

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-503405

(P2016-503405A)

(43) 公表日 平成28年2月4日(2016.2.4)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	Z N A	4 B 050
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1	4 C 084
A61P 25/00 (2006.01)	A 61 P 25/00		4 C 085
A61P 25/28 (2006.01)	A 61 P 25/28		4 C 086
A61P 25/16 (2006.01)	A 61 P 25/16		4 C 087

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-540845 (P2015-540845)	(71) 出願人	500034653 ジェンザイム・コーポレーション
(86) (22) 出願日	平成25年11月4日 (2013.11.4)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月12日 (2015.6.12)		1 4 2, ケンブリッジ, ケンダル ストリート 5 0 0
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/068242	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(87) 國際公開番号	W02014/071282	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(87) 國際公開日	平成26年5月8日 (2014.5.8)	(72) 発明者	セルジオ・パブロ・サルディ アメリカ合衆国ニュージャージー州O 8 8
(31) 優先権主張番号	61/722,434		O 7. ブリッジウォーター、コーポレート ドライブ5 5. メールコード: 5 5 エー 5 0 5 エー. サノフィ
(32) 優先日	平成24年11月5日 (2012.11.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】タンパク質症を処置するための組成物および方法

(57) 【要約】

本開示は、哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物における神経機能を改善するための方法に関する。グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物における毒性脂質を低減し、-シヌクレインを低減し、かつ/またはタンパク質凝集体の蓄積を阻害するための方法も開示する。

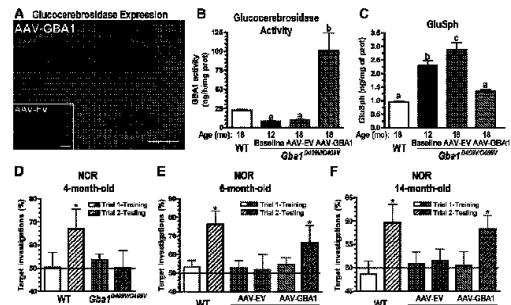


FIG. 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物における神経機能を改善するための方法。

【請求項 2】

哺乳動物は、タンパク質症により神経機能が低減している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、それを必要とする哺乳動物における神経機能の喪失を防止するための方法。 10

【請求項 4】

哺乳動物はタンパク質症を有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

タンパク質症を有する哺乳動物における毒性脂質を低減し、 α -シヌクレインを低減し、タウを低減し、またはタンパク質凝集体の蓄積を阻害するための方法であって、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む前記方法。
。

【請求項 6】

哺乳動物は、作用物質の投与前にグルコセレブロシダーゼ活性が低減している、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 7】

哺乳動物は、グルコセレブロシダーゼ 1 (GBA1) 遺伝子に 1 つまたはそれ以上の変異を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

変異は D 4 0 9 V 变異である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

タウを低減することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

α -シヌクレインを低減することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

毒性脂質を低減することを含む、請求項 5 に記載の方法。 30

【請求項 12】

毒性脂質はグルコシルスフィンゴシンである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

毒性のグルコシルスフィンゴシンは少なくとも約 30 % 低減される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

毒性のグルコシルスフィンゴシンは少なくとも約 50 % 低減される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

毒性のグルコシルスフィンゴシンは、タンパク質症のない哺乳動物と有意差のないレベルに低減される、請求項 12 に記載の方法。 40

【請求項 16】

タンパク質凝集体の蓄積を阻害することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 17】

タンパク質凝集体は、ユビキチン、タウ、および α -シヌクレインからなる群から選択されるタンパク質を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

哺乳動物は、アルツハイマー病、ゴーシェ病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、パーキンソニズム、パーキンソン病、リティコ・ボディング病、レビー小体型認知症、神經

10

20

30

40

50

原線維変化優位型認知症、拳闘家認知症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、ハーラーフォルデン・シュバッツ病、ならびにリポフスチン沈着症からなる群から選択される疾患と診断されている、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

タンパク質症はタンパク質凝集体を含む、請求項1、2、および4～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

タンパク質凝集体は、ユビキチン、タウ、および - シヌクレインからなる群から選択されるタンパク質を含む、請求項19に記載の方法。 10

【請求項21】

タンパク質症はタウオパシーである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

タウオパシーは、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、パーキンソニズム、パーキンソン病、リティコ - ボディグ病、レビー小体型認知症、神経原線維変化優位型認知症、拳闘家認知症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、ハーラーフォルデン・シュバッツ病、ならびにリポフスチン沈着症からなる群から選択される疾患である、請求項21に記載の方法。 20

【請求項23】

タンパク質症はシヌクレイノパシーである、請求項20に記載の方法。

【請求項24】

作用物質は、小分子、抗体、核酸分子、またはポリペプチドを含む、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

作用物質は、GBA1遺伝子またはその同等物をコードする核酸である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

作用物質は、GBA1ポリペプチドまたはその同等物である、請求項24に記載の方法。 30

【請求項27】

作用物質は、GBA1に特異的に結合する抗体である、請求項24に記載の方法。

【請求項28】

作用物質は小分子である、請求項24に記載の方法。

【請求項29】

小分子は、グルコセレブロシダーゼ活性の小分子アクチベーターである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

作用物質はウイルスである、請求項24に記載の方法。 40

【請求項31】

ウイルスは、GBA1遺伝子またはその同等物をコードする核酸を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

GBA1遺伝子またはその同等物は、GBA1タンパク質の発現を調節するプロモーターに作動可能に連結している、請求項25または31に記載の方法。

【請求項33】

ウイルスは神経細胞に感染する、請求項30～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

ウイルスはアデノ随伴ウイルス(AAV)である、請求項30～33のいずれか一項に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 3 5】

A A V は、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、または A A V 12 のカプシドを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

A A V は、クレード A ~ F 由来の A A V 血清型のカプシドを含む、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

A A V は A A V 血清型 1 カプシドを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

A A V は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、または A A V 12 の逆方向末端反復 (I T R) を含む、請求項 3 4 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

A A V は、クレード A ~ F 由来の A A V の I T R を含む、請求項 3 4 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

A A V は A A V 血清型 2 の I T R を含む、請求項 3 8 に記載の方法。

20

【請求項 4 1】

I T R およびカプシドは同じ A A V 血清型に由来する、請求項 3 4 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

I T R およびカプシドは異なる A A V 血清型に由来する、請求項 3 4 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

A A V は、A A V 1 カプシドおよび A A V 2 の I T R を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

。

【請求項 4 4】

30

A A V は自己相補的な A A V である、請求項 3 4 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

核酸は、G B A 1 導入遺伝子をコードする第 1 の非相同性ポリヌクレオチド配列、および G B A 1 導入遺伝子の相補体をコードする第 2 の非相同性ポリヌクレオチド配列を含み、第 1 の非相同性ポリヌクレオチド配列は、第 2 のポリヌクレオチド配列と鎖内塩基対を形成することができる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

第 1 の非相同性ポリヌクレオチド配列および第 2 の非相同性ポリヌクレオチド配列は、変異した A A V の I T R によって連結されている、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

40

変異した A A V の I T R は、D 領域の欠失を含み、末端分解配列の変異を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

プロモーターは、中枢神経系 (C N S) のニューロンにおいて G B A 1 遺伝子またはその同等物を発現することができる、請求項 3 2 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

プロモーターは、ニワトリ - アクチンプロモーターに連結しているヒト - グルクロニダーゼプロモーターまたはサイトメガロウイルスエンハンサーを含む、請求項 3 2 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

50

作用物質は医薬組成物中にある、請求項 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

医薬組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

作用物質または医薬組成物は注射によって投与される、請求項 1 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

作用物質または医薬組成物は C N S 中に投与される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

作用物質または医薬組成物は、脊髄中への直接注射によって、くも膜下腔内注射によって、脳室内注射によって、または海馬内注射によって投与される、請求項 5 3 に記載の方法。 10

【請求項 5 5】

哺乳動物のニューロンにおいてベースラインレベルを超えてグルコセレブロシダーゼ活性を増大させることを含む、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

哺乳動物のニューロンにおいてベースラインレベルを超えて少なくとも約 2 倍グルコセレブロシダーゼ活性を増大させることを含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

哺乳動物のニューロンにおいてベースラインレベルを超えて少なくとも約 3 倍グルコセレブロシダーゼ活性を増大させることを含む、請求項 5 5 に記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、その全文を参照によって本明細書に組み入れる、2012年11月5日出願の米国仮特許出願第 6 1 / 7 2 2 , 4 3 4 号の優先権の利益を主張するものである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

医薬において、タンパク質症は、ある種のタンパク質が構造的に異常となり、それによって身体の細胞、組織、および器官の機能を破壊する一クラスの疾患を意味する。タンパク質は、その正常の立体配置にフォールディングできないことがしばしばある。このミスフォールディングされた状態では、タンパク質は何らかの方法で毒性となり得（毒性機能の獲得）、またはその正常の機能を喪失し得る。タンパク質症には、アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオൺ病、2型糖尿病、アミロイドーシスなどの疾患、および広範囲の他の障害が含まれる。 30

【0 0 0 3】

タンパク質症は、全人口にわたって広まっている。例えば、米国では 1 0 0 万人近くの人がパーキンソン病を抱えて生き、5 1 0 万人ものアメリカ人がアルツハイマー病にかかっている。現在、これらの疾患に対する治療法はなく、疾患および疾患の進行の根底となる分子上の機序の多くは分かっていない。 40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

これらの壊滅的な疾患に対する治療法はないが、ある種の症状は軽減されると考えられている。当技術分野において、タンパク質症に関連する症状を軽減または管理する際に有効な治療法を開発することが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 5】

本開示は、タンパク質症を処置するための方法および組成物に関する。一態様は、哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与する 50

ことを含む、タンパク質症を有する哺乳動物における神経機能を改善するための方法に関する。タンパク質症は、奇形のタンパク質および／またはタンパク質の蓄積によって引き起こされる疾患（例えば、神経変性疾患）を意味する。このクラスの疾患は、毒性になり、その正常な機能を喪失し、かつ／または細胞の機能を破壊し得る、構造上異常なタンパク質を特徴とする。さらなる一態様は、哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症に罹患している、または罹患するリスクのある哺乳動物における神経機能を改善するための方法に関する。

【0006】

タンパク質症は、中枢神経系に存在する場合は、認知機能の障害をもたらし得る。認知機能または神経機能とは、記憶力、注意、言語、意思決定、問題解決などのことである。態様において、本発明の方法は、哺乳動物においてグルコセレブロシダーゼ活性を増大させることにより、認知機能、例えば記憶機能を改善することに関する。

10

【0007】

別の一態様は、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物における毒性脂質（例えば、グルコシルスフィンゴシン）を低減し、-シヌクレインを低減し、タウを低減し、またはタンパク質凝集体の蓄積を阻害／低減するための方法に関する。さらなる一態様は、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タウオパシーに罹患している、または罹患するリスクのある哺乳動物における毒性脂質（例えば、グルコシルスフィンゴシン）を低減し、-シヌクレインを低減し、タウを低減し、またはタンパク質凝集体の蓄積を阻害するための方法に関する。哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性の増大は、有益な組織学的变化をもたらし得る。特に、グルコセレブロシダーゼ活性の増大は、タンパク質症を有する対象における毒性タンパク質種を低減することが示されている。グルコシルスフィンゴシンなどの毒性脂質はCNSに蓄積し、神経毒として作用し得る。-シヌクレインは、ヒトではSNCA遺伝子によってコードされるタンパク質である。-シヌクレインは凝集して、レビー小体によって特徴付けられる病理学的障害において不溶性の原線維を形成し得る。これらの障害はシヌクレインオパシーとして知られており、例えば、パーキンソン病およびレビー小体型認知症を含む。グルコセレブロシダーゼ活性の増大も、例えばタウおよびユビキチンなど、細胞における他のタンパク質凝集体を低減し得る。いずれの場合も、異常な形態のタンパク質が、少なくとも部分的に、哺乳動物の疾患状態に寄与している。

20

【0008】

本開示の他の態様は、治療有効量の、グルコセレブロシド合成酵素の小分子インヒビターまたはグルコセレブロシダーゼのポジティブモジュレーターを投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物におけるグルコセレブロシド脂質のレベルを低減するための方法に関する。さらなる一態様は、治療有効量の、グルコセレブロシド合成酵素の小分子インヒビターまたはグルコセレブロシダーゼのポジティブモジュレーターを投与することを含む、タウオパシーに罹患している、または罹患するリスクのある哺乳動物におけるグルコセレブロシド脂質のレベルを低減するための方法に関する。基質低減療法（substrate reduction therapy）は以前に記載されている（例えば、各々を全文において参照によって組み入れる、McEachern KAら（2007年）Mol. Genet. Metab.、91巻、259～67頁；Cabrerizo-Salazar MAら（2012年）PLoS One、7巻、e43310；および米国特許第8168587号を参照されたい）。治療有効量の、グルコセレブロシド合成酵素の小分子インヒビターまたはグルコセレブロシダーゼのポジティブモジュレーターを哺乳動物に投与することを含む、それを必要とする哺乳動物（例えば、タンパク質症に罹患している、または罹患するリスクのある哺乳動物）における神経機能を改善するための方法、およびそれを必要とする哺乳動物における神経機能の喪失を防止し、阻害し、または低減するための方法も開示する。

30

【0009】

40

50

さらなる一態様は、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、それを必要とする哺乳動物における神経機能の喪失を防止するための方法に関する。一実施形態において、哺乳動物はタウオパシーに罹患しており、または罹患するリスクがある。タンパク質症に罹患しており、または罹患するリスクがある哺乳動物においてグルコセレブロシダーゼ活性を増強すると、疾患に関連する、記憶喪失および神経機能の低下などの認知障害を防止し得る。実施形態において、本方法は、タンパク質症と診断され得ているが、疾患状態に関連する認知障害の典型的な徴候を未だ経験していない対象に有益である。また、例えば、タンパク質症を引き起こすことが分かっている対象または対象の家族系列における変異も、この治療方法の恩恵を受け得る。

【0010】

10

上記の実施形態のいくつかにおいて、哺乳動物はヒトである。

【0011】

上記の実施形態のいくつかにおいて、哺乳動物は、アルツハイマー病、ゴーシェ病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、パーキンソニズム、パーキンソン病、リティコ・ボディグ病、レビー小体型認知症、神経原線維変化優位型認知症 (tangle - predominant demantia)、拳闘家認知症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症 (Argyrophilic grain disease)、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、ハーラーフォルデン・シュバッツ病、ならびにリポフスチン沈着症からなる群から選択される疾患と診断されている。

20

【0012】

上記の実施形態のいくつかにおいて、哺乳動物は、作用物質の投与前にグルコセレブロシド活性が低下していてもよい。

【0013】

上記の実施形態のいくつかにおいて、哺乳動物は、グルコセレブロシダーゼ1 (GBA1) 遺伝子に1つまたはそれ以上の変異があり得る。GBA1変異は当技術分野においてよく知られており、非限定的な例を本明細書に記載する（例えば、D409変異）。

30

【0014】

上記の実施形態のいくつかにおいて、方法は、タウ、-シヌクレイン、および／または毒性脂質（例えば、グルコシルスフィンゴシン）を低減する。関連の実施形態において、毒性のグルコシルスフィンゴシンは、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上低減される。関連の実施形態において、毒性のグルコシルスフィンゴシンは、タンパク質症のない哺乳動物と有意差のないレベルに低減される。

【0015】

上記の実施形態のいくつかにおいて、タンパク質症は、タンパク質凝集体（例えば、ユビキチン、タウ、および／または-シヌクレイン）に関連する。関連の実施形態において、方法は、タンパク質凝集体（例えば、ユビキチン、タウ、および／または-シヌクレインを含むタンパク質凝集体）の蓄積を阻害することを伴う。いくつかの実施形態において、タンパク質症はタウオパシー（例えば、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、パーキンソニズム、パーキンソン病、リティコ・ボディグ病、レビー小体型認知症、神経原線維変化優位型認知症、拳闘家認知症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、ハーラーフォルデン・シュバッツ病、ならびにリポフスチン沈着症）である。いくつかの実施形態において、タンパク質症はシヌクレイノパシーである。

40

【0016】

上記の実施形態のいくつかにおいて、作用物質は、小分子、抗体、核酸分子、またはオリペチドである（または、これらを含んでいる）。実施形態において、作用物質は、GBA1遺伝子をコードする核酸またはその同等物（例えば、グルコセレブロシドの切断を

50

触媒するポリペプチドをコードする、フラグメント、類似体、またはこれらの誘導体)である。他の実施形態において、作用物質は、G B A 1 ポリペプチドまたはその同等物(例えば、グルコセレブロシドの切断を触媒する、フラグメント、類似体、もしくはこれらの誘導体)である。実施形態において、作用物質は、G B A 1 に特異的に結合する、抗体またはそのフラグメントである。実施形態において、作用物質は小分子(例えば、小分子アクチベーター)である。実施形態において、作用物質はシャペロンである。実施形態において、方法は、タンパク質症、シヌクレイノパシー、タウオパシーなどに関連する症状を処置する上で有益である第2の作用物質を投与することを伴う。

【0017】

上記の実施形態のいくつかにおいて、作用物質はウイルス/ウイルスベクターである。実施形態において、ウイルスは、G B A 1 遺伝子またはその同等物をコードする核酸を含む。関連の実施形態において、G B A 1 遺伝子またはその同等物は、G B A 1 タンパク質の発現を調節するプロモーターに作動可能に連結している(例えば、それだけには限定されないが、ニワトリ - アクチンプロモーターに連結しているヒト - グルクロニダーゼプロモーターまたはサイトメガロウイルスエンハンサーを含めて、プロモーターは、中枢神経系のニューロンにおいて、G B A 1 遺伝子またはその同等物を発現することができる)。

【0018】

上記の実施形態のいくつかにおいて、作用物質はアデノ随伴ウイルス(A A V)である。実施形態において、A A Vは、血清型A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、またはA A V 12のカプシドを含む。実施形態において、A A Vは、クレードA ~ F由来のA A V血清型のカプシドを含む。実施形態において、A A Vは、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、またはA A V 12の逆方向末端反復(I T R)を含む。実施形態において、A A VはクレードA ~ F由來のA A VのI T Rを含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、I T Rおよびカプシドは同じA A V血清型に由来する。他の実施形態において、I T Rおよびカプシドは異なるA A V血清型に由来する。

【0020】

いくつかの実施形態において、A A Vは自己相補的なA A Vである。

【0021】

一実施形態において、核酸は、G B A 1 導入遺伝子をコードする第1の非相同性ポリヌクレオチド配列、およびG B A 1 導入遺伝子の相補体をコードする第2の非相同性ポリヌクレオチド配列を含み、第1の非相同性ポリヌクレオチド配列は、第2のポリヌクレオチド配列と鎖内塩基対を形成することができる。関連の実施形態において、第1の非相同性ポリヌクレオチド配列および第2の非相同性ポリヌクレオチド配列は、変異したA A VのI T Rによって連結されている(例えば、変異したA A V I T RはD領域の欠失を含み、末端分解配列(terminal resolution sequence)の変異を含む)。

【0022】

上記の実施形態のいくつかにおいて、作用物質は医薬組成物にある。関連の実施形態において、医薬組成物は薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0023】

上記の実施形態のいくつかにおいて、作用物質または医薬組成物は、経口の経路によって、血管内の経路によって、静脈内の経路によって、筋肉内の経路によって、粘膜組織(例えば、鼻、口、膣、直腸など)を経た直接的な吸収によって、経皮の経路によって、皮内の経路によって、中枢神経系(C N S)によって、脊髄によって、頭蓋内の経路によって、脳室内の経路によって、くも膜下腔内の経路によって、または脳内の経路によって投

10

20

30

40

50

与される。

【0024】

上記の実施形態のいくつかにおいて、作用物質または医薬組成物は注射によって投与される。実施形態において、作用物質または医薬組成物はCNS中に投与される（例えば、脊髄中への直接的な注射によって、くも膜下腔内注射によって、脳室内注射によって、または海馬内注射によって）。

【0025】

上記の実施形態のいくつかにおいて、方法は、ニューロンにおいてベースラインレベルを超えて（例えば、ニューロンにおけるベースラインレベルを超えて少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍以上）グルコセレブロシダーゼ活性を増大させることを含む。10

【0026】

本発明のさらなる目的および利点は以下の記載において部分的に述べるものであり、記載から部分的に明らかになるものであり、または本発明を実践することにより習得され得るものである。本発明の目的および利点は、添付の特許請求の範囲において指摘するものを含めて、本明細書に開示するエレメントおよび組合せによって現実化および達成されるものである。前述の全般的な記載および以下の詳しい記載はどちらも模範的および説明的にすぎず、請求する本発明を制限するものではないことを理解されたい。本明細書に組み入れられ、本明細書の一部分を構成する添付の図面は、説明と共に、本発明のいくつかの実施形態を図示し、本発明の原理の説明を供するものである。20

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】A～Cは、Gba1^{D409V / D409V}マウスの脳におけるタウ凝集体の進行性の蓄積を示す図である。（A）画像は、2月齢、6月齢、および12月齢のGba1^{D409V / D409V}、ならびに年齢をマッチさせた野生型（WT）のマウスの海馬における、抗タウ血清での免疫染色（緑色）および核染色（DAPI、青色）を示す（スケールバー=500μm）。（B）2月齢、6月齢、および12月齢の、WTおよびGba1^{D409V / D409V}の海馬におけるTau-5免疫反応性の定量により、年齢とともに凝集体が進行性に蓄積することが示される（1群あたりn=5）。（C）AT8、AT180、AT270、Tau-5、および-チューブリンに対する、18月齢のGba1^{D409V / D409V}マウス、および年齢をマッチさせた対照からの海馬の可溶化物の代表的な免疫プロットを示す。各レーンは独立のマウスの脳を表す。クローンAT8抗体により、Gba1^{D409V / D409V}高齢マウスにおけるタウのリン酸化の増大が示される（S202/T205）。タウレベルの合計（Tau-5）または他のリン酸化された種（AT180もしくはAT270）において、変異マウスと野生型マウスとの間の差は観察されなかった。結果を、平均値±SEMとして表す。異なる文字で印をつけたバーは相互に有意差がある（p<0.05）。

【図2】A～Fは、AAV-GBA1をCNS投与するとグルコシルスフィンゴシンレベルが低下し、記憶不全が逆転することを示す図である。4月齢および12月齢のGba1^{D409V / D409V}マウスに、AAV-EVまたはAAV-GBA1のいずれかを両側性に海馬に注射した。非注射のGba1^{D409V / D409V}同腹仔を、生化学的および組織学的なエンドポイントに対するベースラインとして、外科手術時に安樂死させた（n=8）。年齢をマッチさせた、非注射の野生型（WT、n=9）マウスを陽性対照として用いた。両方のコホートにおいて、注射6か月後に生化学的および病理学的分析用に組織を回収した。（A）定位固定注射6か月後の、組換え酵素の海馬発現。画像は、AAV-GBA1を注射したGba1^{D409V / D409V}マウスにおける、グルコセレブロシダーゼの免疫反応性（赤色）および核（DAPI、青色）の染色を示す（スケールバー、400μm）。挿入図は、AAV-EVを注射したマウスにおけるグルコセレブロシダーゼおよび核の染色を示す。Gba1^{D409V / D409V}マウスにAAV-GBA1を海馬投与すると、グルコセレブロシダーゼ活性が上昇し（B、赤色バー、n=11、30

50

$p < 0.05$)、グルコシルスフィンゴシン (GlcSph) のクリアランスをWTレベルまで促進したが (C ; 赤色バー、 $n = 11$ 、 $p < 0.05$)、AAV-EV処置したGba1^{D409V / D409V}マウスではグルコセレブロシダーゼ活性における変化は示されず (B、青色バー $n = 12$ 、 $p > 0.05$)、ベースラインレベルに比べてG1uSphが引き続き蓄積した (C、黒色バー、 $n = 8$ 、 $p < 0.05$)。 (D) 4月齢の野生型 (WT) およびGba1^{D409V / D409V}マウスの外科手術前評価では、2つの同一の物体に暴露した場合、物体の好みを表さなかった。試行1からの結果 (訓練) を白色 (WT) および紫色 (Gba1^{D409V / D409V}マウス) の塗りつぶしバーとして示す。24時間の保持時間後、マウスに新規な物体を提示した。試行2 (試験、斜線バー) では、WTマウスは、新規な物体を有意により頻繁に調査した ($n = 9$ 、 $p < 0.05$)。対照的に、Gba1^{D409V / D409V}マウスは ($n = 11$ 、青色斜線バー)、新規な物体に対する好みを示さず、認知障害が指摘された。 (E) 注射2か月後、マウスを新規物体認識 (NOR) 試験に供した。AAV-GBA1で処置したGba1^{D409V / D409V}マウス ($n = 10$ 、青色斜線バー) は試験的試行の間に新規な物体を提示すると記憶欠損の逆転を表したが、AAV-EVで処置した動物は表さなかった ($n = 9$ 、赤色斜線バー)。 (F) 12月齢のGba1^{D409V / D409V}マウスの別々のコホートに、AAV-EV ($n = 12$) またはAAV-GBA1 ($n = 12$) を注射した。動物を注射2か月後に試験すると (14月齢)、4月齢のコホート同様、記憶機能不全の逆転が観察された。結果を、平均値 \pm SEMとして表す (D~F)。横線は、いずれの物体にも好みを表さない、50%標的調査を区切るものである (*、50%から有意差あり、 $p < 0.05$)；(B、C)異なる文字のあるバーは相互に有意差がある ($p < 0.05$)。

