(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7600124号
(P7600124)

(45)発行日　令和6年12月16日(2024.12.16)

(24)登録日　令和6年12月6日(2024.12.6)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/56 (2006.01)		C12N	15/56	ZNA
C12N 7/01 (2006.01)		C12N	7/01	
C12N 15/864 (2006.01)		C12N	15/864	100Z
C12N 15/86 (2006.01)		C12N	15/86	Z
A61P 25/16 (2006.01)		A61P	25/16	

請求項の数　31　（全66頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-545956(P2021-545956)
(86)(22)出願日　令和2年2月4日(2020.2.4)
(65)公表番号　特表2022-520179(P2022-520179A)
(43)公表日　令和4年3月29日(2022.3.29)
(86)国際出願番号　PCT/GB2020/050251
(87)国際公開番号　WO2020/161483
(87)国際公開日　令和2年8月13日(2020.8.13)
審査請求日　令和5年2月2日(2023.2.2)
(31)優先権主張番号　1901512.2
(32)優先日　平成31年2月4日(2019.2.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　1917910.0
(32)優先日　令和1年12月6日(2019.12.6)
最終頁に続く

(73)特許権者　521345464
フリーライン セラピューティクス リミテッド
イギリス国、エスジー１　２ビーピー、ハートフォードシャー、スティーブニッジ、ガネルズ ウッド ロード、シカモア ハウス
(74)代理人　100080791
弁理士　高島　一
(74)代理人　100136629
弁理士　鎌田 光宜
(74)代理人　100125070
弁理士　土井 京子
(74)代理人　100121212
弁理士　田村 弥栄子
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ポリヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該ＧＢＡヌクレオチド配列がβ－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）タンパク質をコードし、ＧＢＡヌクレオチド配列が：

（ｉ）配列番号１～８のいずれか１のヌクレオチド配列と１００％同一である；又は

（ｉｉ）ＧＣａｓｅ活性を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする配列番号１～８のいずれか１の変異体であって、該変異体は、それが、ＧＣａｓｅタンパク質が配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するようにヌクレオチド置換を含むことを除いて、配列番号１～８にそれぞれ同一であり、さらに、ＧＢＡヌクレオチドによってコードされるＧＣａｓｅは、他の点では同一の参照ポリヌクレオチド中の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、より高いレベルでヒト肝細胞において発現する、ポリヌクレオチド。

【請求項２】

ＧＢＡヌクレオチド配列が：

（ｉ）配列番号１又は

（ｉｉ）ＧＣａｓｅ活性を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする配列番号１の変異体であって、該変異体は、それが、ＧＣａｓｅタンパク質が配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するようにヌクレオチド置換を含むことを除いて、配列番号１と同一であり、さらに、ＧＢＡヌクレオチドによってコード

されるＧＣａｓｅは、他の点では同一の参照ポリヌクレオチド中の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、より高いレベルでヒト肝細胞において発現する、
請求項１のポリヌクレオチド。
【請求項３】
ＧＢＡヌクレオチド配列が、（ｉ）配列番号５又は（ｉｉ）ＧＣａｓｅ活性を有するＧＣａｓｅ活性タンパク質をコードする配列番号５の変異体であって、該変異体は、それが、ＧＣａｓｅタンパク質が配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するようにヌクレオチド置換を含むことを除いて、配列番号５と同一であり、さらに、ＧＢＡヌクレオチドによってコードされるＧＣａｓｅは、他の点では同一の参照ポリヌクレオチド中の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、より高いレベルでヒト肝細胞において発現する、
請求項１のポリヌクレオチド。
【請求項４】
変異体が配列番号１の変異体であり、配列番号１の変異体が：
（ｉ）それが、ＧＣａｓｅタンパク質が配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、１、最大２又は最大３のアミノ酸置換を有するようにヌクレオチド置換を含むことを除いて、配列番号１と同一である；
（ｉｉ）配列番号１の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８又は最大９のヌクレオチド置換を有する；
（ｉｉｉ）配列番号１の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、若しくは最大６のヌクレオチド置換を有する；
（ｉｖ）配列番号１の配列と比較して、最大４のヌクレオチド置換を有し、及び／若しくは配列番号２５の野生型アミノ酸ＧＣａｓｅ配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする；
（ｖ）配列番号１の配列と比較して、最大３のヌクレオチド置換を有し、及び／若しくは配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする；並びに／又は
（ｖｉ）配列番号１の配列と比較して、１のヌクレオチド置換を有し、及び／若しくは配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする
請求項１～３のいずれか１項のポリヌクレオチド。
【請求項５】
変異体が配列番号５の変異体であり、配列番号５の変異体が：
（ｉ）それが、ＧＣａｓｅタンパク質が、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、１、最大２又は最大３のアミノ酸置換を有するようにヌクレオチド置換を含むことを除いて、配列番号５と同一である；
（ｉｉ）配列番号５の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８又は最大９のヌクレオチド置換を有する；
（ｉｉｉ）配列番号５の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、若しくは最大６のヌクレオチド置換を有する；
（ｉｖ）配列番号５の配列と比較して、最大４のヌクレオチド置換を有し、及び／若しくは配列番号２５の野生型アミノ酸ＧＣａｓｅ配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする；
（ｖ）配列番号５の配列と比較して、最大３のヌクレオチド置換を有し、及び／若しくは配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする；並びに／又は
（ｖｉ）配列番号５の配列と比較して、１のヌクレオチド置換を有し、及び／若しくは配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする

請求項１～３のいずれか１項のポリヌクレオチド。
【請求項６】
ＧＢＡヌクレオチド配列が：
（ｉ）配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大３のアミノ酸置換；
（ｉｉ）配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換；及び／又は
（ｉｉｉ）配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸の置換
を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、請求項１～５のいずれか１項のポリヌクレオチド。
【請求項７】
（ａ）ＧＢＡヌクレオチド配列は、ヒト肝細胞における発現のためにコドンが最適化されている；及び／又は
（ｂ）ＧＢＡヌクレオチド配列が、野生型ＧＢＡヌクレオチド配列のと比較してＣｐＧ数が低下しており；場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列が、４０未満、２０未満、１８未満、１０未満、若しくは５未満のＣｐＧを含み、更に場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列が、１００ヌクレオチドあたり５未満、４未満、３未満、若しくは２未満のＣｐＧを含み、更に場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列が、ＣｐＧを含まず、好ましくは野生型ＧＢＡヌクレオチド配列が配列番号９である、
請求項１～６のいずれか１項のポリヌクレオチド。
【請求項８】
ポリヌクレオチドが転写調節エレメントを更に含み、場合により、転写調節エレメントが肝臓特異的プロモーター及び／又はエンハンサーを含む、請求項１～７のいずれか１項のポリヌクレオチド。
【請求項９】
転写調節エレメントがＡ１ＡＴプロモーター又はＡ１ＡＴプロモーターの断片を含み、場合により：
（ａ）Ａ１ＡＴプロモーター若しくはＡ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが少なくとも１００、少なくとも１２０、少なくとも１５０、少なくとも１８０、２５５未満、１００～２５５、１５０～２２５、１５０～３００、若しくは１８０～２５５のヌクレオチドであり、更に場合により、Ａ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが１８０～２５５のヌクレオチドである；
（ｂ）Ａ１ＡＴプロモーター若しくはＡ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、５００未満、２００～５００、２５０～５００、３５０～４５０、若しくは約４１８のヌクレオチドであり、更に場合により、Ａ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが３５０～４５０のヌクレオチドである；及び／又は
（ｃ）ポリヌクレオチドが、配列番号１５若しくは配列番号１２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるプロモーターを含む
請求項８のポリヌクレオチド。
【請求項１０】
エンハンサーがＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片であり、場合により：
（ａ）ＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、１９２未満、８０～１９２、９０～１９２、１００～２５０、若しくは１１７～１９２のヌクレオチドの断片であり、更に場合により、ＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが１１７～１９２のヌクレオチドである；
（ｂ）ＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが少なくとも１５０、少なくとも１９０、少なくとも２３０、４００未満、１５０～４００、１９０～３７０、２３０～３４０、２５０～３４０若しくは約３２１のヌクレオチドの断片であり、更に場合により、ＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが２５０～３４０のヌクレオチドである；

又は
（ｃ）ポリヌクレオチドが、配列番号１６若しくは配列番号１１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるエンハンサーを含む
請求項８又は９のポリヌクレオチド。
【請求項１１】
転写調節エレメントが、配列番号１４と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％又は１００％同一である、請求項８のポリヌクレオチド。
【請求項１２】
前記転写調節エレメントが、配列番号１０と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％又は１００％同一である、請求項８のポリヌクレオチド。
【請求項１３】
ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅが、他の点では同一の参照ポリヌクレオチド中の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、ヒト肝細胞において少なくとも１．１倍、少なくとも１．２倍、少なくとも１．３倍、少なくとも１．４倍、又は少なくとも１．５倍高く発現し、場合により、参照ポリヌクレオチドが配列番号９の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列を含み、更に場合により、参照ポリヌクレオチドが配列番号１３のプロモーターを含む、請求項１～１２のいずれか１項のポリヌクレオチド。
【請求項１４】
請求項１～１３のいずれか１項のポリヌクレオチドを含む組換えゲノムを含むウイルス粒子。
【請求項１５】
前記ウイルス粒子が、ＡＡＶ、アデノウイルス、又はレンチウイルスのウイルス粒子であり、場合によりＡＡＶのウイルス粒子である、請求項１４のウイルス粒子。
【請求項１６】
前記ウイルス粒子が、肝臓指向性又はＣＮＳ指向性のキャプシドを含む、請求項１４又は１５のウイルス粒子。
【請求項１７】
肝臓指向性キャプシドが、配列番号１９、２０又は２４の少なくとも６００、少なくとも６５０、少なくとも７００、６００～７３６、６５０～７３６、又は７００～７３６のアミノ酸の断片と、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は少なくとも９９．５％同一であり、場合により、肝臓指向性キャプシドが、配列番号１９又は２０と少なくとも９９％同一の配列を含む、
請求項１６のウイルス粒子。
【請求項１８】
ＣＮＳ指向性キャプシドが、配列番号２１の少なくとも６００、少なくとも６５０、少なくとも７００、６００～７３６、６５０～７３６又は７００～７３６のアミノ酸の断片と、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は少なくとも９９．５％同一である配列を含み、場合により、ＣＮＳ指向性キャプシドが、配列番号２１と少なくとも９９％同一の配列を含む、請求項１６のウイルス粒子。
【請求項１９】
組換えゲノムが：
ａ）ＡＡＶ２　ＩＴＲ；
ｂ）ポリＡ配列；及び／又は
ｃ）イントロン；
を更に含み、場合により、組換えゲノムが一本鎖である、請求項１４～１８のいずれか１項のウイルス粒子。

【請求項２０】
Ｈｕｈ－７細胞への形質導入時に、ウイルス粒子が、形質導入された細胞におけるＧＣａｓｅ活性が、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む、他の点では同一のウイルス粒子で形質導入された細胞における、ＧＣａｓｅの活性よりも高いように、ＧＣａｓｅを発現する、場合により、Ｈｕｈ－７細胞への形質導入時に、ウイルス粒子が、形質導入された細胞におけるＧＣａｓｅ活性が、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む、他の点では同一のウイルス粒子で形質導入された細胞におけるＧＣａｓｅの活性よりも少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、又は少なくとも２０倍高いようにＧＣａｓｅを発現する、更に場合により、活性が、ＧＣａｓｅに特異的な蛍光測定基質を用いて測定される、請求項１４～１９のいずれか１項のウイルス粒子。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれか１項のポリヌクレオチド又はウイルス粒子と、医薬的に許容される賦形剤とを含む組成物。
【請求項２２】
請求項１～２１のいずれか１項のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を含む、疾患を治療するための医薬であって、前記疾患が、（ａ）ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患、（ｂ）パーキンソン病又は（ｃ）ゴーシェ病であり、場合により：
（ｉ）ゴーシェ病がゴーシェ病Ｉ型、ＩＩ型若しくはＩＩＩ型である；及び／又は
（ｉｉ）患者が、酵素補充療法の一部として、以前に患者が処置されている組換えＧＣａｓｅに対する抗体若しくは阻害剤を有する、
医薬。
【請求項２３】
請求項１～２１のいずれか１項のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の医薬の製造における使用であって、該医薬は、以下を治療するためのものである、使用、
（ａ）ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患、又は
（ｂ）パーキンソン病、又は
（ｃ）ゴーシェ病であり、場合により：
（ｉ）ゴーシェ病がゴーシェ病Ｉ型、ＩＩ型若しくはＩＩＩ型である；及び／又は
（ｉｉ）患者が、酵素補充療法の一部として、以前に患者が処置されている組換えＧＣａｓｅに対する抗体若しくは阻害剤を有する、ゴーシェ病。
【請求項２４】
被験体において安定なＧＣａｓｅ活性を達成するための医薬の製造における、請求項１～２１のいずれか１項のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用。
【請求項２５】
被験体においてＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較して、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供するための医薬の製造における、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用であって、生物学的利用能が投与から２週間の期間に亘って測定される、請求項１～２１のいずれか１項のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用。
【請求項２６】
安定したＧＣａｓｅ活性を達成すること、及び／又はより高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供することにより、被験体における疾患の治療がもたらされる、請求項２４又は２５の、使用。
【請求項２７】
請求項２４～２６のいずれか１項の使用であって、
（ｉ）ＧＣａｓｅ活性及び／若しくは生物学的利用能が、ＧＣａｓｅに特異的な蛍光基質を用いて測定される；
（ｉｉ）ＧＣａｓｅ活性が、被験体の血清若しくは血漿において測定される；
（ｉｉｉ）ＧＣａｓｅ活性が、被験体のマクロファージにおいて測定される；

（ｉｖ）ＧＣａｓｅ活性が、被験者において、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、若しくは少なくとも９μｍｏｌ／時間／ｍｌのレベルで安定である；
（ｖ）ＧＣａｓｅ活性が、被験体において少なくとも３μｍｏｌ／時間／ｍｌのレベルで安定である；
（ｖｉｉ）ＧＣａｓｅ活性が、被験体において少なくとも５μｍｏｌ／時間／ｍｌのレベルで安定である；
（ｖｉｉ）ＧＣａｓｅ活性が、被験体において少なくとも９μｍｏｌ／時間／ｍｌのレベルで安定である；
（ｖｉｉｉ）方法が、有効用量のポリヌクレオチド、ウイルス粒子若しくは組成物を被験体に投与することを含む；
（ｉｘ）安定したＧＣａｓｅ活性が、健常被験体のＧＣａｓｅ活性と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、若しくは少なくとも５０％のＧＣａｓｅ活性である；
（ｘ）安定したＧＣａｓｅ活性が、健常被験体のＧＣａｓｅ活性と比較して、１０％～１００％、２０％～９０％、３０％～７０％、４０％～７０％、若しくは５０％～７０％のＧＣａｓｅ活性である；
（ｘｉ）安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも５週間安定である；
（ｘｉｉ）安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも１０週間安定である；
（ｘｉｉｉ）安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも１５週間安定である；
（ｘｉｖ）安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも２０週間安定である。
（ｘｖ）安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも２５週間安定である；
（ｘｖｉ）安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも３０週間安定である；
（ｘｖｉｉ）安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも３５週間安定である；
（ｘｖｉｉｉ）安定したＧＣａｓｅ活性が、投与後少なくとも４０週間安定である；
（ｘｉｘ）投与後の同一時点で同一アッセイにおいて測定される場合、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験体において測定された活性と比較した場合に、被験体の肝臓、脾臓、及び／若しくは骨髄において、投与後少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、若しくは少なくとも３５週間で、ＧＣａｓｅ活性がより高い；並びに／又は
（ｘｘ）投与後の同一時点で同一アッセイにおいて測定される場合、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験体において測定された生物学的利用能と比較した場合に、被験体の肝臓、脾臓及び／若しくは骨髄において、投与後少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、若しくは少なくとも３５週間の期間に亘って、方法が、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を達成する請求項２４～２６のいずれか１項の、使用。

【請求項２８】
疾患がゴーシェ病であり、場合によりゴーシェ病がゴーシェ病Ｉ型、ＩＩ型又はＩＩＩ型である、請求項２６又は２７の使用。

【請求項２９】
ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している被験体において、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させるための医薬の製造における、請求項１～２１のいずれか１項のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用であって、場合により、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させることにより、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態の治療がもたらされる、使用。

【請求項３０】
（ｉ）ヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルが、請求項１～２１のいずれか１項のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物の投与時のヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルと比較した場合、１

／２以上、１／３以上、１／４以上、１／５以上、１／６以上か、１／２～１／３、１／２～１／４、１／２～１／５、１／２～１／６、若しくは１／３～１／５に、低減される；
（ｉｉ）ヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルの低下が、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験体において達成された低下よりも甚だしい（場合により、ヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルが投与後少なくとも６週間、少なくとも８週間、少なくとも１０週間、又は少なくとも１２週間で測定されるときに）；
（ｉｉｉ）ヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルが被験体のマクロファージにおいて測定される；
（ｉｖ）ヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルが被験体の脾臓において測定される；
（ｖ）ヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルが被験体の肝臓において測定される；
（ｖｉ）ヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルが被験体の血清中で測定される；
（ｖｉｉ）ヘキソシルセラミド及び／若しくはヘキソシルスフィンゴシンレベルが、質量分析によって測定される；及び／又は
（ｖｉｉｉ）疾患がゴーシェ病であり、場合により、ゴーシェ病がゴーシェ病Ｉ型、ＩＩ型若しくはＩＩＩ型である
請求項２９の、使用。
【請求項３１】
患者が、酵素補充療法の一部として、以前に患者が処置されている組換えＧＣａｓｅに対する抗体又は阻害剤を有する、請求項２３～３０のいずれか１項の、使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、β－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）をコードするＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むウイルス粒子、及び該ポリヌクレオチドを利用する治療に関する。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
ゴーシェ病（ＧＤ）は、マクロファージ－単球系の細胞にグルコセレブロシドが沈着することを特徴とする常染色体劣性脂質蓄積症である。ＧＤは、酵素β－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）の活性及び／又は産生を損うハウスキーピングのＧＢＡ遺伝子における変異によって引き起こされる。
【０００３】
ＧＤには、同定されている特定の変異を特徴とする３の主要な型があり、それぞれの型が異なる臨床症状を示し得る。ＧＤ１型は中枢神経系にほとんど又はまったく関与していないが、主に脾臓及び肝臓の肥大、血球数の減少、出血の問題、骨疾患等の内臓症状を特徴としている。過去２０年間、酵素補充療法がＧＤ１型のための標準治療として浮かび上がってきた。その高コスト（～２００，０００米ドル又は～１５０，０００英ポンド／患者／年）に加えて、ＧＤでの酵素補充療法治療では、一般に、生涯にわたって隔週で１以上の注射が必要である。これは、高い割合のＧＤ患者の高レベルの治療負担があらわになることにつながる。
【０００４】
従って、ＧＤの治療のための効果的な治療ベクター、即ち高レベルのＧＣａｓｅ発現を可能にするものを提供する必要がある。
【０００５】

本願は、ＧＣａｓｅをコードするＧＢＡポリヌクレオチドを含むウイルス粒子を投与することを含む、ＧＤを治療するための遺伝子治療アプローチに関する。本明細書に記載のポリヌクレオチド及びウイルス粒子は、野生型ＧＣａｓｅをコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドと比較して、より高いＧＣａｓｅ発現を提供できる。かかる遺伝子治療アプローチにより、頻繁で生涯にわたるＧＣａｓｅの静脈内注射の必要性が回避される。

【発明の概要】

【０００６】

発明の要旨

本出願は、ＧＣａｓｅをコードするＧＢＡヌクレオチド配列への特定の改変が、インビトロ及び／又はインビボで発現したＧＣａｓｅポリペプチドの発現レベル及び活性を改善するのを促進できることを実証する。例えば、本出願は、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列を用いることにより、コードされたＧＣａｓｅタンパク質の発現及び／又は活性を改善できることを実証する。かかる改変された（即ち、非野生型）及び／又はコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列は、コードされたＧＣａｓｅタンパク質の発現及び／又は活性における更なる改善を提供するために更に改変され得る。更なる改変としては、ＣｐＧモチーフの除去及び／又は特定のプロモーター及び／又はエンハンサー配列を含む特定の遺伝子調節エレメントの使用等のＧＢＡヌクレオチド配列における更なる改変の提供が挙げられ得る。ＧＢＡヌクレオチド配列に対するかかる改善は、ＧＤの治療におけるかかるヌクレオチドの有効性を改善できると考えられている。

【０００７】

これらの改変は、例えば肝臓において高度に発現する、ＧＣａｓｅポリペプチド又はその断片をコードするＧＢＡヌクレオチド配列を提供する。実施例中で実証される通り、本発明のポリヌクレオチドは、野生型ＧＢＡよりも高いレベルでＧＣａｓｅ活性を発現する。

【０００８】

従って、本発明の第１の態様においては、ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該ＧＢＡヌクレオチド配列がβ－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）タンパク質又はその断片をコードし、ＧＢＡヌクレオチド配列の少なくとも一部分が野生型ではない、ポリヌクレオチドが提供される。

【０００９】

本発明の第２の態様においては、ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該ＧＢＡヌクレオチド配列がＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードし、配列番号１～８の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１６１１未満、１０００～１４９４、１０００～１６１１、１３００～１４９４、１３００～１６１１、又は約１４９４のヌクレオチドの断片と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である配列を含む、ポリヌクレオチドが提供される。

【００１０】

本発明の第３の態様においては、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えゲノムを含むウイルス粒子が提供される。

【００１１】

本発明の第４の態様においては、本発明のポリヌクレオチド又はウイルス粒子と、医薬的に許容される賦形剤とを含む組成物が提供される。

【００１２】

本発明の第５の態様においては、有効量の本発明のポリヌクレオチド又はウイルス粒子を患者に投与することを含む、治療方法が提供される。

【００１３】

本発明の第６の態様においては、治療方法における使用のための医薬の製造における、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用が提供される。

【００１４】
本発明の第７の態様においては、被験体において安定なＧＣａｓｅ活性を達成するための医薬の製造における、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用が提供される。
【００１５】
本発明の第８の態様においては、被験体において、ＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較して、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供するための医薬の製造における、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用であって、生物学的利用能が投与から２週間の期間に亘って測定される、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物が提供される。
【００１６】
本発明の第９の態様においては、被験体に、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与することにより、該被験体において、安定なＧＣａｓｅ活性を達成する方法が提供される。
【００１７】
本発明の第１０の態様においては、被験体に、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与することにより、該被験体において、ＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較して、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供する方法であって、生物学的利用能が投与から２週間の期間に亘って測定される、方法が提供される。
【００１８】
本発明の第１１の態様においては、被験体においてＧＢＡヌクレオチド配列を発現させ、且つ安定なＧＣａｓｅ活性を達成する方法における使用のための、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物が提供される。
【００１９】
本発明の第１２の態様においては、被験体においてＧＢＡヌクレオチド配列を発現させ、且つＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較して、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供する方法における使用のための、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物であって、生物学的利用能が投与から２週間の期間に亘って測定される、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物が提供される。
【００２０】
本発明の第１３の態様においては、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している被験体において、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させるための医薬の製造における、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用が提供される。
【００２１】
本発明の第１４の態様においては、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している被験体に、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与することにより、該被験体において、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させる方法が提供される。
【００２２】
本発明の第１５の態様においては、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している被験体において、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させる方法における使用のための、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物であって、場合により、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させることにより、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態の治療がもたらされる、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物が提供される。
【図面の簡単な説明】
【００２３】
図の説明
【図１】図１－コンストラクトＦＬＦ－ＰＬ０１、ＦＬＦ－ＰＬ２８、及びＦＬＦ－ＰＬ

６４由来のＧＢＡカセットの模式図。ＬＳＰ－Ｓ及びＬＳＰ－Ｌ：肝臓特異的プロモーター；ＧＢＡｗｔ：野生型ヒトＧＢＡヌクレオチド配列；ＧＢＡｃｏ：コドンが最適化されているヒトＧＢＡヌクレオチド配列（シグナルペプチドをコードするストレッチを除いて、その末端は点線で表される）。

【図２】図２－ＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ２８注射後の用量依存的な肝臓発現及びマウス血流へのヒトＧＣａｓｅの分泌。（Ａ）ＡＡＶ２／８－ＰＬ２８注射の１２週間後にＧＣａｓｅについて染色したマウス肝臓の代表的な画像。ＤＡＢ（３，３’－ジアミノベンジジン）を用いてＧＣａｓｅを可視化し、ヘマトキシリンを対比染色として用いた。（Ｂ）漸増用量のＡＡＶ２／８－ＰＬ２８で処置したマウスの血清における活性アッセイによって測定されたＧＣａｓｅのレベル。各治療群中、ｎ＝５、Ｃ５７ＢＬ／６マウス。エラーバーは平均±ＳＤを示す。

【図３】図３－Ｈｕｈ－７細胞へのトランスフェクションに際して、試験した各ＧＢＡのコドンが最適化されているコンストラクト（ＦＬＦ－ＰＬ１６からＦＬＦ－ＰＬ３６、「１６」から「３６」）について観察された相対的ＧＣａｓｅレベル。各コンストラクトは、３～５回の実験で独立に試験した。ここに示すデータは、野生型ＧＢＡコンストラクトＦＬＦ－ＰＬ０１（「０１」）と比較したＧＣａｓｅ活性を表している。エラーバーは平均±ＳＤを表す。

【図４】図４－ベクターＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ－０１、２１、２８、３０、３６及び３７の注射に際しての、マウス血流に存在するＧＣａｓｅ活性の測定（コンストラクトの説明については実施例５を参照）。（Ａ）試験したＧＢＡコンストラクトの注射後８週間でマウス血清中に見出されるＧＣａｓｅ活性レベル。（Ｂ）コンストラクトＦＬＦ－ＰＬ０１及びＦＬＦ－ＰＬ２８の注射後４、８、１２、及び３６週間でマウス血清において観察されたＧＣａｓｅ活性レベル。エラーバーは平均±ＳＤを表し、１実験群あたりｎ＝５～８の動物。＊ｐ≦０．０５；＊＊ｐ≦０．００１（一元配置分散分析）。

【図５】図５－野生型マウスにＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ２８を注射した後の、脾臓及び骨髄組織におけるＧＣａｓｅの取り込みレベル。ＧＢＡについて染色した脾臓及び骨髄組織の代表的な画像を、ナイーブ又は注射後４週間のＡＡＶ２／８－ＰＬ２８処置マウスで示す。ＤＡＢ（３，３’－ジアミノベンジジン）を用いてＧＢＡを視覚化し、ヘマトキシリンを対比染色として用いた。

【図６】図６－野生型マウスへのＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ２８の注射に際して、脾臓において観察されたヒトＧＣａｓｅと標準的なマウスマクロファージマーカーＦ４／８０の共局在レベル。ＧＢＡ及びＦ４／８０抗体で染色された脾臓組織の代表的な免疫蛍光画像。ＤＡＰＩ（青）を用いて核を可視化した。

【図７】図７－ＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ２８及びＦＬＦ－ＰＬ６４の注射から４週間後にマウス血流おいて見出されるＧＣａｓｅ活性のレベル。ＧＣａｓｅ活性を、２ｘ１０^{12}ｖｇ／ｋｇの用量での注射の４週間後に採取したマウス血清について測定した。エラーバーは平均±ＳＤを表す。各治療群において、Ｎ＝５、Ｃ５７ＢＬ／６マウス。

【図８】図８－治療後５週間のマウスにおいて観察された、ＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ２８及びＦＬＦ－ＰＬ６４注射後の脾臓、骨髄及び肺において観察された取り込みレベル。

【図９－１】図９－配列表。

【図９－２】図９－配列表。

【図９－３】図９－配列表。

【図９－４】図９－配列表。

【図９－５】図９－配列表。

【図９－６】図９－配列表。

【図９－７】図９－配列表。

【図９－８】図９－配列表。

【図１０】図１０－ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４による形質導入後の、ヒト由来細胞株によるＧＣａｓｅ分泌のレベル。細胞を、ベクターＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４を用いて１ｘ１０^{5}ｖｇ／細胞のＭＯＩで形質導入した。（Ａ）活性のあるＧＢＡのレベルは、基質とし

て４ＭＵ－Ｇｌｃを用いて蛍光測定で測定した。（Ｂ）各細胞株についての形質導入レベルを、ｐｏｌｙＡ配列に特異的なプライマーを用いるｑＰＣＲによって取得した。各細胞株についてのブランク値を差し引いて、活性のあるＧＣａｓｅのレベルについての値を取得した。エラーバーは、デュプリケートのウェルの平均±ＳＤを表す。

