(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7128491号
(P7128491)

(45)発行日　令和4年8月31日(2022.8.31)

(24)登録日　令和4年8月23日(2022.8.23)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/864 (2006.01)		C12N	15/864	100Z
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	ZNA
C12N 15/113 (2010.01)		C12N	15/113	Z
A61K 35/76 (2015.01)		A61K	35/76	
A61P 25/02 (2006.01)		A61P	25/02	

請求項の数　12　（全28頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-522345(P2020-522345)
(86)(22)出願日　平成30年10月17日(2018.10.17)
(65)公表番号　特表2021-501573(P2021-501573A)
(43)公表日　令和3年1月21日(2021.1.21)
(86)国際出願番号　PCT/EP2018/078384
(87)国際公開番号　WO2019/076973
(87)国際公開日　平成31年4月25日(2019.4.25)
審査請求日　令和3年8月6日(2021.8.6)
(31)優先権主張番号　17382691.8
(32)優先日　平成29年10月17日(2017.10.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　519023754
フンダシオ インスティテュート ディン ベスティガシオ エン シエンシエス デラ サリュ ジャーマンス トライアス アイ プジョル
スペイン国，０８９１６ バダロナ，カミデ レス エスコレス エス／エヌ，カレッテラ デ カン ルティ
(73)特許権者　520132115
ゲンテック， エス．アー．
スペイン国 ０８０１４ バルセロナ カジェ タラゴナ ヌメロ １６１ プランタ １８
(74)代理人　110000796弁理士法人三枝国際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　フリードライヒ運動失調症の治療用のベクター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

核酸を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであって、該核酸が、

（ｉ）フラタキシンをコードする核酸配列と、

（ｉｉ）配列番号１のみからなるホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターと、

（ｉｉｉ）ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）と、

を含み、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）が（ｉ）に作動可能に連結し、（ｉ）の発現を調節し、（ｉ）と（ｉｉ）との間に操作上機能的なリンカーが存在し、該リンカーが配列番号６のみからなり、かつＡＡＶベクターがＡＡＶ血清型９ベクターである、ベクター。

【請求項２】

前記フラタキシンをコードする核酸配列が配列番号３、又は配列番号３と少なくとも９０％同一であり、フラタキシンの機能的変異体である配列を含む、請求項１に記載のベクター。

【請求項３】

前記フラタキシンをコードする核酸配列が配列番号３、又は配列番号３と少なくとも９８％同一であり、フラタキシンの機能的変異体である配列のみからなる、請求項１に記載のベクター。

【請求項４】

前記ＷＰＲＥが配列番号２、又は配列番号２と少なくとも９０％同一である配列のみか

らなる、請求項１～３のいずれか一項に記載のベクター。
【請求項５】
前記ＷＰＲＥが配列番号２、又は配列番号２と少なくとも９９％同一である配列のみからなる、請求項１～３のいずれか一項に記載のベクター。
【請求項６】
前記フラタキシンをコードする核酸配列が配列番号３のみからなり、かつ前記ＷＰＲＥが配列番号２、又は配列番号２と少なくとも９０％同一である配列のみからなる、請求項１に記載のベクター。
【請求項７】
前記フラタキシンをコードする核酸配列が配列番号３のみからなり、かつ前記ＷＰＲＥが配列番号２、又は配列番号２と少なくとも９９％同一である配列のみからなる、請求項１に記載のベクター。
【請求項８】
（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）及び前記リンカーを含む前記核酸の配列が配列番号４からなり、前記ＡＡＶベクターがＡＡＶ血清型９ベクターである、請求項１に記載のベクター。
【請求項９】
核酸を含むトランスファーベクターであって、
該核酸が、
（ｉ）フラタキシンをコードする核酸配列と、
（ｉｉ）配列番号１のみからなるＰＧＫプロモーターと、
（ｉｉｉ）ＷＰＲＥと、
を含み、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）が（ｉ）に作動可能に連結し、（ｉ）の発現を調節し、（ｉ）と（ｉｉ）との間に操作上機能的なリンカーが存在し、該リンカーが配列番号６のみからなり、該トランスファーベクターがさらに、ＡＡＶ－９ベクターへの該トランスファーベクターの組込み又は転位を促進する付加的な核酸エレメントを含む、トランスファーベクター。
【請求項１０】
請求項１～８のいずれか一項に記載のＡＡＶベクターと、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤とを含む医薬組成物。
【請求項１１】
医薬として用いられる、請求項１～８のいずれか一項に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１２】
フリードライヒ運動失調症の治療のために用いられる、請求項１～８のいずれか一項に記載のＡＡＶベクター。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、フリードライヒ運動失調症の治療のための新たな治療法の分野に含まれ得る。特に、本願は、遺伝子療法用の新たな製品に関する。該製品は、フリードライヒ運動失調症を治療することが可能である。
【背景技術】
【０００２】
フリードライヒ運動失調症（ＦＲＤＡ；ＯＭＩＭ　＃２２９３００）は、神経系に対して進行性損傷を引き起こし、歩行困難及び言語障害から心疾患又は心筋症に及ぶ症状を生じる、稀な遺伝性神経変性疾患である。この疾患は、１８６０年代に初めてこの疾患を記述した医師であるニコラウス・フリードライヒにちなんで名付けられた。フリードライヒ運動失調症では、ぎこちない動作及び不安定性等の運動協調性の問題とされる運動失調が脊髄内の神経組織、並びに腕及び脚の筋肉運動を制御する神経の変性により生じる。脊髄が萎縮し、神経細胞がそのミエリン鞘の一部を失う。フリードライヒ運動失調症は、稀で

はあるが、３００００人～５００００人の出生数で１例の範囲の最も一般的な遺伝性運動失調症であり、有病率は１０００００人当たり２例～４例である。男女共に同様に影響を受ける。症状は通常、５歳～１５歳の間に発現するが、稀に早ければ１８ヶ月又は遅ければ５０歳に現れる場合がある。最初に現れる症状は通常、歩行困難又は歩行失調である。運動失調は徐々に悪化し、腕から体幹へゆっくりと広がる。凹足、足指の不随意屈曲、又は槌状足指等の足変形が初期兆候として現れる場合がある。時間と共に、特に足、脚及び手の筋肉が弱り、消耗され始め、変形が生じる。他の症状としては、特に膝及び足首の腱反射の消失が挙げられる。四肢の感覚が徐々に失われることが多く、これが身体の他の部位に広がる場合がある。構音障害が生じ、患者は疲れやすくなる。眼振と呼ばれる、眼球の急速で律動的な不随意の運動がよく見られる。フリードライヒ運動失調症患者の殆どが脊椎側彎症を発症し、これは重度の場合に呼吸に影響を及ぼす可能性がある。

【０００３】

生じる可能性がある他の症状は胸痛、息切れ及び動悸である。これらの症状は肥大型心筋症、心筋線維症又は心不全等のフリードライヒ運動失調症を伴うことが多い様々な形態の心疾患によるものである。頻脈及び心ブロック等の心拍数異常もよく見られる。フリードライヒ運動失調症患者の約２０％が炭水化物不耐症を発症し、３０％が糖尿病を示す。聴力又は視力を失う罹患者もいる。疾患進行速度は人によって異なる。概して、初期症状の発現から１０年～２０年後に、罹患者は車椅子生活を余儀なくされ、疾患の後期には重症身体障害者（totally disabled）となる。平均余命が影響を受ける場合もある。フリードライヒ運動失調症患者の多くは、最も多い死因である関連心疾患によって成人期に死亡する。しかしながら、比較的症状が軽い一部のフリードライヒ運動失調症患者は、６０歳又は７０歳まで生きることもある。

【０００４】

ＭＲＩ等の神経画像検査は、疾患の初期段階では正常な外観を示すが、頸髄及び小脳の様々な萎縮が次第に明らかとなる。上小脳脚（superior peduncle）の萎縮が示されることが多い。電気生理学的研究では４０ｍ／ｓを超える伝導速度が示され、知覚神経活動電位の欠如又は低下、及びＨ反射の欠如が見られる。神経病理学的レベルでは、脊髄、後根、時には小脳の顕著な萎縮、及び心肥大が観察される。神経変性が末梢感覚神経で確認され、大型後根神経節感覚ニューロンの進行性消失、後柱変性、クラーク柱（Clarke's spine）のニューロン、及び脊髄小脳線維、錐体路の経シナプス変性、並びに薄束核及び楔状核の萎縮が見られる。二次病変としては、大型グルタミン酸作動性ニューロンに影響する小脳の歯状核の萎縮、並びにベッツ細胞及び皮質脊髄路の萎縮を挙げることができる。

【０００５】

１９９６年に、フリードライヒ運動失調症の原因が９番染色体（９ｑ２１バンド）上に位置するＦＸＮ遺伝子の分子の欠陥であることが特定された。この突然変異は、ＦＸＮ遺伝子の第一イントロンのＡＬＵ配列内に位置するＧＡＡトリプレットの異常なホモ接合伸長（homozygous expansion）からなる。ＦＲＤＡの患者の約９８％が、各々のＧＡＡ反復の数が２０１～１７００（より頻繁には６００～９００）である２本の染色体を有する。しかしながら、ＦＲＤＡの患者の２％～５％がＦＸＮ遺伝子中のＧＡＡ伸長及び点突然変異を複合ヘテロ接合（composite heterozygosis）で呈する（表１）。これまで、ＦＸＮ遺伝子中の１７種を超える異なる突然変異がＦＲＤＡを誘発することが可能であることが記載されている。ＦＲＤＡにおけるＧＡＡ伸長は、減数分裂時に非常に不安定であり、ＦＸＮ遺伝子の転写を妨げ、異常に低レベルのフラタキシンｍＲＮＡをもたらす。ＧＡＡ伸長は、ＦＸＮ遺伝子の転写をサイレンシングし、三重ＤＮＡ構造若しくはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、又はその両方の形成によりフラタキシン発現を無効にする。更に最近では、ＧＡＡ伸長がＧＡＡ過剰伸長（hyperexpansion）の近くでのヘテロクロマチン様構造の形成により転写の開始から伸長への移行を妨げることが提唱されている。ＧＡＡ伸長がＦＸＮ遺伝子の５’上流領域に位置するＣｐＧサイトのエピジェネティックメチル化をもたらし、それらのサイレンシングを引き起こすことも提唱されている。このため、ＦＸＮ遺伝子中のＧＡＡ突然変異の結果として、ＦＲＤＡにおいてフラタキシンタンパク質

の欠乏が生じる。

【０００６】

【表１】

OMIM	疾患の対立遺伝子変異体
606829.0001	イントロン１内のＧＡＡ伸長
606829.0002	エクソン３内のトランスバージョン：ＬＥＵ１０６Ｘ
606829.0003	スプライシングに影響する転位ｃ．３８５－２Ａ＞Ｇ
606829.0004	エクソン４内のミスセンス変異体：Ｉｌｅ１５４Ｐｈｅ
606829.0005	ミスセンス突然変異：Ｇｌｙ１３０Ｖａｌ
606829.0006	開始コドンに影響するミスセンス突然変異：Ｍｅｔ１Ｉｌｅ
606829.0007	ミスセンス突然変異：Ｔｒｐ１７３Ｇｌｙ
606829.0008	タンパク質切断を誘発するコドン７５内の１ｎｔの欠失
606829.0009	エクソン３内の６ｎｔの欠失及び１５ｎｔの挿入（ｃ．３７１＿３７６ｄｅｌ６ｉｎｓ１５）

表１．　フリードライヒ運動失調症を引き起こすＦＸＮ遺伝子中で特定された最もよく見られる対立遺伝子変異体

【０００７】

ＦＸＮ遺伝子は、フラタキシン（Ｑ１６５９５）と名付けられた、前駆体型で２１０アミノ酸（ａａ）を含有し、２３１３５Ｄａの分子量を有する小さな保存されたミトコンドリアタンパク質をコードする。この前駆体タンパク質型は、それをミトコンドリア基質へと指向するＮ末端トランジット配列を含有し、ミトコンドリア基質でミトコンドリアペプチダーゼにより成熟タンパク質フラタキシンの種々のより小さなアイソフォーム（ＦＸＮ４２－２１０、ＦＸＮ５６－２１０、ＦＸＮ８１－２１０、ＦＸＮ７８－２１０）へと変換され、１３０ａａ及び１４．２ｋＤａのＦＸＮ８１－２１０が最も豊富である。ヒトでは、フラタキシンは、多様な組織においてミトコンドリア基質の内膜に結合して検出され、最も高いレベルが心臓組織、脊髄及び分裂リンパ芽球において特定され、注目すべきことに最低レベルが小脳において特定される。これまで、フラタキシンは大脳皮質中では検出されていない。疾患に関与する遺伝子が特定され、幾つかの動物モデルが作成されたことから、ミトコンドリアの鉄恒常性、鉄貯蔵、酸化ストレスに対する応答、Ｆｅ－Ｓクラスターの生合成、ミトコンドリアアコニターゼ活性の調整及び酸化的リン酸化の調節等の種々の機能がフラタキシンについて想定されている。ＦＲＤＡでは、ＦＸＮ遺伝子におけるＧＡＡ伸長のホモ接合伸長によって生じるフラタキシン欠乏が、ミトコンドリアにおける電子輸送及びアコニターゼ集合に必要とされる鉄－硫黄クラスターの不十分な生合成をもたらし、その恒常性の変化によるミトコンドリア機能及びミトコンドリア鉄蓄積の調節異常につながる。フラタキシンは、ミトコンドリア基質におけるクエン酸回路に関与することに加えて、細胞の鉄の取込み及び利用を調節するタンパク質アコニターゼ１（ＡＣＯ１）のＤＮＡ結合能も調整する。

【０００８】

フリードライヒ運動失調症の幾つかの動物及び細胞モデルが遺伝子操作によって作成されている。ヒト疾患を可能な限り厳密に模倣するマウスのＡＦモデルの作成は困難な作業であったが、現在では８つの異なるＦＲＤＡのマウスモデルが存在する。残念なことに、それらのいずれも後根神経節（ＤＲＧ）及び小脳歯状核中の病変等のＦＡの全ての表現型症状の組合せを同じ動物において呈しないが、ＦＲＤＡにおける分子神経変性過程の単独の態様の研究及び特定の症状における種々の治療の評価に有用である。Ｐｒｐ－ＣｒｅＥＲＴマウス及びＹＧ８Ｒマウスが前臨床治療に最もよく使用されている。Ｐｒｐ－ＣｒｅＥＲＴマウスは、フリードライヒ運動失調症の最も顕著な神経学的機能である小脳性及び進行性の感覚性運動失調を特異的に発症する。これらの動物における組織学的研究は、ヒト疾患の特徴である運動神経障害を伴わない脊髄及び後根神経節の異常、並びに小脳のプルキンエ細胞の分枝欠陥を示す。対照的に、内因性マウスフラタキシンタンパク質を欠くＹＧ８Ｒトランスジェニックマウスは、緩徐進行性のＦＲＤＡの病態を示す。ヒトとは対照的に、これらのマウスは心臓欠陥を示さない。