【図3】A~Cは、症候性のGba1^{D409V / D409V}マウスの海馬におけるグルコセレブロシダーゼの発現により、凝集した - シヌクレインおよびタウの蓄積が遅くなることを示す図である。4月齢または12月齢のGba1^{D409V / D409V}マウスの2つのコホートに、AAV-EVまたはAAV-GBA1のいずれかを、両側性に海馬に注射した。年齢をマッチさせた、非注射のWTマウスを、陽性対照として非処置のままにした。Gba1^{D409V / D409V}同腹仔を、ベースライン群として注射時に収集した。注射した動物を、外科手術の6か月後に屠殺した。グラフは、4月齢 (左) または12月齢 (右) に注射したコホートに対する、ユビキチン (A)、プロテイナーゼK抵抗性 - シヌクレイン (B)、およびタウ (C) の免疫反応性の海馬の定量を表す。症候性のGba1^{D409V / D409V}マウスのCNSにおけるグルコセレブロシダーゼの増強により、凝集したタンパク質のレベルは低下したが、この処置は年長動物では効果が低かった。画像は、AAV-EVまたはAAV-GBA1で処置した18月齢のGba1^{D409V / D409V}マウスの海馬における、ユビキチン (A、緑色)、プロテイナーゼK抵抗性 - シヌクレイン (B、赤色)、およびタウ (C、緑色) の免疫反応性を示す。DAPI核染色を青色で示す (スケールバー、 $100 \mu\text{m}$)。結果を、1群あたり $n = 8$ の平均値 \pm SEMとして表す。異なる文字がついているバーは相互に有意差がある ($p < 0.05$)。

【図4】A~Cは、A53T - シヌクレインマウスの脳におけるグルコセレブロシダーゼを増強すると、 - シヌクレインレベルが低下することを実証する図である。A53T - シヌクレイントランスジェニックマウスは、脳のグルコセレブロシダーゼ活性の低下を表す。(A)多様なリソソームの酵素の活性を、ホモ接合型 ($n = 9$) およびヘテロ接合型 ($n = 8$) の - シヌクレイントランスジェニックならびに野生型の同腹仔 ($n = 9$) からの皮質ホモジネートにおいて決定した。グルコセレブロシダーゼ活性は - シヌクレインレベルと反比例し、ホモ接合型のマウスは加水分解酵素活性の大変な低下を示した。他の2つのリソソームの加水分解酵素である、ヘキソサミニダーゼおよび - ガラクトシダーゼの酵素活性は、A53T - - シヌクレインの発現によって無変化のままであった。(B) 4月齢のA53T - - シヌクレインマウスに各々、AAV-GFP ($n = 6$) またはAAV-GBA1 ($n = 5$) のいずれかを、右側線条体に片側性に注射した

。対象間の - シヌクレインレベルにおける変動性を低減するために、各動物に対する非注射の対照として左側の線条体を用いた。4か月後、マウスを安樂死させ、両側の線条体を回収した。A A V - G B A 1 を注射した線条体に頑強なグルコセレブロシダーゼ活性が観察された（非注射の反対側を7倍上回る）。グルコセレブロシダーゼの発現により、サイトゾル分画における - シヌクレインレベルの低下が促進された（Trips可溶性、膜非関連； $p < 0.05$ ）。（C）新生仔（P0）のA53T - - シヌクレインマウスの腰髄中にA A V - G F P またはA A V - G B A 1 のいずれかを注射した。予想通り、頑強なグルコセレブロシダーゼ活性が、A A V - G B A 1 を注射したマウスに認められた（対照を3倍上回る）。線条体同様、グルコセレブロシダーゼの発現により、サイトゾル分画における - シヌクレインレベルが低下した（Trips可溶性、膜非関連；1群あたりn=7、 $p < 0.05$ ）。データを、平均値±SEMとして表す。*は $p < 0.05$ での統計上の有意性を表す。

【図5】A～Bは、グルコセレブロシダーゼ活性の低下により - シヌクレインの蓄積がもたらされることを示す図である。（A）Gba1^{D409V/D409V}ゴーシュマウスにおける海馬の - シヌクレインおよびユビキチンの凝集体を示す免疫組織化学の画像を示す。（B） - シヌクレイン免疫反応性のパーセント値を、WTおよびGba1^{D409V/D409V}マウスに対して定量化したもの。PK=プロテイナーゼK。

【図6】A～Dは、Gba1^{D409V/D409V}ゴーシュマウスマルクモデルのシヌクレインノバシーの特徴を示す図である。これらのマウスはユビキチンの進行性の蓄積（A）、および - シヌクレイン凝集体（B）、およびグルコシルスフィンゴシンの蓄積（D）を実証した。さらに、これらのマウスは、新規物体認識試験において記憶不全を実証した（C）。

【図7】G B A 1 の増強によりGba1^{D409V/D409V}マウスの病態が回復することを実証する図である（予防的試験）。新規物体認識試験により、前駆症状の（2月齢Gba1^{D409V/D409V}）マウスの海馬にグルコセレブロシダーゼをA A V 媒介性に送達することで、記憶不全を正すことが示される。

【図8】A53T - - シヌクレインマウスの脳におけるグルコセレブロシダーゼの発現により、タウ凝集体の蓄積が低減することを示す図である。A53T - - シヌクレイントランスジェニックマウスに、P0にA A V - 対照またはA A V - G B A 1 のいずれかを側脳室中に両側性に注射した。年齢をマッチさせた、非注射のWTマウスを、陰性対照として非処置のままにした。画像は、野生型（WT）およびA53T - - シヌクレイン過剰発現マウスの海馬における、抗タウ血清（緑色）および核染色（DAPI、青色）での免疫染色を示す（スケールバー、500 μm）。

【図9】A～Bは、タウトランスジェニックマウスのCNSにおけるグルコセレブロシダーゼ活性を増強すると記憶不全が防止されることを示す図である。（A）2月齢のタウトランスジェニックマウスに、A A V - E V またはA A V - G B A 1 のいずれかを両側性に海馬注射した。年齢をマッチさせた、非注射の野生型（WT；n=8）マウスを、試験に対する陽性対照として用いた。試行1（訓練）からの結果を、白色（WT）、緑色（TAU+A A V - E V）、または赤色（TAU+A A V - G B A 1）の塗りつぶしバーとして示す。24時間の保持時間後、マウスに新規な物体を提示した。試行2では（試験、斜線バー）、WTマウスは、4月齢または8月齢の両方とも、新規な物体を有意により頻繁に調査した。対照的に、対照のウイルスを注射したThy1-TAU22トランスジェニックマウスは（n=9；緑色斜線バー）、新規な物体に対する好みを示さず、アッセイした両方の時間点での認知障害が指摘された。A A V - G B A 1 で処置したThy1-TAU22マウス（n=13；赤色斜線バー）は、処置2か月後に記憶機能の改善の傾向を表し、処置後6か月に試験したものは有意であった。結果を、平均値±SEMとして表す。横線は、いずれの物体にも好みを表さない、50%標的調査を区切るものである（*、50%から有意差あり、 $p < 0.05$ ）。

【発明を実施するための形態】

【0028】

10

20

30

40

50

定義

別段の規定がなければ、本明細書において用いる技術用語および科学用語は全て、本開示が属する技術分野の通常の技術者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載するものに同様または同等であるあらゆる方法および材料を、本発明の実践または試験において用いることができるが、例示的な方法、装置、および材料をここに記載する。本明細書に引用する技術上および特許上の出版物は全て、その全文が参照によって本明細書に組み入れられる。本明細書におけるどれも、本発明が先行の発明に鑑みてこのような開示に先行する権利を与えられないことを認めるものと解釈してはならない。

【0029】

本開示の実践は、別段の指摘がなければ、組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組換えDNAの従来の技術を用いるものであり、これら技術は当技術分野の技術の範囲内である。例えば、Michael R. GreenおよびJoseph Sambrook、Molecular Cloning(第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2012年)；Ausubelら編集のシリーズ(2007年)、Current Protocols in Molecular Biology；the series Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.、N.Y.)；MacPhersonら(1991年)、PCR 1:A Practical Approach(IRL Press、Oxford University Press)；MacPhersonら(1995年)、PCR 2:A Practical Approach；HarlowおよびLane編集(1999年)、Antibodies, A Laboratory Manual；Freshney(2005年)、Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique、第5版、Gait編集(1984年)、Oligonucleotide Synthesis；米国特許第4,683,195号；HamesおよびHiggins編集(1984年)、Nucleic Acid Hybridization；Anderson(1999年)、Nucleic Acid Hybridization；HamesおよびHiggins編集(1984年)、Transcription and Translation；Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press(1986年))；Perbal(1984年)、A Practical Guide to Molecular Cloning；MillerおよびCalos編集(1987年)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(Cold Spring Harbor Laboratory)；Makrides編集(2003年)、Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells；MayerおよびWalker編集(1987年)、Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Academic Press、London)；Herzenbergら編集(1996年)、Weir's Handbook of Experimental Immunology；Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual、第3版(Cold Spring Harbor Laboratory Press(2002年))；Sohail(編集)(2004年)、Gene Silencing by RNA Interference:Technology and Application(CRC Press)を参照されたい。

【0030】

数字表示、例えば、pH、温度、時間、濃度、および分子量は全て、範囲を含めて、適宜、0.1または1.0の増加により(+)または(-)変動する近似である。しかし全ての数字表示に「約」の語が先行することを常に明確に記載するわけではないことを理解されたい。本明細書に記載する試薬は例示にすぎず、このような同等物が当技術分野において知られていることを常に明確に記載することは限らないことも理解されたい。

10

20

30

40

50

【0031】

本明細書および特許請求の範囲において用いられる、単数形の「一つの（a）」、「一つの（an）」、および「その（the）」は、文脈が他のものを明らかに指示しなければ、複数の指示対象を含む。例えば、「一つの（a）細胞」の語は、複数の細胞を含み、これらの混合を含む。

【0032】

別段の記載がなく、または文脈から明らかでなければ、本明細書で用いられる「または」の語は包括的なものであることが理解される。

【0033】

「含んでいる（including）」の語は本明細書で用いられて、「それだけには限定されないが含んでいる」の句を意味し、変換可能に用いられる。10

【0034】

本明細書で用いられる「含んでいる（comprising）」または「含む（comprises）」の語は、組成物および方法が列挙するエレメントを含むが、他のものを排除するものではないことを意味するものとされる。組成物および方法を規定するのに用いられる「から本質的になる」は、記載する目的で、組合せにあらゆる本質的な重大性のある他のエレメントを排除することを意味する。このように、本明細書に規定するエレメントから本質的になる組成物は、単離方法および精製方法からの微量の汚染物質、ならびにリン酸緩衝食塩水、保存剤などの薬学的に許容される担体を排除するものではない。「からなる」は、他の成分の微量のエレメントを超えて排除すること、および本発明の組成物を投与するための実質的な方法工程、または組成物を生成し、もしくは意図する結果を実現するためのプロセス工程を意味する。これらの移行用語の各々によって規定される実施形態が、本発明の範囲内にある。20

【0035】

「グルコセレブロシダーゼ1」および「GBA1」および「GBA1ポリペプチド」の語は交換可能に用いて、スフィンゴ糖脂質であるグルコセレブロシド（グルコシルセラミド、Glucosidase）のベータ-グルコシド連結のグルコースおよびセラミドへの切断を触媒する、-グルコセレブロシダーゼタンパク質またはポリペプチドを意味する。GBA1は、酸-グルコシダーゼ；D-グルコシル-N-アシルスフィンゴシングルコヒドロラーゼ；GCアーゼ；およびグルコシダーゼ、ベータ、酸、および転写バリアント1としても知られている。30

【0036】

「グルコセレブロシダーゼ1遺伝子」および「GBA1遺伝子」および「GBA1」の語は交換可能に用いて、-グルコセレブロシダーゼタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸またはポリヌクレオチドを意味する。この遺伝子が変異すると、グルコセレブロシドおよびグルコシルスフィンゴシンの蓄積を特徴とするリソソーム蓄積症であるゴーシェ病を引き起こし得る。GBAに関する情報は、Entrez GeneデータベースのGene ID：2629に見出すことができる。

【0037】

「グルコセレブロシダーゼ活性」の語は、グルコセレブロシドの切断を意味する。40

【0038】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」の語は交換可能に用いて、デオキシリボ核酸またはリボ核酸またはこれらの類似体のいずれかである、あらゆる長さの重合体形態のヌクレオチドを意味する。ポリヌクレオチドは、あらゆる3次元構造を有し得、既知または未知のあらゆる機能を行うことができる。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメント（例えば、プローブ、プライマー、EST、もしくはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスクアーナ、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、単離されているあらゆる配列のDNA、単離されているあらゆる配列のRNA、核酸プローブ、およびP50

ライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化されているヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体など、修飾されているヌクレオチドを含むことができる。ヌクレオチド構造に対する修飾は、存在する場合は、ポリヌクレオチドのアセンブリーの前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、標識化成分とのコンジュゲートなどにより、重合化後にさらに修飾され得る。この語は、2本鎖および1本鎖両方の分子も意味する。別段の特定または要求がなければ、ポリヌクレオチドである本発明のあらゆる実施形態は、2本鎖の形態、および2本鎖の形態を作り上げることが知られており、または予想される2本の相補的な各々の1本鎖の形態の両方を包含する。

【0039】

10

ポリヌクレオチドは、特異的な配列の4つのヌクレオチド塩基：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；およびポリヌクレオチドがRNAである場合はチミンに対してウラシル（U）からなる。したがって、「ポリヌクレオチド配列」の語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表現である。このアルファベット表現を、中央処理装置を有するコンピュータのデータベースにインプットし、機能ゲノム科学およびホモロジー検索などのバイオインフォマティクスアプリケーションに用いることができる。

【0040】

20

「ポリペプチド」および「タンパク質」の語は交換可能に用いて、アミノ酸残基のポリマーを意味し、最小の長さに限定されない。このようなアミノ酸残基のポリマーは、天然または非天然のアミノ酸残基を含むことができ、それだけには限定されないが、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量体、三量体、および多量体を含む。全長のタンパク質およびそのフラグメントの両方とも、この定義に包含される。この語はまた、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化など、ポリペプチドの発現後修飾も含む。さらに、本発明の目的では、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持するのであれば、天然の配列に対する欠失、付加、および置換などの修飾を含むタンパク質を意味する（全般的に自然界において保存されている）。これらの修飾は、部位特異的変異誘発によるなど、意図的であり得、またはタンパク質を生成する宿主の変異、もしくはPCR増幅によるエラーなど、偶発的であり得る。

【0041】

30

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の、配列の類似性を意味する。相同性は、比較の目的でアラインされ得る各配列における位置を比較することによって決定することができる。比較される配列における位置が、同じ塩基またはアミノ酸によって占有される場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の度合いは、配列によって共有される適合性または相同性の位置の数の関数である。「非関連の」または「非相同性の」配列は、本発明の配列の1つと、40%未満の同一性、または代替的に25%未満の同一性を共有する。

【0042】

40

ポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）が、別の配列に対してあるパーセント値（例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%）の「配列同一性」を有するということは、アラインさせた場合に、そのパーセント値の塩基（またはアミノ酸）が、2つの配列の比較において同じであることを意味する。このアラインメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、Ausubelら編集（2007年）Current Protocols in Molecular Biologyに記載されているものなど、当技術分野において知られているソフトウェアプログラムを用いて決定することができる。アラインメントに対してデフォルトパラメータを用いることができる。アラインメントプログラムの1つは、デフォルトパラメータを用いるBLASTである。例示的なプログラムには、それだけには限定されないが、以下のデフォルトパラメータを用いるBLASTNおよびBLASTPが含まれる：遺伝コード = 標準；フィルタ = なし；鎖 = 両方；カッ

50

トオフ = 60 ; 予想 = 10 ; マトリクス = B L O S U M 62 ; 記述 = 50 配列 ; ソーティング = H I G H S C O R E ; データベース = 非冗長、G e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B + G e n B a n k C D S 翻訳 + S w i s s P r o t e i n + S P アップデータ + P I R。これらのプログラムの詳細は以下のインターネットアドレスに見出すことができる : h t t p : / / w w w . n c b i . n l m . n i h . g o v / c g i - b i n / B L A S T。

【0043】

同等の核酸、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドは、基準の核酸、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドに対して、少なくとも 80% の配列同一性、または代替的に少なくとも 85% の配列同一性、または代替的に少なくとも 90% の配列同一性、または代替的に少なくとも 92% の配列同一性、または代替的に少なくとも 95% の配列同一性、または代替的に少なくとも 97% の配列同一性、または代替的に少なくとも 98% の配列同一性を有するものである。

10

【0044】

「遺伝子」は、転写および翻訳された後、特定のポリペプチドまたはタンパク質をコードすることができる、少なくとも 1 つのオープンリーディングフレーム (O R F) を含むポリヌクレオチドを意味する。

20

【0045】

「発現する」の語は、遺伝子生成物の生成を意味する。

【0046】

本明細書で用いられる「発現」は、それによってポリヌクレオチドが m R N A に転写されるプロセス、および / またはそれによって転写された m R N A が引き続きペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを意味する。ポリヌクレオチドがゲノム D N A に由来する場合、発現は、真核細胞における m R N A のスプライシングを含むことができる。

【0047】

「遺伝子生成物」または代替的に「遺伝子発現生成物」は、遺伝子が転写および翻訳される場合に產生されるアミノ酸（例えば、ペプチドまたはポリペプチド）を意味する。

30

【0048】

「非相同性の」は、それに対して比較され、またはその中に導入もしくは組み入れられる実体の残りと遺伝子型で区別可能な実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子操作技術によって異なる細胞型に導入されるポリヌクレオチドは、非相同性のポリヌクレオチドである（そして、発現される場合、非相同性のポリペプチドをコードし得る）。同様に、ウイルスのベクター中に組み入れられる細胞の配列（例えば、遺伝子またはその一部分）は、ベクターに関して非相同性のヌクレオチド配列である。

【0049】

「導入遺伝子」の語は、細胞中に導入され、R N A に転写することができ、場合により、適切な条件下で翻訳および / または発現されるポリヌクレオチドを意味する。態様において、導入遺伝子は、その中に導入される細胞に所望の性質を付与し、または別の方法で所望の治療もしくは診断成績をもたらす。

40

【0050】

「の発現を調節する」は当技術分野において十分理解されている語であり、通常は D N A 配列であるポリヌクレオチド配列の転写が、転写の開始に寄与し、もしくは転写を促進するエレメントに作動可能に連結していることに依存することを指摘する。「作動可能に連結している」は、ポリヌクレオチドが細胞中で機能できるように、ポリヌクレオチドを配置することを意図する。一態様において、本発明は、グルコセレブロシダーゼ 1 (G B A 1) などの下流の配列に対して作動可能に連結しているプロモーターを提供する。

【0051】

ポリヌクレオチドに適用される「コードする」の語は、ポリペプチドを「コードする」と言われるポリヌクレオチドが、天然状態において、または当業者によく知られている方

50

法によって操作される場合に、ポリヌクレオチドを転写および／または翻訳してポリペプチドおよび／またはそのフラグメント用にmRNAを生成することができることを意味する。アンチセンス鎖はこのような核酸の相補体であり、コードする配列はそれから推定することができる。

【0052】

「検出可能な標識」または「マーカー」には、それだけには限定されないが、酵素を含めた、放射性同位元素、蛍光色素、化学発光化合物、色素、およびタンパク質が含まれる。検出可能な標識はまた、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、または本明細書に記載する組成物に付着していくてもよい。

【0053】

「ハイブリダイゼーション」は、1つまたはそれ以上のポリヌクレオチドを反応させて、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化される複合体を形成する反応を意味する。水素結合は、ワトソン・クリックの塩基対、ホーグスタン (Hoogsteen) 結合によって、またはあらゆる他の配列特異的な方法で生じ得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2本の鎖、多重鎖の複合体を形成する3本以上の鎖、単一の自己とハイブリダイズする鎖、またはこれらのあらゆる組合せを含むことができる。ハイブリダイゼーション反応は、PCR反応の開始など、より広範なプロセスにおける工程、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素切断を構成し得る。

【0054】

ハイブリダイゼーション反応は、様々な「ストリンジエンシー」の条件下で行うことができる。一般的に、低ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション反応は、 $10 \times SSC$ 中約40または等しいイオン強度／温度の溶液で行われる。中等度のストリンジエンシーのハイブリダイゼーションは、典型的に、 $6 \times SSC$ 中約50で行われ、高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション反応は、一般的に、 $1 \times SSC$ 中約60で行われる。ハイブリダイゼーション反応は、当業者にはよく知られている「生理学的条件」下でも行うことができる。生理学的条件の非限定的な例は、細胞に通常見出される温度、イオン強度、pH、および Mg^{2+} 濃度である。

【0055】

ハイブリダイゼーションが2本の1本鎖ポリヌクレオチド間の逆平行の立体配置で生じる場合、反応は「アニーリング」と呼ばれ、これらのポリヌクレオチドを「相補的」と記述する。第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドの鎖の1つの間でハイブリダイゼーションが生じ得る場合、2本鎖のポリヌクレオチドは、別のポリヌクレオチドに対して「相補的」または「相同性」であり得る。「相補性」または「相同」(1つのポリヌクレオチドが別のポリヌクレオチドと相補的である度合い)は、一般的に受け入れられている塩基対のルールにしたがって、相互に水素結合を形成すると予想される反対の鎖における塩基の割合に関して数量化できる。

【0056】

本明細書で用いられる「ベクター」の語は、インタクトなレプリコンを含む非染色体性の核酸を意味し、したがって、ベクターが細胞内に配置された場合、形質転換のプロセスなどによって複製され得る。ベクターはウイルス性でも、または非ウイルス性でもよい。ウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、修飾されたバキュロウイルス、パポバウイルス、または他の方法で修飾されている天然に存在するウイルスが含まれる。核酸を送達するための例示的な非ウイルスベクターには、ネイキッドDNA；単独で、または陽イオン性ポリマーと組み合わせて、陽イオン性の脂質と複合されているDNA；陰イオン性および陽イオン性のリポソーム；場合によりリポソームに含まれている、非相同性のポリリジン、規定された長さのオリゴペプチド、およびポリエチレンイミンなどの、陽イオン性ポリマーと縮合されている、DNA-タンパク質複合体およびDNAを含む粒子；ならびにウイルスおよびポリリジン-DNAを含む三元複合体の使用が含まれる。

【0057】

10

20

30

40

50

「ウイルスベクター」は、*in vivo*、*ex vivo*、または*in vitro*のいずれかで宿主細胞中に送達されるポリヌクレオチドを含む、組換え生成されているウイルスまたはウイルス粒子と規定される。ウイルスベクターの例には、レトロウイルスのベクター、レンチウイルスのベクター、アデノウイルスのベクター、アデノ随伴ウイルスのベクター、単純ヘルペスウイルスのベクター、アルファウイルスのベクターなどが含まれる。セムリキ森林ウイルスベースのベクターおよびシンドビスウイルスベースのベクターなどのアルファウイルスのベクターも、遺伝子治療および免疫治療において用いるために開発されている。Schlesinger および Dubensky (1999年) Current Opinion in Biotechnology. 5巻、434~439頁、および Yingら (1999年) Nat. Med. 5巻(7)、823~827頁を参照されたい。

10

【0058】

当業者には知られている通り、6クラスのウイルスが存在する。DNAウイルスはクラスIおよびIIを構成する。RNAウイルスおよびレトロウイルスが残りのクラスを構成する。クラスIIIのウイルスは2本鎖のRNAゲノムを有する。クラスIVのウイルスはポジティブの1本鎖RNAゲノムを有し、ゲノム自体がmRNAとして作用する。クラスVのウイルスは、mRNA合成に対する錆型として用いるネガティブの1本鎖のRNAゲノムを有する。クラスVIのウイルスはポジティブの1本鎖RNAゲノムを有するが、複製だけではなくmRNA合成にもおけるDNA中間体を有する。レトロウイルスはRNAの形態の遺伝情報を保有するが、ウイルスが細胞に一旦感染すると、RNAはDNA形態に逆転写され、感染した細胞のゲノムDNAに組み込まれる。組み込まれたDNA形態はプロウイルスと呼ばれる。

20

【0059】

本発明によるベクター粒子が特定のウイルス「をベースとする」ことは、そのベクターがその特定のウイルスに由来することを意味する。ベクター粒子のゲノムは、バックボーンとしてそのウイルスからの成分を含む。ベクター粒子は、ウイルスのゲノムに適合性である不可欠なベクター成分を含む。ベクター粒子の構造上の成分の中にはそのウイルスに通常由来するものもあるが、ある成分は異なるウイルスを起源とし得る（例えば、ベクター粒子に様々な特異性を与える構造上の成分）。

【0060】

「プロモーター」の語は、特定の遺伝子の転写を開始するDNAの領域を意味する。プロモーターには、転写を適切に開始するのに必要とされるプロモーターの最小の一部分である、コアプロモーターが含まれ、転写因子の結合部位などの調節エレメントも含まれ得る。調節エレメントは転写を促進することも、または転写を阻害することもある。プロモーターの調節エレメントは、転写アクチベーターまたは転写リプレッサーに対する結合部位であり得る。プロモーターは構成的でも、または誘導性でもよい。構成的プロモーターは、常に活性であり、および/または遺伝子の転写が転写の基礎レベルを超えるように継続的に指示するプロモーターを意味する。誘導性プロモーターは、細胞に加えられ、または細胞中で発現される、分子または因子によって誘導することができるプロモーターである。誘導性プロモーターは、誘導の非存在下で転写の基礎レベルを依然として生成し得るが、誘導によりタンパク質の著しく大量の生成をもたらすのが典型的である。プロモーターは組織特異的でもあり得る。組織特異的プロモーターは、プロモーターを活性化するのに適切な転写因子を有するある集団の細胞において、タンパク質を生成させる。

30

【0061】

「逆方向末端反復」すなわち「ITR」配列は、当技術分野において十分に理解されている語であり、反対の配向であるウイルスのゲノムの末端に見出される比較的短い配列を意味する。

【0062】

「アデノ随伴ウイルス(AAV)逆方向末端反復(ITR)」配列は、当技術分野で十分に理解されている語であり、天然の1本鎖のAAVゲノムの両末端に存在するおよそ145ヌクレオチドの配列である。ITRの最も外側の125ヌクレオチドは、2つの二者

40

50

択一の配向のいずれかに存在し得、異なる A A V ゲノム間および単一の A A V ゲノムの 2 終端間に不均質性をもたらす。最も外側の 1 2 5 ヌクレオチドはまた、自己相補的の短い領域をいくつか含み（A、A'、B、B'、C、C'、およびD 領域と呼ばれる）、鎖間塩基対を I T R のこの一部分内で生じさせる。