【図１１】図１１：（Ａ）野生型マウスにおける酵素補充療法（ＶＰＲＩＶ（登録商標）（６０Ｕ／ｋｇ））の薬物動態及び半減期の算出。１フェーズ減衰モデル方程式：Ｙ０は、Ｘ（時間）がゼロのときのＹの値である。プラトーは、時間無限大におけるＹの値である。Ｋは速度定数である。タウは時定数である。半減期はＸ軸の時間単位である。スパンはＹ０とプラトーとの間の差である。（Ｂ）の酵素補充療法（ＶＰＲＩＶ（６０Ｕ／ｋｇ）、黒塗）の単回注射後及びＦＬＦ－ＰＬ６４による遺伝子治療を野生型マウスへ施した後の、ＧＣａｓｅ活性の血清薬物動態プロファイルの比較。

【図１２】図１２：ＶＰＲＩＶ又はＦＬＦ－ＰＬ６４の投与後のマウス肝臓、脾臓及び骨におけるＧＣａｓｅ免疫染色。ＤＡＢ（３，３’－ジアミノベンジジン）を用いてＧＣａｓｅを可視化し、ヘマトキシリンを対比染色として用いた。ＦＬＦ－ＰＬ６４の試料を注射後５週間で取得した一方、ＶＰＲＩＶ処置の試料は、表示した時間に採取した。各画像は、各治療群についてｎ＝５、Ｃ５７ＢＬ／６マウスを表す。すべての写真は同じ倍率である。

【図１３】図１３：ベラグルセラーゼアルファ（ＶＰＲＩＶ（登録商標））（ＥＲＴと表示）又はＡＡＶ－ＧＢＡ（ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４）の投与に際して、ｇｂａ^{9v}／ｎｕｌｌマウス肝臓（ａ）、白血球（ｂ）、脾臓（ｃ）、及び骨髄（ｄ）において観察されたＧＣａｓｅ活性の増大。ＥＲＴの試料を、組織への取り込みのピークに対応する最後の注射の１～２時間後に採取した。ＡＡＶ－ＧＢＡ（ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４）の試料を、注射の１２週間後に、定常状態の取り込みレベルに対応して採取した。ＧＣａｓｅ活性を、野生型の健常マウス（２０週齢）において測定された活性のパーセンテージとして表す。すべてのマウスを、症状顕在化前の８週齢で処置した。ＥＲＴは、６０Ｕ／ｋｇの用量で、２週間ごとに注射により投与。ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４は２ｘ１０^{12}ｖｇ／ｋｇの用量で注射。ｎ＝１０。＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１

【図１４】図１４：ＡＡＶ－ＧＢＡ（ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４）遺伝子治療では、ｇｂａ^{9v}／ｎｕｌｌマウスの肝臓における活性化マクロファージと炎症を低下させる。上パネル：各群からの代表的な画像を表すＨ＆Ｅ染色肝臓切片。貯蔵細胞は円により同定される。左下パネル：ビヒクル対照群と比較した、ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４及びＥＲＴ処置群において計数した貯蔵細胞間の比較を示すグラフ。右下パネル：抗ＣＤ６８抗体で染色後の、ビヒクル対照群と比較したＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４及びＥＲＴ処理群中で計数したＣＤ６８陽性細胞を示すグラフ。ＡＡＶ－ＧＢＡ（ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４）は２ｘ１０^{12}ｖｇ／ｋｇの用量で注射；試料は注射後１２週間で採取、ＥＲＴは用量６０Ｕ／ｋｇで、２週間ごとに注射により投与。ＥＲＴ試料は、最後の注射の１～２時間後に採取した。平均±ＳＥＭ、（ｎ＝１０）、＊＊Ｐ≦０．００５、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００５

【図１５】図１５：ＡＡＶ－ＧＢＡ（ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４）遺伝子治療では、ｇｂａ^{9v}／ｎｕｌｌマウスにおいて、ベラグルセラーゼアルファ（ＶＰＲＩＶ（登録商標）、ＥＲＴと表示）よりも良好な基質クリアランスが示される。ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４及びＥＲＴ治療群における肝臓、脾臓、及び骨髄中のヘキソシルセラミド及びヘキソシルスフィンゴシンレベルのＬＣ／ＭＳ分析。レベルを、ビヒクル対照群において測定されたレベルに正規化した。ＡＡＶ－ＧＢＡ（ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４）は２ｘ１０^{12}ｖｇ／ｋｇの用量で注射；試料は注射後１２週間で採取；ＥＲＴは用量６０Ｕ／ｋｇで、２週間ごとに注射により投与。ＥＲＴ試料は、最後の注射の１～２時間後に採取した。平均±ＳＥＭ、（ｎ＝１０）、＊＊Ｐ≦０．００５、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００５

【発明を実施するための形態】

【００２４】

詳細な説明

一般的な定義

別段の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野における当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【００２５】

一般に、用語「含む」は、含むが、これに限定されないという意味であることが意図される。例えば、語句「ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドがＧＢＡヌクレオチド配列を有するが、ポリヌクレオチドが更なるヌクレオチドを含有し得ることを意味すると解釈されるべきである。

【００２６】

本発明のいくつかの実施形態においては、単語「含む」は、語句「からなる」と置換される。用語「からなる」は、限定的であることが意図される。例えば、語句「ＧＢＡヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドがＧＢＡヌクレオチド配列を有し、更なるヌクレオチドを有さないことを意味すると理解されるべきである。

【００２７】

本明細書で用いられる場合、値の範囲を定義するために２端点を指すときの「～」は、「間及び含む」を意味すると解釈されるべきである。従って、「５～１０」として定義される範囲には、５超１０未満のすべての値並びに、離散値５及び１０自体が含まれる。

【００２８】

用語、「タンパク質」及び「ポリペプチド」は、本明細書では交換可能に用いられ、アミノ酸の、任意の長さのポリマー鎖を指すことが意図される。

【００２９】

本発明の目的のために、２の配列（２のポリヌクレオチド配列又は２のポリペプチド配列等）の同一性のパーセントを特定するために、配列は、最適な比較の目的のためにアラインされる（例、第２の配列との最適なアラインメントのために、ギャップが、第１の配列に導入され得る）。次いで、各位置でヌクレオチド又はアミノ酸の残基が比較される。第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じヌクレオチド又はアミノ酸の残基で占められている場合、その位置でヌクレオチド又はアミノ酸は同一である。２の配列間の同一性のパーセントは、配列によって共有される同一位置の数の関数（即ち、％同一性＝同一の位置の数／参照配列内の位置の総数ｘ１００）である。

【００３０】

典型的には、配列比較は参照配列の長さの全てにわたって行われる。例えば、ユーザーが、ある特定の（「試験」）配列が配列番号１と９５％同一であるか否かを決定したい場合、配列番号１が参照配列になる。例えば、配列が配列番号１（参照配列の例）と少なくとも８０％同一であるか否かを評価するためには、当業者は、アラインメントを配列番号１の長さの全てにわたって行い、試験配列中のどれだけの位置が配列番号１のものと同一であったかを特定する。少なくとも８０％の位置が同一である場合、試験配列は、配列番号１と少なくとも８０％同一である。該配列が配列番号１より短い場合、ギャップ又は抜けている位置は、同一でない位置であると見なされるべきである。

【００３１】

当業者は、２の配列間の相同性又は同一性を決定するために利用可能な異なるコンピュータプログラムを認識している。例えば、配列の比較及び２の配列間の同一性のパーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成し得る。一実施形態においては、２のアミノ酸配列又は核酸配列間の同一性のパーセントは、Ａｃｃｅｌｒｙｓ ＧＣＧ ｓｏｆｔｗａｒｅ ｐａｃｋａｇｅ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｃｃｅｌｒｙｓ．ｃｏｍ／ｐｒｏｄｕｃｔｓ／ｇｃｇ／で入手可能）のＧＡＰプログラムに組み込まれているＮｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ（１９７０）アルゴリズムを用い、Ｂｌｏｓｕｍ ６２マトリックス又はＰＡＭ２５０マトリックスのいずれか、並びにギャップ重み１６、１４、１２、１０、８、６、又は４、長さの重み１、２、３、４、５、又は６を用いて決定される。

【００３２】

本発明の目的のために、用語「断片」は、配列の連続部分を指す。例えば、配列番号５の、５０のヌクレオチドの断片は、配列番号の５の、連続する５０のヌクレオチドを指す。

【００３３】
ポリヌクレオチド
一態様においては、本発明は、ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、ＧＢＡヌクレオチド配列が、β－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）タンパク質又はその断片をコードするコード配列を含み、ＧＢＡヌクレオチド配列の少なくとも一部分が野生型ではない、ポリヌクレオチドを提供する。
【００３４】
ポリヌクレオチドは、以下の特徴のうちの１以上を更に含み得る。ＧＢＡヌクレオチド配列、又は野生型ではない、ＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、コドンが最適化されている場合がある。ポリヌクレオチドは、（更に）コドンが最適化されていない一部分を含み得る。ポリヌクレオチドは、イントロン又はイントロンの断片を含み得る。
【００３５】
用語、「ポリヌクレオチド」は、任意の長さの、ヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、又はそれらの類似体のポリマー形態を指す。例えば、ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ（デオキシリボヌクレオチド）又はＲＮＡ（リボヌクレオチド）を含み得る。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡからなり得る。ポリヌクレオチドはｍＲＮＡであり得る。ポリヌクレオチドはＲＮＡ又はＤＮＡを含み得るので、Ｔ（チミン）ヌクレオチドへのすべての言及はＵ（ウラシル）と置換され得る。
【００３６】
ＧＣａｓｅをコードするＧＢＡヌクレオチド配列
一態様においては、本明細書中に提供されるポリヌクレオチドは、ＧＢＡヌクレオチド配列を含む。ＧＢＡヌクレオチド配列は、典型的には、β－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）タンパク質又はその断片をコードする。
【００３７】
用語「コードする配列」は、コードされるポリペプチドをコードするコドンを含むオープンリーディングフレームを含むヌクレオチド配列を指す。例えば、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードするヌクレオチド配列は、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片のアミノ酸配列をコードするコドンを含む。野生型ＧＣａｓｅタンパク質をコードするＧＢＡヌクレオチド配列の例が、配列番号９中に提供される。
【００３８】
ＧＢＡヌクレオチド配列は、非コードヌクレオチド（例えば、イントロン）によって中断され得るが、ポリペプチドをコードするヌクレオチドのみが、ＧＢＡヌクレオチド配列の一部であると見なされるべきである。例えば、ＧＣａｓｅタンパク質をコードするＧＢＡヌクレオチド配列は、それらのコドンが配列中で連続しているか、又は１以上の非コードヌクレオチドによって分離されているかに関係なく、そのコード配列から発現するＧＣａｓｅタンパク質の一部を形成するアミノ酸をコードする任意のコドンを含む。言い換えれば、非コードヌクレオチドのストレッチによって中断されたコードヌクレオチドのストレッチを含有するＧＢＡポリヌクレオチドは、直接並置された（即ち、非コードストレッチを差し引いた）非連続コーディングストレッチからなる「ＧＢＡヌクレオチド配列」を含むと見なされる。しかしながら、本明細書において、終止コドンは、全長コード配列の一部であると見なされる。
【００３９】
本明細書に記載のＧＣａｓｅをコードするＧＢＡヌクレオチド配列及び／又はＧＣａｓｅコード配列は、シグナルペプチドについてのコドンも含み得る。いくつかのタンパク質、特に異なる組織に輸送されるタンパク質が、シグナルペプチドを伴って発現することは周知である。シグナルペプチドはタンパク質配列のＮ末端（この場合はコード配列の５’末端）にあり得、多くのシグナルペプチドは細胞のプロセシングを受けて切断される。従って、本明細書では、成熟タンパク質又はポリペプチド（成熟ＧＣａｓｅタンパク質又はポリペプチド等）は、シグナルペプチドがプロセシングされて、除去／切断（従って、もはやポリペプチドの一部を形成しない）された後、得られたタンパク質又はポリペプチドで

あると見なされる。

【００４０】

以下の表は、各アミノ酸をコードするコドンを記載する。

【００４１】

【表１】

アミノ酸	コドン	アミノ酸	コドン	アミノ酸	コドン
フェニルアラニン	TTC TTT	プロリン	CCT CCC CCA CCG	アスパラギン	AAT AAC
ロイシン	TTA TTG CTT CTC CTA CTG	スレオニン	ACT ACC ACA ACG	リシン	AAA AAG
イソロイシン	ATT ATC ATA	アラニン	GCT GCC GCA GCG	アスパラギン酸	GAT GAC
メチオニン	ATG	チロシン	TAT TAC	グルタミン酸	GAA GAG
バリン	GTT GTC GTA GTG	ヒスチジン	CAT CAC	システイン	TGT TGC
セリン	TCT TCC TCA TCG AGT AGC	グルタミン	CAA CAG	トリプトファン	TGG
アルギニン	CGT CGC CGA CGG AGA AGG	グリシン	GGT GGC GGA GGG		

【００４２】

対応するＲＮＡコドンは、上記の表におけるＴの代わりにＵを含有する。

【００４３】

本発明の一態様は、ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、ＧＢＡヌクレオチド配列がＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードし、配列番号１～８のいずれか１の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１６１１未満、１０００～１４９４、１０００～１６１１、１３００～１４９４、１３００～１６１１、又は約１４９４のヌクレオチドの断片と少なくとも９５％、少なくと

も９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である配列を含む、ポリヌクレオチドを提供する。場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列の全部又は一部分がコドンが最適化されている。一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号１～８の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９８％同一である配列を含む。一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号１～８の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９９％同一である配列を含む。

【００４４】

一例においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号１と少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である配列を含み得る。一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号１の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９８％同一である配列を含む。一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号１の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９９％同一である配列を含む。ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号５と少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％又は１００％同一である配列を含み得る。ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号１と少なくとも９８％同一である（配列ａ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｔｈａｔ　ｉｓ　ａｔ　ｌｅａｓｔ　９８％　ｉｄｅｎｔｉｃａｌ　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）配列を含み得る。ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号１と少なくとも９９％同一である配列を含み得る。ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号５と少なくとも９８％同一である配列を含み得る。ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号５と少なくとも９９％同一である配列を含み得る。一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号１を含み得る。別の実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号５を含み得る。

【００４５】

ＧＢＡヌクレオチド配列は、ＧＣａｓｅ活性を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする配列番号１の配列又は配列番号１の変異体を含み得る。これらの例においては、配列番号１の変異体は、それが、ＧＣａｓｅタンパク質が配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、又は最大１０のアミノ酸置換を有するように、ヌクレオチド置換を含むことを除いて、配列番号１と同一である。これらの例においては、配列番号１の変異体は、配列番号１の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、最大１０、最大２０、又は最大３０のヌクレオチド置換を有し得る。配列番号１の変異体は、配列番号１の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、又は最大６のヌクレオチド置換を有し得る。一例においては、配列番号１の変異体は、配列番号１の配列と比較して、最大４のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型アミノ酸ＧＣａｓｅ配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする。一例においては、配列番号１の変異体は、配列番号１の配列と比較して、配列番号１の配列と比較して、最大３のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする。一例においては、配列番号１の変異体は、配列番号１の配列と比較して、１のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする。

【００４６】

ＧＢＡヌクレオチド配列は、ＧＣａｓｅ活性を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする配列番号５の配列又は配列番号５の変異体を含み得る。これらの例においては、配列番号５の変異体は、それが、ＧＣａｓｅタンパク質が、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、又は最大１０のアミノ酸置換を有するようにヌクレオチド置換を含むことを除

いて、配列番号５と同一である。これらの例においては、配列番号５の変異体は、配列番号５の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、最大１０、最大２０、又は最大３０のヌクレオチド置換を有し得る。配列番号５の変異体は、配列番号５の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、又は最大６のヌクレオチド置換を有し得る。一例においては、配列番号５の変異体は、配列番号５の配列と比較して、最大４のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型アミノ酸ＧＣａｓｅ配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする。一例においては、配列番号５の変異体は、配列番号５の配列と比較して、最大３のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする。一例においては、配列番号５の変異体は、配列番号５の配列と比較して、１のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする。

【００４７】

ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片

ポリヌクレオチドは、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードするＧＢＡヌクレオチド配列を含む。

【００４８】

β－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）は、細胞膜に豊富に存在する、糖脂質代謝における中間体である化学物質、グルコセレブロシドのベーター－グルコシド結合を加水分解するグルコシルセラミダーゼ活性（ＥＣ３．２．１．４５）を有する酵素である。（ＧＣａｓｅをコードする）ＧＢＡ遺伝子における変異は、ゴーシェ病（ＧＤ）として現れる、多くの重要な臓器に浸潤するマクロファージ中のグルコセレブロシドの蓄積をもたらし得る。典型的な野生型ＧＣａｓｅポリペプチドは、配列番号９によってコードされる。

【００４９】

ＧＣａｓｅ（例、配列番号９によってコードされる配列番号２５のＧＣａｓｅ）は、最初に、シグナルペプチド（配列番号２５のアミノ酸残基１～３９及び配列番号９のコドン１～３９）及び成熟ＧＣａｓｅポリペプチド領域を含む前駆体の「未成熟」形態として発現する。プロセシング後、ＧＣａｓｅの「成熟した」形態はシグナルペプチドを欠いている。用語「成熟ＧＣａｓｅ」又は「成熟ＧＣａｓｅポリペプチド」は、配列番号１～４によってコードされるＧＣａｓｅ等の、シグナルペプチドを含まないＧＣａｓｅポリペプチドを指す。典型的なＧＣａｓｅシグナルペプチドは、配列番号１７のヌクレオチド配列によってコードされ得、そして配列番号１８のポリペプチド配列を有し得る。

【００５０】

ＧＣａｓｅ又はその断片は、変異体ＧＣａｓｅ又はその断片、即ち、配列番号２５と同一の配列を有さないＧＣａｓｅであり得る。一実施形態においては、本発明のポリペプチド及び／若しくはＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅ又はその断片は、配列番号２５と、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である；又は、長さが少なくとも３００、少なくとも３５０、少なくとも４００、５３６以下、４９７以下、３００～５３６、若しくは３００～４９７のアミノ酸の配列番号２５の断片と少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一である。一実施形態においては、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片は、配列番号２５と、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一である；又は、長さが約４９７のアミノ酸の配列番号２５の断片と、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一である。ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片は、配列番号２５の配列を有し得る。好ましくは、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片は、配列番号１８のシグナルペプチドを含まない。好ましくは、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片は機能的である。機能的なＧＣａｓ

ｅタンパク質又は断片は、グルコセレブロシドの加水分解を実行するものである。

【００５１】

ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、又は最大５のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードし得る。かかる例においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードし得る。ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードし得る。ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸置換を有する変異体ＧＣａｓｅタンパク質をコードし得る。

【００５２】

ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅタンパク質又は断片が機能的であるか否かを決定することは当業者の能力の範囲内である。当業者は、単にＧＣａｓｅヌクレオチド配列を発現させ、発現したタンパク質が活性があるか否かを試験することを要するのみである。例えば、当業者は、作動可能なプロモーターに連結されたＧＢＡヌクレオチド配列を含む本発明のウイルス粒子を調製し、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片の発現に好適な条件下で細胞をウイルス粒子で形質導入できる。発現したＧＣａｓｅタンパク質又はその断片の活性（量）は、実施例１に記載の「血清ＧＢＡ活性アッセイ」等の蛍光測定アッセイを用いて解析され得る。

【００５３】

例えば、好適な蛍光発生アッセイは以下の通りである。β－グルコセレブロシダーゼ（酸性β－グルコシダーゼ；ＧＣａｓｅ）活性は、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を基質として蛍光光度法で測定され得る。簡単に言うと、血清試料（０．５μＬ、１：５０に希釈）は、５０ｍＭクエン酸ナトリウム、２５ｍＭタウロコール酸、ｐＨ～５．７５、６ｍＭ　４ＭＵ－Ｇｌｃで、３７℃で３０分間アッセイされ得る。次いで、相対蛍光レベル（ＲＦＵ）は、それぞれ３６５ｎｍ及び４４５ｎｍの励起波長及び発光波長を用いて評価され得る。ＧＣａｓｅは、４－メチルウンベリフェロン（４－ＭＵ）標準曲線に基づいて、ナノモル／時間／ｍＬ血清として表される。

【００５４】

ＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は野生型ではない

ＧＢＡヌクレオチド配列の一部分、例えば、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードするコード配列は、野生型ではない場合がある。野生型ＧＣａｓｅをコードするＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号９で表され、配列番号９とは配列が異なる一部分を含むＧＢＡヌクレオチド配列は、野生型ではない一部分を含む。

【００５５】

一実施形態においては、野生型ではないＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、コドンが最適化されている。コドン最適化は、特定の組織における、及び／又は特定の生物におけるヌクレオチド配列、例えばＧＢＡヌクレオチド配列の発現を改善できる。例えば、ヌクレオチド配列がヒト肝臓における発現のためにコドンが最適化されている場合、ヌクレオチド配列は、ヒトの肝臓において（コドンが、同じアミノ酸に特異的な他のｔＲＮＡ分子種よりも豊富なｔＲＮＡ種に対応するという意味で）好都合であり得るかかるコドンの数を増やすように改変される。当業者は、特に「好ましいコドン」がいくつかの位置にすでに存在している可能性があるため、コドンが最適化されている配列は、すべてのコドンを変更することを必要としない場合があることを理解する。

【００５６】

かかるコドン最適化は、他の要因に曝される場合がある。例えば、ＣｐＧの存在は発現に悪影響を与えると理解され得るため、ユーザーは、そうすることでＣｐＧが配列に導入される位置で優先コドンを用いないことを決定する場合がある。これは依然としてコドン最適化と見なされる。一実施形態においては、Ｃヌクレオチドで終わる優先コドンは、配列内の次のコドンがＧで始まる、コドンが最適化されているコード配列の一部分に含まれ

ない。例えば、コドンＣＴＣはロイシンをコードする。ＣＴＣが優先コドンであるスキームにおいては、それは、コドンＧＴＴ等の、配列内の次のコドンがＧで始まる、ロイシンのコードのために用いられてはならない。（又は、可能であれば、最初の位置におけるＧを回避するよう、次のコドンが選択される）。

【００５７】

ヌクレオチド配列の一部分において用いられる各コドンの頻度を決定することは簡単である。当業者は、その一部分の配列を、コドン使用頻度を調べて結果を検討する、すぐに利用できる１のアルゴリズムに入力することを要するのみである。或いは、ユーザーは単にそれらを計数できる。

【００５８】

一実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、ヒスチジンをコードするコドンの６７％がＣＡＣであり、ヒスチジンをコードするコドンの３３％がＣＡＴであるＧＢＡヌクレオチド配列を含む。

【００５９】

場合により、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、ヒト肝細胞における発現のためにコドンが最適化されている。場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列はヒト肝臓における発現のためにコドンが最適化される。場合により、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、連続する一部分である。

【００６０】

コドンが最適化されている一部分は、ＧＣａｓｅタンパク質の一部又は全体をコードする配列に対応し得る。例えば、コード配列は、成熟ＧＣａｓｅタンパク質の一部ではないシグナルペプチドを含む全長（配列番号９等）であり得、コード配列全体がコドンが最適化され得る。従って、本明細書における「ＧＢＡ配列の一部分がコドンが最適化されている」への言及は、「ＧＢＡ配列の少なくとも一部分がコドンが最適化されている」を意味すると理解されるべきである。場合により、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、長さが少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１６００未満、１５００未満、１０００～１６００、１０００～１５００、１３００～１５００、若しくは約１４９４のヌクレオチドである。場合により、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、成熟ＧＣａｓｅタンパク質をコードする（に対応する）。例えば、ＧＢＡヌクレオチド配列は、前駆体ＧＣａｓｅタンパク質（即ち、シグナルペプチドを含む）をコードし得、そしてコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が成熟ＧＣａｓｅタンパク質に対応する場合、シグナルペプチドはコドンが最適化されていない。

【００６１】

従って、いくつかの実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、コドンが最適化されていない場合があり、例えば、コード配列の一部分は、肝臓における発現のためにコドンが最適化されていない。いくつかの実施形態においては、コドンが最適化されていない一部分は、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも１１０、２００未満、１７０未満、１４０未満、又は約１１７のヌクレオチドである。いくつかの実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列におけるコドンが最適化されていない一部分は、シグナルペプチドをコードする一部分である。

【００６２】

上記の通り、部分的又は全体的にコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を提供することにより、コードされたポリペプチド（即ち、ＧＣａｓｅポリペプチド）が高レベルで発現することを確実にできる。本発明のＧＢＡヌクレオチド配列等のポリヌクレオチド配列からの、又は本発明のウイルス粒子からのＧＣａｓｅの発現は、一般に、プロモーター配列又はポリヌクレオチド配列の上流の、及び／又はそれに作動可能に連結されている領域の存在を必要とすることは、当業者によって理解される。従って、一実施形態においては、本発明は、ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、ＧＢＡヌクレオチド配列が、該ＧＢＡヌクレオチド配列がプロモ

ーター配列に作動可能に連結される場合に、ヒト肝細胞において高レベルで発現するＧＣａｓｅポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態においては、プロモーター配列は、転写調節エレメントの一部であり得る。いくつかの実施形態においては、プロモーター配列は、肝臓特異的プロモーター配列であり得る。一実施形態においては、プロモーター配列は、配列番号１２を有するプロモーターである。別の実施形態においては、プロモーター配列は、配列番号１５を有するプロモーターである。

【００６３】

本発明のポリヌクレオチド又はベクターと、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む参照ポリヌクレオチド又はウイルス粒子等の参照（比較）ポリヌクレオチド又はベクター（参照ポリヌクレオチド又はベクターは、ＧＢＡヌクレオチド配列が異なることを除いて、本発明のポリヌクレオチド又はベクターと同一であり得る）との間で比較を行うことも当業者によって理解される。言い換えれば、比較される異なるＧＢＡヌクレオチド配列は、同一のプロモーター配列に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態においては、試験される異なるＧＢＡヌクレオチド配列は、異なる（特定の）プロモーター配列に作動可能に連結され得る。

【００６４】

従って、一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅポリペプチドは、ヒト肝細胞において、参照野生型ＧＢＡ配列と比較してより高いレベルで発現する。参照野生型ＧＢＡヌクレオチド配列は、配列番号９であり得る。一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドは、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列及び配列番号１３のプロモーターエレメント（ここで、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列及び配列番号１３のプロモーターエレメントは、好ましくは作動可能に連結されている）を含むヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと比較して、ヒト肝細胞において、より高いレベルで発現する。一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドは、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列及び配列番号１０の転写調節エレメント（ここで、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列及び配列番号１０のプロモーターエレメントは、好ましくは作動可能に連結されている）を含むヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと比較して、ヒト肝細胞において、より高いレベルで発現する。かかる実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅは、ヒト肝細胞において、少なくとも１．１倍、少なくとも１．２倍、少なくとも１．３倍、少なくとも１．４倍、又は少なくとも１．５倍高く発現し得る。一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅポリペプチドは、ヒト肝細胞において、配列番号１３のプロモーターに作動可能に連結された配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む、他の点では同一の参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと比較して、より高い又は統計的有意差無しのレベルで発現する（該２のポリヌクレオチドは、同一方法及び同一量で細胞に送達される）。

【００６５】

一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列が被験体、又はマウス等の非ヒト哺乳動物に投与される場合、ＧＣａｓｅは、配列番号１２、１３又は１５のプロモーターエレメントに作動可能に連結された配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む、他の点では同一のヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、（例えば、投与後４又は８又は１２週間で）被験体又は非ヒト動物の血清中に、より高いレベルで存在する（ＧＢＡヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、同一方法及び同一量で投与される。

【００６６】

当業者は、いくつかの細胞を、ＧＢＡヌクレオチド配列を含むウイルス粒子で形質導入し、いくつかの細胞を、参照配列を含む粒子で形質導入することにより、ＧＣａｓｅが、参照配列（例えば、配列番号９等の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列）と比較して、より高いレベルで、ある特定のＧＢＡヌクレオチド配列（例えば、コドンが最適化されているＧ

ＢＡヌクレオチド配列）から発現するか否かを決定し得る。細胞は、ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅタンパク質又はその断片を発現するのに好適な条件下で培養され得、発現したＧＣａｓｅタンパク質のレベルが比較され得る。発現するＧＣａｓｅタンパク質のレベルは、「ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片」という表題の節に記載の蛍光測定アッセイ、又はＧＣａｓｅ特異的抗体を用いるＥＬＩＳＡを用いて評価され得る。好適な細胞としては、Ｈｕｈ－７細胞等の培養ヒト肝細胞が挙げられる。

