用量レベル、計3 . 0 0 × 1 0 1 2 G C 、計1 . 0 0 × 1 0 1 3 G C 、もしくは計3 . 0 0 × 1 0 1 3 G C ( 用量あたりN = 3 ) のうちの1つの用量レベルのr A A V 1 . h P G R N またはビヒクル ( I T F F B 、N = 2 ) を受けた。用量レベルは、脳質量によってスケールされた場合、計画された最小有効用量 ( M E D ) の試験で評価されたものと同等であるように選択された（マウスでは0 . 4 g 、アカゲザルでは9 0 g を想定）。ベースラインの神経学的検査、臨床病理学（鑑別を伴う細胞数、臨床化学、および凝固パネル）、C S F 化学、およびC S F 細胞学を行った。r A A V 1 . P G R N またはビヒクルの投与後、動物を苦痛および異常行動の徴候について毎日モニタリングした。

#### 【 0 1 5 1 】

血液およびC S F 臨床病理評価ならびに神経学的検査は、r A A V 1 . P G R N またはビヒクル投与後の3 0 日間は毎週、およびその後は3 0 日間毎に実施した。ベースラインおよびその後の3 0 日毎の時点で、抗A A V 1 中和抗体 ( N a b ) 、ならびにA A V 1 およびr A A V 1 . P G R N 導入遺伝子産物に対する細胞傷害性T リンパ球 ( C T L ) の応答を、インターフェロン ( I F N - ) の酵素結合免疫スポット ( E L I S p o t ) アッセイによって評価した。

10

20

30

40

50

【表6】

種	Macaca mulatta
同義語	アカゲザル(Rhesus Macaques)
試験開始時の動物の年齢	3~8歳
試験開始時の動物の体重	3.0~10.0kg
使用した動物の数	計11匹 雄6匹 雌5匹

10

【表7】

群指定	1	2	3	4
rAAV1.PGRN/ITFFB	ビヒクル (ITFFB)	rAAV1.PGRN	rAAV1.PGRN	rAAV1.PGRN
rAAV1.PGRN用量(GC)	該当なし	3.0x10 <sup>12</sup>	1.0x10 <sup>13</sup>	3.0x10 <sup>13</sup>
アカゲザルの数	2	3	3	3
性別	両方	両方	両方	両方
ROA	ICM	ICM	ICM	ICM
投与量(mL)	最大2.0	最大2.0	最大2.0	最大2.0
剖検日	90±5	90±5	90±5	90±5

20

30

## 【0152】

rAAV1.PGRNまたはビヒクル投与の90日後、動物を安樂死させ、組織を回収し、網羅的な顕微鏡組織病理学的検査を行った。さらに、リンパ球は、剖検時にこれらの臓器内のカプシドおよび導入遺伝子産物の両方に反応するT細胞の存在を評価するために、肝臓、脾臓、および骨髄から採取される。

## 【0153】

ベクターの体内分布は、組織試料中のqPCRによって評価される。また、血清およびCSFの試料で、ベクターゲノムを定量する。ベクター排泄は、尿および糞便中で検出されたベクターゲノムの分析によって評価された。以前の研究では、ICM投与後のベクター分布のパターンが用量非依存的であり、ベクター用量がより多いほど、qPCRベースの生体分布アッセイで全体的なシグナルがより大きくなり、標的組織におけるベクターデポジションの検出において感度が最も高くなることが実証されていた。そのため、これらの分析は、最高用量コホートに対してのみ実施された(Hordeaux et al., 2018b)。

40

## 【0154】

## 神経伝導速度の評価

動物は、ケタミン/デクスマデトミジンの組み合わせで鎮静された。鎮静化された動物を、横臥位または仰臥位で手術台に配置し、ヒートパックで体温を維持した。電子加温装

50

置は、電気信号の取得に干渉する可能性があるため、推奨されなかった。

【 0 1 5 5 】

感覚神経伝導試験 (NCS) では、カソードが記録部位に最も近くになるように、刺激装置のプローブを正中神経上に配置し、2つの針電極を、第I I指の末節骨のレベル (参照電極) および基節骨のレベル (記録電極) で皮下に刺入し、一方、接地電極を刺激プローブ (カソード) の近位に配置した。小児刺激装置を使用した。誘発された応答を差次的に增幅し、モニターに表示した。初期取得刺激強度を0.0 mAに設定して、バックグラウンド電気信号の欠如を確認した。最適な刺激位置を見つけるために、刺激強度を10.0 mAまで増加させ、プローブを正中神経に沿って移動させながら、決定的な波形によって判断される最適な位置が見つかるまで連発刺激を生成した。プローブを最適な位置に保ったまま、ピーク振幅応答が増えなくなるまで、刺激強度を段階的に徐々に上げた。各刺激応答を記録し、ソフトウェアに保存した。最大10個の最大刺激を平均化し、正中神経について報告した。記録部位から刺激カソードまでの距離 (cm) を測定し、ソフトウェアに入力し、応答の立ち上がり潜時と距離 (cm) を使用して伝導速度を計算した。伝導速度と感覚神経活動電位 (SNAP) 振幅の平均値の両方が報告された。両側の正中神経を試験した。機器によって生成されたすべての生データは、治験資料の一部として保持された。

10

【 0 1 5 6 】

図11Aおよび図11Bは、NHPにおける正中感覚神経伝導検査の結果を示す。投与された用量では、正中感覚神経伝導への影響は観察されなかった。予備的組織学的分析は、主に、DRG、TRG、脊髄および末梢神経の背側白質路内の所見を示した (図12A ~ 図12D)。これらの所見は、DRG / TRG内のニューロン変性および脊髄および末梢神経の背側白質路内の軸索変性 (すなわち、軸索障害) からなっていた。全体的に、これらの所見は、すべての処置群にわたって観察されたが、両方の時点で、中用量群および高用量群の個々の動物において、発生率および重症度がより高くなる傾向があった。

20

【 0 1 5 7 】

GRN関連神経変性疾患の重症度を考慮すると、rAAV1. PGRNのICM投与のベネフィット / リスク特性が好ましいままであることが予想される。

【 0 1 5 8 】

実施例7：ヒト試験

30

GRN遺伝子の変異によって引き起こされる成人発症性神経変性疾患を有する患者におけるrAAV1. hPGRNの単回投与のヒト初回 (FIH) 第1 / 2相用量漸増試験を実施する (以下の表を参照)。rAAV1. hPGRNは、GRN遺伝子を置き換えるように設計される。このFIH試験は、安全性および耐容性を評価し、有効性に関する予備データを収集する。最大12名の症候性ヘテロ接合性GRN変異保因患者をrAAV1. hPGRNで治療し、最初に2年 (24ヶ月) の期間にわたって追跡し、投薬後5年間にわたって長期フォローアップを継続する。この試験は、登録用試験の開始を支持するデータを提供し、第1 / 2相最大耐容用量 (MTD) を利用する。この登録用試験は、疾患に関連する臨床転帰およびバイオマーカーに対するrAAV1. hPGRNの効果を評価する。すべての試験は、GRN関連神経変性疾患を有する成人患者における単回ICM用量のrAAV1. hPGRNの投与を含む。

40

50

【表 8 - 1】

プロトコルのタイトル:	グラニュリン前駆体(GRN)遺伝子のヘテロ接合変異によって引き起こされる成人発症性神経変性疾患有する成人患者の大槽(ICM)に送達されるrAAV1.hPGRNの単回用量の安全性および耐容性を評価するための第1/2相非盲検多施設用量漸増試験	10
対象の数:	最大12名の評価可能な対象	
目的:	<p>主要目的:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>以下の評価を通して、単回ICM用量の投与後の2年間(24ヶ月)にわたって、rAAV1.hPGRNの安全性および耐容性を評価すること: <ul style="list-style-type: none"> <li>○有害事象(AE)および重篤な有害事象(SAE)</li> <li>○バイタルサインと身体検査</li> <li>○心電図(ECG)</li> <li>○感覚神経伝導検査</li> <li>○臨床検査(血清化学、血液学、凝固検査、肝機能検査[LFT]、尿検査、CSF化学および細胞診)</li> <li>○ベクターおよび導入遺伝子産物の免疫原性</li> </ul> </li> </ul> <p>副次目的(探索的有効性):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>以下のエンドポイントに基づいて、単回ICM投与後の2年間(24ヶ月)にわたって、rAAV1.hPGRNの薬物動態および生物学的活性を評価すること: <ul style="list-style-type: none"> <li>○CSF中のPGRNタンパク質レベルに対するrAAV1.hPGRNの影響</li> <li>○rAAV1.hPGRNが脳皮質厚の変化に及ぼす影響</li> </ul> </li> </ul>	20
	<ul style="list-style-type: none"> <li>単回ICM投与後2年間(24ヶ月)にわたって、rAAV1.hPGRNの有効性を、以下によって評価すること: <ul style="list-style-type: none"> <li>○生存率に対するrAAV1.hPGRNの影響</li> <li>○ミニメンタルステート検査(MMSE)、臨床全般印象度変化(CGI-C)、前頭葉機能検査(FAB)、前頭側頭型認知症評価尺度(FRS)、前頭葉性行動質問紙(FBI)、統一パーキンソン病評価尺度(UPDRS)、言語流暢性検査、前頭側頭葉変性症の臨床認知症尺度評価項目合計(CDR-FTLD sb)、および神経精神症状質問紙(NPI)によって評価される臨床症状および日常機能に対するrAAV1.hPGRNの影響</li> </ul> </li> </ul> <p>探索的目的:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>単回ICM投与後の2年間(24ヶ月)にわたって、rAAV1.hPGRNの薬力学的效果を、以下による測定で、さらに評価すること: <ul style="list-style-type: none"> <li>○神経フィラメント軽鎖(NFL)、タウ、リン酸化タウ、および炎症マーカーのCSFレベル</li> </ul> </li> </ul>	30
		40

【表 8 - 2】

○PGRNの血漿レベル	
研究設計:	<p>これは、GRNハプロ不全によって引き起こされる成人発症性神経変性疾患有する成人対象において、単回ICM注入によって投与されるrAAV1.hPGRNの第1/2相、FIH、多施設、非盲検、単群、用量漸増試験である。安全性、耐容性、および臨床有効性を2年間にわたって評価し、すべての対象をrAAV1.hPGRNの投与後5年間にわたって追跡し、安全性および耐容性、薬物動態、ならびに臨床転帰の長期評価を行う。</p> <p>10</p> <p>本試験は、約-35日目から-7日目までの各潜在的な対象の適格性を決定するためのスクリーニング段階からなる。対象の適格性の確認および試験への参加後、対象は、脳磁気共鳴画像法(MRI)、CSF採取のためのLP、採血、採尿、バイタル、ECG、身体検査、および臨床評価を含むベースライン評価を受ける。ベースライン評価は、rAAV1.hPGRNの投与前の、-6日目から0日目(含む)の間に行われる。治療段階では、対象は1日目の朝に入院する。対象は、1日目に単回ICM用量のrAAV1.hPGRNを受け、観察のために投薬後、少なくとも24時間病院に留まる。その後の治験来院は、投与後7日目、14日目、30日目、および6ヶ月目に行われ、続いて、投与後の最初の2年間は6ヶ月ごとに行われる。</p> <p>さらなる3年間は12ヶ月ごとの頻度で、LTFU訪問は、投薬後5年間にわたって行われる。</p> <p>20</p>
	<p>治験は、単回ICM注入として、rAAV1.hPGRNが投与された以下の3つのコホートからなる:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・コホート1(低用量):3人の適格な対象を順次登録し、各対象間に4週間の安全性観察期間を伴って、低用量のrAAV1.hPGRNを投与する。安全性審査トリガー(safety review trigger、SRT)が観察されない場合、すべての利用可能な安全性データは、コホート1の第3の対象がrAAV1.hPGRNを投与された4週間後に、安全委員会(safety board)によって評価される。</li> <li>・コホート2(高用量):進行が決定された場合、3人の適格な対象が順次登録され、高用量のrAAV1.hPGRNが、各対象間に4週間の安全性観察期間を伴つて投与される。SRTが観察されない場合、すべての利用可能な安全性データは、コホート2の第3の対象がrAAV1.hPGRNを投与された4週間後に、安全委員会によって評価される。</li> <li>・コホート3(MTD):安全委員会による肯定的推奨が未決定である場合、6名の追加の対象が登録され、MTD用量のrAAV1.hPGRNが投与される。投薬は、各対象間の4週間の安全性観察期間とのずれはない。</li> </ul> <p>30</p>
	40

【表8-3】

	併せて、高用量コホートまたは低用量コホートのいずれかにおける9名の対象の総登録者、および(すべての用量にわたって)合計12名の対象が予想される。
選択基準:	<p>1.登録時に35歳以上75歳以下であること。</p> <p>2.ヘテロ接合GRN変異に起因する成人発症性神経変性疾患の臨床診断の確認。</p> <p>3.以下の基準のうちの1つによる原因としてのGRN変異の確認:</p> <p>a.アルツハイマー病および前頭側頭型認知症変異データベース(AD&amp;FTDMDB)による病原性に分類される変異(AD&amp;FTDMDB and Cruts,(2019).” Alzheimer Disease&amp;Frontotemporal Dementia Mutation Database.” <a href="http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/default.cfm?MT=1&amp;ML=1&amp;Page=MutByQuery&amp;Query=tblContexts.GeneSymbol%20In%20(%27GRN%27)&amp;Selection=Gene%20In%20(GRN)">www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/default.cfm?MT=1&amp;ML=1&amp;Page=MutByQuery&amp;Query=tblContexts.GeneSymbol%20In%20(%27GRN%27)&amp;Selection=Gene%20In%20(GRN)</a>から2019年1月16日に回収)、American College of Medical Genetics (ACMG)(Richards et al.,(2015). “ Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants:a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.” Genet Med.17(5):405-24)によって公開されたガイドラインに従う。</p> <p>b.AD&amp;FTDMDBでは「病原性不明瞭」またはACMGガイドラインでは「意義不明のバリエント」に分類され、患者が、同じかまたは関連する神経変性疾患の家族歴を有する。</p> <p>4.CDR-FTLDグローバルスコアが、0.5超、1以下。</p>

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

除外基準:	<p>1.完全な同意が提供できない、または同意を提供できる適切な連絡先を有する法的権限のある介護者がいない。</p> <p>2.MRI、ICM宗達、またはLPへの禁忌(例えば、局所感染、血小板減少症、凝固障害、頭蓋内圧の上昇(占拠性病変による[ICP])。</p> <p>3.AD&amp;FDMDBにおける「病原性ではない」、「良性バリアントである可能性が高い」、または「良性バリアント」としてのGRN変異の分類。</p> <p>4.免疫不全患者。</p> <p>5.ヒト免疫不全ウイルス(HIV)またはC型肝炎の試験結果が陽性の患者。</p> <p>6.GRN変異に起因しない他の悪性腫瘍または慢性CNS障害。</p> <p>7.治験責任医師の意見では、免疫抑制薬または全身性コルチコステロイドなど、患者にリスクをもたらす可能性のある薬物。非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)は、スクリーニング前の30日間安定した用量で使用され、試験期間中同じ用量で維持されることに同意がある場合、使用が許容される。</p> <p>8.悪性腫瘍(限局性皮膚癌を除く)、または遺伝性癌症候群の既往歴。以前に悪性腫瘍を成功裏に治療し、再発を除外するための十分なフォローアップ(腫瘍学者の意見に基づく)を有する対象は、治験委託者または被指名人による議論および承認の後に含めることができる。</p> <p>9.神経梅毒、水頭症、脳卒中、小血管虚血性疾患、コントロール不良の甲状腺機能不全、またはビタミン欠乏症を含む、GRN変異とは無関係の認知障害を引き起こす可能性のある任意の併発症。</p> <p>10.妊娠可能な女性の場合、スクリーニング来院時の血清妊娠検査で陽性尿が確認された場合、治験薬投与前の1日目の血清の結果で陽性尿が確認された場合、または治験中に追加の妊娠検査を行う意思がない場合。</p> <p>11.男性および妊娠可能な女性の場合、医学的に許容される二重バリア避妊法(殺精子剤と共にコンドーム/ダイアフラムの使用など)を使用する意思がない、またはスクリーニング日からベクター投与後52週間まで禁欲に従事する意思がない。</p> <p>12.治験責任医師の見解では、対象を過度のリスクにさらす可能性があるか、治験薬の評価を妨害し得るか、または対象の安全性もしくは研究結果の解釈を妨害し得る、任意の状態(例えば、任意の病歴、任意の現在の疾患の証拠、身体検査における任意の所見、または任意の検査異常)を有する。</p> <p>13.登録から30日以内に入院が必要な急性の病気があること。</p>
	10
	20
	30
	40

## 【0159】

## 投与経路および処置

r A A V 1 . h P G R N は、単回用量として、1日目に、大槽内への C T ガイドによる後頭下注入を介して対象に投与される。1日目に、5 . 6 m L の適切な力価で r A A V 1 . h P G R N を含むシリンジが、試験に関連する治験薬剤部 ( I n v e s t i g a t i o n a l P h a r m a c y ) によって調製され、処置室に送達される。

## 【0160】

治験薬の投与の前に、対象は、麻酔され、挿管され、無菌技術を使用して、注入部位が準備され、覆布がかけられる。L P を実施して、所定の体積の C S F を除去し、その後、

ヨード造影剤を髄腔内（IT）注入して、大槽の関連する解剖学的構造の可視化を補助する。静脈内（IV）造影剤は、IT造影剤の代替物として、針穿刺の前またはその間に投与され得る。IVまたはIT造影剤を使用するかどうかの決定は、介入医の判断に委ねられる。透視ガイド下、脊髄針（22～25G）を大槽内に進める。針の配置を補助するために、より大きな誘導針を使用してもよい。針の配置を確認した後、エクステンションセットを脊椎針に取り付け、CSFで充填する。介入医の裁量で、造影剤を含有するシリンジを、エクステンションセットに接続してもよく、少量注入することで、大槽内に針が配置されていることを確認することができる。針の配置を確認した後、rAAV1.hPGRNを含むシリンジをエクステンションセットに接続する。シリンジの内容物を1～2分かけてゆっくりと注入し、5.0mLの容量を送達する。

10

#### 【0161】

有害事象（AE）の収集、身体検査／神経学的検査、バイタルサイン、臨床検査（血清化学、血液学、凝固、LFT、尿検査）、ECG、神経伝導試験、およびCSF細胞診および化学検査（細胞数、タンパク質、グルコース）を含む安全性評価は、治験スケジュールの示された時間に実施される。

#### 【0162】

安全性評価のための統計的比較は計画されていない。すべての結果は説明のみである。データを列挙し、要約表を作成する。

#### 【0163】

二次エンドポイントおよび探索的エンドポイントについて統計的比較を実施する。各時点での測定値を、各対象のベースライン値、ならびに各エンドポイントについて利用可能である場合、健康なボランティアおよび同等のコホート特性を有するGRN患者からの自然歴データと比較する。すべてのデータは、対象データ一覧に示されている。カテゴリー変数は、頻度およびパーセンテージを使用して要約され、連続変数は、記述統計量（非見逃し観察の数、平均値、標準偏差、中央値、最小値、および最大値）を使用して要約される。グラフ表示は、適切に提示される。

20

#### 【0164】

GRNハプロ不全によって引き起こされる成人発症性神経変性の初期臨床症状は、不均一である。この不均一性は、疾患の進行と共に現れる追加の症状を伴う様々な診断をもたらす。症状の発症後、典型的には、患者が急速に減少するため、神経変性のいずれかの診断を有する患者は、確定された病原性ヘテロ接合GRN変異を有する限り、治療され得る。CDR-FTLDグローバルスコアを利用して、患者をスクリーニングしてもよい。この評価尺度は、FTLDスペクトル診断を有する患者における疾患の重症度を評価するよう設計されている。FTLD関連症状の他のGRN関連診断との重複、およびCDR-FTLDグローバルスコア（記憶、見当識、判断力と問題解決、社会適応、家庭状況と趣味、介護状況、行動、および言語）で捉えられるドメインの数により、この尺度は診断に使用することができる。CDR-FTLDグローバルスコアが0.5（軽度の症状のある患者を含む）を超える1以下であれば、遺伝子療法の利益が最大化される可能性が高い神経変性の初期段階で、症状のある患者の治療が可能になるであろう。この初期段階で患者を治療することによって、その後の疾患進行の変化または安定化、および追加の症状の発症の遅延の検出が可能になる。しかしながら、この集団において、CDR-FTLDグローバルスコアが最低0.5という要件は、スケールが運動表現型の障害を捉えるように最適化されていないため、運動に特化した診断への参入を排除する。

30

#### 【0165】

この遺伝子治療は、生理学的レベルを上回るPGRNの発現をもたらさないことが予想される。非臨床NHP研究におけるrAAV1.hPGRNの用量（FIH試験で使用される用量よりも多い）を使用すると、rAAV1.hPGRNのICM投与後、PGRNが正常に近いレベルで血清中に発現することが見出された。FIH試験に登録された対象は、当初、循環PGRNレベルが正常値の約30%であったため、循環血清PGRNレベルが正常値に回復する可能性があると予想される。患者の血液検査は、全血球計数（CB

40

50

C) パネルを通してスクリーニングされ、患者は、5年間のフォローアップの時点で、脳および上位脊椎のガドリニウム造影剤を用いたMRIを介して、腫瘍についてモニタリングされる。

【0166】

安全性および耐容性を主要エンドポイントとして測定することに加えて、副次的および探索的有効性のエンドポイントを、最近の文献に基づき、またGRN関連の神経変性の研究を専門とする一流の臨床医と協議して、この研究のために選択した。これらのエンドポイントは、その後の登録用試験のための適切なエンドポイントを特定することを目的として、臨床転帰および疾患バイオマーカーを追跡する。

【0167】

GRN変異によって引き起こされる神経変性は最終的に死亡をもたらすため、rAAV1.hPGRNが患者の生存に及ぼす影響は、本研究の有効性エンドポイントでもある。しかしながら、ほとんどの患者は、症状発症から7~11年の平均寿命を有するため、研究期間および試料サイズは、生存上の利益を実証するのに十分ではない場合がある。

10

【0168】

臨床症状および患者の日常機能に対するrAAV1.hPGRNの効果を評価する。標的患者集団によって示される表現型が不均一であるために、臨床症状の範囲にわたって発現される症状の進行を捕捉する機能的尺度および臨床的尺度が用いられる。提案された研究は、経時的な変化を測定するためにFAB、FRS、MMSE、CGI-C、NPI、およびFBIを利用する。これらの尺度は、主に、疾患の様々な臨床症状の進行または安定化に関する情報を提供する、認知、言語、神経心理学的行動、および日常機能に関連する能力を測定する。UPDRSはまた、運動症状の変化を捉るために含まれている。FIHでは、これらの有効性評価は、本質的に探索的であり、症状の減少を安定させるrAAV1.hPGRNの能力を経時的に捉えることを意図している。様々な臨床症状を有する患者の様々な臨床パラメータにわたるさらなる低下の速度に関するFIHからのデータは、適切なエンドポイントの選択にさらに情報を提供し、登録用試験の臨床的に有意義な変化を定義するために使用される。

20

【0169】

各臨床的尺度を、以下に簡単に説明する。

主に認知機能を測定する臨床的尺度

30

CDR-FTLD: CDR-FTLDは、ADスペクトル障害の重症度を評価するために歴史的に使用される古典的な臨床認知症評価(CDR)尺度の拡張版である。この評価には、CDRのオリジナルな6つのドメイン(記憶、見当識、判断力と問題解決、社会適応、家庭状況と趣味、介護状況)が含まれる。それはまた、より高い感度でFTLDスペクトル患者の減少の検出を可能にする、言語および行動の2つの追加のドメインを含む。0の評価スコアは、正常な行動または言語を示し、1、2、または3のスコアは、軽度から重度の障害を示す。CDR-FTLD評価項目合計(CDR-FTLD sb)は、個々のドメインの合計を表し、全体的な認知症の重症度を決定するために使用される。

【0170】

MMSE: MMSEは、臨床および研究の実践で広く使用されている11問の全体的な認知評価である。質問としては、例えば、「今年は何年ですか？季節はいつですか？何日ですか？何曜日ですか？何月ですか？」と尋ねられ、正解ごとに1ポイントが与えられ、質問ごとに最高得点が与えられる。総得点の上限は30点で、24点と27点の2つのカットオフがある。これらのカットオフは、認知機能低下の指標である。

40

【0171】

言語流暢性検査: 提案されている探索的有効性のエンドポイントの1つではないが、言語流暢性検査は、FIH試験全体を通して実施される。これは、同じ写真を各対象に提示し、口頭での説明を求めるこによって実施される可能性がある。説明中に、発話速度(単語/分)がカウントされ、記録され、最終的に定型発達の成人を反映する速度と比較される。

50

## 【0172】

## 主に運動機能を測定する臨床的尺度

U P D R S : U P D R S は、精神状態、行動および気分、ならびに日常生活での活動など、パーキンソニズムに関連するいくつかのドメインの 42 項目の 4 部構成の評価である。各項目には、0 (障害なしを示す) から 4 (最も重度の障害を示す) の範囲の評価尺度が含む。各部のスコアは、疾患の重症度を提供するために集計され、高スコアの 199 点は、最悪 / 最も重度の障害を示す。

## 【0173】

## 主に行動を測定する臨床的尺度

N P I : N P I は、脳の障害を有する患者における精神病理の存在を解明するために使用される。当初、これは A D 集団で使用するために開発されたが、他の条件における行動変化を評価するのに役立つと考えられている。この評価は、10 の行動ドメインと 2 つの自律神経領域で構成され、その中には、4 つのスコア：頻度、重症度、総合的な負担、および介護者の負担がある。N P I の総スコアは、行動ドメインのドメインスコアを加算し、介護者負担のスコアを減算することによって得られる。

10

## 【0174】

F B I : F B I は、b v F T D に特に関連する行動および人格の変化の 24 項目の評価であり、b v F T D と他の認知症間を区別する。b v F T D と診断された患者は、一般に、これらのタイプの変化の認識がないため、これは、主看護者との対面面接として実施される。行動と人格に関連するいくつかの分野に焦点を当て、各質問を 0 (なし) から 3 (重度 / ほとんどの場合) まで採点する。総スコアは、典型的には、病気の重症度と相関し、経時的な変化を評価するために使用することができる。

20

## 【0175】

## 認知機能と運動機能の両方を測定する臨床的尺度

C G I - C : C G I - C は、3 部の簡潔で広く使用されている評価のうちの 1 つである。これは、3 つの項目で構成され、臨床医によって評価される。C G I - C は、改善が完全に治療によるものであるかどうかにかかわらず、研究への登録から始まり、1 (非常に改善された) から 7 (非常に悪化した) の範囲の 7 段階で評価される。

## 【0176】

F A B : F A B は、前頭葉性遂行機能障害表現型認知症と A D 型認知症間の区別を補助するための簡易評価である。これは、軽度の痴呆患者 (M M S E > 24) において特に有用である。この評価は、6 部で構成され、認知、運動、および行動の領域に対処する。総スコアは 18、またはより高いスコアは、より良好なパフォーマンスを示す。

30

## 【0177】

F D R : F D R は、前頭側頭型認知症 (F T D) アブタイプ (すなわち、b v F T D、または P P A サブタイプのいずれか) と診断された患者のための簡易病期分類評価である。F D R は、経時的な F T D の疾患進行の差異を検出する。この簡単な面接は、主介護者と共に実施され、30 項目からなり、「起こらない」、「時々起こる」、または「常に起こる」に分類される。次いで、パーセンテージスコアが計算され、ロジットスコア (10 g i t s c o r e)、そして最終的には、重症度スコアに変換される。重症度スコアは、「非常に軽度」から「最重度」までの範囲である。

40

## 【0178】

コロンビア自殺重症度評価尺度 (C - S S R S) : C - S S R S スコアは、F I H の探索的有効性エンドポイントではないが、この評価は、研究にわたって実施される。C - S S R S は、自殺念慮、念慮の強度、および自殺行動を測定する 3 部構成の尺度である。この評価の結果は、尺度から直接取得される自殺行動致死率評価、自殺念慮スコア、および自殺念慮強度評価で構成される。0 を超える念慮スコアは、評価ガイドラインに基づいて、介入の必要性を示し得る。強度評価は、0 ~ 25 の範囲であり、0 は、自殺念慮の支持なしを表す。

## 【0179】

50

追加の探索的エンドポイントとして、患者の生存率が評価される。しかし、G R Nハプロ不全による神経変性と診断された患者は、症状の発症から7～11年の平均寿命を有する。したがって、研究期間、試料サイズ、および疾患の初期段階である対象の包含は、生存上の利益を実証するのに十分ではない場合がある。

#### 【0180】

r A A V 1 . h P G R Nの投与は、G R N関連ハプロ不全によって引き起こされる、主に前頭葉および側頭葉の皮質における萎縮（神経細胞の損失）の減少、および時間の経過に伴う全脳容積を安定化する。M R Iは、内側前頭皮質および頭頂領域の厚さの変化を追跡するために使用され得る。

#### 【0181】

生化学的バイオマーカーも評価される。C S F中および血漿中のP G R Nタンパク質のレベルは、A A V形質導入の読み出しとして測定され、r A A V 1 . h P G R Nの投与後、患者において増加する。神経フィラメント軽鎖（N F L）、タウ、リン酸化タウ、および他の炎症マーカーのC S Fレベルも追跡される。N F Lは、神経細胞の損失または損傷の一般的な指標と考えられる。タウおよびリン酸化タウは、A D、P D、およびいくつかの形態のF T Dで見られる病理に関連する。

#### 【0182】

患者の血液検査は、全血球計数（C B C）パネルを通してスクリーニングされ、患者は、5年間のフォローアップの時点で、脳および上位脊椎のガドリニウム造影剤を用いたM R Iを介して、腫瘍についてモニタリングされる。

#### 【0183】

r A A V 1 . h P G R Nの単回投与は、投与後、安全でありかつ耐容性がある。r A A V 1 . h P G R Nの単回投与は、臨床症状および患者の日常機能によって評価されるよう、生存率を改善し、かつ／または疾患の進行を低減する。治療は、神経認知機能の消失を遅らせる。

#### 【0184】

##### （配列表フリー テキスト）

以下の情報は、数値識別子<223>の下で、フリー テキストを含む配列について提供されている。

10

20

30

40

50

【表9-1】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
3	<223>操作されたヒトPGRN1のコード配列
4	<223>操作されたhPGRN2のコード配列 <220> <221>CDS <222>(1)..(1779)
5	<223>合成構築物
6	<223>ウサギグロビンポリA
7	<223>3' AAV ITR
8	<223>5' AAV ITR
9	<223>ヒトCMV IEエンハンサー
10	<223>CBプロモーター
11	<223>キメライントロン
12	<223>UbCプロモーター
13	<223>イントロン
14	<223>SV40後期ポリA
15	<223>アンピシリン耐性遺伝子
16	<223>COL E1起点
17	<223>EF-1aプロモーター
18	<223>F1起点
19	<223>カナマイシン耐性遺伝子
20	<223>P5プロモーター
21	<223>LacZプロモーター
22	<223>EF1a.huPGRN.SV40  <220> <221>反復領域 <222>(1)..(130)
23	<223>Ubc.PI.huPGRN.SV40
24	<223>CB7.CI.hPGRN1.rBG  <220> <221>その他の特徴 <222>(1)..(130) <223>5' ITR

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt;その他の特徴</p> <p>&lt;222&gt;(198)..(579)</p> <p>&lt;223&gt;CMV IEエンハンサー</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt;その他の特徴</p> <p>&lt;222&gt;(582)..(863)</p> <p>&lt;223&gt;ニワトリベータアクチナプロモーター</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt;その他の特徴</p> <p>&lt;222&gt;(958)..(1930)</p> <p>&lt;223&gt;キメライントロン</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt;その他の特徴</p> <p>&lt;222&gt;(1942)..(3726)</p> <p>&lt;223&gt;hPGRN</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt;その他の特徴</p> <p>&lt;222&gt;(3787)..(3913)</p> <p>&lt;223&gt;ウサギ <math>\beta</math> グロビンポリA</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt;その他の特徴</p> <p>&lt;222&gt;(4002)..(4131)</p> <p>&lt;223&gt;3' ITR</p>	10
25	<p>&lt;223&gt;AAV1 VP1遺伝子</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt;CDS</p> <p>&lt;222&gt;(1)..(2208)</p>	30
26	<223>合成構築物	40

【表9-3】

27	<223>AAV2 rep
28	<223>AAV5カプシドVP1遺伝子  <220> <221>CDS <222>(1)..(2172)
29	<223>合成構築物
30	<223>AAVhu68 VP1カプシド  <220> <221>CDS <222>(1)..(2211)
31	<223>合成構築物
32	<223>miRNA標的配列
33	<223>miRNA標的配列
34	<223>miRNA標的配列
35	<223>miRNA標的配列

10

20

30

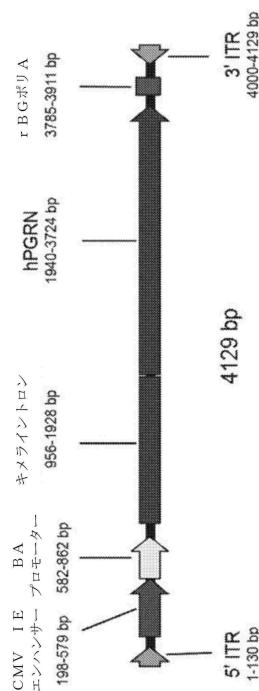
【0185】

本明細書に引用されるすべての文書は、参照により本明細書に組み込まれる。2019年2月22日に出願された米国仮特許出願第62/809,329号、2019年10月21日に出願された米国仮特許出願第62/923,812号、および2020年2月2日に出願された米国仮特許出願第62/969,108号は、それらの配列表と共に、それらの全体が参照により援用される。同様に、「18-8663PCT-ST25.txt」という名前で本明細書と共に提出された配列表、ならびにその中の配列およびテキストは、参照により援用される。本発明は、特定の実施形態を参照して記載されているが、本発明の趣旨から逸脱することなく修正を行うことができる事が理解されよう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲内であることが意図される。

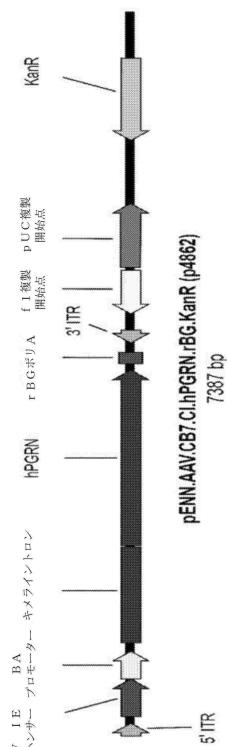
40

50

【図面】  
【図 1】



【図 2】

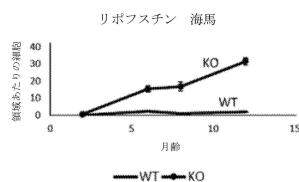


10

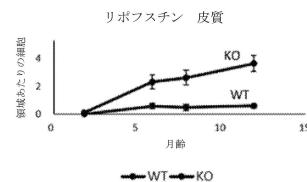
20

30

【図 3 A】



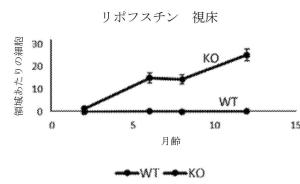
【図 3 B】



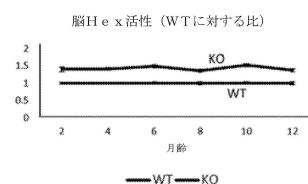
40

50

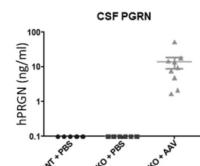
【図 3 C】



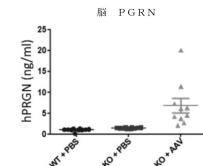
【図 3 D】



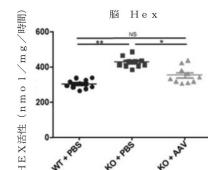
【図 4 A】



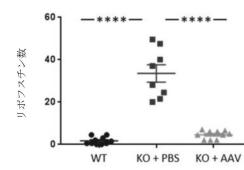
【図 4 B】



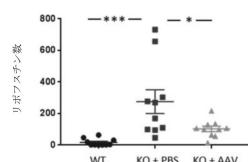
【図 4 C】



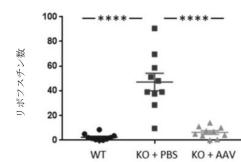
【図 4 D】



【図 4 E】



【図 4 F】



10

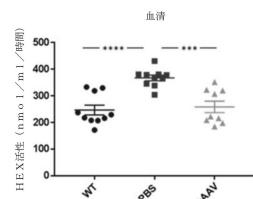
20

30

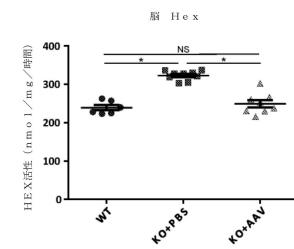
40

50

【図 4 G】

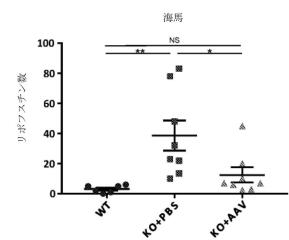


【図 5 A】

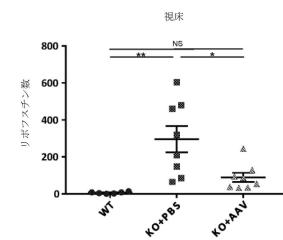


10

【図 5 B】

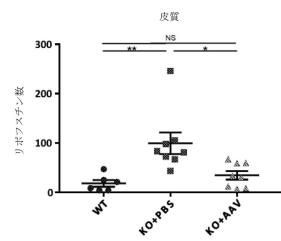


【図 5 C】

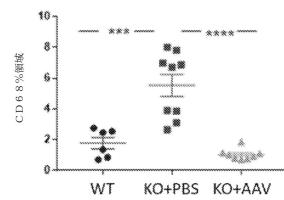


20

【図 5 D】



【図 6 A】

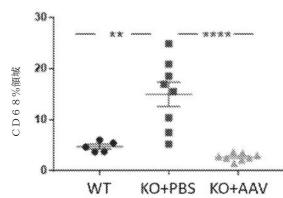


30

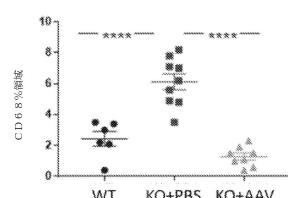
40

50

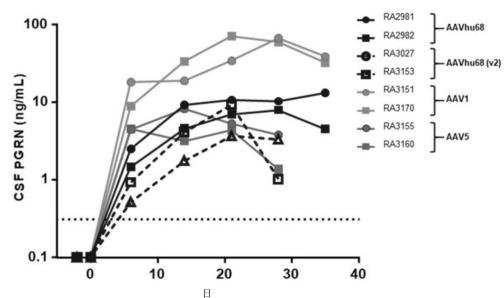
【図 6 B】



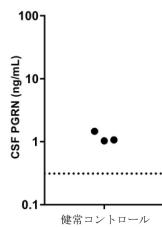
【図 6 C】



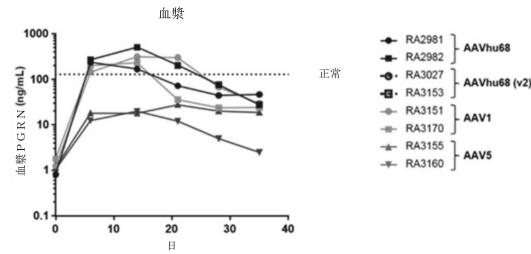
【図 7 A】



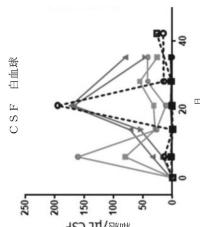
【図 7 B】



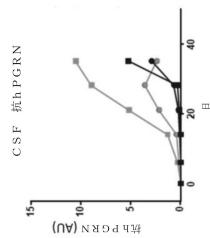
【図 7 C】



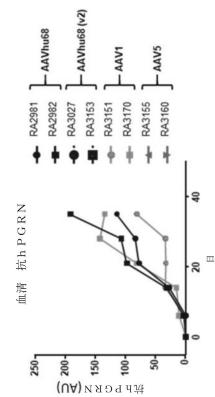
【図 8 A】



【図 8 B】

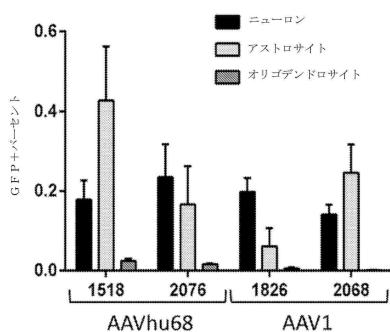


【図 8 C】



10

【図 9】



【図 10】

細胞マーカー	動物ID	領域					平均	
		1	2	3	4	5		
NeuN	1518	0.13	該当なし	0.205	0.34	0.167	0.049	0.178
	2076	0.106	0.227	0.258	0.528	0.053	該当なし	0.234
	1826	0.1	0.318	0.195	0.202	0.171	該当なし	0.197
	2068	0.218	該当なし	0.153	0.141	0.128	0.065	0.141
GFAP	1518	0.152	該当なし	0.202	0.914	0.39	0.476	0.427
	2076	0.011	0.064	0.235	0.511	0.011	該当なし	0.166
	1826	0.019	0.013	0.021	0.244	0.007	該当なし	0.061
	2068	0.066	該当なし	0.245	0.13	0.459	0.33	0.246
Olig2	1518	0.02	該当なし	0.03	0.04	0.009	0.023	0.024
	2076	0.02	0.023	0.011	0.013	0.013	該当なし	0.016
	1826	0	0.001	0.008	0.016	該当なし	0.001	0.005
	2068	0.002	0	該当なし	0.001	0.002	0.002	0.001

20

30

40

50

【図 1 1 A - 1 1 B】

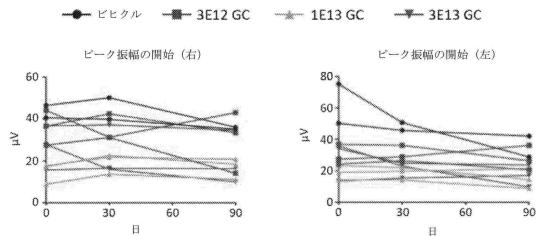
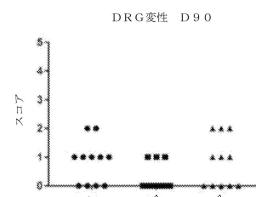


図 1 1 A

図 1 1 B

【図 1 2 A】



【図 1 2 B】

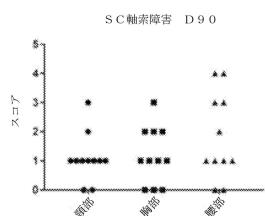


図 1 2 B

【図 1 2 C】

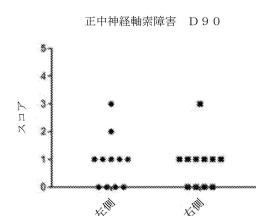


図 1 2 C

【図 1 2 D】

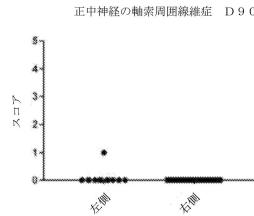
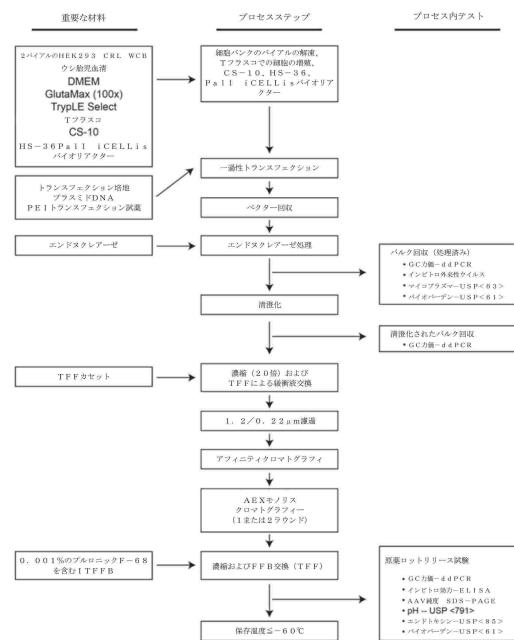


図 1 2 D

【図 1 3】



10

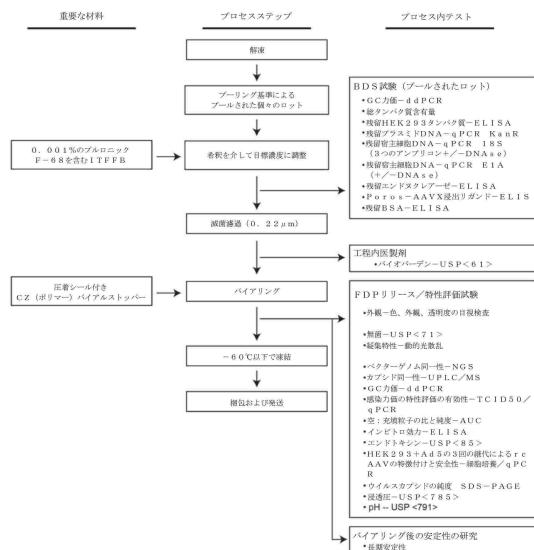
20

30

40

50

## 【図14】



## フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I  
C 1 2 N 15/12 (2006.01) C 1 2 N 15/12

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/969,108

(32)優先日 令和2年2月2日(2020.2.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

1 2 バーヴィン・アイリッシュロード 2 7 1

(72)発明者 ウイルソン, ジェームス・エム

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 3 フィラデルフィア・デランシーストリート 1 8 3 1

審査官 西 賢二

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 5 1 8 8 4 ( WO , A 1 )

特許第 7 4 3 6 0 8 9 ( J P , B 2 )

Yamazaki, Y. et al. , "Targeted gene transfer into ependymal cells through intraventricular injection of AAV1 vector and long-term enzyme replacement via the CSF" , Sci. Rep. , 2014 年 , Vol. 4; 5506 , pp. 1-7

Arrant, A. E. et al. , "Restoring neuronal progranulin reverses deficits in a mouse model of frontotemporal dementia" , Brain , 2017年 , Vol. 140 , pp. 1447-1465

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

A 6 1 K

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q