【0063】

「末端分解配列」すなわち「t r s」は、ウイルス D N A の複製の間 A A V r e p タンパク質によって切断される A A V の I T R の D 領域における配列である。変異体の末端分解配列は、A A V r e p タンパク質による切断に対して抵抗性である。

【0064】

「抗体」の語は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または前述の組合せなどの標的を、免疫グロブリン分子の可変領域内の抗原認識部位の少なくとも 1 つによって、認識し、特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書で用いられる「抗体」の語は、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体フラグメント（例えば、F a b、F a b'、F (a b') 2、F d、および F v フラグメント）、单鎖 F v (s c F v) 变異体、多特異的抗体、例えば、少なくとも 2 つのインタクトな抗体から產生される二重特異的抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、および、抗体が所望の生物学的活性を表す限り抗原認識部位を含むあらゆる他の修飾されている免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる、抗体の重鎖定常ドメインの同一性に基づいて、あらゆる 5 つの主要なクラスの免疫グロブリン：それぞれ、I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M、またはこれらのサブクラス（イソ型）（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、および I g A 2）であってよい。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なり、よく知られているサブユニット構造および三次元立体配置を有する。抗体は、ネイキッドでも、または毒素、放射性同位元素などの他の分子にコンジュゲートしていくてもよい。

【0065】

「抗体フラグメント」の語は、インタクトな抗体の一部分を意味し、インタクトな抗体の抗原決定性の可変領域を意味する。抗体フラグメントの例には、それだけには限定されないが、F a b、F a b'、F (a b') 2、F d、および F v フラグメント、線状抗体、单鎖抗体、および抗体フラグメントから形成される多特異的抗体が含まれる。

【0066】

「モノクローナル抗体」は、单一の抗原決定基すなわちエピトープの極めて特異的な認識および結合に関する均一な抗体の集団を意味する。これは、異なる抗原決定基に対して向けられる異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体と対照的である。「モノクローナル抗体」の語は、インタクトおよび全長両方のモノクローナル抗体、ならびに抗体フラグメント（例えば、F a b、F a b'、F (a b') 2、F d、F v）、单鎖 (s c F v) 变異体、抗原の一部分を含む融合タンパク質、ならびに抗原認識部位を含むあらゆる他の修飾されている免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、それだけには限定されないが、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、およびトランスジェニック動物を含めた、あらゆる数々の方法で作成された抗体を意味する。

【0067】

「ヒト化抗体」の語は、最小の非ヒト（例えば、マウス）配列を含む、特異的な免疫グロブリン鎖、キメラの免疫グロブリン、またはこれらのフラグメントである、非ヒト（例えば、マウス）抗体の形態を意味する。典型的に、ヒト化抗体は、相補性決定領域（ C D R ）からの残基が、所望の特異性、親和性、および性能を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター）の C D R からの残基によって置き換えられているヒトの免疫グロブリンである（ Jones ら（ 1986 年） Nature 、 321 卷、 522 ~ 525 頁； Riechmann ら（ 1988 年） Nature 、 332 卷、 323 ~ 327 頁；および Verhaeyen ら（ 1988 年） Science 、 239 卷、 1534 ~ 1536 頁を参照されたい）。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンの F v

10

20

50

30

40

50

フレームワーク領域(F R)の残基は、所望の特異性、親和性、および性能を有する非ヒト種からの抗体における対応する残基で置き換えられている。ヒト化抗体は、抗体の特異性、親和性、および／または性能を洗練し、最適化するために、F v フレームワーク領域、および／または置き換えられている非ヒトの残基内のいずれかにおいて、さらなる残基の置換によってさらに修飾することができる。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトの免疫グロブリンに対応する C D R 領域を全てまたは実質的に全て含む可変ドメインを少なくとも 1 つの実質的に全て、典型的には 2 つまたは 3 つを含む一方、全ての、または実質的に全ての F R 領域は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の F R 領域である。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンの定常領域またはドメイン(F c)であるのが典型的である、免疫グロブリンの定常領域またはドメイン(F c)の少なくとも一部分も含むことができる。ヒト化抗体を產生するのに用いられる方法の例は、米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号に記載されている。

10

【 0 0 6 8 】

「ヒト抗体」の語は、ヒトによって生成される抗体、または当技術分野では知られているあらゆる技術を用いて作成される、ヒトによって生成される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義には、インタクトまたは全長の抗体、これらのフラグメント、ならびに／あるいはヒト重鎖および／または軽鎖ポリペプチドの少なくとも 1 つを含む抗体、例えば、マウス軽鎖およびヒト重鎖のポリペプチドを含む抗体が含まれる。

20

【 0 0 6 9 】

「キメラ抗体」の語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が 2 つ以上の種に由来する抗体を意味する。軽鎖および重鎖両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、および性能を有する 1 種類の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)に由来する抗体の可変領域に対応し、一方で、定常領域は、その種における免疫応答の誘発を回避するために別の種(通常ヒト)に由来する抗体の配列に相同性であるのが典型的である。

【 0 0 7 0 】

「エピトープ」または「抗原決定部位」の語は本明細書において交換可能に用い、特定の抗体が認識し、特異的に結合することができる抗原の一部分を意味する。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、タンパク質の 3 次フォールディングによって並置された、近接のアミノ酸および非近接のアミノ酸の両方から形成され得る。近接のアミノ酸から形成されるエピトープは、タンパク質の変性時に保持されるのが典型的であり、3 次フォールディングによって形成されたエピトープはタンパク質の変性時に失われるのが典型的である。エピトープは、独特の空間配置において、少なくとも 3 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 8 ~ 1 0 個のアミノ酸を含むのが典型的である。

30

【 0 0 7 1 】

抗体がエピトープまたは抗原分子に対して「特異的に結合する」ということは、抗体が、非関連のタンパク質を含めた代替的な物質よりも、より頻繁に、より速やかに、より長期間、より大きな親和性で、または上記のいくつかの組合せで、エピトープまたは抗原分子と反応または会合することを意味する。実施形態において、「特異的に結合する」は、例えば、抗体がタンパク質に対して、約 0 . 1 m M 以下の、より通常的には約 1 μ M 未満の K D で結合することを意味する。実施形態において、「特異的に結合する」は、抗体が、ときに少なくとも約 0 . 1 μ M 以下、他のときに少なくとも約 0 . 0 1 μ M 以下の K D でタンパク質に結合することを意味する。異なる種における相同的なタンパク質間に配列同一性があるため、特異的な結合は、1 つを超える種における特定のタンパク質を認識する抗体を含み得る。第 1 の標的に特異的に結合する抗体または結合部分は、第 2 の標的に特異的に結合し得、またはし得ないことが理解される。したがって、「特異的な結合」は、単一の標的にに対する結合などの排他的な結合を必ずしも必要としない(が含み得る)。一般的に、しかし必然的ではなく、結合に対する言及は特異的な結合を意味する。

40

【 0 0 7 2 】

「タンパク質症」の語は、ある種のタンパク質が構造的に異常になり、および／または

50

毒性的に蓄積し、それによって身体の細胞、組織、および器官の機能を破壊する疾患を意味する。タンパク質は、その正常な立体配置にフォールディングできないことがしばしばある。このミスフォールディング状態では、タンパク質は毒性になり得、またはその正常な機能を失い得る。タンパク質症の非限定的な例には、アルツハイマー病、ゴーシュ病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、拳闘家認知症、パーキンソニズム、パーキンソン病、レビー小体型認知症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、ハーラーフォルデン・シュバッツ病、ならびにリポフスチン沈着症、脳 - アミロイド血管障害、縁内障における網膜神経節細胞の変性、プリオント病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病および他のトリプレットリピート病、アレキサンダー病、セイピノパシー（seipinopathies）、アミロイドニューロパシー、老人性全身性アミロイドーシス、セルピノパシー（serpinopathies）、アミロイドーシス、封入体筋炎／ミオパシー、マロリー小体、肺胞タンパク症、および重症ミオパシー（CIM）が含まれる。

10

【0073】

「対象」、「個体」、または「患者」は本明細書において交換可能に用い、哺乳動物などの脊椎動物を意味する。哺乳動物には、それだけには限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、サル、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、家畜、競技動物、ペット、ウマ、靈長動物、およびヒトが含まれる。実施形態において、哺乳動物には、ウマ、イヌ、およびネコが含まれる。本発明の別の一実施形態において、哺乳動物はヒト患者である。

20

【0074】

「投与する」は、本明細書において、作用物質または作用物質を含む組成物を対象に、作用物質が対象の身体内にあるようにする方法で提供する手段として規定される。このような投与は、制限なく、経口、経皮（例えば、膣、直腸、口腔粘膜）を含めたあらゆる経路によって、注射によって（例えば、皮下、静脈内、非経口、腹腔内、CNS内）、または吸入によって（例えば、経口または経鼻）もよい。医薬調製物は、勿論、各投与経路に適する形態によって投与する。

20

【0075】

疾患を「処置する」または「処置」には、（1）疾患を防止する、すなわち、疾患の素因があり得るが未だに疾患の症状を経験していない、もしくは表していない患者において疾患の臨床症状が発症しないようにする；（2）疾患を阻止する、すなわち、疾患もしくは疾患の臨床症状の発生を抑止もしくは低減する；または（3）疾患を軽減する、すなわち、疾患もしくは疾患の臨床症状の退行をもたらすことが含まれる。

30

【0076】

「処置」の語に関連して「罹患している」の語は、疾患と診断されている、または疾患の素因のある患者または個体を意味する。患者はまた、家族の系列に疾患の病歴があるため、または疾患に関する遺伝子変異が存在するため、疾患に「罹患するリスクがある」と言及することができる。患者は、特徴的な疾患の病態の全てまたはいくつかを未だ発症していない。

40

【0077】

「有効量」または「治療有効量」は、有益な、または所望の結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1つまたはそれ以上の投与、適用、または投与量において投与することができる。このような送達は、個々の投与量単位を用いようとする期間、治療薬のバイオアベイラビリティ、投与経路などを含めた数々の変数に依存する。しかし、本発明の治療薬のあらゆる特定の対象の具体的な投与量レベルは、使用する具体的な化合物の活性、対象の年齢、体重、全身の健康、性別、および食事、投与の時間、排泄の速度、薬物の併用、および処置している特定の障害の重症度、および投与の形態を含めた多様な因子に依存する。処置の投与量は一般的に、安全性および効能を最適化するように滴定することができる。in vitroおよび/またはin vivoの試験からの投与量 - 効果の関係により、最初に、患者に投与するための適切な投与量に対する有用な指導を提供する

50

ことができるのが典型的である。一般的に、*in vitro*で有効であることが見出された濃度と釣り合った血清レベルを実現するのに有効である化合物の量を投与するのが望ましい。これらのパラメータの決定は当業者の範囲内に十分ある。これらの検討、ならびに有効な製剤および投与の手順は、当技術分野においてよく知られており、標準的な教科書に記載されている。この定義と一致して、本明細書で用いられる「治療有効量」の語は、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させて、*ex vivo*、*in vitro*、または*in vivo*で、タンパク質症に関連する1つまたはそれ以上の症状、または毒性脂質、-シヌクレイン、タウ、もしくはタンパク質凝集体の異常／上昇レベルを処置する（例えば、改善する）のに十分な量である。

【0078】

本明細書で用いられる「薬学的に許容される担体」の語は、あらゆる標準的な製薬上の担体、例えば、リン酸緩衝食塩水溶液、水、およびエマルジョン、例えば、油／水または水／油エマルジョン、ならびに多様なタイプの湿潤剤を包含する。組成物は、安定化剤および保存剤も含むことができる。担体、安定化剤、および補助剤の例には、Remington's Pharmaceutical Sciences（第20版、Mack Publishing Co.、2000年）を参照されたい。

【0079】

本明細書に提供する範囲は、範囲内の全ての値を簡略に記載したものと理解される。例えば、1から50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50からなる群からの、あらゆる数、数の組合せ、または部分範囲を含むものと理解される。

【0080】

本明細書における变数のあらゆる定義における化学基の列挙の詳述には、列挙する基のあらゆる单一の群または組合せとしての变数の定義が含まれる。变数に対する一実施形態または本明細書の態様の詳述には、あらゆる单一の実施形態としての、またはあらゆる他の実施形態もしくはその一部分との組合せにおける実施形態が含まれる。

【0081】

本明細書に提供するあらゆる組成物または方法は、本明細書に提供する1つまたはそれ以上のあらゆる他の組成物および方法と組み合わせることができる。

【0082】

説明的な実施形態

本開示は、タンパク質症を処置するための方法および組成物に関する。哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼの増大は、神経機能の改善、記憶機能の改善、記憶または神経機能の喪失の防止、毒性脂質（例えば、グルコシルスフィンゴシン）の低減、-シヌクレインの低減、タウの低減、およびタンパク質凝集体の蓄積の阻害など、治療上有益な結果を有する。一実施形態において、神経機能の改善は、タンパク質症による記憶機能の低下を表す対象に観察される。認知障害の診断は、医師のルーチンの技術内である。認知試験は当技術分野において知られており、簡易心理試験スコア（AMTS）、簡易精神状態検査（MMSE）、高齢者の認知低下に対する情報提供者への質問票（IQCODE）、および認知障害に対する試験である、一般医の認知評価などの試験が含まれ得る。これらの試験は、記憶、推論力、問題解決力、意志決定力、注意持続時間、および言語力などにおける障害を評価することができる。認知低下を診断するのに画像検査法も利用できる。例えば、機能的神経画像法のモダリティである、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法（SPECT）およびポジトロン放出断層撮影（PET）は、認知機能不全を評価するのに有用である。いくつかの態様において、神経機能の改善は、患者の記憶機能または認知機能を評価することにより測定する。

【0083】

記憶喪失などの認知低下を防止するための方法に関して、放射性トレーサーとして炭素

10

20

30

40

50

- 11 ピツツバーグ化合物 B を用いた P E T 画像法 (P I B - P E T) が、多様な種類のタンパク質症の診断を予測するのに有用であった。例えば、研究により、 P I B - P E T は、軽度認知障害を有する患者の誰が 2 年以内にアルツハイマー病を発症するかを予測するのに 86 % 正確であることが見出された。別の試験では、 P I B または別の放射性トレーサーである炭素 - 11 ジヒドロテトラベナジン (D I B Z) のいずれかを用いると、軽度認知障害または軽度認知症を有する患者の 4 分の 1 を超えてより正確な診断がもたらされた。

【 0084 】

本明細書に記載する方法のある実施形態において、哺乳動物は、処置前にグルコセレブロシダーゼ活性が低減している。グルコセレブロシダーゼ活性は、当技術分野において知られている方法によって評価することができる。例えば、グルコセレブロシダーゼ活性は、哺乳動物の脳脊髄液から測定してもよい。

10

【 0085 】

いくつかの実施形態において、哺乳動物は、 G B A 1 遺伝子に対して「野生型」である。「野生型」の語は、タンパク質の酵素活性に影響を及ぼすことが知られている検出可能な配列変異のない遺伝子またはタンパク質を意味する。このような配列は当技術分野においてよく知られており、非限定的な例は G e n B a n k 受入番号 N M _ 0 0 0 1 5 7 . 3 (m R N A) および N P _ 0 0 0 1 4 8 . 2 (タンパク質) に見出すことができる。成熟 G B A 1 タンパク質に対する例示的な配列は：

A R P C I P K S F G Y S S V V C V C N A T Y C D S F D P P T F P A L G T F S R Y
 E S T R S G R R M E L S M G P I Q A N H T G T G L L L T L Q P E Q K F Q K V K G
 F G G A M T D A A A L N I L A L S P P A Q N L L L K S Y F S E E G I G Y N I I R
 V P M A S C D F S I R T Y T Y A D T P D D F Q L H N F S L P E E D T K L K I P L
 I H R A L Q L A Q R P V S L L A S P W T S P T W L K T N G A V N G K G S L K G Q
 P G D I Y H Q T W A R Y F V K F L D A Y A E H K L Q F W A V T A E N E P S A G L
 L S G Y P F Q C L G F T P E H Q R D F I A R D L G P T L A N S T H H N V R L L M
 L D D Q R L L L P H W A K V V L T D P E A A K Y V H G I A V H W Y L D F L A P A
 K A T L G E T H R L F P N T M L F A S E A C V G S K F W E Q S V R L G S W D R G
 M Q Y S H S I I T N L L Y H V V G W T D W N L A L N P E G G P N W V R N F V D S
 P I I V D I T K D T F Y K Q P M F Y H L G H F S K F I P E G S Q R V G L V A S Q
 K N D L D A V A L M H P D G S A V V V V L N R S S K D V P L T I K D P A V G F L
 E T I S P G Y S I H T Y L W R R Q (配列番号 1)

20

30

30

である。

【 0086 】

遺伝子が野生型であることが見出されるが、グルコセレブロシダーゼ活性の低減が観察される場合、活性の低減は、タンパク質の活性の抑制、または遺伝子 / タンパク質の転写もしくは翻訳の抑圧によることがある。これらの機序は当技術分野においてよく知られている。例えば、タンパク質の生成は、細胞の異常な機序によって抑圧され得る。あるいは、タンパク質は、酵素活性の低減または喪失を引き起こす細胞において修飾され得る。

40

【 0087 】

いくつかの実施形態において、哺乳動物は、グルコセレブロシダーゼ 1 (G B A 1) 遺伝子における 1 つまたはそれ以上の変異を有する。タンパク質の活性に影響を及ぼし得る G B A 1 における特異的な変異には、 L 4 4 4 P 、 D 4 0 9 H 、 D 4 0 9 V 、 E 2 3 5 A 、および E 3 4 0 A が含まれる（例えば、全ての目的で参照によって組み入れる、 C u l 1 e n r a (2 0 1 1 年) A n n a l s o f N e u r o l o g y 、 6 9 卷、 9 4 0 ~ 9 5 3 頁を参照されたい）。特定の一実施形態において、変異は D 4 0 9 V 変異である。

【 0088 】

本明細書に開示する方法は、タンパク質症を有する哺乳動物を処置するのに有用である。ある実施形態において、タンパク質症はタンパク質凝集体を含む。「タンパク質凝集体」は、ミスフォールディングされたタンパク質が、細胞内または細胞外いずれかに凝集す

50

る生物学的現象を意味する。これらのタンパク質凝集体は毒性であり得る。ある実施形態において、タンパク質凝集体は、ユビキチン、タウ、および - シヌクレインからなる群から選択されるタンパク質を含む。ユビキチンは、真核生物の生物体の殆ど全ての組織に見出される小型タンパク質である。ユビキチンは基質のタンパク質に付着することができる、アミノ酸 76 個のタンパク質である。ユビキチンを添加することで、タンパク質の変性；転写、翻訳、およびタンパク質の局在のモジュレーション；またはタンパク質活性 / 相互作用のモジュレーションをもたらすことができる。

【 0 0 8 9 】

「タウ」の語は、微小管を安定化させるように機能するタウタンパク質を意味する。タウタンパク質は、中枢神経系のニューロンに、ならびにアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトに豊富である。タウタンパク質の過剰リン酸化（タウ封入体、pTau）は、対にならせん状のフィラメントおよび直線状のフィラメントの濃縮体の自己集合をもたらし得、これらはアルツハイマー病および他のタウオパシーの病因に関与する。本発明のある態様は、哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、対象におけるタウオパシーを処置または防止する（例えば、タウオパシーを有する哺乳動物における神経機能を改善する）ための方法に関する。タウオパシーは、タウの蓄積を特徴とする神経変性疾患である。例示的なタウオパシーには、それだけには限定されないが、アルツハイマー病、進行性核上性麻痺、拳闘家認知症、パーキンソン病、第 17 染色体に連鎖するパーキンソニズム、リティコ - ボディグ病、神経原線維変化優位型認知症、嗜銀顆粒性認知症、神経節膠腫、神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、ハーラーフォルデン - シュバッツ病、リポフスチン沈着症、レビー小体型認知症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、前頭側頭型認知症、ならびに前頭側頭葉変性症が含まれる。タウのイソ型 6 個全てが、アルツハイマー病の脳から対形成したらせん型フィラメントの過剰リン酸化された状態においてしばしば存在する。他の神経変性疾患において、ある種のタウのイソ型が濃縮した凝集体の沈着が報告されている。ミスフォールディングされると、別の状況では極めて可溶性であるタンパク質が、数々の神経変性疾患の一因となる極度に不溶性の凝集体を形成し得る。

【 0 0 9 0 】

「 - シヌクレイン」は、ヒトにおいて、SNC-A 遺伝子によってコードされるタンパク質である。このタンパク質は神経組織に見出され、新皮質、海馬、黒質、視床、および小脳において優勢に発現される。ニューロン以外では、このタンパク質は神経膠細胞およびメラニン細胞にも見出すことができる。 - シヌクレインは凝集して、病理学的条件下では、場合により、レビー小体を特徴とする不溶性の原線維を形成し得る。特定の一実施形態において、タンパク質症はシヌクレイノパシーである。シヌクレイノパシーの非限定的な例には、パーキンソン病、多系統萎縮症、およびレビー小体型認知症が含まれる。シヌクレイノパシーと分類される疾患の中には、タウタンパク質の蓄積も有し得るものもあり、タウオパシーと分類される疾患の中には - シヌクレインタンパク質の蓄積も有し得るものもある。

【 0 0 9 1 】

ある実施形態において、本明細書に開示する方法において引用されるタンパク質症はアルツハイマー病、ゴーシェ病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、パーキンソニズム、パーキンソン病、リティコ - ボディグ病、レビー小体型認知症、神経原線維変化優位型認知症、拳闘家認知症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、ハーラーフォルデン - シュバッツ病、ならびにリポフスチン沈着症からなる群から選択される疾患である。

【 0 0 9 2 】

本明細書に記載する方法において用いられる作用物質は、哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増大させる作用物質であってもよい。例えば、作用物質は、あらゆる小分子化合物、抗体、核酸分子、ポリペプチド、または哺乳動物におけるグルコセレブロ

10

20

30

40

50

シダーゼ活性を増大させるこれらの生物学的同等物であってもよい。

【0093】

態様において、作用物質は、G B A 1 遺伝子をコードする核酸またはその生物学的同等物（例えば、グルコセレブロシドの切断を触媒するポリペプチドをコードする、そのフラグメント、類似体、または誘導体）を含む。核酸の生物学的同等物は、ポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子のバリエントでも、またはポリヌクレオチドの天然に存在しないバリエントでもよい。ある実施形態において、核酸は、本明細書に開示するG B A 1 ポリペプチドのコード配列の対立遺伝子のバリエントであるコード配列を有してもよい。当技術分野において知られている通り、対立遺伝子のバリエントは、コードされるポリペプチドの機能を実質的に変更しない、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの、置換、欠失、または付加などを有するポリヌクレオチド配列の一代替形態である。10

【0094】

実施形態において、G B A 1 の生物学的同等物は、グルコセレブロシダーゼの酵素活性に必要とされる最小の配列を含むものである。別の一実施形態において、その生物学的同等物は、高ストリンジエンシーの条件下で、本明細書に記載するG B A 1 ポリヌクレオチドの相補体（例えば、本明細書に開示するG B A 1 アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド）にハイブリダイズする核酸を含む。別の一実施形態において、その生物学的同等物は、本明細書に記載するG B A 1 ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に開示するG B A 1 アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド）に、少なくとも80%の配列同一性、または代替的に少なくとも85%の配列同一性、または代替的に少なくとも90%の配列同一性、または代替的に少なくとも92%の配列同一性、または代替的に少なくとも95%の配列同一性、または代替的に少なくとも97%の配列同一性、または代替的に少なくとも98%の配列同一性を有する核酸を含む。20

【0095】

実施形態において、核酸は、例えば、宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌において助けとなるポリヌクレオチドに対して、同じリーディングフレームにおいて融合している、成熟G B A 1 ポリペプチドに対するコード配列またはその生物学的同等物（例えば、ポリペプチドの細胞からの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列）を含む。リーダー配列を有するポリペプチドはプレタンパク質であり、宿主細胞によって切断されて成熟型のポリペプチドを産生する。ポリヌクレオチドは、成熟タンパク質プラスさらなる5'アミノ酸残基であるプロタンパク質もコードし得る。プロ配列を有する成熟タンパク質はプロタンパク質であり、不活性型のタンパク質である。プロ配列が一旦切断されると、活性の成熟タンパク質が残る。30

【0096】

実施形態において、核酸は、コードされたポリペプチドの検出または精製などを可能にするマーカー配列を含んでいる。このようなマーカーは当技術分野においてよく知られており、例示的なマーカーの概要是、Michael R. GreenおよびJoseph Sambrook、Molecular Cloning（第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2012年）に見出すことができる。例示的なマーカーには、それだけには限定されないが、ヒスチジンタグ；ヘマグルチニン（HA）タグ；カルモジュлинタグ；FLAGタグ；Mycタグ；Sタグ；SBPタグ；Softag 1；Softag 3；V5タグ；Xpressタグ；Isopeptag；SpyTag；ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（BCCP）タグ；GSTタグ；蛍光タンパク質タグ、例えば、増強緑色蛍光タンパク質（EGFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）など、マルトース結合タンパク質タグ、Nusタグ、Strep-tags、チオレドキシンタグ、T Cタグ、およびT yタグが含まれる。40

【0097】

本明細書に記載する核酸は、当技術分野において知られているあらゆる適切な方法によって生成することができる。実施形態において、核酸は、オリゴヌクレオチド合成機を用50

いた化学合成によって構築される。実施形態において、特定のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAオリゴマーを合成し、次いでライゲートしてもよい。個々のオリゴヌクレオチドは、相補性を構築するために、5'または3'オーバーハングを含むのが典型的である。

【0098】

構築した後は、ポリヌクレオチド配列を発現ベクター中に挿入し、場合により、所望の宿主においてタンパク質を発現させるのに適切な発現制御配列に作動可能に連結させてもよい。ポリヌクレオチドをやはり、非ベクターベースの送達方法を用いて細胞に（例えば、*in vivo*または*in vitro*で）送達してもよい。例えば、Yuan, Non-Viral Gene Therapy (InTech, 2011年) を参照されたい。妥当な構築は、ヌクレオチドシーケンシング、制限マッピング、適切な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現などにより確認することができる。