【００６７】

上記の通り、ＣｐＧ（即ち、ＣＧジヌクレオチド）の存在は、発現効率を低下させ得る。これは、ＣｐＧがメチル化されている場合があり、それらのメチル化が遺伝子サイレンシングを引き起こし、それによって発現が低下する場合があるためである。また、高いＣｐＧ含有量がＴＬＲ応答を引き起こし、抗ＡＡＶ免疫応答のリスクを増大させる可能性がある。この理由のため、コドンが最適化されているコード配列の一部分は、参照野生型ＧＢＡヌクレオチド配列（配列番号９等）の対応する一部分と比較して、低減した数のＣｐＧを含むことが好ましい。一実施形態においては、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分（これは、ＧＢＡヌクレオチド配列のすべてであり得る）は、４０未満、２０未満、１０未満、又は５未満のＣｐＧを含む。一実施形態においては、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分（これは、ＧＢＡヌクレオチド配列のすべてであり得る）は、１００ｎｔあたり５未満、４未満、３未満、又は２未満のＣｐＧを含む。いくつかの実施形態においては、コドンが最適化されているコード配列の一部分は、ＣｐＧを含まない（即ち、含有するＣＧジヌクレオチドが無し（０）である）。

【００６８】

一実施形態においては、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、配列番号１～４の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１０００～１４９４、１３００～１４９４、又は約１４９４のヌクレオチドの断片と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一である。一実施形態においては、コドンが最適化されているコード配列の一部分は、配列番号１～４と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である。一実施形態においては、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、配列番号１の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１０００～１４９４、１３００～１４９４、又は約１４９４のヌクレオチドの断片と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である。一実施形態においては、コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分は、配列番号１の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である。一実施形態においては、コドンが最適化されているコード配列の一部分は、配列番号１と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である。

【００６９】

本発明は、ＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードするＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供し、ＧＢＡ配列は、配列番号１と、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である配列を含む。場合により、配列番号１と少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は少なくとも９９．８％同一である配列はコドンが最適化されている。

【００７０】

コドンが最適化されていないコード配列の一部分

一実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列は、コドンが最適化されていない一部分を含む。コドンが最適化されていない一部分は、連続する一部分であり得る。

【００７１】

従って、当該技術分野において理解されるように、コドンが最適化されていない一部分は、野生型配列と比較して、より多数の好ましいコドンを含むように改変されていない。連続する、コドンが最適化されていないポリヌクレオチド配列は、野生型配列である。

【００７２】

場合により、コドンが最適化されていない一部分は、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも１１０、２００未満、１７０未満、１４０未満、又は約１１７のヌクレオチドである。いくつかの実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列におけるコドンが最適化されていない一部分は、シグナルペプチドの全部又は一部をコードする（に対応する）一部分である。場合により、コドンが最適化されていない一部分は、ＧＣａｓｅシグナルペプチドの全部又は一部をコードする。いくつかの実施形態においては、ＧＢＡヌクレオチド配列においてコドンが最適化されていない一部分は、配列番号１７の配列を有する一部分である。

【００７３】

ポリヌクレオチドは、転写調節エレメントを更に含み得る。

ポリヌクレオチドは、転写調節エレメントを含み得る。

【００７４】

一実施形態においては、転写調節エレメントは、配列番号１０と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である。一実施形態においては、ポリヌクレオチドは、配列番号１０と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である転写調節エレメントを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１０と少なくとも９８％同一の転写調節エレメントを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１０の転写調節エレメントを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１０から成る転写調節エレメントを含む。

【００７５】

別の実施形態においては、転写調節エレメントは、配列番号１４と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である。一実施形態においては、ポリヌクレオチドは、配列番号１４と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である転写調節エレメントを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１４と少なくとも９８％同一の転写調節エレメントを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１４の転写調節エレメントを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１４から成る転写調節エレメントを含む。

【００７６】

すべて肝臓特異的転写調節エレメントであるＨＬＰ２、ＨＬＰ１、ＬＰ１、ＨＣＲ－ｈＡＡＴ、ＡｐｏＥ－ｈＡＡＴ、及びＬＳＰ等の任意の適切な転写調節エレメントが用いられ得る。これらの転写調節エレメントは、以下の参考文献：ＨＬＰ１：ＭｃＩｎｔｏｓｈ Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ２０１３ Ａｐｒ ２５，１２１（１７）：３３３５－４４；ＬＰ１：Ｎａｔｈｗａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２００６ Ａｐｒｉｌ １，１０７（７）：２６５３－２６６１；ＨＣＲ－ｈＡＡＴ：Ｍｉａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０００；１：５２２－５３２；ＡｐｏＥ－ｈＡＡＴ：Ｏｋｕｙａｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，７，６３７－６４５（１９９６）；及びＬＳＰ：Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９９９ Ｍａｒｃｈ ３０，９６（７）：３９０６－３９１０．においてより詳細に記載されている。

【００７７】
転写調節エレメントは、ＨＬＰ２、ＨＬＰ１、ＬＰ１、ＨＣＲ－ｈＡＡＴ、ＡｐｏＥ－ｈＡＡＴ、及びＬＳＰからのプロモーターエレメント及び／又はエンハンサーエレメント等のプロモーター及び／又はエンハンサーを含み得る。これらの各転写調節エレメントは、プロモーター、エンハンサー、及び場合により他のヌクレオチドを含む。
【００７８】
一実施形態においては、転写調節エレメントは、ヒトアポリポプロテインＥ（ＡｐｏＥ）肝臓遺伝子座制御領域（ＨＣＲ；Ｍｉａｏ ｅｔ ａｌ（２０００），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １（６）：５２２）、又はその断片であるエンハンサーを含む。一実施形態においては、転写調節エレメントは、長さが少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、１９２未満、８０～１９２、９０～１９２、１００～２５０、又は１１７～１９２のヌクレオチドの断片である、ＨＣＲエンハンサーの断片を含む。場合により、ＨＣＲエンハンサーの断片は、長さが１００～２５０のヌクレオチドである。別の実施形態においては、ＨＣＲエンハンサーの断片は、長さが少なくとも１５０、少なくとも１９０、少なくとも２３０、４００未満、１５０～４００、１９０～３７０、２３０～３４０、２５０～３４０、又は約３２１のヌクレオチドの断片である。場合により、ＨＣＲエンハンサーの断片は、長さが２５０～３４０のヌクレオチドの断片である。
【００７９】
好適なＨＣＲエンハンサーエレメント断片が、配列番号１１及び１６に記載される。場合により、転写調節エレメントは、長さが少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、１９２未満、８０～１９２、９０～１９２、１００～２５０、又は１１７～１９２のヌクレオチドであるエンハンサーを含み、該エンハンサーは、配列番号１１と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。場合により、転写調節エレメントは、長さが１１７～１９２のヌクレオチドであるエンハンサーを含み、エンハンサーは、配列番号１１と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。場合により、転写調節エレメントは、配列番号１１の少なくとも９０、少なくとも１００、又は少なくとも１１０のヌクレオチドの断片と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるエンハンサーを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１１と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるエンハンサーを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１１と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるエンハンサーを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１１のエンハンサーを含む。場合により、転写調節エレメントは、長さが３２１ヌクレオチド以下、１９２ヌクレオチド以下、又は１１７ヌクレオチド以下であるＨＣＲエンハンサーの断片を含み、且つ配列番号１１を含む。
【００８０】
別の実施形態においては、転写調節エレメントは、長さが少なくとも１５０、少なくとも１９０、少なくとも２３０、４００未満、１５０～４００、１９０～３７０、２３０～３４０、２５０～３４０、又は約３１８ヌクレオチドであり、エンハンサーは、配列番号１６と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。場合により、転写調節エレメントは、長さが２５０～３４０のヌクレオチドのエンハンサーを含み、エンハンサーは、配列番号１６と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一のポリヌクレオチド配列を含む。場合により、転写調節エレ

メントは、配列番号１６の少なくとも２５０ヌクレオチドの断片と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるエンハンサーを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１６と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるエンハンサーを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１６と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるエンハンサーを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１６のエンハンサーを含む。

【００８１】

一実施形態においては、転写調節エレメントは、ヒトアルファ－１抗トリプシンプロモーター（Ａ１ＡＴ；Ｍｉａｏ ｅｔ ａｌ（２０００），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １（６）：５２２）であるプロモーター、又はその断片を含む。場合により、Ａ１ＡＴプロモーターの断片は、長さが少なくとも１００、少なくとも１２０、少なくとも１５０、少なくとも１８０、２５５未満、１００～２５５、１５０～２２５、１５０～３００、又は１８０～２５５のヌクレオチドである（Ｏｐｔｉｏｎａｌｌｙ， ａ ｆｒａｇｍｅｎｔ ｏｆ ａｎ Ａ１ＡＴ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｗｈｉｃｈ ｉｓ ａｔ ｌｅａｓｔ １００，ａｔ ｌｅａｓｔ １２０，ａｔ ｌｅａｓｔ １５０，ａｔ ｌｅａｓｔ １８０，ｌｅｓｓ ｔｈａｎ ２５５，ｂｅｔｗｅｅｎ １００ ａｎｄ ２５５， ｂｅｔｗｅｅｎ １５０ ａｎｄ ２２５，ｂｅｔｗｅｅｎ １５０ ａｎｄ ３００，ｏｒ ｂｅｔｗｅｅｎ １８０ ａｎｄ ２５５ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｉｎ ｌｅｎｇｔｈ．）。場合により、Ａ１ＡＴプロモーターの断片は、長さが１５０～３００のヌクレオチドである。別の実施形態においては、Ａ１ＡＴプロモーターの断片は、長さが少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、５００未満、２００～５００、２５０～５００、又は３５０～４５０のヌクレオチドである。場合により、Ａ１ＡＴプロモーターの断片は、長さが３５０～４５０のヌクレオチドである。

【００８２】

好適なＡ１ＡＴプロモーター断片は、配列番号１２及び１５に記載されている。場合により、転写調節エレメントは、長さが少なくとも１００、少なくとも１２０、少なくとも１５０、少なくとも１８０、２５５未満、１００～２５５、１５０～２２５、１５０～３００、若しくは１８０～２５５のヌクレオチドであるプロモーターを含み、プロモーターは、配列番号１２と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。場合により、転写調節エレメントは、長さが１８０～２５５のヌクレオチドであるプロモーターを含み、プロモーターは、配列番号１２と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。場合により、ポリヌクレオチドは、少なくとも１００、少なくとも１２０、又は少なくとも１５０の配列番号１２の断片と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるプロモーターを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１２と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるプロモーターを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１２と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるプロモーターを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１２のプロモーターを含む。場合により、転写調節エレメントは、長さが４１８ヌクレオチド以下、２５５ヌクレオチド以下、又は１８５ヌクレオチド以下であるＡ１ＡＴプロモーターの断片を含み、且つ

配列番号１２を含む。
【００８３】
別の実施形態において、転写調節エレメントは、長さが少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、５００未満、２００～５００、２５０～５００、３５０～４５０、又は約４１８のヌクレオチドであるプロモーターを含み、プロモーターは、配列番号１５と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。場合により、転写調節エレメントは、長さが３５０～４５０のヌクレオチドであるプロモーターを含み、プロモーターは、配列番号１５と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％が同一であるポリヌクレオチド配列を含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１５の少なくとも３５０ヌクレオチドの断片と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるプロモーターを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１５と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるプロモーターを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１５と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるプロモーターを含む。場合により、ポリヌクレオチドは、配列番号１５のプロモーターを含む。
【００８４】
ポリヌクレオチドが肝臓における発現を目的としている場合、プロモーターは肝臓特異的プロモーターであり得る。場合により、プロモーターはヒト肝臓特異的プロモーターである。
【００８５】
「肝臓特異的プロモーター」は、一般に、他の細胞と比較して、肝細胞においてより高いレベルの発現を提供するプロモーターである。例えば、当業者は、肝細胞（Ｈｕｈ－７細胞等）におけるポリヌクレオチドの発現を、他の組織からの細胞における該ポリヌクレオチドの発現と比較することによって、プロモーターが肝臓特異的プロモーターであるか否かを決定できる。他の組織からの細胞と比較して、肝細胞において発現レベルが高い場合、プロモーターは肝臓特異的プロモーターである。場合により、転写調節エレメント又はプロモーターは、それが、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞と比較して肝細胞においてより高いレベルのタンパク質発現を促進し、転写調節エレメント又はプロモーターが、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞において、転写調節エレメント又はプロモーターが肝細胞においてタンパク質発現を促進するレベルの、４０％未満、３０％未満、２５％未満、１５％未満、１０％未満、又は５％未満のレベルでタンパク質発現を促進する場合、肝臓特異的である。場合により、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞は、腎臓細胞、膵臓細胞、乳房細胞、神経芽細胞腫細胞、肺細胞、及び初期Ｂ細胞のうちの少なくとも１である。場合により、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞は、腎臓細胞、膵臓細胞、乳房細胞、神経芽細胞腫細胞、肺細胞、及び初期Ｂ細胞である。場合により、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＰＡＮＣ１細胞、ＢｘＰＣ－３細胞、ＭＣＦ７細胞、１６４３細胞、ＭＲＣ－９細胞、及び６９７細胞のうちの少なくとも１である。場合により、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＰＡＮＣ１細胞、ＢｘＰＣ－３細胞、ＭＣＦ７細胞、１６４３細胞、ＭＲＣ－９細胞、及び６９７細胞である。
【００８６】
一実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、肝臓で特異的に発現するＧＣａｓｅを提供し得る。かかる例においては、ポリヌクレオチドは、他の少なくとも１の組織の種類又は器官中よりも、肝細胞において実質的により多くのＧＣａｓｅ発現を促進し得

る。一例においては、肝臓において特異的に発現するＧＣａｓｅを提供する本発明のポリヌクレオチドは、肝臓特異的プロモーターを含む。

【００８７】

場合により、本発明のポリヌクレオチドは、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞と比較して、ＧＣａｓｅが、同一アッセイで測定される場合、肝細胞におけるＧＣａｓｅ発現レベルの４０％未満、３０％未満、２５％未満、１５％未満、１０％未満、又は５％未満のレベルで、他の１の器官又は組織において発現するように、肝細胞においてより高いレベルで発現する、ＧＣａｓｅを提供し得る。

【００８８】

場合により、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞は、腎臓細胞、膵臓細胞、乳房細胞、神経芽細胞腫細胞、肺細胞、及び初期Ｂ細胞のうちの少なくとも１である。場合により、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞は、腎臓細胞、膵臓細胞、乳房細胞、神経芽細胞腫細胞、肺細胞、及び初期Ｂ細胞である。場合により、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＰＡＮＣ１細胞、ＢｘＰＣ－３細胞、ＭＣＦ７細胞、１６４３細胞、ＭＲＣ－９細胞、及び６９７細胞のうちの少なくとも１である。場合により、他の少なくとも１の器官又は組織からの細胞は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＰＡＮＣ１細胞、ＢｘＰＣ－３細胞、ＭＣＦ７細胞、１６４３細胞、ＭＲＣ－９細胞、及び６９７細胞である。

【００８９】

ポリヌクレオチドを含むウイルス粒子

本発明は更に、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えゲノムを含むウイルス粒子を提供する。本発明の目的のために、用語「ウイルス粒子」は、ビリオンの全部又は一部を指す。例えば、ウイルス粒子は組換えゲノムを含み、更にキャプシドを含み得る。ウイルス粒子は、遺伝子治療ベクターであり得る。本明細書中、用語「ウイルス粒子」及び「ベクター」は交換可能に用いられる。本出願の目的のために、「遺伝子治療」ベクターは、遺伝子治療で用いられ得るウイルス粒子、即ち、投与後の宿主細胞において、ＧＢＡヌクレオチド配列等の導入遺伝子を発現するために必要なすべての機能的要素を含むウイルス粒子である。

【００９０】

好適なウイルス粒子としては、パルボウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、又は単純ヘルペスウイルスが挙げられる。パルボウイルスは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）であり得る。ウイルス粒子は、好ましくは、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター又はレンチウイルスベクターである。より好ましくは、ウイルス粒子はＡＡＶウイルス粒子である。用語、ＡＡＶ及びｒＡＡＶは、文脈で明らかにそうでないと示唆されない限り、本明細書中、交換可能に用いられる。

【００９１】

すべての既知のＡＡＶ血清型のゲノム構成は非常に似ている。ＡＡＶのゲノムは、長さが約５，０００ヌクレオチド未満の線状の一本鎖ＤＮＡ分子である。逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は、非構造的な複製（Ｒｅｐ）タンパク質及び構造（ＶＰ）タンパク質についての特有のコードヌクレオチド配列に隣接する。ＶＰタンパク質（ＶＰ１、－２、及び－３）がキャプシドを形成する。末端の約１４５ｎｔ（ＩＴＲ）は自己相補的であり、Ｔ字型ヘアピンを形成するエネルギー的に安定な分子内二重鎖が形成され得るように構成されている。これらのヘアピン構造は、ウイルスＤＮＡ複製の起点として機能し、細胞のＤＮＡポリメラーゼ複合体のためのプライマーとして機能する。哺乳動物細胞における野生型（ｗｔ）ＡＡＶ感染に続いて、Ｒｅｐ遺伝子（即ち、Ｒｅｐ７８及びＲｅｐ５２タンパク質をコードする）は、それぞれＰ５プロモーター及びＰ１９プロモーターから発現し、両方のＲｅｐタンパク質はウイルスゲノムの複製における機能を有する。Ｒｅｐ　ＯＲＦにおけるスプライシングイベントにより、４のＲｅｐタンパク質（即ち、Ｒｅｐ７８、Ｒｅｐ６８、Ｒｅｐ５２、及びＲｅｐ４０）の発現がもたらされる。しかし、哺乳動物細胞においては、Ｒｅｐ７８及びＲｅｐ５２タンパク質をコードする、スプライシングされてい

ないｍＲＮＡが、ＡＡＶベクターの産生に十分であることが示されている。また、昆虫細胞においては、Ｒｅｐ７８及びＲｅｐ５２タンパク質が、ＡＡＶベクターの産生に十分である。

【００９２】

本発明の組換えウイルスゲノムは、ＩＴＲを含み得る。本発明のＡＡＶベクターは１のＩＴＲのみで機能することが可能である。従って、ウイルスゲノムは少なくとも１のＩＴＲを含むが、より典型的には２のＩＴＲを含む（一般的に、ウイルスゲノムのいずれの端にも１、つまり５’末端に１、及び３’末端に１）。本発明のポリヌクレオチドと１以上のＩＴＲとの間に介在配列があり得る。ポリヌクレオチドは、正規の２のＩＴＲの間に位置するか、又は２のＤ領域で改変されたＩＴＲのいずれかの側に位置して、ウイルス粒子に組み込まれ得る。

【００９３】

本発明において、ＡＡＶベクターの産生のために使用され得るＡＡＶ配列は、任意のＡＡＶ血清型のゲノムに由来し得る。一般的に、ＡＡＶ血清型は、アミノ酸及び核酸レベルで有意な相同性のゲノム配列を有し、同一の一式の遺伝的機能を提供し、実質的に物理的及び機能的に同等のビリオンを生成し、実質的に同一のメカニズムによって複製及び集合する。さまざまなＡＡＶ血清型のゲノム配列及びゲノム類似性の概要については、例えば、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｕ８９７９０；ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｊ０１９０１；ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ０４３３０３；ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ０８５７１６；Ｃｈｉｏｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ，１９９７；Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ，１９８３；Ｃｈｉｏｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ，１９９９；Ｒｕｔｌｅｄｇｅ ｅｔ ａｌ，１９９８；及びＷｕ ｅｔ ａｌ，２０００を参照。本発明においては、ＡＡＶ血清型１、２、３、３Ｂ、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２が用いられ得る。ＡＡＶ血清型由来の配列は、遺伝子治療ベクターの作製に用いられる場合に変異又は操作され得る。

【００９４】

場合により、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４及び／又はＡＡＶ６に由来するＩＴＲ配列を含む。好ましくは、ＩＴＲ配列はＡＡＶ２　ＩＴＲ配列である。本明細書において、用語、ＡＡＶｘ／ｙは、ＡＡＶｘからの少なくともＩＴＲ、（ここで、ｘは、ＡＡＶ血清型番号）及びＡＡＶｙからの少なくともキャプシド（ここで、ｙは、同一か又は異なる血清型の番号）等のゲノム成分を含むウイルス粒子を指す。例えば、ＡＡＶ２／８ベクターは、ＩＴＲを含む、ＡＡＶ２株に由来するウイルスゲノムの一部分、及びＡＡＶ８株に由来するキャプシドを含み得る。

【００９５】

一実施形態においては、ウイルス粒子は、キャプシドを含むＡＡＶウイルス粒子である。ＡＡＶキャプシドは、一般的には、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３の３タンパク質から形成される。ＶＰ１のアミノ酸配列はＶＰ２の配列を含む。ＶＰ２の一部を形成しないＶＰ１の一部分は、ＶＰ１ｕｎｉｑｕｅ又はＶＰ１Ｕと称される。ＶＰ２のアミノ酸配列はＶＰ３の配列を含む。ＶＰ３の一部を形成しないＶＰ２の一部分は、ＶＰ２ｕｎｉｑｕｅ又はＶＰ２Ｕと称される。場合により、ウイルス粒子は、肝臓指向性又はＣＮＳ指向性のキャプシドを含む。ウイルス粒子（キャプシド）が特定の組織に指向性であるか否かは、例えば、ルシフェラーゼ等のマーカー遺伝子を発現するかかる粒子を投与し、複数の時点でインビボで画像化することによって評価され得る（例えば、Ｚｉｎｃａｒｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ（２００８）．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，１６：１０７３－１０８０に記載の通りに）。特に他の組織での発現が少ないのとは対照的に、肝臓又はＣＮＳ組織でそれぞれ強いマーカー発現をドライブする粒子は、肝臓又はＣＮＳ指向性であると見なされる。

【００９６】

いくつかの実施形態においては、肝臓指向性キャプシドは、ＡＡＶ３又はＡＡＶ３Ｂ由来のキャプシドであり得る。場合により、肝臓指向性キャプシドは、配列番号１９、２０

又は２４の少なくとも６００、少なくとも６５０、少なくとも７００、６００～７３６、６５０～７３６、又は７００～７３６のアミノ酸の断片と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は少なくとも９９．５％同一の配列を含む。場合により、肝臓指向性キャプシドは、配列番号１９と、少なくとも９９％同一の配列を含む。場合により、肝臓指向性キャプシドは、配列番号２０と、少なくとも９９％同一の配列を含む。場合により、肝臓指向性キャプシドは、配列番号２４と、少なくとも９９％同一の配列を含む。場合により、ＣＮＳ指向性キャプシドは、配列番号２１の少なくとも６００、少なくとも６５０、少なくとも７００、６００～７３６、６５０～７３６、又は７００～７３６のアミノ酸の断片と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は少なくとも９９．５％同一の配列を含む。場合により、ＣＮＳ指向性キャプシドは、配列番号２１と少なくとも９９％同一の配列を含む。本発明のウイルス粒子は、ウイルスＩＴＲ及びウイルスキャプシドが、異なるＡＡＶ血清型等の異なるパルボウイルスに由来する「ハイブリッド」粒子であり得る。好ましくは、ウイルスＩＴＲ及びキャプシドは、ＡＡＶの異なる血清型に由来し、その場合、かかるウイルス粒子は、トランスキャプシド化又は偽型化として知られる。同様に、パルボウイルスは、「キメラ」キャプシド（例、異なるパルボウイルス、好ましくは異なるＡＡＶ血清型由来の配列を含有する）又は「標的化」キャプシド（例、指向性）を有し得る。

【００９７】

いくつかの実施形態においては、組換えＡＡＶゲノムは、機能的末端分離部位（ＴＲＳ）を含む完全なＩＴＲを含む。かかるＡＡＶゲノムは、１又は２の分離可能なＩＴＲ、つまり、部位特異的なニッキングが発生して、ＤＮＡポリメラーゼがＩＴＲを巻き戻し、複製するための基質として機能できる遊離の３’ヒドロキシル基を作製できる機能的ＴＲＳを含有するＩＴＲを含有し得る。好ましくは、組換えゲノムは一本鎖である（即ち、それは一本鎖形態でウイルス粒子にパッケージングされる）。場合により、組換えゲノムは、自己相補的構成でパッケージングされず、即ち、ゲノムは、ウイルス粒子内でアニーリングする実質的な自己相補的部分を有する、単一の、共有結合的に連結されたポリヌクレオチド鎖を含まない。代替的に、組換えゲノムは「単量体二重鎖」形態でパッケージングされ得る。「単量体二重鎖」は、ＷＯ２０１１／１２２９５０に記載されている。ゲノムは、ウイルス粒子内でアニーリングする２の実質的に相補的であるが、非共有結合的に連結されたポリヌクレオチドとしてパッケージングされ得る。

【００９８】

ウイルス粒子は、ポリＡ配列を更に含み得る。ポリＡ配列は、機能的なＧＣａｓｅタンパク質をコードするヌクレオチド配列の下流に位置し得る。ポリＡ配列は、ウシ成長ホルモンポリＡ配列（ｂＧＨｐＡ－配列番号２３）であり得る。ポリＡ配列は、長さが２５０～２７０のヌクレオチドであり得る。

【００９９】

ウイルス粒子は、ウイルスイントロン配列等のイントロン配列、場合によりＳＶ４０イントロン配列（配列番号２２）を更に含み得る。

【０１００】

一実施形態においては、ウイルス粒子は、プロモーターエレメントを含むポリヌクレオチド配列、ＳＶ４０イントロン配列等のイントロン配列、ＧＢＡヌクレオチド配列、及びｂＧＨｐＡ配列等のポリＡ配列を含む。かかる実施形態においては、ＳＶ４０イントロン配列等のイントロン配列は、プロモーターエレメントとＧＢＡヌクレオチド配列との間に位置し得る。かかる実施形態においては、ｂＧＨｐＡ配列等のポリＡ配列は、ＧＢＡヌクレオチド配列の下流に位置し得る。

【０１０１】

本発明のウイルス粒子は、場合により、宿主細胞においてＧＣａｓｅを高度に発現する。例えば、Ｈｕｈ－７細胞における形質導入において、本発明のウイルス粒子は、Ｈｕｈ－７細胞の同等の集団に同等の量で形質導入された、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含み、他の点では同一のウイルス粒子と比較して、より高いレベルでＧＣａｓｅタン

パク質又はその断片を発現する。場合により、本発明のウイルス粒子は、Ｈｕｈ－７細胞の集団への形質導入後、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列及び配列番号１０の転写調節エレメント又は配列番号１２のプロモーターを含むウイルス粒子よりも高いレベルでＧＣａｓｅタンパク質を発現する。場合により、本発明のウイルス粒子は、Ｈｕｈ－７細胞の集団への形質導入後、Ｈｕｈ－７細胞の同等の集団に同等の量で形質導入された、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列及び配列番号１０の転写調節エレメント又は配列番号１２のプロモーター配列を含む同等のウイルス粒子よりも、高いレベルでＧＣａｓｅタンパク質を発現する。場合により、ウイルス粒子は、Ｈｕｈ－７細胞の集団への形質導入後、Ｈｕｈ－７細胞の同等の集団に同等の量で形質導入された、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列及び配列番号１３のプロモーターエレメントを含むウイルス粒子と同等のレベル（即ち、統計的有意差なしのレベル）でＧＣａｓｅタンパク質を発現する。かかる実施形態においては、用語「同等のウイルス粒子」は、該同等のウイルス粒子が異なるＧＢＡヌクレオチド配列及び異なる転写調節エレメントを含むことを除いて、本発明のＡＡＶウイルス粒子と同一のウイルス粒子を指す。場合により、同等のウイルス粒子は、本発明のＡＡＶウイルス粒子と同一の転写調節エレメントを含む。場合により、活性は、上記の蛍光測定アッセイ等の発色アッセイを用いて評価される。