【０００９】
ヒトの病態に対する遺伝子療法に使用されるウイルスベクター及び非ウイルスベクターの中でも、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）に由来するベクターは、特にゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン－ピック病Ａ型、並びにムコ多糖症Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ　Ａ型、ＩＩＩ　Ｂ型、ＩＶ型及びＶＩＩ型の動物モデルにおいて重要な臨床的利点及び長期発現を示した。リソソーム蓄積症の動物モデルにおけるＡＡＶベクターの静脈内投与は血液、肝臓、脾臓、腎臓及び筋肉において正常値の最大１６倍の酵素活性の増大をもたらし、ＡＡＶベクターは、このタイプの病態の治療に極めて有用とされた。過去１０年間にわたって、ＡＡＶは、中枢及び末梢神経系の病態の治療のために行われる殆どの臨床試験で選択されるベクターであった（http://www.abedia.com/wiley/index.html）。重要なことには、これまで、これらのベクターによる有害作用は観察されておらず、結果は非常に有望である。このため、幾つかの要因からＡＡＶは中枢神経系（ＣＮＳ）に対して理想的な遺伝子送達ビヒクルとなった。フラタキシン配列を含むアデノ随伴ウイルスベクターは、マウスにおけるＦＲＤＡの治療に使用されている（非特許文献１、非特許文献２、非特許文献３、特許文献１）。しかし、従来技術で開示されているＡＡＶベクターは、フラタキシンを過剰発現又は過少発現し、ＦＲＤＡにおいて罹患した全ての標的細胞及びニューロンに到達しないため、ＦＲＤＡ、特にその神経学的兆候の効率的な治療には不適切である。このため、治療有効量でフラタキシンタンパク質を発現するＡＡＶベクターが必要とされる。

【先行技術文献】
【特許文献】
【００１０】
【文献】国際公開第２０１６／１５０９６４号
【非特許文献】
【００１１】
【文献】Gerard et al., 2014. Mol Ther Methods Clin Dev. 1: 14044
Chapdelaine et al., 2016. Gene Ther. 23(7): 606-614
Tremblay et al., 2015. Mol Ther. 23(Suppl. 1): pS153

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
現在、ＦＲＤＡの治療に効果的な療法は存在せず、したがってＦＲＤＡの治療のための新たな治療法が必要とされている。本発明の目的は、ＦＲＤＡの治療に適切な療法を提供することである。

【課題を解決するための手段】
【００１３】
本発明は、核酸を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであって、該核酸が（ｉ）フラタキシンをコードする核酸配列と、（ｉｉ）ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターと、（ｉｉｉ）ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）とを含む、ベクターを提供する。本発明は、（ｉ）フラタキシンをコードする核酸配列と、（ｉｉ）ＰＧＫプロモーターと、（ｉｉｉ）ＷＰＲＥとを含む核酸、該核酸を含むクローニングベクター、及び該核酸を含むトランスファーベクターも提供する。さらに、本発明は、本発明のＡＡＶベクターの作製への核酸、クローニングベクター又はトランスファーベクターの使用を包含する。また、本発明は、医薬組成物、及び薬剤、特にＦＲＤＡの治療のための薬剤としてのＡＡＶベクター、核酸又は医薬組成物の使用を提供する。

【図面の簡単な説明】
【００１４】
【図１】フラタキシン（ＦＸＮ）タンパク質発現に関するＳＹＮ（シナプシン）及びＦＸＮ（フラタキシン；１２５５ｂｐ）ヒトプロモーターの評価を示す図である。内因性プロモーター（ｐｈＦＸＮ）及びシナプシンニューロンプロモーター（ｐｈＳＹＮ）のフラグ

メントの調節下でのヒトフラタキシン（ＦＸＮ）タンパク質発現のレベルを高発現構成的プロモーターＣＭＶ下での発現と比較して試験するために、ヒト神経芽細胞腫ＳＨ－ＳＹ５Ｙ細胞に空ベクター（レーン１）、又はヒトシナプシン（ｐｈＳＹＮ）をコードする構築物（レーン３）、又はフラタキシン（ｐｈＦＸＮ）プロモーターの１２５５ｂｐフラグメント（レーン４）をトランスフェクトした。ｐｈＳＹＮ又はｐｈＦＸＮ（１２５５ｂｐ）を用いてヒトＦＸＮコード配列（ｈＦＸＮ　ＣＤＳ）を発現する構築物１．２及び１．３は、組み換えフラタキシンタンパク質（ｒＦＸＮ）の発現をもたらさなかった。ＨＡ、ヘマグルチニンタグ。

【図２】フラタキシン（ＦＸＮ）タンパク質発現に関するＷＰＲＥ配列と合わせたＳＹＮ（シナプシン）、ＮＳＥ（ニューロン特異的エノラーゼ）及びＦＸＮ（フラタキシン；１２５５ｂｐ）ヒトプロモーターの評価を示す図である。先の図１に示したｐｈＳＹＮプロモーター（レーン３、レーン４対レーン８）及びｐｈＮＳＥ（レーン６）からのＦＸＮの発現に対するＦＸＮに由来する５’末端の３２０ｂｐフラグメント、及びＷＰＲＥ配列の影響を評価した。種々の構築物をＨＥＫ細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後に溶解物を分析した。ＲＮＡの安定化におけるＷＰＲＥ配列の有効性がＣＭＶプロモーターからＦＸＮを発現する構築物に見られる（レーン２）。しかしながら、上記に示す調節エレメントの付加及び組合せはｐｈＳＹＮ、ｈｐＦＸＮ又はｐｈＮＳＥからのＦＸＮの発現をもたらさなかった。ＨＡ、ヘマグルチニンタグ；ｉＦＸＮ、中間型ＦＸＮ；ｍＦＸＮ、成熟型ＦＸＮ；ＷＰＲＥ、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント。

【図３】フラタキシン（ＦＸＮ）タンパク質発現に関するＣＭＶエンハンサー及びＷＰＲＥ配列と合わせたＳＹＮ（シナプシン）、ＮＳＥ（ニューロン特異的エノラーゼ）及びＦＸＮ（フラタキシン；１２５５ｂｐ）ヒトプロモーターの評価を示す図である。ＨＥＫ及びマウス神経芽細胞腫細胞Ｎ２ａにＳＹＮ、ＮＳＥ又はＦＸＮ（１２５５ｂｐ）プロモーターのいずれかと共にＣＭＶエンハンサーを含む構築物をトランスフェクトした。上記に示す調節エレメントの組合せはｐｈＳＹＮ、ｐｈＦＸＮ又はｐｈＮＳＥプロモーターからのＦＸＮの発現をもたらさなかった。ＨＡ、ヘマグルチニンタグ；ｉＦＸＮ、中間型ＦＸＮ；ｍＦＸＮ、成熟型ＦＸＮ；ＷＰＲＥ、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント。

【図４】フラタキシン（ＦＸＮ）タンパク質発現に対する、コザック（５’）及びＷＰＲＥ（３’）配列を付加したヒトプロモーターＳＹＮ（シナプシン）、ＮＳＥ（ニューロン特異的エノラーゼ）及びＦＸＮ（フラタキシン；１２５５ｂｐ）ヒトプロモーターの影響の評価を示す図である。種々の構築物をＨＥＫ細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後に溶解物を分析した。ＲＮＡの安定化におけるＷＰＲＥ配列の有効性がＣＭＶプロモーターからＦＸＮを発現する構築物に見られる（レーン１対レーン２）。プロモーターとＦＸＮコード配列との間にコザック配列及び１０５ｎｔ配列を付加することによる更なるＦＸＮ発現の増強がレーン２対レーン３に見られる。しかしながら、上記に示す調節エレメントの付加及び組合せはｐｈＳＹＮ、ｐｈＦＸＮ又はｐｈＮＳＥからのＦＸＮの発現をもたらさなかった。ＨＡ、ヘマグルチニンタグ；ｉＦＸＮ、中間型ＦＸＮ；ｍＦＸＮ、成熟型；ｐＦＸＮ、前駆体型；ＷＰＲＥ、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント。

【図５】フラタキシン（ＦＸＮ）タンパク質発現に関する、コザック（５’）及びＷＰＲＥ（３’）配列に加えたヒトプロモーターＰＧＫ１（ホスホグリセリン酸キナーゼ１）、ＮＳＥ（ニューロン特異的エノラーゼ）、ＳＹＮ（シナプシン）又はＦＸＮ（フラタキシン；１２５５ｂｐ）とＦＸＮのコード領域（ＣＤＳ）との間の規定のリンカーの組合せの評価を示す図である。示される種々の構築物をＮ２ａ（Ａ、Ｂ及びＥ）又はＨＥＫ（Ｃ及びＤ）細胞のいずれかにトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後に溶解物を分析した。プロモーターとコード領域との間に１０５ｂｐリンカーを使用した場合に、ｐｈＮＳＥ又はｐｈＦＸＮ（１２５５ｂｐ）プロモーターではなくｐｈＰＧＫからのＦＸＮの発現が常に検出された（Ａ、Ｃ及びＤ：レーン４；Ｂ：レーン５並びにＥ：レーン８）

。ＨＡ、ヘマグルチニンタグ；ｉＦＸＮ、中間型ＦＸＮ；ｍＦＸＮ、成熟型；ｐＦＸＮ、前駆体型；ＷＰＲＥ、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント。

【図６】ＹＧ８Ｒ　Ｔｇ／－及びＷＴマウスにおけるｒＡＡＶ９ベクター（４．６×１０１２ｖｇ／ｋｇ）の髄腔内注射後のＰＧＫ１（ホスホグリセリン酸キナーゼ１）ヒトプロモーター下のルシフェラーゼ（ＬＵＣ）の発現を示す図である。ルシフェラーゼの発現を、ベクターの髄腔内注射の３．５ヶ月後に１５０ｍｇ／ｋｇ（マウス体重）のＤ－ルシフェリンを１５０μｌ腹腔内注射した後に検出した（Ａ）。器官を解離させ、ルシフェラーゼ基質を新たに添加した後、画像を取り込んだ（相対スケールを左パネル及び右パネルの横に示す（Ｂ））。

【図７】ｒＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮを髄腔内投与した７ヶ月齢マウスにおけるフラタキシンｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ発現を示す図である。フラタキシンｍＲＮＡレベルを７ヶ月齢のＹＧ８Ｒヘミ接合トランスジェニック（Ｔｇ／－）又はホモ接合（Ｔｇ／Ｔｇ）マウスの肝臓、心臓、腰部後根神経節（ＤＲＧ－Ｌ）、腰髄（ＳＣ－Ｌ）、胸髄（ＳＣ－Ｔ）、頸髄（ＳＣ－Ｃ）、小脳（Ｃｂ）及び脳（前頭部Ｃ１）組織においてｑＲＴ－ＰＣＲによって定量化した。ＹＧ８Ｒヘミ接合トランスジェニックマウス（Ｔｇ／－）にはｒＡＡＶ－Ｎｕｌｌ（黒色で示す）又はｒＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮ（薄い灰色で示す）のいずれかを投与し、ＦＲＤＡホモ接合トランスジェニックマウス（Ｔｇ／Ｔｇ）（濃い灰色で示す）には注射しなかった。染色体の一方に約８２個及び約１９０個のＧＡＡトリヌクレオチド配列反復を有するヒトＦＸＮ遺伝子の２つのタンデムコピーを保有するＹＧ８Ｒヘミ接合マウス（Ｔｇ／－）とは異なり、ホモ接合ＹＧ８Ｒマウスは、各染色体に２つのタンデムコピーを有する。ヒトＦＸＮについてホモ接合又はヘミ接合のいずれのＹＧ８Ｒマウスも、マウスＦｘｎノックアウト遺伝的背景を有することから内因性Ｆｘｎを発現しない。ホモ接合ＹＧ８Ｒマウスは、より多くのヒト導入遺伝子のコピーを有した上で正常機能を示すことからヒトＦＸＮ　ｍＲＮＡについてより高発現の対照として働いた。マウスには２．５ヶ月齢で髄腔内注射し、ヒトＦＸＮ特異的プライマーを使用して種々の組織におけるＦＸＮ　ｍＲＮＡを定量化した。全ＦＸＮ　ｍＲＮＡのレベルを、分析した各組織についてｒＡＡＶ９－Ｎｕｌｌで処理したＹＧ８Ｒヘミ接合マウス（Ｔｇ／－）において検出されたレベルに対して正規化した。ｒＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮベクターの髄腔内注射の５ヶ月後に、ＦＸＮ　ｍＲＮＡのレベルは、ＡＡＶ－Ｎｕｌｌ処理したＴｇ／－マウスにおけるレベルと比較して、全ての組織において試験投与量でｒＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮを注射したヘミ接合ＹＧ８Ｒマウス（Ｔｇ／－）でより高かった（１．３倍及び３．２倍前後）が、これはホモ接合ＹＧ８Ｒマウス（Ｔｇ／Ｔｇ）におけるレベルより高くはなかった。Ａ）雌及び雄の両方のマウスにおけるヒトＦＸＮ　ｍＲＮＡの相対レベル（ｎ＝６（３匹の雌及び３匹の雄））。ｒＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮ注射ＹＧ８Ｒマウスと比較した、対照ＡＡＶ－ｎｕｌｌを注射したフリードライヒ運動失調症マウスモデルであるＹＧ８Ｒマウスの倍率差は肝臓、後根神経節及び脊髄において統計的に有意であり（ｐ＝０．０１９、ｐ＝０．００４及びｐ＝０．０２４；アスタリスク＊で示される）、全ての他の組織で増加傾向が示される。より高い変動性が使用した用量で雌性マウスと比較して雄に観察された。Ｂ）雌性ＹＧ８ＲマウスにおけるｈＦＸＮ　ｍＲＮＡの相対レベル。アスタリスクで示され、下記表に挙げるように、フラタキシンレベルの統計的に有意な倍率差が研究した全ての組織で検出される。ｒＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮ注射マウスにおける倍率増加は、Ｔｇ／Ｔｇ　ＹＧ８Ｒマウスにおいて検出されるレベルより高いことはなかった。統計的有意性、ｐ＜０．０５＊、ｐ＜０．００５＊＊

【図８】髄腔内注射後のｒＡＡＶ９－ｈＰＧＫ１－ＦＸＮベクターからの組み換えフラタキシンタンパク質のｉｎ　ｖｉｖｏ発現を示す図である。空ベクター、又は陽性対照として使用されるフラタキシン発現ベクターをトランスフェクトした培養細胞Ｎ２ａの溶解物（図８Ａ及び図８Ｂ：レーン１及びレーン２）。Ｎ２ａ細胞及びＷＴマウスにおける内因性ＦＸＮタンパク質を抗ＦＸＮ抗体で検出する（Ａ及びＢ）。ＹＧ８Ｒマウスにおける導入遺伝子からのヒトＦＸＮタンパク質、及び注射マウスにおけるヒト組み換えＦＸＮタンパク質を肝臓及びマウス脳の両方で検出する（Ａ及びＢ）。１時間にわたるブロットと抗

ＦＸＮ抗体とのインキュベーションによりヒトＦＸＮタンパク質が明らかとなり始め、一晩（ｏ／ｎ）インキュベーションによりＷＴマウスにおけるマウスＦＸＮ、並びにヘミ接合マウス（Ｔｇ／－）及びホモ接合マウス（Ｔｇ／Ｔｇ）におけるヒトＦＸＮの両方が明らかとなる。注射したｒＡＡＶ９－ＦＸＮから発現される組み換えヒトＦＸＮタンパク質の発現のレベルは、ＷＴマウスにおける内因性マウスＦＸＮタンパク質のレベルと同様である。ＨＡ、ヘマグルチニンタグ；ｉＦＸＮ、中間型ＦＸＮ；ｍＦＸＮ、成熟型ＦＸＮ；ＷＰＲＥ、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント。

【図９】ｒＡＡＶ９－ＦＸＮベクターの注射後の経時的なＹＧ８Ｒマウスにおける足組み（clasping）反射の回復を示す図である。ｒＡＡＶ９－ＦＸＮ又はｒＡＡＶ９－ｎｕｌｌベクターを注射したヘミ接合（Ｔｇ／－）マウス及びＷＴにおいて、後肢の組みを障害の小さいものから大きいものへ０～３にスコアリングした（方法を参照されたい）。雌及び雄を合わせた結果（各群につきｎ＝１０、５匹の雄及び５匹の雌）。ヘミ接合ＹＧ８Ｒマウスでは、足組み反射の変化が早ければ４ヶ月齢で検出される。ｒＡＡＶ９－ＦＸＮベクターの髄腔内注射後に、足組み反射は正常化するようであり、この神経学的な病理学的表現型の経時的な回復が示される。アスタリスク（＊）は、ｒＡＡＶ９－ｎｕｌｌを注射したＷＴ及びＴｇ／－マウスについての値の有意差を表し、ナンバー記号（＃）は、ｒＡＡＶ９－ｎｕｌｌを注射したＴｇ／－マウス及びｒＡＡＶ９－ＦＸＮを注射したＴｇ／－マウスについて得られた値の有意差を表す。＊、＃：Ｐ＜０．０５

【図１０】ｒＡＡＶ９－ｈＰＧＫ１－ＦＸＮ注射マウスにおける組み換えフラタキシンタンパク質のｉｎ　ｖｉｖｏ発現が尾神経（caudal nerve）の刺激からの種々の距離（Ｄ１～Ｄ４）での電気生理学的性質を回復させることを示す図である。アスタリスク（＊）は、ｒＡＡＶ９－ｎｕｌｌで処理したＷＴ及びＴｇ／－　ＹＧ８Ｒ　ＦＲＤＡマウスの有意差を表し、ナンバー（＃）記号は、ｒＡＡＶ９－ｎｕｌｌ及びｒＡＡＶ９－ＦＸＮ　ＹＧ８Ｒで処理したマウスの有意差を表す。ｒＡＡＶ９－ＦＸＮベクターによる２．５ヶ月齢のマウスの髄腔内注射は、ＦＲＤＡ（ＹＧ８Ｒ）のＦＲＤＡマウスモデルにおける神経伝導の異常を予防する又は遅らせる。ＷＴ、緑色（ｎ＝１０）；ｒＡＡＶ９－ｎｕｌｌベクターで処理したＴｇ／－　ＹＧ８Ｒ　ＦＲＤＡマウス、灰色（ｎ＝１０）；ｒＡＡＶ９－ＦＸＮベクターで処理したＴｇ／－　ＹＧ８Ｒ　ＦＲＤＡマウス、青色（ｎ＝１０）。測定値を尾端から１ｃｍ、２ｃｍ、３ｃｍ及び４ｃｍの点で得て、それぞれ部位Ｄ１、Ｄ２、Ｄ３及びＤ４の値として表した。＊、＃：Ｐ＜０．０５。

【図１１】ｒＡＡＶ９－ＦＸＮで処理したＦＲＤＡマウスモデルであるＹＧ８Ｒマウスにおける後根神経節の維持を示す図である。腰部後根神経節の直径及びミトコンドリア形態は、ｒＡＡＶ９－ＦＸＮで処理したＦＲＤＡマウスモデルにおいて、ｒＡＡＶ９－ｎｕｌｌウイルスで処理した同じマウスと比較して維持されていたようであった。

【発明を実施するための形態】

【００１５】

定義

本出願で使用される「治療」及び「療法」という用語は、疾患及び／又は症状を治癒及び／又は緩和する目的と共に健康上の問題の改善を目標として使用される一連の衛生的手段、薬理学的手段、外科的手段及び／又は物理的手段を指す。「治療」及び「療法」という用語には、予防法及び治癒法が含まれる。それというのも、両者とも個体又は動物の健康の維持及び／又は回復に向けられるからである。症状、疾患及び廃疾の原因にかかわらず、健康上の問題を軽減及び／又は治癒するために適した医薬の投与は、本出願の文脈内の治療又は療法の形として解釈されるべきである。

【００１６】

「治療有効量」という用語は、治療効果を有し、ＦＲＤＡを治療することが可能な物質の量を指す。

【００１７】

「個体」、「患者」又は「被験体」という用語は、本出願において区別なく使用され、決して限定することを意図するものではない。「個体」、「患者」又は「被験体」は、任

意の年齢、性別及び身体状態であってもよい。
【００１８】
本明細書で使用される場合に、「薬学的に許容可能な担体」又は「薬学的に許容可能な希釈剤」は、医薬品投与と適合可能な任意の全ての溶剤、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤を意味する。医薬品活性物質用のそのような媒体及び作用物質の使用は、当該技術分野でよく知られている。許容可能な担体、賦形剤又は安定剤は、使用される投与量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、本発明の範囲を限定するものではないが、追加の緩衝剤、保存剤、共溶媒、アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤、ＥＤＴＡ等のキレート化剤、金属複合体（例えば、Ｚｎ－タンパク質複合体）、ポリエステル類等の生分解性ポリマー、ナトリウム、多価糖アルコール等の塩形成対イオン、アラニン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、オルニチン、ロイシン、２－フェニルアラニン、グルタミン酸及びトレオニン等のアミノ酸、ラクチトール、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイニシトース（myoinisitose）、ミオイニシトール（myoinisitol）、ガラクトース、ガラクチトール、グリセロール、シクリトール類（例えば、イノシトール）、ポリエチレングリコール等の有機糖類又は糖アルコール、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、α－モノチオグリセロール及びチオ硫酸ナトリウム等の硫黄含有還元剤、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン又は他の免疫グロブリン等の低分子量タンパク質、並びにポリビニルピロリドン等の親水性ポリマーが挙げられる。
【００１９】
「フラタキシン」という用語は、ＦＸＮ遺伝子によってコードされ、通常はミトコンドリア内に局在するタンパク質を指す。このタンパク質の詳細は、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢデータベースにアクセッション番号Ｑ１６５９５で見ることができる。
【００２０】
「プロモーター」という用語は、ＲＮＡポリメラーゼが転写を開始するために結合することができるＤＮＡ配列を指す。この配列は、転写因子等の転写を調節する様々なタンパク質の結合部位を更に含有し得る。プロモーター配列は、ＤＮＡ配列中に近接して局在し、リンカー又はスペーサーによって隔てられ得る種々のプロモーターフラグメント（異なる又は同じフラグメント）から構成されていてもよい。かかるプロモーターは、キメラプロモーターと称される。好ましい実施形態では、「プロモーター」という用語は、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターを指す。
【００２１】
「転写後調節エレメント」という用語は、転写された場合にタンパク質の発現を増強又は阻害する三次構造を生じるＤＮＡ配列を指す。
【００２２】
「作動可能に連結した」という用語は、或る核酸配列が別の核酸配列に影響を与えることができるように接続した２つ以上の核酸配列を指す。例えば、ＰＧＫプロモーター及びＷＰＲＥは、フラタキシンの発現レベルがＰＧＫプロモーター及びＷＰＲＥによって調節されるように、フラタキシンをコードする核酸配列に作動可能に連結する。
【００２３】
「機能的変異体」という用語は、核酸又はアミノ酸配列が１つ以上の位置で親核酸又はアミノ酸配列とは異なり（その違いは、核酸又はアミノ酸残基の付加、欠失及び／又は置換であり得る）、依然として機能的であり、したがってＦＲＤＡの治療に適している核酸又はアミノ酸を指す。当業者は、ＢＬＡＳＴ検索を用いてホモログを探索するか、又は集団内のタンパク質若しくは遺伝子の変動性を研究することで機能的変異体を決定することができる。
【００２４】
「アデノ随伴ウイルス」という用語は、ヒト及び他の幾つかの霊長類種に感染する小さなウイルスを指す。「ベクター」は、外来遺伝物質を細胞内に人為的に運び込むために使

用することができる任意のビヒクルである。このため、「ＡＡＶベクター」は、核酸を細胞内に運び込む組み換えＡＡＶを指す。

【００２５】

ＡＡＶベクター

第１の態様において、本発明は、核酸を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであって、該核酸が、

（ｉ）フラタキシンをコードする核酸配列と、

（ｉｉ）ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターと、

（ｉｉｉ）ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）と、

を含み、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）が（ｉ）に作動可能に連結し、（ｉ）の発現を調節する、ベクターを提供する。

【００２６】

配列番号１は、以下の配列を指す：

gaattccggggttggggttgcgccttttccaaggcagccctgggtctgcgcagggacgcggctgctctgggcgtggttccgggaaacgcagcggcgccgaccctgggtctcgcacattcttcacgtccgttcgcagcgtcacccggatcttcgccgctacccttgtgggccccccggcgacgcttcctgctccgcccctaagtcgggaaggttccttgcggttcgcggcgtgccggacgtgacaaacggaagccgcacgtctcactagtaccctcgcagacggacagcgccagggagcaatggcagcgcgccgaccgcgatgggctgtggccaatagcggctgctcagcagggcgcgccgagagcagcggccgggaaggggcggtgcgggaggcggggtgtggggcggtagtgtgggccctgttcctgcccgcgcggtgttccgcattctgcaagcctccggagcgcacgtcggcagtcggctccctcgttgaccgaatcaccgacctctctccccag

【００２７】

好ましい実施形態では、ＰＧＫプロモーターは配列番号１、又は配列番号１と少なくとも７５％同一の配列を含む。好ましくは、ＰＧＫプロモーターは配列番号１、又は配列番号１と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列を含む。より好ましくは、ＰＧＫプロモーターは配列番号１、又は配列番号１と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。

【００２８】

２つの配列間の配列同一性は、従来の方法により、例えばＢＬＡＳＴ等の現行の技術水準で既知の標準アラインメントアルゴリズムを用いて決定することができる（Altschul et al., 1990. J Mol Biol. 215(3): 403-10）。好ましい実施形態では、２つの配列間の配列同一性は、ＢＬＡＳＴを用いて決定する。

【００２９】

配列番号２は、以下の配列を指す：

TCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG

【００３０】

好ましい実施形態では、ＷＰＲＥは配列番号２、又は配列番号２と少なくとも７５％同一の配列を含む。好ましくは、ＷＰＲＥは配列番号２、又は配列番号２と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しく

は９９％同一の配列を含む。より好ましくは、ＷＰＲＥは配列番号２、又は配列番号２と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。

【００３１】

配列番号３は、以下の配列を指す：

ATGTGGACTCTCGGGCGCCGCGCAGTAGCCGGCCTCCTGGCGTCACCCAGCCCGGCCCA
GGCCCAGACCCTCACCCGGGTCCCGCGGCCGGCAGAGTTGGCCCCACTCTGCGGCCGCC
GTGGCCTGCGCACCGACATCGATGCGACCTGCACGCCCCGCCGCGCAAGTTCGAACCAG
AGAGGTCTCAACCAGATTTGGAATGTCAAAAAGCAGAGTGTCTATTTGATGAATTTGAG
GAAATCTGGAACTTTGGGCCACCCAGGCTCTCTAGATGAGACCACCTATGAAAGACTAG
CAGAGGAAACGCTGGACTCTTTAGCAGAGTTTTTTGAAGACCTTGCAGACAAGCCATAC
ACGTTTGAGGACTATGATGTCTCCTTTGGGAGTGGTGTCTTAACTGTCAAACTGGGTGG
AGATCTAGGAACCTATGTGATCAACAAGCAGACGCCAAACAAGCAAATCTGGCTATCTT
CTCCATCCAGTGGACCTAAGCGTTATGACTGGACTGGGAAAAACTGGGTGTACTCCCAC
GACGGCGTGTCCCTCCATGAGCTGCTGGCCGCAGAGCTCACTAAAGCCTTAAAAACCAA
ACTGGACTTGTCTTCCTTGGCCTATTCCGGAAAAGATGCTT

【００３２】

好ましい実施形態では、フラタキシンをコードする核酸配列は配列番号３、又は配列番号３と少なくとも７５％同一であり、フラタキシンの機能的変異体である配列を含む。好ましくは、フラタキシンをコードする核酸配列は配列番号３、又は配列番号３と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列を含む。より好ましくは、フラタキシンをコードする核酸配列は配列番号３、又は配列番号３と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。

【００３３】

好ましい実施形態では、核酸は、プロモーターとフラタキシンをコードする核酸配列との間にリンカーを更に含み、リンカーは配列番号６、又は配列番号６と少なくとも７５％同一の配列のみからなるか、又はそれを含む。好ましくは、リンカーは配列番号６、又は配列番号６と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列のみからなるか、又はそれを含む。

【００３４】

配列番号６は、以下の配列を指す：

TGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAG
GGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGCCGCCACC

【００３５】

好ましい実施形態では、核酸はコザック配列を更に含み、コザック配列は、フラタキシンをコードする核酸配列に同様に作動可能に連結し、その発現を調節する。コザック配列は、真核生物ｍＲＮＡ中に生じ、コンセンサス配列ｇｃｃＲｃｃＡＵＧＧ（ここで、Ｒはプリンであり、小文字は、その位置で最も一般的な塩基を表すが、塩基は異なる場合があり、大文字は高度に保存される）を有する配列である。

【００３６】

配列番号４は、以下の配列を指す：

GAATTCCGGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTCTGCGCAGGGACGC
GGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATT
CTTCACGTCCGTTCGCAGCGTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCCCCGG
CGACGCTTCCTGCTCCGCCCCTAAGTCGGGAAGGTTCCTTGCGGTTCGCGGCGTGCCGG
ACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAGGG
AGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGC
GCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCGGTAGT
GTGGGCCCTGTTCCTGCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCACGT

CGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAGTGGCTAACTAGA
GAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC
TGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGCCGCCACCATGTGGACTCTCGGGCGCCGCGCAG
TAGCCGGCCTCCTGGCGTCACCCAGCCCGGCCCAGGCCCAGACCCTCACCCGGGTCCCG
CGGCCGGCAGAGTTGGCCCCACTCTGCGGCCGCCGTGGCCTGCGCACCGACATCGATGC
GACCTGCACGCCCCGCCGCGCAAGTTCGAACCAGAGAGGTCTCAACCAGATTTGGAATG
TCAAAAAGCAGAGTGTCTATTTGATGAATTTGAGGAAATCTGGAACTTTGGGCCACCCA
GGCTCTCTAGATGAGACCACCTATGAAAGACTAGCAGAGGAAACGCTGGACTCTTTAGC
AGAGTTTTTTGAAGACCTTGCAGACAAGCCATACACGTTTGAGGACTATGATGTCTCCT
TTGGGAGTGGTGTCTTAACTGTCAAACTGGGTGGAGATCTAGGAACCTATGTGATCAAC
AAGCAGACGCCAAACAAGCAAATCTGGCTATCTTCTCCATCCAGTGGACCTAAGCGTTA
TGACTGGACTGGGAAAAACTGGGTGTACTCCCACGACGGCGTGTCCCTCCATGAGCTGC
TGGCCGCAGAGCTCACTAAAGCCTTAAAAACCAAACTGGACTTGTCTTCCTTGGCCTAT
TCCGGAAAAGATGCTTTGCCCACCTAGGGATCGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC
TGCAGATATCCAGCACACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCGACAATCAACCTCTGGA
TTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTAT
GTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT
TCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCA
GGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATT
GCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCG
GAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA
CAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTG
CCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCG
GACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGC
CCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG

【００３７】

好ましい実施形態では、（ｉ）、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）を含む核酸の配列は配列番号４、又は配列番号４と少なくとも７５％同一の配列である。好ましくは、（ｉ）、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）を含む核酸は配列番号４、又は配列番号４と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。

【００３８】

好ましい実施形態では、核酸はＰｏｌｙＡシグナルを更に含む。好ましくは、ＰｏｌｙＡシグナルは少なくとも５０ｂｐ長、１００ｂｐ長、１５０ｂｐ長又は２２８ｂｐ長である。より好ましくは、ＰｏｌｙＡシグナルは少なくとも２２８ｂｐ長である。最も好ましくは、ＰｏｌｙＡシグナルは２２８ｂｐ長である。

【００３９】

好ましい実施形態では、核酸は、１つ以上の逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列を更に含む。好ましくは、核酸は２つのＩＴＲ配列を含む。より好ましくは、ＩＴＲ配列が核酸の残りの構成要素に隣接する。

【００４０】

配列番号５は、以下の配列を指す：

CTGGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
TTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC
ACTAGGGGTTCCTGAATTCCGGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTC
TGCGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTG
GGTCTCGCACATTCTTCACGTCCGTTCGCAGCGTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCCTTG
TGGGCCCCCCGGCGACGCTTCCTGCTCCGCCCCTAAGTCGGGAAGGTTCCTTGCGGTTC
GCGGCGTGCCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGG
ACAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCT

GCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTG
TGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCCTGCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTC
CGGAGCGCACGTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG
TGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAG
GGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGCCGCCACCATGTGGACTCTCG
GGCGCCGCGCAGTAGCCGGCCTCCTGGCGTCACCCAGCCCGGCCCAGGCCCAGACCCTC
ACCCGGGTCCCGCGGCCGGCAGAGTTGGCCCCACTCTGCGGCCGCCGTGGCCTGCGCAC
CGACATCGATGCGACCTGCACGCCCCGCCGCGCAAGTTCGAACCAGAGAGGTCTCAACC
AGATTTGGAATGTCAAAAAGCAGAGTGTCTATTTGATGAATTTGAGGAAATCTGGAACT
TTGGGCCACCCAGGCTCTCTAGATGAGACCACCTATGAAAGACTAGCAGAGGAAACGCT
GGACTCTTTAGCAGAGTTTTTTGAAGACCTTGCAGACAAGCCATACACGTTTGAGGACT
ATGATGTCTCCTTTGGGAGTGGTGTCTTAACTGTCAAACTGGGTGGAGATCTAGGAACC
TATGTGATCAACAAGCAGACGCCAAACAAGCAAATCTGGCTATCTTCTCCATCCAGTGG
ACCTAAGCGTTATGACTGGACTGGGAAAAACTGGGTGTACTCCCACGACGGCGTGTCCC
TCCATGAGCTGCTGGCCGCAGAGCTCACTAAAGCCTTAAAAACCAAACTGGACTTGTCT
TCCTTGGCCTATTCCGGAAAAGATGCTTTGCCCACCTAGGGATCGGATCCCCGGGTACC
GAGCTCGAATTCTGCAGATATCCAGCACACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCGACAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTC
CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTA
TGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGT
GGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACT
GGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCT
ATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCT
GTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGC
TCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCC
TCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGT
CTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAT
TCGAGCTCGGTACGATCAGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT
GTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTT
TCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGG
GGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT
GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTGGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA
AAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT

【００４１】

好ましい実施形態では、核酸は配列番号５、又は配列番号５と少なくとも７５％同一の配列である。好ましくは、核酸は配列番号５、又は配列番号５と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。

【００４２】

好ましい実施形態では、ベクターにより、フリードライヒ運動失調症を患う患者における治療有効量のフラタキシンの発現が可能となる。このため、ベクターは核酸を患者の細胞に送達し、核酸が続いて治療有効量のフラタキシンを発現する。

【００４３】

好ましい実施形態では、ＡＡＶベクターはＡＡＶ血清型９ベクター、すなわちＡＡＶ－９ベクターである。

【００４４】

核酸

第２の態様では、本発明は、（ｉ）フラタキシンをコードする核酸配列と、（ｉｉ）ＰＧＫプロモーターと、（ｉｉｉ）ＷＰＲＥとを含む核酸であって、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ

）が（ｉ）に作動可能に連結し、（ｉ）の発現を調節する、核酸を提供する。
【００４５】
好ましい実施形態では、ＰＧＫプロモーターは配列番号１、又は配列番号１と少なくとも７５％同一の配列を含む。好ましくは、ＰＧＫプロモーターは配列番号１、又は配列番号１と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列を含む。より好ましくは、ＰＧＫプロモーターは配列番号１、又は配列番号１と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。
【００４６】
好ましい実施形態では、ＷＰＲＥは配列番号２、又は配列番号２と少なくとも７５％同一の配列を含む。好ましくは、ＷＰＲＥは配列番号２、又は配列番号２と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列を含む。より好ましくは、ＷＰＲＥは配列番号２、又は配列番号２と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。
【００４７】
好ましい実施形態では、フラタキシンをコードする核酸配列は配列番号３、又は配列番号３と少なくとも７５％同一であり、フラタキシンの機能的変異体である配列を含む。好ましくは、フラタキシンをコードする核酸配列は配列番号３、又は配列番号３と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列を含む。より好ましくは、フラタキシンをコードする核酸配列は配列番号３、又は配列番号３と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。
【００４８】
好ましい実施形態では、核酸は、プロモーターとフラタキシンをコードする核酸配列との間にリンカーを更に含み、リンカーは配列番号６、又は配列番号６と少なくとも７５％同一の配列のみからなるか、又はそれを含む。好ましくは、リンカーは配列番号６、又は配列番号６と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列のみからなるか、又はそれを含む。
【００４９】
好ましい実施形態では、核酸はコザック配列を更に含み、コザック配列は、フラタキシンをコードする核酸配列に同様に作動可能に連結し、その発現を調節する。
【００５０】
好ましい実施形態では、（ｉ）、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）を含む核酸の配列は配列番号４、又は配列番号４と少なくとも７５％同一の配列である。好ましくは、（ｉ）、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）を含む核酸は配列番号４、又は配列番号４と少なくとも７５％、８０％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。
【００５１】
好ましい実施形態では、核酸はＰｏｌｙＡシグナルを更に含む。好ましくは、ＰｏｌｙＡシグナルは少なくとも５０ｂｐ長、１００ｂｐ長、１５０ｂｐ長又は２２８ｂｐ長である。より好ましくは、ＰｏｌｙＡシグナルは少なくとも２２８ｂｐ長である。最も好ましくは、ＰｏｌｙＡシグナルは２２８ｂｐ長である。
【００５２】
好ましい実施形態では、核酸は、１つ以上の逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列を更に含む。好ましくは、核酸は２つのＩＴＲ配列を含む。より好ましくは、ＩＴＲ配列が核酸の残りの構成要素に隣接する。
【００５３】
好ましい実施形態では、核酸は配列番号５、又は配列番号５と少なくとも７５％同一の配列である。好ましくは、核酸は配列番号５、又は配列番号５と少なくとも７５％、８０

％、８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％同一の配列である。

【００５４】

クローニングベクター

第３の態様では、本発明は、上述の実施形態のいずれか１つによる核酸と、細菌細胞におけるクローニングベクターの複製を促進する付加的な核酸エレメントとを含むクローニングベクターを提供する。

【００５５】

「クローニングベクター」という用語は、概して制限部位、細菌増殖のための複製起点、及び選択可能なマーカーの存在を伴う、クローニングに適した任意のベクターを指す。

【００５６】

本発明のクローニングベクターは、本発明の核酸を含み、好ましくは本発明のトランスファーベクター又はＡＡＶベクターの作製に使用することができる。

【００５７】

トランスファーベクター

第４の態様では、本発明は、上述の実施形態のいずれか１つによる核酸と、ＡＡＶベクター、好ましくはＡＡＶ－９ベクターへのトランスファーベクターの組込み又は転位を促進する付加的な核酸エレメントとを含むトランスファーベクターを提供する。

【００５８】

「トランスファーベクター」という用語は、ＡＡＶベクターにおける組込み又は転位に適したベクターを指す。このため、トランスファーベクターは概して、ＡＡＶベクターへの遺伝情報の挿入を可能にする。

【００５９】

本発明のトランスファーベクターは、本発明の核酸を含み、好ましくは本発明のＡＡＶベクターの作製に使用することができる。

【００６０】

核酸、クローニングベクター及びトランスファーベクターの使用

第５の態様では、本発明は、上述の実施形態のいずれか１つによるＡＡＶベクターの作製への本発明の核酸、本発明のクローニングベクター又は本発明のトランスファーベクターの使用を提供する。

【００６１】

医薬組成物

第６の態様では、本発明は、本発明のＡＡＶベクター又は本発明の核酸と薬学的に許容可能な担体又は希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。

【００６２】

本明細書に記載される医薬組成物は、その他の物質も含有し得る。これらの物質としては、限定されるものではないが、凍結保護剤、凍結乾燥保護剤、界面活性剤、増量剤、酸化防止剤及び安定化剤が挙げられる。幾つかの実施形態では、医薬組成物は凍結乾燥されていてもよい。

【００６３】

本明細書で使用される「凍結保護剤」という用語は、ＡＡＶベクター表面から優先的に排除されることにより凍結誘導ストレスに対してＡＡＶベクターに安定性を与える作用物質を含む。凍結保護剤は、一次乾燥及び二次乾燥並びに長期産物貯蔵の間の保護も提供し得る。凍結保護剤の非限定的な例としては、スクロース、グルコース、トレハロース、マンニトール、マンノース及びラクトース等の糖類、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン及びポリエチレングリコール等のポリマー、ポリソルベート等の界面活性剤（例えば、ＰＳ－２０又はＰＳ－８０）並びにグリシン、アルギニン、ロイシン及びセリン等のアミノ酸が挙げられる。生物系における毒性が低い凍結保護剤が一般的に使用される。

【００６４】

１つの実施形態では、凍結乾燥保護剤が本明細書に記載される医薬組成物に添加される

。本明細書で使用される「凍結乾燥保護剤」という用語は、非晶質のガラス質マトリックスを提供し、水素結合によりＡＡＶベクター表面と結合することで、乾燥過程の間に除去される水分子と置き換えることにより、凍結乾燥又は脱水過程（一次凍結乾燥サイクル及び二次凍結乾燥サイクル）の間にＡＡＶベクターに安定性を与える作用物質を含む。凍結乾燥保護剤は、凍結乾燥サイクルの間の産物の分解を最小限にして長期産物安定性を改善するのを助ける。凍結乾燥保護剤の非限定的な例としては、スクロース又はトレハロース等の糖類、グルタミン酸モノナトリウム、非結晶性グリシン又はヒスチジン等のアミノ酸、ベタイン等のメチルアミン、硫酸マグネシウム等のリオトロピック塩、三価以上の糖アルコール、例えばグリセリン、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトール等のポリオール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、プルロニック（登録商標）類及びそれらの組み合わせが挙げられる。医薬組成物に添加される凍結乾燥保護剤の量は一般に、医薬組成物が凍結乾燥されたときに、許容することができない株の分解をもたらさない量である。

【００６５】

幾つかの実施形態では、増量剤が医薬組成物に含まれる。本明細書で使用される「増量剤」という用語は、医薬製品と直接的に相互作用せずに凍結乾燥産物の構造をもたらす作用物質を含む。薬学的に洗練されたケークを提供することに加えて、増量剤はまた、崩壊温度の変更、凍結融解保護の提供及び長期貯蔵にわたる株安定性の向上に関して有用な品質を与えることもできる。増量剤の非限定的な例としては、マンニトール、グリシン、ラクトース及びスクロースが挙げられる。増量剤は結晶性（例えば、グリシン、マンニトール又は塩化ナトリウム）又は非晶質（例えば、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン）であってもよく、一般的に製剤中で０．５％～１０％の量で使用される。

【００６６】

Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されるようなその他の薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定剤が本明細書に記載される医薬組成物中に含まれていてもよいが、但し、それらは医薬組成物の所望の特性に悪影響を及ぼさないものとする。本明細書で使用される場合に、「薬学的に許容可能な担体」は、医薬品投与と適合可能な任意の全ての溶剤、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤を意味する。医薬品作用物質用のそのような媒体及び作用物質の使用は、当該技術分野でよく知られている。許容可能な担体、賦形剤又は安定剤は、使用される投与量及び濃度で、レシピエントに対して非毒性であり、追加の緩衝剤、保存剤、共溶媒、アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤、ＥＤＴＡ等のキレート化剤、金属複合体（例えば、Ｚｎ－タンパク質複合体）、ポリエステル類等の生分解性ポリマー、ナトリウム、多価糖アルコール等の塩形成対イオン、アラニン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、オルニチン、ロイシン、２－フェニルアラニン、グルタミン酸及びトレオニン等のアミノ酸、ラクチトール、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイニシトース、ミオイニシトール、ガラクトース、ガラクチトール、グリセロール、シクリトール（例えば、イノシトール）、ポリエチレングリコール等の有機糖類又は糖アルコール、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、α－モノチオグリセロール及びチオ硫酸ナトリウム等の硫黄含有還元剤、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン又は他の免疫グロブリン等の低分子量タンパク質並びにポリビニルピロリドン等の親水性ポリマーを含む。

【００６７】

医薬組成物は、経口投与、舌下投与、バッカル投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与、結膜投与、直腸投与、経皮投与、髄腔内投与、局所投与及び／又は吸入による投与用に調製され得る。好ましい実施形態では、医薬組成物は、静脈内投与、筋肉内投与、結膜投与、経皮投与、腹腔内投与及び／又は皮下投与に適した溶液であり得る。別の実施形態では、医薬組成物は舌下投与経路、バッカル投与経路及び／又は吸入による投与経路に適した溶液であり得る。代替的な実施形態では、医薬組成物は、髄腔内投与に

適したゲル又は溶液であってもよい。代替的な実施形態では、医薬組成物は、吸入による投与に適したエアロゾルであってもよい。好ましい実施形態では、医薬組成物は、髄腔内投与用に調製することができる。

【００６８】

医薬組成物は、現行の技術水準で既知の一般的な賦形剤及び担体を更に含み得る。固体医薬組成物には、例えば医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム等を含む従来の非毒性固体担体を使用することができる。注射用溶液については、医薬組成物は凍結保護剤、凍結乾燥保護剤、界面活性剤、増量剤、酸化防止剤、安定剤及び薬学的に許容可能な担体を更に含んでいてもよい。エアロゾル投与については、医薬組成物は概して、界面活性剤及び噴射剤と共に微粉化形態で供給される。界面活性剤は、当然ながら非毒性でなくてはならず、概して噴射剤に可溶である。かかる作用物質の代表的なものは、カプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリン（olesteric）酸及びオレイン酸等の６個～２２個の炭素原子を含有する脂肪酸と脂肪族多価アルコール又はその環状無水物とのエステル又は部分エステルである。混合又は天然グリセリド等の混合エステルを用いることができる。例えば鼻腔内送達用のレシチンのように、担体が必要に応じて含まれていてもよい。坐剤については、従来の結合剤及び担体は、例えばポリアルカレン（polyalkalene）グリコール又はトリグリセリドを含み得る。

【００６９】

医学的使用

第７の態様では、本発明は、薬剤として使用される本発明のＡＡＶベクター、本発明の核酸又は本発明の医薬組成物を提供する。第８の態様では、本発明は、フリードライヒ運動失調症の治療に使用される本発明のＡＡＶベクター、本発明の核酸又は本発明の医薬組成物を提供する。

【００７０】

好ましい実施形態では、本発明のＡＡＶベクター、本発明の核酸又は本発明の医薬組成物は髄腔内、筋肉内、脳内又は脳室内に、好ましくは髄腔内又は筋肉内に投与される。

【００７１】

好ましい実施形態では、本発明のＡＡＶベクター、本発明の核酸又は本発明の医薬組成物は、体重１ｋｇ当たり少なくとも１×１０^{9}個のベクターゲノム、好ましくは体重１ｋｇ当たり１×１０^{10}個、１×１０^{11}個又は１×１０^{12}個のベクターゲノムの用量で投与される。より好ましくは、体重１ｋｇ当たり少なくとも又は約４．６×１０^{12}個のベクターゲノムを投与する。

【実施例】

【００７２】

実施例１：プラスミド構築

ヒトフラタキシン（ｈＦＸＮ）のアイソフォーム１のコード配列をヘマグルチニンタグ（ＨＡ）と融合させ、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（商標） ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（Clontech）を用いてｐｃＤＮＡ３．１発現ベクターにクローニングした。この融合系を全てのクローニング工程に使用した。ＣＭＶ、又はシナプシン（ｐｈＳＹＮ）、ニューロン特異的エノラーゼ（ｐｈＮＳＥ）、１２５５ｂｐのＦＸＮプロモーター（ｐｈＦＸＮ１２５５）若しくはヒトホスホグリセリン酸キナーゼアイソフォーム１（ｐｈＰＧＫ１）のヒト（ｈ）プロモーター（ｐ）のいずれかとＦＸＮ遺伝子のコード領域とを融合させることで幾つかの構築物を生成した。３’末端のウッドチャック肝炎ウイルス応答エレメント（responsive element）（ＷＰＲＥ）配列に加えて、ＣＭＶエンハンサー及びコザック配列等の更なる調節エレメントを５’末端に付加した。これら全ての発現ベクターにより生成する構築物を表２に挙げる。

【００７３】

同じ組合せの調節エレメントを含有するプラスミドも、ＦＸＮのコード配列を、同様に

Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（商標） ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（Clontech）を用いてｐＧＬ３－ＬＵＣベクター（Promega）から増幅したホタルルシフェラーゼコード配列（ＬＵＣ）に置き換えることによってルシフェラーゼ発現を駆動するように生成した。これらのプラスミドを表３に挙げる。

【００７４】

実施例２：組み換えアデノ随伴ウイルスベクターの構築及び作製

ｐｃＤＮＡ３．１－ｐｈＰＧＫ－ｋＦＸＮ－ＨＡ－ＷＰＲＥ及びｐｃＤＮＡ３．１－ｐｈＰＧＫ－ｋＬＵＣ－ＨＡ－ＷＰＲＥプラスミドの発現カセットを、組み換えＡＡＶ９ベクターのＳｎａＢＩ－ＭｆｅＩ部位にクローニングした（ｒＡＡＶ９－ｐｈＰＧＫ１－ＦＸＮ－ＨＡ－ＷＰＲＥベクター及びｒＡＡＶ９－ｐｈＰＧＫ－ＬＵＣ－ＷＰＲＥベクター）。加えて、ＦＸＮコード配列を欠く対照ｎｕｌｌベクターを生成した（ＡＡＶ２／９－ｎｕｌｌ）。３つ全ての構築物及びウイルス粒子は、Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy（バルセロナ自治大学）のVector Production Unitで生成された。得られる最終力価は、ＡＡＶ９－ｐｈＰＧＫ－ＦＸＮ－ＨＡ－ＷＰＲＥについては１．４×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ、ＡＡＶ９－ｐｈＰＧＫ－ＬＵＣ－ＷＰＲＥについては９．８×１０^{12}ｖｇ／ｍｌ、ＡＡＶ２／９－ｎｕｌｌについては６×１０^{12}ｖｇ／ｍｌであった。

【００７５】

実施例３：フラタキシン発現の最適化

１． 細胞培養、ｉｎ ｖｉｔｒｏ発現及びルシフェラーゼレポーターアッセイ

マウス神経芽細胞腫細胞（Ｎ２ａ）、ヒト神経芽細胞腫細胞（ＳＨ－ＳＹ５Ｙ）及びヒト胎児腎臓（ＨＥＫ ２９３）細胞を、１０ｃｍ培養皿において１０％ウシ胎仔血清（Sigma）、２ｍＭ グルタミン、５０μｇ／ｍｌペニシリン／ストレプトマイシン（Life technologies）を含有するダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）中にて７０％コンフルエンスで培養した。トランスフェクションを、Ｎ２ａ及びＳＨ－ＳＹ５Ｙ細胞についてはｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Life technologies）、ＨＥＫ ２９３についてはリン酸カルシウムを用い、０．２５μｇのＥＧＦＰに加えて４μｇのプラスミドＤＮＡ単独を用いて行った。トランスフェクション後に、培地をＨＥＫ細胞については新鮮ＤＭＥＭ培養培地、Ｎ２ａ及びＳＨ－ＳＹ５Ｙ細胞についてはＮｅｕｒｏｂａｓａｌ、Ｂ２７サプリメント、１０μＭレチノイン酸、２ｍＭグルタミン、５０μｇ／ｍｌペニシリン／ストレプトマイシンに置き換えた。細胞培養培地交換の４８時間後に、表２に挙げる発現プラスミドがトランスフェクトされた細胞を採取し、更に使用するまで－８０℃で保管した。ルシフェラーゼレポーターアッセイについては、表３に挙げるプラスミドを上述のようにトランスフェクトし、細胞を３８４ウェルプレートに再プレーティングし、ルシフェラーゼ活性を、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイキットを製造業者（Promega）の使用説明書の通りに使用して決定した。

【００７６】

２． ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び免疫ブロット法

タンパク質をＲＩＰＡ溶解バッファー：１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１４０ｍＭ ＮａＣｌ、０．１％デオキシコール酸ナトリウム、１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、１％ＳＤＳ、２ｍＭエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、２５ｍＭフッ化ナトリウム（ＮａＦ）、２．５ｍＭ ＮａＶＯ$_3$及びタンパク質阻害剤カクテル（Roche）中でのホモジナイズにより培養細胞から抽出した。タンパク質濃度を、ＤＣ－ＢｉｏＲａｄプロテインアッセイ（BioRad）を用いて決定した。全タンパク質抽出物を、１ｍＭ ＤＴＴを含有する４Ｘ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓａｍｐｌｅ Ｌｏａｄｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ（Li-Cor Biosciences）と混合し、一定の２０ｍＡにて１５％アクリルアミドゲル上での電気泳動によって分離した後、ＰＶＤＦ膜に転写した。使用した一次抗体は、抗ＦＸＮ ＰＡＣ ２５１８（Grazia Isaya博士（Mayo Clinic、ミネソタ州ロチェスター）の厚意による寄贈）、抗ＦＸＮ（１Ｇ２、Merck Millipore）、抗ＨＡタグ（クローン１６Ｂ１２、ＭＭＳ－１０１Ｐ、Covance）及び抗βアクチン（ＡＣ１５、Sigma）であった。赤外色素コンジュゲート二次抗体は、抗マウスＩＲＤｙｅ－８００ＣW及び抗ウサギＩＲＤｙｅ ７０

０ＣＷ（Li-Cor Biosciences）であり、免疫反応性を、Ｏｄｙｓｓｅｙ分析ソフトウェアｖ２．１（Li-Cor Biosciences）を用いて検出した。

【００７７】

３．　結果

図１～図５、並びに表２及び表３に見ることができるように、ｈＰＧＫ１プロモーター、リンカー配列（長さ及び含量）及びＷＰＲＥを含む構築物の供給により、細胞におけるフラタキシンの発現が可能であった。ヒトＰＧＫ１プロモーターは、生理学的に適切な組織において発現される、代謝的に調節されるプロモーターであるため、フラタキシンのプロモーターとして有力な候補である。しかしながら、フラタキシンコード配列を発現することを可能にするために使用される調節エレメント又はリンカーの配列／長さは、不明であった。エレメント及び配列の種々の組合せを試みることで、本発明者らの結果から、約１０５ｎｔの長さを有する構築物がＦＸＮ発現を可能にするが、３５ｎｔ前後のリンカー長では、ＷＰＲＥ　ＲＮＡ安定化配列（stabilizer sequence）を付加したとしてもＦＸＮ発現が可能でないことから、ヒトフラタキシンコード配列からのタンパク質発現が、ｈＰＧＫ１プロモーターとＦＸＮコード配列との間に操作上機能的なリンカーを組み入れることを必要とすることが示される。興味深いことに、このリンカーの要求は、試験した他のプロモーター（すなわち、ｈＳＹＮ）ではなく、ｈＰＧＫ１プロモーターを使用した場合にのみ顕著であった。さらに、このベクターからのフラタキシンタンパク質のレベルは、ＷＰＲＥ配列の非存在下であっても、ＣＭＶ又はＣＡＧプロモーター駆動性ベクターから得られたものよりもはるかに低く、内因性レベルにより匹敵する。以前のアプローチの制限の１つは、フラタキシン発現を得ることを可能にするために、ＣＡＧ又はＣＭＶプロモーター等の高駆動プロモーターが使用されており、細胞ストレスを引き起こし、予防効果の一部を無効にする可能性がある、非常に高レベルのタンパク質発現をもたらすことである。本明細書に提示されるベクターは、関連する神経系及び末梢組織において生理学的に機能的な範囲内の量でフラタキシンタンパク質の発現を駆動することが可能である。

【００７８】

【表２】

表２：結果の概要。種々の構築物によるトランスフェクション後のＦＸＮの相対レベル

	フラタキシン発現プラスミド	細胞型	抗体	免疫反応性
1.1	pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA	N2A/HEK293/SHSY	抗ＨＡタグ（Covance）／抗ＦＸＮ　１Ｇ２（Merck Millipore）	++
1.2	pcDNA3.1-phSYN-FXN-HA	SHSY	抗ＨＡタグ（Covance）	-
1.3	pcDNA3.1-phFXN-FXN-HA	HEK293/SHSY	抗ＨＡタグ（Covance）	-
1.4	pcDNA3.1-prNSE-FXN-HA	N2A	抗ＨＡタグ（Covance）	-
1.5	pcDNA3.1-phNSE-FXN-HA	HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
	ＷＰＲＥの付加			
2.1	pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA-WPRE	N2A/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）／抗ＦＸＮ　１Ｇ２（Merck Millipore）	+++
2.2	pcDNA3.1-phSYN-FXN-HA-WPRE	N2A/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
2.3	pcDNA3.1-phSYN-5'UTR_FXN-FXN-HA-WPRE	N2A/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
2.4	pcDNA3.1-phFXN-FXN-HA-WPRE	N2A/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
2.5	pcDNA3.1-prNSE-FXN-HA-WPRE	N2A	抗ＨＡタグ（Covance）	-
	ＣＭＶエンハンサーの付加			
3.1	pcDNA3.1-E-phFXN-FXN-HA-WPRE	HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
3.2	pcDNA3.1-E-phFXN-FXN-HA	N2A/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
3.3	pcDNA3.1-E-phSYN-FXN-HA-WPRE	N2A	抗ＨＡタグ（Covance）	-
	コザック配列及びＷＰＲＥ配列の付加			
4.1	pcDNA3.1-pCMV-105nt-kFXN-HA-WPRE	N2A/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）／抗ＦＸＮ　１Ｇ２（Merck Millipore）	++++
4.2	pcDNA3.1-phSYN-kFXN-HA-WPRE	HEK293/N2A	抗ＨＡタグ（Covance）	-/+
4.3	pcDNA3.1-prNSE-kFXN-HA-WPRE	HEK293/N2A	抗ＨＡタグ（Covance）	-/+
4.4	pcDNA3.1-phFXN-kFXN-HA-WPRE	HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
4.5	pcDNA3.1-E-phFXN-kFXN-HA-WPRE	HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
	特定のリンカー、コザック配列及びＷＰＲＥ配列の使用			
5.1	pcDNA3.1-phPGK-105nt-kFXN-HA-WPRE	N2a/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）／抗ＦＸＮ　１Ｇ２（Merck Millipore）	++
5.2	pcDNA3.1-phNSE-105nt-kFXN-HA-WPRE	N2a/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	+
5.3	pcDNA3.1-phSYN-105nt-kFXN-HA-WPRE	N2a/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-
5.4	pcDNA3.1-phFXN-105nt-kFXN-HA-WPRE	N2A/HEK293	抗ＨＡタグ（Covance）	-

【００７９】

【表３】

表３：フラタキシン及びＰＧＫ１プロモーター構築物のレポーターアッセイ

ルシフェラーゼ発現プラスミド	細胞型	発現
pcDNA3.1-pCMV-135nt-LUC-WPRE	N2a/HEK293	++++
pcDNA3.1-phPGK-135nt-LUC-WPRE	N2a/HEK293	++
pcDNA3.1-E-phPGK-135nt-LUC-WPRE	N2a	++
pcDNA3.1-phFXN1255-135nt-LUC-WPRE	HEK293	-
pcDNA3.1-phFXN1255-35nt-LUC-WPRE	N2a/HEK293	-
pcDNA3.1-phFXN220-35nt-LUC-WPRE	N2a/HEK293	+
pcDNA3.1-phFXN1255OCT-35nt-LUC-WPRE	N2a/HEK293	-

【００８０】

実施例４：ｉｎ　ｖｉｖｏデータ

１．　動物

本研究に使用した、Pookらによって開発されたフリードライヒ運動失調症マウスモデルＹＧ８Ｒ（Pook et al. 2001. Neurogenetics. 3(4):185-93、Virmouni et al., 2014. PLoS ONE. 9(9):e107416）は、Jackson Laboratoriesのリポジトリから入手した

（ストック番号０１２２５３）。このヒトＦＸＮトランスジェニックマウスモデルは、内因性マウスフラタキシン遺伝子のノックアウト（Ｆｘｎ－／－）であり、ファウンダーＹＧ８（およそ８２個及び１９０個のＧＡＡトリヌクレオチド配列反復を有するヒトＦＸＮ遺伝子の２つのタンデムコピーを保有する）に由来するヒトＦＸＮ　ＹＡＣ導入遺伝子を有する。マウスをＮｅｘＧｅｎ　Ｍｏｕｓｅ　ＩＶＣケージ（Allentown、ニュージャージー州）内で１２時間の明暗サイクルを用い、陰圧、温度及び湿度を制御し、水及び照射齧歯類固形飼料Ｔｅｋｌａｄ　ｇｌｏｂａｌ　１８％　ｐｒｏｔｅｉｎ（Envigo）を自由に与えながらＳＰＦ様条件で飼育した。ＹＧ８Ｒマウスコロニーは、The Institute for Health Science Research Germans Trias i Pujol（ＩＧＴＰ）で作り出された。雌性及び雄性ヘミ接合ＹＧ８Ｒ（Ｔｇ／－）、並びにＷＴ　Ｃ５７Ｂｌ／６マウスを全実験に使用した。

【００８１】

突然変異ヒトＦＸＮ遺伝子（ＹＧ８Ｒ）についてヘミ接合のマウスを以前に報告されているようにジェノタイピングした（２９、３６）。簡潔に述べると、ゲノムＤＮＡをＹＧ８Ｒマウスの尾部からＭａｘｗｅｌｌ（商標）　１６　Ｍｏｕｓｅ　Ｔａｉｌ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Promega）によって抽出した。各マウスについての導入遺伝子コピー数を、ＳＹＢＲ　Ｐｒｅｍｉｘ　Ｅｘ　Ｔａｑ　ＩＩ（Ｔｌｉ　ＲＮａｓｅＨ　Ｐｌｕｓ）（タカラバイオ株式会社）、及びヒトフラタキシン導入遺伝子用の以下のプライマー：ｈＦＸＮ＿Ｔｇ＿ＦＷ：５’－ＧＡＡＣ－ＴＴＣＡＡＡＴＴＡＧＴＴＣＣＣＣＴＴＴＣＴＴＣ－３’（配列番号７）、ｈＦＸＮ＿Ｔｇ＿ＲＶ：５’－ＣＡＣＡＧＣＣＡＴ－ＴＣＴＴＴＧＧＧＴＴＴＣ－３’（配列番号８）、及び内部対照アポリポタンパク質Ｂ－１００アイソフォームＸ１：ＩＣ＿ＦＷ：５’－ＣＡＣＧＴＧＧＧＣＴＣＣＡＧＣＡＴＴ－３’（配列番号９）、ＩＣ＿ＲＶ：ＴＣＡＣＣＡＧＴＣＡＴＴＴＣＴＧＣＣＴＴＴＧ（配列番号１０）を使用するＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（商標）　４８０　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ（Roche）での定量リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を用いて決定した。アッセイを９５℃で５分間、９５℃で２０秒間及び６０℃で３０秒間、７２℃で３０秒間の４０サイクル、最後に７２℃で２分間の１サイクルの熱サイクル条件を用いて行った。サンプルを関心の各遺伝子について三連でアッセイし、導入遺伝子のレベルをＣｔ（ΔΔＣｔ）法によって決定した。導入遺伝子コピー数を、既知のコピー数を有する対照サンプルのＣｔデータと比較して推定した。ＧＡＡ反復長をＬＡ　ｔａｑ（Invitrogen）、並びに以下のプライマー：ＧＡＡ－Ｆ：５’－ＧＧＧＡＴＴＧＧＴＴ－ＧＣＣＡＧＴＧＣＴＴ－ＡＡＡＡＧＴＴＡＧ－３’（配列番号１１）及びＧＡＡ－Ｒ：５’－ＧＡＴＣＴＡＡＧＧＡＣＣＡＴＣＡＴＧＧ－ＣＣＡＣＡＣＴＴＧＣＣ－３’（配列番号１２）を使用するＧＡＡ　ＰＣＲ増幅ＰＣＲによって決定した。ＰＣＲ産物を１００Ｖで３時間の電気泳動によって１．５％アガロースゲル中で分離し、バンドサイズを分析した。次いで、ＧＡＡ反復の数をＰＣＲ産物のサイズから４５１ｂｐ（隣接する非反復ＤＮＡ）を差し引き、残りの塩基対反復サイズを３で割ることによって決定した。

【００８２】

全ての動物の処置がＥＵ及び地方の規制に従って行われ、適切な地方倫理委員会によって認可された。

【００８３】

２．　ＡＡＶ投与

ＹＧ８Ｒヘミ接合及びＷＴ　１０週齢マウスをケタミン（１０ｍｇ／ｋｇ（体重）；Ｉｍａｌｇｅｎｅ　５００；Rhone-Merieux、フランス、リヨン）及びキシラジン（１ｍｇ／ｋｇ（体重）；Ｒｏｍｐｕｎ；Bayer）の腹腔内注射によって麻酔した。ＡＡＶ９－ｐｈＰＧＫ－ＦＸＮ－ＨＡ－ＷＰＲＥ、ＡＡＶ９－ｐｈＰＧＫ－ＬＵＣ－ＷＰＲＥ又はＡＡＶ２／９－ｎｕｌｌの髄腔内投与を腰部に行った。傍脊椎筋の切開による脊椎側面の露出後に、ウイルスベクターを３３ゲージ針及びハミルトンシリンジにより腰椎Ｌ３及びＬ４の間でＣＳＦ中にゆっくりと注射した。髄腔への適切なアクセスは、動物の尾部の動きによって確認された。その後、筋肉及び皮膚を縫合した。各マウスへの種々のウイルスベク

ターの投与量は、４．６×１０－１２ｖｇ／ｋｇ（マウス体重）であった。
【００８４】
３．　ルシフェラーゼイメージングを用いたベクターの生体内分布
　ＡＡＶ９－ｐｈＰＧＫ－ＬＵＣ－ＷＰＲＥベクターの生体内分布のｉｎ　ｖｉｖｏ評価のために、１０週齢（２．５ヶ月齢）で、また１５０ｍｇ／ｋｇ（マウス体重）のＤ－ルシフェリン基質溶液の単回腹腔内注射を行った３．５ヶ月後にマウスにベクターを髄腔内投与した。マウスを基質投与の１５分後に吸入麻酔（導入には４％、維持には２％のイソフルラン）によって麻酔した。麻酔マウスをＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｉｖｉｓ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ（Caliper Life Sciences、ドイツ）の暗チャンバー内に維持し、光子放出を記録した。画像を１分間の積分時間、１２．５ｃｍの視野を用いてＬｉｖｉｎｇイメージングソフトウェア（Xenogen Corporation、米国、カリフォルニア州）で分析した。ｅｘ　ｖｉｖｏ評価のために、マウスの組織及び器官を基質投与の１５分後に摘出した。組織及び器官を透明皿に入れ、上記のようなＬｉｖｉｎｇイメージングソフトウェア（Xenogen Corporation、米国、カリフォルニア州）を用いて画像を取り込んだ。結果は図６に見ることができる。
【００８５】
４．　ｑＲＴ－ＰＣＲ
　ＲＮＡを３０ｍｇの新鮮凍結マウス組織からＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Qiagen）を用いて抽出した。ＲＮＡのＲＩＮ及び定量化をＡｇｉｌｅｎｔ　２２００　ＴａｐｅＳｔａｔｉｏｎ（Agilent）で得た。ＲＮＡを３７℃で１５分間、８５℃で５秒間の温度条件でＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔ（商標）　ＲＴ　ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ（タカラバイオ株式会社）を用いてｃＤＮＡ（２５ｎｇ／μｌ）に逆転写した（retrotranscribed）。ｑＲＴ－ＰＣＲをマウス組織に由来するｃＤＮＡを用いて行い、フラタキシン発現のレベルをマルチウェルプレートフォーマットでＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ４８０機器（Roche Diagnostics）を用いて試験した。反応混合物は０．１ｍＭの各プライマー、１０ｎｇのｃＤＮＡ及び５μｌのＴａｑＭａｎ　Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ　ＩＩ、ＵＮＧなし（Thermofisher Scientific）からなる１０μｌの総量を有していた。ヒトフラタキシン検出のためのプライマー－プローブは、Bio-radによって設計済みであり（ｄＨｓａＣＰＥ５０３１６４１、Bio-rad）、マウスサンプル用のβ－２ミクログロブリン（Ｂ２ｍ）ハウスキーピング遺伝子のプライマーは、IDTによって設計済みであった（Ｍｍ．ＰＴ．３９ａ．２２２１４８３５；IDT）。アッセイは５０℃で２分間、９５℃で１０分間、９５℃で１５秒間及び６０℃で１分間の４０サイクルの熱サイクル条件で行った。サンプを関心の各遺伝子について三連でアッセイし、レベルをＣｔ（ΔΔＣｔ）法によって決定した。結果は図７に見ることができる。
【００８６】
５．　ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び免疫ブロット法
　タンパク質をＲＩＰＡ溶解バッファー：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１％デオキシコール酸ナトリウム、１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１％ＳＤＳ、２ｍＭエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、２５ｍＭフッ化ナトリウム（ＮａＦ）、２．５ｍＭ　ＮａＶＯ３及びタンパク質阻害剤カクテル（Roche）中でのホモジナイズによりマウス組織から抽出した。タンパク質濃度を、ＤＣ－ＢｉｏＲａｄプロテインアッセイ（BioRad）を用いて決定した。全タンパク質抽出物を、１ｍＭ　ＤＴＴを含有する４Ｘ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓａｍｐｌｅ　Ｌｏａｄｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ（Li-Cor Biosciences）と混合し、一定の２０ｍＡにて１５％アクリルアミドゲル上での電気泳動によって分離した後、ＰＶＤＦ膜に転写した。使用した一次抗体は、抗ＦＸＮ　ＰＡＣ２５１８（Grazia Isaya博士（Mayo Clinic，Rochester MN）の厚意による寄贈）、抗ＦＸＮ（１Ｇ２、Merck Millipore）、抗ＨＡタグ（クローン１６Ｂ１２、ＭＭＳ－１０１Ｐ、Covance）及び抗βアクチン（ＡＣ１５、Sigma）であった。赤外色素コンジュゲート二次抗体は、抗マウスＩＲＤｙｅ－８００ＣＷ及び抗ウサギＩＲＤｙｅ　７００ＣＷ（Li-Cor Biosciences）であり、免疫反応性を、Ｏｄｙｓｓｅｙ分析ソフトウェアｖ２．

１（Li-Cor Biosciences）を用いて検出した。結果は図８に見ることができる。

【００８７】

６．　足組み

後肢の組みは、多数の神経変性マウスモデルにおいて疾患進行のマーカーであることが示されている。各マウスを、尾を持って周囲のあらゆる物体から離して持ち上げた。後肢の位置を１０秒間観察し、以下のようにスコアリングした。後肢が常に腹部から離れて外向きに開いていた場合、スコア０を割り当てる。ぶら下げた時間の５０％を超えて一方の後肢が腹部に向かって引っ込められていた場合、スコア１が付けられる。ぶら下げた時間の５０％を超えて両方の後肢が腹部に向かって部分的に引っ込められていた場合、スコア２が付けられる。ぶら下げた時間の５０％を超えて後肢が完全に引っ込められ、腹部に触れていた場合、スコア３が付けられる。マウスにおける足組み反射を４ヶ月齢から２ヶ月に一度評定した。結果は図９に見ることができる。

【００８８】

７．　電気生理学

マウス尾部の尾神経における振幅（μＶ）及び神経伝導速度（ｍ／ｓ）を測定した。吸入麻酔（イソフルラン２％）下の動物について、刺激電極針を４つの異なる刺激点（尾端から１ｃｍ、２ｃｍ、３ｃｍ、４ｃｍ）で皮下に位置付け、登録針点を尾端から６ｃｍに固定した。値をＭｅｄｅｌｅｃ　Ｓｙｎｅｒｇｙ装置（Viasys、米国）の２つのチャンネルを用いてＥＭＧ／ＰＥ　Ｎ－ＥＰで記録した。電気生理学的試験中に、動物の皮膚温は３２℃超に維持した。マウスを４ヶ月齢から２ヶ月に一度評定した。結果は図１０に見ることができる。

【００８９】

８．　結果

本発明者らは、提示のＡＡＶ処理が、生理学的に適切な組織において生理学的に適切なレベルで発現され、内因性タンパク質と同様のプロセシングを示し、ＦＲＤＡのマウスモデル（ＹＧ８Ｒ）において罹患ニューロンの電気生理学的性質、及び神経症状を大幅に改善し得ることから、ＦＲＤＡの治療として効果的であることを提唱する。ＡＡＶ９－ｈＰＧＫ１－ＦＸＮベクター中のＦＸＮと同じ調節エレメント下のＡＡＶ９ベクター中のルシフェラーゼ遺伝子が髄腔内注射した場合に脊髄、脳全体、更には末梢組織において発現されることが図６に示される。また、同じベクター及び調節エレメント下のルシフェラーゼの発現は、注射後少なくとも７ヶ月前後にわたって一貫したままである（データは示さない）。フラタキシンレベルの低下が全てではないにしても殆どのＦＲＤＡの症状の根底にあり、２５％以上のフラタキシンレベルを発現する突然変異を保有する個体がＦＲＤＡの症状を示さないことから、ＦＸＮ発現の僅かな増加によりＦＲＤＡ患者における症状を阻止するか又は大幅に改善することが可能であるはずである。しかしながら、非常に高レベルのＦＸＮ発現又は任意の他のタンパク質は、細胞効果を誘導し、最終的に阻止効果を弱め、又は更には症状を悪化させる可能性がある。したがって、内因性ＦＸＮタンパク質と可能な限り同様のレベルをもたらすＦＸＮ発現ベクターを開発することに関心が寄せられる。したがって、本発明者らは、代謝的に調節されるプロモーター下で生理学的に適切なレベルでのＦＸＮの発現を可能にするベクター（ＡＡＶ９－ｈＰＧＫ１－ＦＸＮベクター）を開発し、１０週齢のＹＧ８Ｒヘミ接合マウス（Ｔｇ／－）の髄腔内に送達した。非注射マウスと比較してより高レベルのＦＸＮ　ｍＲＮＡが、ＹＧ８Ｒヘミ接合マウス（Ｔｇ／－）において肝臓と脊髄の胸部との両方でＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮベクターの髄腔内注射の３．５ヶ月後に検出された（それぞれ０．５倍及び２倍；図７）。これらは、ヘミ接合ＹＧ８Ｒマウスと比較して、脊髄でそれぞれ０．５倍及び３倍を示したホモ接合ＹＧ８Ｒマウスにおいて同じか又はより低かった。これにより、Ｌ３－Ｌ４髄腔内領域に注射したこのＦＸＮコードベクターが取り込まれ、逆行性輸送によって又は髄液を介して拡散することで胸髄ニューロンにおいて発現されることが示される。本発明者らは、髄腔内投与したＡＡＶ９ベクターが血液脳関門を通過し、肝臓、心臓等の末梢組織に到達することも可能であり（図６）、注射したベクターからｈＦＸＮ　ｍＲＮＡを発現することが可

能である（図７）ことにも注目した。

【００９０】

開発した組み換えベクターからのＦＸＮタンパク質の発現レベルも分析した。使用した抗体は、一次抗ＦＸＮ抗体とのブロットの一晩のインキュベーションに対する１時間後に得られたタンパク質パターンに見られるように、ヒトＦＸＮタンパク質に対してより高い親和性を示すが、ｒＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮベクターから発現されるＦＸＮタンパク質のレベルがＷＴマウスにおけるマウスＦＸＮレベルと同様のようであることが図８に示される（図８Ａ、レーン３対レーン４、並びに図８Ｂの第２のパネル、レーン３対レーン４及びレーン５対レーン６及びレーン７）。注目すべきことに、マウス脳の運動皮質領域（Ｃ１）において組み換えＦＸＮタンパク質を検出することができた（図８Ｂ、レーン７）。これにより、脊髄の腰部への髄腔内注射による本発明者らのベクターの送達がＣＮＳの運動関連領域全体にわたるベクターの分布をもたらすことが示される。加えて、組換えタンパク質は、野生型ＦＸＮタンパク質と同様のパターンでプロセシングされるようであり、中間型及び成熟型が最も顕著なプロセシング型である。

【００９１】

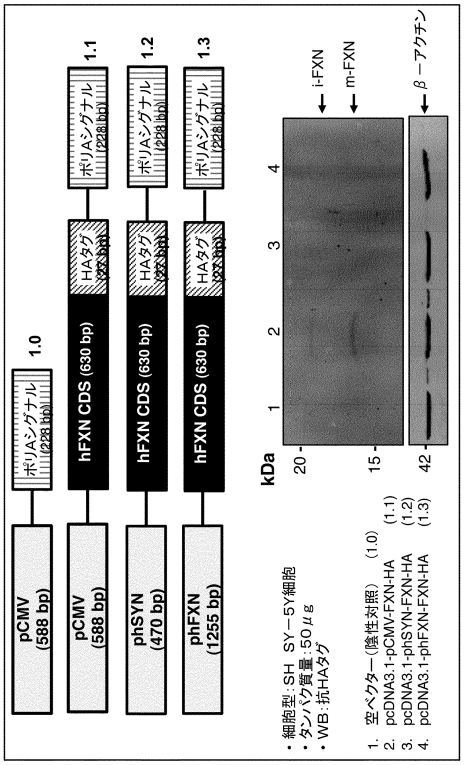
ｒＡＡＶ９－ＰＧＫ１－ＦＸＮで処理したＹＧ８Ｒヘミ接合マウス（Ｔｇ／－）の表現型を神経学的足組み反射、及び尾神経の電気生理学的性質についてｒＡＡＶ９－ｎｕｌｌベクターと比較して更に分析した。足組み反射は、幾つかの神経変性障害に関与することが示されている。この反射は感覚経路、更には前肢及び後肢の運動を調節する脊髄運動経路に関与するようである。特に、小脳－皮質－網様体経路（cerebello-cortico-reticular pathways）が関与することが示されている。したがって、ＹＧ８Ｒマウスにおけるこれらの経路に対するｒＡＡＶ９－ｈＰＧＫ１－ＦＸＮベクターの処理の影響を決定するために、ベクターの髄腔内注射後に種々の時点で足組み反射を定量化した（方法を参照されたい）。ＡＡＶ９－ｎｕｌｌベクター及びＡＡＶ９－ＦＸＮベクターのいずれかで処理したＹＧ８Ｒマウスが早くも４ヶ月齢（髄腔内注射の１．５ヶ月後）で足組み異常を示すことが図９に示される。しかしながら、時間と共に、ＡＡＶ－ＦＸＮ処理マウスにおける足組み反射は正常化し、１０ヶ月齢（注射の６．５ヶ月後）では一層、ＷＴマウスによりよく似ている。これにより、ＦＲＤＡマウスモデルに感覚系及び小脳－皮質－網様体系の初期異常が見られ、これがＡＡＶ－ＦＸＮベクターでの処理によって顕著に改善又は逆転することが示唆される。

【００９２】

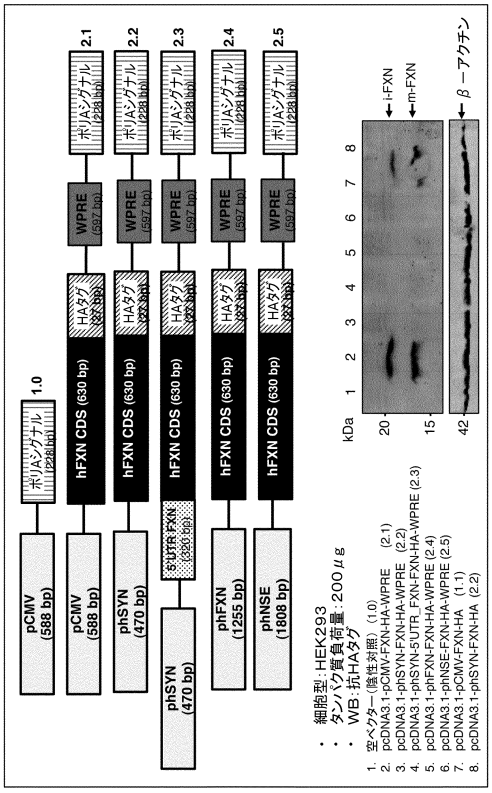
感覚ニューロンに対する処理の影響をより具体的に決定するために、ＡＡＶ－ＦＸＮベクターで処理したＹＧ８ＲマウスのＤＲＧ神経の電気生理学的性質（振幅及び速度）をＡＡＶ９－ｎｕｌｌ対照ベクターで処理したマウスと比較して決定した。尾端からの全ての距離（１ｃｍ～４ｃｍ）で、４ヶ月齢（処理の１．５ヶ月後）ではｎｕｌｌベクターで処理したＷＴ、又はｎｕｌｌ及びＡＡＶ－ＦＸＮで処理したＹＧ８Ｒヘミ接合マウスの間に有意差が認められなかったことが図１０に示される。しかしながら、６ヶ月齢からは、ＡＡＶ９－ｎｕｌｌ処理ＹＧ８Ｒ（Ｔｇ／－）マウスが振幅の有意な減少を示した一方で、ＡＡＶ９－ＦＸＮ処理マウスは、１３ヶ月齢（処理の９．５ヶ月後）になってもＷＴマウスによりよく似ていた。速度の変化は認められなかった（データは示さない）。これらのデータから、ＡＡＶ－ｈＰＧＫ１－ＦＸＮベクターでの処理が、おそらくは罹患ニューロンからの軸索の喪失を防ぐことによって、ＹＧ８Ｒマウスにおいて尾神経の機能を保持することができたことが示される。

【図面】

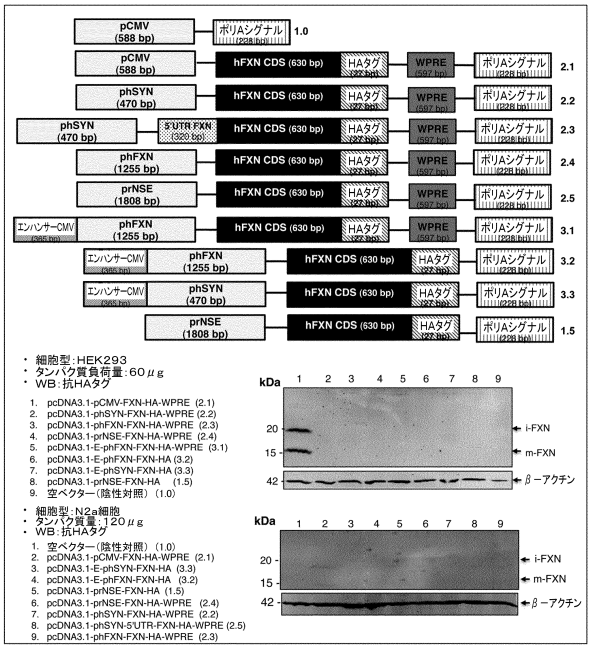
【図１】


1.0
1.1
1.2
1.3
pCMV (588 bp)
phSYN (470 bp)
phFXN (1255 bp)
hFXN CDS (630 bp)
HAタグ (223 bp)
ポリAシグナル (228 bp)
i-FXN
m-FXN
β－アクチン
kDa
20
15
42
・細胞型：SH SY－5Y細胞
・タンパク質量：50μg
・WB：抗HAタグ
1. 空ベクター（陰性対照） (1.0)
2. pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA (1.1)
3. pcDNA3.1-phSYN-FXN-HA (1.2)
4. pcDNA3.1-phFXN-FXN-HA (1.3)

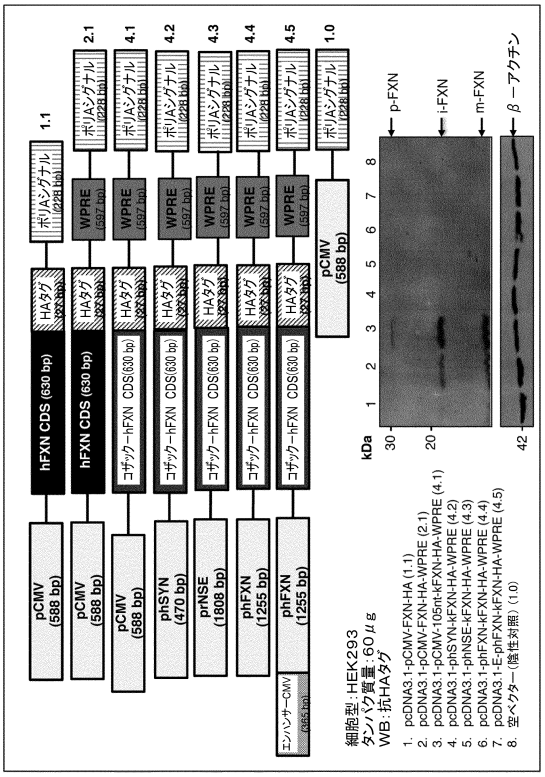
【図２】


1.0
2.1
2.2
2.3
2.4
2.5
pCMV (588 bp)
phSYN (470 bp)
phFXN (1255 bp)
phNSE (1808 bp)
5'UTR FXN (320 bp)
WPRE (597 bp)
hFXN CDS (630 bp)
HAタグ (223 bp)
ポリAシグナル (228 bp)
i-FXN
m-FXN
β－アクチン
kDa
・細胞型：HEK293
・タンパク質負荷量：200μg
・WB：抗HAタグ
1. 空ベクター（陰性対照） (1.0)
2. pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA-WPRE (2.1)
3. pcDNA3.1-phSYN-FXN-HA-WPRE (2.2)
4. pcDNA3.1-phSYN-5'UTR FXN-FXN-HA-WPRE (2.3)
5. pcDNA3.1-phFXN-FXN-HA-WPRE (2.4)
6. pcDNA3.1-phNSE-FXN-HA-WPRE (2.5)
7. pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA （1.1）
8. pcDNA3.1-phSYN-FXN-HA (2.2)

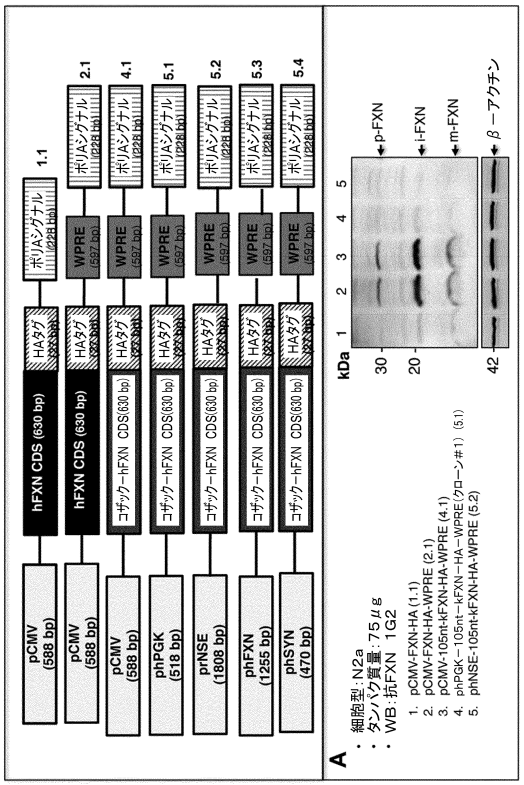
【図３】


pCMV (588 bp)
phSYN (470 bp)
phFXN (1255 bp)
prNSE (1808 bp)
エンハンサーCMV (365 bp)
5'UTR FXN (320 bp)
hFXN CDS (630 bp)
HAタグ (223 bp)
WPRE (597 bp)
ポリAシグナル (228 bp)
1.0
2.1
2.2
2.3
2.4
2.5
3.1
3.2
3.3
1.5
・細胞型：HEK293
・タンパク質負荷量：60μg
・WB：抗HAタグ
1. pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA-WPRE (2.1)
2. pcDNA3.1-phSYN-FXN-HA-WPRE (2.2)
3. pcDNA3.1-phFXN-FXN-HA-WPRE (2.3)
4. pcDNA3.1-prNSE-FXN-HA-WPRE (2.4)
5. pcDNA3.1-E-phFXN-FXN-HA-WPRE (3.1)
6. pcDNA3.1-E-phFXN-FXN-HA (3.2)
7. pcDNA3.1-E-phSYN-FXN-HA (3.3)
8. pcDNA3.1-prNSE-FXN-HA (1.5)
9. 空ベクター（陰性対照）（1.0）
・細胞型：N2a細胞
・タンパク質量：120μg
・WB：抗HAタグ
1. 空ベクター（陰性対照）（1.0）
2. pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA-WPRE (2.1)
3. pcDNA3.1-E-phSYN-FXN-HA (3.3)
4. pcDNA3.1-E-phFXN-FXN-HA (3.2)
5. pcDNA3.1-prNSE-FXN-HA (1.5)
6. pcDNA3.1-prNSE-FXN-HA-WPRE (2.4)
7. pcDNA3.1-phSYN-FXN-HA-WPRE (2.2)
8. pcDNA3.1-phSYN-5'UTR-FXN-HA-WPRE (2.5)
9. pcDNA3.1-phFXN-FXN-HA-WPRE (2.3)
kDa
1 2 3 4 5 6 7 8 9
20
15
42
i-FXN
m-FXN
β－アクチン

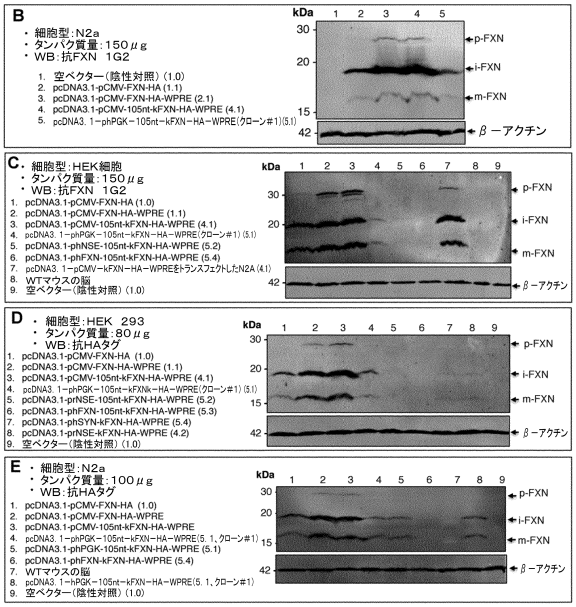
【図４】


1.1
2.1
4.1
4.2
4.3
4.4
4.5
1.0
pCMV (588 bp)
phSYN (470 bp)
prNSE (1808 bp)
phFXN (1255 bp)
エンハンサーCMV (365 bp)
HAタグ (223 bp)
WPRE (597 bp)
ポリAシグナル (228 bp)
hFXN CDS (630 bp)
コザック－hFXN CDS(630 bp)
p-FXN
i-FXN
m-FXN
β－アクチン
kDa
30
20
42
細胞型：HEK293
タンパク質量：60μg
WB：抗HAタグ
1. pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA (1.1)
2. pcDNA3.1-pCMV-FXN-HA-WPRE (2.1)
3. pcDNA3.1-pCMV-10nt-kFXN-HA-WPRE (4.1)
4. pcDNA3.1-phSYN-kFXN-HA-WPRE (4.2)
5. pcDNA3.1-phNSE-kFXN-HA-WPRE (4.3)
6. pcDNA3.1-phFXN-kFXN-HA-WPRE (4.4)
7. pcDNA3.1-E-phFXN-kFXN-HA-WPRE (4.5)
8. 空ベクター（陰性対照）(1.0)

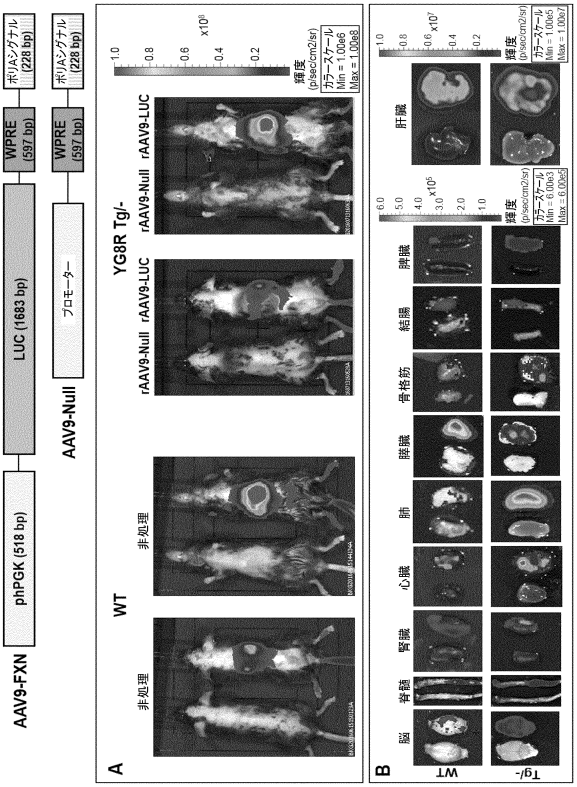
【図５－１】



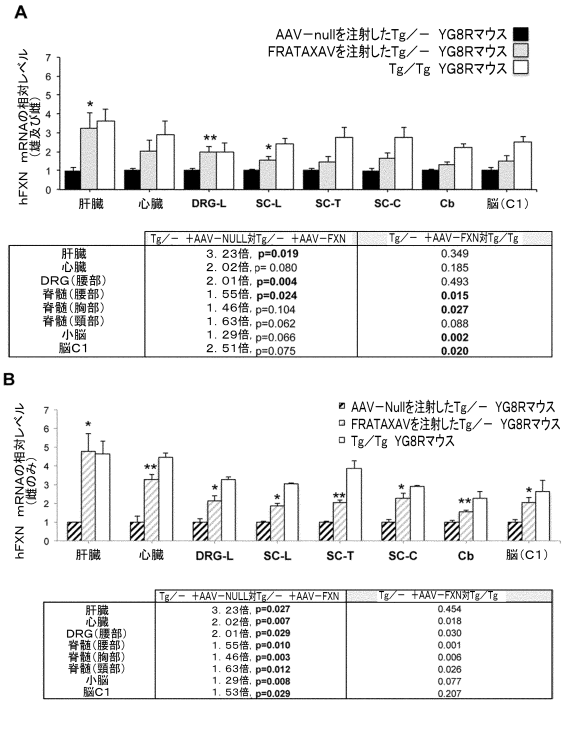
【図５－２】



【図６】



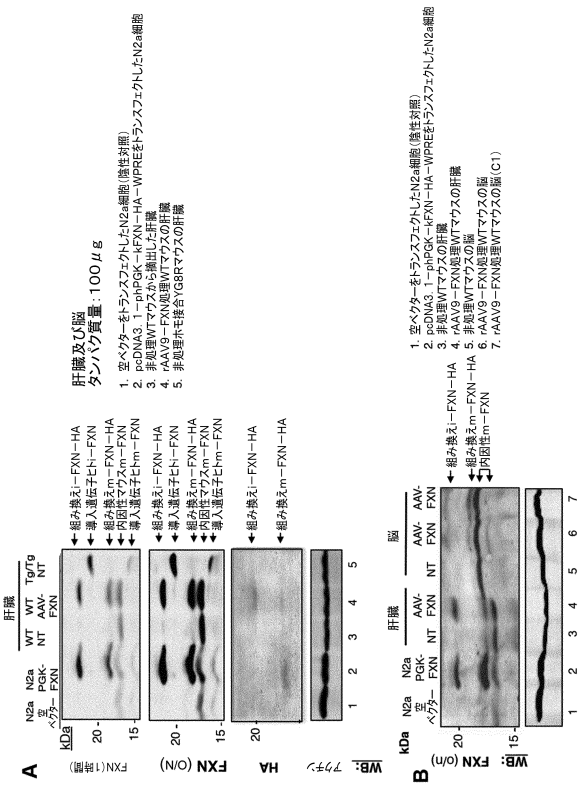
【図７】



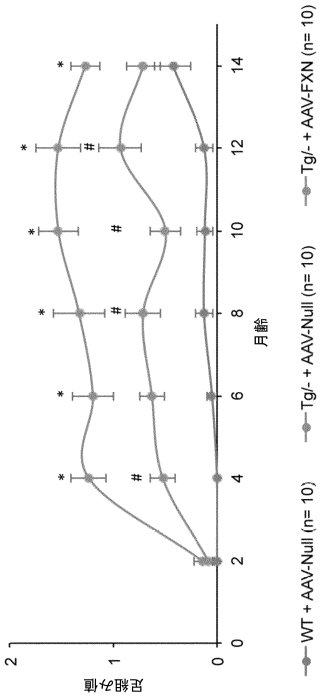
	Tg／－ +AAV－NULL対Tg／－ +AAV－FXN	Tg／－ +AAV－FXN対Tg／Tg
肝臓	3．23倍，**p=0.019**	0.349
心臓	2．02倍，p= 0.080	0.185
DRG（腰部）	2．01倍，**p=0.004**	0.493
脊髄（腰部）	1．55倍，**p=0.024**	**0.015**
脊髄（胸部）	1．46倍，p=0.104	**0.027**
脊髄（頸部）	1．63倍，p=0.062	0.088
小脳	1．29倍，p=0.066	**0.002**
脳C1	2．51倍，p=0.075	**0.020**

	Tg／－ +AAV－NULL対Tg／－ +AAV－FXN	Tg／－ +AAV－FXN対Tg／Tg
肝臓	3．23倍，**p=0.027**	0.454
心臓	2．02倍，**p=0.007**	0.018
DRG（腰部）	2．01倍，**p=0.029**	0.030
脊髄（腰部）	1．55倍，**p=0.010**	0.001
脊髄（胸部）	1．46倍，**p=0.003**	0.006
脊髄（頸部）	1．63倍，**p=0.012**	0.026
小脳	1．29倍，**p=0.008**	0.077
脳C1	1．53倍，**p=0.029**	0.207

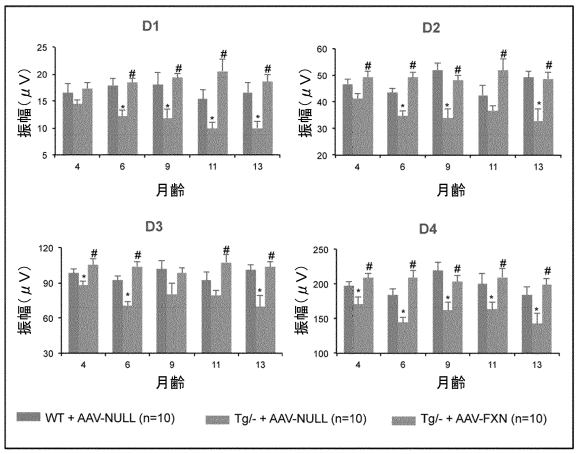
【図８】



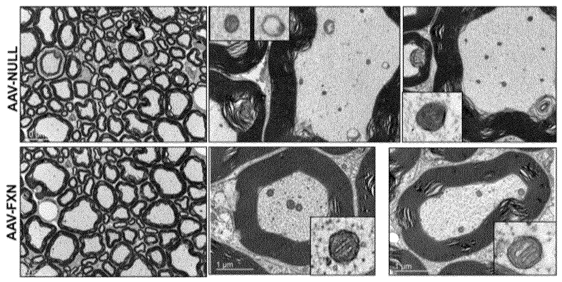
【図９】



【図１０】



【図１１】



【配列表】

0007128491000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI	
A61P	*25/28*	*(2006.01)*	A61P	25/28
A61P	*21/00*	*(2006.01)*	A61P	21/00
A61P	*9/00*	*(2006.01)*	A61P	9/00
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	48/00

(72)発明者 マティージャ ドゥエニャス アントニ
スペイン国 ０８９１６ バダロナ カミ デ レ エスコレス エセ／エネ カレテラ デ カン ルティ フンダシオ インスティテュート ディンベスティガシオ エン シエンシエス デ ラ サルー ヘルマンズ トリアス イ プジョル
(72)発明者 サンチェス ディアス イベリス
スペイン国 ０８９１６ バダロナ カミ デ レ エスコレス エセ／エネ カレテラ デ カン ルティ フンダシオ インスティテュート ディンベスティガシオ エン シエンシエス デ ラ サルー ヘルマンズ トリアス イ プジョル
(72)発明者 バラゲ カバセス エウダルド
スペイン国 ０８９１６ バダロナ カミ デ レ エスコレス エセ／エネ カレテラ デ カン ルティ フンダシオ インスティテュート ディンベスティガシオ エン シエンシエス デ ラ サルー ヘルマンズ トリアス イ プジョル

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献
国際公開第２０１６／１５０９６４（WO，A１）
国際公開第２０１６／１１５５０３（WO，A１）
国際公開第２００９／０３４１２７（WO，A１）
特表２０１７－５２１４９２（ＪＰ，A）
国際公開第２０１７／５２１４９２（WO，A１）
特表平８－５０３８５５（ＪＰ，A）
特表２０１３－５０９８９０（ＪＰ，A）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ａ６１Ｋ ３５／７６
Ａ６１Ｐ ２５／０２
Ａ６１Ｐ ２５／２８
Ａ６１Ｐ ２１／００
Ａ６１Ｐ ９／００
Ａ６１Ｋ ４８／００
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