10

【0099】

核酸を、当業者には一般的に知られている多様な機序によって細胞に送達してもよい。ウイルスの構築物を、適切な宿主細胞中でウイルスを生成させることによって送達することができる。次いで、ウイルスを宿主細胞から収集し、標的細胞と接触させる。対象の遺伝子を発現することができるウイルスおよび非ウイルスのベクターを、DNA / リポソーム複合体、ミセル、および標的化したウイルスタンパク質 - DNA 複合体によって、標的化した細胞に送達することができる。標的化抗体またはそのフラグメントを含むリポソームも、本発明の方法において用いることができる。ポリヌクレオチドの細胞または細胞集団への送達の他に、本明細書に記載するタンパク質の細胞または細胞集団への直接的な導入は、タンパク質トランスフェクションの非限定的な技術によって行うことができ、あるいは、本発明のタンパク質の発現を増強し、かつ / または活性を促進することができる培養条件は他の非限定的な技術である。

20

【0100】

本発明の遺伝子をコードするベクターを送達する他の方法には、それだけには限定されないが、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE - デキストラントransフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、プロトプラスト融合、またはリポソーム媒介性トランスフェクションが含まれる。本発明のベクターがトランスフェクトされる宿主細胞には（それだけには限定されないが）、大腸菌 (E. coli) または他の細菌、酵母菌、真菌、昆虫細胞（例えば、SF9 昆虫細胞における発現にはバキュロウイルスのベクターを用いて）またはマウス、ヒト、もしくは他の動物（例えば、哺乳動物）に由来する細胞が含まれてもよい。クローン化DNAによってコードされる、タンパク質、融合物、ポリペプチドフラグメント、または変異体の*in vitro* 発現も用いることができる。分子生物学の技術分野の技術者であれば、広範囲の発現系および精製系を用いて、組換えタンパク質およびそのフラグメントを生成することができることを理解されよう。

30

【0101】

態様において、作用物質は、標的の細胞に、*in vitro*、*in vivo*、または*ex-vivo*のいずれかで送達することができる、非相同性のポリヌクレオチドを含む非ウイルスのベクターである。非相同性のポリヌクレオチドは、対象の配列を含むことができ、1つまたはそれ以上の調節エレメントに作動可能に連結していてよく、対象の核酸配列の転写を制御することができる。本明細書で用いられるベクターは、最終的な標的細胞または対象において複製ができる必要はない。ベクターの語は、発現ベクターおよびクローニングベクターを含むことができる。

40

【0102】

GBA1 遺伝子またはその同等物をコードする核酸の発現を調節するプロモーターは、構成的、誘導性、または組織特異的なプロモーターであってよい。ある実施形態において、プロモーターを構築する場合に誘導系を用いてもよい。誘導系の非限定的な例には、テトラサイクリン、エクジソン、エストロゲン、プログステロン、二量体化の化学誘導物質

50

、およびイソプロピル - ベータ - D 1 - チオガラクトピラノシド (E P T G) による調節が含まれる。

【 0 1 0 3 】

本開示において有用なプロモーターは、構成的でも、または誘導性でもよい。プロモーターのいくつかの例には、S V 4 0 初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス L T R プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーター、および C M V プロモーターが含まれる。

【 0 1 0 4 】

態様において、作用物質は、対象の遺伝子（例えば、G B A 1 またはその生物学的同等物）をコードする核酸を含むウイルスベクターである。ウイルスの遺伝子移入は、哺乳動物における遺伝子の治療的遺伝子移入のための効果的な方法である。本発明において用いるのに適するウイルスベクターは、当技術分野においてよく知られている。実施形態において、ウイルスベクターは、向神経性ウイルス（または向神経性ウイルスの組合せ）に由来し、または向神経性ウイルス（または向神経性ウイルスの組合せ）をベースとする。向神経性ウイルスの例には、それだけには限定されないが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (A A V) 、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルス、およびレンチウイルスが含まれる。このようなウイルスベクターを作成および使用するための方法は、当技術分野においてよく知られており、その各々を全文において参照によって組み入れる、Carol Shoskes Reiss、Neurotropic Viral Infections (Cambridge University Press、2008年) ; Michael G. Kaplitt および Matthew J. During、Gene Therapy of the Central Nervous System: From Bench to Bedside (Gulf Professional Publishing、2006年) ; Jean-Michel H. Vos、Viruses in Human Gene Therapy (Springer、1995年) ; Andres M. Lozanoら、Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery (Springer、2009年) ; ならびに Michael R. Green および Joseph Sambrook、Molecular Cloning (第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2012年) に記載されている。

10

20

30

40

【 0 1 0 5 】

実施形態において、ウイルスベクターは野生型ウイルスに由来し、または野生型ウイルスをベースとする。このようなものの例には、制限なく、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) 、ウマ伝染性貧血ウイルス (E I A V) 、サル免疫不全ウイルス (S I V) 、およびネコ免疫不全ウイルス (F I V) が含まれる。あるいは、マウス白血病ウイルス (M L V) など、他のレトロウイルスを、ベクターのバックボーンに対するベースとして用いてよいことが企図される。本発明によるウイルスベクターを特定のウイルスの成分に限定する必要がないことは明らかである。ウイルスベクターは、2つ以上の異なるウイルスに由来する成分を含むことができ、合成の化合物も含むことができる。ベクターの成分を操作して、標的細胞の特異性など、所望の特徴を得ることができる。

40

【 0 1 0 6 】

米国特許第 6 , 9 2 4 , 1 2 3 号は、ある種のレトロウイルスの配列は、標的細胞のゲノム中への組入れを促進することを開示している。この特許は、レトロウイルスのゲノムは各々、ビリオンタンパク質および酵素をコードする、g a g 、 p o l 、および e n v と呼ばれる遺伝子を含むことを教示している。これらの遺伝子は、末端反復配列 (L T R) と呼ばれる領域によって両末端で隣接している。L T R は、プロウイルスの組入れ、および転写を担う。L T R は、エンハンサー - プロモーター配列としても働く。換言すれば、L T R はウイルス遺伝子の発現を制御することができる。レトロウイルスの R N A のカプシド形成は、ウイルスのゲノムの 5' 末端に位置する p s i 配列のために生じる。L T R 自体は、U 3 、 R 、および U 5 と呼ばれる3つのエレメントに分割することができる同一

50

の配列である。U3は、RNAの3'末端に独特な配列に由来する。Rは、RNAの両末端で反復する配列に由来し、U5は、RNAの5'末端に独特な配列に由来する。3つのエレメントのサイズは、異なるレトロウイルス間でかなり変動し得る。ウイルスのゲノムでは、ポリ(A)付加(終結)の部位は、右手側のLTRにおけるRとU5との間の境界にある。U3は、プロウイルスの殆どの転写制御エレメントを含み、転写制御エレメントは、細胞、および場合によってはウイルスの転写アクチベーターのタンパク質を担う、プロモーターおよび複数のエンハンサー配列を含む。

【0107】

構造遺伝子のgag、pol、およびenv自体に関して、gagは、ウイルスの内部構造タンパク質をコードする。gagタンパク質は、成熟タンパク質であるMA(マトリクス)、CA(カプシド)、およびNC(ヌクレオカプシド)に、タンパク質切断性にプロセシングされる。pol遺伝子は逆転写酵素(RT)をコードし、RTはDNAポリメラーゼ、関連のRNアーゼHおよびインテグラーゼ(IN)を含み、これらはゲノムの複製を媒介する。

10

【0108】

ウイルスベクター粒子を生成するには、ベクターのRNAゲノムを、宿主細胞において、このゲノムをコードするDNA構築物から発現させてもよい。ベクターのゲノムによってコードされない粒子の成分は、宿主細胞において発現される核酸配列(gag/polおよびenv遺伝子のいずれかまたは両方を通常含む、「パッケージング系」)を加えることによりトランスにおいて(in trans)提供することができる。ウイルスベクター粒子を生成するのに必要とされる配列のセットを一過性のトランスフェクションによって宿主細胞中に導入してもよく、またはこの配列のセットを宿主細胞のゲノム中に組み込んでもよく、またはこの配列のセットを混合の方法において提供してもよい。関与する技術は、当業者には知られている。

20

【0109】

実施形態において、ウイルスベクターはアデノウイルスに由来し、またはアデノウイルスをベースにする。アデノウイルスは比較的良好く特徴付けられている、均一なウイルスの群であり、50を超える血清型を含む。例えば、PCT国際出願第WO95/27071号を参照されたい。アデノウイルスは増殖させるのが容易であり、宿主細胞のゲノム中への組入れを必要としない。組換えアデノウイルス由來のベクター、例えば、野生型ウイルスの組換えおよび産生の可能性を低減するものも構築されている。例えば、PCT国際出願第WO95/00655号および第WO95/11984号を参照されたい。

30

【0110】

実施形態において、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)に由来し、またはアデノ随伴ウイルスをベースにする。組換えAAV(rAAV)系では、対象のタンパク質(例えば、GBA1タンパク質)をコードする核酸配列は、AAVウイルス粒子中にパッケージングされている。組換えウイルスゲノムには、タンパク質、例えば、プロモーター、導入遺伝子(例えば、GBA1導入遺伝子)、ITR、リボソーム結合性エレメント、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、イントロン、ポリAシグナル、および/または複製開始点の発現を確立するためのあらゆるエレメントが含まれていてよい。

40

【0111】

態様において、本発明の組換えAAV粒子は、1つまたは2つのITRが隣接するGBA1をコードする配列を含む核酸を含むことができる。核酸は、AAV粒子においてカプシド形成される。AAV粒子はカプシドタンパク質も含む。いくつかの実施形態において、核酸は、転写の方向で成分に作動可能に連結している対象のタンパク質コード配列(複数可)(例えば、GBA1タンパク質をコードする導入遺伝子)、転写開始点を含む制御配列、および終結配列を含み、それによって発現力セットを形成する。発現力セットは、少なくとも1つの機能的なAAVのITR配列によって、5'および3'末端上に隣接する。「機能的なAAVのITR配列」は、ITR配列が、AAVビリオンのレスキュ、複製、およびパッケージングに意図される通りに機能することを意味する。全て、参照に

50

よってその全文を本明細書に組み入れる、Davidsonら(2000年)PNAS、97巻、3428~32頁；Passiniら(2003年)J.Virol.、77巻、7034~40頁；およびPechanら(2009年)Gene Ther.、16巻、10~16頁を参照されたい。本発明のいくつかの態様を実践するために、組換えベクターは、カプシド形成に不可欠な少なくとも全てのAAVの配列およびrAAVによる感染のための物理的構造を含む。本発明のベクターにおいて用いるためのAAVのITRは、野生型のヌクレオチド配列を有する必要はなく(例えば、Kotin Hum.、Gene Ther.(1994年)5巻、793~801頁に記載されている通り)、ヌクレオチドの挿入、欠失、もしくは置換によって改変されていてもよく、またはAAVのITRはあらゆるいくつかのAAV血清型に由来してもよい。

10

【0112】

40を超えるAAVの血清型が現在知られており、新たな血清型および既存の血清型のバリエントが引き続き同定されている。Gaoら(2002)PNAS、99巻、11854~6頁；Gaoら(2003年)PNAS、100巻、6081~6頁；およびBossisら(2003年)J.Virol.、77巻、6799~810頁を参照されたい。あらゆるAAVの血清型の使用が本発明の範囲内にあると考えられている。rAAVベクターは、制限なく、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh.10、AAV11、またはAAV12などを含む、あらゆるAAVの血清型に由来するベクターであってよい。AAVにおける核酸はAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh.10、AAV11、AAV12などのITRを含むことができ、rAAV粒子はAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh.10、AAV11、AAV12などのカプシドタンパク質を含むことができる。rAAV粒子は、ITR、またはクレードA~F由来のあらゆるAAV血清型由来のカプシドタンパク質も含むことができる(Gaoら(2004年)J.Virol.、78巻(12)、6381頁)。

20

【0113】

様々なAAVの血清型を用いて、特定の標的細胞の形質導入を最適化してもよく、または特定の標的組織(例えば、罹患している組織)内の具体的な細胞型を標的化してもよい。rAAV粒子は、同じ血清型または混合の血清型(すなわち、偽型AAV)の、ウイルスのタンパク質およびウイルスの核酸を含むことができる。偽型AAVのベクターは、1つのAAVの血清型の逆方向末端反復(ITR)および第2のAAVの血清型のカプシドを含むベクターである。例えば、rAAV粒子は、AAV1のカプシドタンパク質および少なくとも1つのAAV2のITRを含むことができ、またはAAV2のカプシドタンパク質および少なくとも1つのAAV1のITRを含むことができる。さらに別の一例では、rAAV粒子は、AAV1および少なくとも1つのさらなるAAVの血清型の両方からのカプシドタンパク質を含むことができ、少なくとも1つのAAV2のITRをさらに含む。rAAV粒子を生成するためのAAV血清型のあらゆる組合せを、各組合せを明確に本明細書に記載する如く、本明細書に提供する。

30

【0114】

本発明のAAV粒子は、組換え自己相補性ゲノムを含むウイルス粒子であってよい。自己相補性ゲノムを有するAAVウイルス粒子、および自己相補性AAVゲノムの使用方法は、その各々を全文において参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第6,596,535号；第7,125,717号；第7,765,583号；第7,785,888号；第7,790,154号；第7,846,729号；第8,093,054号；および第8,361,457号；ならびにWang Z.ら(2003年)Gene Ther.、10巻、2105~2111頁に記載されている。自己相補性ゲノムを含むrAAVは、部分的に相補性の配列(例えば、導入遺伝子の相補性のコード鎖および/または非コード鎖)によって、2本鎖のDNA分子を速やかに形成する。実施形態において、本發

40

50

明は、AAVのゲノムを含むAAVウイルス粒子を提供し、rAAVのゲノムは第1の非相同性のポリヌクレオチド配列（例えば、G B A 1 コード鎖）および第2の非相同性のポリヌクレオチド配列（例えば、G B A 1 非コード鎖またはアンチセンス鎖）を含み、第1の非相同性のポリヌクレオチド配列は、第2のポリヌクレオチド配列と、第2のポリヌクレオチド鎖の長さのいくらかまたは殆ど／全てに沿って鎖内塩基対を形成することができる。実施形態において、第1の非相同性のポリヌクレオチド配列および第2の非相同性のポリヌクレオチド配列は、鎖内塩基対形成を促進する配列により連結されている（例えば、ヘアピンDNA構造）。実施形態において、第1の非相同性のポリヌクレオチド配列および第2の非相同性のポリヌクレオチド配列は、変異したITR（例えば、右の(righthtright)ITR）によって連結されている。いくつかの関連の実施形態において、変異したITRは、末端分解配列を含むD領域の欠失を含む。その結果、AAVウイルスのゲノムを複製する際、repタンパク質は、変異したITRでウイルスのゲノムを切断せず、したがって、5'から3'の順に以下を含む組換えウイルスゲノムがウイルスのカプシドにパッケージングされる：調節配列を含む第1の非相同性のポリヌクレオチド配列、変異したAAVのITR、第1の非相同性のポリヌクレオチドに対して逆配向の第2の非相同性のポリヌクレオチド、および第3のAAVのITR。

10

【0115】

AAVベクターを用いてrAAV粒子を生成するための方法は、当技術分野においてよく知られている。例えば、米国特許第6,566,118号；第6,989,264号；および第6,995,006号を参照されたい。本発明を実践する上で、rAAV粒子を生成するための宿主細胞には、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物、および酵母菌が含まれる。宿主細胞は、AAVのrepおよびcap遺伝子が、その中でAAVベクターのゲノムが安定に維持される宿主細胞またはプロデューサー細胞に安定に維持される、パッケージング細胞であってもよい。例示的なパッケージング細胞およびプロデューサー細胞は、293、A549、またはHeLa細胞に由来する。AAVベクターは、当技術分野において知られている標準的な技術を用いて精製および配合される。

20

【0116】

rAAV粒子を精製する態様において、本明細書で用いられる「精製する」の語は、rAAV粒子が天然に存在し、またはそれから最初に調製される場所にも存在し得る、少なくともいくつかの他の成分のないrAAV粒子の調製を含む。このように、例えば、培養物の可溶化液、または培養物上清の生成など、単離したrAAV粒子を供給源の混合物から濃縮するための精製技術を用いて調製してもよい。濃縮は、例えば、溶液中に存在するDNAアーゼ抵抗性粒子(DRP)もしくはゲノムコピー(gc)の比率により、もしくは感染力によるなど、様々な方法で測定することができ、または第2の、生成培養混入物またはプロセス中の混入物を含めた混入物（例えば、ヘルパーウイルス、培地成分など）など、供給源の混合物中に存在する潜在的に干渉する物質に関して測定することができる。実施形態において、ウイルスは、哺乳動物における神経細胞に感染する。「神経細胞」または「ニューロン」の語は、中枢神経系および末梢神経系を作り上げる、電気的に興奮性の細胞を意味する。ニューロンは、動物の身体内の細胞でも、または動物の身体の外側で培養された細胞でもよい。「神経細胞」または「ニューロン」の語はまた、哺乳動物からの神経細胞に由来する、確立されたもしくは一次の組織培養細胞系、またはニューロンに分化するように作成される組織培養細胞系を意味する。「ニューロン」または「神経細胞」は、染色体外または染色体内いずれかで特定のタンパク質を発現するようにはり修飾されているあらゆる上記のタイプの細胞も意味し、神経芽細胞、およびグリアなどの脳内の支持細胞などの形質転換したニューロンも意味する。神経細胞の感染は、当技術分野において知られている多様な機序によって遂行することができる。一実施形態において、ウイルスをCNSに局所的に投与する。関連の実施形態において、ウイルスを海馬内注射により、または代替的にくも膜下腔内注射により投与する。

30

【0117】

態様において、作用物質は、G B A 1 タンパク質またはその生物学的同等物（例えば、

40

50

グルコセレブロシドの切断を触媒する、そのフラグメント、類似体、または誘導体)を含む。G B A 1タンパク質は、当技術分野において知られており、特徴付けられており、例示的な配列を本明細書に提供する。実施形態において、作用物質は、グルコセレブロシダーゼ活性を有し、本明細書に開示するG B A 1ポリペプチドに対して、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、または少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。生物学的同等物は、所望のグルコセレブロシダーゼ活性(例えば、野生型のグルコセレブロシダーゼ活性)を維持するポリペプチドであってよい。

10

【0118】

本明細書に記載するポリペプチドは、当技術分野において知られているあらゆる適切な方法により生成することができる。実施形態において、直接的なタンパク質合成方法を用いる。他の実施形態において、組換え発現ベクターを用いて、対象のタンパク質(例えば、G B A 1タンパク質またはその生物学的同等物)をコードするDNAを増幅および発現させてもよい。Michael R. GreenおよびJoseph Sambrook、Molecular Cloning(第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2012年)を参照されたい。組換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫の遺伝子に由来する、適切な転写または翻訳の調節エレメントに作動可能に連結している、対象のタンパク質をコードする、合成の、またはcDNA由来のDNAフラグメントを有する、複製可能なDNA構築物である。転写ユニットは、(1)遺伝子発現において調節的な役割を有する遺伝エレメント(单数もしくは複数)、例えば、転写プロモーターまたはエンハンサー、(2)mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される、構造的配列またはコード配列、ならびに(3)以下に詳しく記載する、適切な転写および翻訳の開始および終結の配列の集合を一般的に含む。このような調節エレメントは、転写を制御するためのオペレーター配列を含むことができる。宿主において複製する能力は、通常、複製開始点によって付与され、形質転換体の認識を促進するための遺伝子の選択をさらに組み入れることができる。DNA領域は、これらが相互に機能的に関連する場合は、作動可能に連結している。例えば、シグナルペプチド(分泌性のリーダー)のためのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現される場合、ポリペプチドのためのDNAに作動可能に連結しており;プロモーターは、配列の転写を制御する場合、コード配列に作動可能に連結しており;またはリボソーム結合部位は、翻訳を可能にするように位置付けられている場合、コード配列に作動可能に連結している。一般的に、作動可能に連結しているとは隣接を意味し、分泌性のリーダーの場合は、隣接およびリーディングフレーム内にあるものを意味する。酵母菌の発現系で用いることを意図する構造エレメントには、宿主細胞によって翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列が含まれる。あるいは、組換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列なしで発現される場合、組換えタンパク質はN末端のメチオニン残基を含むことができる。この残基は、場合により、発現された組換えタンパク質から引き続き切断されて最終生成物をもたらし得る。

20

30

40

【0119】

発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存する。広範囲の発現宿主/ベクターの組合せを用いることができる。真核生物の宿主に有用な発現ベクターには、S V 4 0、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルスからの発現制御配列を含むベクターなどが含まれる。細菌の宿主に有用な発現ベクターには、大腸菌からのプラスミドなどの知られている細菌のプラスミド、例えば、p C R 1、p B R 3 2 2、p M B 9 およびこれらの誘導体、より広範囲の宿主のプラスミド、例えば、M 1 3 および線維状の1本鎖DNAファージが含まれる。

【0120】

50

ポリペプチドの発現に適する宿主細胞には、適切なプロモーターの制御下の、原核生物、酵母菌、昆虫、または高次の真核細胞が含まれる。原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性の生物体、例えば、大腸菌または桿菌が含まれる。高次の真核細胞には、哺乳動物起源の確立された細胞系が含まれる。細胞フリーの翻訳系も用いることができる。細菌、真菌、酵母菌、および哺乳動物の細胞の宿主と用いるのに適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、当技術分野においてよく知られている。Pouwelsら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual (Elsevier Science, 1985年) を参照されたい。

【0121】

組換えタンパク質を発現させるのに、多様な哺乳動物または昆虫の細胞培養系を用いても有利である。哺乳動物細胞における組換えタンパク質は、一般的に正確にフォールディングされ、適切に修飾され、完全に機能的であることから、このようなタンパク質の発現を行うことができる。適切な哺乳動物宿主の細胞系の例には、Gluzman (1981年) Cell、23巻、175頁によって記載される、サル腎臓細胞のCOS-7系統、および、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、HeLa、およびBHK細胞系などを含めた適切なベクターを発現することができる他の細胞系が含まれる。哺乳動物の発現ベクターは、複製開始点などの非転写のエレメント、発現させようとする遺伝子に連結している適切なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに他の5'または3'隣接非転写配列、ならびに必要なリボソーム結合部位などの5'または3'非翻訳配列、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、ならびに転写終結配列を含むことができる。昆虫細胞中で異種性のタンパク質を生成させるためのバキュロウイルス系は、LuckowおよびSummer (1988年) Bio/Technology、6巻、47頁によって概説されている。

10

20

30

40

50

【0122】

形質転換された宿主によって生成されたタンパク質は、あらゆる適切な方法にしたがって精製することができる。このような標準的な方法には、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティおよびサイジングカラムクロマトグラフィーなど)、遠心分離、差次的溶解性、またはタンパク質を精製するためのあらゆる他の標準的な技術によるものが含まれる。ヘキサヒスチジンなどのアフィニティタグ、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどをタンパク質に付着させて、適切なアフィニティカラムを通過させることによって精製を容易にしてもよい。タンパク質分解、核磁気共鳴、およびエックス線結晶構造解析などの技術を用いて、単離されたタンパク質を物理的に特徴付けてもよい。例えば、組換えタンパク質を培養培地中に分泌する系からの上清を、AmiconまたはMillipore Pelliconの限外濾過装置などの市販のタンパク質濃縮フィルタを用いて、最初に濃縮してもよい。濃縮工程の後、濃縮物を適切な精製マトリクスに適用してもよい。あるいは、ペンダントのジエチルアミノエチル(DEAE)基を有するマトリクスまたは基体などの陰イオン交換樹脂を用いてもよい。マトリクスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質の精製において通常用いられる他のタイプであってよい。あるいは、陽イオン交換工程を用いてもよい。適切な陽イオン交換体には、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含む、多様な不溶性のマトリクスが含まれる。最後に、ペンダントのメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルなどの疎水性RP-HPLC媒体を用いた、1つまたはそれ以上の逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)の工程を用いてもよい。いくつかの、または全ての前述の精製工程を、多様な組合せでやはり用いて、均一な組換えタンパク質を提供することができる。細菌培養物中で生成された組換えタンパク質を、例えば、細胞ペレットから最初に抽出し、引き続き濃縮、塩析、水性のイオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフィー工程の1つまたはそれ以上によって単離してもよい。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を、最終の精製工程に用いてもよい。組換えタンパク質の発現において用いた微生物細胞を、凍結・解凍のサイクル、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含めたあらゆる便利な方法によ

って破壊してもよい。

【0123】

態様において、作用物質は、G B A 1 に特異的に結合し、G B A 1 の活性を増強する抗体またはそのフラグメントを含む。

【0124】

「抗体」の語は、フルサイズの抗体、およびこのような抗体の抗原結合フラグメント、バリアント、類似体、または誘導体、例えば、天然に存在する抗体もしくは免疫グロブリン分子もしくは操作した抗体分子、または抗体分子と同様に抗原に結合するフラグメントを包含する。

【0125】

抗体は、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを通常含む。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン構造は十分に理解されている。例えば、全文を参照によって本明細書に組み入れる、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual(第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988年)を参照されたい。
。

10

【0126】

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリアント、もしくは誘導体には、それだけには限定されないが、ヒト、ヒト化、靈長類化、またはキメラの抗体、単鎖抗体、エピトープ結合フラグメント、例えば、Fab、Fab'、およびF(ab')2、Fd、Fvs、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド連結したFv(sdFv)、VLまたはVHドメインのいずれかを含むフラグメント、Fab発現ライブラリーによって生成されるフラグメント、および抗イディオタイプ(抗-IgD)抗体が含まれる。scFv分子は当技術分野において知られており、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。本発明の免疫グロブリンまたは抗体分子は、あらゆるタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)、またはサブクラスの免疫グロブリン分子であつてよい。