【０１０２】

一実施形態においては、ポリヌクレオチド配列を含むウイルス粒子であって、該ポリヌクレオチド配列が：

ａ）配列番号５と、少なくとも９８％の配列同一性を有するＧＢＡヌクレオチド配列であって

ｂ）配列番号１４と、少なくとも９８％の配列同一性を有する転写調節配列；

に作動可能に連結されている配列：

を含み、ウイルス粒子が、配列番号２０と、少なくとも９８％の同一性を有するキャプシドを更に含む、

ウイルス粒子が提供される。

【０１０３】

一実施形態においては、ポリヌクレオチド配列を含むウイルス粒子であって、該ポリヌクレオチド配列が：

ａ）配列番号５と、少なくとも９８％の配列同一性を有するＧＢＡヌクレオチド配列であって

ｂ）配列番号１０と、少なくとも９８％の配列同一性を有する転写調節配列；

に作動可能に連結されている配列：

を含み、ウイルス粒子が、配列番号２０と、少なくとも９８％の同一性を有するキャプシドを更に含む。

ウイルス粒子が提供される。

【０１０４】

組成物、方法及び使用

本発明の更なる態様において、本発明のポリヌクレオチド又はベクター／ウイルス粒子及び医薬的に許容される賦形剤を含む組成物が提供される。

【０１０５】

医薬的に許容される賦形剤は、担体、希釈剤及び／又は他の医薬品（ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　ａｇｅｎｔ）、医薬品（ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　ａｇｅｎｔ）又は補助剤等を含み得る。場合により、医薬的に許容される賦形剤は、生理食塩水を含む。場合により、医薬的に許容される賦形剤は、ヒト血清アルブミンを含む。

【０１０６】

本発明は更に、被験体においてＧＢＡヌクレオチド配列を発現させ、且つ安定なＧＣａｓｅ活性を達成する、及び／又はＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較して被験体においてより高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供する、方法であって、生物学的利用能が、投与から２週間の期間に亘って測定され、該方法が、本発明のポリヌクレ

オチド、ウイルス粒子又は組成物の被験体への投与を含む、方法を提供する。
【０１０７】
本発明は更に、治療方法における使用のための本発明のポリヌクレオチド、ベクター／ウイルス粒子又は組成物を提供する。場合により、治療方法は、有効量の本発明のポリヌクレオチド又はベクター／ウイルス粒子を患者に投与することを含む。
【０１０８】
本発明は更に、有効量の本発明のポリヌクレオチド又はベクター／ウイルス粒子を患者に投与することを含む治療方法を提供する。
【０１０９】
本発明は更に、治療方法における使用のための医薬の製造における、本発明のポリヌクレオチド、ベクター／ウイルス粒子又は組成物の使用を提供する。場合により、治療方法は、有効量の本発明のポリヌクレオチド又はベクター／ウイルス粒子を患者に投与することを含む。場合により、治療方法は遺伝子治療である。「遺伝子治療」は、それが投与される宿主において導入遺伝子（ＧＢＡヌクレオチド配列等）を発現できる本発明のベクター／ウイルス粒子を投与することを含む。
【０１１０】
場合により、治療方法は、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患を治療する方法である。上記の通り、ＧＣａｓｅ欠損は、多くの重要な臓器に浸潤し、シヌクレオパチー（ｓｙｎｕｃｌｅｏｐａｔｈｙ）（ＷＯ０８／１４４５９１中に記載）又はパーキンソン病等のさまざまな疾患を引き起こし得る、マクロファージ中のグルコセレブロシドの蓄積をもたらす。場合により、治療方法は、パーキンソン病又はシヌクレオパチーを治療する方法である。
【０１１１】
場合により、治療方法は、ゴーシェ病（ＧＤ）、例えば、ＧＤ　Ⅰ型、ⅠⅠ型又はⅠⅠⅠ型等のリソソーム蓄積障害を治療する方法である。好ましくは、リソソーム蓄積障害は、打撲傷、倦怠感、貧血、血小板数の低下、及び肝臓及び脾臓の肥大を特徴とする。場合により、治療方法は、ＧＤ、例えば、ＧＤ　Ⅰ型を治療する方法である。いくつかの実施形態においては、患者は、ＧＤ、例えば、ＧＤ　Ⅰ型に罹患している患者である。場合により、患者は、患者が以前に酵素補充療法の一部として処置されている組換えＧＣａｓｅに対する抗体又は阻害剤（例えば、イミグルセラーゼ、ベラグルセラーゼアルファ又はタリグルセラーゼアルファ）を有する。場合により、ポリヌクレオチド及び／又はベクター／ウイルス粒子は静脈内投与される。場合により、ポリヌクレオチド及び／又はベクター／ウイルス粒子は、患者への一度だけの投与（即ち、単回投与）用である。
【０１１２】
上記の方法でＧＤを「治療」する場合、これは、ＧＤ　Ⅰ型の１以上の症状が改善されることを意味する。ＧＤ　Ⅰ型の症状が完全に治療され、それがもはや患者に存在しないことを意味しないが、一部の方法ではこれが当てはまる場合がある。従って、すべての場合において、用語「治療」は用語「改善」に置き換えられ得る。治療方法は、治療前よりも重症度が低いＧＤ　Ⅰ型の１以上の症状をもたらす場合がある。場合により、治療方法は、投与前の状況と比較して、患者の血液中の循環ＧＣａｓｅの量／濃度、並びに／又は患者のある特定の量の血液及び／若しくはマクロファージ内で検出可能なＧＣａｓｅ活性の全体的なレベルの増大をもたらす。一実施形態においては、治療方法は、投与前の状況と比較して、ヘモグロビン濃度の増大；血小板数の増大；脾臓サイズの減少；肝臓サイズの減少のうちの１以上をもたらす。
【０１１３】
更に、本発明の方法は、ゴーシェ病等の疾患を「予防」し得る。ゴーシェ病は一般に様々な組織におけるグルコセレブロシダーゼの蓄積と関連しており、本発明の方法が若い被験体（ティーンエイジャー、若年成人、子供又は乳児等）に実施される場合、ゴーシェ病の罹患を防ぐことが可能であるはずである。従って、すべての場合において、用語「治療」は、用語「予防」に置き換えられ得る。
【０１１４】

「治療有効量」は、投与量で、及び必要な期間の間に（機能的ＧＣａｓｅ産生を、ＧＤ、例えば、ＧＤ　Ｉ型の症状を改善するのに十分なレベルでもたらすために）被験体における機能的ＧＣａｓｅのレベルを上げる等の所望の治療結果を達成するために有効な量を指す。

【０１１５】

場合により、ベクター／ウイルス粒子は、患者の体重１ｋｇあたり１ｘ１０^{11}未満の、１ｘ１０^{12}未満の、５ｘ１０^{12}未満の、２ｘ１０^{12}未満の、１．５ｘ１０^{12}未満の、３ｘ１０^{12}未満の、１ｘ１０^{13}未満の、２ｘ１０^{13}未満の、又は３ｘ１０^{13}未満のベクターゲノムの用量で投与される。場合により、投与されるベクター／ウイルス粒子の用量は、被験体が、ＧＤに罹患していない健常被験体のレベルの１０％～９０％、２０％～８０％、３０％～７０％、２５％～５０％、２０％～１５０％、３０％～１４０％、４０％～１３０％、５０％～１２０％、６０％～１１０％又は７０％～１００％のレベルでＧＣａｓｅを発現するように選択される。

【０１１６】

場合により、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与された患者は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８又は少なくとも９μｍｏｌ／時間／ｍｌのＧＣａｓｅ活性レベルを有し得る。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、ＧＣａｓｅに特異的な蛍光基質を用いて測定される。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を基質として蛍光測定で測定される。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、被験体の血清、血漿、マクロファージ、脾臓、肝臓、及び／又は骨髄において測定される。

【０１１７】

一実施形態においては、ＧＣａｓｅ活性は、基質として４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を用いて、蛍光測定で、以下：（１）血清試料が採取されるか、又は組織（肝臓、脾臓、骨髄）が回収され、急速冷凍及び溶解される；（２）組織溶解物又は血清／血漿試料を５０ｍＭクエン酸ナトリウム、２５ｍＭタウロコール酸、ｐＨ＝５．７５、６ｍＭ　４ＭＵ－Ｇｌｃで、３７℃で３０分間混合する；（３）１体積（１００μｌ）の停止溶液（０．５Ｍグリシン、０．３Ｍ　ＮａＯＨ、ｐＨ１０．０）を加えることにより、反応を停止する；（４）相対蛍光レベル（ＲＦＵ）は、それぞれ３６５ｎｍと４４５ｎｍの励起波長及び発光波長を用いてＳｐｅｃｔｒａｍａｘ　Ｉ３Ｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｄｅｖｉｃｅｓ）で評価され、次いで、蛍光レベルは４－メチルウンベリフェロン（４－ＭＵ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）標準曲線に基づいてナノモル／時間／ｍＬに変換された。

【０１１８】

場合により、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与された患者は、投与後の同一時点で同一アッセイで測定された場合で、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験体で測定された活性と比較した場合、投与後少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、又は少なくとも３５週間でより高いＧＣａｓｅ活性レベルを有し得る。場合により、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与された患者は、投与後の同一時点で同一アッセイで測定された場合で、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験者で測定された活性と比較した場合、投与後少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、又は少なくとも３５週間で、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍又は１０００倍、高いＧＣａｓｅ活性レベルを有し得る。

【０１１９】

場合により、投与されるベクター／ウイルス粒子の用量は、ＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較した場合、被験体に対するＧＣａｓｅの生物学的利用能がより高いように選択される。生物学的利用能は、当該技術分野における任意の既知の方法を介して測定（例、推定又は算出）され得る。ＧＣａｓｅの生物学的利用能は、被験体の血清

、マクロファージ、脾臓、肝臓、及び／又は骨髄において測定され得る。一例においては、生物学的利用能は、実施例８による曲線下面積（「ＡＵＣ」）法を用いて推定され得る。一例においては、生物学的利用能は、被験体の血清、血漿、マクロファージ、脾臓、肝臓及び／又は骨髄において入手できるトータルＧＣａｓｅ活性を推定することにより推定され得る。場合により、それは定義された期間にわたって算出され、その期間中のＧＣａｓｅのトータル活性又は濃度を指す。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、ＧＣａｓｅに特異的な蛍光基質を用いて測定される。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を基質として蛍光測定で測定される。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、被験体の血清、血漿、マクロファージ、脾臓、肝臓、及び／又は骨髄において測定され得る。

【０１２０】

場合により、ＧＣａｓｅ活性は被験体の白血球において測定される。場合により、生物学的利用能は投与から２週間の期間にわたって測定される。場合により、生物学的利用能は投与から５週間の期間にわたって測定される。場合により、生物学的利用能は血清中で測定される。一例においては、被験体におけるより高いＧＣａｓｅの生物学的利用能は、投与後の同一時点で同一アッセイで測定される場合で、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験体で測定された生物学的利用能と比較した場合、投与後少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、又は少なくとも３５週間の期間にわたって達成される。

【０１２１】

場合により、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与された患者（例えば、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している患者）では、投与後、好ましくは投与後６週間、８週間、１０週間、又は１２週間でヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが測定される時、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが低下し得る。ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルは、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与時の（出発）ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルと比較した場合、１／２以上、１／３以上、１／４以上、１／５以上、１／６以上か、１／２～１／３、１／２～１／４、１／２～１／５、１／２～１／６、又は１／３～１／５に、低下している場合がある。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与後（例えば、投与後６週間、８週間、１０週間又は１２週間）、患者におけるヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルは、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与時の（開始）ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルと比較した場合、５０％以下、４０％以下、３０％以下、２５％以下、２０％以下であり得る。場合により、患者は、健常被験体又はＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態を有さない被験体と比較した場合に、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが増大している場合がある。例えば、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルは、患者／被験体の脾臓、肝臓及び／又は骨髄において測定される。ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルは、患者／被験体の血清及び／又は白血球（例、マクロファージ）において測定され得る。ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを測定する方法は当該技術分野で公知であり、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンのレベルは、好ましくは、質量分析（ＬＣ／ＭＳ分析）を用いて、例えば実施例９に記載の方法によって測定される。場合により、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベル（例えば、患者／被験体の血清、白血球（例、マクロファージ）、脾臓、肝臓、及び／又は骨髄中）の低下は、好ましくは、治療開始後、少なくとも６週間、少なくとも８週間、少なくとも１０週間、又は少なくとも１２週間後にヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが測定される場合、ＧＣａｓｅ酵素補充療法から達成される低下よりも甚だしい。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与から少なくとも６週間（例、６週間）、少なくとも８週間（例、８週間）、少なくとも

１０週間（例、１０週間）、又は少なくとも１２週間（例、１２週間）後のレベルは、ＧＣａｓｅ酵素補充療法の最初の実施からそれぞれ少なくとも６週間（例、６週間）、少なくとも８週間（例、８週間）、少なくとも１０週間（例、１０週間）、又は少なくとも１２週間（例、１２週間）後のレベルと比較され得る。特定の例として、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルは、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与後少なくとも１２週間（例、１２週間）後に測定され、ＧＣａｓｅ酵素補充療法の最初の実施後少なくとも１２週間（例、１２週間）に測定されたレベルと比較され得る。好ましくは、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンのレベルは、投与後の同一時点で同一アッセイで測定される。場合により、ＧＣａｓｅ酵素補充療法は、２週間ごとに実施され得る。場合により、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与後の被験体（又は患者）におけるヘキソシルセラミドレベルは、該ヘキソシルセラミドレベル（例えば、血清、白血球（例、マクロファージ）、肝臓及び／又は脾臓中）が、健常被験体又はＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患していない被験体において測定されたヘキソシルセラミドレベルの、２００％、１５０％、又は１２５％以下であるように低下する。一例においては、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルの低下は、それぞれ、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルの低下を表し得る。例えば、ヘキソシルセラミドの低下は、グルコシルセラミドの低下を表し得る。更なる例として、ヘキソシルスフィンゴシンレベルの低下は、グルコシルスフィンゴシンレベルの低下を表し得る。

【０１２２】

一例においては、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルの低下は、それぞれ、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンの低下である。言い換えれば、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与された患者（例えば、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している患者）は、好ましくは、投与後、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルが、６週間、８週間、１０週間、又は１２週間で測定される場合、投与後、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルが低下している場合がある。グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルは、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与時の（出発）グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルと比較した場合、１／２以上、１／３以上、１／４以上、１／５以上、１／６以上か、１／２～１／３、１／２～１／４、１／２～１／５、１／２～１／６、又は１／３～１／５に、低下している場合がある。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与後（例えば、投与後６週間、８週間、１０週間又は１２週間）、患者におけるグルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルは、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与時の（出発）グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルと比較した場合、５０％以下、４０％以下、３０％以下、２５％以下、２０％以下であり得る。場合により、患者は、健常被験体又はＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態を有さない被験体と比較した場合に、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルが増大している可能性がある。例えば、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルは、患者／被験体の脾臓、肝臓及び／又は骨髄において測定される。グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルは、患者／被験体の血清及び／又は白血球（例、マクロファージ）において測定され得る。グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルを測定する方法は当該技術分野において公知であり、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンのレベルは、好ましくは、質量分析（ＬＣ／ＭＳ分析）を用いて、例えば実施例９に記載の方法によって測定される。場合により、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベル（例えば、患者／被験体の血清、白血球（例、マクロファージ）、脾臓、肝臓、及び／又は骨髄中）の低下は、好ましくは、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルが、治療開始後少なくとも６週間、少なくとも８週間、少なくとも１０週間、又は少なくとも１２週間後に測定される場合、ＧＣａｓ

ｅ酵素補充療法から達成される低下よりも甚だしい。例えば、発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与から少なくとも６週間（例、６週間）、少なくとも８週間（例、８週間）、少なくとも１０週間（例、１０週間）、又は少なくとも１２週間（例えば、１２週間）後のレベルは、ＧＣａｓｅ酵素補充療法の最初の実施からそれぞれ少なくとも６週間（例、６週間）、少なくとも８週間（例、８週間）、少なくとも１０週間（例、１０週間）、又は少なくとも１２週間（例、１２週間）後のレベルと比較され得る。特定の例として、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンレベルは、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与後少なくとも１２週間（例、１２週間）後に測定され、ＧＣａｓｅ酵素補充療法の最初の実施後少なくとも１２週間（例、１２週間）で測定されたレベルと比較され得る。好ましくは、グルコシルセラミド及び／又はグルコシルスフィンゴシンのレベルは、投与後の同一時点で同一アッセイで測定される。場合により、ＧＣａｓｅ酵素補充療法は、２週間ごとに実施され得る。場合により、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与後の被験体（又は患者）におけるグルコシルセラミドレベルは、該グルコシルセラミドレベル（例えば、血清、白血球（例、マクロファージ）、肝臓及び／又は脾臓中）が、健常被験体又はＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患していない被験体で測定されたグルコシルセラミドレベルの、２００％、１５０％、又は１２５％以下であるように低下する。

【０１２３】

場合により、本発明のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与された患者（例えば、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している患者）は、好ましくは、細胞が投与後少なくとも６週間（例、６週間）、少なくとも８週間（例、８週間）、少なくとも１０週間（例、１０週間）、又は少なくとも１２週間（例、１２週間）後に係数される場合、投与後に肝臓における貯蔵細胞及び／又は活性化マクロファージの数の低下を示し得る。肝臓における貯蔵細胞及び／又は活性化マクロファージの数の低下は、炎症の低下、従って治療上の利益の兆候であり得る。活性化されたマクロファージの数は、ＣＤ６８^{陽性}細胞の数を測定することによって示されるか、又は推定され得る。貯蔵細胞及びＣＤ６８^{陽性}細胞の同定は、当技術分野で知られている方法、例えば、実施例９に記載の方法によって行われ得る。

【０１２４】

「ＧＣａｓｅ酵素補充療法」は、被験体へのＧＣａｓｅポリペプチドの投与を含む任意の療法を指し得る。ＧＣａｓｅポリペプチドは、配列番号２５のアミノ酸配列を有するＧＣａｓｅポリペプチド等の野生型であり得る。ＧＣａｓｅポリペプチドは、任意の好適な用量で、場合により４０～１００、５０～８０、６０～７０、又は約６０Ｕ／ｋｇ体重の用量で投与され得る。ＧＣａｓｅポリペプチドは、任意の適切な経路、場合により静脈内注射又は皮下注射を介して、投与され得る。

【０１２５】

少なくともＸ％（例、少なくとも２０％）のＧＣａｓｅ活性レベルは、例えば、脾臓又は骨髄の試料から測定された通常のＧＣａｓｅレベルの範囲の少なくともＸ％（例、２０％）であるＧＣａｓｅ活性レベルを指す。当業者は、健常被験体からの対照試料との比較により、通常の臨床診療において決定される、正常なＧＣａｓｅ活性レベルの％への言及によって何が意味されるかを容易に理解するであろう。

【０１２６】

用語「安定したＧＣａｓｅ活性」又は「安定したＧＣａｓｅ活性レベル」は、少なくとも５週間の連続期間にわたって特定のレベル以上で持続するＧＣａｓｅ活性レベルを指す。言い換えれば、活性は、上記の活性レベルを超えて変動する可能性があるが、規定された最小閾値を超えている限り、依然として安定していると言われる。いくつかの実施形態においては、ＧＣａｓｅ活性レベルは、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、又は少なくとも５０週間の連続期間に、特定のレベル以上で持続する。例えば、活性レベルが少なくとも５週間の連続期間にわたって少なくとも２０％で持続する場合、患者は少なくとも２０％の安定したＧＣａｓｅ活性レベル

を有する。かかる例においては、ＧＣａｓｅ活性レベルは、少なくとも５週間後に少なくとも２０％であり続ける可能性があり、従って、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも３０又は少なくとも４０、又は少なくとも５０週間の累積連続期間にわたって少なくとも２０％で持続する。ＧＣａｓｅ活性レベルが少なくとも５週間の連続期間にわたって特定のレベル以上で持続する場合、患者は安定したＧＣａｓｅ活性レベルを有する。場合により、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物が投与された患者は、健常被験体のＧＣａｓｅ活性と比較して、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％又は少なくとも５０％の安定したＧＣａｓｅ活性レベルを有し得る。場合により、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物が投与された患者は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８又は少なくとも９μｍｏｌ／時間／ｍｌの安定したＧＣａｓｅ活性レベルを有し得る。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、ＧＣａｓｅに特異的な蛍光基質を用いて測定される。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を基質として蛍光測定で測定される。場合により、ＧＣａｓｅ活性は、被験体の血清、マクロファージ、脾臓、肝臓、及び／又は骨髄において測定される。

【０１２７】

場合により、ＧＣａｓｅ活性レベルは、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与から少なくとも５週間、少なくとも１０週間、少なくとも１５週間、少なくとも２０週間、少なくとも３０週間、少なくとも４０週間、又は少なくとも５０週間後に安定である。例えば、患者がポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与される時から少なくとも５週間後に患者が少なくとも２０％の安定したＧＣａｓｅ活性レベルを有する場合、投与から最初の少なくとも５週間後、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも３０又は少なくとも４０、又は少なくとも５０週間の連続期間にわたって、少なくとも２０％で持続する少なくとも２０％のＧＣａｓｅ活性レベルが存在する。

【０１２８】

場合により、ＧＣａｓｅ活性レベルは、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与後、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４、又は少なくとも５０週間の時点で、特定のレベル（例えば、２０％、２５％、３０％、３５％、若しくは４０％；及び／又は少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８又は少なくとも９μｍｏｌ／時間／ｍｌ）以上である。例えば、ＧＣａｓｅ活性レベルは、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の投与後、約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、５０、５１又は５２週間の時点で、特定のレベル（例、２０％、２５％、３０％、３５％、若しくは４０％；及び／又は少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、又は少なくとも９μｍｏｌ／時間／ｍｌ）以上である。

【０１２９】

これより、本発明を、以下の実施例を参照して説明するが、これらは単に例示的なものであり、決して本発明の範囲を限定するものと解釈してはならない。

【０１３０】

【表２】

配列表

配列番号	配列の説明
1	シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL28由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列
2	シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL21由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列
3	シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL30由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列
4	シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL36由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列
5	シグナルペプチド部分有りの、FLF-PL28由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列
6	シグナルペプチド部分有りの、FLF-PL21由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列
7	シグナルペプチド部分有りの、FLF-PL30由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列
8	シグナルペプチド部分有りの、FLF-PL36由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列
9	シグナルペプチド有りの、(GenBank NM_000157.3由来の)野生型ヒトGBAヌクレオチド配列
10	LSP-S転写調節エレメント
11	LSP-SのHCRエンハンサー部分
12	LSP-SのA1ATプロモーター部分
13	CAGプロモーター
14	LSP-L転写調節エレメント
15	LSP-LのA1ATプロモーター部分
16	LSP-LのHCRエンハンサー部分
17	シグナルペプチドに対応する野生型GBAヌクレオチド配列
18	シグナルペプチドの野生型GCaseポリペプチド配列
19	肝臓指向性キャプシドのポリペプチド配列
20	肝臓指向性キャプシドのポリペプチド配列
21	CNS指向性キャプシドのポリペプチド配列
22	SV40イントロンのヌクレオチド配列
23	ウシ成長ホルモンポリA配列のヌクレオチド配列
24	肝臓指向性キャプシドのポリペプチド配列
25	野生型ヒトGCaseのポリペプチド配列

【０１３１】

本発明の態様

本発明を、以下の態様において更に説明する。

１．ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該ＧＢＡヌクレオチド配列がβ－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）タンパク質又はその断片をコードし、ＧＢＡヌクレオチド配列の少なくとも一部分が野生型ではない、ポリヌクレオチド。

２．野生型ではないＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、コドンが最適化されている、態様１のポリヌクレオチド。

３．ＧＢＡヌクレオチド配列がＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードし、配列番号１～８のいずれか１のヌクレオチド配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一である配列を含む、態様１又は２のポリヌクレオチド。

４．ＧＢＡヌクレオチド配列が、ＧＣａｓｅ活性を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする配列番号１又は配列番号１の変異体配列を含む、態様１～３のいずれか１のポリヌク

レオチド。
５．配列番号１の変異体が、それが、ＧＣａｓｅタンパク質が配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、又は最大１０のアミノ酸置換を有するようにヌクレオチド置換を含むことを除いて、配列番号１と同一である、態様４のポリヌクレオチド。
６．配列番号１の変異体が、配列番号１の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、最大１０、最大２０、又は最大３０のヌクレオチド置換を有する、態様１又は２のポリヌクレオチド。
７．配列番号１の変異体が、配列番号１の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、又は最大６のヌクレオチド置換を有する、態様４～６のいずれか１のポリヌクレオチド。
８．配列番号１の変異体が、配列番号１の配列と比較して、最大４のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型アミノ酸ＧＣａｓｅ配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、態様４～７のいずれか１のポリヌクレオチド。
９．配列番号１の変異体が、配列番号１の配列と比較して、最大３のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、態様４～８のいずれか１のポリヌクレオチド。
１０．配列番号１の変異体が、配列番号１の配列と比較して、１のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、態様４～９のいずれか１のポリヌクレオチド。
１１．ＧＢＡヌクレオチド配列が、ＧＣａｓｅ活性を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする配列番号５又は配列番号５の変異体の配列を含む、態様１～３のいずれか１のポリヌクレオチド。
１２．配列番号５の変異体が、それが、ＧＣａｓｅタンパク質が、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅ配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、又は最大１０のアミノ酸置換を有するようにヌクレオチド置換を含むことを除いて、配列番号５と同一である、態様１１のポリヌクレオチド。
１３．配列番号５の変異体が、配列番号５の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、最大１０、最大２０、又は最大３０のヌクレオチド置換を有する、態様１１又は１２のポリヌクレオチド。
１４．配列番号５の変異体が、配列番号５の配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、最大５、又は最大６のヌクレオチド置換を有する、態様１１～１３のいずれか１のポリヌクレオチド。
１５．配列番号５の変異体が、配列番号５の配列と比較して、最大４のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、態様１１～１４のいずれか１のポリヌクレオチド。
１６．配列番号５の変異体が、配列番号５の配列と比較して、最大３のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、態様１１～１５のいずれか１のポリヌクレオチド。
１７．変異体が、配列番号５の配列と比較して、１のヌクレオチド置換を有し、及び／又は配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、態様１１～１６のいずれか１のポリヌクレオチド。
１８．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、１、最大２、最大３、最大４、又は最大５のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタン

パク質をコードする、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
１９．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大３のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２０．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大２のアミノ酸置換を有するＧＣａｓｅタンパク質をコードする、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２１．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号２５の野生型ＧＣａｓｅアミノ酸配列と比較して、最大１のアミノ酸置換を有する変異体ＧＣａｓｅタンパク質をコードする、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２２．ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、ＧＢＡヌクレオチド配列がＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードし、配列番号１～８のいずれか１の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１６１１未満、１０００～１４９４、１０００～１６１１、１３００～１４９４、１３００～１６１１、約１４９４、又は約１６１１のヌクレオチドの断片と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である配列を含む、ポリヌクレオチド。
２３．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１～８のいずれか１の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９８％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２４．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１～８のいずれか１の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９９％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２５．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１～８のいずれか１のヌクレオチド配列と少なくとも９８％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２６．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１～８のいずれか１のヌクレオチド配列と少なくとも９９％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２７．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９８％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２８．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９９％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
２９．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１と少なくとも９８％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
３０．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１と少なくとも９９％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
３１．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号５と少なくとも９８％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
３２．ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号５と少なくとも９９％同一である配列を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
３３．ＧＢＡヌクレオチド配列の少なくとも一部分が、コドンが最適化されている、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
３４．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の少なくとも一部分が、ヒト肝細胞における発現のためにコドンが最適化されている、態様３３のポリヌクレオチド。
３５．ＧＢＡヌクレオチド配列が、ヒト肝細胞における発現のためにコドンが最適化されている、態様３３のポリヌクレオチド。
３６．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、連続する一部分である、態様２～３５のいずれか１のポリヌクレオチド。
３７．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、長さが少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１０００～１４９４、１３００～１４９４、又は約１４９４のヌクレオチドである、態様２～３６のいずれ

か１のポリヌクレオチド。
３８．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、成熟ＧＣａｓｅタンパク質に対応する、態様２～３７のいずれか１のポリヌクレオチド。
３９．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、シグナルペプチドの全部又は一部分をコードしない、態様２～３８のいずれか１のポリヌクレオチド。
４０．ＧＢＡヌクレオチド配列又はコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、野生型ＧＢＡヌクレオチド配列の対応する一部分と比較してＣｐＧ数が低下している、態様２～３９のいずれか１のポリヌクレオチド。
４１．ＧＢＡヌクレオチド配列又はコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、４０未満、２０未満、１８未満、１０未満、若しくは５未満のＣｐＧを含む、態様４０のポリヌクレオチド。
４２．ＧＢＡヌクレオチド配列又はコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、１００ヌクレオチドあたり５未満、４未満、３未満、若しくは２未満のＣｐＧを含む、態様４１のポリヌクレオチド。
４３．ＧＢＡヌクレオチド配列若しくはコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、ＣｐＧを含まない、態様４１又は４２のポリヌクレオチド。
４４．野生型ＧＢＡヌクレオチド配列が配列番号９である、態様４０～４３のいずれか１のポリヌクレオチド。
４５．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、配列番号１～４のいずれか１の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１０００～１４９４、１３００～１４９４、又は約１４９４のヌクレオチドの断片と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である、態様２～４４のいずれか１のポリヌクレオチド。
４６．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、配列番号１～４のいずれか１と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である、態様４５のポリヌクレオチド。
４７．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、配列番号１の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１０００～１４９４、１３００～１４９４、又は約１４９４のヌクレオチドの断片と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％少なくとも９９．８％、又は１００％同一である、態様２～４６のいずれか１のポリヌクレオチド。
４８．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、配列番号１と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である、態様４７のポリヌクレオチド。
４９．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、配列番号１の少なくとも１３００のヌクレオチドの断片と少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である、態様２～４８のいずれか１のポリヌクレオチド。
５０．コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、配列番号１と少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である、態様４９のポリヌクレオチド。
５１．ＧＢＡヌクレオチド配列が、コドンが最適化されていない一部分を含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
５２．コドンが最適化されていない一部分が、ＧＣａｓｅシグナルペプチドの全部又は一部分をコードする、態様５１のポリヌクレオチド。
５３．コドンが最適化されていない一部分が、少なくとも８０、少なくとも９０、少なく

とも１００、少なくとも１１０、２００未満、１７０未満、１４０未満、又は約１１７のヌクレオチドである、態様５１又は５２のポリヌクレオチド。
５４．コドンが最適化されていない一部分が、１以上のＣｐＧを含む、態様５１～５３のいずれか１のポリヌクレオチド。
５５．ポリヌクレオチドが転写調節エレメントを更に含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
５６．転写調節エレメントが肝臓特異的プロモーターを含む、態様５５のポリヌクレオチド。
５７．転写調節エレメントがＡ１ＡＴプロモーター又はＡ１ＡＴプロモーターの断片を含む、態様５５又は５６のポリヌクレオチド。
５８．Ａ１ＡＴプロモーター又はＡ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが少なくとも１００、少なくとも１２０、少なくとも１５０、少なくとも１８０、２５５未満、１００～２５５、１５０～２２５、１５０～３００、又は１８０～２５５のヌクレオチドである、態様５７のポリヌクレオチド。
５９．Ａ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが１８０～２５５のヌクレオチドである、態様５８のポリヌクレオチド。
６０．ポリヌクレオチドが、配列番号１２又は配列番号１５と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるプロモーターを含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
６１．ポリヌクレオチドが、配列番号１２又は配列番号１５と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるプロモーターを含む、態様６０のポリヌクレオチド。
６２．ポリヌクレオチドが、配列番号１２又は配列番号１５のプロモーターを含む、態様６１のポリヌクレオチド。
６３．転写調節エレメントが、長さが４１８ヌクレオチド以下、２５５ヌクレオチド以下、又は１８５ヌクレオチド以下であるＡ１ＡＴプロモーターの断片を含む、態様５５～６２のいずれか１のポリヌクレオチド。
６４．転写調節エレメントが、エンハンサーを含む、態様５５～６３のいずれか１のポリヌクレオチド。
６５．エンハンサーがＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片である、態様６４のいずれか１のポリヌクレオチド。
６６．ＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、１９２未満、８０～１９２、９０～１９２、１００～２５０、又は１１７～１９２のヌクレオチドの断片である、態様６５のポリヌクレオチド。
６７．ＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが１１７～１９２のヌクレオチドである、態様６６のポリヌクレオチド。
６８．ポリヌクレオチドが、配列番号１１又は配列番号１６と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるエンハンサーを含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
６９．ポリヌクレオチドが、配列番号１１又は配列番号１６と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一であるエンハンサーを含む、態様６８のポリヌクレオチド。
７０．ポリヌクレオチドが、配列番号１１又は配列番号１６のエンハンサーを含む、態様６９のポリヌクレオチド。
７１．転写調節エレメントが、長さが３２１ヌクレオチド以下、１９２ヌクレオチド以下、又は１１７ヌクレオチド以下であるＨＣＲエンハンサーの断片を含み、且つ配列番号１１を含む、態様５５～７０のいずれか１のポリヌクレオチド。
７２．転写調節エレメントが、配列番号１０と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、

少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である、態様５５～７１のいずれか１のポリヌクレオチド。
７３．転写調節エレメントが、配列番号１０の配列を有する、態様７２のポリヌクレオチド。
７４．（ｉ）ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１又は５と少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％若しくは１００％同一である配列を含む；並びに
（ｉｉ）ポリヌクレオチドが、配列番号１２と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるプロモーター、及び／又は配列番号１１と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるエンハンサーエレメントを含む
上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
７５．（ｉ）ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１又は５と少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％若しくは１００％同一である配列を含む；並びに
（ｉｉ）ポリヌクレオチドが、配列番号１０と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一である転写調節エレメントを含む
上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
７６．Ａ１ＡＴプロモーター又はＡ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、５００未満、２００～５００、２５０～５００、３５０～４５０、若しくは約４１８のヌクレオチドである、態様５７のポリヌクレオチド。
７７．Ａ１ＡＴプロモーター又はＡ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが３５０～４５０のヌクレオチドである、態様７６のポリヌクレオチド。
７８．ＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが少なくとも１５０、少なくとも１９０、少なくとも２３０、４００未満、１５０～４００、１９０～３７０、２３０～３４０、２５０～３４０若しくは約３２１のヌクレオチドの断片である、態様６５のポリヌクレオチド。
７９．ＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが２５０～３４０のヌクレオチドである、態様７８のポリヌクレオチド。
８０．転写調節エレメントが、配列番号１４と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である、態様５５～７９のいずれか１のポリヌクレオチド。
８１．転写調節エレメントが、配列番号１４の配列を有する、態様８０のポリヌクレオチド。
８２．（ｉ）ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１又は５と少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％若しくは１００％同一である配列を含む；並びに
（ｉｉ）ポリヌクレオチドが、配列番号１４と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一である転写調節エレメントを含む
態様１～５６又は７６～７９のいずれか１のポリヌクレオチド。
８３．（ｉ）ＧＢＡヌクレオチド配列が、配列番号１又は５と少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％若しくは１００％同一である配列を含む；並びに
（ｉｉ）ポリヌクレオチドが、配列番号１５と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるプロモーター

、及び／又は配列番号１６と少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるエンハンサーエレメントを含む態様１～５６又は７６～７９のいずれか１のポリヌクレオチド。
８４．ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅが、野生型ＧＢＡヌクレオチド配列であって、他の点では同一の参照ポリヌクレオチド中の配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、より高いレベルでヒト肝細胞において発現する、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
８５．ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅが、参照ポリヌクレオチド中の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、ヒト肝細胞において少なくとも１．１倍、少なくとも１．２倍、少なくとも１．３倍、少なくとも１．４倍、又は少なくとも１．５倍高く発現する、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
８６．参照ポリヌクレオチドが配列番号９の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列を含む、態様８４又は８５のポリヌクレオチド。
８７．参照ポリヌクレオチドが配列番号１３のプロモーターを含む、態様８６のポリヌクレオチド。
８８．ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅが、ヒト肝細胞において、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含み、配列番号１３のプロモーターに作動可能に連結された、他の点では同一の参照ポリヌクレオチドによってコードされるＧＣａｓｅと比較して、より高い又は統計的有意差無しのレベルで発現する、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
８９．ポリヌクレオチドが、ＤＮＡ又はＲＮＡを含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
９０．上記態様のいずれか１のポリヌクレオチドを含む組換えゲノムを含むウイルス粒子。
９１．ＡＡＶ、アデノウイルス、又はレンチウイルスのウイルス粒子である、態様９０のウイルス粒子。
９２．ＡＡＶのウイルス粒子である、態様９１のウイルス粒子。
９３．前記ウイルス粒子が、肝臓指向性又はＣＮＳ指向性のキャプシドを含む、態様９０～９２のいずれか１のウイルス粒子。
９４．肝臓指向性キャプシドが、配列番号１９又は２０の少なくとも６００、少なくとも６５０、少なくとも７００、６００～７３６、６５０～７３６、又は７００～７３６のアミノ酸の断片と、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は少なくとも９９．５％同一の配列を含む、態様９３のウイルス粒子。
９５．肝臓指向性キャプシドが、配列番号１９と少なくとも９９％同一の配列を含む、態様９４のウイルス粒子。
９６．肝臓指向性キャプシドが、配列番号２０と少なくとも９９％同一の配列を含む、態様９４のウイルス粒子。
９７．ＣＮＳ指向性キャプシドが、配列番号２１の少なくとも６００、少なくとも６５０、少なくとも７００、６００～７３６、６５０～７３６又は７００～７３６のアミノ酸の断片と、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は少なくとも９９．５％同一の配列を含む、態様９３のウイルス粒子。
９８．ＣＮＳ指向性キャプシドが、配列番号２１と少なくとも９９％同一の配列を含む、態様９７のウイルス粒子。
９９．組換えゲノムが：
ａ）ＡＡＶ２　ＩＴＲ；
ｂ）ポリＡ配列；及び／又は
ｃ）イントロン；
を更に含む、態様９０～９８のいずれか１のウイルス粒子。
１００．組換えゲノムが一本鎖である、態様９９のウイルス粒子。
１０１．Ｈｕｈ－７細胞への形質導入時に、ウイルス粒子が、形質導入された細胞におけ

るＧＣａｓｅ活性が、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む、他の点では同一のウイルス粒子で形質導入された細胞における、ＧＣａｓｅ又はその断片の活性よりも高いように、ＧＣａｓｅ又はその断片を発現する、態様９０～１００のいずれか１のウイルス粒子。
１０２．Ｈｕｈ－７細胞への形質導入時に、ウイルス粒子が、形質導入された細胞におけるＧＣａｓｅ活性が、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む、他の点では同一のウイルス粒子で形質導入された細胞におけるＧＣａｓｅ又はその断片の活性よりも少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、又は少なくとも２０倍高いようにＧＣａｓｅ又はその断片を発現する、態様９９～１０１のいずれか１のウイルス粒子。
１０３．活性が、ＧＣａｓｅに特異的な蛍光測定基質を用いて測定される、態様１０１～１０２のいずれか１のウイルス粒子。
１０４．上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド又はウイルス粒子と、医薬的に許容される賦形剤とを含む組成物。
１０５．治療方法における使用のための、上記態様のいずれか１項のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物。
１０６．治療方法が、有効量の態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、組成物又はウイルス粒子を患者に投与することを含む、態様１０５の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物。
１０７．　有効量の態様１～１０４いずれか１のポリヌクレオチド、組成物又はウイルス粒子を患者に投与することを含む、治療方法。
１０８．治療方法における使用のための医薬の製造における、態様１～１０４いずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用。
１０９．治療方法が、有効量の態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド又はウイルス粒子を患者に投与することを含む、態様１０８の使用。
１１０．治療方法が、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患の治療方法である、態様１０５～１０９のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、組成物、使用又は方法。
１１１．治療方法がパーキンソン病の治療方法である、態様１０５～１０９のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、組成物、使用又は方法。
１１２．治療方法がゴーシェ病の治療方法である、態様１０５～１０９のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、組成物、使用又は方法。
１１３．ゴーシェ病がゴーシェ病Ｉ型である、態様１１２のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、組成物、使用又は方法。
１１４．ゴーシェ病がゴーシェ病ＩＩ型である、態様１１２のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、組成物、使用又は方法。
１１５．ゴーシェ病がゴーシェ病ＩＩＩ型である、態様１１２のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、組成物、使用又は方法。
１１６．患者が、酵素補充療法の一部として、以前に患者が処置されている組換えＧＣａｓｅに対する抗体又は阻害剤を有する、態様１１２～１１５のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、組成物、使用又は方法。
１１７．被験体において安定なＧＣａｓｅ活性を達成するための医薬の製造における、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用。
１１８．被験体において、ＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較して、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供するための医薬の製造における、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用であって、生物学的利用能が投与から２週間の期間に亘って測定される、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物。
１１９．被験体に、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与することにより、該被験体において、安定なＧＣａｓｅ活性を達成する方法。
１２０．被験体に、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は

組成物を投与することにより、該被験体において、ＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較して、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供する方法であって、生物学的利用能が投与から２週間の期間に亘って測定される、方法。
１２１．被験体において、安定なＧＣａｓｅ活性を達成すること、又は、被験体において、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供することにより該被験体における疾患が治療される、態様１１７～１２０のいずれか１の方法又は使用。
１２２．ＧＢＡヌクレオチド配列を発現し、被験体において安定なＧＣａｓｅ活性を達成する方法における使用のための、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物。
１２３．被験体においてＧＢＡヌクレオチド配列を発現させ、且つＧＣａｓｅ酵素補充療法からの生物学的利用能と比較して、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を提供する方法における使用のための、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物であって、生物学的利用能が投与から２週間の期間に亘って測定される、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物。
１２４．安定したＧＣａｓｅ活性を達成すること、及び／又はより高い生物学的利用能を提供することにより、被験体における疾患の治療がもたらされる、態様１２２又は１２３の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、又は組成物。
１２５．ＧＣａｓｅ活性及び／又は生物学的利用能が、ＧＣａｓｅに特異的な蛍光基質を用いて測定される、態様１１７～１２４のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１２６．ＧＣａｓｅ活性が、被験体の血清又は血漿において測定される、態様１１７～１２５のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１２７．ＧＣａｓｅ活性が、被験体のマクロファージにおいて測定される、態様１１７～１２６のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１２８．ＧＣａｓｅ活性が、被験者において、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、又は少なくとも９μｍｏｌ／時間／ｍｌのレベルで安定である、態様１１７～１２７のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１２９．ＧＣａｓｅ活性が、被験体において少なくとも３μｍｏｌ／時間／ｍｌのレベルで安定である、態様１１７～１２８のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１３０．ＧＣａｓｅ活性が、被験体において少なくとも５μｍｏｌ／時間／ｍｌのレベルで安定である、態様１１７～１２９のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１３１．ＧＣａｓｅ活性が、被験体において少なくとも９μｍｏｌ／時間／ｍｌのレベルで安定である、態様１１７～１３０のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、又は方法。
１３２．方法が、有効用量のポリヌクレオチド、ウイルス粒子若しくは組成物を被験体に投与することを含む、態様１１７～１３１のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１３３．安定したＧＣａｓｅ活性が、健常被験体のＧＣａｓｅ活性と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、又は少なくとも５０％のＧＣａｓｅ活性である、態様１１７～１３２のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１３４．安定したＧＣａｓｅ活性が、健常被験体のＧＣａｓｅ活性と比較して、１０％～１００％、２０％～９０％、３０％～７０％、４０％～７０％、又は５０％～７０％のＧＣａｓｅ活性である、態様１１７～１３３のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。

１３５．安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも５週間安定である、態様１１７～１３４のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１３６．安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも１０週間安定である、態様１１７～１３５のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１３７．安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも１５週間安定である、態様１１７～１３６のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１３８．安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも２０週間安定である、態様１１７～１３７のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１３９．安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも２５週間安定である、態様１１７～１３８のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４０．安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも３０週間安定である、態様１１７～１３９のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４１．安定したＧＣａｓｅ活性が、投与から少なくとも３５週間安定である、態様１１７～１４０のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４２．安定したＧＣａｓｅ活性が、投与後少なくとも４０週間安定である、態様１１７～１４１のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４３．方法が、投与後の同一時点で同一アッセイにおいて測定される場合、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験体において測定された活性と比較した場合に、被験体の肝臓、脾臓、及び／又は骨髄において、投与後少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、若しくは少なくとも３５週間で、より高い活性を達成する、態様１１７～１４２のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４４．方法が、投与後の同一時点で同一アッセイにおいて測定される場合、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験体において測定された生物学的利用能と比較した場合に、肝臓、脾臓及び／又は骨髄被験体において、投与後少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、若しくは少なくとも３５週間の期間に亘って、より高いＧＣａｓｅの生物学的利用能を達成する、態様１１７～１４３のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４５．ＧＣａｓｅ酵素補充療法が、配列番号２５の配列を有するＧＣａｓｅポリペプチドの投与を含む、態様１１８、１２０又は１２３～１４４のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４６．ＧＣａｓｅ酵素補充療法が、４０～１００、５０～８０、６０～７０、又は約６０Ｕ／ｋｇ体重の用量でのＧＣａｓｅポリペプチドの投与を含む、態様１４５の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４７．疾患がゴーシェ病である、態様１２１又は１２４～１４６のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４８．ゴーシェ病がゴーシェ病Ｉ型である、態様１４７の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１４９．ゴーシェ病がゴーシェ病ＩＩ型である、態様１４７の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１５０．ゴーシェ病がゴーシェ病ＩＩＩ型である、態様１４７の、使用のためのポリヌク

レオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１５１．患者が、酵素補充療法の一部として、以前に患者が処置されている組換えＧＣａｓｅに対する抗体又は阻害剤を有する、態様１１７～１５０のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１５２．ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している被験体において、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させるための医薬の製造における、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物の使用。
１５３．ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している被験体に、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物を投与することにより、該被験体において、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させる方法。
１５４．被験体におけるヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンのレベルを低下させることにより、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態が治療される、態様１５２又は１５３の使用又は方法。
１５５．ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態に罹患している被験体において、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させる方法における使用のための、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物であって、場合により、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルを低下させることにより、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患又は状態の治療がもたらされる、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物。
１５６．ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが、態様１～１０４のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物の投与時のヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルと比較した場合、１／２以上、１／３以上、１／４以上、１／５以上、１／６以上か、１／２～１／３、１／２～１／４、１／２～１／５、１／２～１／６、若しくは１／３～１／５に、低減される、態様１５２～１５５のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１５７．ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルの低下が、有効用量のＧＣａｓｅ酵素補充療法を施された被験体において達成された低下よりも甚だしい（場合により、ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが投与後少なくとも６週間、少なくとも８週間、少なくとも１０週間、または少なくとも１２週間で測定されるときに）、態様１５２～１５６のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１５８．ＧＣａｓｅ酵素補充療法が、配列番号２５の配列を有するＧＣａｓｅポリペプチドの投与を含む、態様１５７の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１５９．ＧＣａｓｅ酵素補充療法が、４０～１００、５０～８０、６０～７０、又は約６０Ｕ／ｋｇ体重の用量でのＧＣａｓｅポリペプチドの投与を含む、態様１５８の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６０．ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが被験体のマクロファージにおいて測定される、態様１５２～１５９のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６１．ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが被験体の脾臓において測定される、態様１５２～１６０のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６２．ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが被験体の肝臓において測定される、態様１５２～１６１のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６３．ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが被験体の血清

中で測定される、態様１５２～１６２のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６４．ヘキソシルセラミド及び／又はヘキソシルスフィンゴシンレベルが、質量分析によって測定される、態様１５２～１６３のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６５．疾患がゴーシェ病である、態様１５２～１６４のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６６．ゴーシェ病がゴーシェ病Ｉ型である、態様１６５の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用は方法。
１６７．ゴーシェ病がゴーシェ病ＩＩ型である、態様１６５の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６８．ゴーシェ病がゴーシェ病ＩＩＩ型である、態様１６５の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
１６９．患者が、酵素補充療法の一部として、以前に患者が処置されている組換えＧＣａｓｅに対する抗体又は阻害剤を有する、態様１５２～１６８のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、若しくは組成物、使用又は方法。
【０１３２】
本発明の更なる態様
本発明を、以下の態様においても説明する。
１．ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該ＧＢＡヌクレオチド配列がβ－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）タンパク質又はその断片をコードし、ＧＢＡヌクレオチド配列の少なくとも一部分が野生型ではなく、場合により、野生型ではないＧＢＡヌクレオチド配列の該一部分が、コドンが最適化されており、更に場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列がＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードし、
配列番号１～８のいずれか１のヌクレオチド配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である配列を含む、ポリヌクレオチド。
２．ＧＢＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、ＧＢＡヌクレオチド配列がＧＣａｓｅタンパク質又はその断片をコードし、配列番号１～８のいずれか１の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１６１１未満、１０００～１４９４、１０００～１６００、１３００～１４９４、１３００～１６１１、約１４９４、又は約１６１１のヌクレオチドの断片と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、又は１００％同一である配列を含む、ポリヌクレオチド。
３．ＧＢＡヌクレオチド配列の少なくとも一部分が、コドンが最適化されている、態様１又は２のいずれか１のポリヌクレオチド。
４．（ａ）コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の少なくとも一部分が、ヒト肝細胞における発現のためにコドンが最適化されている；
（ｂ）コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、連続する一部分である；
（ｃ）コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、長さが少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１０００～１４９４、１３００～１４９４、若しくは約１４９４のヌクレオチドである；
（ｄ）コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、成熟ＧＣａｓｅタンパク質に対応する；
（ｅ）コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、シグナルペプチドの全部若しくは一部分をコードしない；
（ｆ）ＧＢＡヌクレオチド配列若しくはコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、野生型ＧＢＡヌクレオチド配列の対応する一部分と比較してＣｐＧ数が低下しており；場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列若しくはコドンが最適化されているＧ

ＢＡヌクレオチド配列の一部分が、４０未満、２０未満、１８未満、１０未満、若しくは５未満のＣｐＧを含み、更に場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列若しくはコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の部分が、１００ヌクレオチドあたり５未満、４未満、３未満、若しくは２未満のＣｐＧを含み、更に場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列若しくはコドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、ＣｐＧを含まず、好ましくは野生型ＧＢＡヌクレオチド配列が配列番号９である；並びに／又は
（ｇ）コドンが最適化されているＧＢＡヌクレオチド配列の一部分が、配列番号１～４のいずれか１の少なくとも１０００、少なくとも１２００、少なくとも１３００、１４９４未満、１０００～１４９４、１３００～１４９４、若しくは約１４９４のヌクレオチドの断片と、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一である
態様３のポリヌクレオチド。
５．ＧＢＡヌクレオチド配列が、コドンが最適化されていない一部分を含み、場合により：
（ａ）コドンが最適化されていない一部分が、ＧＣａｓｅシグナルペプチドの全部若しくは一部分をコードする。
（ｂ）コドンが最適化されていない一部分が、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも１１０、２００未満、１７０未満、１４０未満、若しくは約１１７のヌクレオチドである。及び／又は
（ｃ）コドンが最適化されていない一部分が、１以上のＣｐＧを含む
上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
６．ポリヌクレオチドが転写調節エレメントを更に含み、場合により、転写調節エレメントが肝臓特異的プロモーター及び／又はエンハンサーを含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
７．転写調節エレメントがＡ１ＡＴプロモーター又はＡ１ＡＴプロモーターの断片を含み、場合により：
（ａ）Ａ１ＡＴプロモーター若しくはＡ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが少なくとも１００、少なくとも１２０、少なくとも１５０、少なくとも１８０、２５５未満、１００～２５５、１５０～２２５、１５０～３００、若しくは１８０～２５５のヌクレオチドであり、更に場合により、Ａ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが１８０～２５５のヌクレオチドである；
（ｂ）Ａ１ＡＴプロモーター若しくはＡ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、５００未満、２００～５００、２５０～５００、３５０～４５０、若しくは約４１８のヌクレオチドであり、更に場合により、Ａ１ＡＴプロモーターの断片が、長さが３５０～４５０のヌクレオチドである；
（ｃ）ポリヌクレオチドが、配列番号１２若しくは配列番号１５と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるプロモーターを含む
態様６のポリヌクレオチド。
８．エンハンサーがＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片であり、場合により：
（ａ）ＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、１９２未満、８０～１９２、９０～１９２、１００～２５０、若しくは１１７～１９２のヌクレオチドの断片であり、更に場合により、ＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが１１７～１９２のヌクレオチドである；
（ｂ）ＨＣＲエンハンサー又はＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが少なくとも１５０、少なくとも１９０、少なくとも２３０、４００未満、１５０～４００、１９０～３７０、２３０～３４０、２５０～３４０若しくは約３２１のヌクレオチドの断片であり、更に場合により、ＨＣＲエンハンサーの断片が、長さが２５０～３４０のヌクレオチドである；

（ｃ）ポリヌクレオチドが、配列番号１１若しくは配列番号１６と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％、若しくは１００％同一であるエンハンサーを含む
態様６又は７のポリヌクレオチド。
９．転写調節エレメントが、配列番号１９又は１４と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、少なくとも９９．８％又は１００％同一である、態様６のポリヌクレオチド。
１０．ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅが、野生型ＧＢＡヌクレオチド配列であって、他の点では同一の参照ポリヌクレオチド中の配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、より高いレベルでヒト肝細胞において発現し、場合により、ＧＢＡヌクレオチド配列によってコードされるＧＣａｓｅは、野生型ＧＢＡヌクレオチド配列であって、他の点では同一の参照ポリヌクレオチド中の配列によってコードされるＧＣａｓｅと比較して、ヒト肝細胞において少なくとも１．１倍、少なくとも１．２倍、少なくとも１．３倍、少なくとも１．４倍、又は少なくとも１．５倍高く発現し、更に場合により、参照ポリヌクレオチドが配列番号９の野生型ＧＢＡヌクレオチド配列を含み、場合により、参照ポリヌクレオチドが配列番号１３のプロモーターを含む、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド。
１１．上記態様のいずれか１のポリヌクレオチドを含む組換えゲノムを含むウイルス粒子。
１２．ＡＡＶ、アデノウイルス、またはレンチウイルスのウイルス粒子であり、場合によりＡＡＶのウイルス粒子である、態様１１のウイルス粒子。
１３．前記ウイルス粒子が、肝臓指向性又はＣＮＳ指向性のキャプシドを含む、態様１１～１２のいずれか１のウイルス粒子。
１４．肝臓指向性キャプシドが、配列番号１９、２０又は２４の少なくとも６００、少なくとも６５０、少なくとも７００、６００～７３６、６５０～７３６、又は７００～７３６のアミノ酸の断片と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、で配列を含む、態様１３のウイルス粒子。
１５．ＣＮＳ指向性キャプシドが、配列番号２１の少なくとも６００、少なくとも６５０、少なくとも７００、６００～７３６、６５０～７３６又は７００～７３６のアミノ酸の断片と、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、で配列を含む、態様１３のウイルス粒子。
１６．組換えゲノムが：
ａ）ＡＡＶ２　ＩＴＲ；
ｂ）ポリＡ配列；及び／又は
ｃ）イントロン；
を更に含み、場合により、組換えゲノムが一本鎖である、態様１１～１９のいずれか１のウイルス粒子。
１７．Ｈｕｈ－７細胞への形質導入時に、ウイルス粒子が、形質導入された細胞におけるＧＣａｓｅ活性が、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む、他の点では同一のウイルス粒子で形質導入された細胞における、ＧＣａｓｅ又はその断片の活性よりも高いように、ＧＣａｓｅ又はその断片を発現する、場合により、Ｈｕｈ－７細胞への形質導入時に、ウイルス粒子が、形質導入された細胞におけるＧＣａｓｅ活性が、配列番号９のＧＢＡヌクレオチド配列を含む、他の点では同一のウイルス粒子で形質導入された細胞におけるＧＣａｓｅ又はその断片の活性よりも少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、又は少なくとも２０倍高いようにＧＣａｓｅ又はその断片を発現する、更に場合により、活性が、ＧＣａｓｅに特異的な蛍光測定基質を用いて測定される、態様１１～１６のいずれか１のウイルス粒子。
１８．上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド又はウイルス粒子と、医薬的に許容される賦形剤とを含む組成物。