20

【0127】

抗原結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリアント、もしくは誘導体は、これらが認識し、または特異的に結合する標的のポリペプチドなどの抗原のエピトープ(複数可)または一部分(複数可)に鑑みて記載し、または特定され得る。抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的のポリペプチドの一部分が、「エピトープ」すなわち「抗原決定基」である。標的のポリペプチドは單一のエピトープを含むことができるが、少なくとも2つのエピトープを含むのが典型的であり、抗原のサイズ、立体配置、およびタイプに応じてあらゆる数のエピトープを含むことができる。さらに、標的のポリペプチド上の「エピトープ」は非ポリペプチドのエレメントであつてよく、または非ポリペプチドのエレメントを含むことができ、例えば、エピトープは炭水化物の側鎖を含むことができることに留意されたい。

30

【0128】

抗体はポリクローナルでも、またはモノクローナルでもよい。

40

【0129】

ポリクローナル抗体は、あらゆる知られている方法によって調製することができる。ポリクローナル抗体は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミンなどに場合によりコンジュゲートさせた関連の抗原(精製したペプチドフラグメント、全長の組換えタンパク質、融合タンパク質など)を、滅菌食塩水で希釈し、アジュバント(例えば、完全もしくは不完全フロイントアジュバント)と組み合わせて安定なエマルジョンを形成させたものを、複数回皮下または腹腔内注射することによって、動物(例えば、ウサギ、ラット、マウス、ロバなど)を免疫化することにより產生される。次いで、ポリクローナル抗体を、このように免疫化した動物の血液、腹水などから回収する。回収した血

50

液を凝固させ、血清をデカントし、遠心分離によって澄明にし、抗体の力価に対してアッセイする。ポリクローナル抗体は、血清または腹水から、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などを含めた、当技術分野における標準的な方法にしたがって精製することができる。

【0130】

モノクローナル抗体は、その全文を参照によって本明細書に組み入れる、KohlerおよびMilstein(1975年)Nature、256巻、495頁によって記載されるものなどのハイブリドーマ法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ法を用いて、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物を、上記に記載した通りに免疫化して、免疫化する抗原に特異的に結合する抗体のリンパ球による生成を誘発する。リンパ球は *in vitro* でも免疫化することができる。免疫化後、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールなどを用いて適切なミエローマ細胞系と融合させてハイブリドーマ細胞を形成させ、次いでこの細胞を、非融合のリンパ球およびミエローマ細胞から選別することができる。免疫沈降、免疫プロット、または *in vitro* の結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)および酵素結合免疫吸着検定法(ELISA))によって決定した選択された抗原に対して特異的なモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを、次いで、標準法(その全文を参照によって本明細書に組み入れる、Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、Academic Press、1986年)を用いた *in vitro* の培養、または動物における腹水腫瘍として *in vivo* のいずれかによって増殖させることができる。次いで、モノクローナル抗体を、上記のポリクローナル抗体に対して記載した通り、培養培地または腹水から精製することができる。

10

20

30

【0131】

あるいは、モノクローナル抗体を、その全文を参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第4,816,567号に記載されている、組換えDNA法を用いてやはり作成してもよい。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCRなどによって単離し、その配列を、従来の手順を用いて決定する。重鎖および軽鎖をコードする単離したポリヌクレオチドを、次いで、適切な発現ベクター中にクローニングし、発現ベクターは、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはミエローマ細胞などの、他の方法では免疫グロブリンタンパク質を生成しない宿主細胞にトランスフェクトすると、宿主細胞によってモノクローナル抗体が産生される。また、所望の種の組換えモノクローナル抗体またはそのフラグメントを、記載されている通り(各々その全文を参照によって本明細書に組み入れる、McCaffertyら(1990年)Nature、348巻、552~554頁; Clarksonら(1991年)Nature、352巻、624~628頁; およびMarksら(1991年)J.Mol.Biol.、222巻、581~597頁)、所望の種のCDRを発現するファージディスプレイライブラリーから単離することができる。

【0132】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、組換えDNA技術を用いた数々の異なる方法でさらに修飾して代替的な抗体を産生することができる。いくつかの実施形態において、マウスのモノクローナル抗体などの軽鎖および重鎖の定常ドメインを、1)キメラ抗体を産生するためにヒト抗体などの領域に対して、または2)融合抗体を産生するために非免疫グロブリンのポリペプチドに対して置換してもよい。いくつかの実施形態において、定常領域を切断または除去して、モノクローナル抗体の所望の抗体フラグメントを産生する。可変領域の部位特異的変異誘発または高密度変異誘発を用いて、モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化してもよい。

40

【0133】

したがって、実施形態において、抗体はヒト化抗体である。実施形態において、抗体は

50

キメラ抗体である。

【0134】

ヒト化抗体は、当技術分野において知られている様々な技術を用いて直接調製することができる。標的の抗原に対する抗体を生成する、*in vitro*で免疫化し、または免疫化した個体から単離した、固定化されたヒトBリンパ球を產生することができる（例えば、各々その全文を参照によって本明細書に組み入れる、Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、77頁（Alan R. Liss、1985年）；Boemerら（1991年）J. Immunol.、147巻、86～95頁；および米国特許第5,750,373号を参照されたい）。また、例えば、各々その全文を参照によって本明細書に組み入れる、Vaughanら（1996年）Nat. Biotech.、14巻、309～314頁、Sheetsら（1998年）Proc. Natl. Acad. Sci.、95巻、6157～6162頁、HoogenboomおよびWinter（1991年）J. Mol. Biol.、227巻、381頁、およびMarksら（1991年）J. Mol. Biol.、222巻、581頁に記載される通り、ファージライブラリーがヒト抗体を発現する場合、ヒト抗体をファージライブラリーから選択することができる。抗体ファージライブラリーを產生し、使用するための技術は、各々その全文を参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第5,969,108号；第6,172,197号；第5,885,793号；第6,521,404号；第6,544,731号；第6,555,313号；第6,582,915号；第6,593,081号；第6,300,064号；第6,653,068号；第6,706,484号；および第7,264,963号；ならびにRothelら（2007年）J. Mol. Biol.、376巻、1182～1200頁にも記載されている。チェインシャーリング（その全文が参照によって組み入れる、Marksら（1992年）Bio/Technology、10巻、779～783頁）などの親和性成熟の戦略は当技術分野において知られており、高親和性のヒト抗体を产生するのに用いられ得る。

【0135】

ヒト化抗体は、免疫化の際に、内因性の免疫グロブリン生成の非存在下で全レパートリーのヒト抗体を生成することができる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニックマウスにおいて作成することもできる。この取組みは、各々その全文を参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号、および第5,661,016号に記載されている。

【0136】

本発明は、二重特異性抗体も包含する。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープを特異的に認識し、結合することができる抗体である。異なるエピトープが、同じ分子（例えば、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド）内にあってもよく、または両方など、異なる分子上にあってもよい。二重特異性抗体は、インタクトな抗体でも、または抗体フラグメントでもよい。

【0137】

特に抗体フラグメントの場合、抗体の血清半減期を増大させるために抗体を修飾するのがさらに望ましいことがある。これは、抗体フラグメントにおける適切な領域の変異によって、またはエピトープをペプチドタグ中に組み入れ、次いでペプチドタグを抗体フラグメントにいずれかの末端もしくは中央で融合することによって（例えば、DNAもしくはペプチド合成によって）、抗体フラグメント中にサルベージ受容体結合エピトープを組み入れるなどにより実現することができる。

【0138】

ヘテロコンジュゲート抗体も本発明の範囲内である。ヘテロコンジュゲート抗体は、共有結合性に連結された2つの抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫細胞を不需要な細胞に標的化すると提唱されている（その全文を参照によって本明細書に組み入れる

10

20

30

40

50

、米国特許第4,676,980号)。抗体は、架橋剤を伴うものを含めた、合成タンパク質化学において知られている方法を用いてin vitroで調製することができるこれが企図される。例えば、免疫毒素を、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエーテル結合を形成することにより、構築することができる。この目的に適した試薬の例には、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート(mercapto butyrimidate)が含まれる。

【0139】

本発明は、本明細書に記載する、キメラ、ヒト化、およびヒトの抗体、またはこれらの抗体フラグメントに実質的に相同性であるバリアントおよび同等物をさらに包含する。これらは、例えば、保存的置換変異、例えば、1つまたはそれ以上のアミノ酸の同様のアミノ酸による置換を含むことができる。例えば、保存的置換は、アミノ酸の、同じ一般的クラス内の別のアミノ酸での、例えば、酸性のーアミノ酸の別の酸性のーアミノ酸での、塩基性のーアミノ酸の別の塩基性のーアミノ酸での、または中性のーアミノ酸の別の中性のーアミノ酸での、置換を意味する。保存的なアミノ酸置換が意図するものは、当技術分野においてよく知られている。

10

【0140】

態様において、作用物質は小分子化合物を含む。実施形態において、小分子化合物は、グルコセレブロシダーゼ活性のアクチベーターである。例えば、国際特許公開第WO2013/148333号を参照されたい。いくつかの実施形態において、「小分子」は、対象のタンパク質に結合することができ、それによってタンパク質の機能を変更する、低分子量(MW)の分子である。いくつかの実施形態において、小分子のMWは1000を超えない。タンパク質の機能を変更することができる小分子をスクリーニングするための方法は、当技術分野において知られている。例えば、細胞における小分子-タンパク質の相互作用を検出するための小型化したアレイのアッセイが、Yousら(1997年)Chem.Biol.、4巻、961～968頁によって論じられている。

20

【0141】

実施形態において、作用物質はシャペロンである。本明細書で用いられる「シャペロン」の語は、タンパク質に特異的に結合し、1つまたはそれ以上の以下の効果を有する小分子、ポリペプチド、核酸などの分子を意味する：少なくとも1つの部分的な野生型機能および／もしくはタンパク質の活性の回復もしくは増強；安定な分子配置のタンパク質の編成の増強；ERからのタンパク質の、天然の細胞の位置などの別の細胞の位置へのトラフィкиングの誘発、それによりタンパク質のER関連の分解の防止；ならびに／またはミスフォールディングされたタンパク質の凝集の防止。関連の実施形態において、シャペロンは、タンパク質の少なくとも部分的な野生型の機能および／または活性を回復または増強する。例えば、Patnaikら(2012年)J.Med.Chem.、55巻、5734～5748頁を参照されたい。他の実施形態において、シャペロンは、GBA1の活性を増大させる作用物質(例えば、それだけには限定されないが、GBA1もしくはその同等物またはGBA1をコードする核酸もしくはその同等物を含めた、本明細書に記載する作用物質)と場合により組み合わせて、細胞(例えば、タンパク質症、シヌクレイノパシー、タウオパシーなどに罹患している哺乳動物からの細胞)の残りの活性を増大させる。例えば、国際特許公開第WO2012/177997号およびChangら(2006年)FEBS J.、273巻、4082～4092頁を参照されたい。

30

【0142】

態様において、本発明は、少なくとも2つの作用物質を投与することを伴う(例えば、GBA1活性を増大させる作用物質を別の作用物質と組み合わせて投与することを含む併用治療)。

40

【0143】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載する作用物質を、タンパク質症、シヌクレイノパシー、タウオパシーなどに関連する症状を処置するのに有益である別の一治療薬と組み合わせて投与する。実施形態において、本明細書に記載する作用物質は核酸(例え

50

ば、G B A 1 またはその同等物をコードする核酸)である。実施形態において、本明細書に記載する作用物質はポリペプチド(例えば、G B A 1 またはその同等物)である。実施形態において、本明細書に記載する作用物質は小分子(例えば、G B A 1 のアクチベーター)である。実施形態において、本明細書に記載する作用物質は、抗体またはそのフラグメント(例えば、G B A 1 に特異的に結合する抗体またはそのフラグメント)である。実施形態において、本明細書に記載する作用物質はシャペロン(例えば、G B A 1 のシャペロン)である。

【0144】

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に記載する少なくとも2つの作用物質を投与することを伴う。

10

【0145】

「併用治療」の句は、G B A 1 の活性を増大させる作用物質、および治療薬の相互作用から有益な効果をもたらすように意図される特定の処置レジメンの一部として第2の治療薬の投与を包含する。併用の有益な効果には、それだけには限定されないが、治療薬の併用に起因する薬物動態学的または薬力学的な相互作用が含まれる。これらの治療薬の併用の投与は、規定された期間(選択する併用に応じて、通常、分、時間、日、または週)にわたって行うのが典型的である。「併用治療」は一般的に、本発明の併用を偶発的および恣意的にもたらす別々の単独療法のレジメンの一部として2つ以上のこれらの治療薬の投与を包含しようとするものではない。「併用治療」は、これらの治療薬を逐次的に投与することを包含しようとするものであり、すなわち、各治療薬を、これら治療薬の投与同様、様々な時間に投与し、または少なくとも2つの治療薬と実質的に同時に投与する。実質的に同時の投与は、例えば、対象に、固定された割合の各治療薬を有する单一のカプセル剤、または各治療薬に対して、複数の、单一のカプセル剤を投与することによって遂行することができる。各治療薬の逐次の、または実質的に同時の投与は、それだけには限定されないが、経口経路、静脈内の経路、筋肉内の経路、および粘膜組織(例えば、鼻、口、膣、および直腸)による直接的な吸収を含めたあらゆる適切な経路によって行うことができる。治療薬は、同じ経路により、または異なる経路により投与することができる。例えば、特定の組合せの一成分を静脈内注射によって投与してもよく、併用の他の成分(複数可)を経口投与してもよい。成分は、あらゆる治療上有効な順序で投与することができる。「併用」の句は、併用治療の一部として有用な化合物または非薬物治療の群を包含する。

20

【0146】

あらゆる上記の態様および実施形態において、作用物質は、検出可能な部分をさらに含むことができる。検出可能な部分は当技術分野においてよく知られており、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、物理学的、または化学的な手段によって検出することができる。例示的な部分には、それだけには限定されないが、酵素、蛍光分子、粒子の標識、高電子密度の試薬、放射標識、ビオチン、ジゴキシゲニン、またはハプロテン、または検出可能に作られたタンパク質が含まれる。

30

【0147】

あらゆる上記の態様および実施形態において、作用物質は、通常は作用物質の一部ではないさらなる化学的部分および/または生物学的部分を含むことができる。これらの誘導体化された部分は、送達、溶解性、生物学的半減期、作用物質の吸収などを改善し得る。部分はまた、作用物質のあらゆる望ましくない副作用などを低減または除去し得る。これらの部分に対する概要は、Remington's Pharmaceutical Sciences(第20版、Mack Publishing Co.、2000年)に見出すことができる(その全文を参照によって本明細書に組み入れる、Pathanら(2009年)Recent Patents on Drug Delivery & Formulation、3巻、71~89頁も参照されたい)。

40

【0148】

作用物質は、部分に共有結合性に、または非共有結合性に連結し得る。実施形態におい

50

て、作用物質は部分に共有結合性に連結している。関連の実施形態において、その部分の共有結合性の連結は、ポリヌクレオチド／ポリペプチドに対してN末端にある。関連の実施形態において、部分の共有結合性の連結は、ポリヌクレオチド／ポリペプチドに対してC末端にある。

【0149】

上記の実施形態のあらゆる場合において、作用物質は、哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性を、ベースラインレベルを超えて増大する作用物質であってよい。ある実施形態において、グルコセレブロシダーゼ活性は、哺乳動物におけるベースラインレベルを超えて、少なくとも約1.5倍、約2.0倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4.0倍、約4.5倍、約5倍、またはそれを超えて増大する。ある実施形態において、グルコセレブロシダーゼ活性は、ニューロンにおいて、ベースラインレベルを超えて、少なくとも約1.5倍、約2.0倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4.0倍、約4.5倍、約5倍、またはそれを超えて増大する。グルコセレブロシダーゼ活性のベースラインレベルは、当技術分野において知られている方法によって容易に決定することができ、本明細書に記載するものである。いくつかの場合において、ベースラインレベルは、平均して、タンパク質症のない、またはGBA1変異のない個体によって表されるレベルである。

10

【0150】

別の一態様は、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物における-シヌクレインを低減するための方法に関する。-シヌクレインは、膜などの細胞の様々な部分に見出すことができ、サイトゾルに可溶性であり、サイトゾルに不溶性である。ある実施形態において、本明細書に記載する方法は、-シヌクレインの特異的な分画を低減する上で有効である。一実施形態において、サイトゾル可溶性の-シヌクレインは低減する。別の一実施形態において、膜に関連する-シヌクレインは低減する。実施形態において、-シヌクレインは、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%低減される。一実施形態において、-シヌクレインは、-シヌクレインの増大を特徴とするタンパク質症のない哺乳動物と有意差のないレベルに低減される。

20

【0151】

別の一態様は、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物におけるタウを低減するための方法に関する。タウは、膜などの細胞の様々な部分に見出すことができ、サイトゾルに可溶性であり、サイトゾルに不溶性である。ある実施形態において、本明細書に記載する方法は、タウの特異的な分画を低減する上で有効である。一実施形態において、サイトゾル可溶性のタウは低減する。別の一実施形態において、膜に関連するタウは低減する。実施形態において、タウは、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%低減される。一実施形態において、タウは、タウの増大を特徴とするタンパク質症のない哺乳動物と有意差のないレベルに低減される。

30

40

【0152】

別の一態様は、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物における毒性脂質（例えば、グルコシルスフィンゴシン）を低減するための方法に関する。一実施形態において、毒性脂質はグル

50

コシルスフィンゴシンである。さらなる実施形態において、グルコシルスフィンゴシンは、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%低減される。一実施形態において、グルコシルスフィンゴシンは、グルコシルスフィンゴシンの増大を特徴とするタンパク質症のない哺乳動物と有意差のないレベルに低減される。

【0153】

別の一態様は、グルコセレブロシダーゼ活性を増大させる治療有効量の作用物質を投与することを含む、タンパク質症を有する哺乳動物におけるタンパク質凝集体の蓄積を阻害するための方法に関する。関連の一実施形態において、タンパク質凝集体は、ユビキチン、タウ、および - シヌクレインからなる群から選択される。

10

【0154】

組成物およびキット

本発明は、それを必要とする哺乳動物におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増大させるのに有用な、本明細書に記載するあらゆる1つまたはそれ以上の作用物質を含む組成物またはキットも提供する。これらの組成物およびキットは、本明細書に記載する通り治療的に用いることができ、タンパク質症に対する他の知られている治療と併用して用いることができる。例えば、タンパク質症に対する通常の処置には、レボドバ、ドパミンアゴニスト、MAO-Bインヒビター、アマンタジン、抗コリン作動薬、外科手術、リハビリテーション、および食事管理が含まれる。アルツハイマー病に対する通常の治療には、例えば、アセチルコリンエステラーゼインヒビター、例えば、タクリン、リバスチグミン、ガランタミン、ドネペジル、メマンチンが含まれる。タンパク質症に対するさらなる治療には、心理社会的介入、行動介入、回想療法、バリデーション療法、支持的精神療法、感覚統合、認知再訓練、リハビリテーション、言語療法などが含まれる。

20

【0155】

「医薬組成物」は、作用物質および別の担体、例えば、不活性または活性な化合物または組成物、例えば、検出可能な作用物質、標識、補助剤、希釈剤、結合剤、安定化剤、バッファー、塩、親油性溶媒、保存剤、補助剤などを含むことができる。担体にはまた、製薬上の賦形剤および添加剤、例えば、単一または併用で、重量もしくは体積で1~99.99%を単独または併用で含めて、存在し得る、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、および炭水化物（例えば、单糖、二糖、三糖、四糖、およびオリゴ糖を含めた糖；アルジトール、アルドン酸、エステル化した糖などの誘導体化した糖；ならびに多糖または糖重合体）が含まれる。例示的なタンパク質の賦形剤には、ヒト血清アルブミン(HSA)などの血清アルブミン、組換えヒトアルブミン(rHA)、ゼラチン、カゼインなどが含まれる。緩衝能において機能することもできる代表的なアミノ酸／抗体の成分には、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテームなどが含まれる。炭水化物の賦形剤も本発明の範囲内に企図されており、その例には、それだけには限定されないが、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなどの单糖；ラクトース、ショ糖、トレハロース、セロビオースなどの二糖；ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなどの多糖；ならびにマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール(グルチトール)、およびミオイノシトールなどのアルジトールが含まれる。

30

【0156】

担体の語は、バッファーまたはpH調整剤をさらに含み、バッファーが有機酸または塩基から調製される塩であるのが典型的である。代表的なバッファーには、有機酸塩、例えば、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸、またはフ

40

50

タル酸の塩；Tri-s、塩酸トロメタミン、またはリン酸バッファーが含まれる。さらなる担体には、重合性の賦形剤／添加剤、例えば、ポリビニルピロリドン、フィコール（重合体の糖）、デキストレート（例えば、2-ヒドロキシプロピル-クワドラチャーリクロデキストリンなどのシクロデキストリン）、ポリエチレングリコール、香味剤、抗微生物剤、甘味剤、抗酸化剤、帯電防止剤、界面活性剤（例えば、「TWEEN 20」および「TWEEN 80」などのポリソルベート）、脂質（例えば、リン脂質、脂肪酸）、ステロイド（例えば、コレステロール）、ならびにキレート化剤（例えば、EDTA）が含まれる。

【0157】

本明細書で用いられる「薬学的に許容される担体」の語は、あらゆる標準的な製薬上の担体、例えば、リン酸緩衝食塩水溶液、水、およびエマルジョン、例えば、油／水または水／油エマルジョン、および多様なタイプの湿潤剤を包含する。組成物はまた、安定化剤および保存剤、ならびにあらゆる上記に記述した担体を、これらが *in vivo* で用いるのに許容できるというさらなる前提で含むことができる。担体、安定化剤、およびアジュvantの例として、Remington's Pharmaceutical Sciences（第20版、Mack Publishing Co.、2000年）およびthe Physician's Desk Reference（第52版、Medical Economics、1998年）を参照されたい。10

【0158】

一般的に、本明細書に記載する作用物質および組成物は、有効量、または対象におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増強するのに十分な量において投与される。投与量は、例えば、年齢、身体状態、体重、性別、食事、投与時間、および他の臨床上の因子に基づいて、この範囲内で調整することができるのが典型的である。有効量の決定は、当業者の能力の範囲内に十分ある。20

【0159】

本明細書に記載する組成物を送達する方法には、それだけには限定されないが、経口、非経口（例えば、局所的、経皮的、吸入による、または注射による）が含まれる。このような投与様式、および適切な医薬組成物をその中で用いるように調製するための方法は、参考によって本明細書に組み入れる、Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care（第1版、American Society of Health-System Pharmacists、2007年）に記載されている。30

【0160】

実施形態において、医薬組成物を、固体形態で経口投与する。

【0161】

経口投与に適する医薬組成物は、各々が、予め決定された量の、本明細書に記載する化合物（複数可）、その誘導体、または薬学的に許容される塩、またはそのプロドラッグを有効成分（複数可）として含む、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、トローチ剤（香味基剤、通常ショ糖およびアラビアゴムもしくはトラガカントゴムを用いて）、散剤、顆粒剤の形態において、または水性もしくは非水性液体中の液剤もしくは懸濁剤として、または水中油型もしくは油注水型の液体エマルジョンとして、またはエリキシル剤もしくはシリップ剤として、またはトローチ剤（pastille）として（不活性な基剤、例えば、ゼラチンおよびグリセリン、もしくはショ糖およびアラビアゴムを用いて）、および/または含嗽剤などとしてあってよい。有効成分を、ボーラス、舐剤、またはペースト剤として投与してもよい。40

【0162】

経口投与用の固体剤形（例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、ドラジェ剤、散剤、顆粒剤など）では、有効成分を1つまたはそれ以上の薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤、例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、および/またはあらゆる以下のものと混合する：（1）充填剤または增量剤、例えば、デンプン、ラクトース、50

ショ糖、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸；(2)結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネット、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ショ糖、および／またはアラビアゴム；(3)保湿剤、例えば、グリセリン；(4)崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、バレイショまたはタピオカデンブン、アルギン酸、ある種のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム；(5)溶解遅延剤、例えば、パラフィン；(6)吸収促進剤、例えば、四級アンモニウム化合物；(7)湿潤剤、例えば、アセチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセリン；(8)吸収剤、例えば、カオリיןおよびベントナイト粘土；(9)滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびこれらの混合物；ならびに(10)着色剤。カプセル剤、錠剤、および丸剤の場合、医薬組成物は緩衝化剤も含むことができる。同様のタイプの固体組成物も、軟および硬充填ゼラチンカプセル剤における充填剤、およびラクトースまたは乳糖などの賦形剤、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどを用いて調製することができる。

10

【0163】

錠剤は、場合により、1つまたはそれ以上の付属的な成分との、圧縮または成形によって作成することができる。圧縮錠剤は、結合剤（例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性な希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、デンブングリコール酸ナトリウム、または架橋されているカルボキシメチルセルロースナトリウム）、表面活性化剤、および／または分散剤を用いて調製することができる。成形錠剤は、適切な機械中に、不活性の液体希釈剤で湿らせた粉末化した有効成分の混合物を成形することによって作成することができる。錠剤および他の固体剤形、例えば、ドラジエ剤、カプセル剤、丸剤、および顆粒剤は、場合により刻み目を付け、または腸溶性コーティングおよび当技術分野においてよく知られている他のコーティングなどのコーティングおよびシェルと調製することができる。

20

【0164】

医薬組成物は、所望の放出プロファイルをもたらすための様々な比率のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマー・マトリクス、リポソーム、および／または微粒子などを用いて、有効成分の組成物中への緩徐な、長期間にわたる、または制御された放出をもたらすように配合することもできる。医薬組成物は、場合により乳白剤も含むことができ、消化管のある部分において、場合により遅れて、有効成分（複数可）のみを、または有効成分（複数可）を優先的に放出する組成物であってもよい。埋込みの組成物の例には、高分子物質およびロウが含まれる。有効成分はまた、適宜、当技術分野においてよく知られている、1つまたはそれ以上の薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と一緒にマイクロカプセル化形態であってもよい（例えば、Remington'sを参照されたい）。

30

【0165】

実施形態において、医薬組成物を経口的に液体形態で投与する。有効成分を経口投与するための液体剤形には、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤、およびエリキシル剤が含まれる。液体剤形は、有効成分の他に、当技術分野において通常用いられる不活性な希釈剤、例えば、水および他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（例えば、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセリン、テトラヒドロフルルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにこれらの混合物を含むことができる。液体の医薬組成物は、不活性な希釈剤の他に、湿潤剤、乳化剤、および懸濁化剤などの補助剤、甘味剤、香味剤、着色剤、芳香剤、および保存剤などを含むことができる。

40

【0166】

懸濁剤は、有効成分（複数可）の他に、懸濁化剤、例えば、それだけには限定されない

50

が、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天、およびトラガカントゴム、ならびにこれらの混合物を含むことができる。

【0167】

実施形態において、医薬組成物を、局所適用、経皮適用、注射などの非経口的手段によって投与する。関連の実施形態において、医薬組成物を、注射、注入、または埋込み（例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下など）によって非経口的に投与する。

【0168】

態様において、本開示の医薬組成物および／または細胞をCNSに直接投与するのが望ましいことがある。したがって、ある実施形態において、血液脳関門を避けるために、組成物をCNSに直接投与する。いくつかの実施形態において、組成物を、直接的な脊髄注射によって投与することができる。実施形態において、組成物を、くも膜下腔内注射によって投与する。いくつかの実施形態において、組成物を、側脳室内注射によって投与する。実施形態において、組成物を、脳の側脳室中に投与する。実施形態において、組成物を、両側の脳の側脳室中に投与する。さらなる実施形態において、組成物を、海馬内注射によって投与する。

10

【0169】

組成物は、1回注射または複数回注射で投与してもよい。他の実施形態において、組成物を、1つを超える位置に投与する（例えば、CNSの2つの部位）。

20

【0170】

非経口使用のための組成物は、単位剤形において、例えば、数回の投与量を含むアンプルまたはバイアルにおいて提示することができ、この場合適切な保存剤を加えることができる。このような組成物は、液剤、懸濁剤、エマルジョン、注入装置、埋込み用の送達装置の形態であってよく、または水もしくは別の適切なビヒクルで使用前に再構成するための乾燥粉末として提示することができる。エタノールなどの1つまたはそれ以上の共ビヒクル（co-vehicle）も用いることができる。有効成分（複数可）とは別に、組成物は、適切な非経口的に許容される担体および／もしくは賦形剤を含むことができ、または有効成分（複数可）を、徐放用に、微粒子、マイクロカプセル、ナノ粒子、リポソームなどの中に組み入れることもできる。さらに、組成物は、懸濁化剤、可溶化剤、安定化剤、pH調整剤、および／または分散剤も含むことができる。

30

【0171】

医薬組成物は、無菌の注射剤の形態であってもよい。医薬組成物は、例えば、細菌保持フィルタを通したろ過により、または無菌水もしくはいくつかの他の無菌の注射用媒体中に使用直前に溶解することができる無菌の固体組成物の形態の滅菌剤を組み入れることにより、滅菌することができる。このような組成物を調製するために、有効成分を、非経口的に許容される液体ビヒクル中に溶解または懸濁する。例示的なビヒクルおよび溶媒には、それだけには限定されないが、水、適切な量の塩酸、水酸化ナトリウム、または適切なバッファーを加えることによって適切なpHに調節した水、1,3-ブタンジオール、リンゲル溶液、および塩化ナトリウムの等張溶液が含まれる。医薬組成物は、1つまたはそれ以上の保存剤、例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、エチル、またはn-プロピルも含むことができる。溶解性を改善するために、溶解増強剤もしくは可溶化剤を加えてもよく、または溶媒がプロピレングリコールなどを10～60重量%含んでいてもよい。

40

【0172】

医薬組成物は、1つまたはそれ以上の薬学的に許容される無菌の等張水溶液剤または非水性溶液剤、分散剤、懸濁剤、もしくはエマルジョン、または使用直前に無菌の注射用の液剤もしくは分散剤に再構成することができる無菌の散剤を含むことができる。このような医薬組成物は、抗酸化剤；バッファー；静菌剤；製剤を意図する受容者の血液と等張にする溶質；懸濁化剤；増粘剤；保存剤などを含むことができる。

【0173】

本発明の医薬組成物において用いることができる、適切な水性および非水性の担体の例

50

には、水、エタノール、多価アルコール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレン glycol など）、およびこれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用の有機エステルが含まれる。例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散剤の場合は必要とされる粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤の使用によって、妥当な流動性を維持することができる。いくつかの実施形態において、有効成分の効果を延長するために、皮下または筋肉内注射からの化合物の吸収を遅らせるのが望ましい。これは、水に難溶性の結晶または非晶質の材料の懸濁液の使用によって遂行することができる。次いで、有効成分の吸収速度は有効成分の溶解速度に依存し、溶解速度は、今度は結晶サイズおよび結晶形態に依存し得る。あるいは、非経口投与した有効成分の吸収の遅延を、化合物を油性のビヒクルに溶解または懸濁することにより遂行する。さらに、注射用の薬剤形態の吸収の延長は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなど、吸収を遅らせる作用物質を含めることによりもたらすことができる。

10

【0174】

徐放の非経口組成物は、水性懸濁液剤、微粒子、マイクロカプセル、磁性微粒子、油性溶液、油性懸濁液、エマルジョンの形態であってよく、または有効成分を生体適合性の担体（複数可）、リポソーム、ナノ粒子、埋込み、または注入装置に組み入れてもよい。

20

【0175】

微粒子および／またはマイクロカプセルの調製において用いるための材料には、それだけには限定されないが、生分解性／生物浸蝕性のポリマー、例えば、ポリグラクチン、ポリ-(イソブチルシアノアクリレート)、ポリ(2-ヒドロキシエチル-L-グルタミン)、およびポリ(乳酸)が含まれる。

20

【0176】

徐放の非経口製剤を配合する場合に用いることができる、生体適合性の担体には、デキストランなどの炭水化物、アルブミンなどのタンパク質、リボタンパク質、または抗体が含まれる。

30

【0177】

埋込みで用いるための材料は、ポリジメチルシリコサンなどの生物非分解性でも、またはポリ(カブロラクトン)、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)もしくはポリ(オルトエステル)などの生分解性でもよい。

30

【0178】

本明細書に全般的に記載してきたが、本発明をさらに説明するために以下の実施例を提供する。

【実施例】

【0179】

ゴーシェ関連タウオパシーおよび他のタンパク質症に対する治療戦略としてのCNSにおけるグルコセレブロシダーゼ活性の増強

40

グルコセレブロシダーゼをコードする遺伝子であるG B A 1 の変異は、シヌクレイノパシーであるパーキンソン病(PD)、およびレビー小体型認知症(DLB)を発症する共通の遺伝的リスク因子を表す。G B A 1 変異のある、またはないPD患者はまた、中枢神経系(CNS)における低レベルのグルコセレブロシダーゼ酵素を表し、酵素と疾患の発症との間に可能な連結が示唆される。本実施例は、ゴーシェ関連シヌクレイノパシーのマウスモデル(Gba1^{D409V/D409V})およびA53T - シヌクレインを過剰発現するトランスジェニックマウスのCNSにおけるグルコセレブロシダーゼ活性の増強を記載するものである。実施例1は、徵候性のGba1^{D409V/D409V}マウスのCNSにおいて、アデノ随伴ウイルス媒介性にグルコセレブロシダーゼを発現させると、毒性脂質であるグルコシルスフィンゴシンの異常な蓄積を完全に正し、ユビキチン、タウ、およびプロテイナーゼ-K-抵抗性 - シヌクレインの凝集体のレベルを低下させることを実証するものである。新規物体認識試験を用いて調べた場合、Gba1^{D409V/D409V}マウス(4月齢または12月齢に開始)におけるグルコセレブロシダーゼの

50

海馬発現がこれらの認知障害を逆転したのも重要である。A 5 3 T - シヌクレインマウスのC N Sにおけるグルコセレブロシダーゼの過剰発現により可溶性 - シヌクレインのレベルが低下し、このグリコシダーゼが - シヌクレインノパシーの発症をモジュレートし得ることが示唆される。したがって、C N Sにおけるグルコセレブロシダーゼ活性の増大は、G B A 1 関連の、およびG B A 1 非関連のタウオパシーに対する潜在的な治療戦略を表す。

【 0 1 8 0 】

グルコセレブロシダーゼに対する遺伝子 (G B A 1) における変異は、パーキンソン病 (P D) およびレビー小体型認知症 (D L B) などのシヌクレインノパシーを発症する遺伝的リスク因子が最高であることを表すことが報告されている（例えば、A h a r o n - P e r e t z J ら (2 0 0 4 年) N Engl J Med、3 5 1 卷、1 9 7 2 ~ 1 9 7 7 頁；S i d r a n s k y E ら (2 0 0 9 年) N Engl J Med、3 6 1 卷、1 6 5 1 ~ 1 6 6 1 頁；V e l a y a t i A ら (2 0 1 0 年) Curr Neurosci Rep、1 0 卷、1 9 0 ~ 1 9 8 頁；C l a r k L N ら (2 0 0 7 年) Neurology、6 9 卷、1 2 7 0 ~ 1 2 7 7 頁；M a t a I F ら (2 0 0 8 年) Arch Neurol、6 5 卷、3 7 9 ~ 3 8 2 頁；B u l t r o n G ら (2 0 1 0 年) J Inherit Metab Dis、3 3 卷、1 6 7 ~ 1 7 3 頁；R o s e n b l o o m B ら (2 0 1 0 年) Blood Cells Mol Dis、4 6 卷、9 5 ~ 1 0 2 頁；およびD u r a n R ら (2 0 1 2 年) Mol Genet Metab、4 卷、4 9 5 ~ 4 9 7 頁を参照されたい）。ゴーシェ患者、ならびにパーキンソニズムおよび認知症を表す保因者の中枢神経系 (C N S) は、 - シヌクレイン陽性のレビー小体 (L B) およびレビー神経突起 (L N) の海馬ニューロンにおける沈着、ならびに古典的なP D およびD L B を有する患者に認められるのと同様のプロセスを抱え持つ（例えば、S p i l l a n t i n i M G ら (1 9 9 7 年) Nature、3 8 8 卷、8 3 9 ~ 8 4 0 頁；S p i l l a n t i n i M G ら (1 9 9 8 年) Proc Natl Acad Sci USA、9 5 卷、6 4 6 9 ~ 6 4 7 3 頁；T a y e b i N ら (2 0 0 3 年) Mol Genet Metab、7 9 卷、1 0 4 ~ 1 0 9 頁、およびW o n g K ら (2 0 0 4 年) Mol Genet Metab、8 2 卷、1 9 2 ~ 2 0 7 頁を参照されたい）。これらの特徴の局面は、神経障害性および非神経障害性のゴーシェ病のいくつかのマウスモデルのC N Sにも認められている（例えば、X u Y H ら、M o l G enet Metab (2 0 1 0 年) 1 0 2 卷、4 3 6 ~ 4 4 7 頁；C u l l e n V ら (2 0 1 1 年) Ann Neurol、6 9 卷、9 4 0 ~ 9 5 3 頁；およびS a r d i S P ら (2 0 1 1 年) Proc Natl Acad Sci USA、1 0 8 卷、1 2 1 0 1 ~ 1 2 1 0 6 頁を参照されたい）。したがって、グルコセレブロシダーゼ活性の喪失または未分解の代謝物のリソソーム蓄積と、P D およびD L B の発症との間の因果関係が示唆されている。薬理学的または遺伝的介入によるグルコセレブロシダーゼ活性の低減により - シヌクレイン凝集体のレベルの上昇がもたらされることを示す、ゴーシェ細胞およびマウスの試験によって、グルコセレブロシダーゼ活性と - シヌクレイン代謝との間のより直接的な連結も強調されている（例えば、C u l l e n V ら (2 0 1 1 年) Ann Neurol、6 9 卷、9 4 0 ~ 9 5 3 頁；S a r d i S P ら (2 0 1 1 年) Proc Natl Acad Sci USA、1 0 8 卷、1 2 1 0 1 ~ 1 2 1 0 6 頁；M a n n i n g - B o g A B ら (2 0 0 9 年) Neurotoxicology、3 0 卷、1 1 2 7 ~ 1 1 3 2 頁；およびM a z z u l l i J R ら (2 0 1 1 年) Cell、1 4 6 卷、3 7 ~ 5 2 頁を参照されたい）。さらに、グルコセレブロシダーゼ活性の低減が、(G B A 1 における変異を抱え持つか否かに関係なく) P D およびD L B を有する対象からのC S F および脳試料に認められており、グルコセレブロシダーゼ活性の低減がシヌクレインノパシーの発症に寄与し得ることが示唆される（例えば、B a l d u c c i C ら (2 0 0 7 年) Mov Disord、2 2 卷、1 4 8 1 ~ 1 4 8 4 頁；P a r n e t t i L ら (2 0 0 9 年) Neurobiology Dis、3 4 卷、4 8 4 ~ 4 8 6 頁；およびG e g g M E ら (2 0 1 2 年) Annals of Neurology、7 2 卷

10

20

30

40

50

、455～63頁を参照されたい)。

【0181】

シヌクレイノパシーの発症におけるグルコセレブロシダーゼの役割は、ゴーシェ関連パーキンソニズムを有する対象を臨床的に観察することによりさらに支持される。これらの個体は、個体の生活の質を実質的に蝕む非運動症状(例えば、認知障害)の頻度および重症度の増大を表す(例えば、Brockmann Kら(2011年)Neurology、77巻、276～280頁; McNeil L Aら(2012年)Mov Disord、27巻、526～532頁; およびMcNeil L Aら(2012年)J Neurol Neurosurg Psychiatry、83巻、253～254頁を参照されたい)。GBA1に変異を抱え持つ個体はまた、-シヌクレインの凝集体の新皮質の蓄積の存在に相関する認知症の発症率がより高い(例えば、Clark LNら(2009年)Arch Neurol、66巻、578～583頁; およびNeumann Jら(2009年)Brain、132巻、1783～1794頁を参照されたい)。実際、GBA1における変異は、PD患者において認知障害を発症する独立のリスク因子として、現在認められている(例えば、Alcalay RNら(2012年)Neurology、78巻、1434～1440頁を参照されたい)。PDにおいて認知症を発症するリスクの増大に関連することが示されている別の一遺伝子はMAPTである(例えば、Goris Aら(2007年)Ann Neurol、62巻、145～153頁を参照されたい)。この遺伝子は、細胞骨格の妥当な組織化および統一性を維持する上で役割を有する、微小管関連タンパク質であるタウをコードする。タウおよび-シヌクレイン関連の病態は、PDおよびLBDを有する患者において並行して、頻繁に見出される(例えば、McKeith IGら(1996年)Neurology、47巻、1113～1124頁; Duda JEら(2002年)Acta Neuropathol、104巻、7～11頁; およびGiasson BIら(2003年)Science、300巻、636～640頁を参照されたい)。

10

20

30

40

【0182】

グルコセレブロシダーゼ活性において結果的な欠損を有するGBA1における変異は、リソソーム貯蔵障害のファミリーの中で最も蔓延しているメンバーである、ゴーシェ病の分子基盤である(例えば、Brady ROら(1966年)J Clin Invest、45巻、1112～1115頁、およびSidransky(2004年)Mol Genet Metab、83巻、6～15頁を参照されたい)。この疾患は、主にグルコシルセラミドである、未代謝の脂質基質がリソソームに進行性に蓄積することを特徴とする。ゴーシェ病を有する対象は、現在、グリカン修飾した組換えグルコセレブロシダーゼを周期的に投与することによって管理されている(例えば、Cox TM(2001年)QJM、94巻、399～402頁、およびGrabowski GA(2008年)Lancet、372巻、1263～1271頁を参照されたい)。しかし、神経障害のゴーシェ患者のCNS出現を是正するのに十分な量の組換え酵素は、血液脳関門を横切ることができない(例えば、Grabowski GA(2008年)Lancet、372巻、1263～1271頁、およびGrabowski GAら(1998年)Blood Rev、12巻、115～133頁を参照されたい)。CNSにおけるグルコセレブロシダーゼを増強するための戦略は、最近、熱心な調査の対象である(例えば、Cabrera-Salazar MAら(2010年)Exp Neurol、225巻、436～444頁; Khanna Rら(2010年)FEBS J、277巻、1618～1638頁; Ashe KMら(2011年)PLoS One、6巻、e21758頁; およびPatnaik Sら(2012年)J Med Chem、55巻、5734～5748頁を参照されたい)。

50

【0183】

レビュー神経突起を暗示する、プロテイナーゼK-抵抗性-シヌクレイン/ユビキチン凝集体の進行性のCNS蓄積を表す、ゴーシェ関連のシヌクレイノパシーのマウスモデルは、以前に記載されている(Sardi SPら(2011年)Proc Natl A

50

c a d . S c i . U S A、108巻、12101～12106頁)。これらのマウスはまた、高レベルの神経毒素であるグルコシルスフィンゴシン(GlcSph)をCNSに表し、実証できる海馬の記憶欠損を表す。この実施例は、ゴーシェ関連シヌクレイノパシーのこのモデルに関連する病理学的特徴がタンパク質タウを含むことを特徴付けるものである。さらに、グルコセレブロシダーゼを、臨床的に関連のある症候後の段階の動物に投与した場合、異常を緩和または逆転することができるか否かを調べた。最後に、グルコセレブロシダーゼと-シヌクレインとの間の関係をさらに探索するために、リソソームの加水分解酵素が、A53T-シヌクレインマウスにおける-シヌクレインレベルに影響を及ぼす能力を、本明細書に記載する通りに評価した。

【0184】

10

〔実施例1〕

ゴーシェ病のマウスマodelのCNSはタウ凝集体の蓄積を表す

-シヌクレインおよびタウ封入体の蓄積、ならびに結果として生じる認知症は、PDおよびDLBを含めた数々の神経変性疾患の際立った特徴である(例えば、McKeith h IGら(1996年)Neurology、47巻、1113～1124頁; Ishizawa Tら(2003年)J Neuropathol Exp Neurol、62巻、389～397頁; およびLee VMら(2004年)Trends Neurosci、27巻、129～134頁を参照されたい)。マウスGba1遺伝子座に単一の点変異を抱え持つゴーシェ病のマウスマodel(Gba1^{D409V/D409V})は、CNSに-シヌクレイン/ユビキチン凝集体の進行性の、かつ顕著な蓄積、ならびに海馬記憶の測定可能な欠損を表すことが以前に報告された(Sardi SPら(2011年)Proc Natl Acad Sci USA、108巻、12101～12106頁)(図5AおよびB、ならびに図6A～Dも参照されたい)。Gba1における変異と、その結果生じるグルコセレブロシダーゼ活性の喪失も、CNSにおけるタウの蓄積を促進するか否かを決定するために、12月齢のGba1^{D409V/D409V}マウスの脳切片を、タウを特異的に認識する抗体を用いて免疫組織化学的に試験した。際立った点状の染色が主に海馬領域に認められたが(図1A)、免疫反応性の証拠は、大脳皮質および小脳などの他の脳の領域にも観察された。Gba1^{D409V/D409V}マウスの脳におけるタウ凝集体の蓄積の開始および速度も決定した。2月齢では、Gba1^{D409V/D409V}マウスにおけるタウの免疫反応性の程度は、野生型の対照に認められたものと差がなかった(図1AおよびB)。しかし、6月齢のGba1^{D409V/D409V}マウスにおけるタウ染色のレベルは、年齢をマッチさせた対照より有意に高かった。蓄積は進行性であり、12月齢のGba1^{D409V/D409V}マウスは、より大量のタウ凝集体を表した(図1AおよびB)。

20

【0185】

30

神経変性疾患における共通の所見は、神経原線維変化を含む過剰リン酸化したタウの存在の増大である(例えば、Goedert Mら(1995年)Neurosci Lett、189巻、167～169頁; およびHanger DPら(2009年)Trends Mol Med、15巻、112～119頁を参照されたい)。これらのリン酸化された種は、AT270(Thr181がリン酸化されたタウを認識する)、AT8(Ser202およびThr205がリン酸化されたタウを認識する)、ならびにAT180(Thr231がリン酸化されたタウを認識する)などの特異的な抗体を用いて検出することができる。Gba1^{D409V/D409V}マウスのCNSにおけるタウ凝集体のリン酸化状態を探索するために、18月齢のマウスからの海馬可溶化物に対してウエスタンプロット分析を行った。全てのタウ種を認識する抗体(Tau-5)を用いてプロットを染色すると、タンパク質の全体的なレベルは、Gba1^{D409V/D409V}と野生型のマウスとの間では差がなかった(図1C)。プロットをAT180またはAT270のいずれかの抗体を用いてプロープした場合、対照と年齢をマッチさせたGba1^{D409V/D409V}マウスとの間の染色の程度に差は観察されなかった(図1C)。しかし、Ser202およびThr205上のリン酸化を検出するAT8染色では、Gba1^D

40

50

4 0 9 V / D 4 0 9 V マウスの可溶化物において中等度であるが有意に増大した（野生型に比べて 1.3 ± 0.1 、n = 6、p < 0.05、図 1 C）。Ser 202 および Thr 205 上のリン酸化の増大のこの観察を、タウ凝集体の蓄積の進行性の性質と合わせると（-シヌクレインに加えて）、Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの CNS は、PD および DLB を有する対象に認められる病理学的特徴を要約することが指摘される。

【0186】

〔実施例 2〕

グルコセレブロシドを海馬中に投与すると症候後の Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの生化学的および記憶の異常を逆転する

CNS を組換えグルコセレブロシダーゼで再構成すると、症候性の Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの生化学的異常および記憶欠損を正すことができるか否かを決定するために、ヒトのグルコセレブロシダーゼをコードする組換えの自己相補的アデノ随伴ウイルスベクター（血清型 1）（AAV - GBA 1）を、初期および後期の症候性マウス（それぞれ 4 月齢および 12 月齢）の海馬中に両側性に投与した。12 月齢に AAV - GBA 1 を投与した Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの CNS を免疫組織化学検査し、次いで 6 か月後に分析すると、グルコセレブロシダーゼの豊富で広範な海馬発現が明らかになった（図 2 A）。導入遺伝子をコードしない対照のウイルス（AAV - EV）で処置したマウスは、染色を示さなかった（図 2 A、挿入図）。AAV - GBA 1 処置した（図 2 B、赤色バー）マウスの酵素活性は、ベースライン時（図 2 B、黒色バー）および AAV - EV を投与した Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウス（図 2 B、青色バー）よりも、およそ 10 倍高いことが決定された。酵素の同様の分布が、4 月齢に処置し、処置 6 か月後に分析した Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの CNS に認められた（データは示さず）。12 月齢のマウスにおけるグルコセレブロシダーゼの発現は、6 か月後の脳のグルコシルスフィンゴシンレベルの過剰な上昇の標準化に関連した（図 2 C、赤色バー）。対照的に、対照のウイルスで処置した Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスは、同じ時間間隔にわたって炎症誘発性の脂質の継続的な蓄積を表した（図 2 C、青色バー）。

【0187】

新規物体認識試験を用いて海馬記憶を評価した。4 月齢の Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスを処置前に試験することで、これらのマウスが新規な物体の記憶の障害を表すことを確認した（図 2 D）。これらのマウスを AAV - GBA 1 で処置し、マウスを 2 か月後に試験すると、記憶欠損を逆転した（6 月齢、図 2 E、赤色バー、n = 10、p < 0.05）。対照的に、対照のウイルスベクターで処置した Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスは、識別できる改善を示さなかった（図 2 E、青色バー、n = 9）。12 月齢に AAV - GBA 1 で処置し（すなわち、既存の病態が高レベルである）、2 か月後に試験した（14 月齢、図 2 F、赤色バー、n = 12、p < 0.05；AAV - EV、青色バー、n = 12）Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの別々のコホートで、同様の結果が達成された。したがって、症候後の Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの CNS におけるグルコセレブロシダーゼ活性の増強は、グルコシルスフィンゴシンの病理学的蓄積を正し、そして重要なことに、これらマウスの記憶障害を正した（GBA 1 を増強すると 2 月齢の Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスにおける記憶欠損も正すことができることを示す、図 7 も参照されたい）。

【0188】

〔実施例 3〕

症候性の Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの海馬中にグルコセレブロシダーゼを投与すると脳における凝集したタンパク質のレベルを低減する

Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスはグルコセレブロシダーゼ活性の低減、ならびに海馬におけるユビキチン、-シヌクレインおよびタウ凝集体の進行性の蓄積を表すので、脳におけるグルコセレブロシダーゼレベルを増強すると、症候後の動物におけるこれら異常なタンパク質材料のレベルが低下するか否かを試験した。4 月齢および 12 月齢の Gba 1^{D 4 0 9 V / D 4 0 9 V} マウスの海馬（後者は、凝集体のより大きな蓄積および

10

20

30

40

50

病態を表した)に、AAV-GBA1またはAAV-EVのDNアーゼ抵抗性粒子2E1 (drp)を両側性に、定位注射した。試験の開始時(4月齢および12月齢)、および対照のAAV-EVベクターを注射し6か月後、Gba1^{D409V/D409V}マウスの脳組織を分析すると、この期間にわたってユビキチン、-シヌクレイン、およびタウ凝集体の蓄積が示された(図3A~C)。対照的に、AAV-GBA1を4月齢のGba1^{D409V/D409V}マウスに遺伝子送達すると、海馬のユビキチン、プロテイナーゼK-抵抗性-シヌクレイン、およびタウ凝集体の低減がもたらされた(図3A~C)。しかし、ユビキチンの低減は統計学的有意に到達したが、-シヌクレインまたはタウの低減は到達しなかった。より年長の(12月齢)マウスにおけるグルコセレブロシダーゼのCNS発現は、6か月後にアッセイした場合、より若いコホートに認められるのと同様であるが、より控えめな効果を生じた(図3A~C)。グルコセレブロシダーゼの送達は、タウおよび-シヌクレインの蓄積速度を遅くするように見えたが、ユビキチンレベルには影響がなく、これらのタンパク質の蓄積に対する機序は異なり得ることが示唆された。年長の動物に存在する高レベルの凝集体は、効果的に低減するのにより長期間、またはより多くのグルコセレブロシダーゼを必要とする可能性がある。それにもかかわらず、データは、CNSにおけるグルコセレブロシダーゼ活性の増強は、症候性のGba1^{D409V/D409V}マウスにおける病態的にミスフォールディングされたタンパク質凝集体の蓄積の程度を遅らせることを示唆している。