１９．治療方法における使用のための、上記態様のいずれか１のポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物。
２０．治療方法が、有効量の態様１～１７のいずれか１のポリヌクレオチド、組成物又はウイルス粒子を患者に投与することを含む、態様１９の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子又は組成物。
２１．治療方法が、ＧＣａｓｅ欠損に関連する疾患の治療方法である、態様１９～２０のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、又は組成物。
２２．治療方法がパーキンソン病の治療方法である、態様１９～２０のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、又は組成物。
２３．治療方法がゴーシェ病の治療方法である、態様１９～２０のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、又は組成物。
２４．ゴーシェ病がゴーシェ病Ｉ型、ＩＩ型若しくはＩＩＩ型である、態様２３の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、又は組成物。
２５．患者が、酵素補充療法の一部として、以前に患者が処置されている組換えＧＣａｓｅに対する抗体若しくは阻害剤を有する、態様２３～２４のいずれか１の、使用のためのポリヌクレオチド、ウイルス粒子、又は組成物。
【０１３３】
実施例
実施例１－方法
特記されない限り、下記の実施例においては、以下の一般的な方法に従った。
【０１３４】
ｒＡＡＶの産生
ＡＡＶ２／８粒子を、ＡＡＶ　Ｒｅｐ及びＣａｐ及びアデノウイルスヘルパー機能をコードするプラスミド、並びにＧＢＡコンストラクトを含有する組換えゲノムによるＨＥＫ２９３Ｔ細胞の一過的トランスフェクションによって産生させた。ＡＡＶ２／８粒子はａＰＯＲＯＳ　ＣａｐｔｕｒｅＳｅｌｅｃｔアフィニティーカラムにより精製し、ｑＰＣＲにより力価測定し、アルカリゲル分析により特性評価した。
【０１３５】
マウス研究計画
肝細胞特異的プロモーターの転写制御下にあるＧＢＡ導入遺伝子を保有するＡＡＶウイルス粒子を、６～８週齢の野生型（Ｃ５７ＢＬ／６）雄性マウスの尾静脈に投与した。ＡＡＶ用量は、本明細書中、各研究について、６ｘ１０^{11}ｖｇ／ｋｇ～６ｘ１０^{12}ｖｇ／ｋｇの範囲であった。各実験について、治療効果の対照として機能するよう、追加の動物群を未治療のままにした。導入遺伝子発現の動態と持続性を評価するために、注射後のさまざまな時間間隔（４、８、及び１２週間）で血清ＧＣａｓｅレベルを測定した。ＡＡＶ治療後最大１２週間マウスを追跡調査し、生化学的及び病理学的解析のために　殺した。
【０１３６】
血清及び組織のＧＢＡ活性アッセイ
β－グルコセレブロシダーゼ（酸性β－グルコシダーゼ；ＧＣａｓｅ）活性は、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を基質として蛍光測定で測定した。血清試料はマウスの血液から入取し、－８０℃で保存した。組織（肝臓、脾臓、骨髄）を採取し、急速凍結して溶解した。β－グルコセレブロシダーゼ（酸性β－グルコシダーゼ、ＧＣａｓｅ）活性は、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を基質として蛍光光度法で測定した。アッセイの日に、血清を希釈し（０．５μＬ、１：５０）、５０ｍＭクエン酸ナトリウム、２５ｍＭタウロコール酸、ｐＨ＝５．７５、６ｍＭ　４ＭＵ－Ｇｌｃ中で、３７℃で３０分間アッセイした。組織試料については、組織タンパク質溶解物を直接アッセイした。１体積（１００μｌ）の停止溶液（０．５Ｍグリシン、０．３Ｍ　ＮａＯＨ、ｐＨ１０．０）を加えることにより、反応を停止した。相対蛍光レベル（ＲＦＵ）を、Ｓｐｅｃｔｒａｍａｘ　Ｉ３Ｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｄｅｖｉｃｅｓ）を用いて、それぞれ３６５ｎｍ及び４４５ｎｍの

励起波長及び発光波長を用いて評価した。次いで、蛍光レベルを、４－メチルウンベリフェロン（４－ＭＵ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）の標準曲線に基づいて、ナノモル／時間／ｍＬ（血清）又はｎｍｏｌ／時間／ｍｇ全タンパク質（組織）に変換した。

【０１３７】

ベクターゲノムコピー数

ｒＡＡＶ注射後の肝細胞あたりのベクターゲノム数を決定するために、ＤＮＡを、ＱＩＡＧＥＮ ＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて、製造業者の指示に従って凍結肝臓試料から単離した。ＤＮＡ単離後、ＬＳＰ－Ｓプロモーターと ＬＳＰ－Ｌプロモーターの両方に共通の領域に結合するプライマーセットを用いてｑＰＣＲを行い、ＡＡＶコピー数の推定を可能にした。

【０１３８】

免疫組織化学

ウサギ抗ヒトＧＣａｓｅ（Ａｂｃａｍ ａｂ１２５０６５；１：１００）を用いて、マウス組織中のＧＣａｓｅを可視化した。ラット抗Ｆ４／８０（Ａｂｃａｍ ａｂ６６４０；１：１００）を用いて、マウスマクロファージを可視化した。ホルマリン固定マウス組織をキシレン及びエタノール洗浄で脱パラフィンした後、ＶｅｎｔａｎａＣＣ１の製品使用の推奨に従って抗原を賦活化した。免疫組織化学染色は、Ｖｅｎｔａｎａ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ＸＴ機器を用い、Ｖｅｎｔａｎａ ＤＡＢ Ｍａｐ検出キット（７６０－１２４）を用いて行った。切片をヘマトキシリンで対比染色した。ＦＩＴＣ及びテキサスレッド結合二次抗体を、免疫蛍光染色中に用いた。ＤＡＰＩを用いて核を可視化した。共焦点蛍光顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）によってシグナルを可視化した。

【０１３９】

Ｈｕｈ－７トランスフェクション及び効力アッセイ

トランスフェクションの前日、肝臓の肝細胞株Ｈｕｈ－７をウェルあたり３ｘ１０^{5}細胞の細胞密度で１２ウェルプレートにプレーティングした。トランスフェクションのために、ＦｕＧＥＮＥをプラスミド１μｇあたり４μｌの比率で用い、１０％の血清（ウシ胎児血清、ＦＢＳ）の存在下でＨｕｈ－７細胞に一晩添加した。トランスフェクション培地を交換し、細胞をインスリン－トランスフェリン－セレン（ＩＴＳ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び２５ｍＭ Ｈｅｐｅｓ緩衝液を添加した培地で２４時間インキュベーションした。Ｈｕｈ－７細胞の形質導入を、血清の存在下で２４時間、定められた感染多重度（ＭＯＩ）で行い、その後、培地を交換し、新鮮な培地中で２４時間インキュベーションした。上記の通り、２０μｌの培地を用いて、４ＭＵ－Ｇｌｃを基質として用いてＧＣａｓｅ活性を測定した。

【０１４０】

統計分析

Ｐｒｉｓｍ ７（Ｇｒａｐｈ Ｐａｄ）ソフトウェアを用いて統計解析を行った。カラム解析は一元配置分散分析により行った。Ｐ値及び試料サイズは図の説明に示す。

【０１４１】

生物学的利用能（ＡＵＣ）を概算するために、ＧｒａｐｈＰａｄＰｒｉｓｍにおいて、１フェーズ減衰モデル方程式：Ｙ＝（Ｙ０－プラトー）＊ｅｘｐ（－Ｋ＊Ｘ）＋プラトーを用いた。Ｙ０は、Ｘ（時間）がゼロのときのＹの値であり、Ｙと同じ単位で表される。プラトーは、時間無限大におけるＹの値であり、Ｙと同じ単位で表される。Ｋは、速度定数であり、Ｘ軸の時間単位の逆数で表される（即ち、Ｘが分単位の場合、Ｋは分－１で表される）。タウは時定数であり、Ｘ軸と同じ単位で表され、Ｋの逆数として計算される。半減期はＸ軸の時間単位であり、ｌｎ（２）／Ｋとして計算される。スパンは、Ｙ０とプラトーの差であり、Ｙ値と同じ単位で表される。ＡＵＣの計算のために、線形台形法を用いた。ＡＵＣはＵ＊ｈ／Ｌとして表され、１ユニットは３７℃で１μｍｏｌ／ｈの４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド基質を加水分解するのに必要な酵素の量として定義される。

【０１４２】

実施例２－ＧＢＡコンストラクト

肝臓指向性遺伝子治療アプローチをゴーシェ病（ＧＤ）の治療に用い得るか否かを評価するために、（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿０００１５７．３；配列番号９に見出される通りの）ヒトの全長ＧＢＡコード配列を、肝臓特異的プロモーターにドライブされるアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターにクローニングした。ＦＬＦ－ＰＬ０１ＡＡＶコンストラクト（図１Ａ）においては、ＧＢＡ野生型配列（ＧＢＡｗｔ、非コドン最適化）が、本明細書中「ＬＳＰ－Ｓ」（配列番号１０）と称される肝臓特異的プロモーターによってドライブされる。発現に最適な配列を決定するために、いくつかの異なるコドン最適化戦略を用いて配列を設計した。一例のＡＡＶコンストラクト（ＦＬＦ－ＰＬ２８）においては、ＧＢＡコドン配列が最適化されていて、同じ肝臓特異的プロモーターＬＳＰ－Ｓによってドライブされる（図１Ｂ）。ＦＬＦ－ＰＬ６４コンストラクトはＦＬＦ－ＰＬ２８と同じＧＢＡコドン最適化配列を含有するが、ＬＳＰ－Ｓの代わりに本明細書中「ＬＳＰ－Ｌ」（配列番号１４）と称されるより長い転写調節エレメントを含有する点で異なる（図１Ｃ）。

【０１４３】

実施例３－野生型ＧＢＡ導入遺伝子発現の解析

（野生型）ＧＢＡコンストラクトＦＬＦ－ＰＬ０１が肝臓での発現及びそれに続くβ－グルコセレブロシダーゼ（ＧＣａｓｅ）の血流への分泌をもたらし得るか否かを評価するために、ＦＬＦ－ＰＬ０１をＡＡＶ２／８に偽型化した。ｒＡＡＶ粒子は、マウスで用いる前に、上記の通り産成及び力価測定し、アルカリゲル解析によって特性解析した。８週齢の野生型（Ｃ５７ＢＬ／６）マウスを、６ｘ１０^{11}～６ｘ１０^{12}ｖ／ｋｇの範囲の用量でＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ０１の単回注射で処置した。対照（ナイーブ）マウスは未治療のままにした。ＡＡＶ注射の４、８、及び１２週間後に血清試料を採取し、循環する活性のあるＧＣａｓｅレベルを評価するために用いた。ＧＣａｓｅ活性を測定し、免疫組織化学染色を上記の通り行った。切片をヘマトキシリンで対比染色した。

【０１４４】

野生型マウスにＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ０１を注射すると、処置動物の肝臓においてヒトＧＣａｓｅの発現が増大した（図２Ａ）。肝臓におけるＧＣａｓｅ発現レベルの増大が、ベクター用量の増大につれて観察でき、６ｘ１０^{11}ｖｇ／ｋｇのベクター用量の群で約１２倍、２ｘ１０^{12}ｖｇ／ｋｇの用量で４３倍、６ｘ１０^{12}ｖｇ　ｋｇの用量で５７倍の増大が観察された（図２Ｂ）。このデータは、ＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ０１が、ＧＣａｓｅの発現を、血流へのＧＣａｓｅの有意な放出と、ＧＤに罹患した組織におけるマクロファージへのアクセスの可能性をもたらすレベルまでドライブしたことを示している。

【０１４５】

実施例４－コドンが最適化されているコンストラクトからのインビトロＧＣａｓｅ発現の解析

成熟ＧＣａｓｅタンパク質（シグナルペプチドをコードする領域ではない）に対応するストレッチ全体でコドンが最適化されているＧＢＡ配列を作製するために、様々な肝臓発現配列のコドン使用表を用いた。次いで、１の、かかる、コドンが最適化されているＧＢＡ配列（「ＦＬＦ－ＰＬ３６」）を除いて、得られた配列を更に手動で変更して、ＣｐＧ、潜在的スプライス部位、未成熟終止コドン、及び不要なアミノ酸置換を除去した。２１の、コドンが最適化されているＧＢＡ配列を作製し、ヒト肝細胞株Ｈｕｈ－７におけるトランスフェクションに際してＧＣａｓｅ発現レベルについて試験した。Ｈｕｈ－７細胞をウェルあたり３ｘ１０^{5}の細胞密度で１２ウェルプレートにプレーティングし、上記の通りトランスフェクトした。２０マイクロリットルの培地を用いて、４ＭＵ－Ｇｌｃを基質として用いてＧＣａｓｅ活性を測定した。この解析の結果により、Ｈｕｈ－７細胞におけるトランスフェクションに際して（野生型ＧＢＡ配列、ＦＬＦ－ＰＬ０１と比較して）、ＧＣａｓｅの発現の増大を実証したＧＢＡコドン最適化（ＦＬＦ－ＰＬ２１、－ＰＬ２８、－ＰＬ３０、及び－ＰＬ３６）の特定が可能になった。（図３）。

【０１４６】
実施例５－コドンが最適化されているコンストラクトからのインビボＧＣａｓｅ活性の解析
実施例４で同定された４のコンストラクト（ＦＬＦ－ＰＬ２１、ＦＬＦ－ＰＬ２８、ＦＬＦ－ＰＬ３０及びＦＬＦ－ＰＬ３６）を、ＡＡＶ２／８として偽型化し、２×１０^{12}ｖｇ／ｋｇの用量で野生型マウスに注射した。実験には、コドンが最適化されていないコンストラクトＦＬＦ－ＰＬ０１、及び強力な合成プロモーターＣＡＧによってドライブされる、ＦＬＦ－ＰＬ０１と同じ野生型ＧＢＡ配列を含有するコンストラクト（ＦＬＦ－ＰＬ３７）も含めた。対照（ナイーブ）マウスは未治療のままにした。注射後最大３６週間の時点で、動物を　　殺し、血清及び組織試料を採取した。
【０１４７】
図４Ａは、ＬＳＰ－Ｓプロモーター（ＦＬＦ－ＰＬ０１）によってドライブされるコドンが最適化されていないＧＢＡ配列、やはりＬＳＰ－Ｓプロモーターによってドライブされる、コドンが最適化されているＧＢＡコンストラクト（ＦＬＦ－ＰＬ２１、ＦＬＦ－ＰＬ２８、ＦＬＦ－ＰＬ３０及びＦＬＦ－ＰＬ３６）、及びＣＡＧプロモーターによってドライブされる、ＧＢＡのコドンが最適化されていない配列（ＦＬＦ－ＰＬ３７）のいずれかを注射したマウスで見出される、ＧＣａｓｅ活性の注射後８週間の結果を示す。４の、ＧＢＡのコドンが最適化されているコンストラクトはすべて、ＦＬＦ－ＰＬ０１と比較して、マウスに注射したときに血流に存在するＧＣａｓｅ活性のレベルの増大を示した（図４Ａ）。ＦＬＦ－ＰＬ２８コンストラクトは、同じＬＳＰ－Ｓプロモーターによってドライブされる、コドンが最適化されていないコンストラクト（ＦＬＦ－ＰＬ０１）と比較して、血流へのＧＣａｓｅ放出における最大の増大（約６倍）を示した。ＦＬＦ－ＰＬ０１と比較した、ＦＬＦ－ＰＬ２８によってドライブされるＧＣａｓｅのレベルの上昇は、３６週間の研究期間を通して観察された（図４Ｂ）。
【０１４８】
特に注目すべきことに、肝臓特異的プロモーターを含有するＦＬＦ－ＰＬ２８を注射したマウスで観察されたＧＣａｓｅのレベルが、野生型ＧＢＡ配列が、遍在する強力なＣＡＧプロモーターから発現するＦＬＦ－ＰＬ３７コンストラクトによってドライブされるＧＣａｓｅレベルと同じだけ高かった（図４Ａ）。
【０１４９】
最終段階で、脾臓と骨髄を採取し、ホルマリン中で固定した後、パラフィン包埋した。パラフィン切片に対して行ったＧＢＡ免疫染色解析により、循環ＧＣａｓｅレベルと整合して、ＧＣａｓｅの組織取り込みが、非コドン最適化コンストラクトＦＬＦ－ＰＬ０１と比較して、ＦＬＦ－ＰＬ２８ＧＢＡコドン最適化コンストラクトで処理したマウスにおいて増大することを示している（図５）。
【０１５０】
ＦＬＦ－ＰＬ２８による肝臓指向性ＧＢＡ発現に際して、脾臓におけるマクロファージ取り込みのレベルを評価するために、マウス汎マクロファージマーカーＦ４／８０及びＧＢＡ抗体による免疫蛍光解析を行った。Ｆ４／８０陽性細胞の大部分は、ヒト特異的ＧＢＡの発現を示し、脾臓におけるＧＣａｓｅ取り込みの大部分がマクロファージで起こることが示唆されている（図６）。
【０１５１】
実施例６－インビボＧＣａｓｅ活性に対するプロモーターの効果の解析
プロモーター改変がＧＢＡコドン最適化配列からの発現を更に増大させることができるか否かを試験するために、ＦＬＦ－ＰＬ２８からのＧＢＡコンストラクトを肝臓特異的プロモーター（本明細書では「ＬＳＰ－Ｌ」と称される；配列番号１４）下に配置し、コンストラクトＦＬＦ－ＰＬ６４を作製した（実施例２、図１Ｃ）。
【０１５２】
ＡＡＶ２／８ベクターを新しいコンストラクトで調製し、２ｘ１０^{12}ｖｇ／ｋｇの用量で野生型マウスに注射した。対照（ナイーブ）マウスは未治療のままにした。５週間後、動物を　　殺し、血清及び組織を採取した。

【０１５３】
血清中のＧＣａｓｅ活性解析により、ＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ６４が、ＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ２８で処置されたマウスと比較して、マウス血流中のＧＣａｓｅの発現の増大（約２．５倍、Ｐ＝０．０００１、一元配置分散分析）をもたらすことが示される（図７）。
【０１５４】
コンストラクトＦＬＦ－ＰＬ２８と同様に、ＦＬＦ－ＰＬ６４は、脾臓、骨髄及び肺等の（ｓｕｃｈ ｓｐｌｅｅｎ，ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ａｎｄ ｌｕｎｇ）ＧＤ標的組織へのＧＣａｓｅの確固とした取り込みを可能にする（図８）。
【０１５５】
実施例７－ＧＢＡコンストラクトによるＡＡＶベクターからの肝臓発現選択性
肝細胞株に対するＬＳＰ－Ｌプロモーターの選択性を解析するために、さまざまな組織から８のヒト由来細胞株を選択した。各細胞株とその起源の詳細を、以下の表にまとめる。
【０１５６】
【表３】

表 1. 本実施例において評価されたヒト由来細胞株

細胞株	起源	増殖	起源の種
HUH-7	肝細胞がん (肝臓)	接着性	ヒト
HEK293T	腎臓	接着性	ヒト
PANC-1	膵臓 (類上皮がん)	接着性	ヒト
BxPC-3	膵臓 (腺がん)	接着性	ヒト
MCF7	乳房 (上皮; 腺がん)	接着性	ヒト
1643	神経芽細胞腫	接着性	ヒト
MRC-9	正常肺線維芽細胞 (胚)	接着性	ヒト
697	B 細胞白血病 (初期 B 細胞)	懸濁	ヒト

【０１５７】
上記の表１に記載されている８のヒト由来細胞株を、１０％ＦＢＳを添加したＤＭＥＭ、ＩＭＤＭ、又はＲＰＭＩ培地のいずれかで増殖させた。各細胞株について、２ｘ１０^{4}細胞／ウェルを、ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４（肝臓指向性キャプシドを有するＡＡＶ＝配列番号２０）で、１ｘ１０^{5}ｖｇ／細胞の感染多重度（ＭＯＩ）で形質導入した。すべての実験はデュプリケートで実施した。懸濁液中の細胞を計数し、無血清培地（３００μｌ／ウェル）中で形質導入し、４８ウェルプレートに入れた。接着細胞株については、培地を吸引し、続いてＰＢＳ（１Ｘ）で洗浄し、５ｍｌのＴｒｉｐＬＥで３７℃、５％CO_2で５分間処理して細胞を解離させた。５ｍｌの完全培地を加えることにより反応を停止させた。解離した細胞は、Ｃｏｕｎｔｅｓｓ（商標）ＩＩ Ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｅｒ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を用いて計数し、遠心分離（２５０ｘｇで５分間）した後、２ｘ１０^{5}細胞／ｍｌの密度で完全培地に再懸濁した。これらの細胞を９６ウェルプレート（２ｘ１０^{4}細胞／ウェル）にプレーティングし、形質導入前に５時間接着させた。形質導入ミックスをＸ－ＶＩＶＯ培地（５０μｌ／ウェル）で調製し、細胞に加えた。３時間後、１００μｌ／ウェルの完全培地を加えた。形質導入の１日後、各細胞株についての培地を完全培地（＋２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ（分泌解析のため））に交換した。

【０１５８】
ＧＣａｓｅ活性は、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を基質として蛍光測定で測定した。
【０１５９】
各細胞株についての培養上清からＧＣａｓｅ活性を測定し、ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４による形質導入後に分泌されたＧＣａｓｅのレベルを測定した（図１０）。ＬＳＰ－ＬプロモーターがｇＢＡ導入遺伝子をドライブする場合、ＧＣａｓｅ分泌はＨＵＨ－７細胞株で唯一検出された。ＨＵＨ－７細胞で観察された活性のあるＧＣａｓｅのレベルは、約５．０ｎｍｏｌ／時間／ｍｌ［５．１±０．１ｎｍｏｌ／時間／ｍｌ］であった。解析した他の細胞株のいずれについても、検出可能なレベルの活性のあるＧＣａｓｅは観察されなかった。
【０１６０】
実施例８－ＥＲＴ療法との比較
本実施例の目標は、マウスに単回注射として投与した場合において、ＦＬＦ－ＰＬ６４とＶＰＲＩＶ（登録商標）（６０Ｕ／ｋｇ体重）とを比較することであった。ＶＰＲＩＶ（登録商標）は、天然酵素であるＧＣａｓｅ（即ち、配列番号２５）と同じアミノ酸配列及び類似のグリコシル化パターンを含有し、従って好適な比較を提供する。酵素補充療法（ＥＲＴ）を受けている患者は、典型的には、隔週でＥＲＴのＩＶ注入（注入時間は１～２時間、ＶＰＲＩＶ（登録商標）の臨床用量は６０Ｕ／ｋｇ）で治療される。
【０１６１】
注入用の溶液を調製するためのＶＰＲＩＶ（登録商標）粉末（４００ユニット、Ｓｈｉｒｅ）を入手し、冷蔵下及び光からの保護下で再構成するまで維持した。製造業者による推奨の通り、１のバイアル（４００Ｕ）を４．３ｍｌの滅菌水で再構成し、１００Ｕ／ｍｌの溶液を得た。再構成後、ＶＰＲＩＶ溶液を使い捨てのアリコートとして即急速凍結し、後に用いるために（－８０℃）で保存した。
【０１６２】
ＶＰＲＩＶ（登録商標）（６０Ｕ／ｋｇ体重）又はＦＬＦ－ＰＬ６４（ＡＡＶ２／８粒子、2×10^{12} ｖｇ／ｋｇとして製剤化）のいずれかの単回ＩＶ注射を野生型マウスに施した。血清及び組織中の活性のあるＧＣａｓｅのレベルを、最大１週間のさまざまな時点で、また注射後３週間及び５週間でも測定した。活性のあるＧＣａｓｅのレベルを、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－Ｇｌｃ）を用いて蛍光測定で測定した。
【０１６３】
図１１（Ａ）に示す通り、ＶＰＲＩＶはマウスの血液から急速に除去される。ＶＰＲＩＶは、注射後２分で１２．７μｍｏｌ／時間／ｍｌのＣｍａｘに達した。推定半減期は約５．６分である。注射後約２０分で、血清中には残存レベルの活性のあるＧＣａｓｅしか検出できなかった。これらのレベルは、研究期間の残りの間、未処理の対照に近いままであった。ＶＰＲＩＶとＦＬＦ－ＰＬ６４との比較を、ＧＣａｓｅの発現が安定しているマウスを解析することによって行った（図１１Ｂ）。ＦＬＦ－ＰＬ６４での処理によっても、マウス血液中の活性のあるＧＣａｓｅのレベル増大がもたらされた（Ｃｍａｘ　９．４μｍｏｌ／時間／ｍｌ）（図１１Ｂ）。しかし、活性のあるＧＣａｓｅのレベルは、ＶＰＲＩＶ（登録商標）注射後に観察されたほど高くはなかったものの、これらのレベルは研究期間中一定のままであった。以下の表２は、ＥＲＴ又はＦＬＦ－ＰＬ６４のいずれかの注射後のマウスにおける２週間の間隔内で予測される生物学的利用能を示している。
【０１６４】

【表４】

表 2. C57BL / 6 マウスの、ERT（60 U / kg 体重）又は AAV-FLF-PL64（$2x10^{12}$ vg / kg）の単回注射に際しての、2 週間の間隔内での予測生物学的利用能（AUC）。

	ERT (VPRIV (登録商標))	FLF-PL64
$AUC_{2\text{週間}}$ (分 U/ml)	18.6 ± 5.6	3,161.6 ± 348.2

【０１６５】

図１２は、ＶＰＲＩＶ（登録商標）又はＡＡＶ２／８－ＦＬＦ－ＰＬ６４の投与後のマウス肝臓、脾臓、及び骨髄におけるＧＣａｓｅ免疫染色を示す。各動物群についての代表的な画像を示す。ＤＡＢ（３，３’－ジアミノベンジジン）を用いてＧＣａｓｅを可視化し、ヘマトキシリンを対比染色として用いた。ＦＬＦ－ＰＬ６４で処置した試料は、注射後５週間目で取得したが、ＶＰＲＩＶ（登録商標）で処置した試料は表示の通り採取した。画像の半定量的解析を以下の表３に示す。

【０１６６】

【表５】

表 3：ERT（VPRIV（登録商標））又は FLF-PL64 のいずれかの投与後にマウスの肝臓、脾臓、及び骨髄で観察された GCase 免疫反応性の相対的レベル。「-」は GCase についての染色陰性を指す。「+」は GCase の染色陽性を表す。

群	肝臓	脾臓	骨髄
ナイーブ	-	-	-
ERT – 20 分	+	++	++
ERT – 60 分	+	+++	++
ERT – 240 分	+	-/+	-
ERT – 1440 分	-/+	-	-
FLF-PL64	+++	+++	++/+++

【０１６７】

実施例９－治療の可能性に関するインビボ研究

１．方法

マウスの方法

本研究においては、ゴーシェ病モデルとして、Ｇｂａ１変異Ｄ４０９Ｖ／Ｄ４０９Ｖ（９Ｖ／９Ｖ）を保有する９Ｖ／ｎｕｌｌマウスを用いた。９Ｖ／ｎｕｌｌマウスの寿命はほぼ正常で、内臓の異常（炎症及び貯蔵細胞）並びに基質の蓄積が伴う（Ｘｕ ｅｔ ａｌ．Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ．２００３ Ｎｏｖ；１６３（５）：２０９３－１０１；Ｘｕ ｅｔ ａｌ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１０ Ｍａｙ ２０；５（５）：ｅ１０７５０）。９Ｖ／ｎｕｌｌマウスは、Ｇｂａ１変異Ｄ４０９Ｖ／Ｄ４０９Ｖ（９Ｖ／９Ｖ）を保有するマウスとＧｂａ１ ｎｕｌｌ／ＷＴとを交配することによって作製した。各同腹子で約２の９Ｖ／ｎｕｌｌが生じる。９Ｖ／ｎｕｌｌ及びＷＴマウスの系統背景は、Ｃ５７ＢＬ／６、１２９ＳｖＥｖＢｒｄ及びＦＶＢである。複数の同腹子からの９Ｖ／ｎｕｌｌマウスを、各処置群に順次、無作為に割り当てた。雄性及び雌性の両方のマウスを、各群に登録

し、群内の性別の釣り合わせるようにした。すべてのマウスは病原体のない条件下で飼育し、毎日モニタリングし、毎週体重を測定した。すべてのＡＡＶ処置マウスは正常な成長及び体重増加を示した。

【０１６８】

研究の終わりに、マウスをペントバルビタール（１００ｍｇ／ｋｇ）で安楽死させた。マウスを生理食塩水で経心的に灌流した。次に、肝臓、脾臓、及び肺を摘出した。

【０１６９】

ＡＡＶ／ＶＰＲＩＶの調製及び投与

ＡＡＶ８－ＦＬＦ－ＰＬ６４のアリコートを－８０℃で保存した。注射前に、アリコートを氷上で解凍し、Ｘ－ＶＩＶＯ　１０（Ｌｏｎｚａ，ｐＨ７．４，４℃）で希釈し、低速で短時間ボルテックスにより穏やかに混合した。希釈したＡＡＶは注射前に氷上に保ち、２時間以内に用いた。

【０１７０】

ＶＰＲＩＶ（登録商標）を再懸濁して分注し（２５、５０、１００μｌ）、－８０℃で保存した。注射前に、アリコートを氷上で解凍し、酸性化したＸ－ＶＩＶＯ　１０（Ｌｏｎｚａ，ｐＨ５．５，４℃）で表示された用量に希釈し、低速で短時間のボルテックスにより穏やかに混合した。希釈した酵素は注射前に氷上に保ち、２時間以内に用いた。

【０１７１】

ＡＡＶ（２ｘ１０^{12}ｖｇ／ｋｇ）及びビヒクル（Ｘ－ｖｉｖｏ）を、８週齢の９Ｖ／ｎｕｌｌマウスに、５μＬ／ｇ体重（ＢＷ）の表示用量で１回投与した。ＷＴマウスにはビヒクルを投与した。ＡＡＶ及びビヒクルの投与は、短時間のイソフルラン下で、マウスへ、尾静脈を介して行った。ＶＰＲＩＶ（登録商標）を、バイオバブルルームで、イソフルラン及び酸素の混合物で麻酔された９Ｖ／ｎｕｌｌマウスに、６０Ｕ／ｋｇ及び２．５μＬ／ｇ　ＢＷで、尾静脈ボーラス注射によって投与した。８週齢から開始して、７回の注射のために、隔週で投与した。

【０１７２】

組織採取

血液（約１００μＬまで）を、１２週齢、１６週齢、及び２０週齢で、尾静脈から、０．５Ｍ　ＥＤＴＡ（５μＬ）を含有するチューブに採取した。新たに採取した血液試料を氷上に保ち、血漿に分離して２時間以内にＧＣａｓｅ活性についてアッセイした。ＶＰＲＩＶ（登録商標）処置群からの各血漿収集及び活性アッセイを、予定された酵素注射後２時間以内に行った。血液の一部（約４００μＬ）を別に処理して、ＧＣａｓｅ活性アッセイ用の白血球（ＷＢＣ）を単離した。採取したＷＢＣは－８０℃で保存した。

【０１７３】

実験の終了時（２０週齢）に、組織（肝臓、肺、脾臓、骨髄）を採取した。ＶＰＲＩＶ（登録商標）群からの組織採取は、最終的に予定されている酵素注射後２時間以内に行った。肝臓、肺、脾臓の試料を４の部分に分け、３部分を個別のチューブで凍結し、ＧＣａｓｅ活性アッセイ、タンパク質及び基質解析に先立ち－８０℃で保存した。残りの部分は、組織学的解析のために１０％ホルマリン中で固定した。マウスの両脚の大腿骨及び脛骨から骨髄細胞を採取し、ＧＣａｓｅ活性及び基質アッセイのために－８０℃の冷凍庫に保存した２本のチューブ中に凍結した。

【０１７４】

ＧＣａｓｅ活性アッセイ

Ｐｒｅｃｅｌｌｙｓ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ組織ホモジナイザーを用いて４℃で２サイクル（各２０秒、３０秒間隔）の間、組織を１％タウロコール酸ナトリウム及び１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｔｃ／Ｔｘ）でホモジナイズした。細胞（骨髄（ＢＭ）及び白血球（ＷＢＣ））を１％Ｔｃ／Ｔｘ中で４℃での超音波処理によりホモジナイズした。組織及び細胞の溶解物（２μＬ）をアッセイ混合物中の反応緩衝液（０．０２５Ｍクエン酸－リン酸緩衝液、ｐＨ５．６）で希釈（５ｘ）した。希釈した溶解物（１０μＬ）（試料ごとにトリプリケートで）を反応プレートに充填した。ＧＣａｓｅ活性を、３７℃で１時間イ

ンキュベーションした２ｍＭコンズリトールＢエポキシド（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ．ＣＡ）の存在下及び非存在下で、４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－グルコース，４ｍＭ）（Ｂｉｏｓｙｎｔｈ ＡＧ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて蛍光測定で測定した。タンパク質濃度は、ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を用いて測定した。

【０１７５】

血漿を０．０２５Ｍクエン酸－リン酸緩衝液、ｐＨ５．６中に希釈した。ＧＣａｓｅ活性は、上記の通り４－メチルウンベルリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４ＭＵ－グルコース，４ｍＭ）（Ｂｉｏｓｙｎｔｈ ＡＧ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて蛍光測定で測定した。

【０１７６】

基質解析

凍結組織の重量を量り、３．６ｍＬのメタノール／クロロホルム／H_2O（２：１：０．６ｖ／ｖ／ｖ）中でホモジナイズした。溶解物のアリコート（５００μＬ）をＬＣ／ＭＳ解析に供した。定量化されたヘキソシルセラミド及びヘキソシルスフィンゴシンを、組織重量によって正規化した。

【０１７７】

血漿を水中に希釈（４０μＬ血漿＋６０μＬ水）し、ＬＣ／ＭＳ解析に供した。基質レベルを血漿量によって正規化した。

【０１７８】

骨髄細胞を２００μＬの水に懸濁し、超音波処理及びボルテックスして細胞溶解物を作成した。１６０μＬの溶解物をＬＣ／ＭＳ解析に供した。残りの溶解物をタンパク質濃度について測定した。基質レベルをｍｇタンパク質によって正規化した。

【０１７９】

ヘキソシルセラミド及びヘキソシルスフィンゴシン濃度を解析するために、ＬＣ／ＭＳ解析を行った。このマウスモデルではガラトシルセラミド及びガラトシルスフィンゴシンのレベルが非常に低いため、測定されたヘキソシルセラミド及びヘキソシルスフィンゴシンの濃度は、それぞれグルコシルセラミドとグルコシルスフィンゴシンのレベルを表している。

【０１８０】

組織学解析

肝臓、肺、脾臓及び骨髄を生理食塩水灌流マウスから摘出し、ホルマリン（１０％）中で固定し、パラフィン包埋した。固定した組織を４μｍの切片に切断し、スライド上にマウントした。

【０１８１】

貯蔵細胞数

Ａｕｔｏｓｔａｉｎｎｅｒ（Ｌｅｉｃａ Ａｕｔｏｓｔａｉｎｎｅｒ ＸＬ）により、組織切片をヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した。染色した組織をＡｐｅｒｉｏ ＡＴ２（Ｌｅｉｃａ，４０Ｘ）でスキャンした。組織画像をＡｐｅｒｉｏ ＩｍａｇｅＳｃｏｐｅ（Ｖ１２．４．０．０５４３）で処理した。１マウスあたり肝臓及び肺からの２０Ｘの倍率の１０枚の写真（５００μｍ Ｘ ８００μｍ画像）を解析用に選択した。各画像から貯蔵細胞を計数した。データグラフのために、１０枚の画像からの細胞数の平均を算出した。「貯蔵細胞」の定義は、細胞（マクロファージ）のサイズに基づいており、例えば、肝臓中の貯蔵細胞のサイズは＞１０μｍ、肺中は＞１５μｍである。

【０１８２】

ＣＤ６８染色及び定量化

組織切片を、Ｄｉｓｃｏｖｅｒ Ｕｌｔｒａ自動ＩＨＣ／ＩＳＨスライド染色機中でウサギ抗マウスＣＤ６８抗体（１：２５．Ａｂｃａｍ Ａｂ５３４４４）で染色した。組織を、細胞核に対してヘマトキシリンで対比染色した。染色した組織をＡｐｅｒｉｏ ＡＴ２（Ｌｅｉｃａ，４０Ｘ）でスキャンし、画像をＡｐｅｒｉｏ ＩｍａｇｅＳｃｏｐｅ（

Ｖ１２．４．０．０５４３）により取得した。
【０１８３】
２０倍の倍率（５００μｍ Ｘ ８００μｍ）での肝臓及び肺の画像を定量解析用に用いた。１マウスあたり肝臓又は肺の５画像からのＩＨＣシグナルを、Ｉｍａｇｅ Ｊ（Ｆｉｊｉ，ｖ５．１）を用いて解析した。データグラフのために、１マウスあたりの平均ＣＤ６８シグナルを算出した。
【０１８４】
統計解析
データを、スチューデントのｔ検定又は一元配置分散分析によって解析した。図のグラフと統計解析は、ＰＲＩＳＭ ８ソフトウェア（ＰＲＩＳＭバージョン８．０．１）によって作製した。
【０１８５】
２．結果
ＧＣａｓｅ活性
９Ｖ／ｎｕｌｌマウス中の活性のあるＧＣａｓｅレベルを回復するためのＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４処置を、細胞及び組織中のＧＣａｓｅ活性を測定することによって研究した。白血球（ＷＢＣ）、骨髄、及び組織の試料を、マウスが２０週齢のときに、上記の通りの実験終了時（即ち、ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４注射の１２週間後又は最後のＶＰＲＩＶ（登録商標）投与時）に採取した。
【０１８６】
ＶＰＲＩＶ（登録商標）は、試験したすべての細胞及び組織で活性を増大させることが示された（図１３）。上記の通り、ＶＰＲＩＶ（登録商標）治療群の組織は、最後の注射後２時間以内に採取した。これは、ＶＰＲＩＶ（登録商標）が組織内でＣ－ｍａｘにある期間内であることを示す以前のデータと一致している。
【０１８７】
ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４も、たった１回の投与後に、すべての組織中でＧＣａｓｅ活性を有意に増大させることが示された（図１３）。Ｖｅｈｉｃｌｅ－９Ｖ／ｎｕｌｌと比較して、肝臓のＧＣａｓｅ活性は４．７倍増大し、脾臓のＧＣａｓｅ活性は２．５倍増大した。白血球においては、ＧＣａｓｅ活性がＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４治療群において７～９倍有意に増大するととらえられた。特に、白血球におけるＧＣａｓｅ活性レベルはＷＴ活性レベルの約８２％に達した。
【０１８８】
組織の組織学
９Ｖ／ｎｕｌｌマウスにおける内臓病状は、泡沫状マクロファージを貯蔵細胞として計数し、活性化マクロファージ上のＣＤ６８染色シグナルを定量することによって測定した。貯蔵細胞は、Ｈ＆Ｅ染色した肝臓切片中で計数した。ＣＤ６８シグナル（茶色）の強度は、抗ＣＤ６８抗体で染色された肝臓及び肺の切片で定量化した。
【０１８９】
肝臓中のサイズが１０μｍ以上の貯蔵細胞は、各マウスの１組織あたり１０枚の画像から計数した。肝臓においては、ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４処置群及びＶＰＲＩＶ（登録商標）群において貯蔵細胞の数が検出不能であった。（図１４）
【０１９０】
肝臓におけるＣＤ６８のシグナルも、ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４治療群で有意に減少した。ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４処理により、ＣＤ６８のシグナルがビヒクル－９Ｖ／ｎｕｌｌレベルの約２５％に低下した。比較すると、ＶＰＲＩＶ群におけるＣＤ６８のシグナルはビヒクル－９Ｖ／ｎｕｌｌのレベルの約３７％であった。（図１４）
【０１９１】
基質の蓄積
９Ｖ／ｎｕｌｌマウスは、肝臓、肺及び脾臓に糖脂質基質の蓄積を起こすことが知られている（Ｘｕ ｅｔａｌ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１０ Ｍａｙ ２０；５（５）：ｅ１０

７５０）。例えば、本研究では、対照のＶｅｈｉｃｌｅ－９Ｖ／ｎｕｌｌ群におけるヘキソシルセラミドが、ＷＴレベルを、肝臓において７．９７倍、脾臓において３．５７倍上回っていることが示された（データ示さず）。

【０１９２】

ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４処理群では、Ｖｅｈｉｃｌｅ－９Ｖ／ｎｕｌｌと比較して、肝臓及び脾臓においてヘキソシルセラミド及びヘキソシルスフィンゴシンの有意な低下が示された（図１５）。特に、ＡＡＶ－ＦＬＦ－ＰＬ６４処理群では、ヘキソシルセラミドレベルが、肝臓において野生型レベルの１．２０倍に、脾臓において野生型レベルの１．０３倍に低下した（データ示さず）。骨髄の解析に際しては、同様の、ＷＴレベルに近い低下が見られた（データ示さず）。

【０１９３】

一方、ＶＰＲＩＶ（登録商標）処置では、肝臓におけるヘキソシルセラミドの有意な低下のみが示され、他の試験組織ではヘキソシルセラミドレベルの有意な変化は示されなかった。ＶＰＲＩＶ（登録商標）は、試験した組織のいずれにおいてもヘキソシルフィンゴシンレベルに何ら有意な影響を与えているようではなかった。

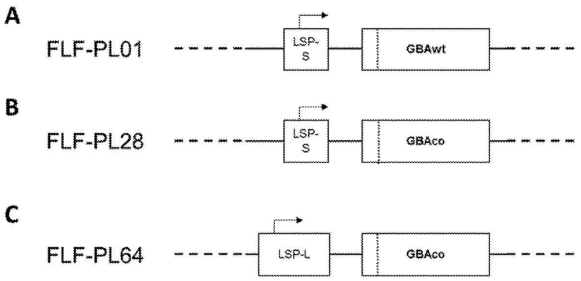
【０１９４】

本発明は例として記載しているが、該例は決して限定することを意味するものではなく、以下の特許請求の範囲内で変更を行い得ることは、当然に理解される。本発明の各実施形態の好ましい特徴は、他の実施形態のそれぞれについて、必要な変更を加えて行う。本明細書中に引用される特許及び特許出願を含むがこれらに限定されないすべての刊行物は、個々の刊行物が参照により本明細書に組み込まれることが具体的且つ個別に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

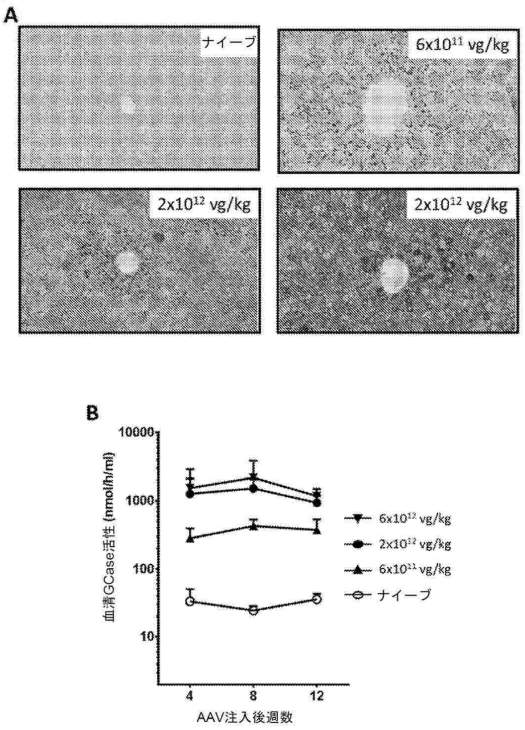
【図１】

図1



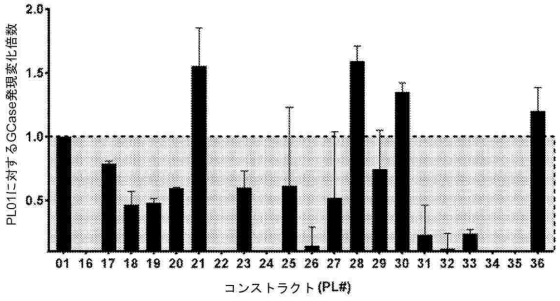
【図２】

図2



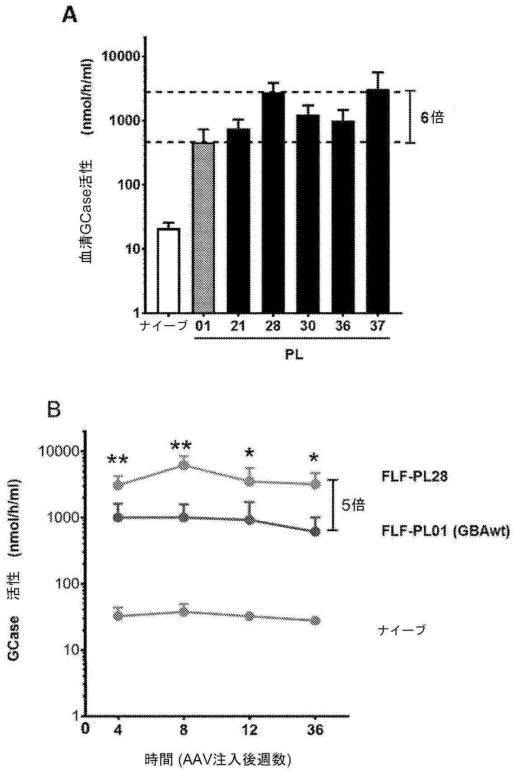
【図３】

図3



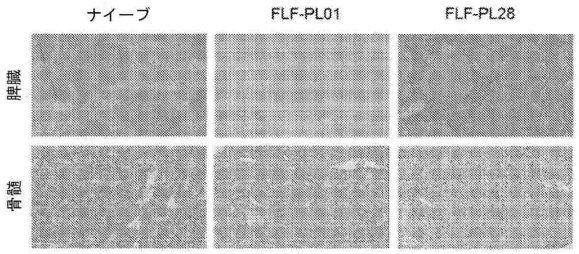
【図４】

図4



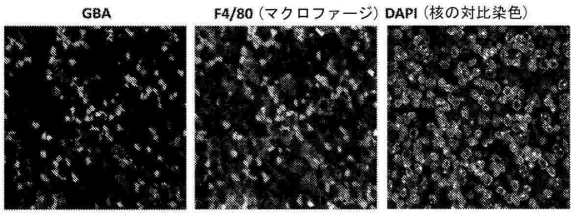
【図５】

図5



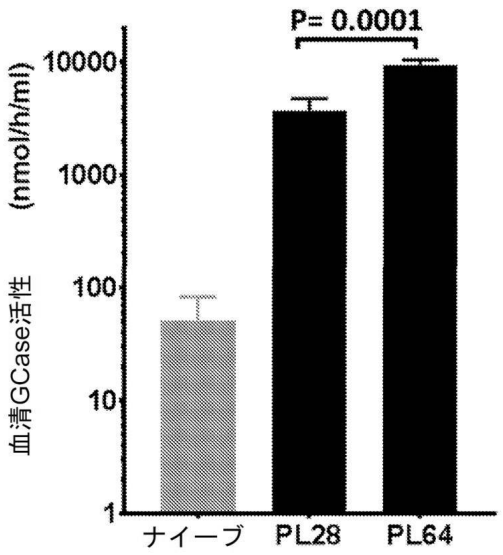
【図６】

図6



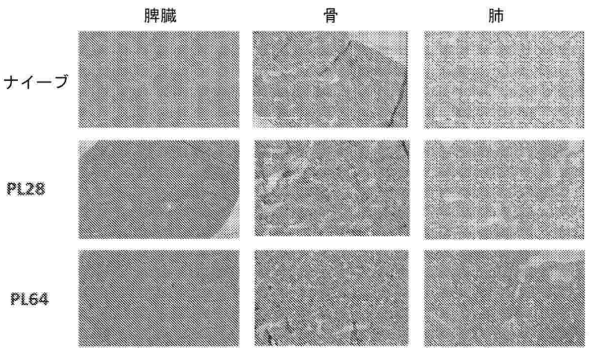
【図７】

図7



【図８】

図8



【図９－１】

図9

配列番号1－シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL28由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

GCCAGGCCCTGCATCCCTAAGAGCTTTCGGCTACAGCTCTGTGGTGTGTGTGTGCAATGCCACCTAC
TGTGACAGCTTTGACCCCCCCACCTTTCCTGCCCTGGGCACCTTCAGCAGATATGAGAGCACCAGGT
CTGGGAGGAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACTGGCACTGGCCTGCTG
CTGACCCTGCAGCCTGAGCAGAAGTTCCAGAAAGTAAAGGGCTTTGGAGGGGCCATGACTGATGCT
GCTGCTCTGAACATCCTGGCCCTGAGCCCCCCTGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGAGCTACTTCTCTG
AGGAGGGCATTGGCTATAACATCATCAGGGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTCAGCATCAGGACCT
ACACCTATGCTGACACCCCTGATGATTTCCAGCTGCACAACTTCAGCCTGCCTGAGGAGGATACCAA
GCTGAAGATCCCACTGATCCACAGGGCTCTGCAGCTGGCCCAGAGGCCTGTGAGCCTGCTGGCCAG
CCCCTGGACCAGCCCCACTTGGCTGAAGACCAATGGGGCTGTGAATGGGAAGGGGAGCCTGAAGG
GACAGCCTGGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGC
TGAGCACAAGCTGCAGTTCTGGGCTGTGACTGCTGAGAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGCTGTCTGG
CTACCCCTTCCAATGCCTGGGCTTCACCCCTGAGCATCAGAGGGACTTCATTGCCAGGGACCTGGG
CCCTACCCTGGCCAACAGCACTCACCATAATGTTAGGCTGCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCT
GCTGCCCCACTGGGCTAAGGTGGTGCTGACTGACCCTGAGGCTGCTAAATATGTGCATGGCATTGC
TGTGCATTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCTGCCAAGGCCACCCTGGGGGAGACCACAGGCTGTTT
CCCCAACACCATGCTGTTTGCCTCTGAGGCCTGTGTGGGCAGCAAGTTCTGGGAGCAGTCTGTGAG
GCTGGGCAGCTGGGATAGGGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACCAACCTGCTGTACCATGT
GGTGGGCTGGACTGACTGGAACCTGGCCCTGAACCCTGAGGGAGGACCTAACTGGGTCAGAAACTT
TGTGGACAGCCCCATCATTGTGGACATCACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTCTACCAC
CTGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGGGCAGCCAGAGAGTGGGGCTGGTGGCCAGCCAGAA
GAATGACCTGGATGCTGTGGCTCTGATGCATCCTGATGGCTCTGCTGTGGTGGTGGTGCTGAACAG
GAGCTCTAAGGATGTGCCTCTGACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCCTGGAGACCATCAGCCC
TGGCTACAGCATCCACACCTACCTGTGGAGGAGGCAGTGA

配列番号2－シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL21由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

GCCAGGCCCTGTATCCCTAAGAGCTTtGGCTACAGCTCAGTaGTtTGTGTCTGTAATGCCACATACTG
TGACTCCTTtGACCCCCCTACCTTCCCTGCCCTGGGAACCTTCAGCAGaTATGAGTCAACAAGaTCAG
GAAGGAGGATGGAGCTGTCAATGGGACCCATCCAGGCTAATCACACAGGCACAGGCCTGCTGCTGA
CCCTGCAGCCAGAACAGAAGTTCCAGAAAGTGAAGGGATTtGGAGGAGCCATGACAGATGCTGCTG
CTCTCAACATCCTGGCCCTGTCACCCCCTGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGTCATACTTCTCTGAAGA
AGGAATTGGATATAACATCATCAGGGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCAGGACCTACACC
TATGCtGACACCCCTGATGATTTCCAGCTGCACAACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAA
GATCCCtCTGATaCAtAGgGCaCTGCAGCTGGCCCAGAGGCCtGTGTCACTCCTGGCCAGCCCCTGGA
CATCACCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCtGTGAATGGAAAGGGATCACTCAAGGGACAGCCtGG
AGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGaTACTTtGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAG
CTGCAGTTCTGGGCaGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGACTGCTGTCAGGATACCCCTTCC
AGTGTCTGGGCTTCACCCCTGAACATCAGAGGGACTTCATtGCCAGGGACCTGGGACCTACCCTtGC
CAACTCAACTCACCACAATGTCAGGCTGCTCATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCCCCACTGG
GCCAAGGTGGTGCTGACAGACCCAGAAGCtGCTAAaTATGTGCATGGCATtGCTGTGCATTGGTACC
TGGACTTCCTGGCTCCAGCCAAGGCCACCCTGGGAGAGACACACAGGCTGTTCCCCAACACCATGCT
CTTtGCCTCtGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCTGGGAGCAGTCAGTGAGGCTGGGCTCCTGGGA
TAGGGGAATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACCAACCTGCTGTACCATGTGGTGGGCTGGACTGA
CTGGAACCTGGCCCTGAACCCTGAGGGAGGACCtAACTGGGTcAGaAACTTTGTGGACAGCCCCATC
ATTGTGGACATCACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTCTACCACCTGGGCCACTTCAGCA
AGTTCATCCCTGAGGGCAGCCAGAGAGTGGGGCTGGTGGCCAGCCAGAAGAATGACCTGGATGCT
GTGGCTCTGATGCATCCTGATGGCTCTGCTGTGGTGGTGGTGCTGAACAGGAGCTCTAAGGATGTG
CCTCTGACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCCTGGAGACCATCAGCCCTGGCTACAGCATCCACA
CCTACCTGTGGAGGAGGCAGTGA

配列番号3－シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL30由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

GCCAGGCCCTGCATCCCTAAGAGCTTTGGCTACAGCTCTGTGGTGTGTGTGTGCAATGCCACATAC
TGTGACTCCTTTGACCCCCCCACCTTTCCTGCCCTGGGCACaTtccAGaTATGAGAGCACAAGATC
TGGGAGAAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACTGGCACAGGCCTGCTGCT
GACCCTGCAGCCTGAACAGAAGTTTCAGAAAgTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGC
TGCTCTGAATATCCTGGCCCTGTCACCCCCTGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGAGCTACTTTTCAGAA
GAAGGAATTGGATATAATATCATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTTTCCATCAGAACCTACA
CCTATGCAGACACCCCTGATGATTTTCAGCTGCACAATTTTAGCCTGCCTGAGGAAGATACCAAGCT
GAAGATACCCCTGATTCACAGGGCCCTGCAGCTGGCCCAGAGGCCTGTTTCACTGCTGGCCAGCCC
CTGGACATCACCCACCTGGCTGAAGACCAATGGAGCTGTGAATGGGAAGGGGTCACTGAAGGGACA
GCCTGGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTTCTGGATGCCTATGCTGA
GCACAAGCTGCAGTTTTGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCAGCTGGGCTGCTGTCAGGATA
CCCCTTTCAGTGCCTGGGCTTTACCCCTGAACATCAGAGGGACTTTATTGCCAGGGACCTGGGCCCT
ACCCTGGCCAATAGCACCCAcCAtAATGTgAGgttgCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCC
CCACTGGGCAAAGGTGGTGCTGACAGACCCTGAAGCAGCTAaaTATGTTCATGGCATTGCTGTGCA
TTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCTGCCAAGGCCACCCTGGGGGAGACACACAGGCTGTTTCCCAA
TACCATGCTGTTTGCCTCtGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCTGTGAGGCTGGG
CTCCTGGGATAGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACCAATCTGCTGTACCATGTGGTGGG
CTGGACTGACTGGAATCTGGCCCTGAATCCTGAAGGAGGACCtAaCTGGGTcAGgAATTTTGTGGAC
AGCCCCATCATTGTGGACATCACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTTACCACCTGGGCC
ACTTTAGCAAGTTTATTCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGCCAGAAGAATGACC
TGGATGCAGTGGCACTGATGCATCCTGATGGCTCAGCTGTTGTGGTGGTGCTGAATAGATCCAGCA
AGGATGTGCCTCTGACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTC
CATTCACACCTACCTGTGGAGAAGGCAGTGA

配列番号4－シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL36由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

GCCAGGCCTTGCATCCCAAAGTCTTTCGGCTACAGCTCCGTGGTGTGCGTGTGCAACGCCACCTATT
GTGACTCCTTCGATCCCCCTACCTTTCCCGCCCTGGGCACATTTTCTAGATACGAGTCTACACGCAG
CGGCCGGAGAATGGAGCTGAGCATGGGCCCTATCCAGGCCAATCACACAGGAACAGGCCTGCTGCT
GACCCTGCAGCCAGAGCAGAAGTTCCAGAAGGTGAAGGGCTTTGGCGGAGCCATGACAGATGCAGC
CGCCCTGAACATCCTGGCCCTGTCCCACCCGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGTCCTACTTCTCTGAG
GAGGGCATCGGCTATAACATCATCCGGGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTTTCCATCAGAACCTACA
CATATGCCGATACCCCTGACGATTTCCAGCTGCACAATTTTTCCCTGCCAGAGGAGGATACAAAGCT
GAAGATCCCCCTGATTCACCGGGCCCTGCAGCTGGCACAGCGGCCCGTGAGCCTGCTGGCCAGCCC
CTGGACCTCCCCTACATGGCTGAAGACCAACGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCTCTCTGAAGGGACA
GCCTGGCGACATCTACCACCAGACATGGGCCAGATATTTCGTGAAGTTTCTGGATGCCTACGCCGA
GCACAAGCTGCAGTTCTGGGCCGTGACAGCAGAGAATGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGAGCGGCTA
TCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTTACACCTGAGCACCAGCGGGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGCCC
AACCCTGGCCAACTCCACACACCACAATGTGAGGCTGCTGATGCTGGACGATCAGCGCCTGCTGCT
GCCTCACTGGGCCAAGGTGGTGCTGACCGACCCAGAGGCCGCCAAGTACGTGCACGGCATCGCCGT
GCACTGGTATCTGGATTTCCTGGCACCTGCAAAGGCCACCCTGGGAGAGACACACCGGCTGTTCCC
TAACACCATGCTGTTTGCCAGCGAGGCCTGCGTGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCCGTGAGGCT
GGGATCTTGGGACAGAGGCATGCAGTACTCCCACTCTATCATCACCAATCTGCTGTATCACGTGGTG
GGCTGGACAGACTGGAACCTGGCCCTGAATCCAGAGGGCGGCCCCAACTGGGTGAGAAATTTCGTG
GATAGCCCCATCATCGTGGACATCACCAAGGATACATTCTACAAGCAGCCAATGTTTTATCACCTGG
GCCACTTCTCTAAGTTTATCCCTGAGGGCAGCCAGAGGGTGGGCCTGGTGGCCAGCCAGAAGAACG

【図９－２】

CCCTGATGCATCCtGATGGCTCTGCTGTGGTGGTtGTGCTGAAtAGaTCCTCTAAGGATGTGCCTCT
GACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATCCACACCTAC
CTGTGGAGGAGGCAGTGA

配列番号3－シグナルペプチド部分無しの、FLF-PL30由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

GCCAGGCCCTGCATCCCTAAGAGCTTTGGCTACAGCTCTGTGGTGTGTGTGTGCAATGCCACATAC
TGTGACTCCTTTGACCCCCCCACCTTTCCTGCCCTGGGCACaTtccAGaTATGAGAGCACAAGATC
TGGGAGAAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACTGGCACAGGCCTGCTGCT
GACCCTGCAGCCTGAACAGAAGTTTCAGAAAgTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGC
TGCTCTGAATATCCTGGCCCTGTCACCCCCTGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGAGCTACTTTTCAGAA
GAAGGAATTGGATATAATATCATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTTTCCATCAGAACCTACA
CCTATGCAGACACCCCTGATGATTTTCAGCTGCACAATTTTAGCCTGCCTGAGGAAGATACCAAGCT
GAAGATACCCCTGATTCACAGGGCCCTGCAGCTGGCCCAGAGGCCTGTTTCACTGCTGGCCAGCCC
CTGGACATCACCCACCTGGCTGAAGACCAATGGAGCTGTGAATGGGAAGGGGTCACTGAAGGGACA
GCCTGGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTTCTGGATGCCTATGCTGA
GCACAAGCTGCAGTTTTGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCAGCTGGGCTGCTGTCAGGATA
CCCCTTTCAGTGCCTGGGCTTTACCCCTGAACATCAGAGGGACTTTATTGCCAGGGACCTGGGCCCT
ACCCTGGCCAATAGCACCCAcCAtAATGTgAGgttgCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCC
CCACTGGGCAAAGGTGGTGCTGACAGACCCTGAAGCAGCTAaaTATGTTCATGGCATTGCTGTGCA
TTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCTGCCAAGGCCACCCTGGGGGAGACACACAGGCTGTTTCCCAA
TACCATGCTGTTTGCCTCtGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCTGTGAGGCTGGG
CTCCTGGGATAGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACCAATCTGCTGTACCATGTGGTGGGC
TGGACTGACTGGAATCTGGCCCTGAATCCTGAAGGAGGACCtAaCTGGGTcAGgAATTTTGTGGAC
AGCCCCATCATTGTGGACATCACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTTACCACCTGGGCC
ACTTTAGCAAGTTTATTCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGCCAGAAGAATGACC
TGGATGCAGTGGCACTGATGCATCCTGATGGCTCAGCTGTTGTGGTGGTGCTGAATAGATCCAGCA
AGGATGTGCCTCTGACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTC
CATTCACACCTACCTGTGGAGAAGGCAGTGA

【図９－３】

ACCTGGATGCCGTGGCCCTGATGCACCCTGATGGCTCCGCCGTGGTGGTGGTGCTGAATCGCTCTA
GCAAGGACGTGCCTCTGACCATCAAGGATCCAGCCGTGGGATTTCTGGAGACTATTTCACCTGGCT
ATTCAATTCATACCTACCTGTGGAGGAGGCAGTGA

配列番号5－シグナルペプチド部分有りの、FLF-PL28由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGCATCAGGTGCCAGGCCCTGCATC
CCTAAGAGCTTTGGCTACAGCTCTGTGGTGTGTGTGCAATGCCACCTACTGTGACAGCTTTGAC
CCCCCCACCTTTCCTGCCCTGGGCACCTTCAGCAGaTATGAGAGCACCAGGTCTGGGAGGAGGATG
GAGCTGAGCATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACTGGCACTGCCTGCTGACCCTGCAGCCTGA
GAGCAGAAGTTCCAGAAAGTaAAGGGCTTTGGAGGGGCCATGACTGATGCTGCTGCTCTGAACATC
CTGGCCCTGAGCCCCCCTGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGAGCTACTTCTCTGAGGAGGGCATTGGC
TATAACATCATCAGGGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTCAGCATCAGGACCTACACCTATGCTGACA
CCCCTGATGATTTCCAGCTGCACAACTTCAGCCTGCCTGAGGAGGATACCAAGCTGAAGATCCCaCT
GATCCACAGGGCtCTGCAGCTGGCCCAGAGGCCTGTGAGCCTGCTGGCCAGCCCCTGGACCAGCCC
CACTTGGCTGAAGACCAATGGGGCTGTGAATGGGAAGGGGAGCCTGAAGGGACAGCCTGGAGACA
TCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGCTGCA
GTTCTGGGCTGTGACTGCTGAGAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGCTGTCTGGCTACCCCTTCCAaTG
CCTGGGCTTCACCCCTGAGCATCAGAGGGACTTCATTGCCAGGGACCTGGGCCCTACCCTGGCCAA
CAGCACTCACCAtAATGTtAGGCTGCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCCCCACTGGGCT
AAGGTGGTGCTGACTGACCCTGAGGCTGCTAAaTATGTGCATGGCATTGCTGTGCATTGGTACCTG
GACTTTCTGGCTCCTGCCAAGGCCACCCTGGGGGAGACCCACAGGCTGTTCCCCAACACCATGCTG
TTTGCCTCTGAGGCCTGTGTGGGCAGCAAGTTCTGGGAGCAGTCTGTGAGGCTGGGCAGCTGGGA
TAGGGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACCAACCTGCTGTACCATGTGGTGGGCTGGACTGA
CTGGAACCTGGCCCTGAACCCTGAGGGAGGACCtAACTGGGTcAGaAACTTTGTGGACAGCCCCATC
ATTGTGGACATCACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTCTACCACCTGGGCCACTTCAGCA
AGTTCATCCCTGAGGGCAGCCAGAGAGTGGGGCTGGTGGCCAGCCAGAAGAATGACCTGGATGCT
GTGGCTCTGATGCATCCTGATGGCTCTGCTGTGGTGGTGGTGCTGAACAGGAGCTCTAAGGATGTG
CCTCTGACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTTCTGGAGACCATCAGCCCTGGCTACAGCATCCACA
CCTACCTGTGGAGGAGGCAGTGA

配列番号6－シグナルペプチド部分有りの、FLF-PL21由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGCATCAGGTGCCAGGCCCTGTATC
CCTAAGAGCTTtGGCTACAGCTCAGTaGTtTGTGTCTGTAATGCCACATACTGTGACTCCTTtGACCC
CCCTACCTTCCCTGCCCTGGGAACCTTCAGCAGaTATGAGTCAACAAGaTCAGGAAGGAGGATGGAG
CTGTCAATGGGACCCATCCAGGCTAATCACACAGGCACAGGCCTGCTGCTGACCCTGCAGCCAGAAC
AGAAGTTCCAGAAAgTGAAGGGATTtGGAGGAGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTGGC
CCTGTCACCCCCTGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGTCATACTTCTCTGAAGAAGGAATTGGATATAAC
ATCATCAGGGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCAGGACCTACACCTATGCtGACACCCCTG
ATGATTTCCAGCTGCACAACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATCCCtCTGATaCAt
AGgGCaCTGCAGCTGGCCCAGAGGCCtGTGTCACTCCTGGCCAGCCCCTGGACATCACCCACTTGGC
TCAAGACCAATGGAGCtGTGAATGGAAAGGGATCACTCAAGGGACAGCCtGGAGACATCTACCACCA
GACCTGGGCCAGaTACTTtGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGCTGCAGTTCTGGGCa
GTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGACTGCTGTCAGGATACCCCTTCCAGTGTCTGGGCTTC
ACCCCTGAACATCAGAGGGACTTCATtGCCAGGGACCTGGGACCTACCCTtGCCAACTCAACTCACCA
CAATGTCAGGCTGCTCATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCCCCACTGGGCCAAGGTGGTGCT
GACAGACCCAGAAGCtGCTAAaTATGTGCATGGCATTGCTGTGCATTGGTACCTGGACTTCCTGGCT
CCAGCCAAGGCCACCCTGGGAGAGACACACAGGCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTtGCCTCtGAGG
CCTGTGTGGGCTCCAAGTTCTGGGAGCAGTCAGTGAGGCTGGGCTCCTGGGATAGGGGAATGCAG

【図９－４】

TACAGCCACAGCATCATCACAAACCTCCTGTACCATGTGGTgGGCTGGACtGACTGGAACCTGGCCC
TGAACCCtGAAGGAGGACCCAAcTGGGTcagaAAtTTtGTgGACTCACCCATCATtGTGGACATCACCA
AGGACACATTCTACAAGCAGCCCATGTTCTACCACCTGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGGG
CTCCCAGAGGGTGGGACTGGTGGCCTCACAGAAGAAtGACCTGGatGCaGTGGCCCTGATGCATCCt
GATGGCTCTGCTGTGGTGGTtGTGCTGAATAGaTCCTCTAAGGATGTGCCTCTGACCATCAAGGATC
CTGCTGTGGGCTTCCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATCCACACCTACCTGTGGAGGAGGC
AGTGA

配列番号7－シグナルペプチド部分有りの、FLF-PL30由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGCATCAGGTGCCAGGCCCTGCATC
CCTAAGAGCTTTGGCTACAGCTCTGTGGTGTGTGTGTGCAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACC
CCCCCACCTTTCCTGCCCTGGGCACaTtctccAGaTATGAGAGCACAAGATCTGGGAGAAGGATGGA
GCTGAGCATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACTGGCACAGGCCTGCTGCTGACCCTGCAGCCTGA
ACAGAAGTTTCAGAAAgTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTGAATATCCT
GGCCCTGTCACCCCCTGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGAGCTACTTTTCAGAAGAAGGAATTGGATAT
AATATCATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTTTCCATCAGAACCTACACCTATGCAGACACCC
CTGATGATTTTCAGCTGCACAATTTTAGCCTGCCTGAGGAAGATACCAAGCTGAAGATACCCCTGAT
TCACAGGGCCCTGCAGCTGGCCCAGAGGCCTGTTTCACTGCTGGCCAGCCCCTGGACATCACCCAC
CTGGCTGAAGACCAATGGAGCTGTGAATGGGAAGGGGTCACTGAAGGGACAGCCTGGAGACATCTA
CCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTTCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGCTGCAGTTT
TGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCAGCTGGGCTGCTGTCAGGATACCCCTTTCAGTGCCTG
GGCTTTACCCCTGAACATCAGAGGGACTTTATTGCCAGGGACCTGGGCCTACCCTGGCCAATAGC
ACCCAcCAtAATGTgAGgttgCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAGGT
GGTGCTGACAGACCCTGAAGCAGCTAAaTATGTTCATGGCATTGCTGTGCATTGGTACCTGGACTTT
CTGGCTCCTGCCAAGGCCACCCTGGGGGAGACACACAGGCTGTTTCCCAATACCATGCTGTTTGCC
TCtGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCTGTGAGGCTGGGCTCCTGGGATAGAGG
GATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACCAATCTGCTGTACCATGTGGTGGGCTGGACTGACTGGAA
TCTGGCCCTGAATCCTGAAGGAGGACCtAaCTGGGTcAGgAATTTTGTGGACAGCCCCATCATTGTG
GACATCACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTTACCACCTGGGCCACTTTAGCAAGTTTA
TTCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGCCAGAAGAATGACCTGGATGCAGTGGCAC
TGATGCATCCTGATGGCTCAGCTGTTGTGGTGGTGCTGAATAGATCCAGCAAGGATGTGCCTCTGA
CCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTCACACCTACCT
GTGGAGAAGGCAGTGA

配列番号8－シグナルペプチド部分有りの、FLF-PL36由来の、コドンが最適化されているGBAヌクレオチド配列

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGCATCAGGTGCCAGGCCTTGCATC
CCAAAGTCTTTCGGCTACAGCTCCGTGGTGTGCGTGTGCAACGCCACCTATTGTGACTCCTTCGATC
CCCCTACCTTTCCCGCCCTGGGCACATTTTCTAGATACGAGTCTACACGCAGCGGCCGGAGAATGGA
GCTGAGCATGGGCCCTATCCAGGCCAATCACACAGGAACAGGCCTGCTGCTGACCCTGCAGCCAGA
GCAGAAGTTCCAGAAGGTGAAGGGCTTTGGCGGAGCCATGACAGATGCAGCCGCCCTGAACATCCT
GGCCCTGTCCCACCCGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGTCCTACTTCTCTGAGGAGGGCATCGGCTA
TAACATCATCCGGGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTTTCCATCAGAACCTACACATATGCCGATACC
CCTGACGATTTCCAGCTGCACAATTTTTCCCTGCCAGAGGAGGATACAAAGCTGAAGATCCCCCTGA
TTCACCGGGCCCTGCAGCTGGCACAGCGGCCCGTGAGCCTGCTGGCCAGCCCCTGGACCTCCCCTA
CATGGCTGAAGACCAACGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCTCTCTGAAGGGACAGCCTGGCGACATCT
ACCACCAGACATGGGCCAGATATTTCGTGAAGTTTCTGGATGCCTACGCCGAGCACAAGCTGCAGTT
CTGGGCCGTGACAGCAGAGAATGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGAGCGGCTATCCCTTCCAGTGCCT
GGGCTTTACACCTGAGCACCAGCGGGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGCCCAACCCTGGCCAACTC

【図９－５】

CACACACCACAATGTGAGGCTGCTGATGCTGGACGATCAGCGCCTGCTGCTGCCTCACTGGGCCAA
GGTGGTGCTGACCGACCCAGAGGCCGCCAAGTACGTGCACGGCATCGCCGTGCACTGGTATCTGGA
TTTCCTGGCACCTGCAAAGGCCACCCTGGGAGAGACACACCGGCTGTTCCCTAACACCATGCTGTTT
GCCAGCGAGGCCTGCGTGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCCGTGAGGCTGGGATCTTGGGACAG
AGGCATGCAGTACTCCCACTCTATCATCACCAATCTGCTGTATCACGTGGTGGGCTGGACAGACTGG
AACCTGGCCCTGAATCCAGAGGGCGGCCCCAACTGGGTGAGAAATTTCGTGGATAGCCCCATCATC
GTGGACATCACCAAGGATACATTCTACAAGCAGCCAATGTTTTATCACCTGGGCCACTTCTCTAAGT
TTATCCCTGAGGGCAGCCAGAGGGTGGGCCTGGTGGCCAGCCAGAAGAACGACCTGGATGCCGTG
GCCCTGATGCACCCTGATGGCTCCGCCGTGGTGGTGGTGCTGAATCGCTCTAGCAAGGACGTGCCT
CTGACCATCAAGGATCCAGCCGTGGGATTTCTGGAGACTATTTCACCTGGCTATTCAATTCATACCT
ACCTGTGGAGGAGGCAGTGA

配列番号9－シグナルペプチド有りの、(GenBank NM_000157.3由来の) 野生型ヒトGBAヌクレオチド配列

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATC
CCTAAAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTGCAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACC
CCCCGACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGG
AGCTGAGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAG
AACAGAAGTTCCAGAAAGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCC
TTGCCCTGTCACCCCCTGCCCAAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCTGAAGAAGGAATCGGATA
TAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACC
CCTGATGATTTCCAGTTGCACAACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACCCCTGA
TTCACCGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCCTTGCCAGCCCCTGGACATCACCCAC
TTGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTA
CCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGTTACAGTTC
TGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATACCCCTTCCAGTGCCTG
GGCTTCACCCCTGAACATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCCTACCCTCGCCAACAGTA
CTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAGGT
GGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTT
CTGGCTCCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCCT
CAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCTGGGAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGG
ATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTGGACCGACTGGAACC
TTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTCGACAGTCCCATCATTGTAGA
CATCACCAAGGACACGTTTTACAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGTTCATTC
CTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTG
ATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACCA
TCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTCACACCTACCTGTG
GCGTCGCCAGTGA

配列番号10－LSP-S転写調節エレメント

CCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT
GGAGCTGGGGCAGAGGTCAGACACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACTGGACACAGGACGCTG
TGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGA
TAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTT
AAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGA
AT

配列番号11－LSP-SのHCRエンハンサー部分

CCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT
GGAGCTGGGGCAGAGGTCAGACACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACTGGACACAGGACGCTG
TGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGA
TAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTT
AAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGA
AT

【図９－６】

CCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT
GGAGCTGGGGCAGAGGTCAGACACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAAC

配列番号12－LSP-SのA1ATプロモーター部分

GGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTT
GGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGAC
AGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT

配列番号13－CAGプロモーター

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATG
GAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT
TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT
ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC
CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG
CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTTAATTATTTTG
TGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGG
GGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTT
TCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG

配列番号14－LSP-L転写調節エレメント

AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCT
CCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTA
AAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGC
TGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAATT
TCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGAT
CTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACT
CTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGC
CAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGG
CAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTG
GGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATAC
ATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT
GATCCCCCTGATCTGCGGCC

配列番号15－LSP-LのA1ATプロモーター部分

GGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGG
TACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCT
GAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTC
CGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATA
ACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAA
ATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT
GATCCCCCTGATCTGCGGCC

配列番号16－LSP-LのHCRエンハンサー部分

AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCT
CCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTA
AAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGC
TGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAATT
TCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGG

【図９－７】

配列番号17－シグナルペプチドに対応する野生型GBAヌクレオチド配列

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGCATCAGGT

配列番号18－シグナルペプチドの野生型GCaseポリペプチド配列

MEFSSPSREECPKPLSRVSIMAGSLTGLLLLQAVSWASG

配列番号19－肝臓指向性キャプシドのポリペプチド配列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNEA
DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKT
APGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGG
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYST
PWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFED
VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSMSLQARNWLPGPCYRQQ
RLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDN
VMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTD
GHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP
EIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

配列番号20－肝臓指向性キャプシドのポリペプチド配列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAA
DAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAK
TAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGG
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGY
STPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTD
SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTF
EDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSMSLQARNWLPGPCYR
QQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAEL
DNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHT
DGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWN
PEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

配列番号21－CNS指向性キャプシドのポリペプチド配列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAA
DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKT
APGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGG
APVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGY
STPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTD
SDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFE
NVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRV
STTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKV
MITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG
NFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEI
QYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

配列番号22－SV40イントロンのヌクレオチド配列

【図９－８】

GTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAG

配列番号23－ウシ成長ホルモンポリA配列のヌクレオチド配列

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
TGCTGGGGA

配列番号24－肝臓指向性キャプシドのポリペプチド配列

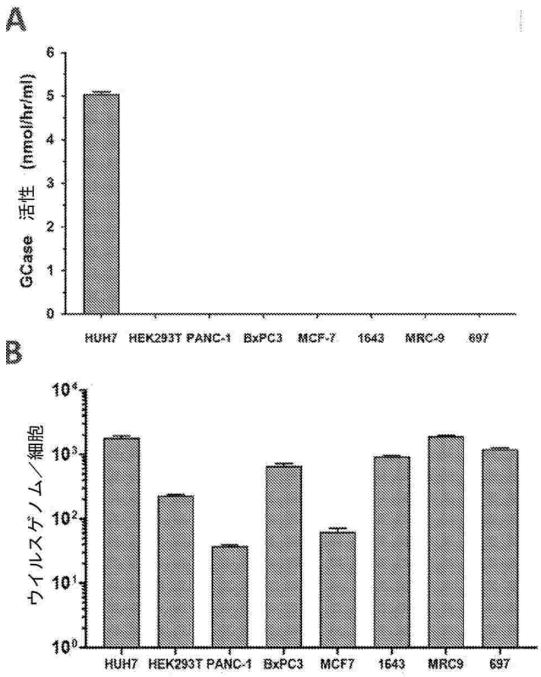
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAA
DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKT
APGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGG
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYST
PWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFED
VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSMSLQARNWLPGPCYRQQ
RLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDN
VMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTD
GHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP
EIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRPL

配列番号25－野生型ヒトGCaseのポリペプチド配列

MEFSSPSREECPKPLSRVSIMAGSLTGLLLLQAVSWASGARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPAL
GTFSRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLL
KSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPW
TSPTWLKTNGAVNGKGSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQC
LGFTPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDFLA
PAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPE
GGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAVVV
VLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

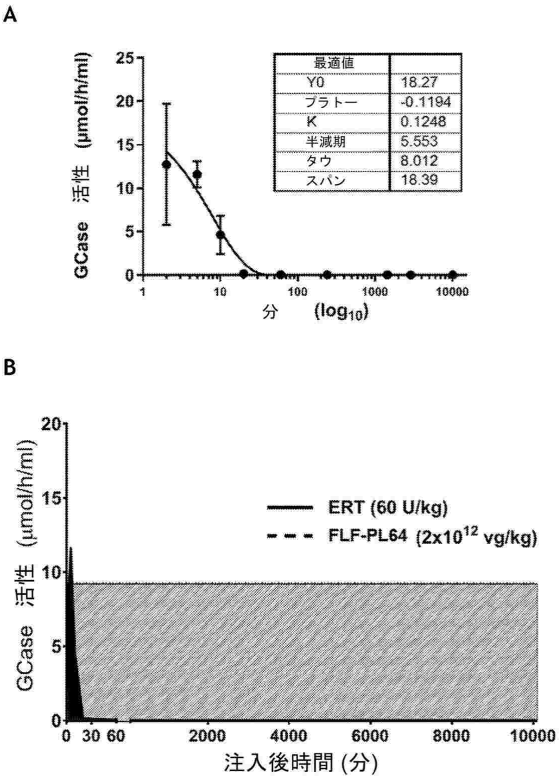
【図１０】

図10

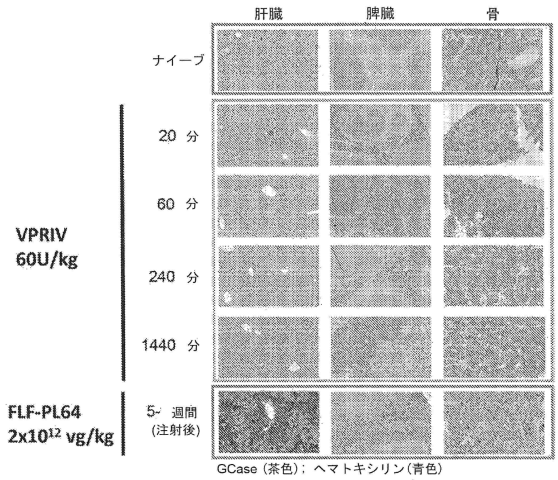


【図１１】

図11

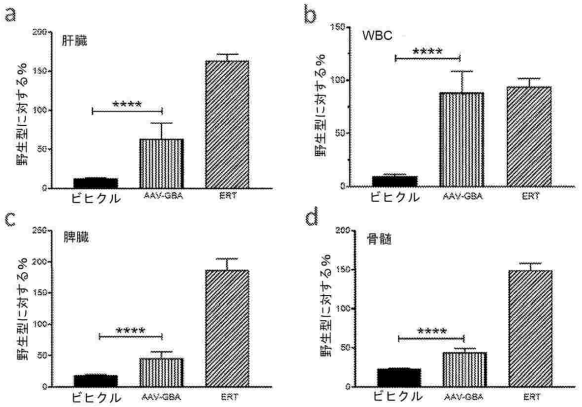


【図１２】



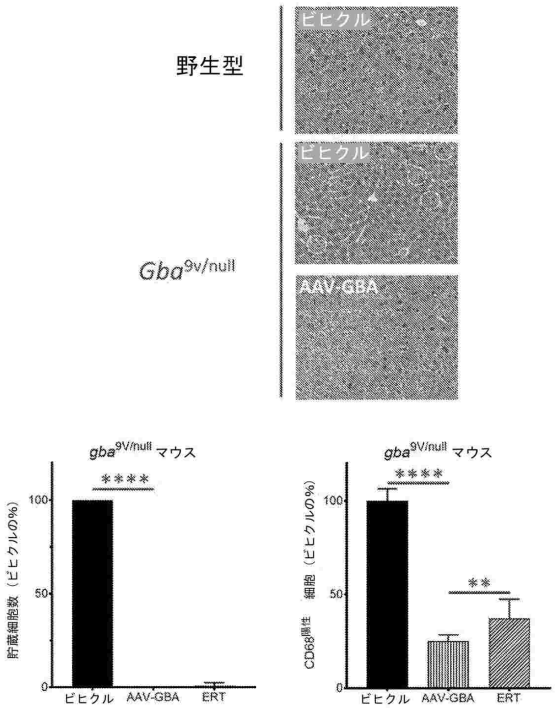
【図１３】

図13



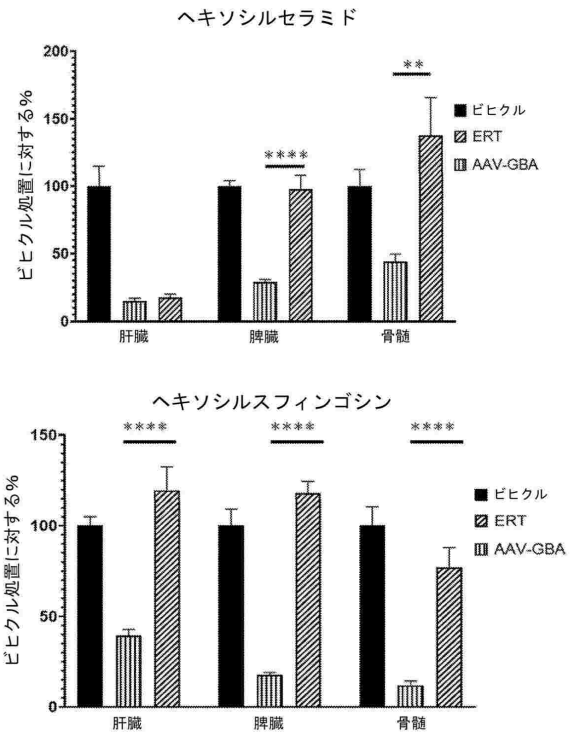
【図１４】

図14



【図１５】

図15



【配列表】

0007600124000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI	
Ａ６１Ｐ	*3/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76
Ａ６１Ｋ	*35/761 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/761
Ｃ１２Ｎ	*9/24 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/24
Ａ６１Ｋ	*38/47 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/47

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
(74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子
(74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉
(72)発明者 ナスワミ、アミット
イギリス国、エスジー１ ２エフエックス ハートフォードシャー スティーブニッジ、ガネルズ ウッド ロード、スティーブニッジ バイオサイエンス カタリスト、フリーライン セラピューティクス リミテッド内
(72)発明者 マッキントッシュ、ジェニー
イギリス国、エスジー１ ２エフエックス ハートフォードシャー スティーブニッジ、ガネルズ ウッド ロード、スティーブニッジ バイオサイエンス カタリスト、フリーライン セラピューティクス リミテッド内
(72)発明者 コルバウ、ロムアルド
イギリス国、エスジー１ ２エフエックス ハートフォードシャー スティーブニッジ、ガネルズ ウッド ロード、スティーブニッジ バイオサイエンス カタリスト、フリーライン セラピューティクス リミテッド内
(72)発明者 キア、アザデ
イギリス国、エスジー１ ２エフエックス ハートフォードシャー スティーブニッジ、ガネルズ ウッド ロード、スティーブニッジ バイオサイエンス カタリスト、フリーライン セラピューティクス リミテッド内
(72)発明者 ミランダ、カルロス
イギリス国、エスジー１ ２エフエックス ハートフォードシャー スティーブニッジ、ガネルズ ウッド ロード、スティーブニッジ バイオサイエンス カタリスト、フリーライン セラピューティクス リミテッド内
審査官 上村 直子

(56)参考文献 米国特許出願公開第２００５／０２６５９８８（ＵＳ，Ａ１）
特開２０１８－０１１５９７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１５－００６２０５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１８／２０６１６８（WO，Ａ１）
特開２０１３－０４８６２４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ ７／０１
Ｃ１２Ｎ ９／２４
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