10

20

30

40

50

【0189】

〔実施例4〕

トランスジェニックA53T -シヌクレインマウスのCNSはグルコセレブロシダーゼの低活性に関連する

PDまたはDLBを有する対象のCSFおよび脳の試料の分析により、非罹患の個体より罹患した個体にグルコセレブロシダーゼ活性が低かったことが示され、これらのシヌクレインノバシーの発症におけるリソソーム酵素の因果的役割が示唆される(例えば、Balducci Cら(2007年) Mov Disord、22巻、1481~1484頁; Parnetti Lら、Neurobiol Dis(2009年) 34巻、484~486頁; およびGegg MEら(2012年) Annals of Neurology、72巻、455~63頁を参照されたい)。最近のデータは、-シヌクレインは、リソソームのグルコセレブロシダーゼ活性を阻害する能力を有することも示唆している(例えば、Mazzulli JRら(2011年) Cell、146巻、37~52頁、およびYap TLら(2011年) J Biol Chem、286巻、28080~28088頁を参照されたい)。-シヌクレインの過剰発現が、グルコセレブロシダーゼの活性に負の影響を及ぼすか否かを決定するために、A53T -シヌクレイントランスジェニックマウス(A53T変異を保有する変異ヒト-シヌクレインを発現する)からの脳の可溶化液を試験した。GBA1に変異のないPD患者における所見同様、A53T -シヌクレインマウスは、野生型の動物よりも有意に低いリソソームのグルコセレブロシダーゼ活性を表した(図4A)。ホモ接合性のA53T -シヌクレインマウスのCNSが、低レベルの-シヌクレインを発現する(Het)同腹仔よりも酵素活性における大幅な低減を示したことから、この効果は-シヌクレインのレベルに依存的であった(図4A、斜線バー)。他のリソソーム酵素(すなわち、ヘキソサミニダーゼおよび-ガラクトシダーゼ)の活性が影響を受けなかったことから、この低減はグルコセレブロシダーゼに選択的に関連するものであった(図4A)。これらの結果は、阻害が大きいほど、より高レベルの-シヌクレインに相関するため、高レベルの-シヌクレインはリソソームのグルコセレブロシダーゼ活性を阻害し得るという主張を指示するものである。

【0190】

〔実施例5〕

A53T -シヌクレイントランスジェニックマウスのCNSにおけるグルコセレブロシダーゼのAAV媒介性の発現により -シヌクレインレベルは低下する

以前に、グルコセレブロシダーゼが過剰発現すると、症候性の G b a 1 D 4 0 9 V / D_{4 0 9 V} マウスの C N S における - シヌクレイン凝集体の蓄積が低減することが認められた（図 3 B）。 - シヌクレインの蓄積の緩和におけるグルコセレブロシダーゼの治療可能性を確認するために、この低減が A 5 3 T - シヌクレインマウスでも実現し得るか否かを、次に試験した。4 月齢のヘテロ接合型 A 5 3 T - シヌクレインマウスの線条体に、A A V - G B A 1、または G F P をコードする対照ウイルス（A A V - G F P）のいずれかを一側性に注射した。予想通り、グルコセレブロシダーゼ活性は、反対側または A A V - G F P を注射した対照に比べた場合、A A V - G B A 1 を注射したマウスの同側性の線条体に有意に増加（およそ 7 倍）した（図 4 B）。線条体組織のホモジネートを連続的な分画化にやはりかけて、サイトゾル可溶性、膜関連性、およびサイトゾル不溶性の形態の - シヌクレインを分離した。E L I S A による定量により、グルコセレブロシダーゼの線条体発現によって、サイトゾル可溶性の - シヌクレインレベルが有意に低下（対照の 8 6 ± 3 %、n = 5、p < 0 . 0 1）したことが明らかになった（図 4 B）。膜関連性の - シヌクレインのレベルも、グルコセレブロシダーゼの発現時に中等度の低下を表した（対照の 8 1 ± 9 %、n = 5、p = 0 . 0 7）（図 4 B）。しかし、不溶性の分画の量は処置により不变であった。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 1 】

A 5 3 T - シヌクレインマウスの脊髄において - シヌクレインレベルを低下させるグルコセレブロシダーゼの効果も決定した。A 5 3 T - シヌクレイン新生仔マウスの側脳室および腰髄上部の両方中に A A V - G B A 1 または A A V - G F P を、1 匹あたり合計投与量 3 E 1 1 d r p を注射した。予想通り、A A V - G B A 1 の投与後、脊椎におけるグルコセレブロシダーゼの頑強な発現（対照よりおよそ 3 倍高い）が実現したが、対照のベクターでは実現しなかった（図 4 C）。線条体の注射同様、A A V - G B A 1 を投与すると、対照の可溶性分画の - シヌクレインレベルが 6 7 ± 7 % に低下した（p < 0 . 0 1、図 4 C）。まとめると、これらの結果は、グルコセレブロシダーゼの活性を増強すると、A 5 3 T - シヌクレインマウスの C N S における - シヌクレインレベルを低下し得ることを指摘するものである。

【 0 1 9 2 】

〔 実施例 6 〕

A 5 3 T - シヌクレインマウスの脳におけるグルコセレブロシダーゼの発現はタウ凝集体の蓄積を低減する

タウの凝集は、 - シヌクレイン過剰発現マウスを含めたいいくつかの動物モデルに観察されている（H a g g e r t y ら（2 0 1 1 年）E u r J N e u r o s c i、3 3 卷、1 5 9 8 ~ 1 6 1 0 頁）。タウの蓄積の緩和におけるグルコセレブロシダーゼの治療可能性を確認するために、この低減が A 5 3 T - シヌクレインマウスでも実現され得るか否かを次に試験した。A 5 3 T - シヌクレイントランスジェニックマウスに、P 0 に A A V 対照または A A V - G B A 1 のいずれかを両側性に注射した。年齢をマッチさせた、非注射の W T マウスを、陰性対照として無処置のままにした。A 5 3 T - シヌクレインマウスの脳組織の分析により、野生型対照に比べて多数の凝集体が示された（図 8）。とりわけ、G B A 1 の過剰発現により、年齢をマッチさせた同腹仔における蓄積したタウの数が低減した（図 8）。データは、C N S におけるグルコセレブロシダーゼ活性の増強は、病態的にミスフォールディングされたタンパク質凝集体の蓄積の程度を遅らせることができるという見解と一致する。

【 0 1 9 3 】

〔 実施例 7 〕

タウトランスジェニックマウスにおけるグルコセレブロシダーゼの発現は記憶不全を防止する

タウトランスジェニックマウス（T h y 1 - T A U 2 2）は、T h y 1 . 2 - プロモーターの下で、G 2 7 2 V および P 3 0 1 S の部位が変異したヒト 4 リピートタウを発現する、アルツハイマー病および他のタウオパシーのマウスモデルである。T h y 1 - T A U

22は、記憶機能試験を妨害するいかなる運動不全およびジストニー姿勢の非存在下でタウの病態を表す。Thy1-TAU22は、いくつかのアルツハイマー病関連のタウエピトープ(AT8、AT100、AT180、AT270、12E8、タウ-pSer396、およびAP422)上のタウの過剰リン酸化、まばらなゴーストタングルおよびPHF様フィラメントを有する神経原線維変化様封入体(GallyasおよびMC1-陽性)、ならびに軽度のアストログリオシスを示す。これらのマウスは、学習の遅延および空間記憶の低下を含めた行動の障害も表す。

【0194】

グルコセレブロシダーゼ(GBA1)活性を増強する治療効能をさらに評価するために、GBA1増強のタウトランスジェニックマウスに対する効果を評価した。2月齢のThy1-TAU22マウスに、AAV1-GBA1またはAAV1-对照ウイルスのいずれかを注射した(1e13 DRP/ml)。マウスに麻酔し、ウイルスベクターの海馬への定位注射を行った(1部位あたり3μlを両側の海馬に注射)(図9A)。Gba1^{D409V/D409V}マウスと一致して、Thy1-TAU22マウスをAAV-GBA1処置すると、記憶欠損は逆転した(図9B)。注射2か月後に認知が改善する傾向があり、これは動物を処置6か月後に試験した場合に強化された(図9B)。対照的に、対照のウイルスベクターで処置したThy1-TAU22マウスは、新規な物体に対する好みを示さず、両時間点での記憶不全が指摘された(図9B)。したがって、タウトランスジェニックマウスのCNSのGBA1活性の増強により、記憶障害が正された。

【0195】

考察

PDおよびDLBを発症するリスク因子としてのGBA1変異を最初に記載した後、いくつかの独立した試験からの所見は、これら荒廃的な疾患の病原におけるグルコセレブロシダーゼの役割を支持するものであった。グルコセレブロシダーゼ活性の低下、および変異グルコセレブロシダーゼの存在の両方が、-シヌクレイン/ユビキチン凝集体のCNSにおけるレベルの上昇を誘発し得ると言われている(例えば、Xu YHら(2010年)Mol Genet Metab、102巻、436~447頁; Cullen Vら(2011年)Ann Neurol、69巻、940~953頁; Sardi SPら(2011年)Proc Natl Acad Sci USA、108巻、12101~12106頁; Manning-Bog ABら(2009年)Neurotoxicology、30巻、1127~1132頁; およびMazzulli JRら(2011年)Cell、146巻、37~52頁を参照されたい)。Gba1に変異を抱え持つゴーシェ病のマウスマルクの分析により、酵素活性の低下が、PDおよびDLBの2つの特徴である神経のタンパク質のミスプロセシングおよび認知欠損を促進することが示唆される(例えば、Xu YHら(2010年)Mol Genet Metab、102巻、436~447頁; Cullen Vら(2011年)Ann Neurol、69巻、940~953頁; およびSardi SPら(2011年)Proc Natl Acad Sci USA、108巻、12101~12106頁を参照されたい)。しかし、酵素の欠乏がこれらの病気の病原にどの程度寄与するかは依然として明らかにされていない。この試験は、これらの疾患の発症におけるグルコセレブロシダーゼの役割に対するさらなる支持を提供し、PDおよびDLBなどの-シヌクレインのミスプロセシングに関連する疾患に対する治療取組みとしてCNSにおけるグルコセレブロシダーゼの増強を確証するものである。

【0196】

PDおよびLBDの正確な原因病理学は依然として明らかになっていないが、LBにおける-シヌクレインおよび他のタンパク質の進行性の蓄積の所見は、潜在的な因果的機序としてタンパク質のミスフォールディングを結びつけるものである(例えば、Lee VMら(2004年)Trends Neurosci、27巻、129~134頁、およびDawson TM & Dawson VL(2003年)Science、302巻、819~822頁を参照されたい)。このタンパク質症は、以前に記載された

10

20

30

40

50

- シヌクレインおよびユビキチンの凝集体の蓄積に加えて、タウの病態の進行性の蓄積を実証する、ゴーシェ病の Gba1^{D409V / D409V} マウスモデルで再現される。

- シヌクレイン、および微小体関連タンパク質であるタウの両方が、いくつかの疾患の神経変性性のプロセスにおいて中心的な役割を果たすと考えられている。SNC A および MAPT (それぞれ - シヌクレインおよびタウをコードする遺伝子) の変異は、 - シヌクレインおよびタウ凝集体の結果として生じる外観とともに、アルツハイマー病、PD、DLB、および前頭側頭型認知症を含めた多様な神経変性疾患に関係している (例えは、Goris A ら (2007 年) Ann Neurol 、 62 巻、 145 ~ 153 頁 ; Lee VM ら (2004 年) Trends Neurosci 、 27 巻、 129 ~ 134 頁 ; および Schlossmacher M (2007 年) - synuclein and synucleinopathies ; および The Dementias 、第 2 版、 MN GJR (Butterworth Heinemann , Inc. 、 Oxford) 、第 30 巻、 186 ~ 215 頁を参照されたい) 。これらのタンパク質凝集体が異なって見える機序 ; 例えは、 - シヌクレインは自発的に自家重合し得るが (Conway KA ら (1998 年) Nat Med 、 4 巻、 1318 ~ 1320 頁) 、タウは誘発剤の存在を必要とする (Goedert M ら (1996 年) Nature 、 383 巻、 550 ~ 553 頁) 。さらに、 - シヌクレインの原線維は、タウの重合化を促進し得ることが報告されている (Giasson BI ら (2003 年) Science 、 300 巻、 636 ~ 640 頁、および Waxman EA & Giasson BI (2011 年) J Neurosci 、 31 巻、 7604 ~ 7618 頁) 。したがって、 Gba1^{D409V / D409V} マウスの CNS に観察されるタウ凝集体は、 - シヌクレインの線維化に二次的に生じることが可能である。さらに、たった 1 つのタウがリン酸化した種 (Ser202 および Thr205) が、老齢 Gba1^{D409V / D409V} の脳で増大した。ゴーシェマウスモデルでは広範にわたるタウの過剰リン酸化がなかったことより、 Lasagna-Reeves ら (2012 年) FASEB J 、 26 巻、 1946 ~ 1959 頁によって提唱される通り、リン酸化は後期の事象であり得ることが示唆される。

【 0197 】

PD は運動障害として現れるのが典型的であるが、認知症を含めた多様な度合いの認知障害に関連することが知られている。GBA1 に変異を抱え持つ PD 患者は、非 GBA1 変異を保有する対応患者よりも認知スコアが低いのが典型的であり、 GBA1 の変化により認知欠損の発症の感受性が増大することが示唆される (Alcalay RN ら (2012 年) Neurology 、 78 巻、 1434 ~ 1440 頁) 。ゴーシェ病の Gba1^{D409V / D409V} マウスモデルは、 PD および DLB 患者からの脳に認められる多くの異常な生化学的特徴、ならびに記憶における測定可能な欠損を要約するものである。これらの疾患の出現は、外来の供給源の酵素を補充することによって、前駆症状の動物の CNS で回復され得ることが示唆されている (Sardi SP ら (2011 年) Proc Natl Acad Sci USA 、 108 巻、 12101 ~ 12106 頁) 。 GBA1 関連の認知障害の発症を予想するのは本質的に困難であるため、同じ有益な効果が、他の疾患有する動物でも実現し得るか否かを試験するのが妥当であった。本実施例は、初期および後期両方の症候性の Gba1^{D409V / D409V} マウスにおいてグルコセレブロシダーゼを AAV 媒介性に発現させると、認知障害を逆転するのにやはり効果的であったことを実証するものである。認知におけるこの回復は、糖脂質であるグルコシルスフィンゴシンの完全な消失、および病的な凝集体の蓄積の測定可能な低下に関連した。 Gba1^{D409V / D409V} マウスの CNS におけるグルコセレブロシダーゼ活性を増強すると、「毒性の」代謝物のレベルを低下させ、それによって正確なシナプス機能 (Hernandez D ら (2012 年) Neuron 、 74 巻、 277 ~ 284 頁) 、および凝集したタンパク質を分解する経路の妥当な機能 (Martinez-Vicente M & Cuervo AM (2007 年) Lancet Neurol 、 6 巻、 352 ~ 361 頁、および Cremades N ら (2012 年) Cell 、 149 巻、 1

10

20

30

40

50

048～1059頁)に必要であるリソーム機能を改善することが可能である。重要なことに、これらの結果は、CNSにおけるグルコセレブロシダーゼ活性を増強すると、ゴーシュ関連パーキンソニズムおよび関連のシヌクレイノパシーの臨床上の局面のいくつかの進行を妨害し(さらに逆転し)得ることを強力に示唆している。

【0198】

調査を継続することにより、グルコセレブロシダーゼと - シヌクレインとの間の関係に対する多大な洞察が、引き続きもたらされる。グルコセレブロシダーゼ活性の低下または変異グルコセレブロシダーゼの存在が、 - シヌクレインの異常な蓄積を促進し得ることは明白である(Sardi S Pら(2012年)Neurodegener Dis、10巻、195～202頁)。 - シヌクレインはまた、グルコセレブロシダーゼと相互作用して、リソームに対するトラフィкиングを低減し得、またはリソームの活性を阻害し得、それによって疾患状態を増悪すると報告されている(Mazzulli JRら(2011年)Cell、146巻、37～52頁およびYap TLら(2011年)J Biol Chem、286巻、28080～28088頁)。疾患プロセスにおけるグルコセレブロシダーゼの役割は、PD患者がGBA1変異を抱え持つか否かに関係なく、孤発性のPD患者の脳およびCSFでグルコセレブロシダーゼ活性が低減する所見によってやはり支持される(Gegg MEら(2012年)Annals of Neurology、72巻、455～63頁)。これらの所見を補うために、上記の実施例は、CNSでA53T - - シヌクレインを過剰発現するトランスジェニックA53T

- シヌクレインマウスの試験を記載するものである。A53T - - シヌクレインマウスからの脳可溶化液を測定すると、 - シヌクレインが高いマウスほど、より低い量のグルコセレブロシダーゼ活性に相關したことが示された。重要なのは、A53T - - シヌクレインマウスの脳におけるグルコセレブロシダーゼ活性が増大すると、 - シヌクレインレベルが低下したことである。これらの結果は、A53T - - シヌクレインマウスのCNSにおけるグルコセレブロシダーゼ活性を増強すると、その「シヌクレアーゼ」活性によって、グルコセレブロシダーゼ活性に対する - シヌクレインの有害なフィードバックを中断し得、それによって - シヌクレインを分解する細胞の能力が回復することを示唆している。したがって、組換え酵素、リソームの酵素をコードする遺伝子導入ベクター、または加水分解酵素の小分子アクチベーターの投与によってCNSにおけるグルコセレブロシダーゼ活性を増強すると、ミスフォールディングされたタンパク質の蓄積の程度を低減し得、それによって、GBA1変異のある、またはない対象におけるPDの疾患の進行を遅らせ得る。

【0199】

要約すると、CNSにおける凝集体の蓄積の程度のモジュレーションにおける、グルコセレブロシダーゼの増大の効能を、タウおよび - シヌクレインのタンパク質症の3つのマウスマodelにおいて実証した。ゴーシュ関連のパーキンソニズムおよび認知症の症候性のマウスマodelにおいて、CNSにおけるグルコセレブロシダーゼ活性を増強すると、脂質の異常な貯蔵を正し、認知機能不全を逆転し、凝集した - シヌクレインおよびタウのレベルを低下させた。CNSにおけるグルコセレブロシダーゼレベルの上昇は、A53T

- シヌクレインマウスマodelにおける - シヌクレインレベルおよびタウ凝集体の低減にも効果的であった。タウトランスジェニックマウスのCNSにおけるグルコセレブロシダーゼレベルを上昇させると、記憶機能不全における改善がさらに観察された。まとめると、これらの結果は、PD、ならびに関連のシヌクレイノパシーおよびタウオパシーに対するグルコセレブロシダーゼ増強治療の開発を支持するものである。

【0200】

材料と方法

動物：サノフィ社、ジェンザイムの動物ケアおよび使用委員会の施設によりすべての手順が承認された。ゴーシュ病のGba1^{D409V/D409V}マウスマodelは、マウスグルコセレブロシダーゼ(Gba1)遺伝子の残基409に点変異を抱え持つ(例えば、Xu YHら(2003年)Am J Pathol、163巻、2093～2101頁を

10

20

30

40

50

参照されたい）。トランスジェニック A 5 3 T - シヌクレインマウスは、マウス PrP プロモーターの転写制御下でヒト A 5 3 T - シヌクレイン（M 8 3 系統）を発現する（Giasson BIら（2002年）Neuron、34巻、521～533頁）。Applied Biosystems 7500リアルタイム PCR システム（Life Technologies、Carlsbad、CA）を、ヒト SNC-A に対するプライマー - プローブセットと一緒に用いた定量的 PCR により、A 5 3 T - シヌクレインマウスの遺伝子型解析を行った（アッセイ ID Hs00240907_m1）。SNC-A 値をマウス GADPH (4352339E) に対して標準化した。

【0201】

自己相補的（sc）AAVベクター：ヒト GBA1 の cDNA のオープンリーディングフレームを、scAAV2 の ITR および 0.4 kb の GUSB プロモーターを含むシャトルプラスミド中にクローニングした（Passini MAら（2010年）J Clin Invest（2010年）120巻、1253～1264頁）。緑色蛍光タンパク質（GFP）のオープンリーディングフレームまたは非コードスタッファー-DNA（空ベクター、EV）も、同じシャトルベクター中にクローニングした。組換えプラスミドを各々、ヒト 293 細胞のトリプルプラスミドトランスフェクションによって、AAV 血清型 - 1 カプシド中にパッケージングして、scAAV2/1-GusB-hGBA1 (AAV-GBA1)、scAAV2/1-GusB-GFP (AAV-GFP)、および scAAV2/1-GusB-EV (AAV-EV) を產生した。組換えAAVベクターを、イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。得られたベクター調製物である、AAV-GBA1、AAV-GFP、および AAV-EV は、典型的に DNAse - 抵抗性粒子の力値 1 E 13 (drip) / ml を有していた。

【0202】

定位固定注射：Gba1^{D409V/D409V} および A 5 3 T - シヌクレインマウスをイソフルランで麻酔し、海馬（A-P：-2.00；M-L： \pm 1.50；D-V：十字縫合および硬膜から -1.5；切歎棒：0.0）または線条体（A-P： \pm 0.50；M-L： \pm 2.00；D-V：十字縫合および硬膜から -2.5；切歎棒：0.0）中にウイルスベクター（AAV-GFP、AAV-GBA1、AAV-EV）を定位固定注射した。10 μl Hamilton シリンジを用いて、各注射部位に 2 マイクロリットルを投与した（1 注射部位あたり合計 2 E 11 drip を、0.5 μl / 分の速度で）。手術 1 時間前および手術 24 時間後に、マウスにケトプロフェン（5 mg / kg s.c.）を鎮痛薬として投与した。

【0203】

新生仔注射：出生日（P0）、仔の、脳の両半球の側脳室および腰髄上部に注射を 3 回投与した（各部位に 2 μl）。投与した AAV-GBA1 および AAV-GFP ベクターの合計投与量は、1 匹あたり 3 E 11 drip であった。注射は全て、以前に記載されている通り、精密に引かれたガラス製マイクロピペットニードルで行った（Passini MAら（2010年）J Clin Invest、120巻、1253～1264頁）。

【0204】

ウェスタンプロット：生化学的分析用に、マウスをリン酸緩衝食塩水（PBS）で還流し、以前に記載されている通りに処理した（Sardi SPら（2012年）Neurodegener Dis、10巻、195～202頁）。組織を液体窒素中で瞬間凍結し、アッセイまで -80° で貯蔵した。組織を、プロテアーゼ（Complete (登録商標)；Roche、Germany) および ホスファターゼ（Pierce、Rockford、IL）インヒビターのカクテルを含む、T-PER 溶解バッファー（Pierce、Rockford、IL）中でホモジナイズした。遠心分離後、溶解液を 4～12% SDS-PAGE 上で分離し、ニトロセルロース膜に移し、以下の抗体でプロービングした：マウス抗タウ（Tau-5、1:500、Millipore、Billerica、MA）、マウス抗リン酸化タウ（AT8、Ser202/Thr205；AT180、Thr231；AT270、Thr181；全て Pierce、Rockford、

10

20

30

40

50

ILから)、またはウサギ抗- - チューブリン抗体(1:1000、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)。膜を、赤外二次(1:10000)抗体(LI-COR Biosciences、Lincoln NB)とインキュベートし、タンパク質のバンドを、Odysseyソフトウェア(LI-COR Biosciences)を用いて定量的蛍光によって可視化した。

【0205】

グルコセレブロシダーゼ活性およびスフィンゴ糖脂質レベルの測定：脳および海馬のグルコセレブロシダーゼ活性を、人工基質として4-メチルウンベリフェリル(4-MU)- - D-グルコシドを用いて、以前に記載されている通りに決定した。ヘキソサミニダーゼおよび-ガラクトシダーゼ活性をそれぞれ、4-MU-N-アセチル- - D-グルコサミニドおよび4-MU- - D-ガラクトピラノシドを用いて決定した。グルコシリセラミド(GlcCer)およびグルコシリスフィンゴシン(GlcSph)の組織レベルを、以前に記載されている通り、質量分析法によって測定した(Cabrera-Salazar MAら、Exp Neurol(2010年)225巻、436~444頁)。

【0206】

免疫組織化学：組織を、以前に記載されている通りに処理した(Sardi SPら(2012年)Neurodegener Dis、10巻、195~202頁)。組織のいくつかをプロテイナーゼK(1:4希釀；DAKO、Carpinteria、CA)と室温で7分間前処理して、-シヌクレイン凝集体を暴露した。以下の一次抗体を用いた：マウス抗ユビキチン(1:50；Millipore、Billerica、MA)、ウサギ抗-シヌクレイン(1:300；Sigma、St. Louis、MO)、およびマウス抗タウ(1:500、Tau-5、Millipore、Billerica、MA)。

【0207】

新規物体認識試験：以前に記載されている通りに試験を行った(Sardi SPら(2012年)Neurodegener Dis、10巻、195~202頁)。簡潔に述べると、連續3日、5分間、マウスを個々に慣らして、オープンフィールドボックスを探索させた。最初の訓練セッション(T1)の間、2つの別個の物体を、オープンフィールド中に、相互に14インチ(35.56センチメートル)離して、対称に配置した。動物を5分間探索させた。物体を調査するのに費やした時間を、Ethovisionビデオトラッキングソフトウェア(Noldus、オランダ)を用いて記録した。24時間の保持時間後、動物を、新規な物体の認識に対して試験した(T2)。マウスをオープンフィールドボックスに5分間戻し、馴染みのある物体および新規な物体を調査するのに費やした時間を記録した。結果を、訓練(T1)または試験(T2)の間の標的的調査のパーセント値として表す。標的にに対する調査のスコアが50%であれば、いずれかの物体に好みがないことを表す。

【0208】

-シヌクレインの分画化および定量化：A53T-シヌクレインマウスからの線条体および脊髄を、以前に記載されている通りにホモジナイズして(Cullen Vら(2011年)Ann Neurol、69巻、940~953頁)、サイトゾル(Tris可溶性)、膜関連(Triton-X100可溶性)、および不溶性(SDS可溶性)の3つの分画を得た。異なる分画中のヒト-シヌクレインの濃度を、サンドイッチELISA(Invitrogen、Carlsbad、CA)によって定量した。タンパク質濃度を、マイクロBCAアッセイによって(Pierce、Rockford、IL)決定した。

【0209】

統計学的分析：統計学的分析をスチュードントのt検定または分散分析(ANOVA)、引き続きNewman-Kuelsの事後検定によって行った。新規性に対する好みを、1標本のt検定を用いて、時間の50%を超える新規な物体の調査と定義した。統計学的

10

20

30

40

50

分析は全て、GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) で行った。p < 0.05 の値を有意とみなした。

【0210】

本発明を、上記の実施形態と組み合わせて記載してきたが、先の記載および実施例は本発明を説明しようとするものであり、本発明の範囲を限定するものではないことを理解されたい。本発明の範囲内の他の態様、利点、および修飾は、本発明が関係する技術分野における技術者であれば明らかである。

【0211】

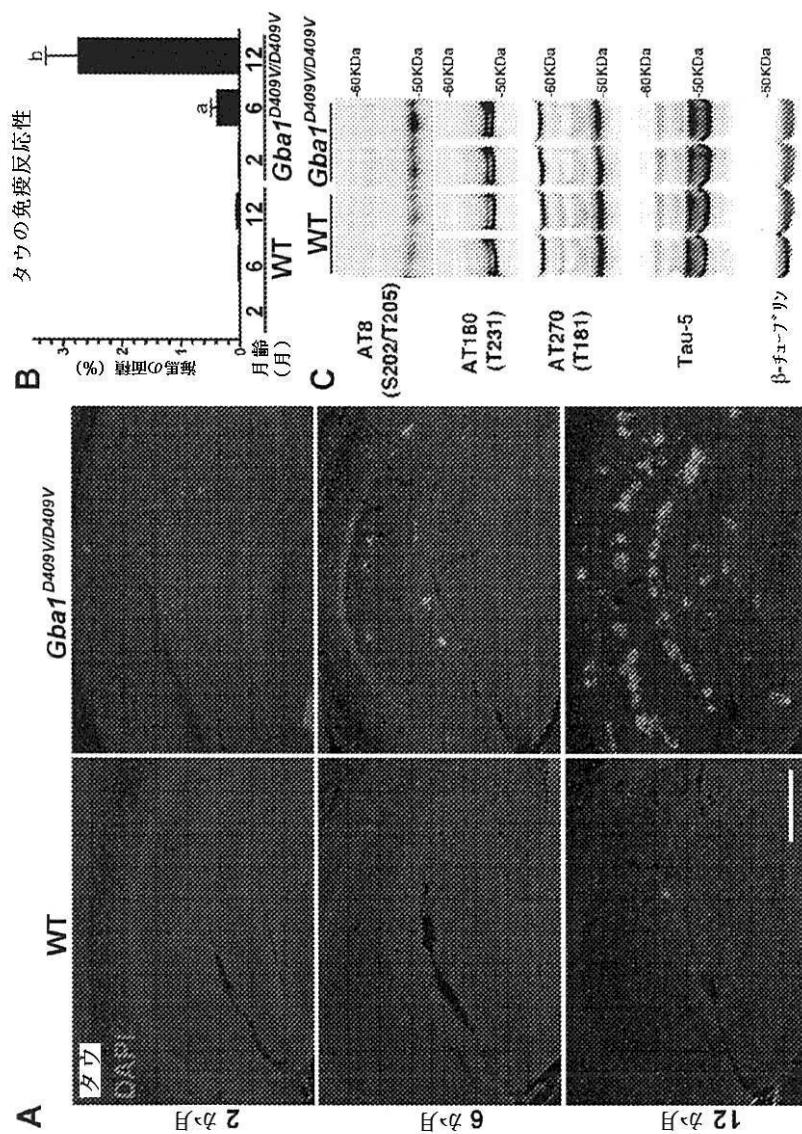
さらに、本発明の特徴または態様を、マーカッシュグループに関して記載する場合、当業者であれば、本発明はそれによってマーカッシュグループのあらゆる個々のメンバーまたはサブグループのメンバーに関してやはり記載されることを認識されよう。

10

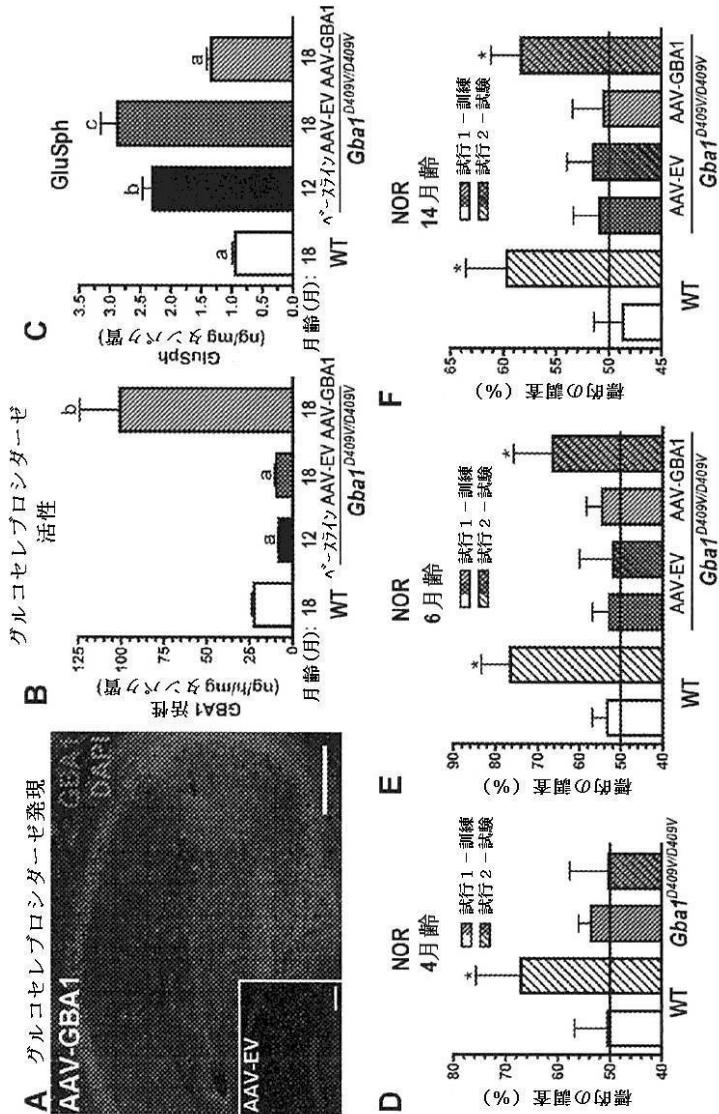
【0212】

本明細書で言及する出版物、特許出願、特許、および他の参考文献は全て、各々が個々に参照によって組み入れられるのと同程度に、その全文が参照によって特に組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含めた本明細書によって規制される。

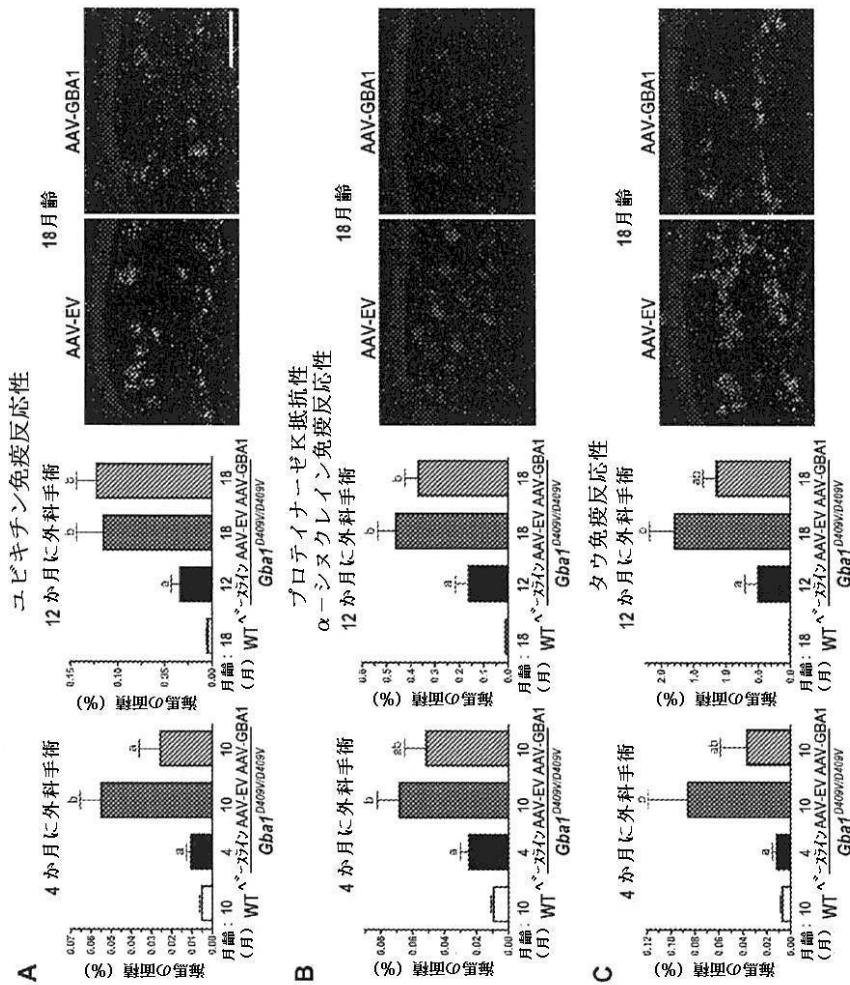
【図1】



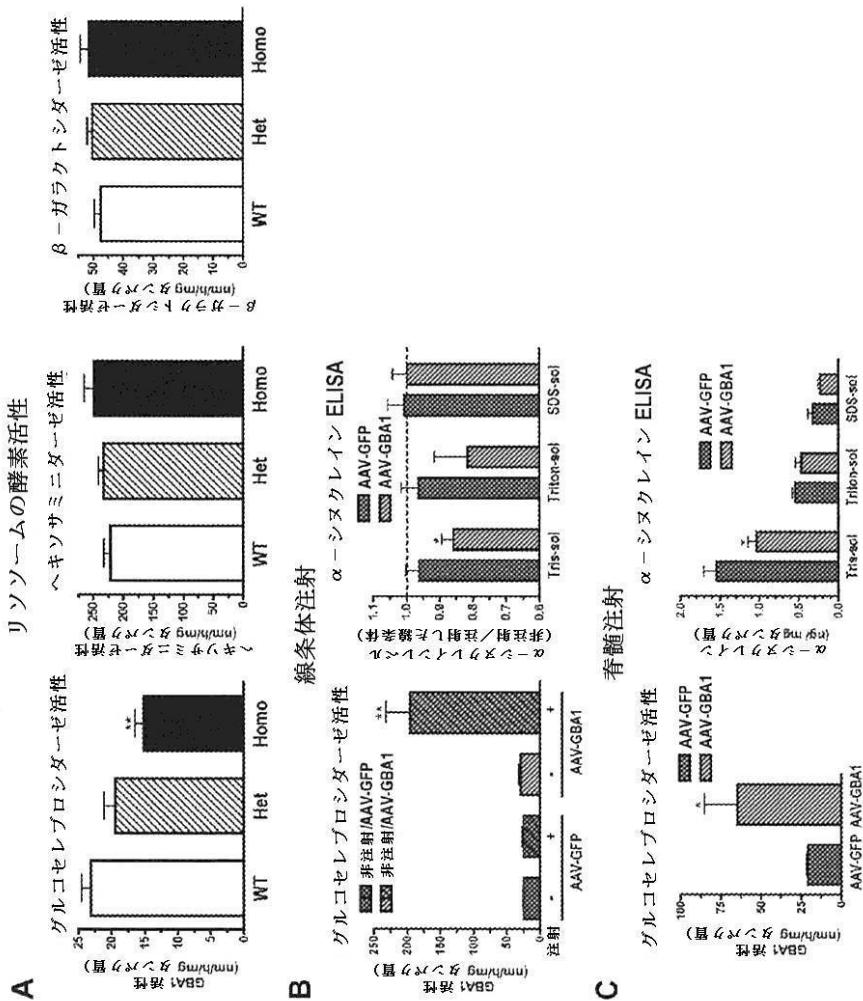
【図2】



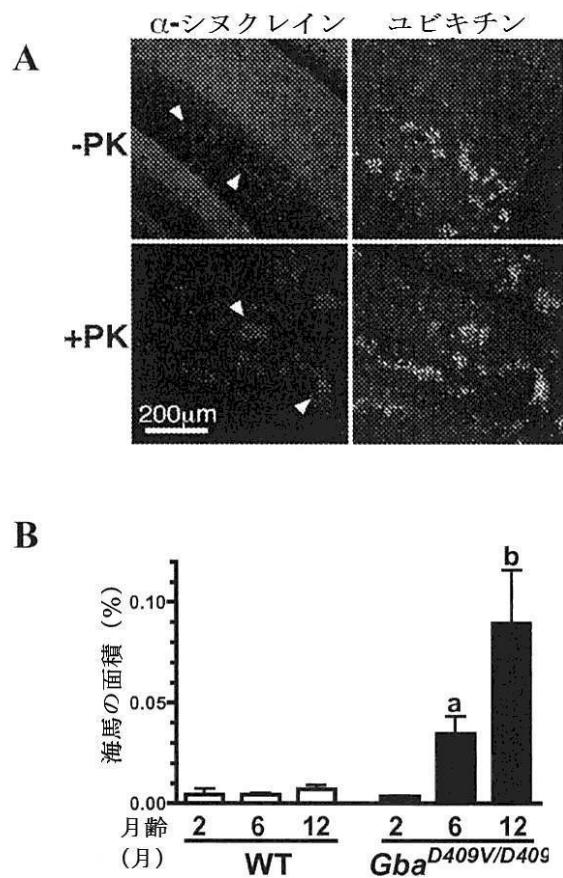
【図3】



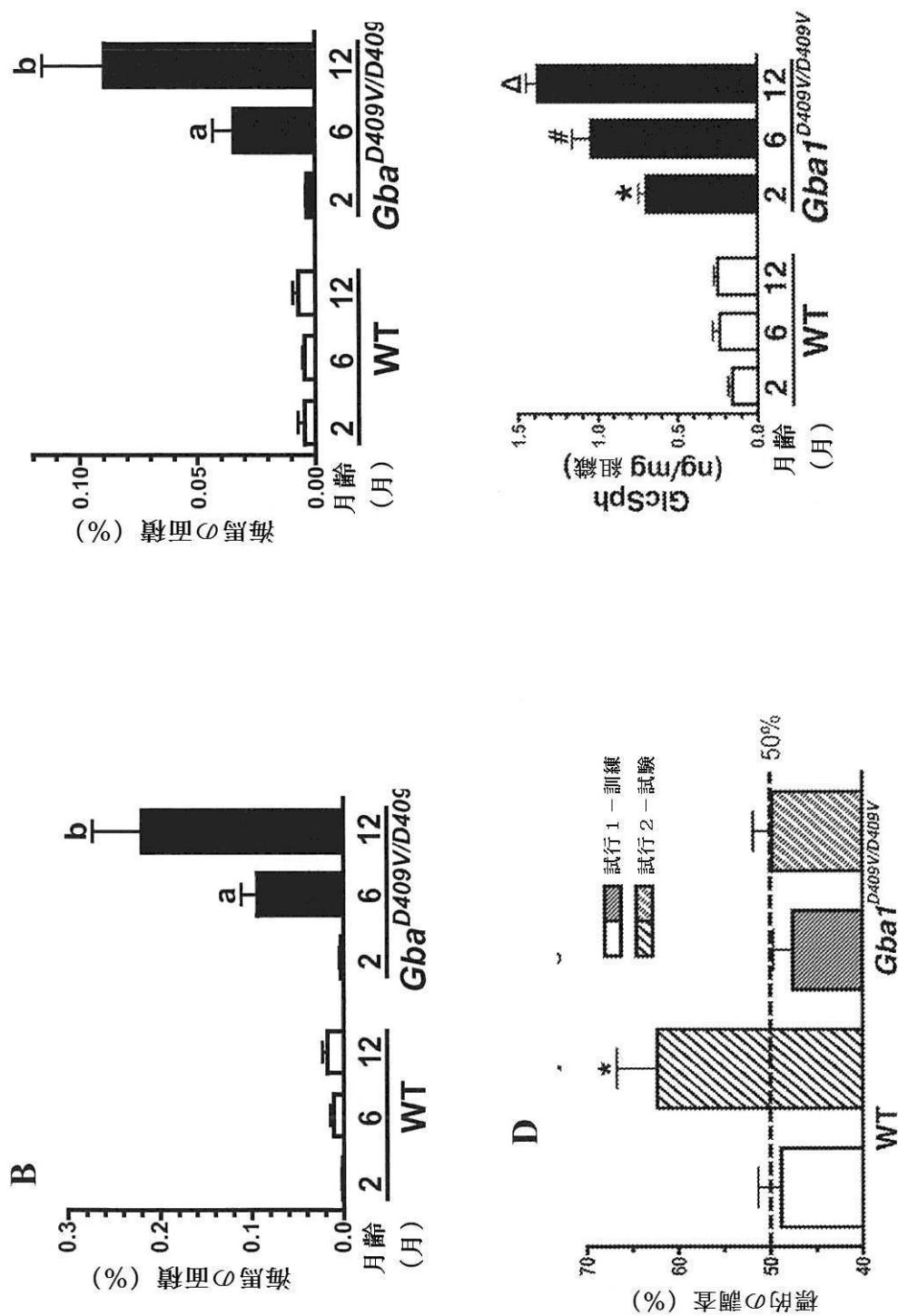
【図4】



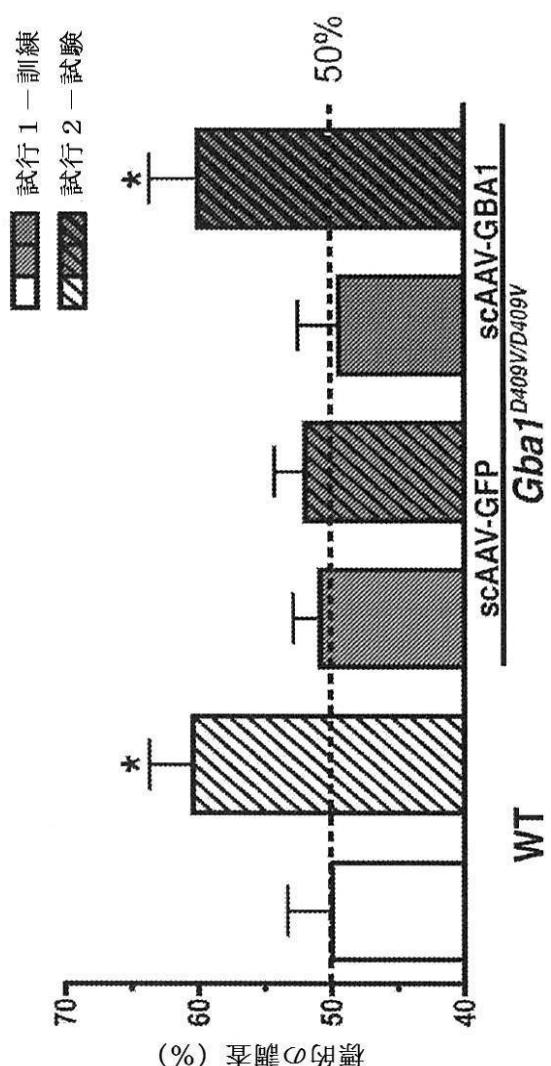
【図 5】



【図 6】



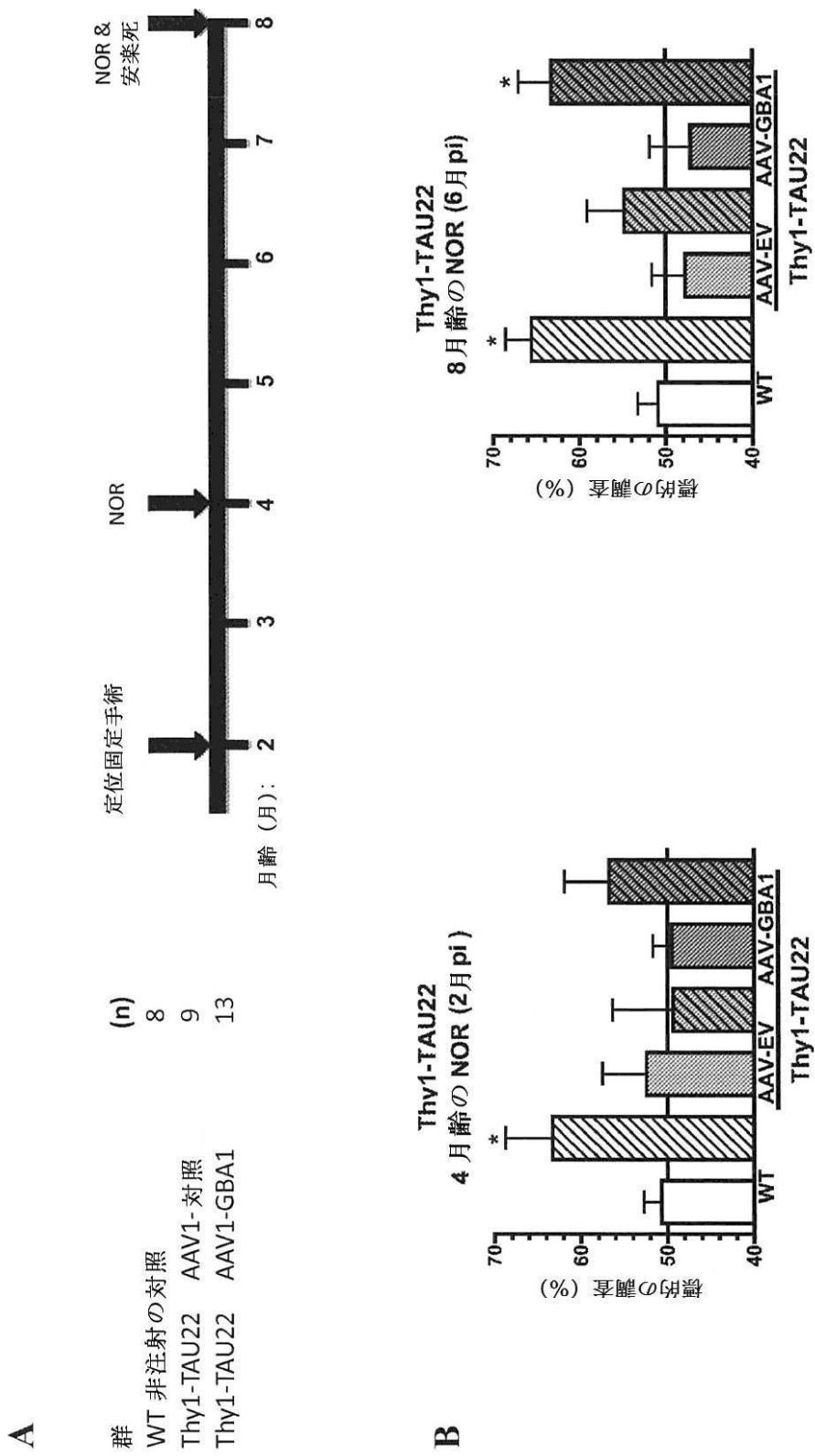
【図7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2016503405000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/068242

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/46 A61P25/28
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/144591 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; SCHLOSSMACHER MICHAEL [CA]; CULLEN VAL) 27 November 2008 (2008-11-27) claims 1-14, examples 4-5, 7-13 -----	1-6,9, 10,16-24
Y	-----	1-57
X	WO 2004/074450 A2 (MONT SINAI SCHOOL OF MEDICINE [US]; FAN JIAN-QIANG [US]) 2 September 2004 (2004-09-02) page 15, second row; page 1, para 2; page 17, lines 7-26; claim 21 -----	1-6,18
Y	-----	1-57
X	WO 2007/150064 A2 (AMICUS THERAPEUTICS INC [US]; WUSTMAN BRANDON [US]) 27 December 2007 (2007-12-27) claims 1-4, 14-16 -----	1-6,24, 28,29

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

18 December 2013

08/01/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ludwig, Gerald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2013/068242

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2008144591 A2	27-11-2008	AU CA CN EP JP JP US US WO	2008254774 A1 2684946 A1 101754682 A 2154969 A2 5291093 B2 2010535153 A 2011038851 A1 2013177549 A1 2008144591 A2	27-11-2008 27-11-2008 23-06-2010 24-02-2010 18-09-2013 18-11-2010 17-02-2011 11-07-2013 27-11-2008
WO 2004074450 A2	02-09-2004	BR CA CN EP JP MX US WO	P10407648 A 2516304 A1 1750834 A 1594514 A2 2006517980 A PA05007821 A 2004219132 A1 2004074450 A2	21-02-2006 02-09-2004 22-03-2006 16-11-2005 03-08-2006 07-04-2006 04-11-2004 02-09-2004
WO 2007150064 A2	27-12-2007	AT AU BR CA DK EP ES JP JP KR PT US US WO	555788 T 2007260812 A1 P10713442 A2 2656643 A1 2040548 T3 2040548 A2 2387845 T3 5303458 B2 2009541489 A 20090021393 A 2040548 E 2008009516 A1 2011052613 A1 2007150064 A2	15-05-2012 27-12-2007 06-03-2012 27-12-2007 13-08-2012 01-04-2009 02-10-2012 02-10-2013 26-11-2009 03-03-2009 02-08-2012 10-01-2008 03-03-2011 27-12-2007

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 C 1 2 N 9/24	

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

(72)発明者 ラミヤ・シハブッディン

アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.ブリッジウォーター.コーポレートドライブ55
.メールコード:55エー-505エー.サノフィ

(72)発明者 セン・チェン

アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.ブリッジウォーター.コーポレートドライブ55
.メールコード:55エー-505エー.サノフィ

Fターム(参考) 4B050 CC10 DD11 LL01

4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 MA66 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZC19

4C085 AA13 AA14 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZA01 ZA02 ZA16

ZC19

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZC19