

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7571044号  
(P7571044)

(45)発行日 令和6年10月22日(2024.10.22)

(24)登録日 令和6年10月11日(2024.10.11)

|                        |                             |          |                          |       |
|------------------------|-----------------------------|----------|--------------------------|-------|
| (51)国際特許分類             |                             | F I      |                          |       |
| A 6 1 K                | 48/00 (2006.01)             | A 6 1 K  | 48/00                    | Z N A |
| A 6 1 K                | 38/18 (2006.01)             | A 6 1 K  | 38/18                    |       |
| A 6 1 K                | 35/76 (2015.01)             | A 6 1 K  | 35/76                    |       |
| A 6 1 P                | 25/28 (2006.01)             | A 6 1 P  | 25/28                    |       |
| A 6 1 K                | 47/18 (2017.01)             | A 6 1 K  | 47/18                    |       |
| 請求項の数 7 (全119頁) 最終頁に続く |                             |          |                          |       |
| (21)出願番号               | 特願2021-559727(P2021-559727) | (73)特許権者 | 520118865                |       |
| (86)(22)出願日            | 令和2年4月10日(2020.4.10)        |          | プリベイル セラピューティクス、イン       |       |
| (65)公表番号               | 特表2022-526823(P2022-526823  |          | コーポレーテッド                 |       |
|                        | A)                          |          | PREVAIL THERAPEUTI       |       |
| (43)公表日                | 令和4年5月26日(2022.5.26)        |          | CS, INC.                 |       |
| (86)国際出願番号             | PCT/US2020/027764           |          | アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2    |       |
| (87)国際公開番号             | WO2020/210698               |          | 8 5、インディアナポリス、リリー コ      |       |
| (87)国際公開日              | 令和2年10月15日(2020.10.15)      |          | ーポレート センター               |       |
| 審査請求日                  | 令和5年4月10日(2023.4.10)        |          | Lilly Corporate Cen      |       |
| (31)優先権主張番号            | 62/831,846                  |          | ter, Indianapolis,       |       |
| (32)優先日                | 平成31年4月10日(2019.4.10)       |          | Indiana 4 6 2 8 5, U. S. |       |
| (33)優先権主張国・地域又は機関      |                             |          | A.                       |       |
|                        | 米国(US)                      | (74)代理人  | 100102842                |       |
| (31)優先権主張番号            | 62/934,450                  |          | 弁理士 葛和 清司                |       |
| (32)優先日                | 令和1年11月12日(2019.11.12)      | (72)発明者  | アベリオビック、アーサ              |       |
| 最終頁に続く                 |                             | 最終頁に続く   |                          |       |

(54)【発明の名称】 リソソーム障害のための遺伝子療法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

G R N変異を有する前頭側頭型認知症を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための医薬組成物であって、

- ( i ) 5 ' から 3 ' の順に、
- ( a ) アデノ随伴ウイルス2 ( A A V 2 ) I T R、
- ( b ) サイトメガロウイルス ( C M V ) エンハンサー、
- ( c ) ニワトリベータアクチン ( C B A ) プロモーター、
- ( d ) プログラニュリン ( P G R N ) タンパク質をコードする導入遺伝子挿入物であって、前記導入遺伝子挿入物が配列番号 6 8 のヌクレオチド配列を含む、前記導入遺伝子挿入物、
- ( e ) ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素 ( W P R E )、
- ( f ) ウシ成長ホルモンポリ A シグナル尾部、及び
- ( g ) A A V 2 I T R を含む核酸を含む、組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ベクターと、
- ( i i ) アデノ随伴ウイルス9 ( A A V 9 ) キャプシドタンパク質と、
- を含む r A A V を含む、前記医薬組成物。

【請求項2】

約  $1 \times 10^{13}$  v g ~ 約  $7 \times 10^{14}$  v g の範囲の用量の r A A V を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

約  $2 \times 10^{13}$  v g ～ 約  $2 \times 10^{14}$  v g の範囲の用量の r A A V を含む、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

約  $3.5 \times 10^{13}$  v g、約  $7.0 \times 10^{13}$  v g、または約  $1.4 \times 10^{14}$  v g の用量の r A A V を含む、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

約  $2 \times 10^{13}$  v g、約  $4 \times 10^{13}$  v g、または約  $8 \times 10^{13}$  v g の用量の r A A V を含む、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

約 20 mM の T r i s (p H 8.0)、約 1 mM の M g C l <sub>2</sub>、約 200 mM の N a C l、及び約 0.001 % w / v のポロキサマー 188 を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

前記 r A A V ベクターが、前記 (a) の A A V 2 I T R と C B A プロモーターとの間に T R Y 領域をさらに含み、前記 T R Y 領域が、配列番号 28 を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年3月12日に提出された米国仮特許出願第62/988,665号、2020年1月13日に提出された米国仮特許出願第62/960,471号、2019年12月27日に提出された米国仮特許出願第62/954,089号、2019年11月12日に提出された米国仮特許出願第62/934,450号、及び2019年4月10日に提出された米国仮特許出願第62/831,846号の優先権を主張する。これらの出願の各々の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書とともに電子的に提出されたテキストファイルの内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読フォーマットコピー（ファイル名：P R V L \_ 0 1 0 \_ 0 5 W O \_ S e q L i s t . t x t、記録日：2020年4月10日、ファイルサイズ約612,902バイト）。

## 【0003】

分野

本開示は、遺伝子療法の分野及びそれを使用する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

ゴーシェ病は、リソソーム酸性β-グルコセレブロンダーゼ（G c a s e、「G B A」）の欠乏によるスフィンゴ糖脂質代謝の稀な先天性異常である。患者は、肝脾腫大、汎血球減少症につながる骨髄不全、肺障害及び線維症、ならびに骨欠損を含む非CNS症状及び所見に苦しむ。さらに、かなりの数の患者は、衝動性眼球運動及び視線の欠陥、発作、認知障害、発達遅延、及びパーキンソン病を含む運動障害を含む神経学的症状に苦しむ。造血骨髄及び内臓における末梢疾患及び主な臨床症状に対処するいくつかの治療法が存在し、それは、以下に記載する酵素補充療法、欠陥のあるG c a s eと結合して安定性を向上させるシャペロン様小分子薬剤、ならびにゴーシェ病において蓄積して症状及び所見に至る基質の産生を遮断する基質減少療法を含む。しかしながら、ゴーシェ病の他の側面（特に骨格及び脳に影響を及ぼすもの）は、治療に対して難治性であるようである。

## 【0005】

プログラニューリン（P G R N）は、リソソーム機能に関連する付加的なタンパク質であ

10

20

30

40

50

る。PGRNは、GRN遺伝子によってコードされる。ヒトにおけるGRNハプロイ不全は、FTD-GRN（GRN変異を伴う前頭側頭型認知症）、前頭葉及び側頭葉の萎縮を伴う、実行機能の障害、行動における変化、及び言語障害によって特徴付けられる神経変性疾患を発症するリスクが約90%に至る。FTD患者には疾患修飾療法がない。

#### 【発明の概要】

##### 【0006】

本明細書では、GRN変異を有する前頭側頭型認知症を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法が提供され、方法は、対象に以下を含む組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）を投与することを含む。（i）PGRNタンパク質をコードする導入遺伝子挿入物に作動可能に連結したプロモーターを含む発現構築物を含む核酸を含むrAAVベクターであって、導入遺伝子挿入物は配列番号68のヌクレオチド配列を含む、rAAVベクター、及び（ii）AAV9キャプシドタンパク質。いくつかの実施形態において、rAAVは、約 $1 \times 10^{13}$ ベクターゲノム（vg）～約 $7 \times 10^{14}$ vgの範囲の用量で対象に投与される。いくつかの実施形態において、rAAVは、大槽への注射を介して投与される。

##### 【0007】

いくつかの実施形態において、PGRNタンパク質をコードする導入遺伝子挿入物に作動可能に連結したプロモーターは、ニワトリベータアクチン（CBA）プロモーターである。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、サイトメガロウイルス（CMV）エンハンサーをさらに含む。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素（WPRE）をさらに含む。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、ウシ成長ホルモンポリAシグナル尾部をさらに含む。いくつかの実施形態において、核酸は、発現構築物に隣接する2つのアデノ随伴ウイルス逆位末端反復（ITR）配列を含む。いくつかの実施形態において、各ITR配列は、野生型AAV2 ITR配列である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、5' ITR及び発現構築物の間のTRY領域をさらに含み、TRY領域は、配列番号28を含む。

##### 【0008】

本明細書では、GRN変異を有する前頭側頭型認知症を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法が提供され、方法は、対象に以下を含むrAAVを投与することを含む。（i）5'から3'の順に、（a）AAV2 ITR、（b）CMVエンハンサー、（c）CBAプロモーター、（d）PGRNタンパク質をコードする導入遺伝子挿入物であって、導入遺伝子挿入物が配列番号68のヌクレオチド配列を含む、導入遺伝子挿入物、（e）WPRE、（f）ウシ成長ホルモンポリAシグナル尾部、及び（g）AAV2 ITRを含む、核酸を含むrAAVベクター、ならびに（ii）AAV9キャプシドタンパク質。いくつかの実施形態において、rAAVは、約 $1 \times 10^{13}$ vg～約 $7 \times 10^{14}$ vgの範囲の用量で対象に投与される。いくつかの実施形態において、rAAVは、大槽への注射を介して投与される。

##### 【0009】

いくつかの実施形態において、rAAVは、約20mMのTris（pH8.0）、約1mMのMgCl<sub>2</sub>、約200mMのNaCl、及び約0.001%w/vのポロキサマー188を含む製剤で投与される。

##### 【0010】

本明細書で提供されるのは、以下を含む医薬組成物が提供される。（i）（a）PGRNタンパク質をコードする導入遺伝子挿入物に作動可能に連結したプロモーターを含む発現構築物を含む核酸を含むrAAVベクターであって、導入遺伝子挿入物が、配列番号68のヌクレオチド配列を含む、rAAVベクター、ならびに（b）AAV9キャプシドタンパク質を含むrAAV、（ii）約20mMのTris（pH8.0）、（iii）約1mMのMgCl<sub>2</sub>、（iv）約200mMのNaCl、及び（v）約0.001%w/vのポロキサマー188。

## 【0011】

本明細書では、以下を含む rAAV が提供される。(a) PGRN タンパク質をコードする導入遺伝子挿入物に作動可能に連結したプロモーターを含む発現構築物を含む核酸を含む rAAV ベクターであって、導入遺伝子挿入物は配列番号 68 のヌクレオチド配列を含む、rAAV ベクター、及び (b) 対象における GRN 変異を有する前頭側頭型認知症を治療する方法において使用するための AAV9 キャプシドタンパク質。

## 【0012】

本明細書では、脳脊髄液 (CSF) 試料における PGRN タンパク質レベルを定量する方法が提供され、方法は、以下を含む。(1) ジチオスレイトール (DTT) 及び試料緩衝液を含むマスター混合物において CSF 試料を希釈すること、(2) 希釈 CSF 試料、抗プログランニューリン抗体、抗プログランニューリン抗体を検出する二次抗体、ルミノール及び過酸化物を、キャピラリーカートリッジのウェルに充填すること、(3) キャピラリーカートリッジを自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器に装填すること、(4) 自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器を使用して、シグナル強度、ピーク面積、及びシグナル対ノイズ比を計算すること、ならびに (5) CSF 試料におけるプログランニューリンタンパク質レベルを、抗プログランニューリン抗体に対する免疫反応性のピーク面積として定量すること。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

【図1】 G case (例えば、GBA1 またはその一部分) をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図2】 G case (例えば、GBA1 またはその一部分) 及び LIMP2 (SCARB2) またはその一部分をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。G case 及び LIMP2 のコード配列は、内部リボソーム侵入部位 (IRES) によって分離される。

【図3】 G case (例えば、GBA1 またはその一部分) 及び LIMP2 (SCARB2) またはその一部分をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。G case 及び LIMP2 のコード配列の発現は、別個のプロモーターによってそれぞれ駆動される。

【図4】 G case (例えば、GBA1 またはその一部分)、LIMP2 (SCARB2) またはその一部分、及び  $\alpha$ -Syn についての干渉 RNA をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図5】 G case (例えば、GBA1 またはその一部分)、プロサポシン (例えば、PSAP またはその一部分)、及び  $\alpha$ -Syn についての干渉 RNA をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図6】 G case (例えば、GBA1 またはその一部分) 及びプロサポシン (例えば、PSAP またはその一部分) をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。G case 及びプロサポシンのコード配列は、内部リボソーム侵入部位 (IRES) によって分離される。

【図7】 G case (例えば、GBA1 またはその一部分) をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。本実施形態において、ベクターは、以下の4つの部分からなる CBA プロモーター要素 (CBA) を含む。ヒト GBA1 のコドン最適化コード配列を構成的に発現するための、CMV エンハンサー (CMVe)、CBA プロモーター (CBAP)、エクソン1、及びイントロン (int)。3' 領域はまた、WPRE 調節エレメント、続いて bGH ポリA 尾部を含む。以下の3つの転写調節活性化部位が、プロモーター領域の5' 末端に含まれる: TATA、RBS、及び YY1。隣接 ITR は、介在配列の正しいパッケージングを可能にする。5' ITR 配列の2つのバリエーション (挿入ボックス) を評価し、これらは、野生型 AAV2 ITR の20ヌクレオチド「D」領域内にいくつかのヌクレオチド差を有する。いくつかの実施形態において、rAAV ベクターは、上段の並びに示される「D」ドメインヌクレオチド配列を含む。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態において、rAAVベクターは、変異体「D」ドメイン（例えば、下段の並びに示されるヌクレオチド変化を有する「S」ドメイン）を含む。

【図8】図6に記載のベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図9-1】パーキンソン病のCBEマウスモデルにおけるGcase（例えば、GBA1またはその一部分）をコードする導入遺伝子を含むrAAVの送達についての代表的なデータを示す。PBSビヒクル、25mg/kgのCBE、37.5mg/kgのCBE、または50mg/kgのCBE（左から右）の1日あたりのIP送達をP8で開始した。生存率（上段左）を1日2回チェックし、体重（上段右）を毎日チェックした。すべての群は、n=8で開始した。P23でのオープンフィールドにおける移動距離の合計（下段左）、及びP24でのロータロッドでの落下までの潜時（下段中央）によって、行動を評価した。CBE離脱を伴う（3日目）及び伴わない（1日目）の両方で、PBS及び25mg/kgのCBE処置群におけるマウスの皮質において、GCase基質のレベルを分析した。凝集体GluSph及びGalSphレベル（下段右）を、組織のmg湿潤重量あたりのpmolとして示す。平均が示されている。エラーバーはSEMである。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、線形回帰による処置群についての名目上のp値。

10

【図9-2】パーキンソン病のCBEマウスモデルにおけるGcase（例えば、GBA1またはその一部分）をコードする導入遺伝子を含むrAAVの送達についての代表的なデータを示す。PBSビヒクル、25mg/kgのCBE、37.5mg/kgのCBE、または50mg/kgのCBE（左から右）の1日あたりのIP送達をP8で開始した。生存率（上段左）を1日2回チェックし、体重（上段右）を毎日チェックした。すべての群は、n=8で開始した。P23でのオープンフィールドにおける移動距離の合計（下段左）、及びP24でのロータロッドでの落下までの潜時（下段中央）によって、行動を評価した。CBE離脱を伴う（3日目）及び伴わない（1日目）の両方で、PBS及び25mg/kgのCBE処置群におけるマウスの皮質において、GCase基質のレベルを分析した。凝集体GluSph及びGalSphレベル（下段右）を、組織のmg湿潤重量あたりのpmolとして示す。平均が示されている。エラーバーはSEMである。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、線形回帰による処置群についての名目上のp値。

20

【図10】CBEマウスモデルにおける最大rAAV用量についての試験設計の一実施形態を示す概略図である。簡潔に述べると、rAAVは、P3でのICV注射によって送達され、毎日のCBE処置は、P8で開始された。挙動をP24~25でオープンフィールド及びロータロッドアッセイにおいて評価し、基質レベルをP36及びP38で測定した。

30

【図11-1】CBEマウスモデルにおける最大rAAV用量の生存中評価についての代表的なデータを示す。P3で、マウスを、ICV送達を介して賦形剤または8.8e9v gのrAAV-GBA1のいずれかで処置した。PBSまたは25mg/kgのCBEのいずれかの毎日のIP送達を、P8で開始した。試験の終了時に、半数のマウスを、P36（1日目）での最終CBE用量の1日後に殺し、残りの半数を、3日間のCBE離脱を経てP38（3日目）で殺した。すべての処置群（賦形剤+PBS、n=8、rAAV-GBA1+PBS（n=7）、賦形剤+CBE（n=8）、及びバリエーション+CBE（n=9））を毎日計量し（上段左）、P36で重量を分析した（上段右）。行動を、P23でのオープンフィールドにおける総移動距離（下段左）及びP24でのロータロッドでの落下までの潜時（下段右）によって評価し、3つの試験にわたる中央値として各動物について評価した。致死性により、行動アッセイについての賦形剤+CBE群については、n=7であり、他のすべての群についてはn=8であった。動物全体の平均が示されている。エラーバーはSEMである。\*p<0.05、\*\*\*p<0.001、CBE処置の動物における線形回帰による処置群についての名目上のp値。

40

【図11-2】CBEマウスモデルにおける最大rAAV用量の生存中評価についての代表的なデータを示す。P3で、マウスを、ICV送達を介して賦形剤または8.8e9v gのrAAV-GBA1のいずれかで処置した。PBSまたは25mg/kgのCBEの

50

いずれかの毎日のIP送達を、P8で開始した。試験の終了時に、半数のマウスを、P36（1日目）での最終CBE用量の1日後に殺し、残りの半数を、3日間のCBE離脱を経てP38（3日目）で殺した。すべての処置群（賦形剤+PBS、n=8、rAAV-GBA1+PBS（n=7）、賦形剤+CBE（n=8）、及びバリエーション+CBE（n=9））を毎日計量し（上段左）、P36で重量を分析した（上段右）。行動を、P23でのオープンフィールドにおける総移動距離（下段左）及びp24でのロータロッドでの落下までの潜時（下段右）によって評価し、3つの試験にわたる中央値として各動物について評価した。致死性により、行動アッセイについての賦形剤+CBE群については、n=7であり、他のすべての群についてはn=8であった。動物全体の平均が示されている。エラーバーはSEMである。\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 、CBE処置の動物における線形回帰による処置群についての名目上のp値。

10

【図11-3】CBEマウスモデルにおける最大rAAV用量の生存中評価についての代表的なデータを示す。P3で、マウスを、ICV送達を介して賦形剤または8.8e9vgのrAAV-GBA1のいずれかで処置した。PBSまたは25mg/kgのCBEのいずれかの毎日のIP送達を、P8で開始した。試験の終了時に、半数のマウスを、P36（1日目）での最終CBE用量の1日後に殺し、残りの半数を、3日間のCBE離脱を経てP38（3日目）で殺した。すべての処置群（賦形剤+PBS、n=8、rAAV-GBA1+PBS（n=7）、賦形剤+CBE（n=8）、及びバリエーション+CBE（n=9））を毎日計量し（上段左）、P36で重量を分析した（上段右）。行動を、P23でのオープンフィールドにおける総移動距離（下段左）及びp24でのロータロッドでの落下までの潜時（下段右）によって評価し、3つの試験にわたる中央値として各動物について評価した。致死性により、行動アッセイについての賦形剤+CBE群については、n=7であり、他のすべての群についてはn=8であった。動物全体の平均が示されている。エラーバーはSEMである。\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 、CBE処置の動物における線形回帰による処置群についての名目上のp値。

20

【図12-1】CBEマウスモデルにおける最大rAAV用量の生化学的評価についての代表的なデータを示す。すべての処置群（賦形剤+PBS（n=8）、バリエーション+PBS（n=7）、賦形剤+CBE（n=7）、及びバリエーション+CBE（n=9））の皮質を使用して、CBE離脱前（1日目）または離脱後（3日目）の群におけるGCASE活性（上段左）、GluSphレベル（上段右）、GluCerレベル（下段左）、及びベクターゲノム（下段右）を測定した。生体内分布は、1µgのゲノムDNAあたりのベクターゲノムとして示される。平均が示されている。エラーバーはSEMである。（\*） $p < 0.1$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 、CBE処置の動物における線形回帰による処置群の名目上のp値、収集日数及び性別は共変量として補正された。

30

【図12-2】CBEマウスモデルにおける最大rAAV用量の生化学的評価についての代表的なデータを示す。すべての処置群（賦形剤+PBS（n=8）、バリエーション+PBS（n=7）、賦形剤+CBE（n=7）、及びバリエーション+CBE（n=9））の皮質を使用して、CBE離脱前（1日目）または離脱後（3日目）の群におけるGCASE活性（上段左）、GluSphレベル（上段右）、GluCerレベル（下段左）、及びベクターゲノム（下段右）を測定した。生体内分布は、1µgのゲノムDNAあたりのベクターゲノムとして示される。平均が示されている。エラーバーはSEMである。（\*） $p < 0.1$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 、CBE処置の動物における線形回帰による処置群の名目上のp値、収集日数及び性別は共変量として補正された。

40

【図13】賦形剤+PBS、賦形剤+CBE、及びバリエーション+CBE処置群の投与後のCBEマウスモデルにおける行動及び生化学的相関についての代表的なデータを示す。処置群にわたって、ロータロッドでの性能は、GluCer蓄積と負の相関があり（A、線形回帰により $p = 0.0012$ ）、GluSph蓄積は、GCASE活性の増加と負の相関があった（B、線形回帰により $p = 0.0086$ ）。

【図14-1】CBEマウスモデルにおけるバリエーションの生体内分布についての代表的なデータを示す。ベクターゲノムの存在を、すべての処置群（賦形剤+PBS（n=8）、

50

バリエーション+PBS (n=7)、賦形剤+CBE (n=7)、及びバリエーション+CBE (n=9)) についての肝臓、脾臓、腎臓、及び生殖腺において評価した。生体内分布は、1 µg のゲノムDNAあたりのベクターゲノムとして示される。ベクターゲノムの存在を、ベクター参照標準曲線を使用した定量的PCRによって定量し、ゲノムDNA濃度を、A260光学密度測定によって評価した。平均が示されている。エラーバーはSEMである。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 、CBE処置の動物における線形回帰による処置群の名目上のp値、収集日数及び性別が共変量として補正された。

【図14-2】CBEマウスモデルにおけるバリエーションの生体内分布についての代表的なデータを示す。ベクターゲノムの存在を、すべての処置群(賦形剤+PBS (n=8)、バリエーション+PBS (n=7)、賦形剤+CBE (n=7)、及びバリエーション+CBE (n=9)) についての肝臓、脾臓、腎臓、及び生殖腺において評価した。生体内分布は、1 µg のゲノムDNAあたりのベクターゲノムとして示される。ベクターゲノムの存在を、ベクター参照標準曲線を使用した定量的PCRによって定量し、ゲノムDNA濃度を、A260光学密度測定によって評価した。平均が示されている。エラーバーはSEMである。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 、CBE処置の動物における線形回帰による処置群の名目上のp値、収集日数及び性別が共変量として補正された。

【図15-1】CBEマウスモデルにおけるrAAV用量範囲の生存中評価についての代表的なデータを示す。マウスは、P3でのICV送達によって、賦形剤、または以下の3つの異なる用量のrAAV-GBA1のうちの1つを受けた。3.2 e9 vg、1.0 e10 vg、または3.2 e10 vg。P8で、25 mg/kgのCBEの毎日のIP処置を開始した。賦形剤及びCBEまたは賦形剤及びPBSを受けたマウスを対照とした。すべての処置群は、群あたりn=10(5頭雄/5頭雌)で開始した。最終CBE用量(P38~P40)の1日後にすべてのマウスを殺した。すべての処置群を毎日計量し、それらの体重をP36で分析した。P24でロータロッドでの落下まで潜時、及びP30でテーパービームを横断するまでの潜時によって、運動性能を評価した。早期の致死性のため、行動アッセイに参加するマウス数は、賦形剤+PBSのn=10、賦形剤+CBEのn=9、及び3.2 e9 vgのrAAV-GBA1+CBEのn=6、1.0 e10 vgのrAAV-GBA1+CBEのn=10、3.2 e10 vgのrAAV-GBA1+CBEのn=7であった。平均が示されている。エラーバーはSEMであり、 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ はCBE処置群における線形回帰による名目上のp値についてであり、性別は共変量として補正される。

【図15-2】CBEマウスモデルにおけるrAAV用量範囲の生存中評価についての代表的なデータを示す。マウスは、P3でのICV送達によって、賦形剤、または以下の3つの異なる用量のrAAV-GBA1のうちの1つを受けた。3.2 e9 vg、1.0 e10 vg、または3.2 e10 vg。P8で、25 mg/kgのCBEの毎日のIP処置を開始した。賦形剤及びCBEまたは賦形剤及びPBSを受けたマウスを対照とした。すべての処置群は、群あたりn=10(5頭雄/5頭雌)で開始した。最終CBE用量(P38~P40)の1日後にすべてのマウスを殺した。すべての処置群を毎日計量し、それらの体重をP36で分析した。P24でロータロッドでの落下まで潜時、及びP30でテーパービームを横断するまでの潜時によって、運動性能を評価した。早期の致死性のため、行動アッセイに参加するマウス数は、賦形剤+PBSのn=10、賦形剤+CBEのn=9、及び3.2 e9 vgのrAAV-GBA1+CBEのn=6、1.0 e10 vgのrAAV-GBA1+CBEのn=10、3.2 e10 vgのrAAV-GBA1+CBEのn=7であった。平均が示されている。エラーバーはSEMであり、 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ はCBE処置群における線形回帰による名目上のp値についてであり、性別は共変量として補正される。

【図16-1】CBEマウスモデルにおけるrAAV用量範囲の生化学的評価についての代表的なデータを示す。すべての処置群(賦形剤+PBS (n=10)、賦形剤+CBE (n=9)、及び3.2 e9 vgのrAAV-GBA1+CBE (n=6)、1.0 e10 vgのrAAV-GBA1+CBE (n=10)、3.2 e10 vgのrAAV-GB

10

20

30

40

50

A1 + CBE (n = 7)) の皮質を使用して、GCase 活性、GluSph レベル、GluCer レベル、及びベクターゲノムを測定した。GCase 活性は、総タンパク質の mg あたりの GCase の ng として示される。GluSph 及び GluCer レベルは、組織の mg 湿潤重量あたりの pmol として示される。生体内分布は、1 µg のゲノム DNA あたりのベクターゲノムとして示される。ベクターゲノムの存在を、ベクター参照標準曲線を使用した定量的 PCR によって定量し、ゲノム DNA 濃度を、A260 光学密度測定によって評価した。ベクターゲノムの存在を、肝臓においても測定した (E)。平均が示されている。エラーバーは SEM である。\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001 は CBE 処置群における線形回帰による名目上の p 値についてであり、性別は共変量として補正される。

10

【図 16-2】CBE マウスモデルにおける rAAV 用量範囲の生化学的評価についての代表的なデータを示す。すべての処置群 (賦形剤 + PBS (n = 10)、賦形剤 + CBE (n = 9)、及び 3.2 e9 vg の rAAV-GBA1 + CBE (n = 6)、1.0 e10 vg の rAAV-GBA1 + CBE (n = 10)、3.2 e10 vg の rAAV-GBA1 + CBE (n = 7)) の皮質を使用して、GCase 活性、GluSph レベル、GluCer レベル、及びベクターゲノムを測定した。GCase 活性は、総タンパク質の mg あたりの GCase の ng として示される。GluSph 及び GluCer レベルは、組織の mg 湿潤重量あたりの pmol として示される。生体内分布は、1 µg のゲノム DNA あたりのベクターゲノムとして示される。ベクターゲノムの存在を、ベクター参照標準曲線を使用した定量的 PCR によって定量し、ゲノム DNA 濃度を、A260 光学密度測定によって評価した。ベクターゲノムの存在を、肝臓においても測定した (E)。平均が示されている。エラーバーは SEM である。\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001 は CBE 処置群における線形回帰による名目上の p 値についてであり、性別は共変量として補正される。

20

【図 17-1】遺伝子マウスモデルにおける最大用量 rAAV-GBA1 におけるテーパーストック分析についての代表的なデータを示す。処置群 (WT + 賦形剤 (n = 5)、4 L / PS-NA + 賦形剤 (n = 6)、及び 4 L / PS-NA + rAAV-GBA1 (n = 5)) の運動性能を、rAAV-GBA1 投与の 4 週間後のビームウォークによってアッセイした。合計スリップ及び活動時間は、異なるビームでの 5 回にわたる試験の合計として示される。速度ごとの速度及びスリップは、異なるビームでの 5 回にわたる試験の平均として示される。平均が示されている。エラーバーは SEM である。

30

【図 17-2】遺伝子マウスモデルにおける最大用量 rAAV-GBA1 におけるテーパーストック分析についての代表的なデータを示す。処置群 (WT + 賦形剤 (n = 5)、4 L / PS-NA + 賦形剤 (n = 6)、及び 4 L / PS-NA + rAAV-GBA1 (n = 5)) の運動性能を、rAAV-GBA1 投与の 4 週間後のビームウォークによってアッセイした。合計スリップ及び活動時間は、異なるビームでの 5 回にわたる試験の合計として示される。速度ごとの速度及びスリップは、異なるビームでの 5 回にわたる試験の平均として示される。平均が示されている。エラーバーは SEM である。

【図 18】プログラニュリン (PGRN) タンパク質をコードする rAAV 構築物のインビトロ発現についての代表的なデータを示す。左パネルは、プログラニュリン (PGRN) ELISA アッセイの標準曲線を示す。下段パネルは、rAAV で形質導入した HEK 293T 細胞の細胞溶解物における ELISA アッセイによって測定した PGRN 発現の用量応答を示す。MOI = 感染の多重度 (細胞あたりのベクターゲノム)。

40

【図 19-1】プロサポシン (PSAP)、SCARB2、及び / または 1 つ以上の阻害性核酸と組み合わせた、GBA1 をコードする rAAV 構築物のインビトロ発現についての代表的なデータを示す。データは、各構築物での HEK 293 細胞のトランスフェクションが、モックトランスフェクション細胞に対して目的の導入遺伝子の過剰発現をもたらしたことを示す。

【図 19-2】プロサポシン (PSAP)、SCARB2、及び / または 1 つ以上の阻害性核酸と組み合わせた、GBA1 をコードする rAAV 構築物のインビトロ発現について

50

の代表的なデータを示す。データは、各構築物でのHEK293細胞のトランスフェクションが、モックトランスフェクション細胞に対して目的の導入遺伝子の過剰発現をもたらしたことを示す。

【図19-3】プロサポシン(P SAP)、SCARB2、及び／または1つ以上の阻害性核酸と組み合わせた、GBA1をコードするrAAV構築物のインビトロ発現についての代表的なデータを示す。データは、各構築物でのHEK293細胞のトランスフェクションが、モックトランスフェクション細胞に対して目的の導入遺伝子の過剰発現をもたらしたことを示す。

【図20】ITRの「外側」に位置する「D」領域を(例えば、導入遺伝子挿入物または発現構築物に対してITRの末端に近位に)含むrAAVベクター(上段)、及びベクターの「内側」にITRを(例えば、ベクターの導入遺伝子挿入物に近位に)有する野生型rAAVベクターを示す概略図である。

10

【図21】GBA2またはその一部分、及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図。

【図22】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)及びガラクトシルセラミダーゼ(例えば、GALCまたはその一部分)をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びガラクトシルセラミダーゼのコード配列の発現は、T2A自己切断ペプチド配列によって分離される。

【図23】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)及びガラクトシルセラミダーゼ(例えば、GALCまたはその一部分)をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びガラクトシルセラミダーゼのコード配列の発現は、T2A自己切断ペプチド配列によって分離される。

20

【図24】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)、カテプシンB(例えば、CTSBまたはその一部分)、及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びカテプシンBのコード配列の発現は、T2A自己切断ペプチド配列によって分離される。

【図25】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1(例えば、SMPD1、その一部分)、及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図26】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)及びガラクトシルセラミダーゼ(例えば、GALCまたはその一部分)をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びガラクトシルセラミダーゼのコード配列は、内部リボソーム侵入部位(IRES)によって分離される。

30

【図27】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)及びカテプシンB(例えば、CTSBまたはその一部分)をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びカテプシンBのコード配列の発現は、別個のプロモーターによってそれぞれ駆動される。

【図28】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)、GCH1(例えば、GCH1またはその一部分)、及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びGCH1のコード配列は、T2A自己切断ペプチド配列により分離される。

40

【図29】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)、RAB7L1(例えば、RAB7L1またはその一部分)、及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びRAB7L1のコード配列は、T2A自己切断ペプチド配列によって分離される。

【図30】Gcase(例えば、GBA1またはその一部分)、GCH1(例えば、GCH1またはその一部分)、及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びGCH1のコード配列の発現は、内部リボソーム侵入部位(IRES)である。

【図31】VPS35(例えば、VPS35またはその一部分)及び $\alpha$ -Syn及びTM

50

EM106Bについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図32】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）、IL-34（例えば、IL34またはその一部分）、及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びIL-34のコード配列は、T2A自己切断ペプチド配列によって分離される。

【図33】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）及びIL-34（例えば、IL34またはその一部分）をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びIL-34のコード配列は、内部リボソーム侵入部位（IRES）によって分離される。

10

【図34】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）及びTREM2（例えば、TREM2またはその一部分）をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びTREM2のコード配列の発現は、別個のプロモーターによってそれぞれ駆動される。

【図35】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）及びIL-34（例えば、IL34またはその一部分）をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。Gcase及びIL-34のコード配列の発現は、別個のプロモーターによってそれぞれ駆動される。

【図36】A～Bは、qPCR及びELISAによって測定された対照形質導入細胞に対して、HEK293細胞におけるTREM2及びGBA1の過剰発現についての代表的なデータを示す。Aは、TREM2の過剰発現についてのデータを示す。Bは、同じ構築物からのGBA1の過剰発現についてのデータを示す。

20

【図37】GFPLレポーターアッセイ（上段）及び $\alpha$ -Synアッセイ（下段）によるインビトロでのSNCAのサイレンシングに成功したことを示す代表的なデータを示す。

【図38】GFPLレポーターアッセイ（上段）及び $\alpha$ -Synアッセイ（下段）によるインビトロでのTMEM106Bのサイレンシングに成功したことを示す代表的なデータを示す。

【図39】PGRNをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図40】「D」配列の野生型（円）または代替的（例えば、「外側」、正方形）配置を有するITRを有するrAAVを使用したHEK293細胞の形質導入についてのデータを示す。「外側」に配置されたITRを有するrAAVは、野生型ITRを有するrAAVと同様に効率的に細胞に形質導入することができた。

30

【図41】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図42】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図43】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図44】PGRNをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

40

【図45】PGRNをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図46】PGRN及び微小管関連タンパク質tau（MAPT）についての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図47】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）及び $\alpha$ -Synについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図48】PSAPをコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図49】Gcase（例えば、GBA1またはその一部分）をコードする発現構築物を

50

含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図50】G c a s e（例えば、G B A 1またはその一部分）及びガラクトシルセラミダーゼ（例えば、G A L Cまたはその一部分）をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。

【図51】G c a s e（例えば、G B A 1またはその一部分）、プロサポシン（例えば、P S A Pまたはその一部分）、及び $\alpha$ -S y nについての干渉RNAをコードする発現構築物を含むr A A Vベクターを含むプラスミドの一実施形態を示す概略図である。

【図52A】F T D - G R N変異を有する患者由来のi P S C由来の神経幹細胞（N S C）株が、健常な対照対象由来のN S C株よりも少ないプログラニユリンを分泌したことを示す。統計を、対応のないt検定、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 、 $*** = p < 0.001$ を使用して決定した。データは、平均 $\pm$  S E Mとして示される。

10

【図52B】F T D - G R N変異保有ニューロン培養における用量範囲のP R 0 0 6 A形質導入の結果を示す。N S Cを等密度で播種し、ニューロンに分化させた。7日目に、賦形剤または示された量のP R 0 0 6 Aで72時間ニューロンに形質導入した。分泌されたプログラニユリン発現を、E L I S Aによって細胞培地から測定し、体積に対して正規化した（ $n = 3 \sim 4$ 、平均値 $\pm$  S E M）。黒い破線は、対照ニューロン（賦形剤処置）から分泌されるプログラニユリンの内因性レベルを表す。分泌されたプログラニユリンは、賦形剤処置のF T D - G R Nニューロンにおいて検出可能ではなかった。統計を、A N O V A、続いてT u k e y H S Dを使用して決定し、賦形剤処置の対照ニューロンに対する各状態の統計的比較をグラフ、 $* = p < 0.05$ 、 $*** = p < 0.001$ で示す。L L O Q = 定量の下限、M O I = 感染多重度。

20

【図52C】F T D - G R Nニューロン培養物において、ニューロン培養物のP R 0 0 6 A処理が、主要なリソソームプロテアーゼ、カテプシンDの欠陥のある成熟を救出したことを示す。N S Cを等濃度で播種し、ニューロンに分化させた。7日目に、 $5.3 \times 10^5$ のM O Iで72時間、賦形剤またはP R 0 0 6 Aでニューロンに形質導入した。ニューロンを溶解し、溶解物を、抗カテプシンD（C T S D）一次抗体を用いてP r o t e i n S i m p l e W e s t e r n J e s sシステムで分析した。成熟カテプシンD（m a t C T S D）及びプロカテプシンD（p r o C T S D）の両方に対応するバンドを検出し、曲線下面積を各バンドについて定量し、内部総タンパク質正規化シグナルに対して正規化した。賦形剤またはP R 0 0 6 A処置のF T D - G R Nニューロンにおけるm a t C T S D / p r o C T S D比を決定し、y軸は、賦形剤処置の対照ニューロン（ $n = 3$ 、平均 $\pm$  S E M）の比のパーセントとして、m a t C T S D / p r o C T S D比を示す。統計を、対応のないt検定、 $* = p < 0.05$ を使用して決定した。

30

【図52D】P R 0 0 6 AがF T D - G R Nニューロン培養におけるT D P - 4 3病理を低減することを示す。N S Cを等濃度で播種し、ニューロンに分化させた。7日目に、 $5.3 \times 10^5$ のM O Iで賦形剤またはP R 0 0 6 Aを用いてニューロンを形質導入し、形質導入の21日後に収集した。ニューロンを溶解し、T r i t o n - X不溶性タンパク質画分を単離し、抗T D P - 4 3抗体（# 1 2 8 9 2 - A P - 1）を用いてP r o t e i n S i m p l e W e s t e r n J e s sシステムで分析した。T D P - 4 3に対応するバンドを検出し、各バンドについて曲線下面積を定量化し、不溶性画分の総タンパク質濃度に対して正規化した。Y軸は、不溶性T D P - 4 3の量を、各F T D - G R N細胞株について別々に正規化された賦形剤処置レベルのパーセントとして示す（ $n = 3$ 、平均 $\pm$  S E M）。図52Dは、F T D - G R N神経細胞培養において、P R 0 0 6 A処理が、F T D - G R N病理の特徴である不溶性T D P - 4 3を減少させたことを示す。統計を、対応のないt検定、 $** = p < 0.01$ 、 $*** = p < 0.001$ を使用して決定した。

40

【図52E】F T D - G R N変異を有する患者由来のi P S C由来のN S C株が、健常な対照対象由来のN S C株よりも少ないプログラニユリンを発現したことを示す。統計を、対応のないt検定、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 、 $*** = p < 0.001$ を使用して決定した。データは、平均 $\pm$  S E Mとして示される。

【図52F】P R 0 0 6 AがF T D - G R Nニューロン培養におけるT D P - 4 3病理を

50

低減することを示す。NSCを等濃度で播種し、ニューロンに分化させた。7日目に、 $5 \cdot 3 \times 10^5$ のMOIで賦形剤またはPR006Aを用いてニューロンを形質導入し、形質導入の21日後に収集した。PR006Aで処理されたiPSC由来ニューロンの免疫蛍光画像由来の核TDP-43シグナルの定量化である。賦形剤またはPR006Aで処理したFTD-GRNニューロンにおける核あたりのTDP-43シグナル強度を決定し、y軸は、核あたりのTDP-43シグナル強度を、賦形剤処置の対照ニューロンの核あたりのTDP-43シグナル強度のパーセントとして示す( $n=145 \sim 306$ 細胞、平均 $\pm$ SEM)。抗TDP-43抗体(#12892-AP-1)を使用してTDP-43を測定し、核領域をDAPI染色によって決定した。図52Fは、PR006A処理が、FTD-GRNニューロン培養における核TDP-43発現レベルを、野生型対照レベルに近いレベルまで増加させたことを示す。統計を、対応のないt検定、 $**=p<0.01$ 、 $***=p<0.001$ を使用して決定した。

10

【図52G】ヒトFTD-GRN由来の神経幹細胞(NSC)株及びヒト対照細胞株を神経細胞培養物に分化させることに成功したことを示す一連の画像である。対照及びFTD-GRN NSC株(FTD-GRN#1及びFTD-GRN#2)を、細胞形態及びニューロンマーカーについての免疫蛍光染色(NeuN[赤色]、左で標識されるMAP2またはTau[緑色])によって示されるように、7日後にニューロンに分化させた。DAPI(青色)を使用して核を染色した。

【図53-1】A~Cは、成体用量範囲のPR006A FTD-GRNマウスモデル試験におけるCNSにおける生体内分布及びプログラニュリン発現を分析する実験の結果を示す一連の棒グラフである。4か月齢のGrn KOマウスに、ICV投与によってPR006Aまたは賦形剤を投与した。それらを、CNSにおける生化学的エンドポイントのために、賦形剤(赤色)または、 $1.1 \times 10^9$  vg ( $2.7 \times 10^9$  vg/g脳)、 $1.1 \times 10^{10}$  vg ( $2.7 \times 10^{10}$  vg/g脳)、もしくは $1.1 \times 10^{11}$  vg ( $2.7 \times 10^{11}$  vg/g脳)の用量のPR006A(青色)での処置の3か月後に殺した。A:ベクターゲノムの存在を大脳皮質及び脊髄において評価し、対数スケールでgDNAの $\mu$ gあたりのベクターゲノムとして生体内分布を示す( $n=8 \sim 10$ /群、平均 $\pm$ SEM)。ベクターゲノムの存在を、ベクター参照標準曲線を使用して、qPCRによって定量化した。破線(50ベクターゲノム/ $\mu$ g gDNA)は、ベクターの存在の陽性についての閾値を表す。B:PR006AがコードされたGRN RNA発現を、大脳皮質における定量RT-PCR(qRT-PCR)によって評価した( $n=8 \sim 10$ /群、平均値 $\pm$ SEM)。GRNコピーの数(発明者らのコドン最適化PR006A配列に特異的な)は、全RNAの1 $\mu$ gに対して正規化され、対数スケールで示される。C:プログラニュリタンパク質レベルを、脳及び脊髄におけるヒト特異的プログラニュリンELISAを使用して測定した( $n=8 \sim 10$ /群、平均 $\pm$ SEM)。組織プログラニュリンレベルを総タンパク質濃度に対して正規化した。定量の下限(LLOQ)は、破線灰色で示される。組織ELISAアッセイについて、LLOQ(ng/mg)値は、アッセイLLOQ(ng/mL)を、すべての試料由来の総タンパク質濃度平均で除すことによって決定される。エラーバーのないx軸上の処置群の凡例の色に対応する単一の線は、その群におけるすべての動物が0であったことを示す。賦形剤処置のGrn KOマウス群と比較するために、ANOVA、続いてDunnett's検定、 $*=p<0.05$ 、 $**=p<0.01$ 、 $***=p<0.001$ を使用して、統計分析を実施した。vg=ベクターゲノム、LLOQ=定量の下限、SC=脊髄。

20

30

40

【図53-2】D~Eは、成体用量範囲のPR006A FTD-GRNマウスモデル試験における末梢組織生体内分布及びプログラニュリン発現を分析する実験の結果を示す一連の棒グラフである。4か月齢のGrn KOマウスに、ICV投与によってPR006Aまたは賦形剤を投与した。それらを、肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓、及び生殖腺における生化学的エンドポイントのために、賦形剤(赤色)または $1.1 \times 10^9$  vg ( $2.7 \times 10^9$  vg/g脳)、 $1.1 \times 10^{10}$  vg ( $2.7 \times 10^{10}$  vg/g脳)、もしくは $1.1 \times 10^{11}$  vg ( $2.7 \times 10^{11}$  vg/g脳)の用量のPR006A(青色)での

50

処置の3か月後に 殺した。D：ベクターゲノムの存在を評価し、対数スケールでgDNAの $\mu\text{g}$ あたりのベクターゲノムとして生体内分布を示す( $n=8\sim10$ /群、平均 $\pm$ SEM)。ベクターゲノムの存在を、ベクター参照標準曲線を使用して、qPCRによって定量化した。破線(50ベクターゲノム/ $\mu\text{g}$  gDNA)は、ベクターの存在の陽性についての閾値を表す。E：プログラニユリンタンパク質レベルを、ELISAを使用して測定した( $n=8\sim10$ /群、平均 $\pm$ SEM)。組織プログラニユリンレベルを総タンパク質濃度に対して正規化した。エラーバーのないx軸上の処置群の凡例の色に対応する単順な線は、その群におけるすべての動物が0であったことを示す。賦形剤処置のGrn KOマウス群と比較するために、ANOVA、続いてDunnett's検定、 $*=p<0.05$ 、 $***=p<0.001$ を使用して、統計分析を実施した。vg=ベクターゲノム。

10

【図53-3】Fは、成体用量範囲のPR006A FTD-GRNマウスモデル研究における血漿におけるプログラニユリンレベルを分析する実験の結果を示す棒グラフである。4か月齢のGrn KOマウスに、ICV投与によってPR006Aまたは賦形剤を投与した。それらを、血漿における生化学的エンドポイントのために、賦形剤(赤色)または、 $1.1\times10^9\text{vg}$  ( $2.7\times10^9\text{vg/g脳}$ )、 $1.1\times10^{10}\text{vg}$  ( $2.7\times10^{10}\text{vg/g脳}$ )、もしくは $1.1\times10^{11}\text{vg}$  ( $2.7\times10^{11}\text{vg/g脳}$ )の用量のPR006A(青色)での処置の3か月後に 殺した。プログラニユリンタンパク質レベルを、血漿におけるヒト特異的プログラニユリンELISA( $n=8\sim10$ /群、平均値 $\pm$ SEM)を使用して測定した。血漿レベルは、対数スケールで示される。定量の下限(LLQ)は、破線灰色で示される。賦形剤処置のGrn KOマウス群と比較するために、ANOVA、続いてDunnett's検定、 $*=p<0.05$ 、 $**=p<0.01$ 、 $***=p<0.001$ を使用して、統計分析を実施した。LLQ=定量の下限。vg=ベクターゲノム。

20

【図53-4】G~Hは、成体用量範囲のPR006A FTD-GRN成体マウスモデル試験におけるリソソームの神経病理学的な欠損の減少を示す実験の結果を示す一連の棒グラフである。4か月齢のGrn KOマウスに、ICV投与によってPR006Aまたは賦形剤を投与した。それらを、分析のために、賦形剤(赤色)または、 $1.1\times10^9\text{vg}$  ( $2.7\times10^9\text{vg/g脳}$ )、 $1.1\times10^{10}\text{vg}$  ( $2.7\times10^{10}\text{vg/g脳}$ )、または $1.1\times10^{11}\text{vg}$  ( $2.7\times10^{11}\text{vg/g脳}$ )の用量のPR006A(青色)での処置の3か月後に 殺した。リポフスチン症を、以下の2つの独立した方法によって分析した。(1)病理学者によるH&E染色脳切片の点数付け、及び(2)IHC切片由来のリポフスチン自己蛍光の定量化。G：リポフスチンの蓄積(自己蛍光リポフスチン顆粒)を、以下の等級付けスキームに従って、盲検化された有資格の病理学者によって異なる脳領域におけるH&E染色切片において半定量的に採点した。0=リポフスチンは観察されない。1=領域全体に散在するリポフスチンの非常に小さな顆粒( $<2\mu\text{m}$ )。2=小さな顆粒の蓄積の密度の増加、及び/またはより大きな顆粒の発達( $>2\sim3\mu\text{m}$ )。3=低い対物レンズパワーから見える高密度のリポフスチンの顆粒を有する多焦点領域。4=広範囲にわたるリポフスチンの蓄積。大脳皮質、海馬、及び視床/視床下部脳領域におけるリポフスチン重症度点数を示す( $n=8\sim10$ /群)。H：大脳皮質、海馬、及び視床においてユビキチンのIHC分析を実施し、定量化した。閾値を超える免疫反応性物体のサイズ(免疫反応性物体のサイズ $[\mu\text{m}^2]$ )は、ユビキチンについて示されている( $n=8\sim10$ /群、平均 $\pm$ SEM)。賦形剤処置のGrn KOマウス群と比較するために、ANOVA、続いてDunnett's検定、 $*=p<0.05$ 、 $**=p<0.01$ 、 $***=p<0.001$ によって統計を決定した。vg=ベクターゲノム、WT=野生型。

30

40

【図53-5】I~Kは、成体用量範囲のPR006A FTD-GRNマウスモデル試験における神経炎症マーカーの減少を示す実験の結果を示す一連の棒グラフである。4か月齢のGrn KOマウスに、ICV投与によってPR006Aまたは賦形剤を投与した。それらを、分析のために、賦形剤(赤色)または、 $1.1\times10^9\text{vg}$  ( $2.7\times10^9$

50

v g / g 脳)、 $1.1 \times 10^{10}$  v g ( $2.7 \times 10^{10}$  v g / g 脳)、または $1.1 \times 10^{11}$  v g ( $2.7 \times 10^{11}$  v g / g 脳)の用量のPR006A(青色)での処置の3か月後に 殺した。I: Tnf及びCd68の遺伝子発現(mRNAレベル)を、体性感覚皮質におけるqRT-PCRによって測定した(平均±SEM、 $n=8 \sim 10$ /群)。遺伝子発現をハウスキーピング遺伝子Ppi bに対して正規化した。J~K: 大脳皮質、海馬、及び視床における固定された脳切片において、Iba1(J)及びGFAP(K)のIHC分析を実施し、定量化した。閾値を超える物体によって覆われる関心領域の割合(免疫反応面積[%])を示す(平均±SEM、 $n=8 \sim 10$ /群)。各群を賦形剤処置のGrn KOマウス群と比較してDunnett's調整を伴うANOVA、 $*=p<0.05$ 、 $***=p<0.001$ を使用して統計を決定した。v g =ベクターゲノム、WT =野生型。

10

【図53-6】L~Nは、成体用量範囲のPR006A FTD-GRNマウスモデル試験におけるリソソーム及び免疫経路の遺伝子発現の減少を示す実験の結果を示す一連の棒グラフである。4か月齢のGrn KOマウスに、ICV投与によってPR006Aまたは賦形剤を投与した。それらを、分析のために、賦形剤(赤色)または、 $1.1 \times 10^9$  v g ( $2.7 \times 10^9$  v g / g 脳)、 $1.1 \times 10^{10}$  v g ( $2.7 \times 10^{10}$  v g / g 脳)、または $1.1 \times 10^{11}$  v g ( $2.7 \times 10^{11}$  v g / g 脳)の用量のPR006A(青色)での処置の3か月後に 殺した。RNA配列決定は、ICV処置のGrn KOマウス及び年齢適合WT C57BL/6Jマウス(灰色)由来の大脳皮質試料において実施した。遺伝子セット変異分析(GSVA)法を使用して、WTマウスと比較して賦形剤処置のGrn KOマウスにおいて調節不全である以前に公開された遺伝子特徴のmRNA発現レベルを比較した。示されるデータは、2つの公開された研究及び1つのHALLMARK経路からのキュレートされた遺伝子セットについてのGSVA活性点数である。L: 細胞成分: 液胞(GO: 0005773)、M: リソソーム、及びN: 補体系(HALLMARK経路)(中央値±範囲、 $n=8 \sim 10$ /群)。ファミリーワイズI型エラー率について制御しながら賦形剤処置のGrn KOマウス群と比較するために、ANOVA、続いてDunnett's検定、 $***=p<0.001$ を使用して統計分析を実施した。GSVA=遺伝子セット変異分析、v g =ベクターゲノム、WT =野生型。

20

【図54A】qPCRによって定量化されたPR006A導入遺伝子の生体内分布を分析する実験の結果を示す一連の棒グラフである。導入遺伝子レベルは、賦形剤、低用量のPR006A( $6.5 \times 10^9$  v g / g 脳)、または高用量のPR006A( $6.5 \times 10^{10}$  v g / g 脳)のいずれかのICM注射の182日後のNHPにおけるqPCR法を使用して分析した。各バーは、群あたり3頭の動物の平均±SEMを表し、黄色の線は、 $50$  v g /  $\mu$  gのDNAでの定量の下限を示す。

30

【図54B】ヒトプログランニューリンに対する抗薬物抗体のレベルを分析する実験の結果を示す一連の棒グラフである。賦形剤、低用量のPR006A( $6.5 \times 10^9$  v g / g 脳)、または高用量のPR006A( $6.5 \times 10^{10}$  v g / g 脳)のいずれかで処置後29日目及び182日目のNHP血清及びCSF試料におけるプログランニューリンに対する抗体。データは平均値±SEMを表す。

【図54C】PR006A導入遺伝子(GRN)の発現を分析する実験の結果を示す一連の棒グラフである。GRN発現レベルを、RT-qPCRを使用して、183日目に収集したNHP皮質、海馬、及び腹側中脳において決定した。データは、平均±SEMとして示される。

40

【図54D】Simple Western(商標)(JESS)プラットフォームによって定量化されたCSFにおけるプログランニューリンレベルを分析する実験の結果を示す棒グラフである。プログランニューリンレベルを、183日目に収集したNHP CSF試料において決定し、Simple Western(商標)(JESS)分析によって決定した。賦形剤、低用量のPR006A( $6.5 \times 10^9$  v g / g 脳重量)または高用量のPR006A( $6.5 \times 10^{10}$  v g / g 脳重量)で処置したNHP由来のCSF試料。提示されるデータは平均±SEMであり、P値:  $*p<0.05$ 、ウィリアム傾向検定を使

50

用した一元的用量依存性応答分析による。

【図55】自動Western Jessアッセイの選択性及び特異度の結果を示すグラフである。FTD患者CSF試料におけるプログラニユリンタンパク質レベルは、Jessによって58kDaで検出された。群(A)：ヘテロ接合性FTD患者、ならびに群(B)及び(C)：家族性非保有者または正常個体。データは、平均±平均の標準誤差(SEM)として表す。SEM値は、垂直方向のエラーバーとして表示される。

【図56】ELISAによって検出されたFTD患者CSF試料におけるプログラニユリンレベルを示すグラフである。群(A)：ヘテロ接合性FTD患者、ならびに群(B)及び(C)：家族性非保有者または正常個体。データは、平均±平均の標準誤差(SEM)として表す。SEM値は、垂直方向のエラーバーとして表示される。

【図57】Jess自動Westernプラットフォーム上で二重に実行された各CSF試料のゲル画像である。試料を、一次抗体Adipogen PG-359-7を使用して4倍希釈で分析した。第1のレーンは、分子量基準であり、右側は、実施例14において報告される免疫反応性を計算するために使用されるバンドの識別である。

【図58】A～Bは、ヒトPGRN発現レベルの測定を示す一連のプロットである。ヒトPGRN発現レベルを、Simple Western (商標) (Jess) 分析を使用して、180日目に収集した非ヒト霊長類(NHP)CSF試料において決定した。賦形剤(「賦形剤」)、低用量のPR006A ( $6.5 \times 10^9$  vg/g脳重量、「低」)、または高用量のPR006 ( $6.5 \times 10^{10}$  vg/g脳重量、「高」)で処置したNHP由来のCSFを分析した。データは、平均免疫反応性ピーク面積(A)、または賦形剤処置の動物に対する倍率変化(B)として表される。各ドットは、1つのNHP由来の単一のCSF試料(技術的複製の平均)を表し、ボックスは、3つの個々のNHPの平均値+/-標準誤差を表す。

【図59-1】A～Cは、PR006A処置後の老齢FTD-GRNマウスモデルにおけるCNSにおける生体内分布及びプログラニユリン発現を分析する実験の結果を示す一連の棒グラフである。組織試料は、賦形剤(赤色)または $9.7 \times 10^{10}$  vg ( $2.4 \times 10^{11}$  vg/g脳)のPR006A(青色)のICVを受けた2か月後に、18か月齢のGrn KOマウスから収集した。A：大脳皮質及び脊髄におけるベクターゲノムの存在を評価した(平均値±SEM、n=4/群)。生体内分布は、対数スケールで1µgのgDNAあたりのベクターゲノムとして示す。ベクターゲノムの存在を、ベクター参照標準曲線を使用して、qPCRによって定量化した。破線(50ベクターゲノム/µg gDNA)は、ベクターの存在の陽性についての閾値を表す。B～C：プログラニユリンタンパク質レベルを、CNS組織(脳及び脊髄(B))及びCSF(C)(平均±SEM、n=4/群)におけるELISAを使用して測定した。組織プログラニユリンレベルを総タンパク質濃度に対して正規化し、プログラニユリンのCSFレベルを流体体積に対して正規化した。定量の下限(LLOQ)は、破線灰色で示される。組織ELISAアッセイについて、LLOQ (ng/mg)値は、アッセイLLOQ (ng/mL)を、すべての試料由来の総タンパク質濃度平均で除すことによって決定された。エラーバーのないx軸上の単順な赤い線は、その群におけるすべての動物が0であったことを示す。統計分析は、Kruskal-Wallis、\* =  $p < 0.05$ 、\*\* =  $p < 0.01$ 、\*\*\* =  $p < 0.001$ を使用して実施した。vg = ベクターゲノム、LLOQ = 定量の下限、SC = 脊髄。

【図59-2】D～Eは、PR006A処置後の老齢FTD-GRNマウスモデルにおけるリソソームの神経病理学的欠損の減少を示す実験の結果を示す一連の棒グラフ及び画像である。組織試料は、賦形剤(赤色)または $9.7 \times 10^{10}$  vg ( $2.4 \times 10^{11}$  vg/g脳)のPR006A(青色)のICVを受けた2か月後に、18か月齢のGrn KOマウスから収集した。リポフスチン症を、病理学者によるH&E染色脳切片の点数付けによって分析した。D：脳切片の視床/視床下部領域からの代表的なリポフスチン画像。白い矢印はリポフスチンの蓄積の例を示す。自己蛍光リポフスチン顆粒について評価した脳切片由来のH&E染色スライドの大脳皮質、海馬、及び視床/視床下部におけるリポフ

スチン重症度点数の概要を提供する。リポフスチンの蓄積を、以下の等級付けスキームに従って、盲検化された有資格の病理学者によって半定量的に採点した：0＝リポフスチンは観察されなかった。1＝領域全体に散在するリポフスチンの非常に小さな顆粒（ $< 2 \mu\text{m}$ ）。2＝小さな顆粒の蓄積の密度の増加、及び／またはより大きな顆粒の発達（ $> 2 \sim 3 \mu\text{m}$ ）。3＝低い対物レンズパワーから見える高密度のリポフスチンの顆粒を有する多焦点領域。4＝広範囲にわたるリポフスチンの蓄積。E：大脳皮質、海馬、及び視床においてユビキチンのIHC分析（ $n = 4$ ／群）を実施し、定量化した。各領域の陽性細胞密度（細胞／ $\text{mm}^2$ ）を示した（平均±SEM）。統計を、t検定、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ を使用して決定した。vg＝ベクターゲノム。

【図59-3】D～Eは、PR006A処置後の老齢FTD-GRNマウスモデルにおけるリソソームの神経病理学的欠損の減少を示す実験の結果を示す一連の棒グラフ及び画像である。組織試料は、賦形剤（赤色）または $9.7 \times 10^{10} \text{vg}$ （ $2.4 \times 10^{11} \text{vg/g}$ 脳）のPR006A（青色）のICVを受けた2か月後に、18か月齢のGrn KOマウスから収集した。リポフスチン症を、病理学者によるH&E染色脳切片の点数付けによって分析した。D：脳切片の視床／視床下部領域からの代表的なリポフスチン画像。白い矢印はリポフスチンの蓄積の例を示す。自己蛍光リポフスチン顆粒について評価した脳切片由来のH&E染色スライドの大脳皮質、海馬、及び視床／視床下部におけるリポフスチン重症度点数の概要を提供する。リポフスチンの蓄積を、以下の等級付けスキームに従って、盲検化された有資格の病理学者によって半定量的に採点した：0＝リポフスチンは観察されなかった。1＝領域全体に散在するリポフスチンの非常に小さな顆粒（ $< 2 \mu\text{m}$ ）。2＝小さな顆粒の蓄積の密度の増加、及び／またはより大きな顆粒の発達（ $> 2 \sim 3 \mu\text{m}$ ）。3＝低い対物レンズパワーから見える高密度のリポフスチンの顆粒を有する多焦点領域。4＝広範囲にわたるリポフスチンの蓄積。E：大脳皮質、海馬、及び視床においてユビキチンのIHC分析（ $n = 4$ ／群）を実施し、定量化した。各領域の陽性細胞密度（細胞／ $\text{mm}^2$ ）を示した（平均±SEM）。統計を、t検定、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ を使用して決定した。vg＝ベクターゲノム。F～Iは、PR006A処置後の老齢FTD-GRNマウスモデルにおける神経炎症マーカーの減少を示す実験の結果を示す一連の棒グラフである。組織試料は、賦形剤（赤色）または $9.7 \times 10^{10} \text{vg}$ （ $2.4 \times 10^{11} \text{vg/g}$ 脳）のPR006A（青色）のICVを受けた2か月後に、18か月齢のGrn KOマウスから収集した。F：Tnf及びCd68の遺伝子発現を、体性感覚皮質におけるqRT-PCRによって測定した（平均±SEM、 $n = 4$ ／群）。遺伝子発現をハウスキーピング遺伝子Ppi bに対して正規化した。（G）炎症促進サイトカインTNF $\alpha$ のタンパク質発現を、Mesoscale Discoveryマウス炎症促進サイトカインアッセイを用いて大脳皮質において測定した（平均±SEM、 $n = 4$ ／群）。大脳皮質を均質化し、タンパク質発現レベルを組織溶解物の総タンパク質濃度に対して正規化した。H～I：固定脳切片においてIba1（H）及びGFAP（I）のIHC分析を実施し、定量化した。分析された3つの脳領域（大脳皮質、海馬、及び視床）由来の陽性細胞密度（細胞／ $\text{mm}^2$ ）の編集集を示す（平均±SEM、 $n = 3 \sim 4$ ／群）。統計分析は、t検定、 $* = p < 0.05$ を使用して実施した。vg＝ベクターゲノム。

【図59-4】F～Iは、PR006A処置後の老齢FTD-GRNマウスモデルにおける神経炎症マーカーの減少を示す実験の結果を示す一連の棒グラフである。組織試料は、賦形剤（赤色）または $9.7 \times 10^{10} \text{vg}$ （ $2.4 \times 10^{11} \text{vg/g}$ 脳）のPR006A（青色）のICVを受けた2か月後に、18か月齢のGrn KOマウスから収集した。F：Tnf及びCd68の遺伝子発現を、体性感覚皮質におけるqRT-PCRによって測定した（平均±SEM、 $n = 4$ ／群）。遺伝子発現をハウスキーピング遺伝子Ppi bに対して正規化した。（G）炎症促進サイトカインTNF $\alpha$ のタンパク質発現を、Mesoscale Discoveryマウス炎症促進サイトカインアッセイを用いて大脳皮質において測定した（平均±SEM、 $n = 4$ ／群）。大脳皮質を均質化し、タンパク質発現レベルを組織溶解物の総タンパク質濃度に対して正規化した。H～I：固定脳切片に

においてIba1 (H) 及びGFAP (I) のIHC分析を実施し、定量化した。分析された3つの脳領域(大脳皮質、海馬、及び視床)由来の陽性細胞密度(細胞/mm<sup>2</sup>)の編集物を示す(平均±SEM、n=3~4/群)。統計分析は、t検定、\* = p < 0.05を使用して実施した。vg = ベクターゲノム。

【図60】PR006Aで形質導入されたHEK293T細胞の用量反応曲線を示すグラフである(n=2、平均±SEM)。等しい数の細胞に、様々な量のPR006Aで形質導入した。72時間後、ELISAアッセイを使用して、細胞培地中のプログラニュリンタンパク質レベルを測定した。

【図61】老齢FTD-GRNマウスモデルにおける最大用量PR006Aの試験設計の図である。10μLの賦形剤(対照)または $9.7 \times 10^{10}$ vg ( $2.4 \times 10^{11}$ vg/g脳)の用量のPR006Aを、ICV注射により以下の2つのコホートのGrn KOマウスに送達した。(1)注射時16か月齢(n=4~5/群、PRV-2018-027)及び(2)注射時14か月齢(n=1/賦形剤処置群、n=3/PR006A処置群、PRV-2019-002)。動物を注射の2か月後に殺した。CNS及び末梢組織を収集して、PR006A生体内分布(qPCR)、プログラニュリンタンパク質発現(ELISA)、及び組織病理(H&E)を分析した。炎症促進マーカーの発現、リポフスチンの蓄積、及びユビキチンの蓄積を脳において評価した。

【図62】A~Bは、PR006A処置後の老齢FTD-GRNマウスモデルにおける末梢組織生体内分布及びプログラニュリン発現の結果を示す棒グラフである。組織試料は、賦形剤(赤色)または $9.7 \times 10^{10}$ vg ( $2.4 \times 10^{11}$ vg/g脳)のPR006A(青色)のICVを受けた2か月後に、18か月齢のGrn KOマウスから収集した。A:肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓、及び生殖腺におけるベクターゲノムの存在を評価した(平均±SEM、n=4/群)。生体内分布を、対数スケールでgDNAのμgあたりのベクターゲノムとして示す。ベクターゲノムの存在を、ベクター参照標準を使用して、qPCRによって定量化した。B:プログラニュリンタンパク質レベルを、ELISA(平均±SEM、n=4/群)を使用して測定した。組織プログラニュリンレベルを総タンパク質濃度に対して正規化した。エラーバーのないx軸上の単順な赤い線は、その群におけるすべての動物が0であったことを示す。統計分析は、Kruskal-Wallis、\* = p < 0.05、\*\* = p < 0.01、\*\*\* = p < 0.001を用いて実施した。vg = ベクターゲノム。

【図63】10μL賦形剤(対照)または $1.1 \times 10^9$ vg ( $2.7 \times 10^9$ vg/g脳)、 $1.1 \times 10^{10}$ vg ( $2.7 \times 10^{10}$ vg/g脳)、または $1.1 \times 10^{11}$ vg ( $2.7 \times 10^{11}$ vg/g脳)PR006Aの用量のPR006Aが4か月齢のGrn KOマウス(n=10/群)へICV注射によって送達された、成体FTD-GRNマウスモデルにおける用量範囲のPR006Aについての試験設計の図である。動物は、マウスが7か月齢であったとき、注射の3か月後に殺された。CNS及び末梢組織を収集して、PR006A生体内分布(qPCR)、プログラニュリンタンパク質発現(ELISA)、及び組織病理(H&E)を分析した。炎症促進マーカーの発現、リポフスチンの蓄積、ユビキチンの蓄積、及び全般的な遺伝子発現変化を脳において評価した。

【図64】ヒトプログラニュリンをコードする発現構築物を含む組換えアデノ随伴ウイルスベクター(PR006A)の一実施形態を示す概略図である。「bp」は、「塩基対」を指す。「kan」は、カナマイシンに対する耐性を付与する遺伝子を指す。「GRN」は、「プログラニュリン」を指す。「ITR」は、アデノ随伴ウイルス逆位末端反復配列を指す。「TRY」は、3つの転写制御活性化部位、すなわちTATA、RBS、及びYY1を含む配列を指す。「CBAP」は、ニワトリβ-アクチンプロモーターを指す。「CMVe」は、サイトメガロウイルスエンハンサーを指す。「WPRE」は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素を指す。「bGH」は、ウシ成長ホルモンポリAシグナル尾部を指す。「int」は、イントロンを指す。PR006Aの2本鎖のヌクレオチド配列は、配列番号90及び91に提供される。

【発明を実施するための形態】

## 【0014】

本開示は、部分的に、対象におけるある特定の遺伝子産物（例えば、CNS疾患に関連する遺伝子産物）の組み合わせの発現のための組成物及び方法に基づく。遺伝子産物は、タンパク質、タンパク質の断片（例えば、部分）、CNS疾患関連遺伝子を阻害する干渉核酸などであり得る。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、CNS疾患関連遺伝子によってコードされるタンパク質またはタンパク質断片である。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、CNS疾患関連遺伝子を阻害する干渉核酸（例えば、shRNA、siRNA、miRNA、amiRNAなど）である。

## 【0015】

CNS疾患関連遺伝子は、FTD（前頭側頭型認知症）またはPD（パーキンソン病）などのCNS疾患に遺伝的、生化学的、または機能的に関連する遺伝子産物をコードする遺伝子を指す。例えば、GRN遺伝子（タンパク質PGRNをコードする）において病原性変異を有する個体は、GRNにおいて変異を有さない個体と比較して、FTDを発症するリスクが増加する。同様に、GBA1遺伝子（タンパク質Gcaseをコードする）において変異を有する個体は、GBA1において変異を有さない個体と比較して、PDを発症するリスクが増加することが観察されている。別の例では、PDは、 $\alpha$ -シヌクレイン（ $\alpha$ -Syn）タンパク質を含むタンパク質凝集体の蓄積に関連しており、したがって、SNCA（ $\alpha$ -Synをコードする）は、PD関連遺伝子である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の発現カセットは、野生型または非変異体形態のCNS疾患関連遺伝子（またはそのコード配列）をコードする。CNS疾患関連遺伝子の例を表1に記載する。

表1：CNS疾患関連遺伝子の例

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

| 名称                | 遺伝子          | 機能                                                           | NCBI アクセ<br>ッション番号                                                                       |
|-------------------|--------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| リソソーム膜タンパク質 2     | SCARB2/LIMP2 | グルコシルセラミダーゼについてのリソソーム受容体 (GBA 標的)                            | NP_005497.1 (アイソフォーム 1)、<br>NP_001191184.1 (アイソフォーム 2)                                   |
| プロサポシン            | PSAP         | リソソーム区画に局在し、短いオリゴ糖基を有するスフィンゴ糖脂質の異化を促進する、サポシン A、B、C、及び D の前駆体 | AAH01503.1、<br>AAH07612.1、<br>AAH04275.1、<br>AAA60303.1                                  |
| ベーターグルコセレブロシダーゼ   | GBA1         | グルコセレブロシドのベーターグルコシド結合を切断する                                   | NP_001005742.1 (アイソフォーム 1)、<br>NP_001165282.1 (アイソフォーム 2)、<br>NP_001165283.1 (アイソフォーム 3) |
| 非リソソームグルコシルセラミダーゼ | GBA2         | グルコシルセラミドの遊離グルコース及びセラミドへの変換を触媒する                             | NP_065995.1 (アイソフォーム 1)、<br>NP_001317589.1 (アイソフォーム 2)                                   |

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

|                                   |        |                                                                                               |                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ガラクトシルセラミ<br>ダーゼ                  | GALC   | セラミド誘導体<br>からガラクトー<br>スを除去する                                                                  | EAW81359.1<br>(アイソフォ<br>ーム<br>CRA_a)、<br>EAW81360.1<br>(アイソフォ<br>ーム<br>CRA_b)、<br>EAW81362.1<br>(アイソフォ<br>ーム CRA__<br>c)                                     |
| スフィンゴミエリン<br>ホスホジエステラー<br>ゼ 1     | SMPD1  | スフィンゴミエ<br>リンをセラミド<br>に変換する                                                                   | EAW68726.1<br>(アイソフォ<br>ーム<br>CRA_a)、<br>EAW68727.1<br>(アイソフォ<br>ーム<br>CRA_b)、<br>EAW68728.1<br>(アイソフォ<br>ーム<br>CRA_c)、<br>EAW68729.1<br>(アイソフォ<br>ーム CRA_d) |
| カテプシン B                           | CTSB   | タンパク質の細<br>胞内分解及びタ<br>ーンオーバーに<br>関与すると考え<br>られるチオール<br>プロテアーゼ、<br>腫瘍浸潤及び転<br>移にも関係があ<br>るとされる | AAC37547.1<br>、<br>AAH95408.1<br>、<br>AAH10240.1                                                                                                             |
| RAB7、メンバーRAS<br>がん遺伝子ファミリ<br>ー様 1 | RAB7L1 | 小胞輸送を調節<br>する                                                                                 | AAH02585.1                                                                                                                                                   |

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

|                         |       |                                                                                                   |                |
|-------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 空胞タンパク質選別<br>関連タンパク質 35 | VPS35 | レトロマーカー<br>ゴ選択性複合体<br>の構成要素                                                                       | NP_060676.2    |
| GTP シクロヒドロラ<br>ーゼ 1     | GCH1  | グアノシン三リン<br>酸の加水分解<br>を担って 7,8-ジ<br>ヒドロネオプテ<br>リン三リン酸を<br>形成する                                    | AAH25415.1     |
| インターロイキン 34             | IL34  | 単球の増殖また<br>は生存を増加さ<br>せ、コロニー刺<br>激因子 1 受容体<br>に結合すること<br>によって活性を<br>誘発する                          | AAH29804.1     |
| 骨髄性細胞発現トリ<br>ガー受容体 2    | TREM2 | TYRO タンパク<br>質チロシンキナ<br>ーゼ結合タンパ<br>ク質と受容体シ<br>グナル伝達複合<br>体を形成し、免<br>疫応答において<br>機能し、慢性炎<br>症に関与し得る | AAF698<br>24.1 |
| プログランニューリン              | PGRN  | 発生、炎症、細<br>胞増殖及びタン<br>パク質恒常性に<br>おいて役割を果<br>たす                                                    | NP_002087.1    |

## 【0016】

ゴーシェ病患者（GBA1 遺伝子の両方の染色体対立遺伝子に変異を有する）に加えて、GBA1 の 1 つの対立遺伝子のみにおいて変異を有する患者は、パーキンソン病（PD）のリスクが非常に増加する。歩行困難、安静時の振戦、硬直、及び頻繁な抑うつ、睡眠障害、及び認知機能低下を含む PD 症状の重症度は、酵素活性の低下の程度と相関する。したがって、ゴーシェ病患者は最も重度の経過を有するが、GBA1 における単一の軽度の変異を有する患者は、典型的にはより良性の経過を有する。変異保有者はまた、実行機能不全、精神病、及び PD 様運動障害を特徴とするレビー小体型認知症、ならびに特徴的な運動障害及び認知機能障害を有する多系統萎縮症を含む、他の PD 関連障害のリスクが高い。これらの障害の不可避な経過を変える療法は存在しない。

## 【0017】

G c a s e（例えば、GBA1 遺伝子の遺伝子産物）などの酵素の欠損だけでなく、リソソーム機能またはリソソームへの巨大分子の輸送に関与する多くの遺伝子における一般的な変異体（例えば、リソソーム膜タンパク質 1（LIMP）、SCARB2とも称され

る)は、PDリスク及び／またはゴーシェ病(例えば、2型ゴーシェ病または3型ゴーシェ病などの神経障害性ゴーシェ病)のリスクの増加と関連付けられている。本開示は、部分的に、中枢神経系(CNS)疾患、例えば、ゴーシェ病、PDなどに関連する、1つ以上の遺伝子、例えば、Gcase、GBA2、プロサポシン、プログラニュリン(PGRN)、LIMP2、GALC、CTSB、SMPD1、GCH1、RAB7、VPS35、IL-34、TREM2、TMEM106B、または前述(またはそれらの部分)のうちのいずれかの組み合わせをコードする発現構築物(例えば、ベクター)に基づく。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の遺伝子産物の組み合わせは、対象において発現されるとき、一緒に作用して(例えば、相乗的に)、CNS疾患の1つ以上の徴候及び症状を減少させる。

#### 【0018】

したがって、いくつかの態様において、本開示は、Gcase(例えば、GBA1遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された(例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された)Gcaseコード配列を含む。いくつかの実施形態において、Gcaseをコードする核酸配列は、配列番号14に記載(例えば、NCBI参照配列NP\_000148.2に記載)のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号15に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)、例えば、Gcaseタンパク質をコードする核酸配列に隣接するAAV ITRを含む。

#### 【0019】

いくつかの態様において、本開示は、プロサポシン(例えば、PSAP遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された(例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された)プロサポシンコード配列を含む。いくつかの実施形態において、プロサポシンをコードする核酸配列は、配列番号16に記載(例えば、NCBI参照配列NP\_002769.1に記載)のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号17に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)、例えば、プロサポシンタンパク質をコードする核酸配列に隣接するAAV ITRを含む。

#### 【0020】

いくつかの態様において、本開示は、LIMP2/SCARB2(例えば、SCARB2遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された(例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された)SCARB2コード配列を含む。いくつかの実施形態において、LIMP2/SCARB2をコードする核酸配列は、配列番号18に記載(例えば、NCBI参照配列NP\_005497.1に記載)のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号29に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)、例えば、SCARB2タンパク質をコードする核酸配列に隣接するAAV ITRを含む。

#### 【0021】

いくつかの態様において、本開示は、GBA2タンパク質(例えば、GBA2遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された(例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された)GBA2コード配列を含む。いくつかの実施形態において、GBA2をコードする核酸配列は、配列番号30に記載(例えば、NCBI参照配列NP\_065995.1に記載)のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。

いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 31 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、例えば、GBA2 タンパク質をコードする核酸配列に隣接する AAV ITR を含む。

#### 【0022】

いくつかの態様において、本開示は、GALC タンパク質 (例えば、GALC 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された) GALC コード配列を含む。いくつかの実施形態において、GALC をコードする核酸配列は、配列番号 33 に記載 (例えば、NCBI 参照配列 NP\_000144.2 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 34 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、例えば GALC タンパク質をコードする核酸配列に隣接する AAV ITR を含む。

#### 【0023】

いくつかの態様において、本開示は、CTSB タンパク質 (例えば、CTSB 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された) CTSB コード配列を含む。いくつかの実施形態において、CTSB をコードする核酸配列は、配列番号 35 に記載 (例えば、NCBI 参照配列 NP\_001899.1 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 36 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、例えば CTSB タンパク質をコードする核酸配列に隣接する AAV ITR を含む。

#### 【0024】

いくつかの態様において、本開示は、SMPD1 タンパク質 (例えば、SMPD1 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された) SMPD1 コード配列を含む。いくつかの実施形態において、SMPD1 をコードする核酸配列は、配列番号 37 に記載 (例えば、NCBI 参照配列 NP\_000534.3 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 38 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、例えば、SMPD1 タンパク質をコードする核酸配列に隣接する AAV ITR を含む。

#### 【0025】

いくつかの態様において、本開示は、GCH1 タンパク質 (例えば、GCH1 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された) GCH1 コード配列を含む。いくつかの実施形態において、GCH1 をコードする核酸配列は、配列番号 45 に記載 (例えば、NCBI 参照配列 NP\_000534.3 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 46 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、例えば、GCH1 タンパク質をコードする核酸配列に隣接する AAV ITR を含む。

#### 【0026】

いくつかの態様において、本開示は、RAB7L タンパク質 (例えば、RAB7L 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞

10

20

30

40

50

における発現のためにコドン最適化された) R A B 7 L コード配列を含む。いくつかの実施形態において、R A B 7 L をコードする核酸配列は、配列番号 47 に記載 (例えば、N C B I 参照配列 N P \_ 0 0 3 9 2 0 . 1 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 48 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (A A V) 逆位末端反復 (I T R)、例えば、R A B 7 L タンパク質をコードする核酸配列に隣接する A A V I T R を含む。

#### 【0027】

いくつかの態様において、本開示は、V P S 3 5 タンパク質 (例えば、V P S 3 5 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された) V P S 3 5 コード配列を含む。いくつかの実施形態において、V P S 3 5 をコードする核酸配列は、配列番号 49 に記載 (例えば、N C B I 参照配列 N P \_ 0 6 0 6 7 6 . 2 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 50 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (A A V) 逆位末端反復 (I T R)、例えば、V P S 3 5 タンパク質をコードする核酸配列に隣接する A A V I T R を含む。

#### 【0028】

いくつかの態様において、本開示は、I L - 3 4 タンパク質 (例えば、I L 3 4 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された) I L - 3 4 コード配列を含む。いくつかの実施形態において、I L - 3 4 をコードする核酸配列は、配列番号 55 に記載 (例えば、N C B I 参照配列 N P \_ 6 8 9 6 6 9 . 2 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 56 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (A A V) 逆位末端反復 (I T R)、例えば、I L - 3 4 タンパク質をコードする核酸配列に隣接する A A V I T R を含む。

#### 【0029】

いくつかの態様において、本開示は、T R E M 2 タンパク質 (例えば、T R E M 2 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された) T R E M 2 コード配列を含む。いくつかの実施形態において、T R E M 2 をコードする核酸配列は、配列番号 57 に記載 (例えば、N C B I 参照配列 N P \_ 0 6 1 8 3 8 . 1 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 58 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (A A V) 逆位末端反復 (I T R)、例えば、T R E M 2 タンパク質をコードする核酸配列に隣接する A A V I T R を含む。

#### 【0030】

いくつかの態様において、本開示は、T M E M 1 0 6 B タンパク質 (例えば、T M E M 1 0 6 B 遺伝子の遺伝子産物) をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された (例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された) T M E M 1 0 6 B コード配列を含む。いくつかの実施形態において、T M E M 1 0 6 B をコードする核酸配列は、配列番号 63 に記載 (例えば、N C B I 参照配列 N P \_ 0 6 0 8 4 4 . 2 に記載) のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 64 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス (A A V) 逆位末端反復 (I T R)、例えば、T M E M 1 0 6 B タンパク質をコード

10

20

30

40

50

する核酸配列に隣接する A A V I T R を含む。

【0031】

いくつかの態様において、本開示は、プログラニュリン（例えば、PGRN 遺伝子の遺伝子産物）をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞における発現のためにコドン最適化された）プロサボシンコード配列を含む。いくつかの実施形態において、プログラニュリン（PGRN）をコードする核酸配列は、配列番号 67 に記載（例えば、NCBI 参照配列 NP\_002078.1 に記載）のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 68 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復（ITR）、例えば、プロサボシンタンパク質をコードする核酸配列に隣接する A A V I T R を含む。

10

【0032】

いくつかの態様において、本開示は、第 1 の遺伝子産物及び第 2 の遺伝子産物をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供し、各遺伝子産物は、独立して、表 1 に記載の遺伝子産物またはその一部から選択される。

【0033】

いくつかの実施形態において、第 1 の遺伝子産物または第 2 の遺伝子産物は、Gcase タンパク質、またはその一部分である。いくつかの実施形態において、第 1 の遺伝子産物は、Gcase タンパク質であり、第 2 の遺伝子産物は、GBA2、プロサボシン、プログラニュリン、LIMP2、GALC、CTSB、SMPD1、GCH1、RAB7、VPS35、IL-34、TREM2、及び TMEM106B から選択される。

20

【0034】

いくつかの実施形態において、発現構築物は、（例えば、単独でまたは別の遺伝子産物に加えて）干渉核酸（例えば、shRNA、miRNA、dsRNA など）をコードする。いくつかの実施形態において、干渉核酸は、 $\alpha$ -シヌクレイン（ $\alpha$ -シヌクレイン）の発現を阻害する。いくつかの実施形態において、 $\alpha$ -シヌクレインを標的とする干渉核酸は、配列番号 20 ~ 25 のうちのいずれか 1 つに記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、 $\alpha$ -シヌクレインを標的とする干渉核酸は、配列番号 20 ~ 25 のうちのいずれか 1 つに記載の配列に結合する（例えば、ハイブリダイゼーションする）。

30

【0035】

いくつかの実施形態において、干渉核酸は、TMEM106B の発現を阻害する。いくつかの実施形態において、TMEM106B を標的とする干渉核酸は、配列番号 64 または 65 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、TMEM106B を標的とする干渉核酸は、配列番号 64 または 65 に記載の配列に結合する（例えば、ハイブリダイゼーションする）。

【0036】

いくつかの実施形態において、発現構築物は 1 つ以上のプロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、プロモーターは、ニフトリベータアクチン（CBA）プロモーター、CAG プロモーター、CD68 プロモーター、または JeT プロモーターである。いくつかの実施形態において、プロモーターは、RNA pol III プロモーター、または RNA pol IIII プロモーター（例えば、U6 など）である。

40

【0037】

いくつかの実施形態において、発現構築物は、内部リボソーム侵入部位（IRES）をさらに含む。いくつかの実施形態において、IRES は、第 1 の遺伝子産物及び第 2 の遺伝子産物の間に位置する。

【0038】

いくつかの実施形態において、発現構築物は、自己切断ペプチドコード配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、自己切断ペプチドは、T2A ペプチドである。

【0039】

50

いくつかの実施形態において、発現構築物は、2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)配列を含む。いくつかの実施形態において、ITR配列は、第1の遺伝子産物及び第2の遺伝子産物に隣接する(例えば、5'末端から3'末端までに以下のように配置される: ITR-第1遺伝子産物-第2遺伝子産物-ITR)。いくつかの実施形態において、単離核酸のITR配列のうちの1つは、機能的な末端解離部位(trs)を欠く。例えば、いくつかの実施形態において、ITRのうちの1つは、 $\Delta$ ITRである。

#### 【0040】

本開示は、いくつかの態様において、修飾「D」領域(例えば、野生型AAV2 ITRに対して修飾されたD配列、配列番号29)を有するITRを含むrAAVベクターに関する。いくつかの実施形態において、修飾D領域を有するITRは、rAAVベクターの5' ITRである。いくつかの実施形態において、修飾「D」領域は、例えば、配列番号26に記載の「S」配列を含む。いくつかの実施形態において、修飾「D」領域を有するITRは、rAAVベクターの3' ITRである。いくつかの実施形態において、修飾「D」領域は、「D」領域がITRの3'末端(例えば、ベクターの導入遺伝子挿入物に対してITRの外側または末端)に配置される3' ITRを含む。いくつかの実施形態において、修飾「D」領域は、配列番号26または27に記載の配列を含む。

10

#### 【0041】

いくつかの実施形態において、単離核酸(例えば、rAAVベクター)は、TRY領域を含む。いくつかの実施形態において、TRY領域は、配列番号28に記載の配列を含む。

20

#### 【0042】

いくつかの実施形態において、本開示による記載の単離核酸は、配列番号1~91のうちのいずれか1つに記載の配列を含むか、またはそれからなるか、またはそれを有するペプチドをコードする。

#### 【0043】

いくつかの態様において、本開示は、本開示による記載の単離核酸を含むベクターを提供する。いくつかの実施形態において、ベクターは、プラスミド、またはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは組換えAAV(rAAV)ベクターまたはバキュロウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、一本鎖(例えば、一本鎖DNA)である。

30

#### 【0044】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示による記載の単離核酸または本開示による記載のベクターを含む宿主細胞を提供する。

#### 【0045】

いくつかの実施形態において、本開示は、キャプシドタンパク質及び本開示による記載の単離核酸またはベクターを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を提供する。

#### 【0046】

いくつかの実施形態において、キャプシドタンパク質、例えば、AAV9キャプシドタンパク質またはAAVrh.10キャプシドタンパク質は、血液脳関門を通過することができる。いくつかの実施形態において、rAAVは、中枢神経系(CNS)の神経細胞及び非神経細胞を形質導入する。

40

#### 【0047】

いくつかの態様において、本開示は、中枢神経系(CNS)疾患を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、本開示による記載の組成物(例えば、単離核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、CNS疾患は、表12に記載の神経変性疾患などの神経変性疾患である。いくつかの実施形態において、CNS疾患は、表13に記載のシヌクレイン病などのシヌクレイン病である。いくつかの実施形態において、CNS疾患は、表14に記載のタウオパチーなどのタウオパチーである。いくつかの実施形態において、CNS疾患は、表15に記載のリソソーム蓄積症などのリソソーム蓄積症である。いく

50

つかの実施形態において、リソソーム蓄積症は、2型ゴーシェ病または3型ゴーシェ病などの神経障害性ゴーシェ病である。

【0048】

いくつかの実施形態において、本開示は、パーキンソン病を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、本開示による記載の組成物（例えば、単離核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物）を対象に投与することを含む。

【0049】

いくつかの実施形態において、本開示は、前頭側頭型認知症（FTD）、GRN変異を有するFTD、タウ変異を有するFTD、C9orf72変異を有するFTD、セロイドリポフスチン症、パーキンソン病、アルツハイマー病、大脳皮質基底核変性症、運動ニューロン病、またはゴーシェ病を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、対象に、プログラニユリン（PGRN）をコードするrAAVを投与することを含み、PGRNは、配列番号68の核酸配列によってコードされ、rAAVは、AAV9血清型を有するキャプシドタンパク質を含む。

【0050】

いくつかの実施形態において、本開示は、GRN変異を有する、FTDを有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、対象に、プログラニユリン（PGRN）をコードするrAAVを投与することを含み、PGRNは、配列番号68の核酸配列によってコードされ、rAAVは、AAV9血清型を有するキャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、rAAVは、約 $3.5 \times 10^{13}$ ベクターゲノム（vg）、約 $7.0 \times 10^{13}$ vg、または約 $1.4 \times 10^{14}$ vgの用量で対象に投与される。いくつかの実施形態において、rAAVは、大槽への注射を介して投与される。

【0051】

いくつかの実施形態において、組成物は、2つ以上の遺伝子産物（例えば、CNS疾患関連遺伝子産物）、例えば、本出願に記載の2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の遺伝子産物をコードする核酸（例えば、AAVキャプシドタンパク質によって封入される、rAAVゲノム）を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、2つ以上（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上）の異なる核酸（例えば、AAVキャプシドタンパク質によって別々に封入される2つ以上のrAAVゲノム）を含み、それぞれが1つ以上の異なる遺伝子産物をコードする。いくつかの実施形態において、2つ以上の異なる組成物が対象に投与され、それぞれの組成物は、異なる遺伝子産物をコードする1つ以上の核酸を含む。いくつかの実施形態において、異なる遺伝子産物が、同じプロモーター型（例えば、同じプロモーター）に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、異なる遺伝子産物が、異なるプロモーターに作動可能に連結されている。

【0052】

単離核酸及びベクター

単離核酸は、DNAまたはRNAであり得る。いくつかの態様において、本開示は、1つ以上のPD関連遺伝子、例えば、Gcase（例えば、GBA1遺伝子の遺伝子産物）またはその一部分をコードする発現構築物を含む単離核酸（例えば、rAAVベクター）を提供する。Gcaseは、ベーターグルコセレブロシダーゼまたはGBAとも称され、化学的グルコセレブロシド、糖脂質代謝における中間体のβ-グルコシド結合を切断するリソソームタンパク質を指す。ヒトにおいて、Gcaseは、1番染色体上に位置するGBA1遺伝子によってコードされる。いくつかの実施形態において、GBA1は、NCBI参照配列NP\_000148.2（配列番号14）によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号15に記載の配列などの、コドン最適化された（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化された）Gcaseコード配列を含む。

【0053】

いくつかの態様において、本開示は、プロサポシン（例えば、PSAP遺伝子の遺伝子

産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供する。プロサポシンは、スフィンゴ脂質活性化タンパク質(サポシン)A、B、C、及びDの前駆体糖タンパク質であり、短いオリゴ糖基を有するスフィンゴ糖脂質の異化を促進する。ヒトにおいて、PSAP遺伝子は、10番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、PSAPは、NCBI参照配列NP\_002769.1(例えば、配列番号16)によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号17に記載の配列などの、コドン最適化された(例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化された)プロサポシンをコードする配列を含む。

#### 【0054】

本開示の態様は、LIMP2/SCARB2(例えば、SCARB2遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。SCARB2は、細胞内のリソソーム及びエンドソーム輸送を調節する膜タンパク質を指す。ヒトにおいて、SCARB2遺伝子は、4番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、SCARB2遺伝子は、NCBI参照配列NP\_005497.1(配列番号18)によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号19に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたSCARB2コード配列を含む。

10

#### 【0055】

本開示の態様は、GBA2タンパク質(例えば、GBA2遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。GBA2タンパク質は、非リソソームグルコシルセラミダーゼを指す。ヒトにおいて、GBA2遺伝子は、9番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、GBA2遺伝子は、NCBI参照配列NP\_065995.1(配列番号30)によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号31に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたGBA2コード配列を含む。

20

#### 【0056】

本開示の態様は、GALCタンパク質(例えば、GALC遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。GALCタンパク質は、ガラクトシルセラミダーゼ(またはガラクトセレブロシダーゼ)を指し、ガラクトセレブロシド、ガラクトシルスフィンゴシン、ラクトシルセラミド、及びモノガラクトシルジグリセリドのガラクトースエステル結合を加水分解する酵素である。ヒトにおいて、GALC遺伝子は、14番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、GALC遺伝子は、NCBI参照配列NP\_000144.2(配列番号33)によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号34に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたGALCコード配列を含む。

30

#### 【0057】

本開示の態様は、CTSBタンパク質(例えば、CTSB遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。CTSBタンパク質は、細胞内タンパク質分解において重要な役割を果たすリソソームシステインプロテアーゼであるカテプシンBを指す。ヒトにおいて、CTSB遺伝子は、8番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、CTSB遺伝子は、NCBI参照配列NP\_001899.1(配列番号35)によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号36に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたCTSBコード配列を含む。

40

#### 【0058】

本開示の態様は、SMPD1タンパク質(例えば、SMPD1遺伝子の遺伝子産物)をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。SMPD1タンパク質は、スフィンゴ脂質代謝に関与する加水分解酵素であるスフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1を指す。ヒトにおいて、SMPD1遺伝子は、11番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、SMPD1遺伝子は、NCBI参照配列NP\_000534.3(配列番号3

50

7) によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号38に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたSMPD1コード配列を含む。

【0059】

本開示の態様は、GCH1タンパク質（例えば、GCH1遺伝子の遺伝子産物）をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。GCH1タンパク質は、葉酸及びビオプテリン生合成経路の一部である加水分解酵素であるGTPシクロヒドロラーゼIを指す。ヒトにおいて、GCH1遺伝子は、14番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、GCH1遺伝子は、NCBI参照配列NP\_000152.1（配列番号45）によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号46に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたGCH1コード配列を含む。

10

【0060】

本開示の態様は、RAB7Lタンパク質（例えば、RAB7L遺伝子の遺伝子産物）をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。RAB7Lタンパク質は、GTP結合タンパク質である、RAB7、メンバーRASがん遺伝子ファミリー様1を指す。ヒトにおいて、RAB7L遺伝子は、1番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、RAB7L遺伝子は、NCBI参照配列NP\_003920.1（配列番号47）によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号48に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたRAB7Lコード配列を含む。

20

【0061】

本開示の態様は、VPS35タンパク質（例えば、VPS35遺伝子の遺伝子産物）をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。VPS35タンパク質は、エンドソームからトランスゴルジネットワークへのタンパク質の逆行輸送に参与するタンパク質複合体の一部である、空胞タンパク質選別関連タンパク質35を指す。ヒトにおいて、VPS35遺伝子は、16番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、VPS35遺伝子は、NCBI参照配列NP\_060676.2（配列番号49）によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号50に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたVPS35コード配列を含む。

30

【0062】

本開示の態様は、IL-34タンパク質（例えば、IL34遺伝子の遺伝子産物）をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。IL-34タンパク質は、単球の増殖及び生存を増加させるサイトカインであるインターロイキン34を指す。ヒトにおいて、IL34遺伝子は、16番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、IL34遺伝子は、NCBI参照配列NP\_689669.2（配列番号55）によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号56に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたIL-34コード配列を含む。

40

【0063】

本開示の態様は、TREM2タンパク質（例えば、TREM2遺伝子の遺伝子産物）をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。TREM2タンパク質は、骨髄性細胞で見出される免疫グロブリンスーパーファミリー受容体である、骨髄性細胞発現トリガー受容体2を指す。ヒトにおいて、TREM2遺伝子は、6番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、TREM2遺伝子は、NCBI参照配列NP\_061838.1（配列番号57）によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号58に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化されたTREM2コード配列を含む。

【0064】

50

本開示の態様は、T M E M 1 0 6 B タンパク質（例えば、T M E M 1 0 6 B 遺伝子の遺伝子産物）をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。T M E M 1 0 6 B タンパク質は、樹状突起の形態形成及びリソソーム輸送の調節に関与するタンパク質である、膜貫通タンパク質 1 0 6 B を指す。ヒトにおいて、T M E M 1 0 6 B 遺伝子は、7 番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、T M E M 1 0 6 B 遺伝子は、N C B I 参照配列 N P \_ 0 6 0 8 4 4 . 2 （配列番号 6 2）によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 6 3 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された T M E M 1 0 6 B コード配列を含む。

【0065】

本開示の態様は、プログラニューリンタンパク質（例えば、P G R N 遺伝子の遺伝子産物）をコードする発現構築物を含む単離核酸に関する。P G R N タンパク質は、発生、炎症、細胞増殖及びタンパク質恒常性に関与するタンパク質であるプログラニューリンを指す。ヒトにおいて、P G R N 遺伝子は、17 番染色体上に位置する。いくつかの実施形態において、P G R N 遺伝子は、N C B I 参照配列 N P \_ 0 0 2 0 7 8 . 1 （配列番号 6 7）によって表されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、単離核酸は、配列番号 6 8 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態において、単離核酸は、コドン最適化された P G R N コード配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、ニワトリβアクチン（C B A）プロモーター及びサイトメガロウイルスエンハンサー（C M V e）をさらに含む。

【0066】

いくつかの態様において、本開示は、脳脊髄液（C S F）試料における P G R N タンパク質レベルを定量するための自動ウエスタンブロットイムノアッセイを提供する。いくつかの実施形態において、イムノアッセイは、キャピラリーベースの自動ウエスタンブロットイムノアッセイプラットフォームであり、タンパク質分離、免疫プロービング、洗浄、及び化学発光による検出などのすべてのステップがキャピラリーカートリッジにおいて行われる。いくつかの実施形態において、C S F 試料は、ヒトまたは非ヒト霊長類由来である。いくつかの態様において、イムノアッセイは、循環抗体の存在下での P G R N タンパク質レベルの差の検出を可能にする。いくつかの態様において、本開示は、C S F 試料におけるプログラニューリンタンパク質レベルを定量する方法を提供し、方法は、以下を含む。

（1）C S F 試料を希釈すること（例えば、4 倍希釈）、（2）C S F 試料、抗プログラニューリン抗体、抗プログラニューリン抗体を検出する二次抗体、ルミノール及び過酸化物を、キャピラリーカートリッジのウェルに充填すること、（3）キャピラリーカートリッジを自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器に装填すること、（4）自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器を使用して、シグナル強度、ピーク面積、シグナル対ノイズ比及び総タンパク質正規化パラメータのうちの1つ以上を計算すること、ならびに（5）C S F 試料におけるプログラニューリンタンパク質レベルを、抗プログラニューリン抗体に対する免疫反応性のピーク面積として定量すること。いくつかの実施形態において、C S F 試料は、ジチオスレイトール（D T T）及び試料緩衝液を含むマスター混合物において希釈される。マスター混合物は、他の独自の構成要素をさらに含み得る。いくつかの態様において、抗プログラニューリン抗体は、ヒトプログラニューリンを検出する。いくつかの実施形態において、プログラニューリンタンパク質レベルは、自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器を制御するソフトウェアを使用して、計算されたパラメータから定量化される。いくつかの実施形態において、このソフトウェアは、Simple Western（商標）（Protein Simple, San Jose, CA）のためのCompasソフトウェアである。

【0067】

いくつかの実施形態において、本開示は、脳脊髄液（C S F）試料におけるプログラニューリンタンパク質レベルを定量する方法を提供し、方法は、以下を含む。（1）ジチオスレイトール（D T T）及び試料緩衝液を含むマスター混合物において C S F 試料を希釈すること（例えば、4 倍希釈）、（2）希釈 C S F 試料、抗プログラニューリン抗体、抗プロ

グラニューリン抗体を検出する二次抗体、ルミノール及び過酸化物を、キャピラリーカートリッジのウェルに充填すること、(3) キャピラリーカートリッジを自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器に装填すること、(4) 自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器を使用して、シグナル強度、ピーク面積、及びシグナル対ノイズ比を計算すること、ならびに(5) C S F 試料におけるプログラニューリンタンパク質レベルを、抗プログラニューリン抗体に対する免疫反応性のピーク面積として定量すること。

【0068】

いくつかの態様において、本開示は、第1の遺伝子産物及び第2の遺伝子産物をコードする発現構築物を含む単離核酸を提供し、各遺伝子産物は、独立して、表1に記載の遺伝子産物またはその一部から選択される。

【0069】

いくつかの実施形態において、本開示による記載の単離核酸またはベクター（例えば、r A A Vベクター）は、配列番号1～91のうちのいずれか1つに記載の配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、本開示による記載の単離核酸またはベクター（例えば、r A A Vベクター）は、配列番号1～91のうちのいずれか1つに記載の配列と相補的である（例えば、その相補鎖である）配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、本開示による記載の単離核酸またはベクター（例えば、r A A Vベクター）は、配列番号1～91のうちのいずれか1つに記載の配列の逆相補鎖である配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、本開示による記載の単離核酸またはベクター（例えば、r A A Vベクター）は、配列番号1～91のうちのいずれか1つに記載の配列の一部分を含むか、またはそれからなる。一部分は、配列番号1～91のうちのいずれか1つに記載の配列の少なくとも25%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%を含み得る。いくつかの実施形態において、本開示による記載の核酸配列は、核酸センス鎖（例えば、5'から3'鎖）であるか、またはウイルス配列の文脈において、プラス(+)鎖である。いくつかの実施形態において、本開示による記載の核酸配列は、核酸アンチセンス鎖（例えば、3'から5'鎖）であるか、またはウイルス配列の文脈において、マイナス(-)鎖である。

【0070】

いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、天然に存在する遺伝子のコード部分（例えば、c D N A）によってコードされる。いくつかの実施形態において、第1の遺伝子産物は、G B A 1遺伝子によってコードされるタンパク質（またはその断片）である。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、表1に記載の別の遺伝子、例えば、S C A R B 2 / L I M P 2遺伝子またはP S A P遺伝子によってコードされるタンパク質（またはその断片）である。しかしながら、当業者は、第1の遺伝子産物（例えば、G c a s e）及び第2の遺伝子産物（例えば、L I M P 2など）の発現順序が概して逆転し得ること（例えば、L I M P 2は第1の遺伝子産物であり、G c a s eは第2の遺伝子産物である）を認識する。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、表1に記載の遺伝子の断片（例えば、部分）である。タンパク質断片は、表1に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%または約99%を含み得る。いくつかの実施形態において、タンパク質断片は、表1に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質の50%～99.9%（例えば、50%～99.9%の任意の値）を含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、発現構築物は、モノシストロン性である（例えば、発現構築物は、第1の遺伝子産物及び第2の遺伝子産物を含む単一の融合タンパク質をコードする）。いくつかの実施形態において、発現構築物は、ポリシストロン性である（例えば、発現構築物は、2つの異なる遺伝子産物、例えば、2つの異なるタンパク質またはタンパク質断片をコードする）。

【0072】

ポリシストロン発現ベクターは、1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、

10

20

30

40

50

またはそれ以上)のプロモーターを含み得る。任意の好適なプロモーター、例えば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、内因性プロモーター、組織特異的プロモーター（例えば、CNS特異的プロモーター）などを使用し得る。いくつかの実施形態において、プロモーターは、ニワトリベータアクチンプロモーター（CBAプロモーター）、CAGプロモーター（例えば、Alexopoulos et al. (2008) BMC Cell Biol. 9:2; doi:10.1186/1471-2121-9-2によって記載される）、CD68プロモーター、またはJeTプロモーター（例えば、Tornoe et al. (2002) Gene 297(1-2):21-32によって記載される）である。いくつかの実施形態において、プロモーターは、第1の遺伝子産物、第2の遺伝子産物、または第1の遺伝子産物及び第2の遺伝子産物をコードする核酸配列に作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、発現カセットは、転写因子結合配列、イントロンスプライス部位、ポリ(A)付加部位、エンハンサー配列、リプレッサー結合部位、または前述の任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない1つ以上の追加の調節配列を含む。

#### 【0073】

いくつかの実施形態において、第1の遺伝子産物をコードする核酸配列及び第2の遺伝子産物をコードする核酸配列は、内部リボソーム侵入部位(IRES)をコードする核酸配列によって分離される。IRES部位の例は、例えば、Mokrejs et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34(Database issue):D125-30によって記載されている。いくつかの実施形態において、第1の遺伝子産物をコードする核酸配列及び第2の遺伝子産物をコードする核酸配列は、自己切断ペプチドをコードする核酸配列によって分離される。自己切断ペプチドの例として、限定されないが、T2A、P2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、及びBmIFV 2Aが挙げられ、それらはLiu et al. (2017) Sci Rep. 7:2193に記載される。いくつかの実施形態において、自己切断ペプチドは、T2Aペプチドである。

#### 【0074】

病理学的には、PD及びゴーシェ病などの障害は、 $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -Syn)タンパク質を主に含むタンパク質凝集体の蓄積と関連している。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書に記載の単離核酸は、 $\alpha$ -Synタンパク質の発現を減少または防止する阻害性核酸を含む。阻害性核酸をコードする配列は、発現ベクターの非翻訳領域（例えば、イントロン、5'UTR、3'UTRなど）に配置され得る。

#### 【0075】

いくつかの実施形態において、阻害性核酸は、発現構築物のイントロンにおいて、例えば、第1の遺伝子産物をコードする配列の上流のイントロンにおいて配置される。阻害性核酸は、二本鎖RNA(dsRNA)、siRNA、shRNA、マイクロRNA(miRNA)、人工miRNA(amiRNA)、またはRNAアプタマーであり得る。一般に、阻害性核酸は、標的RNA（例えば、mRNA）の約6個〜約30個（例えば、6個及び30個を含めたその間の任意の整数）の連続したヌクレオチドに結合する（例えば、ハイブリダイゼーションする）。いくつかの実施形態において、阻害性核酸分子は、miRNAまたはamiRNA、例えば、SNCA( $\alpha$ -Synタンパク質をコードする遺伝子)またはTMEM106B（例えば、TMEM106Bタンパク質をコードする遺伝子）を標的とするmiRNAである。いくつかの実施形態において、miRNAは、それがハイブリダイゼーションするSNCA mRNAの領域とのミスマッチを一切含まない（例えば、miRNAは「完全」である）。いくつかの実施形態において、阻害性核酸は、shRNA（例えば、SNCAまたはTMEM106Bを標的とするshRNA）である。いくつかの実施形態において、阻害性核酸は、miR-155足場及びSNCAまたはTMEM106B標的配列を含む人工miRNA(amiRNA)である。

#### 【0076】

当業者は、阻害性核酸（例えば、dsRNA、siRNA、miRNA、amiRNAなど）を含むかまたはコードする核酸配列に言及する場合、本明細書で提供される配列に

10

20

30

40

50

において任意の1つ以上のチミジン（T）ヌクレオチドまたはウリジン（U）ヌクレオチドを、アデノシンヌクレオチドとの塩基対形成（例えば、ワトソン－クリック塩基対を介して）に適切な任意の他のヌクレオチドと置き換えてもよいことを認識する。例えば、TをUに置き換え得、UをTに置き換え得る。

#### 【0077】

本明細書に記載の単離核酸は、それ自体として、またはベクターの一部として存在し得る。一般に、ベクターは、プラスミド、コスミド、ファージミド、細菌人工染色体（BAC）、またはウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、バキュロウイルスベクターなど）であり得る。いくつかの実施形態において、ベクターは、プラスミド（例えば、本明細書に記載の単離核酸を含むプラスミド）である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、一本鎖（例えば、一本鎖DNA）である。いくつかの実施形態において、ベクターは組換えAAV（rAAV）ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、バキュロウイルスベクター（例えば、Autographa californica核多角体病（AcNPV）ベクター）である。

#### 【0078】

典型的には、rAAVベクター（例えば、rAAVゲノム）は、2つのAAV逆位末端反復（ITR）配列に隣接する導入遺伝子（例えば、以下のプロモーター、イントロン、エンハンサー配列、タンパク質コード配列、阻害性RNAコード配列、ポリA尾部配列などの各々のうちの1つ以上を含む発現構築物）を含む。いくつかの実施形態において、rAAVベクターの導入遺伝子は、本開示による記載の単離核酸を含む。いくつかの実施形態において、rAAVベクターの2つのITR配列の各々は、全長ITR（例えば、長さが約145bpであり、機能的なRep結合部位（RBS）及び末端解離部位（trs）を含む）である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターのITRのうちの1つは、切断されている（例えば、短縮されるか、または完全長ではない）。いくつかの実施形態において、切断されたITRは、機能的な末端解離部位（trs）を欠き、自己相補的AAVベクター（scAAVベクター）の産生のために使用される。いくつかの実施形態において、切断されたITRは、例えば、McCarty et al. (2003) Gene Ther. 10 (26) : 2112-8によって記載されるΔITRである。

#### 【0079】

本開示の態様は、野生型AAV ITRに対して、例えば野生型AAV2 ITR（例えば、配列番号29）に対して、1つ以上の修飾（例えば、核酸付加、欠失、置換など）を有するITRを含む単離核酸（例えば、rAAVベクター）に関する。野生型AAV2 ITRの構造を図20に示す。概して、野生型ITRは、自己アニールして、2つのクロスアーム（それぞれB/B'及びC/C'と称される配列によって形成される）、より長いステム領域（配列A/A'と称される配列によって形成される）、及び「D」領域と称される一本鎖末端領域からなる回文二本鎖T字形ヘアピン構造を形成する125ヌクレオチド領域を含む（図20）。概して、ITRの「D」領域は、A/A'配列によって形成されるステム領域と、rAAVベクターの導入遺伝子を含む挿入物との間に配置される（例えば、ITRの末端に対してITRの「内側」に配置されるか、またはrAAVベクターの導入遺伝子挿入物もしくは発現構築物の近位に配置される）。いくつかの実施形態において、「D」領域は、配列番号27に記載の配列を含む。「D」領域は、例えば、Ling et al. (2015) J Mol Genet Med 9 (3) によって開示されるように、キャプシドタンパク質によるrAAVベクターのキャプシド化において重要な役割を果たすことが観察されている。

#### 【0080】

本開示は、部分的に、ITRの「外側」（例えば、導入遺伝子挿入物または発現構築物に対してITRの末端に近位）に位置する「D」領域を含むrAAVベクターが、未修飾（例えば、野生型）ITRを有するITRを有するrAAVベクターよりもAAVキャプシドタンパク質によって効率的にキャプシド化されるという驚くべき発見に基づいている

。いくつかの実施形態において、修飾「D」配列（例えば、「外側」位置における「D」配列）を有するrAAVベクターは、野生型ITR配列を有するrAAVベクターに対して毒性が低下している。

#### 【0081】

いくつかの実施形態において、修飾「D」配列は、野生型「D」配列（例えば、配列番号27）に対して少なくとも1つのヌクレオチド置換を含む。修飾「D」配列は、野生型「D」配列（例えば、配列番号27）に対して、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、または10個超のヌクレオチド置換を有し得る。いくつかの実施形態において、修飾「D」配列は、野生型「D」配列（例えば、配列番号27）に対して、少なくとも10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、または19個の核酸置換を含む。いくつかの実施形態において、修飾「D」配列は、野生型「D」配列（例えば、配列番号27）と、約10%～約99%（例えば、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%）同一である。いくつかの実施形態において、修飾「D」配列は、Wang et al. (1995) J Mol Biol 250 (5) : 573-80に記載の「S」配列とも称される、配列番号26に記載の配列を含む。

#### 【0082】

本開示による記載の単離核酸またはrAAVベクターは、例えば、配列番号28に記載の、またはFrancois et al., (2005) J. Virol. 79 (17) : 11082-11094によって記載される「TRY」配列をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、TRY配列は、単離核酸またはrAAVベクターのITR（例えば5' ITR）と発現構築物（例えば導入遺伝子コード挿入物）との間に位置付けられる。

#### 【0083】

いくつかの態様において、本開示は、本開示による記載の単離核酸またはrAAVベクターを含むバキュロウイルスベクターに関する。いくつかの実施形態において、バキュロウイルスベクターは、例えば、Urabe et al. (2002) Hum Gene Ther 13 (16) : 1935-43及びSmith et al. (2009) Mol Ther 17 (11) : 1888-1896によって記載される、Autographa californica核多角体病 (AcNPV) ベクターである。

#### 【0084】

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載の単離核酸またはベクターを含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、宿主細胞は哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞などであり得る。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えば、HEK293T細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、細菌細胞、例えば、E. coli細胞である。

#### 【0085】

##### rAAV

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載の核酸（例えば、本明細書に記載のrAAVベクター）をコードする導入遺伝子を含む組換えAAV (rAAV) に関する。「rAAV」という用語は、概して、1つ以上のAAVキャプシドタンパク質によって封入されたrAAVベクターを含むウイルス粒子を指す。本開示による記載のrAAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、及びAAV10から選択される血清型を有するキャプシドタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、rAAVは、非ヒト宿主由来のキャプシドタンパク質、例えば、AAVrh.10、AAVrh.39などのアカゲザルAAVキャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本開示による記載のrAAVは、それが由来する野生型AAVキャプシドタンパク質に対して、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、または10個超（例えば、15個、20個、25個、50個、100個など）のアミノ酸置換（例えば、変異）を含むキャプシドタ

ンパク質変異体などの野生型キャプシドタンパク質の変異体であるキャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、AAVキャプシドタンパク質変異体は、例えば、Albright et al. Mol Ther. 2018 Feb 7; 26(2): 510-523によって記載される、AAV1RXキャプシドタンパク質である。いくつかの実施形態において、キャプシドタンパク質変異体は、例えば、Rosario et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2016; 3: 16026によって記載される、AAV TM6キャプシドタンパク質である。

【0086】

いくつかの実施形態において、本開示による記載のrAAVは、特にCSF空間に、または脳実質に直接導入されるときに、CNSを通して容易に拡散する。したがって、いくつかの実施形態において、本開示による記載のrAAVは、血液脳関門(BBB)を通過することができるキャプシドタンパク質を含む。例えば、いくつかの実施形態において、rAAVは、AAV9またはAAVrh.10血清型を有するキャプシドタンパク質を含む。rAAVの産生は、例えば、Samulski et al. (1989) J Virol. 63(9): 3822-8及びWright (2009) Hum Gene Ther. 20(7): 698-706によって記載される。いくつかの実施形態において、rAAVは、骨髄性細胞、例えば、小膠細胞を特異的または優先的に標的とするキャプシドタンパク質を含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、本開示は、「P006A」と称されるrAAVを提供する。P006Aは、機能的なヒトGRN遺伝子を送達し、機能的なヒトPGRNの発現の増加をもたらすrAAVである。P006Aベクター挿入物は、ヒトGRNのコードン最適化コード配列(配列番号68)を構成的に発現するために、4つの部分、サイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー、CBAプロモーター、エクソン1、及びイントロン(イントロン)を含む、ニワトリβアクチン(CBA)プロモーター要素を含む。3'領域はまた、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素(WPRE)、それに続くウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル尾部を含む。よく説明された3つの転写制御活性化部位が、プロモーター領域の5'末端に含まれる:TATA、RBS、及びYY1(例えば、Francois et al., (2005) J. Virol. 79(17): 11082-11094を参照)。隣接する逆位末端反復(ITR)は、介在配列の正しいパッケージングを可能にする。骨格は、カナマイシンに対する耐性を付与する遺伝子、及び逆パッケージングを防止するためのスタッファー配列を含む。RAAVベクターを示す概略図を図64に示す。配列番号90は、図64に示されるP006Aベクターの第1の鎖のヌクレオチド配列(5'から3'の順に)を提供する。配列番号91は、図64に示されるP006Aベクターの第2の鎖のヌクレオチド配列(5'から3'の順に)を提供する。P006Aは、AAV9キャプシドタンパク質を含む。

【0088】

いくつかの実施形態において、本開示による記載のrAAV(例えば、rAAVキャプシド粒子を形成するようにAAVキャプシドタンパク質によってキャプシド化された組換えrAAVゲノムを含む)は、バキュロウイルスベクター発現系(BEVS)において産生される。BEVSを使用したrAAVの産生は、例えば、Urabe et al. (2002) Hum Gene Ther 13(16): 1935-43、Smith et al. (2009) Mol Ther 17(11): 1888-1896、米国特許第8,945,918号、米国特許第9,879,282号、及び国際PCT公開第WO2017/184879号によって記載される。しかしながら、rAAVは、任意の適切な方法を用いて(例えば、組換えrep及びcap遺伝子を用いて)産生され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示のrAAVは、HEK293(ヒト胚性腎臓)細胞において産生される。

【0089】

医薬組成物

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載の単離核酸または rAAV 及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される」という用語は、化合物の生物学的活性または特性を無効にせず、比較的無毒である担体または希釈剤などの材料を指し、例えば、材料は、望ましくない生物学的作用を引き起こすことなく、またはそれが含まれている組成物の構成要素のうちのいずれかと有害な様式で相互作用することなく、個体に投与され得る。

#### 【0090】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、本発明内で有用な化合物をその意図された機能を実行し得るように患者内で、または患者に運搬または輸送することに関与する、液体もしくは固体充填剤、安定剤、分散剤、懸濁剤、希釈剤、賦形剤、増粘剤、溶媒、または封入材料などの薬学的に許容される材料、組成物、または担体を意味する。本発明の実施において使用される医薬組成物に含まれ得る追加の成分は、当該技術分野で既知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA) に記載され、それは参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0091】

本明細書で提供される組成物（例えば、医薬組成物）は、経腸（例えば、経口）、非経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、くも膜下腔内、皮下、脳室内、経皮、皮膚間、直腸、膣内、腹腔内、局所（粉末、軟膏、クリーム、及び／または液滴による）、粘膜、鼻腔、口腔、舌下を含む任意の経路によって；気管内注入、気管支注入、及び／または吸入によって；及び／または経口スプレー、鼻腔スプレー、及び／またはエアロゾルとして投与され得る。具体的に企図される経路は、経口投与、静脈内投与（例えば、全身静脈内注射）、血液及び／またはリンパ供給を介した局所投与、及び／または患部への直接投与である。概して、最も適切な投与経路は、薬剤の性質（例えば、胃腸管の環境におけるその安定性）、及び／または対象の状態（例えば、対象が経口投与に耐えることができるかどうか）を含む様々な因子に依存する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の化合物または医薬組成物は、対象の眼への局所投与に適切である。

#### 【0092】

いくつかの実施形態において、本開示は、水溶液中に存在する上述の P006A rAAV を含む P006A 完成薬品を提供する。いくつかの実施形態において、最終製剤緩衝液は、約 20 mM の Tris [pH 8.0]、約 1 mM の MgCl<sub>2</sub>、約 200 mM の NaCl、及び約 0.001% [w/v] のポロキサマー 188 を含む。いくつかの実施形態において、完成した薬剤製品及び最終製剤緩衝液は、大槽内 (ICM) 注射に適切である。

#### 【0093】

##### 方法

本開示の態様は、CNS 関連疾患を治療するための対象における 1 つ以上の CNS 疾患関連遺伝子産物の発現のための組成物に関する。1 つ以上の CNS 疾患関連遺伝子産物は、1 つ以上の単離核酸または rAAV ベクターによってコードされ得る。いくつかの実施形態において、対象は、1 つ以上（1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、またはそれ以上）の遺伝子産物をコードする単一のベクター（例えば、単離核酸、rAAV など）を投与される。いくつかの実施形態において、対象は、複数の（例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたはそれ以上の）ベクター（例えば、単離核酸、rAAV など）を投与され、各ベクターは、異なる CNS 疾患関連遺伝子産物をコードする。

#### 【0094】

CNS 関連疾患は、神経変性疾患、シヌクレイン病、タウオパチー、またはリソソーム蓄積症であり得る。神経変性疾患及びその関連遺伝子の例を表 12 に記載する。

#### 【0095】

「シヌクレイン病」は、（例えば、健康な対象、例えば、シヌクレイン病を有しない対

10

20

30

40

50

象に対して) 対象におけるアルファシヌクレイン (S N C A の遺伝子産物) の蓄積によって特徴付けられる疾患または障害を指す。シヌクレイン病及びその関連遺伝子の例を表 1 3 に記載する。

【0 0 9 6】

「タウオパチー」は、(例えば、タウオパチーを有しない健康な対象に対して) 対象における異常な T a u タンパク質の蓄積によって特徴付けられる疾患または障害を指す。タウオパチー及びその関連遺伝子の例を表 1 4 に記載する。

【0 0 9 7】

「リソソーム蓄積症」は、対象のリソソームにおける有毒な細胞産物の異常な蓄積によって特徴付けられる疾患を指す。リソソーム蓄積症及びそれらに関連する遺伝子の例を表 1 5 に記載する。

【0 0 9 8】

本明細書で使用される場合、「治療する」または「治療すること」は、(a) C N S 疾患の発症の予防または遅延、(b) C N S 疾患の重症度の減少、(c) C N S 疾患の特徴的な症状の発症の減少または予防、(d) 及び／または C N S 疾患の特徴的な症状の悪化の予防を指す。C N S 疾患の症状は、例えば、運動機能障害 (例えば、震え、硬直、動きの遅さ、歩行困難、麻痺)、認知機能障害 (例えば、認知症、うつ病、不安、精神病)、記憶の障害、感情及び行動機能障害を含み得る。

【0 0 9 9】

本開示は、部分的に、パーキンソン病を治療するために一緒に (例えば、相乗的に) 作用する対象における P D 関連遺伝子産物の組み合わせの発現のための組成物に基づく。

【0 1 0 0】

したがって、いくつかの態様において、本開示は、パーキンソン病を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、本開示による記載の組成物 (例えば、単離核酸またはベクターまたは r A A V を含む組成物) を対象に投与することを含む。

【0 1 0 1】

本開示は、部分的に、ゴーシェ病を治療するための対象における 1 つ以上の C N S 疾患関連遺伝子産物の発現のための組成物に基づく。いくつかの実施形態において、ゴーシェ病は、神経障害性ゴーシェ病、例えば、2 型ゴーシェ病または 3 型ゴーシェ病である。いくつかの実施形態において、ゴーシェ病を有する対象は、P D または P D 症状を有しない。

【0 1 0 2】

したがって、いくつかの態様において、本開示は、神経障害性ゴーシェ病を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、本開示による記載の組成物 (例えば、単離核酸またはベクターまたは r A A V を含む組成物) を対象に投与することを含む。

【0 1 0 3】

本開示は、部分的に、アルツハイマー病または前頭側頭型認知症 (F T D) を治療するための対象における 1 つ以上の C N S 疾患関連遺伝子産物の発現のための組成物に基づく。いくつかの実施形態において、対象は、アルツハイマー病を有さない。いくつかの実施形態において、対象は、F T D を有し、アルツハイマー病を有さない。いくつかの実施形態において、対象は、G R N (プログラニュリン) 変異を有して、F T D を有する。いくつかの実施形態において、対象は、G R N 変異を有して、F T D を有し、対象は、G R N 変異についてヘテロ接合性である (例えば、病原性 G R N 変異)。いくつかの実施形態において、G R N 変異は、ヌル (n u l l) 変異 (例えば、ナンセンス、フレームシフト、またはスプライス部位変異、または完全または部分的 (エクソンの) 遺伝子欠失) である。いくつかの実施形態において、G R N 変異は、実証された機能的に有害な効果を有する病原性変異である。いくつかの実施形態において、G R N 変異は、ミスセンス病原性変異である。いくつかの実施形態において、G R N 変異は、M o l g e n F T D データベース (m o l g e n . u a . a c . b e) に記載される。いくつかの実施形態において、G

10

20

30

40

50

R N変異は、対象において低い血漿P G R Nレベル（70 ng/mL未満）を産生する。

【0104】

いくつかの実施形態において、対象は、F T D、G R N変異を伴うF T D、タウ変異を伴うF T D、C9O r f 72変異を伴うF T D、神経セロイドリポフスチン症、パーキンソン病、アルツハイマー病、大脳皮質基底核変性症、運動ニューロン病、またはゴーシェ病を有する。

【0105】

いくつかの実施形態において、対象は、症候性F T D（例えば、行動変異型F T D（b v F T D）、原発性進行性失語症（P P A）－F T D、皮質基底核症候群を伴うF T D、または症候群の組み合わせ）を有する。

【0106】

したがって、いくつかの態様において、本開示は、G R N変異を有するF T Dを有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、本開示による記載の組成物（例えば、単離核酸またはベクターまたはr A A Vを含む組成物）を対象に投与することを含む。

【0107】

いくつかの実施形態において、アルツハイマー病またはF T D（例えば、G R N変異を伴うF T D）を有する対象は、プログラニュリン（P G R N）またはその一部分をコードするr A A Vを投与される。いくつかの実施形態において、アルツハイマー病またはF T D（例えば、G R N変異を伴うF T D）を有する対象は、P G R Nまたはその一部分をコードするr A A Vを投与され、P G R Nタンパク質は、コドン最適化核酸配列または配列番号68の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、P G R Nタンパク質は、配列番号67のアミノ酸配列またはその一部分を含む。いくつかの実施形態において、P G R Nをコードするr A A Vは、A A V 9血清型を有するキャプシドタンパク質を含む。

【0108】

いくつかの実施形態において、F T D（例えば、G R N変異を伴うF T D）を治療するためのP G R Nをコードするr A A Vを含む組成物は、対象に、約 $1 \times 10^{12}$ ベクターゲノム（v g）～約 $1 \times 10^{15}$  v g、または約 $1 \times 10^{13}$  v g～約 $7 \times 10^{14}$  v g、または約 $1 \times 10^{13}$  v g～約 $5 \times 10^{14}$  v g、または約 $2 \times 10^{13}$  v g～約 $2 \times 10^{14}$  v g、または約 $3 \times 10^{13}$  v g～約 $2 \times 10^{14}$  v g、または約 $3.5 \times 10^{13}$  v g～約 $1.4 \times 10^{14}$  v gの範囲の用量で投与される。いくつかの実施形態において、F T D（例えば、G R N変異を伴うF T D）を治療するためのP G R Nをコードするr A A Vを含む組成物は、対象に、約 $2 \times 10^{13}$  v g、約 $3 \times 10^{13}$  v g、約 $4 \times 10^{13}$  v g、約 $5 \times 10^{13}$  v g、約 $6 \times 10^{13}$  v g、約 $7 \times 10^{13}$  v g、約 $8 \times 10^{13}$  v g、約 $9 \times 10^{13}$  v g、約 $1 \times 10^{14}$  v g、または約 $2 \times 10^{14}$  v gの用量で投与される。

【0109】

いくつかの態様において、本開示は、F T D（例えば、G R N変異を伴うF T D）を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、対象に、P G R Nをコードするr A A Vを含む組成物を投与することを含み、組成物は、約 $3.5 \times 10^{13}$ ベクターゲノム（v g）、約 $7.0 \times 10^{13}$  v g、または約 $1.4 \times 10^{14}$  v gの用量で投与される。

【0110】

いくつかの態様において、本開示は、F T D（例えば、G R N変異を伴うF T D）を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法を提供し、方法は、対象に、P G R Nをコードするr A A Vを含む組成物を投与することを含み、組成物は、約 $1 \times 10^{14}$ ベクターゲノム（v g）、約 $2.0 \times 10^{14}$  v g、または約 $4.0 \times 10^{14}$  v gの用量で投与される。

【0111】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、単回用量として対象にFTD（例えば、GRN変異を伴うFTD）を治療するためのPGRNをコードするrAAVを含む組成物であって、組成物は、その後対象に投与されない。

【0112】

いくつかの実施形態において、rAAVを含む組成物は、大槽への単一の後頭下注射を介して送達される。いくつかの実施形態において、大槽への注射は、放射線誘導下で行われる。

【0113】

いくつかの実施形態において、本開示は、GRN変異を有して、FTDを有するか、または有する疑いのある対象の症状を治療するための方法を提供し、方法は、機能的なプログラニューリン（PGRN）タンパク質についての配列をコードするrAAVを含む組成物を対象に投与することを含み、PGRNタンパク質は、コドン最適化核酸配列または配列番号68の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、GRN変異を伴うFTDの症状は、人格変化、実行機能の障害、脱抑制、無気力、発話の遅さ、文法の誤用、多様な失認、語義失語、または単語理解の障害であり得る。いくつかの実施形態において、PGRNをコードするrAAVは、AAV9血清型を有するキャプシドタンパク質を含む。

【0114】

いくつかの実施形態において、本開示は、GRN変異を有して、FTDを有するか、または有する疑いのある対象の脳におけるリポフスチンの蓄積を減少させるための方法を提供し、方法は、対象に、プログラニューリン（PGRN）をコードするrAAVを含む組成物を投与することを含み、PGRNタンパク質は、コドン最適化核酸配列または配列番号68の核酸配列によってコードされる。いくつかの態様において、本開示は、GRN変異を有して、FTDを有するか、または有する疑いのある対象の脳におけるユビキチンの蓄積を減少させるための方法を提供し、方法は、対象に、プログラニューリン（PGRN）をコードするrAAVを含む組成物を投与することを含み、PGRNタンパク質は、コドン最適化核酸配列または配列番号68の核酸配列によってコードされる。いくつかの態様において、本開示は、GRN変異を有して、FTDを有するか、または有する疑いのある対象の脳におけるTNF $\alpha$ 及び／またはCD68の遺伝子発現及び／またはタンパク質発現を減少させるための方法を提供し、方法は、対象に、プログラニューリン（PGRN）をコードするrAAVを含む組成物を投与することを含み、PGRNタンパク質は、コドン最適化核酸配列または配列番号68の核酸配列によってコードされる。いくつかの態様において、本開示は、GRN変異を有して、FTDを有するか、または有する疑いのある対象の脳におけるカテプシンDの成熟を増加させるための方法を提供し、方法は、対象に、プログラニューリン（PGRN）をコードするrAAVを含む組成物を投与することを含み、PGRNタンパク質は、コドン最適化核酸配列または配列番号68の核酸配列によってコードされる。いくつかの態様において、本開示は、GRN変異を有して、FTDを有するか、または有する疑いのある対象の脳における核TDP-43（トランス活性応答DNA結合タンパク質43kDa）タンパク質のレベルを増加させるための方法を提供し、方法は、対象に、プログラニューリン（PGRN）をコードするrAAVを含む組成物を投与することを含み、PGRNタンパク質は、コドン最適化核酸配列または配列番号68の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、本開示は、GRN変異を有して、FTDを有するか、または有する疑いのある対象の血液またはCSFにおける神経フィラメント軽鎖（NFL）のレベルを減少させるための方法を提供し、方法は、対象に、プログラニューリン（PGRN）をコードするrAAVを含む組成物を投与することを含み、PGRNタンパク質は、コドン最適化核酸配列または配列番号68の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、PGRNをコードするrAAVは、AAV9血清型を有するキャプシドタンパク質を含む。

【0115】

対象は、典型的には、哺乳動物、好ましくはヒトである。いくつかの実施形態において

10

20

30

40

50

、対象は、1 か月齢～10 歳齢（例えば、1 か月、2 か月、3 か月、4 か月、5 か月、6 か月、7 か月、8 か月、9 か月、10 か月、11 か月、12 か月、13 か月、14 か月、15 か月、16 か月、17 か月、18 か月、19 か月、20 か月、21 か月、22 か月、23 か月、24 か月、3 年、4 年、5 年、6 年、7 年、8 年、9 年、10 年、またはこれらの間の任意の齢）である。いくつかの実施形態において、対象は、2 歳～20 歳である。いくつかの実施形態において、対象は、30 歳～100 歳である。実施形態によっては、対象は、年齢 55 歳より高齢である。

#### 【0116】

いくつかの実施形態において、組成物は、例えば、対象の脳、及び／または脊髄への直接注射によって、対象の CNS に直接投与される。CNS 直接投与様式の例としては、脳内注射、脳室内注射、大槽内注射、実質内注射、くも膜下腔内注射、及び前述の任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、組成物は、大槽内（ICM）注射によって対象に投与される。いくつかの実施形態において、対象の CNS への直接注射は、対象の中脳、線条体、及び／または大脳皮質における導入遺伝子発現（例えば、第 1 の遺伝子産物、第 2 の遺伝子産物、及び該当する場合、第 3 の遺伝子産物の発現）をもたらす。いくつかの実施形態において、CNS への直接注射は、対象の脊髄、及び／または CSF における導入遺伝子発現（例えば、第 1 の遺伝子産物、第 2 の遺伝子産物、及び該当する場合、第 3 の遺伝子産物の発現）をもたらす。

#### 【0117】

いくつかの実施形態において、対象の CNS への直接注射は、対流増強送達（CED）を含む。対流増強送達は、脳の外科的露出及び脳の標的領域への小径カテーテルの直接的な配置、続いて治療薬（例えば、本明細書に記載の組成物または rAAV）の対象の脳への直接的な注入を含む治療戦略である。CED は、例えば、Debinski et al. (2009) Expert Rev Neurother. 9 (10): 1519-27 によって記載されている。

#### 【0118】

いくつかの実施形態において、組成物は、例えば、末梢注射によって、対象に末梢投与される。末梢注射の例としては、皮下注射、静脈内注射、動脈内注射、腹腔内注射、または前述の任意の組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態において、末梢注射は、動脈内注射、例えば対象の頸動脈への注射である。

#### 【0119】

いくつかの実施形態において、本開示による記載の組成物（例えば、単離核酸またはベクターまたは rAAV を含む組成物）は、対象の CNS に末梢及び直接の両方で投与される。例えば、いくつかの実施形態において、対象は、動脈内注射（例えば、頸動脈への注射）及び実質内注射（例えば、CED による実質内注射）によって組成物を投与される。いくつかの実施形態において、CNS への直接注射及び末梢注射は、同時に行われる（例えば、同時に行われる）。いくつかの実施形態において、直接注射は、末梢注射の前（例えば、1 分～1 週間、またはそれ以上前）に行われる。いくつかの実施形態において、直接注射は、末梢注射の後（例えば、1 分～1 週間、またはそれ以上後）に行われる。

#### 【0120】

いくつかの実施形態において、対象は、本明細書に記載の組成物の前（例えば、1 か月～1 分前）または同時に免疫抑制剤を投与される。いくつかの実施形態において、免疫抑制剤は、コルチコステロイド（例えば、プレドニゾン、ブデソニドなど）、mTOR 阻害剤（例えば、シロリムス、エベロリムスなど）、抗体（例えば、アダリムマブ、エタネルセプト、ナタリズマブなど）、またはメトトレキサートである。

#### 【0121】

対象に投与される本開示による記載の組成物（例えば、単離核酸またはベクターまたは rAAV を含む組成物）の量は、投与方法に応じて変化するであろう。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に記載の rAAV は、約  $10^9$  ゲノムコピー（GC）/kg～約  $10^{14}$  GC/kg（例えば、約  $10^9$  GC/kg、約  $10^{10}$  GC/kg

10

20

30

40

50

、約 $10^{11}$  GC/kg、約 $10^{12}$  GC/kg、約 $10^{12}$  GC/kg、または約 $10^{14}$  GC/kg)の力価で対象に投与される。いくつかの実施形態において、対象は、CSF空間への注射によって、または実質内注射によって、高い力価(例えば、 $10^{12}$  ゲノムコピー GC/kg 超の rAAV)を投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の rAAV は、静脈内注射によって約 $1 \times 10^{10}$  ベクターゲノム(vg)～約 $1 \times 10^{17}$  vgの範囲の用量で対象に投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の rAAV は、大槽への注射によって、約 $1 \times 10^{10}$  vg～約 $1 \times 10^{16}$  vgの範囲の用量で対象に投与される。

#### 【0122】

本開示による記載の組成物(例えば、単離核酸またはベクターまたは rAAV を含む組成物)は、対象に、1回または複数回(例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、20回、またはそれ以上)投与され得る。いくつかの実施形態において、組成物は、例えば、注入ポンプを介して、対象に連続的に(例えば、慢性的に)投与される。

#### 【実施例】

#### 【0123】

##### 実施例1：rAAVベクター

HEK293細胞などの細胞を使用して、トリプルプラスミドトランスフェクションのためのAAVベクターを生成する。ITR配列は、各目的の導入遺伝子についてのプロモーター／エンハンサー要素、3'ポリAシグナル、及びWPRE要素などの翻訳後シグナルを含む発現構築物に隣接している。GBA1及びLIMP2、及び／またはプロサポシンなどの複数の遺伝子産物が、タンパク質配列の融合によって、またはペプチド結合の生成の防止によりアミノ酸が付加された2つのペプチド断片を導くT2AもしくはP2Aなどの2Aペプチドリinkerを使用して、またはIRES要素を使用して、または2つの別々の発現カセットをでの発現によって、同時に発現され得る。発現された遺伝子の上流で効率的にスプライシングされる短いイントロン配列の存在は、発現レベルを改善し得る。shRNA及び他の調節RNAは、潜在的にこれらの配列内に含まれ得る。本開示による記載の発現構築物の例は、図1～8、21～35、39、41～51、及び64、ならびに下記の表2に示される。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2

| 名称                                                            | プロモーター1 | shRNA | CDS1   | ポリ A1    | パインストロン性要素 | プロモーター2 | CDS2   | PolyA2 | ITR 間長 |
|---------------------------------------------------------------|---------|-------|--------|----------|------------|---------|--------|--------|--------|
| CMVc_CBAp_GBA1_WPRE_bGH                                       | CBA     |       | GBA1   | WPRE-bGH |            |         |        |        | 3741   |
| LT1s_Jet 長_mRNAiaSYn_SCARB2-T2A-GBA1_bGH                      | Jet 長   | aSyn  | SCARB2 | bGH      | T2A        |         | GBA1   |        | 4215   |
| LI1_Jet 長_SCARB2-IRES-GBA1_bGH                                | Jet 長   |       | SCARB2 | bGH      | IRES       |         | GBA1   |        | 4399   |
| FP1_Jet 長_GBA1_bGH_Jet 長_SCARB2_SV40L                         | Jet 長   |       | GBA1   | bGH      |            | Jet 長   | SCARB2 | SV40L  | 4464   |
| PrevailVector_LT2s_Jet 長_mRNAiaSYn_PSAP-T2A-GBA1_bGH_4353nt   | Jet 長   | aSyn  | PSAP   | bGH      | T2A        | -       | GBA1   | -      | 4353   |
| PrevailVector_LI2_Jet 長_PSAP_IRES-GBA1_Synthet icpolyA_4337nt | Jet 長   | -     | PSAP   | 合成 pA    | IRES       | -       | GBA1   | -      | 4337   |
| PrevailVector_I0s_Jet 長_mRNAiaSy_GBA2_WPRE_bGH_4308nt         | Jet 長   | aSyn  | GBA2   | WPRE_bGH | -          | -       | -      | -      | 4308   |
| PrevailVector_FT4_Jet 長_GBA1_T2A_GALC_Synthet icpolyA_4373nt  | Jet 長   | -     | GBA1   | 合成 pA    | T2A        | -       | GALC   | -      | 4373   |

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

|                                                                                              |       |      |        |              |      |       |           |       |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|--------|--------------|------|-------|-----------|-------|------|
| PrevailVector_L<br>T4_Jet 長<br>_GALC_T2A_<br>GBA1_Syntheti<br>cpolyA_4373nt                  | Jet 長 | -    | GALC   | 合成 pA        | T2A  | -     | GBA1      | -     | 4373 |
| PrevailVector_L<br>T5s_Jet 長<br>_mRNAiaSyn_<br>CTSB-T2A-<br>GBA1_WPRE_<br>bGH_4392nt         | Jet 長 | aSyn | CTSB   | WPRE_<br>bGH | T2A  | -     | GBA1      | -     | 4392 |
| PrevailVector_F<br>T11t_Jet 長<br>_mRNAiaSyn_<br>GBA1_T2S_S<br>MPD1_Syntheti<br>cpolyA_4477nt | Jet 長 | aSyn | GBA1   | 合成 pA        | T2A  | -     | SMPD<br>1 | -     | 4477 |
| PrevailVector_L<br>I4_Jet 長<br>_GALC_IRES_<br>GBA1_Symthet<br>icpolyA_4820nt                 | Jet 長 | -    | GALC   | 合成 pA        | IRES | -     | GBA1      | -     | 4820 |
| PrevailVector_F<br>P5_Jet 長<br>_GBA1_bGH_J<br>et 長<br>_CTSB_SV40L_<br>4108nt                 | Jet 長 | -    | GBA1   | bGH          | -    | Jet 長 | CTSB      | SV40L | 4108 |
| PrevailVector_F<br>T6s_Jet 長<br>_mRNAiaSyn_<br>GBA1-T2A-<br>GCH1_WPRE_<br>bGH_4125nt         | Jet 長 | aSyn | GBA1   | WPRE_<br>bGH | T2A  | -     | GCH1      | -     | 4125 |
| PrevailVector_L<br>T7s_Jet 長<br>_mRNAiaSyn_<br>RAB7L1-T2A-<br>GBA1_WPRE_<br>bGH_3984nt       | Jet 長 | aSyn | RAB7L1 | WPRE_<br>bGH | T2A  | -     | GBA1      | -     | 3984 |

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

|                                                                                               |       |                        |       |              |      |       |           |       |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------------|-------|--------------|------|-------|-----------|-------|------|
| PrevailVector_F<br>I6s_Jet 長<br>_mRNAiaSYn_<br>GBA1-IRES-<br>GCH1_bGH_39<br>78nt              | Jet 長 | aSyn                   | GBA1  | bGH          | IRES | -     | GCH1      | -     | 3978 |
| PrevailVector_9<br>st_Jet 長<br>_mRNAiaSyn_<br>mRNAiTMEM<br>106B_VPS35_<br>WPRE_bGH_4<br>182nt | Jet 長 | aSyn 及<br>TMEM<br>106B | VPS35 | WPRE_<br>bGH | -    | -     | -         | -     | 4182 |
| PrevailVector_F<br>T12s_Jet 長<br>_mRNAiaSyn_<br>GBA1-T2A-<br>IL34_WPRE_b<br>GH_4104nt         | Jet 長 | aSyn                   | GBA1  | WPRE_<br>bGH | T2A  | -     | IL34      | -     | 4104 |
| PrevailVector_F<br>I12s_Jet 長<br>_mRNAiaSYn_<br>GBA1-IRES-<br>IL34_bGH_395<br>7nt             | Jet 長 | aSyn                   | GBA1  | bGH          | IRES | -     | IL34      | -     | 3957 |
| PrevailVector_F<br>P8_Jet 長<br>_GBA1_bGH_<br>CD68_TREM2<br>_SV40L_4253nt                      | Jet 長 | -                      | GBA1  | bGH          | -    | CD68  | TREM<br>2 | SV40L | 4253 |
| PrevailVector_F<br>P12_CMVe_CB<br>A_GBA1_bGH<br>_Jet 長<br>_IL34_SV40L_4<br>503nt              | CBA   |                        | GBA1  | bGH          |      | Jet 長 | IL34      | SV40L | 4503 |

## 【 0 1 2 4】

## 実施例 2 : G B へのウイルス形質導入の細胞ベースアッセイ

G B A 1 が欠損した細胞は、例えば、G D 患者、単球もしくは h E S 細胞由来の線維芽細胞、または患者由来人工多能性幹細胞 ( i P S C ) として得られる。これらの細胞は、グルコシルセラミド及びグルコシルスフィンゴシン ( G l c C e r 及び G l c S p h ) などの基質を蓄積する。野生型または変異体培養細胞株での C B E などの G c a s e 阻害剤での処置もまた、G B A 欠損細胞を得るために使用される。

## 【 0 1 2 5】

そのような細胞モデルを使用して、リソソーム欠損は、このタンパク質またはホスホ α S y n についての抗体、続いて蛍光顕微鏡法を使用した画像化で α - シヌクレインなどのタンパク質凝集体の蓄積の観点で定量化される。L A M P 1、L A M P 2、L I M P 1、

L I M P 2 などのタンパク質マーカーについての I C C による、またはライソトラッカーなどの染料を使用した、または蛍光デキストランもしくは他のマーカーのエンドサイトーシス区画を介した取り込みによる、リソソーム異常についての画像化も実施される。L C 3 についてなどのリソソームとの欠陥のある融合による自食作用マーカー蓄積についての画像化も実施され得る。ウェスタンブロッティング及び／または E L I S A を使用して、これらのマーカーの異常蓄積を定量する。また、G B A 1 の糖脂質基質及び生成物の蓄積を標準的な手法を用いて測定する。

#### 【0126】

治療的エンドポイント（例えば、P D 関連病理の減少）を、A A V ベクターの形質導入の発現という観点で測定し、活性及び機能を確認し、定量化する。G c a s e はまた、タンパク質 E L I S A 測定を使用して、または標準的な G c a s e 活性アッセイによって定量化され得る。

#### 【0127】

##### 実施例 3：変異体マウスを用いたインビボアッセイ

本実施例は、変異体マウスを使用した A A V ベクターのインビボアッセイを記載する。変異体マウスにおける上述の A A V ベクターのインビボ試験は、例えば、L i o u e t a l . ( 2 0 0 6 ) J . B i o l . C h e m . 2 8 1 ( 7 ) : 4 2 4 2 - 4 2 5 3 、 S u n e t a l . ( 2 0 0 5 ) J . L i p i d R e s . 4 6 : 2 1 0 2 - 2 1 1 3 、 及び F a r f e l - B e c k e r e t a l . ( 2 0 1 1 ) D i s . M o d e l M e c h . 4 ( 6 ) : 7 4 6 - 7 5 2 によって記載されるアッセイを使用して実施される。

#### 【0128】

ビヒクル対照及び A A V ベクターのくも膜下腔内または脳室内送達（例えば、 $2 \times 10^{11}$  v g / マウスの用量）は、濃縮 A A V ストックを使用して、例えば、 $5 \sim 10 \mu\text{L}$  の注射体積で実行される。対流増強送達による実質内送達を実施する。

#### 【0129】

処置は、症状の発症の前、または発症の後のいずれかで開始される。測定されるエンドポイントは、C N S 及び C S F における基質の蓄積、E L I S A による G c a s e 酵素の蓄積及び酵素活性の蓄積、運動及び認知エンドポイント、リソソーム機能障害、ならびに  $\alpha$ -シヌクレインモノマー、プロトフィブリルまたは原線維の蓄積である。

#### 【0130】

##### 実施例 4：疾患の化学モデル

本実施例は、ゴーシェ病の化学的誘導マウスモデル（例えば、C B E マウスモデル）を使用した A A V ベクターのインビボアッセイを記載する。これらの A A V ベクターのインビボ試験は、例えば、V a r d i e t a l . ( 2 0 1 6 ) J P a t h o l . 2 3 9 ( 4 ) : 4 9 6 - 5 0 9 によって記載されているように、ゴーシェ病の化学的誘導マウスモデルにおいて実施される。

#### 【0131】

ビヒクル対照及び A A V ベクターのくも膜下腔内または脳室内送達（例えば、 $2 \times 10^{11}$  v g / マウスの用量）は、濃縮された A A V ストックを使用して、例えば、 $5 \sim 10 \mu\text{L}$  の注射体積で実施される。対流増強送達による実質内送達を実施する。末梢送達を尾静脈注射によって達成する。

#### 【0132】

処置は、症状の発症の前、または発症の後のいずれかで開始される。測定されるエンドポイントは、C N S 及び C S F における基質の蓄積、E L I S A による G c a s e 酵素の蓄積及び酵素活性の蓄積、運動及び認知エンドポイント、リソソーム機能障害、ならびに  $\alpha$ -シヌクレインモノマー、プロトフィブリルまたは原線維の蓄積である。

#### 【0133】

##### 実施例 5：P D、L B D、ゴーシェ病患者における臨床試験

いくつかの実施形態において、ある特定の形態のゴーシェ病（例えば、G D 1）を有する患者は、パーキンソン病（P D）またはレビー小体型認知症（L B D）を発症するリス

10

20

30

40

50

クが増加する。本実施例は、ゴーシェ病、PD及び／またはLBDを有する患者における、本開示による記載のrAAVの安全性及び有効性を評価するための臨床試験を記載する。

【0134】

ゴーシェ病、PD及び／またはLBDの治療のためのそのようなベクターの臨床試験は、Grabowski et al. (1995) Ann. Intern. Med. 122 (1) : 33-39に記載されているものと同様の試験設計を使用して実施される。

【0135】

#### 実施例6：末梢疾患の治療

いくつかの実施形態において、ある特定の形態のゴーシェ病を有する患者は、例えば、Biegstraaten et al. (2010) Brain 133 (10) : 2909-2919に記載されているように、末梢神経障害の症状を呈する。

【0136】

本実施例は、ゴーシェ病（例えば、1型ゴーシェ病）に関連する末梢神経障害の治療のための本明細書に記載のAAVベクターのインビボアッセイを記載する。簡潔に述べると、末梢神経障害の徴候または症状を有すると特定された1型ゴーシェ病患者は、本開示による記載のrAAVを投与される。いくつかの実施形態において、対象の末梢神経障害の徴候及び症状は、rAAVの投与後に、例えば、Biegstraaten et al.に記載の方法を使用して監視される。

【0137】

患者の患者において存在する（例えば、患者の血清における、末梢組織（例えば、肝臓組織、脾臓組織など）における）本開示による記載の形質導入遺伝子産物のレベルを、例えば、ウエスタンブロット分析、酵素機能アッセイ、または画像化研究によってアッセイする。

【0138】

#### 実施例7：CNS形態の治療

本実施例は、ゴーシェ病のCNS形態の治療のための本明細書に記載のrAAVのインビボアッセイを記載する。簡潔に述べると、CNS形態のゴーシェ病（例えば、2型または3型ゴーシェ病）を有すると特定されたゴーシェ病患者は、本開示による記載のrAAVを投与される。患者のCNSにおいて（例えば、患者のCNSの血清において、患者の脳脊髄液（CSF）において、または患者のCNS組織において）存在する本開示による記載の形質導入遺伝子産物のレベルを、例えば、ウエスタンブロット分析、酵素機能アッセイ、または画像化研究によってアッセイする。

【0139】

#### 実施例8：GBA1において変異を有する対象におけるパーキンソン病の遺伝子療法

本実施例は、GBA1遺伝子における変異によって特徴付けられるパーキンソン病を有する対象への、GBA1をコードする組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）の投与を記載する。

【0140】

rAAV-GBA1ベクター挿入物は、ヒトGBA1（栗色）のコドン最適化コード配列（CDS）を構成的に発現するために、4つの部分、すなわちCMVエンハンサー（CMVe）、CBAプロモーター（CBAP）、エクソン1、及びイントロン（int）からなるCBAプロモーター要素（CBA）を含む。3'領域はまた、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素（WPRE）、それに続くウシ成長ホルモンポリAシグナル（bGHポリA）尾部を含む。隣接ITRは、介在配列の正しいパッケージングを可能にする。5'ITR配列の2つの変異型（図7、挿入ボックス、下部配列）を評価し、これらの変異型は、ITRの20ヌクレオチド「D」領域内にいくつかのヌクレオチドの差異を有し、これはパッケージング及び発現の効率に影響を与えると考えられる。rAAV-GBA1ベクター生成物は、図7（挿入ボックス、上部配列）に示される「D」ドメインヌクレオチド配列を含む。変異体「D」ドメイン（本明細書では「S」ドメインと呼ばれ、ヌクレオチド変化が陰影によって示される）を有する変異型ベクターは、前臨床研究において同

10

20

30

40

50

様に実施された。骨格は、カナマイシンに対する耐性を付与する遺伝子、及び逆パッケージングを防止するためのスタッファー配列を含む。rAAV-GBA1ベクターを示す概略図を図8に示す。rAAV-GBA1ベクターは、AAV9血清型キャプシドタンパク質を使用してrAAVにパッケージ化される。

#### 【0141】

rAAV-GBA1は、大槽（大槽内、ICM）への蛍光透視誘導後頭下注射を介して単回用量として対象に投与される。rAAV-GBA1投与レジメン研究の一実施形態は以下のとおりである。

#### 【0142】

非臨床薬理学及び毒物学試験の結果に基づいて決定される2つの用量レベル（3e13vg（低用量）、1e14vg（高用量）など）のうちの1つで患者（N=12）に投与されるrAAV-GBA1の単回用量。

#### 【0143】

初期試験は、rAAV-GBA1ベクター及びrAAV-GBA1 S-変異型構築物（以下にさらに記載する）の有効性及び安全性を評価するために、コンズリトールーボーエポキシド（CBE）、GCASEの阻害剤の日次送達にて、化学マウスモデルにおいて実施された。さらに、初期試験は、ホモ接合性GBA1変異を保有し、サポシンが部分的に欠損している（4L/PS-NA）遺伝子マウスモデルにおいて行われた。マウス及び非ヒト霊長類（NHP）における追加の用量範囲試験を実施して、ベクターの安全性及び有効性をさらに評価する。

#### 【0144】

AAV骨格における5'逆位末端反復（ITR）の2つのわずかに異なるバージョンを試験して、製造可能性及び導入遺伝子発現を評価した（図7）。145bpの5'ITR内の20bpの「D」ドメインは、最適なウイルスベクター産生に必要であると考えられているが、「D」ドメイン内の変異が、場合によっては導入遺伝子発現を増加させることも報告されている。したがって、無傷な「D」ドメインを保有するウイルスベクターrAAV-GBA1に加えて、変異体Dドメイン（本明細書において「S」ドメインと称される）を有する第2のベクター形態も評価した。rAAV-GBA1及び変異型の両方が同じ導入遺伝子を発現する。両方のベクターが、以下に詳述するようにインビボで有効なウイルスを産生したが、野生型「D」ドメインを含むrAAV-GBA1をさらなる開発のために選択した。

#### 【0145】

GCASE欠損のCBEモデルを確立するために、若齢マウスに、CBE、GCASEの特異的阻害剤を投薬した。生後8日目（P8）で開始して、毎日のIP注射によって、マウスにCBEを与えた。3つの異なるCBE用量（25mg/kg、37.5mg/kg、50mg/kg）及びPBSを試験し、行動表現型を呈するモデルを確立した（図9）。CBEの高用量は、用量依存的に致死性をもたらした。50mg/kgのCBEで処置したすべてのマウスは、P23までに死亡し、37.5mg/kgのCBEで処置した8頭のマウスのうち5頭は、P27までに死亡した。25mg/kgのCBEで処置したマウスに致死性はなかった。CBE注射のマウスがオープンフィールドアッセイで全般的な運動欠損を示さなかった（PBSを与えられたマウスと同じ距離を、同じ速度で移動した）のに対し、CBE処置のマウスは、ロータロッドアッセイによって測定されるように運動協調性及びバランスの欠損を呈した。

#### 【0146】

試験終了まで生存したマウスを、最後のCBE投与の翌日（P27、「1日目」）またはCBE離脱の3日後（P29、「3日目」）に殺した。25mg/kgのCBEを与えたマウスの皮膚に対して脂質分析を行い、1日目及び3日目の両方のコホートにおけるGCASE基質の蓄積を評価した。Glusph及びGalSphレベル（本実施例において、凝集体で測定した）は、GCASE不全と一致して、PBS処置の対照と比較して、CBE処置のマウスにおいて顕著に蓄積された。

## 【0147】

上述の試験に基づいて、生存に影響を与えることなく行動欠損を生じさせたため、25 mg/kgのCBE用量を選択した。CBE処置中に脳全体にわたる広いGBA1分布及び導入遺伝子発現を達成するために、rAAV-GBA1または賦形剤を、生後3日目（P3）に脳室内（ICV）注射によって送達し、続いてP8で毎日のIP CBEまたはPBS処置を開始した（図10）。

## 【0148】

rAAV-GBA1を受けたCBE処置のマウスは、賦形剤を受けたマウスよりも、ロータロッド上で統計学的に有意に良好に行動した（図11）。バリエーション処置群のマウスは、試験中に移動した総距離などの他の行動尺度において、賦形剤処置のマウスと差異はなかった（図11）。

## 【0149】

生存中試験の完了時に、生化学分析のために、半数のマウスは、最後のCBE投与の翌日に（P36、「1日目」）、またはCBE離脱の3日後（P38、「3日目」）に殺された（図12）。生物学的三重で実施した蛍光測定酵素アッセイを使用して、皮質におけるGCase活性を評価した。GCase活性は、rAAV-GBA1で処置したマウスにおいて増加したが、CBE処置はGCase活性を低下させた。加えて、CBE及びrAAV-GBA1の両方を受けたマウスは、PBS処置群と同様のGCase活性レベルを有し、これは、rAAV-GBA1の送達が、CBE処置によって誘導されるGCase活性の阻害を克服することができることを示す。マウスの運動皮質に対して脂質分析を行い、基質GlucCer及びGlucSphのレベルを調査した。CBE及びrAAV-GBA1処置を与えられたマウスの脳において蓄積した両方の脂質は、基質蓄積を顕著に減少させた。

## 【0150】

脂質レベルは、処置群にわたってGCase活性及びロータロッド上の性能の両方と負の相関があった。rAAV-GBA1投与後のGCase活性の増加は、基質の減少及び運動機能の増強と関連した（図13）。図14に示されるように、予備的な生体内分布は、qPCRによって測定して、ベクターゲノムの存在によって評価した（1µgのゲノムDNAあたり100超のベクターゲノムを陽性として定義した）。rAAV-GBA1を受けたマウスは、CBEの有無の両方で、皮質におけるrAAV-GBA1ベクターゲノムについて陽性であり、これは、ICV送達が、皮質へのrAAV-GBA1送達をもたらすことを示す。さらに、ベクターゲノムは、肝臓で検出され、脾臓ではほとんど検出されず、心臓、腎臓、または生殖腺では検出されなかった。すべての測定値について、1日目群及び3日目群の間に統計学的有意差はなかった。

## 【0151】

CBEモデルにおけるより大規模な試験により、CBEモデルにおけるrAAV-GBA1の有効用量をさらに探索した。25 mg/kgのCBE用量モデルを用いて、賦形剤またはrAAV-GBA1を、P3でICVを介して送達し、P8で毎日のIP PBSまたはCBE処置を開始した。以前の試験で観察されたCBE離脱有無の群間の類似性を考慮して、すべてのマウスを最終CBE用量の1日後に殺した（P38～40）。3つの異なるrAAV-GBA1用量の効果を評価し、群あたり10頭のマウス（5M/5F）での以下の5つの群の結果をもたらした。

賦形剤 ICV+PBS IP

賦形剤 ICV+25 mg/kgのCBE IP

3.2e9 vg (2.13e10 vg/g脳) の rAAV-GBA1 ICV+25 mg/kgのCBE IP

1.0e10 vg (6.67e10 vg/g脳) の rAAV-GBA1 ICV+25 mg/kgのCBE IP

3.2e10 vg (2.13e11 vg/g脳) の rAAV-GBA1 ICV+25 mg/kgのCBE IP。

## 【0152】

rAAV-GBA1の最高用量は、P37でのCBE処置に関連した体重増加の失敗を救出した。さらに、この用量は、賦形剤+CBE処置群と比較して、ロータロッド及びテーパービームの性能において統計学的に有意な増加をもたらした(図15)。致死性が、賦形剤処置群及びrAAV-GBA1処置群の両方を含むいくつかの群において観察された(賦形剤+PBS:0、賦形剤+25mg/kgのCBE:1、3.2e9vgのrAAV-GBA1+25mg/kgのCBE:4、1.0e10vgのrAAV-GBA1+25mg/kgのCBE:0、3.2e10vgのrAAV-GBA1+25mg/kgのCBE:3)。

## 【0153】

生存中試験の完了時に、生化学分析のためにマウスを殺した(図16)。皮質におけるGCASE活性を、蛍光測定アッセイによって、生物学的三重で評価した。CBE処置のマウスは、GCASE活性の低下を示したが、rAAV-GBA1高用量を受けたマウスは、CBE処置と比較して、GCASE活性の統計学的に有意な増加を示した。CBE処置のマウスはまた、GlucCer及びGlucSphの蓄積を有し、これらの両方は、高用量のrAAV-GBA1を投与することによって救出された。

## 【0154】

確立された化学CBEモデルに加えて、rAAV-GBA1は、Gba1のV394LGD変異に対してホモ接合性であり、また、GCASEの局在化及び活性に影響を及ぼすサポシンも部分的に欠損している4L/PS-NA遺伝モデルにおいても評価された。これらのマウスは、ビームウォーク、ロータロッド、及びワイヤハングアッセイにおけるそれらの性能によって証明されるように、運動強度、協調性、及びバランスの欠損を呈する。典型的には、これらのマウスの寿命は22週未満である。初期試験において、3µlの最大力価ウイルスを、P23で、2.4e10vg(6.0e10vg/g脳)の最終用量で、ICVにより送達した。群あたり6頭のマウスを用いて、処置群は以下であった。

WT+賦形剤ICV

4L/PS-NA+賦形剤ICV

4L/PS-NA+2.4e10vg(6.0e10vg/g脳)のrAAV-GBA1 ICV

## 【0155】

ビームウォーク試験による運動性能を、rAAV-GBA1の送達の4週間後に評価した。rAAV-GBA1を受けた変異体マウス群は、賦形剤で処置した変異体マウスと比較して、全スリップが少なく、速度あたりスリップが少ない傾向を示し、運動機能をWTレベル近くまで回復させた(図17)。運動表現型は、これらのマウスの加齢に伴ってより重度になるため、この行動試験及び他の行動試験におけるそれらの性能は、後の時点で評価される。生存中試験の完了時に、脂質レベル、GCASE活性、及び生体内分布を、これらのマウスにおいて評価した。

## 【0156】

追加の低用量のrAAV-GBA1が、現在、CBEモデルを使用して試験中であり、提案された第1相高臨床用量の0.03倍、0.1倍、及び1倍に対応する。各群は、群あたり10頭のマウス(5M/5F)を含む。

賦形剤ICV

賦形剤ICV+25mg/kgのCBE IP

3.2e8vg(2.13e9vg/g脳)のrAAV-GBA1 ICV+25mg/kgのCBE IP

1.0e9vg(6.67e9vg/g脳)のrAAV-GBA1 ICV+25mg/kgのCBE IP

1.0e10vg(6.67e10vg/g脳)のrAAV-GBA1 ICV+25mg/kgのCBE IP。

## 【0157】

運動表現型に加えて、皮質における脂質レベル及びG C a s e 活性を評価する。処置及び分析の時間経過も実施される。

【0158】

有効性及び安全性データを評価するために、より大きな用量範囲の試験が開始された。10頭の4 L / P S - N A マウス（群あたり5頭雄／5頭雌）に10  $\mu$  l のr A A V - G B A 1を注射した。アロメトリック脳重量計算を使用して、用量は、提案された第1相高臨床用量の0.15倍、1.5倍、4.4倍、及び14.5倍と相関する。注射群は以下からなる。

W T + 賦形剤 I C V

4 L / P S - N A + 賦形剤 I C V

4 L / P S - N A + 4.3 e 9 v g (1.1 e 10 v g / g 脳) のr A A V - G B A 1 I C V

4 L / P S - N A + 4.3 e 10 v g (1.1 e 11 v g / g 脳) のr A A V - G B A 1 I C V

4 L / P S - N A + 1.3 e 11 v g (3.2 e 11 v g / g 脳) のr A A V - G B A 1 I C V

4 L / P S - N A + 4.3 e 11 v g (1.1 e 12 v g / g 脳) のr A A V - G B A 1 I C V。

【0159】

実施例9：r A A V ベクターのインビトロ分析

r A A V 構築物をインビトロ及びインビボで試験した。図18は、プログラニュリン（P G R N）タンパク質をコードするr A A V 構築物のインビトロ発現についての代表的なデータを示す。左パネルは、プログラニュリン（P G R N）E L I S A アッセイの標準曲線を示す。下段パネルは、r A A V で形質導入したH E K 2 9 3 T 細胞の細胞溶解物におけるE L I S A アッセイによって測定したP G R N 発現の用量応答を示す。M O I = 感染の多重度（細胞あたりのベクターゲノム）。

【0160】

単独でまたはG B A 1 及び／または1つ以上の阻害性R N A と組み合わせて、プロサポシン（P S A P）及びS C A R B 2 をコードするr A A V ベクターのインビトロ活性を評価するためにパイロット試験を行った。P S A P 及びプログラニュリン（P G R N）をコードする1つの構築物も試験した。試験したベクターは、表3に示されるものを含む。

「O p t」は、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）における発現のためにコドン最適化された核酸配列を指す。図19は、構築物の各々でのH E K 2 9 3 細胞のトランスフェクションが、モックトランスフェクション細胞と比較して対応する遺伝子産物の過剰発現をもたらしたことを示す代表的なデータを示す。

【0161】

単独で、または1つ以上の阻害性R N A と組み合わせて、T R E M 2 をコードするr A A V ベクターのインビトロ活性を評価するために、パイロット試験を行った。試験したベクターは、表3に示されるものを含む。「O p t」は、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）における発現のためにコドン最適化された核酸配列を指す。図36A～36Bは、構築物の各々でのH E K 2 9 3 細胞のトランスフェクションが、モックトランスフェクション細胞と比較して対応する遺伝子産物の過剰発現をもたらしたことを示す代表的なデータを示す。

表3

10

20

30

40

50

【表 3】

| ID     | プロモーター       | 阻害性 RNA | プロモーター  | 導入遺伝子                   |
|--------|--------------|---------|---------|-------------------------|
| I00015 | JL_イントロ<br>ン | SNCA    | Jet 長   | Opt-<br>PSAP_GBA1       |
| I00039 | -            | -       | Jet 長   | Opt-PSAP-<br>GRN        |
| I00046 | -            | -       | CBA     | Opt-PSAP                |
| I00014 | Jet 長        | SNCA    | Jet 長   | Opt-<br>SCARB2_GBA<br>1 |
| I00040 |              |         | JL、CD68 | opt-GBA1、<br>TREM2      |

10

## 【0162】

## 実施例 10：SNCA 及び TMEM106B shRNA 構築物の試験

## HEK293 細胞

この試験において、ヒト胚性腎臓 293 細胞株 (HEK293) が使用された (#85120602、Sigma-Aldrich)。HEK293 細胞を、100 単位/mL のペニシリン及び 100 µg/mL のストレプトマイシン (#15140122、Thermo Fisher Scientific) を含む培養培地 (10% のウシ胎仔血清 [FBS] [#10082147、Thermo Fisher Scientific] を補充した D-MEM [#11995065、Thermo Fisher Scientific]) 中で維持した。

20

## 【0163】

## プラスミドトランスフェクション

プラスミドトランスフェクションを、Lipofectamine 2000 トランスフェクション試薬 (#11668019、Thermo Fisher Scientific) を使用して、製造業者の指示に従って実施した。簡単に述べると、HEK293 細胞 (#12022001、Sigma-Aldrich) を、抗生物質を含まない培地中で  $3 \times 10^5$  細胞/mL の密度で播種した。翌日、プラスミド及び Lipofectamine 2000 試薬を Opti-MEM 溶液 (番号 31985062、Thermo Fisher Scientific) 中で混ぜ合わせた。5 分後、混合物を HEK293 培養物に添加した。72 時間後、RNA またはタンパク質抽出のために細胞を採取したか、または画像化分析に供した。画像化分析のために、プレートを、細胞の播種前に、0.01% のポリ-L-リジン溶液 (P8920、Sigma-Aldrich) で予めコーティングした。

30

## 【0164】

## 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) による遺伝子発現解析

相対遺伝子発現レベルを、Power SYBR Green Cells-to-CT Kit (#4402955、Thermo Fisher Scientific) を使用して、製造業者の指示に従って、定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) によって決定した。候補プラスミドを、Lipofectamine 2000 トランスフェクション試薬 (50 µl の Opti-MEM 溶液中の 0.5 µg のプラスミド及び 1.5 µl の試薬) を使用して、48 ウェルプレート上に播種した HEK293 細胞 ( $7.5 \times 10^4$  細胞/ウェル) に一過性にトランスフェクションした。製造業者の指示に従って、72 時間後、RNA を細胞から抽出し、逆転写のために使用して cDNA を合成した。定量的 PCR 分析について、2~5 µL の cDNA 生成物を、遺伝子特異的プライマー対 (250 nM の最終濃度) を使用して、Power SYBR Green PCR Mast

40

50

r Mix (#4367659、Thermo Fisher Scientific) で二重に増幅した。SNCA、TMEM106B、及びGAPDH遺伝子についてのプライマー配列は以下のとおりである。SNCAについては5'-AAG AGG GTG TTC TCT ATG TAG GC-3' (配列番号71)、5'-GCT CCT CCA ACA TTT GTC ACT T-3' (配列番号72)、TMEM106Bについては5'-ACA CAG TAC CTA CCG TTA TAG CA-3' (配列番号73)、5'-TGT TGT CAC AGT AAC TTG CAT CA-3' (配列番号74)、及びGAPDHについては5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3' (配列番号75)、5'-AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG -3' (配列番号76)。定量的PCRは、QuantStudio 3 Real-Time PCRシステム(Thermo Fisher Scientific)において実行された。発現レベルをハウスキーピング遺伝子GAPDHによって正規化し、比較CT法を用いて計算した。

#### 【0165】

##### 蛍光画像化分析

EGFPコード領域の下流にヒトSNCA遺伝子の3' UTRを含むEGFPレポータープラスミドを、SNCA及びTMEM106Bノックダウンプラスミドの検証のために使用した。EGFPレポータープラスミド及び候補ノックダウンプラスミドを、Lipofectamine 2000トランスフェクション試薬(10 µlのOpti-MEM溶液中の0.04 µgのレポータープラスミド、0.06 µgのノックダウンプラスミド、及び0.3 µlの試薬)を使用して、ポリ-L-リジンコーティング96ウェルプレート上に播種したHEK293細胞( $3.0 \times 10^4$ 細胞/ウェル)に同時にトランスフェクションした。72時間後、EGFPシグナルの蛍光強度を、Varioskana LUXマルチモードリーダー(Thermo Fisher Scientific)を使用して、励起488 nm/発光512 nmで測定した。細胞を4% PFAで室温にて10分間固定し、40 µg/mLの7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD)を含むD-PBSで室温で30分間インキュベーションした。D-PBSで洗浄した後、7-AADシグナルの蛍光強度を、Varioskanaリーダーを使用して励起546 nm/発光647 nmで測定し、細胞数を定量した。7-AADシグナルレベルあたりの正規化されたEGFPシグナルを、対照ノックダウン試料と比較した。

#### 【0166】

##### 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

SNCAコード領域の下流にヒトSNCA遺伝子またはTMEM106B遺伝子の3' UTRを含むα-シヌクレインレポータープラスミドを、タンパク質レベルでのノックダウンプラスミドの検証のために使用した。HEK293細胞から抽出した溶解物を使用して、α-シヌクレインタンパク質のレベルをELISA(#KHB0061、Thermo Fisher Scientific)によって決定した。候補プラスミドを、Lipofectamine 2000トランスフェクション試薬(25 µlのOpti-MEM溶液中の0.1 µgのレポータープラスミド、0.15 µgのノックダウンプラスミド、及び0.75 µlの試薬)を使用して、48ウェルプレート上に播種したHEK293細胞( $7.5 \times 10^4$ 細胞/ウェル)に一過性にトランスフェクションした。72時間後、細胞を、プロテアーゼ阻害剤カクテル(#P8340、Sigma-Aldrich)を補充した放射免疫沈降アッセイ(RIPA)緩衝液(#89900、Thermo Fisher Scientific)中で溶解し、数秒間超音波処置した。氷上で30分間インキュベーションした後、溶解物を20,000×gで、4℃で15分間遠心分離し、上清を回収した。タンパク質レベルを定量化した。プレートを450 nmのVarioskanaプレートリーダーで読み取り、濃度をSoftMax Pro 5ソフトウェアを使用して計算した。測定されたタンパク質濃度を、ピシンコニン酸アッセイ(#23225、Thermo Fisher Scientific)で決定された総タンパク質濃度に対して正規化した。

## 【0167】

図37及び表4は、GFPLレポーターアッセイ（上段）及び $\alpha$ -Synアッセイ（下段）によるイントロでのSNCAの成功裏のサイレンシングを示す代表的なデータを示す。図38及び表5は、GFPLレポーターアッセイ（上段）及び $\alpha$ -Synアッセイ（下段）によるイントロでのTMEM106Bの成功裏のサイレンシングを示す代表的なデータを示す。

表4

【表4】

| ID     | プロモーター    | ノックダウン       | プロモーター | 過剰発現           |
|--------|-----------|--------------|--------|----------------|
| 100007 | CMV_イントロン | SNCA_mi      | CMV    | opt-GBA1       |
| 100008 | H1        | SNCA_sh      | CMV    | opt-GBA1       |
| 100009 | H1        | SNCA_Pubsh4  | CMV    | opt-GBA1       |
| 100014 | JL_イントロン  | SNCA_mi      | Jet 長  | opt-SCARB2_GBA |
| 100015 | JL_イントロン  | SNCA_mi      | Jet 長  | opt-PSAP_GBA   |
| 100016 | JL_イントロン  | SNCA_mi      | Jet 長  | opt-CTSB_GBA   |
| 100019 | JL_イントロン  | SNCA_TMEM_mi | Jet 長  | opt-VPS35      |
| 100023 | JL_イントロン  | SNCA_mi      | Jet 長  | opt-GBA1_IL34  |
| 100024 | JL_イントロン  | SNCA_mi      | Jet 長  | opt-GBA2       |
| 100028 | イントロン     | SNCA_Broadsh | CMV    | opt-GBA1       |
| 100029 | イントロン     | SNCA_Pubsh4  | CMV    | opt-GBA1       |

表5

10

20

30

40

50

【表 5】

| ID     | プロモーター   | ノックダウン       | プロモーター | 過剰発現         |
|--------|----------|--------------|--------|--------------|
| I00010 | H1       | TMEM_Pubsh   | CMV    | opt-GRN      |
| I00011 | JL_イントロン | TMEM_mi      | Jet 長  | opt-GBA1_GRN |
| I00012 | H1       | TMEM_sh      | CMV    | opt-GRN      |
| I00019 | JL_イントロン | SNCA_TMEM_mi | Jet 長  | opt-VPS35    |

10

## 【0168】

## 実施例 11：ITR「D」配列の配置及び細胞形質導入

rAAVベクターの細胞形質導入に対する ITR「D」配列の配置の効果を調査した。図 20 に示すように、HEK293 細胞を、1) 野生型 ITR（例えば、導入遺伝子挿入物の近位にあり、ITR の末端の遠位にある「D」配列）または 2) ベクターの「外側」に位置する「D」配列を有する ITR（例えば、ITR の末端に近位であり、導入遺伝子挿入物の遠位にある「D」配列）を有する Gcase コード化 rAAV で形質導入した。驚くべきことに、データは、「外側」位置に位置する「D」配列を有する rAAV が、パッケージ化され、細胞を効率的に形質導入する能力を保持することを示す（図 40）。

20

## 【0169】

## 実施例 12：プログラニューリン rAAV のインビトロ試験

図 39 は、PGRN をコードする発現構築物を含むベクターの一実施形態を示す概略図である。プログラニューリンは、大槽などへの実質内または髄腔内注射のいずれかによる PGRN（例えば、コドン最適化された PGRN）をコードする rAAV ベクターの注射によって、GRN 欠失についてヘテロ接合またはホモ接合のいずれかである GRN が欠損しているげっ歯類の CNS において過剰発現される。

30

## 【0170】

2 か月齢または 6 か月齢でマウスに注射し、6 か月齢または 12 か月齢まで年をとらせ、以下のうちの 1 つ以上について分析する。RNA 及びタンパク質レベルでの GRN の発現レベル、行動アッセイ（例えば、改善された移動）、生存アッセイ（例えば、改善された生存）、小膠細胞及び炎症マーカー、神経膠症、ニューロンの喪失、リポフスチン症、ならびに／または LAMP1 などのリソソームマーカー蓄積救済。PGRN 欠損マウスに対するアッセイは、例えば、Arrant et al. (2017) Brain 140:1477-1465、Arrant et al. (2018) J. Neurosci 38 (9):2341-2358、及び Amado et al. (2018) doi:https://doi.org/10.1101/30869 によって記載されており、それらの全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

## 【0171】

## 実施例 13：プログラニューリン rAAV のインビトロ及びインビボ試験

プログラニューリン (PGRN) タンパク質をコードする rAAV 構築物 (P006 (P006A とも称される)、図 64 を参照) の効果を分析するために、インビトロアッセイ及びインビボアッセイを行った。P006 は、AAV9 血清型を有するキャプシドを含む。

## 【0172】

## インビトロ非臨床試験

50

### HEK293T細胞におけるPR006Aに由来するプログラニュリン発現

細胞の環境でPR006Aのプログラニュリタンパク質産生を誘導する能力を調査した。HEK293T細胞を、 $2.1 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^6$ ベクターゲノム(vg)/細胞の範囲の感染の多重度(MOI)の範囲にわたってPR006Aで形質導入した。PR006A形質導入は、プログラニュリタンパク質の発現及び細胞培地への分泌において堅牢で用量依存的な増加をもたらした(図60)。賦形剤(意図する臨床ビヒクル)のみで処置した陰性対照群において、内因性ヒトGRN遺伝子由来の発現を反映する実質的に低いプログラニュリタンパク質レベルを検出した。

【0173】

### FTD-GRN iPSC由来ニューロンにおける有効性

アッセイを実施して、ヒトFTD-GRN(GRN変異を有する前頭側頭型認知症)ニューロン培養におけるインビトロでのrAAV構築物の有効性を分析した。細胞株は、National Institute of Neurological Disorders and Stroke(NINDS) Human Cell and Data Repository(NHCDR)から入手した。材料ND50015(FTD-GRN、M1L)、ND50060(FTD-GRN、R493X)及びND38555(対照、野生型)(表6を参照)。

表6:iPSC細胞株の特徴の要約

【表6】

| 細胞株       | NINDS<br>細胞株<br>ID# | FTDの臨床<br>診断である<br>か? | GRN変異 | 年齢 | 性別 | 細胞源/リプログラミング方法     |
|-----------|---------------------|-----------------------|-------|----|----|--------------------|
| FTD-GRN#1 | ND50015             | はい                    | M1L   | 54 | 女性 | 線維芽細胞/エピソームプラスミド   |
| FTD-GRN#2 | ND50060             | リスク(62歳で罹患した兄弟姉妹)     | R493X | 60 | 男性 | 線維芽細胞/エピソームプラスミド   |
| 対照        | ND38555             | いいえ                   | 該当なし  | 48 | 女性 | 線維芽細胞/レトロウイルスプラスミド |

【0174】

FTD-GRNに病理学的に関連する細胞モデルを確立するために、各株由来のiPSCを、2ステッププロトコルを使用して神経細胞に分化させた。第1のステップにおいて、iPSCを、免疫蛍光標識によって検出されるように、多能性マーカー(すなわち、OCT4及びSSEA1)の発現を欠き、神経幹細胞マーカー(すなわち、SOX2、Nestin、SOX1、及びPAX6)の発現を獲得した増殖ニューロン幹細胞(NSC)株に分化させた。

【0175】

対照及びFTD-GRN NSC株を等密度で播種し、48時間後、細胞溶解物(細胞内プログラニュリン)(図52E)及び細胞培地(分泌プログラニュリン)(図52A)におけるプログラニュリン発現を酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。プログラニュリン発現を総タンパク質濃度に対して正規化して、細胞数の差( $n=3$ 、平均±SEM)を考慮した。ヘテロ接合性GRN変異を有するNSC株は、対照NSCと比較して顕著に低い細胞内及び分泌プログラニュリンレベルを有し、FTD-GRN NSCは、内因性プログラニュリンレベルの約25~50%を発現した。これは、このF

FTD-GRN細胞モデルが、血漿中の正常なプログランニューリンレベルの3分の1から2分の1を発現するFTD-GRN患者において観察された臨床プログランニューリン欠乏症を再現することを示唆した(Finch et al., Brain 132, 583-591 (2009)、Ghidoni et al., Neurology 71, 1235-1239, (2008)、Sleegers et al., Ann Neurol 65, 603-609 (2009))。

【0176】

すべての細胞株由来のNSCを神経細胞培養物に分化させた。iPSC由来のNSCがプログランニューリン発現の減少を呈することを確認した後、株をニューロンに分化させ、PRO06Aの非臨床有効性試験のための臨床的に代表的な細胞型を生成した。NSCをニューロン分化培地に播種し、最終的に、7日間有糸分裂後ニューロンに分化させ、次いで免疫蛍光によってニューロンマーカー(すなわち、MAP2、NeuN、Tau、Tuj1、NF-H)の発現について評価した(図52G)。このプロトコルを使用して、対照及びFTD-GRN iPSC由来NSC株の両方がニューロンに効率的に分化した。

【0177】

FTD-GRN iPSC由来ニューロン培養物を使用して、インビトロでのPRO06Aの有効性を評価した。FTD-GRNニューロンを、 $2.7 \times 10^5$ 、 $5.3 \times 10^5$ 、または $1.1 \times 10^6$  v g /細胞のMOIで賦形剤またはPRO06Aで処理した。PRO06A形質導入は、すべての細胞株において、ELISAによって測定されたように、分泌プログランニューリンの堅牢で用量依存的な発現をもたらした(図52B)。賦形剤処置の対照及びFTD-GRNニューロンを、内因性プログランニューリンレベルについて評価した。対照ニューロンは内因性分泌プログランニューリンを発現したが、FTD-GRNニューロンにおいては、分泌プログランニューリンは検出されなかった(図52B)。線形回帰分析は、両方のFTD-GRN細胞株にわたって、PRO06A用量とプログランニューリンレベルとの間の有意な相関を確認した( $p = 3.5 \times 10^{-13}$ )。これらの結果は、PRO06Aでの処置が、FTD-GRNニューロンモデルにおけるプログランニューリンの分泌の上昇をもたらすことを実証している。

【0178】

プログランニューリンは、リソソームプロテアーゼカテプシンD(CTSD)の成熟を刺激することが知られており、その機能の喪失は、リソソーム貯蔵障害及び神経変性にも関与するものと考えられている。CTSDは、酵素活性成熟プロテアーゼ(matCTSD)へのタンパク質分解処理を受ける不活性全長プロタンパク質(proCTSD)として発現される。プログランニューリンは、proCTSDに結合してmatCTSDプロテアーゼへのその成熟を増強する分子シャペロンとして作用することが報告されている。FTD-GRNニューロン培養において、PRO06A形質導入は、カテプシンDの欠陥のある成熟を救出した(図52C)。対照、FTD-GRN #1、及びFTD-GRN #2ニューロンを、PRO06Aまたは賦形剤で形質導入した。プログランニューリンレベルを対照細胞の少なくとも2倍に回復させたため、 $5.3 \times 10^5$ のMOIのPRO06Aを有効性実験に使用した(図52B)。有効性を評価するために、proCTSD及びmatCTSD発現レベルを、自動Simple Western(商標)(Jess)プラットフォームを使用して、細胞溶解物において測定した(図52C)。賦形剤処置のFTD-GRNニューロンは、賦形剤処置の対照ニューロンと比較して、matCTSDのproCTSDに対する比率が低く、PRO06A処置は、両方のFTD-GRNニューロン株における比率を顕著に増加させた(図52C)。対照ニューロンにおいて、matCTSDのproCTSDに対する比率は、PRO06A処置によって顕著に変化しなかった。これらの所見は、PRO06AがFTD-GRNニューロンにおけるリソソーム機能関連表現型を還元することを実証している。

【0179】

正常なニューロンにおいて、TDP-43(トランス活性応答DNA結合タンパク質43 kDa)タンパク質は核内に局在している。FTD-GRN患者の死後脳において、ニ

10

20

30

40

50

ニューロンの細胞質におけるTDP-43の凝集が観察され、TDP-43の核蓄積が減少する。FTDニューロンは核TDP-43を減少させ、ニューロンにおける凝集及び下流毒性につながる。Grn KOマウスは、このTDP-43病理を完全に再現しないので、人工多能性幹細胞(iPSC)由来ニューロンは、TDP-43生物学を研究するための貴重なFTD-GRNモデルである。Valdez et al. (Human Molecular Genetics 26, 4861-4872 (2017)) によって記載されているように、核におけるTDP-43の蓄積の減少、及び不溶性TDP-43の蓄積の増加は、GRN変異を保有しない対照ニューロンに対して、FTD-GRNを有する患者由来のiPSC由来ニューロンにおいて報告されている。両方のFTD-GRN変異保有株由来のニューロン培養物のPR006A形質導入がTDP-43異常を逆転させ、不溶性TDP-43の減少(Simple Western (商標)(Jess)プラットフォームを使用して測定(図52D))、及びTDP-43の核局在の増加(免疫蛍光を使用して測定(図52F))をもたらした。

【0180】

要約すると、PR006の形質導入は、リソソーム酵素、カテプシンDにおける欠陥のある成熟を回復させ、FTD-GRNニューロンにおける異常TDP-43病理を改善した。

【0181】

インビボ非臨床試験

老齢Grnノックアウトマウスにおける有効性及び生体内分布

PR006Aのインビボでの有効性及び最大用量PR006Aを、Grnノックアウト(KO)マウスモデルで評価した。これらの試験において使用したGrn KOマウスモデル(B6(Cg)-Grn<sup>tm1.1Aidi/J</sup>(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME))において、エクソン1~4を標的プログラニュリン(Grn)遺伝子から欠失させる(Yin et al., J Exp Med 207, 117-128 (2010))。これらの動物はプログラニュリンを完全に喪失し、リソソームの変化、ニューロンのリボフスチンの蓄積、ユビキチンの蓄積、小膠細胞症、及び神経炎症を含む年齢依存性の表現型を示し、したがってFTD-GRNをモデル化するために広く使用される。試験からバイアスを除去するためにすべての試みを行なった。性別及び体重についてバランスの取れた処置群にマウスを割り当て、有資格者によって実験エンドポイントの盲検評価を行った。

【0182】

初期試験において、PR006Aを $9.7 \times 10^{10}$  vg ( $2.4 \times 10^{11}$  vg/g 脳)の用量で老齢Grn KOマウスに送達し、これは、注射量の制約及び試験に使用されるウイルスロットの物理力価により、試験時点で達成可能な最高用量であった。CNS炎症及び小膠細胞症を含む多くのFTD-GRN関連表現型は、年齢依存的な様式で発症し、表現型の最も顕著な症状は、12~24か月齢間で発生するため、老齢マウスを使用した。

【0183】

老齢Grn KOマウスでの試験において、PR006Aを、単回脳室内(ICV)注射によって投与した。 $10 \mu\text{L}$ の賦形剤(意図される臨床ビヒクル、20mMのTris (pH 8.0)、200mMのNaCl、及び1mMのMgCl<sub>2</sub>+0.001%のプルロニックF68)または $9.7 \times 10^{10}$  vgのPR006A ( $2.4 \times 10^{11}$  vg/gの脳[400mgの成体マウスの脳重量に基づく])を、以下の老齢Grn KOマウスの2つのコホートにICV注射によって送達した。(1)注射時に16か月齢(n=4/群、PRV-2018-027、図61)及び(2)注射時に14か月齢(n=3/群、PRV-2019-002、図61)。動物を注射の2か月後に殺した。

【0184】

PRV-2018-027試験において、PR006Aの単回用量を、以下の処置群で16か月齢のマウスに送達した。

【表 7】

| モデル    | ICV    | ICV 用量                                                 | N              |
|--------|--------|--------------------------------------------------------|----------------|
| Grn KO | 賦形剤    | 該当なし                                                   | 4 頭(2 頭雄/2 頭雌) |
| Grn KO | PR006A | $9.7 \times 10^{10}$ vg ( $2.4 \times 10^{11}$ vg/g 脳) | 5 頭(3 頭雄/2 頭雌) |

## 【0185】

予期しない試験の逸脱（遺伝子型決定の誤り及び動物の早期喪失）により、PRV-2019-002試験（14ヵ月コホート）は、計画された $n=3$ の代わりに、賦形剤処置群において1頭のマウスのみが登録された。試料数が少ないことで統計解析が不可能であるため、本試験はここでのさらなる考察から除外する。しかしながら、本試験からの所見は、試験PRV-2018-027からの所見に類似していた。

## 【0186】

生体内分布及びプログラニュリン発現：現在の米国 Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) / Office of Tissues and Advanced Therapies (OTAT) のPCR感受性についての基準を満たすqPCRアッセイを使用して、ベクターゲノムの存在を測定することによって、生体内分布を決定した（ $1 \mu\text{g}$  のゲノムDNAあたり50超のベクターゲノムを陽性として定義した）。PR006Aを受けたすべてのマウスは、大脳皮質及び脊髄におけるベクターゲノムについて陽性であり、これは、ICV投与が、脳及びCNSにおけるPR006A形質導入を成功裏にもたらすことを示す（図59A）。ICV PR006Aは、Grn KOマウスのCNS（脳、脊髄）において顕著なレベルのヒトプログラニュリンタンパク質をもたらしたが、予想されるように、賦形剤を受けたマウスにおいては、ヒトプログラニュリンは検出できなかった（図59B）。プログラニュリンは主に分泌タンパク質であるため、CSFにおける発現は、脳内のタンパク質産生の代理物と見なされ得、CSFプログラニュリンレベルが減少したFTD-GRN患者の潜在的な翻訳エンドポイントを表す。PR006A処置のマウスのCSFにおいてヒトプログラニュリンを検出することができたが、試料量が少なく、マウスにおいて十分な量のCSFを得る技術的限界があるため、CSFプログラニュリンレベルの測定は、アッセイの定量の下限（LLOQ）を下回った（図59C）。

## 【0187】

ICV投与はまた、肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓、及び生殖腺を含む末梢組織において、広範なベクターゲノムの存在及びプログラニュリンタンパク質レベルをもたらした（図62A～図62B）。さらに、PR006A処置のGrn KOマウスの血漿において顕著なレベルのヒトプログラニュリンが検出可能であった。予想されるように、ヒトプログラニュリンは、賦形剤処置のGrn KOマウスにおいて検出されなかった。

## 【0188】

リポフスチンの蓄積：有糸分裂後の細胞のリソソームにおいて経時的に徐々に蓄積し、リソソーム機能不全の指標である、電子密度の高い自己蛍光材料であるニューロンリポフスチンの蓄積は、Grn KOマウスの特徴的な年齢依存性の表現型である。リポフスチンの蓄積を、隣接する脳切片において、以下の2つの独立した方法を使用して評価した。（1）より臨床的なアプローチにおいて、脳におけるリポフスチンの蓄積を盲検病理学者によって0（リポフスチンは観察されない）～4（広範なリポフスチンの蓄積）の尺度で点数化し、（2）より定量的なアプローチにおいて、リポフスチンの自己蛍光を免疫組織化学（IHC）によって検出し、自動的に定量化した。Grn KOマウスは、脳全体にわたって実質的なリポフスチン症を呈し、ICV PR006A処置は、大脳皮質、海馬

、及び視床におけるリポフスチン点数の重症度を減少させた（図59D）。IHC画像からのリポフスチンの蓄積の定量化は、3つの脳領域すべてにおいてPR006A処置でリポフスチン症の減少も検出した。ユビキチン陽性の包含は、年齢依存的な様式でGrn KOマウスモデルにおいても蓄積するFTD-GRN患者の決定的な病理学的特徴であるため、IHCを実施し、目的の脳領域（大脳皮質、海馬、視床）において定量化して、ユビキチンの蓄積を評価した。PR006A処置は、Grn KOマウスにおけるユビキチンの蓄積を顕著に減少させた（図59E）。これらの所見は、PR006Aが、FTD-GRNのGrn KOマウスモデルにおけるリソソーム機能障害を改善することを示唆する。

#### 【0189】

神経炎症：慢性CNS炎症は、年齢依存的な様式でGrn KOマウスにおいて再現されるFTD-GRNを有する患者の脳における病理学的特徴である。プログラニューリンは、FTD-GRNのマウスモデルにおいて抗炎症効果を有し、プログラニューリンの喪失は、TNF $\alpha$ を含む炎症促進サイトカインの上方制御につながる。この試験において、PR006Aでの処置は、老齢Grn KOマウスにおける炎症マーカーレベルを抑制した。ICV PR006Aは、大脳皮質における、小膠細胞のマーカーである、炎症促進サイトカインTnf（TNF $\alpha$ ）及びCd68（CD68）の遺伝子発現を減少させた（図59F）。また、Mesoscale Discoveryマウス炎症促進サイトカインアッセイを使用して、PR006A処置のGrn KOマウス由来の大脳皮質試料におけるTNF $\alpha$ タンパク質レベルも減少した（図59G）。神経炎症をさらに評価するために、Iba1、小膠細胞症のマーカー、及びGFAP、アストロサイトーシスのマーカーについて免疫組織化学検査（IHC）を行い、目的の脳領域（大脳皮質、海馬、視床）において定量化した。PR006A処置は、Grn KOマウスにおいて小膠細胞症（Iba1）の減少の傾向をもたらしたが、アストロサイトーシス（GFAP）には影響を与えなかった（図59H、図59I）。総合すると、これらの結果は、PR006A処置がFTD-GRNの老齢Grn KOマウスモデルにおける神経炎症を減少させることを示す。

#### 【0190】

組織病理：これらの試験から得られたすべてのマウスの脳、胸髄、肝臓、心臓、脾臓、肺、及び腎臓のヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色の盲検化された委員会認定病理学者による徹底的な組織病理学的分析により、PR006A処置に関連する有害事象が認められなかった。PR006AのGrn KOマウスへの投与は、髄質及び脳橋におけるニューロン壊死の頻度及び／または重症度点数の減少を含む、モデルに特徴的である所見の発生率及び／または重症度の減少をもたらされた。さらに、PR006A処置で、胸髄における軸索変性の発生率と重症度の両方が減少した。これらの所見は、以下の毒物セクションで詳細に考察されている。

#### 【0191】

結論： $9.7 \times 10^{10}$  vg ( $2.4 \times 10^{11}$  vg/g 脳) の用量でのICV PR006Aは、老齢Grn KOマウスにおいて、脳及び末梢組織全体にわたって広範なベクターゲノムの存在をもたらした。PR006A処置は、全体的なプログラニューリン発現を増加させた。さらに、PR006Aは、Grn KOマウスモデル及びFTD-GRNを有する患者の両方で発生することが知られている病態である、脳におけるリポフスチン及びユビキチンの蓄積を減少させた。PR006Aはまた、慢性CNS炎症を示す表現型である、大脳皮質における炎症促進サイトカイン及び免疫細胞活性化の発現を低下させた。

#### 【0192】

成体Grnノックアウトマウスにおける用量範囲の有効性

PR006Aの有効用量をさらに評価するために、成体Grn KOマウスにおけるより大きな用量範囲の試験を実施した。PRV-2019-004において、 $10 \mu\text{l}$ の賦形剤（意図された臨床ピヒクル、 $20 \text{ mM}$ のTris（pH 8.0）、 $200 \text{ mM}$ のNaCl、及び $1 \text{ mM}$ のMgCl<sub>2</sub> +  $0.001\%$ のプルロニックF68）またはPR006Aを、ICVを介して4か月齢の動物に送達した。これらの成体マウスを、老齢Grn

10

20

30

40

50

KOマウスの代わりに使用した。それは、後者は、用量範囲の試験を実施するのに十分な数では利用できなかったからである。成体Grn KOマウスは、老齢マウスよりも穏やかな表現型を有するが、それらは依然としてリソソーム欠損及び神経炎症の変化を呈し、したがって、PR006Aの有効用量範囲を評価するのに適切である。広範囲のウイルス用量にわたるPR006Aの有効性を評価するために、PR006Aを、試験に使用されるウイルスロットの注射量制約及び物理力価に起因する、試験時点で達成可能な最高用量である $1.1 \times 10^{11} \text{vg}$  ( $2.7 \times 10^{11} \text{vg/g 脳}$ )、 $1.1 \times 10^{10} \text{vg}$  ( $2.7 \times 10^{10} \text{vg/g 脳}$ ) の中程度用量、または $1.1 \times 10^9 \text{vg}$  ( $2.7 \times 10^9 \text{vg/g 脳}$ ) の低用量で、各用量にわたる完全対数差で投与した。実験設計の詳細を図63に示す。

#### 【0193】

群あたり10頭のマウス（4頭雄／6頭雌）で、以下のPR006Aの3回用量を評価した。

【表8】

| モデル    | ICV    | ICV 用量                                                                | N               |
|--------|--------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Grn KO | 賦形剤    | 該当なし                                                                  | 10 頭(4 頭雄/6 頭雌) |
| Grn KO | PR006A | $1.1 \times 10^9 \text{vg}$ ( $2.7 \times 10^9 \text{vg/g 脳}$ )       | 10 頭(4 頭雄/6 頭雌) |
| Grn KO | PR006A | $1.1 \times 10^{10} \text{vg}$ ( $2.7 \times 10^{10} \text{vg/g 脳}$ ) | 10 頭(4 頭雄/6 頭雌) |
| Grn KO | PR006A | $1.1 \times 10^{11} \text{vg}$ ( $2.7 \times 10^{11} \text{vg/g 脳}$ ) | 10 頭(4 頭雄/6 頭雌) |

#### 【0194】

この試験において、野生型(WT) Grn対立遺伝子を有するGrn KOマウス（7か月齢C57BL／6J）と同じ背景株の齢適合マウスが、選択された有効性エンドポイントについての対照として機能した。

【表9】

| モデル          | ICV  | ICV 用量 | N               |
|--------------|------|--------|-----------------|
| WT(C57BL/6J) | 該当なし | 該当なし   | 10 頭(5 頭雄/5 頭雌) |

#### 【0195】

生体内分布及びプログラニューリン発現：現在の米国Food and Drug Administration CBER／OTATのPCR感受性についての基準を満たすqPCRアッセイを使用して、ベクターゲノムの存在を測定することによって、生体内分布を決定した（ゲノムDNAの $\mu\text{g}$ あたり50超のベクターゲノムを陽性として定義した）。PR006Aを受けたマウスは、用量依存的に大脳皮質及び脊髄におけるベクターゲノムについて陽性であり、ICV投与がCNSにおけるPR006Aの形質導入を成功裏にもたらすことを示した（図53A）。PR006AをコードするGRNのqRT-PCR分析は、PR006AのICV投薬が大脳皮質におけるヒトGRN mRNA発現の用量依存的誘導をもたらしたことを明らかにした（図53B）。PR006A処置は、脳及び脊髄におけるヒトプログラニューリンタンパク質のレベルを増加させた（図53C）。脳組織において、ヒトプログラニューリンレベルを検出し、PR006Aの最高用量で定量化し

た。低用量では、プログラニュリンレベルは、脳における高いバックグラウンドのためにアッセイの検出の限界を下回った。しかしながら、用量間の対数倍の差に基づいて、より低い用量での予想されるプログラニュリンレベルの比例推定は、脳組織におけるアッセイの定量の下限（LLOQ）をはるかに下回るであろう。内因性マウスプログラニュリンのレベルを、野生型（WT）Grn対立遺伝子を有する齢及び株適合マウスにおいて測定し、大脳皮質及び脊髄の両方において、PR006A処置のGrn KOマウスにおけるヒトプログラニュリンのレベルは、任意の用量でWTマウスにおける内因性プログラニュリンのレベルを超えなかった。非種間交差反応性抗プログラニュリン抗体を採用した異なる検出アッセイを使用して、ヒト及びマウスプログラニュリンを測定したため、絶対数を正確に比較することはできない。

10

【0196】

PR006A投与はまた、肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓、及び生殖腺を含む末梢組織において、広範なベクターゲノムの存在及びプログラニュリタンパク質レベルをもたらした（図53D、図53E）。

【0197】

血漿において、PR006A処置のGrn KOマウスにおいて、すべての用量レベルで顕著なレベルのヒトプログラニュリンが検出された（図53F）。予想通り、ヒトプログラニュリンは、賦形剤処置のGrn KOマウスにおいて検出されなかった。中程度用量のPR006Aで処置した動物におけるヒトプログラニュリンのレベルは、WT Grn対立遺伝子を有するマウスにおいて測定したマウスプログラニュリンのレベルと同じ範囲であった。非種間交差反応性抗プログラニュリン抗体を採用した異なる検出アッセイを使用して、ヒト及びマウスプログラニュリンを測定したため、絶対数を正確に比較することはできない。

20

【0198】

リポフスチンの蓄積：リポフスチンの蓄積を、隣接する脳切片において、以下の2つの独立した方法を使用して評価した。（1）より臨床的なアプローチにおいて、脳におけるリポフスチンの蓄積を盲検病理学者によって0（リポフスチンは観察されない）～4（広範なりポフスチンの蓄積）の尺度で点数化し、（2）より定量的なアプローチにおいて、リポフスチンの自己蛍光をIHCによって検出し、自動的に定量化した。Grn KOマウスは脳全体にわたってリポフスチン症を呈したが、WTマウスは脳において検出可能なリポフスチンを有しなかった（図53G）。PR006AのICV投与は、Grn KOマウスの脳における細胞内リポフスチンの蓄積の重症度点数の用量依存的減少をもたらした（図53G）。リポフスチン症の減少に対するPR006Aの有効性は、海馬及び視床を含むFTD-GRNのGrn KOマウスモデルにおいて最も堅牢なりポフスチン症表現型を示す脳領域において最も容易に定量化することができる。病理学者によるリポフスチン点数化に加えて、リポフスチン症を定量的に評価するために目的の脳領域（すなわち、大脳皮質、海馬、視床）において実施されたIHCは、大脳皮質及び視床脳領域におけるリポフスチンの蓄積の量の用量依存的減少を検出し、PR006Aの中程度及び高用量で顕著な減少が生じた。Grn KOマウスにおいて生じるさらなるFTD-GRN関連病理である、脳におけるユビキチンの蓄積を評価するためにもIHCを実施した。WTマウスと比較して、Grn KOマウスは、脳全体にわたってユビキチンの増加を呈した（図53H）。PR006Aは、すべて3回用量において、ユビキチン免疫反応性物体サイズをほぼWTレベルまで顕著に減少させた（図53H）。

30

40

【0199】

神経炎症：PR006Aでの処置は、成体Grn KOマウスの脳における炎症マーカーレベルを抑制した。ICV PR006Aは、 $2.7 \times 10^9$  vg/g脳～ $2.7 \times 10^{11}$  vg/g脳の用量範囲にわたって、小膠細胞のマーカーである、大脳皮質における炎症促進サイトカインTnf（TNF $\alpha$ ）及びCd68（CD68）の遺伝子発現を減少させた（図53I）。公表されているデータに一致して、野生型Grn対立遺伝子を有する齢適合マウスと比較して、賦形剤処置のGrn KOマウスにおけるこれらの神経炎症マ

50

ーカーの遺伝子発現の増加を観察した（図53I）。PRV-2018-027からの18か月齢のGrn KOマウスにおける観察及び文献におけるTNF $\alpha$ 異常の報告とは対照的に、7か月齢の成体の賦形剤処置のGrn KOマウスにおいて大脳皮質TNF $\alpha$ タンパク質レベルの堅牢な増加はなく、加えて、Grn KOマウスにおけるPR006Aでの顕著な変化は観察されなかった。これらの所見は、堅牢な神経炎症の表現型が、12～24か月齢までGrn KOマウスモデルでは生じないという、以前に発表された所見と一致する。免疫組織化学検査（IHC）を実施し、目的の脳領域（大脳皮質、海馬、及び視床）において定量化して、小膠細胞症のマーカーであるIba1、及びアストロサイトーシスのマーカーであるGFAPについて染色することによって、ニューロンの炎症をさらに評価した。WTマウスと比較して、Grn KOマウスにおける脳全体にわたって小膠細胞症（Iba1）及びアストロサイトーシス（GFAP）の顕著な増加があった（図53J～図53K）。PR006A処置は、すべて3回用量で顕著に小膠細胞症（Iba1）を減少させた（図53J）。PR006Aの中程度用量では星状細胞症（GFAP）の減少傾向が観察され、視床脳領域においてPR006Aの高用量でアストロサイトーシス（GFAP）の顕著な減少が観察された（図53K）。

#### 【0200】

Grn KOモデルの表現型の多くは、晩年に生じるが、研究は、Grn KOマウスは、早ければ4か月齢においても、リソソーム及び免疫関連経路の変化を含む、広範囲にわたる遺伝子発現変化を呈することを報告している。したがって、上記の標的化されたqRT-PCR分析に加えて、mRNAレベルの変化を評価するためのトランスクリプトミクスアプローチを用いた。それは高感度のハイスループット技術（RNA配列決定）で全般的に評価でき、必要する試料材料を最小限にすることができる。我々は、大脳皮質上でRNA配列決定を行い、遺伝子セット変異分析（GSVA）を使用して（Hanzelmann et al., BMC Bioinformatics 14, 7 (2013)）、7か月齢の賦形剤処置のGrn KOマウスにおいて、どの遺伝子発現経路が同じ株の年齢適合WTマウスと比較して変化しているかを決定した。以前に発表された研究において報告されたように、Grnを欠くマウスにおけるリソソーム及び免疫関連経路の欠損を確認した。GO TERM（GO:0005773）「液胞」遺伝子のサブセット（Lui et al (Cell 165, 921-935 (2016))）によって記載されるGrn KOマウスにおいて調節不全であると報告された4つの遺伝子を含む）、「リソソーム遺伝子」セット（Evers et al (Cell Reports 20, 2565-2574 (2017))）によって記載されるGrn KOマウスにおいて調節不全であることが示された25個のリソソーム関連遺伝子のサブセット）、及びGene Set Enrichment Analysis HALLMARKデータベースからの「補体」遺伝子セット（自然免疫系の一部である補体系の構成要素をコードする遺伝子を含む）において顕著な変化が報告された。次いで、これらの遺伝子セットの活性レベルを測定し、PR006A処置と比較した（図53L～図53N）。PR006Aでの処置は、Grn KOマウスにおいて観察された遺伝子セット欠損を用量依存的に逆転させた。

#### 【0201】

組織病理：これらの試験から得られたすべてのマウスの脳、胸髄、肝臓、心臓、脾臓、肺、腎臓、及び生殖腺のヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色に対する盲検化された委員会認定病理学者によって徹底的な組織病理学的分析が実施され、PR006A処置に関連する毒性の証拠は発見されなかった。毒性分析の詳細は、以下のセクションに記載されている。

#### 【0202】

結論： $2.7 \times 10^9$  vg/g 脳～ $2.7 \times 10^{11}$  vg/g 脳の範囲の用量でのICV PR006Aは、用量依存的に、脳及び末梢組織全体にわたって広範なベクターゲノムの存在をもたらした。PR006A処置はまた、CNSにおけるプログランニューリンmRNA及びタンパク質の産生をもたらした。PR006Aとリポフスチン症、リソソーム機能不全の読み出しの減少との間の明確な用量応答関係が、複数の脳領域にわたって観察された

。P R 0 0 6 A の中程度及び最高用量レベルでは、リポフスチン症の堅牢で統計学的に有意な減少が観察された。すべてのP R 0 0 6 A の用量は、脳におけるユビキチンの蓄積を減少させた。2.7 × 10<sup>9</sup> v g / g 脳の最低用量で始まり、P R 0 0 6 A は、RNA 及びタンパク質レベルでの脳における炎症促進マーカーの発現を減少させた。

#### 【0203】

要約：インビボ非臨床試験

P R 0 0 6 A は、G r n K O マウスを効果的に形質導入し、導入遺伝子の堅牢で用量依存的な生体内分布及びC N S におけるプログラニューリンmRNA 及びタンパク質の産生をもたらした。P R 0 0 6 A は、リソソーム及び神経炎症の経路における遺伝子発現異常を用量依存的に逆転させた。P R 0 0 6 A は、リポフスチン症、ユビキチンの蓄積、及び小膠細胞症を含む、このF T D - G R N マウスモデルの脳において発生する多くの表現型を減少させた。用量範囲の試験において、2.7 × 10<sup>9</sup> v g / g 脳のP R 0 0 6 A の最低用量は、大脳皮質における炎症マーカーの発現を顕著に抑制した。中程度用量の2.7 × 10<sup>10</sup> v g / g 脳のP R 0 0 6 A は、堅牢で統計学的に有意な方法で、リソソーム欠損（例えば、リポフスチン症）と神経炎症の両方を改善した。高用量の2.7 × 10<sup>11</sup> v g / g 脳のP R 0 0 6 A は、毒性の証拠なしに、プログラニューリン発現をさらに増加させた。

表7：生体内分布の要約

#### 【表10】

| 試験           | 用量                                | 大脳皮質 | 脊髄 | 肝臓 | 脾臓 | 心臓 | 腎臓 | 肺 | 生殖腺 |
|--------------|-----------------------------------|------|----|----|----|----|----|---|-----|
| PRV-2018-027 | 9.7 × 10 <sup>10</sup> v g PR006A | +    | +  | +  | +  | +  | +  | + | +   |
| PRV-2019-004 | 1.1 × 10 <sup>9</sup> v g PR006A  | +    | +  | +  | +  | +  | +  | + | +   |
|              | 1.1 × 10 <sup>10</sup> v g PR006A | +    | +  | +  | +  | +  | +  | + | +   |
|              | 1.1 × 10 <sup>11</sup> v g PR006A | +    | +  | +  | +  | +  | +  | + | +   |

陽性の生体内分布は50 v g / μ g 超のゲノムDNAとして定義される。

#### 【0204】

安全性薬理学

これらの試験を通じて、試験品に起因する可能性のある有害事象はなかった。P R V - 2 0 1 8 - 0 2 7、P R V - 2 0 1 9 - 0 0 2、及びP R V - 2 0 1 9 - 0 0 4 における動物の生存中及び組織病理学的分析からの安全性所見が、以下のセクションで考察される。

#### 【0205】

単回投与毒性

P R 0 0 6 A での一連の非臨床試験は、マウス及びサルにおける安全性エンドポイントを調査して実施した。3つの試験は、G r n K O マウスモデルにおいて実施され、エンドポイントは、神経病理学的評価を含み、脳室内（I C V）注射を介したP R 0 0 6 A 投与から結果として生じる保護活性及び潜在的毒性の両方を評価した。I C M 投与は、マウスにおいてはより技術的に困難である。これらのマウスモデルは、患者がプログラニューリンレベルの低下をもたらすG R N 遺伝子における変異を有するF T D - G R N の代表的なものである。カニクイザルにおいて、P R 0 0 6 A を大槽（I C M）に注射したパイロット試験の一部として、神経病理検査も実施した。G L P 試験は、P R 0 0 6 A がI C M に送達されたカニクイザルにおいて実施され、サルは7日目、30日目、または183日目

に 殺された。G L P 試験は、組織の完全なリストに対する解剖学的病理学的評価に加えて、臨床エンドポイントの包括的リストを組み込んだ。診療所における単回投与をサポートするために、以下の単回投与試験が実施された。

【0206】

老齢 F T D - G R N マウスモデルにおける最大用量の P R 0 0 6 A ( P R V - 2 0 1 8 - 0 2 7 及び P R V - 2 0 1 9 - 0 0 2 )

G r n K O マウスにおけるこれらの有効性試験の一部として、賦形剤または P R 0 0 6 A のいずれかで I C V を処置したマウスにおいて神経病理学的評価を行った。G r n K O マウスは、プログラニューリンの完全な喪失を有し、リソソームの変化、ニューロンのリポフスチンの蓄積、小膠細胞症、及び神経炎症を含む年齢依存性の表現型により、F T D - G R N のモデルとして広く使用されている。試験の薬理学部分の側面は、上記のセクションに要約され、本試験において評価された毒物学関連エンドポイントは、以下に要約される。老齢 G r n K O マウスモデルにおいて、P R 0 0 6 A の 2 つの試験を実施した。第 1 の試験 ( P R V - 2 0 1 8 - 0 2 7 ) において、9 頭の 1 6 か月齢の雌雄混合 G r n K O マウスが、P R 0 0 6 A または賦形剤のいずれかの I C V 投与を受けた。投与の 9 週間後に動物を 殺した。以下の単一の P R 0 0 6 A 用量群をこの試験に含めた。全用量  $9.7 \times 10^{10} \text{ v g}$  ( $2.4 \times 10^{11} \text{ v g} / \text{g 脳}$ ) について  $10 \mu \text{ l}$  の未希釈ウイルス。対照群を賦形剤  $10 \mu \text{ l}$  で処置した。

表 8 : P R V - 2 0 1 8 - 0 2 7 の試験設計

【表 11】

| モデル       | 処置     | RoA (投薬体積)                | PR006A 用量 (v g / g 脳) | 総 PR006A 用量 (v g)    | マウス数              | 処置後の剖検 |
|-----------|--------|---------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|--------|
| G r n K O | 賦形剤    | ICV (10 $\mu \text{ l}$ ) | 0                     | 0                    | 4 頭 (2 頭雄 / 2 頭雌) | 9 週    |
| G r n K O | PR006A | ICV (10 $\mu \text{ l}$ ) | $2.4 \times 10^{11}$  | $9.7 \times 10^{10}$ | 5 頭 (3 頭雄 / 2 頭雌) | 9 週    |

R O A : 投与経路

【0207】

生体内分布、リソソーム変化、及び炎症マーカーなどの様々な死後エンドポイントを、この試験プロトコルの一部として評価した (上記セクションを参照)。また、動物の生存を 1 日 2 回確認し、体重を 1 日 1 回測定した。処置の 2 か月後に安楽死させた後、標的組織を採取し、冷却された 4 % パラホルムアルデヒド中に落として固定し、4 °C で保管した。試験を完了した 8 頭の動物由来の組織の不要部分を切り落とし、処理し、パラフィンブロックに包埋した。次いで、これらを、約  $5 \mu \text{ m}$  に切片化し、ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) で染色し、理事会認定の獣医病理学者によって検査した。

【0208】

この試験の間、1 頭のマウスが処置群で早期に死亡し、剖検中、死亡動物について異常は記録されておらず、したがって、死因は分かっていない。他の死亡または異常は観察されなかった。すべての処置群は、体重に関して同様に追跡され、有意差は存在しなかった。

【0209】

病理組織学的検査では、P R 0 0 6 A 関連の有害所見はなかった。G r n K O マウスにおける予想される所見と一致して、脳におけるリポフスチンの蓄積が広範に存在した。P R 0 0 6 A 処置の動物において、脳のすべての領域におけるリポフスチンの蓄積についての点数重症度の減少があった。形態変化もまた、P R 0 0 6 A 処置で、特に髄質及び脳橋におけるニューロン壊死に関して、頻度及び / または重症度点数においてわずかな減少を示すようであった。しかしながら、形態変化におけるこれらの傾向は、リポフスチン点

数の傾向ほど一貫していなかった。

#### 【0210】

胸髄では軸索変性があり、ごく稀に（各群4頭のうち1匹）最小限のニューロン壊死が認められた。PR006Aで処置した動物において、軸索変性の発生率及び重症度の両方において軽微な減少があった。

#### 【0211】

Grnホモ接合性ノックアウトマウスにおそらく関連する以下の所見は、PR006Aで処置した動物において、発生率及び／または重症度が低下しているようであった：腎臓の髄質における拡張した尿細管、腎臓における糸球体症、及び肺における異物（通常、気道内で、異物巨細胞及び／またはマクロファージに頻繁に関連する、線状、無細胞、暗いピンク色の構造を特徴とする）。より確実な結論を得るためには動物のより大きなコホートが必要であろう。

#### 【0212】

観察された他のすべての組織病理学的所見は、賦形剤及び試験品処置の動物において偶発的及び／または同様の発生率及び重症度であると見なされ、したがって、PR006Aの投与とは無関係であると見なされた。

#### 【0213】

第2の試験（PRV-2019-002）では、5頭の14か月齢の雌雄混合Grn KOマウスが、PR006Aまたは賦形剤のいずれかのICV投与を受けた。投与の8週間後に動物を殺した。単一のPR006A用量群をこの試験に含めた：全用量  $9.7 \times 10^{10} \text{ vg}$  ( $2.4 \times 10^{11} \text{ vg/g 脳}$ ) について  $10 \mu\text{l}$  の未希釈ウイルス、対照群を賦形剤  $10 \mu\text{l}$  で処置した。

表9：PRV-2019-002の試験設計

【表12】

| モデル       | 処置     | RoA(投薬<br>体積)           | PR006A 用<br>量(vg/g 脳) | 総 PR006A<br>用量(vg)   | マウス数                    | 処置後の剖<br>検 |
|-----------|--------|-------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|------------|
| Grn<br>KO | 賦形剤    | ICV( $10 \mu\text{l}$ ) | 0                     | 0                    | 2 頭(0 頭<br>雄/2 頭<br>雌)* | 8 週        |
| Grn<br>KO | PR006A | ICV( $10 \mu\text{l}$ ) | $2.4 \times 10^{11}$  | $9.7 \times 10^{10}$ | 3 頭(1 頭<br>雄/2 頭雌)      | 8 週        |

\* 研究終了時の遺伝子型の結果は、賦形剤群からの  $n = 1$  の動物が、予想される Grn ホモ接合 KO の代わりに Grn ヘテロ接合 KO であることを確認した。

#### 【0214】

動物は、PRV-2018-027 試験と同一の方法で分析された。動物の生存を1日2回確認し、体重を1日1回測定した。処置の2か月後に安楽死させた後、標的組織を採取し、冷却された4%パラホルムアルデヒド中に落として固定し、評価まで4℃で保管した。

#### 【0215】

CNSにおいて、Grn KOマウスにおいて以前に観察されたものと一致する所見が、脳内で観察された(Yin et al., J Exp Med 207(1):117-128(2010))。具体的には、脳全体にわたってリポフスチンの蓄積が広く増加していた。稀に最小限のニューロン壊死も観察された(1頭の未処置の早期死亡動物及び1頭の賦形剤動物において)。

#### 【0216】

試料数が少ないため、処置に関連する所見において一貫した傾向を示すことはできなかった。試験品(PR006A)と賦形剤との間に応答において一貫した差はなかった。

## 【0217】

非CNS組織について、Grn KOマウスの表現型と一致すると考えられる所見が、腎臓（単核炎症性細胞の尿細管拡張及び浸潤）及び肝臓（クッパー細胞／類洞並列細胞、及びクッパー細胞小肉芽腫の空胞化）において観察された（Yin et al., J Exp Med 2007 (1) : 117-128 (2010)）。

## 【0218】

手術を受け、試験に登録されたすべての動物において、「糸球体症」の所見が観察された。標準的な、負荷されていないGrnノックアウトマウスに関連する変化としてこの所見の発表された報告が見出されなかったが、ある研究は、高ホモシステイン血症を誘導し、糸球体基底膜の肥厚及び有足細胞足突起の消失を発症させる食事処置されたプログラニュリン欠損マウスを実証した（Fu et al., Hypertension 69 (2) : 259-266 (2017)）。

## 【0219】

他のすべての所見は、実験室マウスにおいて一般的に観察された所見と一致した。試料数が少ないため、処置に関連する決定的な差異は示されなかった。

## 【0220】

成体FTD-GRNマウスモデルにおける用量範囲PR006A（PRV-2019-004）

PR006Aの安全性をさらに評価するために、成体Grn KOマウスにおけるより大きな用量範囲の試験を実施した。合計40頭の雌雄混合マウスを4つの群に分け、左脳半球への単回片側ICV注射によって、賦形剤または3つの用量のPR006Aのうちの1つのいずれかを投与し、すべての動物は、処置群に関係なく、10μlの総用量体積を受けた。マウスを4か月齢で処置し、処置後3か月で安楽死させた。約7か月まで齢をとった未処置C57BL/6Jマウス（同じバックグラウンド系統）を含む追加の野生型（WT）対照群も安楽死させ、同様の剖検に供した。

## 【0221】

以下の試験設計に従って試験を実施した：

表10：PRV-2019-004の試験設計

## 【表13】

| 群    | モデル              | 処置     | RoA<br>(投薬体積) | PR006Aの<br>用量<br>(vg/g 脳) | 総<br>PR006A<br>用量(vg) | マウス数         | 処置後の<br>剖検 |
|------|------------------|--------|---------------|---------------------------|-----------------------|--------------|------------|
| 1    | Grn KO           | 賦形剤    | ICV(10μl)     | 0                         | 0                     | 10頭(4頭雄/6頭雌) | 13週目       |
| 2    | Grn KO           | PR006A | ICV(10μl)     | $2.7 \times 10^{11}$      | $1.1 \times 10^{11}$  | 10頭(4頭雄/6頭雌) | 13週目       |
| 3    | Grn KO           | PR006A | ICV(10μl)     | $2.7 \times 10^{10}$      | $1.1 \times 10^{10}$  | 10頭(4頭雄/6頭雌) | 13週目       |
| 4    | Grn KO           | PR006A | ICV(10μl)     | $2.7 \times 10^9$         | $1.1 \times 10^9$     | 10頭(4頭雄/6頭雌) | 13週目       |
| 該当なし | WT<br>(C57BL/6J) | なし     | 該当なし          | 0                         | 0                     | 10頭(5頭雄/5頭雌) | 該当なし       |

## 【0222】

試験中、動物は、1日2回生存を確認し、1週間に1回計量した。処置の3か月後にマウスを安楽死させ、種々の死後評価を行い、PR006Aの有効性を評価した（上記セク

ションを参照)。さらに、脳、胸髄、肝臓、心臓、脾臓、肺、腎臓、及び生殖腺由来のH & Eで染色された切片を、理事会認定の病理学者によって評価した。

#### 【0223】

組織病理学的検査では、処置群にかかわらず、いずれのマウスにも有害なP R O O 6 A関連の所見はなかった。

#### 【0224】

大脳皮質、大脳核、海馬、視床／視床下部、小脳及び脳幹（特に脳橋および髄質）の脳の様々な領域における細胞内リポフスチンの蓄積など、G r n K Oマウスモデルの表現型と一致する所見があった。H & E染色された切片における形態変化の明確な証拠（ニューロンの空胞化及び神経膠症）は観察されなかった。リポフスチン色素の蓄積が、容易に検出可能な形態変化の前に認められ得、したがって、有効性の適切なバイオマーカーとして機能する。すべてのG r nホモ接合K O群はリポフスチンの蓄積を示したが、処置群にわたってこの所見の重症度に差異があった。リポフスチンの蓄積についてのより高い点数の頻度は、賦形剤で処置した動物の群（群1）において最大であった。P R O O 6 Aで処置した動物のうち、群4（低用量P R O O 6 A、 $2.7 \times 10^9$  v g / g 脳）、続いて群3（中程度用量P R O O 6 A、 $2.7 \times 10^{10}$  v g / g 脳）においてより高い点数の頻度が観察された。群2（高用量P R O O 6 A、 $2.7 \times 10^{11}$  v g / g 脳）で最小重症度点数を観察した。これらの所見は、G r nホモ接合性ノックアウトマウスの脳における細胞内リポフスチンの蓄積の重症度点数の用量依存的減少を示す。他のすべての組織病理学的所見は、賦形剤及び試験品処置の動物において偶発的及び／または同様の発生率及び重症度であると見なされ、したがって、P R O O 6 Aの投与とは無関係であると見なされた。

#### 【0225】

サルにおけるG L P単回投与試験（P R V - 2 0 1 8 - 0 2 8）

##### 試験設計

このG L P試験の目的は、投与の6日後、29日後、または182日後の観察期間で、カニクイザルにI C M注射を介して1回投与した場合の試験品、P R O O 6 Aの毒性及び生体内分布を評価することであり、試験7日目、30日目、または183日目に動物を殺した。この研究は、2つの用量レベルを評価するように設計されており、最高用量は、1.2 mL体積（投与の経験があった最高体積）の未希釈のP R O O 6 Aで達成可能な最大実行可能用量であり、低用量は、高用量よりも1ログ単位低い用量に相当する。用量は、 $4.8 \times 10^{11}$  v g の低用量、及び $4.8 \times 10^{12}$  v g の高用量に等しく、本試験で使用されるカニクイザル、N H P種の脳重量推定値74 gであり、これは、約 $6.5 \times 10^9$  v g / g 脳及び $6.5 \times 10^{10}$  v g / g 脳となる。この試験は、動物が1.2 mLの賦形剤のみ（20 mMのT r i s（p H 8.0）、200 mMのN a C l、及び1 mMのM g C l<sub>2</sub> + 0.001% [w / v] のプルロニックF 68）を受ける対照群も含む。この試験は、雄及び雌のカニクイザルマカクの両方を利用した。7日目の群は、最高用量での1頭の雌を含み、早期毒性のためのセンチネルとして設計され、残りの2つの時点（30日目及び183日目）には、各用量での2頭の雄と1頭の雌を含んだ。複数の脳領域由来の試料に加えて、q P C R分析のために末梢組織試料を収集した。q P C Rで陽性であったすべての試料を、導入遺伝子発現について分析した。この試験の設計の表形式の要約を表11に示す。

表11：G L P N H P試験P R V - 2 0 1 8 - 0 2 8の概要

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

|               |                                                                                           |                      |              |               |                |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------|---------------|----------------|
| 目的            | NHP における PR006A の耐性及び生体内分布を評価する                                                           |                      |              |               |                |
| 規制コンプライアンス    | GLP                                                                                       |                      |              |               |                |
| 試験品           | PR006A                                                                                    |                      |              |               |                |
| 動物の総数         | 19 頭のカニクイザル                                                                               |                      |              |               |                |
| 体重 (年齢)       | 2～5kg (25～50 か月)                                                                          |                      |              |               |                |
| 試験設計          | 群の割り当て：                                                                                   |                      |              |               |                |
|               | 群                                                                                         | 用量<br>(vg/g 脳)       | 動物の数         |               |                |
|               |                                                                                           |                      | 剖検<br>(7 日目) | 剖検<br>(30 日目) | 剖検<br>(183 日目) |
|               |                                                                                           |                      | 0            | 2 頭雄/1 頭雌     | 2 頭雄/1 頭雌      |
|               |                                                                                           |                      | 0            | 2 頭雄/1 頭雌     | 2 頭雄/1 頭雌      |
|               | 3                                                                                         | $6.5 \times 10^{10}$ | 1F           | 2 頭雄/1 頭雌     | 2 頭雄/1 頭雌      |
| 投与経路及び頻度      | ポリプロピレン 1～3cc シリンジ及び脊椎ニードル (Pencan 25Gx2.5cm BBraun) を使用した大槽内、最大速度 0.5cc/分 で送達される単回低速ボーラス |                      |              |               |                |
| 製剤            | $4.01 \times 10^{12}$ vg/mL の濃度で提供される投薬溶液                                                 |                      |              |               |                |
| 臨床兆候          | 毎日 (食べ物の消費を含む)、毎週の詳細な観察                                                                   |                      |              |               |                |
| 体重            | 毎週                                                                                        |                      |              |               |                |
| 神経、眼科、ECG の検査 | 投与前及び 2 週目及び 26 週目の間に 1 回                                                                 |                      |              |               |                |

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

|               |                                                                                                                   |                                                                                                                                     |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 臨床病理学         | 全群の血液学、臨床化学、凝固パラメータ                                                                                               |                                                                                                                                     |
| 血液学           | 赤血球数<br>ヘモグロビン<br>ヘマトクリット<br>平均血球<br>ヘモグロビン<br>平均血球<br>ヘモグロビン濃度<br>絶対好酸球数<br>絶対好塩基球数                              | 平均血球体積<br>血小板数<br>白血球数<br>絶対好中球数<br>絶対リンパ球数<br>絶対単球数<br>絶対網状赤血球数<br>差次的血球数<br>血液塗抹                                                  |
| 臨床化学          | グルコース<br><br>尿素窒素<br>クレアチニン<br><br>総タンパク質<br><br>アルブミン<br>グロブリン<br>アルブミン／グロブリン比<br>コレステロール<br>総ビリルビン<br>クレアチンキナーゼ | アラニンアミノトランスフェラーゼ<br>アルカリホスファターゼ<br>ガンマグルタミルトランスフェラーゼ<br>アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ<br>カルシウム<br>無機リン<br>ナトリウム<br><br>カリウム<br>塩化物<br>トリグリセリド |
| 凝固物           | プロトロンビン時間<br>フィブリノーゲン<br>活性化部分トロンボプラスチン時間                                                                         |                                                                                                                                     |
| ベクター排出（尿／糞便）  | 屠殺時                                                                                                               |                                                                                                                                     |
| 剖検            | 7日目、30日目、183日目                                                                                                    |                                                                                                                                     |
| 組織病理学のための組織保存 | 各動物由来の以下の組織が、（別段の指示がない限り）10%の中性緩衝ホルマリンに収集されるか、または該当する場合、欠損として記録される。                                               |                                                                                                                                     |

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

|         |                                                                                                     |                  |                   |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|
| 組織保存、続き | 副腎 <sup>a</sup>                                                                                     | 注射部位             | 直腸                |
|         | 大動脈                                                                                                 | (覆っている           | 唾液腺               |
|         | 骨、骨髄を有する大腿                                                                                          | 肌)               | 坐骨神経              |
|         | 骨                                                                                                   | 空腸               | 精囊 <sup>a</sup>   |
|         | 骨、骨髄を有する胸骨                                                                                          | 腎臓 <sup>a</sup>  | 皮膚／皮下組織           |
|         | 脳 <sup>a</sup>                                                                                      | 病変               | 脊髄                |
|         | 盲腸                                                                                                  | 肝臓 <sup>a</sup>  | (頸部、              |
|         | 頸部                                                                                                  | 大きな気管支を          | 胸部、腰部)            |
|         | 結腸                                                                                                  | 有する肺             | 脾臓                |
|         | 十二指腸                                                                                                | リンパ節             | 胃                 |
|         | 精巣上部 <sup>a</sup>                                                                                   | (下顎骨)            | 精巣                |
|         | 食道                                                                                                  | リンパ節             | 胸腺                |
|         | 眼 <sup>b</sup>                                                                                      | (腸間膜)            | 甲状腺               |
|         | 胆嚢                                                                                                  | 乳腺               | 副甲状腺 <sup>a</sup> |
|         | GALT (パイエル                                                                                          | 筋肉、大腿二頭          | 舌                 |
|         | 板)                                                                                                  | 筋                | 気管                |
|         | 心臓 <sup>a</sup>                                                                                     | 視神経              | 膀胱                |
|         | 回腸                                                                                                  | 卵巣 <sup>a</sup>  | 子宮 <sup>a</sup>   |
|         |                                                                                                     | 卵管               | 膣                 |
|         |                                                                                                     | 脾臓               |                   |
|         |                                                                                                     | 下垂体 <sup>a</sup> |                   |
|         |                                                                                                     | 前立腺 <sup>a</sup> |                   |
|         | <sup>a</sup> 臓器(存在する場合)は、計量されるか、または欠損として記録される。<br><sup>b</sup> 修正デビッドソン固定液中に収集され、10%中性緩衝ホルマリンに保存される |                  |                   |
| 組織病理学   | すべての群—すべての組織                                                                                        |                  |                   |
| 生体内分布   | 以下の組織／生体液を、qPCRによって生体内分布について分析する。                                                                   |                  |                   |
|         | 前頭皮質                                                                                                | 肝臓               |                   |
|         | 海馬                                                                                                  | DRG(頸椎)          |                   |
|         | 腹側中脳                                                                                                | DRG(胸部)          |                   |
|         | 脳室周囲灰白質                                                                                             | DRG(腰部)          |                   |
|         | 被殻                                                                                                  | 脊髄(胸部)           |                   |
|         | 精巣                                                                                                  | 脊髄(腰部)           |                   |
|         | 卵巣                                                                                                  | 脊髄(頸部)           |                   |
|         | 腎臓                                                                                                  | 脾臓               |                   |
|         | 胃(幽門)                                                                                               | 心臓(尖部)           |                   |
|         | 血液                                                                                                  | CSF              |                   |
|         | 肺                                                                                                   |                  |                   |
| 導入遺伝子発現 | qPCR 陽性であるすべての試料は、プログラニューリン発現について評価される。                                                             |                  |                   |

略語：F、雌；ICM；大槽内；M、雄；MgCl<sub>2</sub>；塩化マグネシウム；NaCl、塩化ナトリウム；vg、ベクターゲノム(複数可)；DRG、後根神経節；GALT、腸関連リンパ組織。

## 【0226】

カニクイザルNHPを、死亡率／罹患率(毎日)、臨床観察(毎日)、体重(ベースライン及びその後毎週)、食物消費の目視検査(毎日)、神経学的観察(ベースライン及び2週目及び26週目の間)、間接眼底検査(ベースライン及び2週目及び26週目の間)、及び心電図(ECG)測定(ベースライン及び2週目及び26週目の間)を含む複数の生存中観察及び測定によって評価した。

## 【0227】

AAV9キャプシドに対する中和抗体 (nAb) の分析を、ベースライン時及び7日目、30日目、または183日目の殺時に実施した。血液学、凝固、臨床化学、及び尿検査からなる臨床病理検査を、ベースライン時に2回 (血液検査、尿検査について1回)、及び投与段階の1週目及び13週目の間に1回行った。

## 【0228】

動物を安楽死させ、7日目、30日目、または183日目に組織を回収した。表11に概説した組織は、存在する場合、すべての動物から収集し、重量を測定し (該当する場合)、複製に分割した。組織病理学的評価のために、10%中性緩衝ホルマリン (最適な固定のために特別な固定剤が必要な場合を除く) 中に1個の複製物を保存した (すべての動物)。 $qPCR$ 及び導入遺伝子発現分析のために更なる複製物を収集した。

10

## 【0229】

## 安全性及び毒物学

予定外の死亡はなく、すべての動物は予定された剖検まで生存した。有害なPR006A関連の臨床観察、体重変化、眼科的観察、または身体的もしくは神経学的検査所見は存在しなかった。剖検時の肉眼的検査では、いずれのコホートにも薬物関連の異常は見られなかった。さらに、 $6.5 \times 10^9$  または  $6.5 \times 10^{10} \text{ v g / g 脳}$  を投与された雄または雌雄の組み合わせにおいて観測されたPR間隔、QRS期間、QT間隔、補正QT (QTc) 間隔、または心拍数においてPR006A関連の変化はなかった。ECGの定性評価中に異常なECG波形または不整脈は観察されなかった。

20

## 【0230】

## 生体内分布

PR006A導入遺伝子の生体内分布分析を、 $qPCR$ ベースのアッセイを使用して実施した。高用量群 ( $6.5 \times 10^{10} \text{ v g / g 脳}$ ) における183日目に、CNS及び末梢にわたって広範囲の形質導入があり、 $qPCR$ アッセイの定量の下限である  $50 \text{ v g / } \mu\text{g}$  のDNAのカットオフで、すべての組織がベクターの存在について陽性であった。183日目からの選択された代表的な領域からのデータを図54Aに示す。30日目のデータは示されない。高用量群 ( $6.5 \times 10^{10} \text{ v g / g 脳}$ ) における30日目に、調べられたCNS組織は、被殻を除いてすべて形質導入において陽性であった。低用量 ( $6.5 \times 10^9 \text{ v g / g 脳}$ ) で処置した動物由来の組織は、183日目のCNSでは陽性であったが、末梢組織からは脾臓及び肝臓のみが陽性であった。さらに、高用量のPR006Aで処置した1頭の雌のNHPは、7日目の卵巣において陽性であり、高用量で処置した雄は30日目及び183日目の精巣において陽性であった。PR006A形質導入は、肝臓及び神経系の組織において最も堅牢であり、検査した他の末梢臓器においては一貫して低かった。脳において、ベクター形質導入は、30日目と比較したときに183日目に安定し、導入遺伝子の堅牢で持久性のある形質導入を実証した。

30

## 【0231】

PR006AのICM投与を受けたNHPにおいて、導入遺伝子産物、プログラニュリンに対する顕著な同種免疫応答があり、処置後30日目及び183日目に採取された血清及びCSF試料において抗プログラニュリン抗体が検出され、免疫応答は、ヒトプログラニュリンタンパク質がNHPにおいて発現されたことを示す。抗薬物抗体 (ADA) レベルを、確立された免疫アッセイ技術を使用して決定した。データを図54Bに示す。

40

## 【0232】

PR006A (GRN) の発現を、RT- $qPCR$ ベースのアッセイを使用してmRNAレベルで測定し、Simple Western (商標) (Jess) 分析を使用してタンパク質レベルで測定した。PR006A形質導入レベルと同時に、RT- $qPCR$ を使用したmRNA測定によって、183日目に収集された選択された脳領域 (図54C)、肝臓、生殖腺、脊髄及びDRGにおける導入遺伝子の発現が観察された。

## 【0233】

導入遺伝子の発現は、PR006Aの両方の用量で脳及び肝臓において測定可能であり

50

、発現レベルは用量依存性及び持続性の両方であった。生殖腺において、発現は、高用量でのみ雄において測定可能であり、雌における両方の用量において、発現は、7日目及び30日目において測定可能であったが、183日目においては測定可能ではなかった。

#### 【0234】

処置されたNHPにおいてヒトプログラニユリンが産生されたことを確認するために、CSFにおけるタンパク質レベルを、Simple Western (商標) (Jess) プラットフォームで評価した。方法の詳細は、実施例14に提供される。方法は、FTD-GRN患者由来のCSF試料におけるプログラニユリンレベルを測定し、それらが、健常なヒト対照由来の、及びGRN変異を有さないFTD患者由来のCSF試料において測定されたレベルの約半分であることを確立することによって限定された。CSFからの結果は、低用量及び高用量のPRO06Aの両方で処置された動物において、プログラニユリンのレベルが、用量依存的に上昇することを示す(図54D)。これらの結果は、ICM投与後のNHPにおけるPRO06Aの効果的で広範な形質導入が、プログラニユリンのレベルの増加につながることを示す。

#### 【0235】

Simple Western (商標) (Jess) アッセイは、高いレベルの非特異的バックグラウンドバンドにより、脳組織中のプログラニユリンレベルを測定するのに適していないため、プログラニユリンタンパク質測定は、CSFに焦点を当てた。現在利用可能なアッセイは、高レベルの非特異的バックグラウンドのために、NHP組織における導入遺伝子由来ヒトプログラニユリンのレベルの測定は確実ではない。CSFレベルは、概して、関連する脳濃度を反映すると考えられており、それらは、臨床研究への翻訳バイオマーカーとして特に価値がある。

#### 【0236】

##### 要約

NHPにおける小規模なパイロット非GLP試験及び183日目までのNHPにおけるGLP試験を含む、非臨床試験のうちのいずれにおいても、臨床試験の開始を妨げる有害な安全性所見または毒性の懸念は存在しない。GLP試験における病理学的知見は、両方の用量群にわたって影響を受ける細胞の数が少なく、重症度が一貫して最小限であった。他の生存中または死後のPRO06A関連の有害な所見はなかった。

#### 【0237】

##### FTD-GRNを有するヒト対象における第1／2相試験

ヒト被験者(n=15)が、PRO06組換えAAVの非盲検試験に登録される。対象の包含基準は、以下を含む：30～80歳(上限、下限を含める)、病原性GRN変異を有し、症候性の病期にあり、治験薬の投薬前にバックグラウンド薬を安定して使用している。各被験者は、単回ICM(大槽内)注射として治験薬を受ける。試験は、3か月間のバイオマーカー読み出し、12か月間の臨床読み出し、5年間の安全性及び臨床フォローアップを含む。試験では、以下を分析する。(1)安全性及び忍容性：(2)プログラニユリン、NfL(ニューロフィラメント軽鎖)、及び体積MRI(磁気共鳴画像)を含む主要なバイオマーカー、ならびに(3)有効性：CDR plus NACC FTLD (Clinical Dementia Rating plus National Alzheimer's Coordinating Center Frontal Temporal Lobar Dementia)、行動、認知、言語、機能、及びQoL(生活の質)の尺度。

表12：神経変性疾患の例

10

20

30

40

50

【表 1 5】

| 疾患                                                                        | 関連遺伝子                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| アルツハイマー病                                                                  | APP、PSEN1、PSEN2、APOE                                                                                                                                                      |
| パーキンソン病                                                                   | LRRK2、PARK7、PINK1、PRKN、SNCA、GBA、UCHL1、ATP13A2、VPS35                                                                                                                       |
| ハンチントン病                                                                   | HTT                                                                                                                                                                       |
| 筋萎縮性側索硬化症                                                                 | ALS2、ANG、ATXN2、C9orf72、CHCHD10、CHMP2B、DCTN1、ERBB4、FIG4、FUS、HNRNPA1、MATR3、NEFH、OPTN、PFN1、PRPH、SETX、SIGMAR1、SMN1、SOD1、SPG11、SQSTM1、TARDBP、TBK1、TRPM7、TUBA4A、UBQLN2、VAPB、VCP |
| バッテン病(神経セロイドリポフスチン症)                                                      | PPT1、TPP1、CLN3、CLN5、CLN6、MFSD8、CLN8、CTSD、DNAJC5、CTSF、ATP13A2、GRN、KCTD7                                                                                                    |
| フリードライヒ運動失調症                                                              | FXN                                                                                                                                                                       |
| レビー小体病                                                                    | APOE、GBA、SNCA、SNCB                                                                                                                                                        |
| 脊髄性筋萎縮症                                                                   | SMN1、SMN2                                                                                                                                                                 |
| 多発性硬化症                                                                    | CYP27B1、HLA-DRB1、IL2RA、IL7R、TNFRSF1A                                                                                                                                      |
| プリオン病(クロイツフェルト・ヤコブ病、致死性家族性不眠症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、可変性プロテアーゼ感受性プリオン病) | PRNP                                                                                                                                                                      |

表 1 3 : シヌクレイン病の例

【表 1 6】

| 疾患        | 関連遺伝子                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------|
| パーキンソン病   | LRRK2、PARK7、PINK1、PRKN、SNCA、GBA、UCHL1、ATP13A2、VPS35 |
| レビー小体型認知症 | APOE、GBA、SNCA、SNCB                                  |
| 多系統萎縮症    | COQ2、SNCA                                           |

表 1 4 : タウオパチーの例

10

20

30

40

50

【表 1 7】

| 疾患                     | 関連遺伝子                                  |
|------------------------|----------------------------------------|
| アルツハイマー病               | APP、PSEN1、PSEN2、APOE                   |
| 原発性加齢性タウオパチー           | MAPT                                   |
| 進行性核上性麻痺               | MAPT                                   |
| 大脳皮質基底核変性症             | MAPT、GRN、C9orf72、VCP、CHMP2B、TARDBP、FUS |
| パーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症-17 | MAPT                                   |
| 亜急性硬化性全脳炎              | SCN1A                                  |
| Lytico-Bodig 病         |                                        |
| 神経節細胞腫                 |                                        |
| 髄膜血管腫症                 |                                        |
| 脳炎後パーキンソニズム            |                                        |
| 慢性外傷性脳症                |                                        |

10

表 1 5：リソソーム貯蔵疾患の例

20

30

40

50

【表 18】

| 疾患                     | 関連遺伝子                                                                  |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| ニーマン・ピック病              | NPC1、NPC2、SMPD1                                                        |
| ファブリ病                  | GLA                                                                    |
| クラッペ病                  | GALC                                                                   |
| ゴーシェ病                  | GBA                                                                    |
| Tach-Sachs 病           | HEXA                                                                   |
| 異染性白質ジストロフィー           | ARSA、PSAP                                                              |
| ファーバー病                 | ASAHI                                                                  |
| ガラクトシアリドーシス            | CTSA                                                                   |
| シンドラー病                 | NAGA                                                                   |
| GM1 ガングリオシドーシス         | GLB1                                                                   |
| GM2 ガングリオシドーシス         | GM2A                                                                   |
| サンドホフ病                 | HEXB                                                                   |
| リソソーム酸リパーゼ欠損症          | LIPA                                                                   |
| 複数のスルファターゼ欠損症          | SUMF1                                                                  |
| ムコ多糖症 I 型              | IDUA                                                                   |
| ムコ多糖症 II 型             | IDS                                                                    |
| ムコ多糖症 III 型            | GNS、HGSNAT、NAGLU、SGSH                                                  |
| ムコ多糖症 IV 型             | GALNS、GLB1                                                             |
| ムコ多糖症 VI 型             | ARSB                                                                   |
| ムコ多糖症 VII 型            | GUSB                                                                   |
| ムコ多糖症 IX 型             | HYAL1                                                                  |
| ムコリピドーシス II 型          | GNPTAB                                                                 |
| ムコリピドーシス III 型アルファ/ベータ | GNPTAB                                                                 |
| ムコリピドーシス III 型ガンマ      | GNPTG                                                                  |
| ムコリピドーシス IV 型          | MCOLN1                                                                 |
| 神経セロイドリポフスチン症          | PPT1、TPP1、CLN3、CLN5、CLN6、MFSD8、CLN8、CTSD、DNAJC5、CTSF、ATP13A2、GRN、KCTD7 |
| アルファマンノシドーシス           | MAN2B1                                                                 |
| ベータマンノシドーシス            | MANBA                                                                  |
| アスパルチルグルコサミン尿症         | AGA                                                                    |
| フコシドーシス                | FUCA1                                                                  |

## 【0238】

実施例 14：脳脊髄液におけるプログラニュリンの検出のための自動ウエスタンアッセイ  
 この実験の目的は、ProteinSimple (San Jose, CA) Automated WesternプラットフォームJessを使用して、脳脊髄液 (CSF) におけるプログラニュリン (PGRN) のタンパク質レベルを定量化することであった。この試験方法を使用して、非ヒト霊長類 (NHP) CSF 試料を分析し得る。ヒトプログラニュリンタンパク質、P006Aの導入遺伝子産物の発現レベルを決定するために、ヒトプログラニュリンタンパク質を特異的に検出する抗体を使用して、Simple Western (商標) (Jess) プラットフォームで非ヒト霊長類対象由来のCSF試料を分析した。Simple Western (商標) プラットフォームは、キャピラリー

ーベースの自動ウエスタンブロットイムノアッセイプラットフォームであり、タンパク質分離、免疫プロービング、洗浄、及び化学発光による検出を含むすべてのステップがキャピラリーカートリッジにおいて行われる。試料（4倍希釈）及びヒトプログラニユリンに対する一次抗体（Adipogen PG-359-7、10倍希釈）、加えて二次抗体及びProteinSimpleによって製造されたすべての緩衝液を、カスタマイズされたカートリッジに充填し、Jessプラットフォームで実行した。半定量的データ分析が、各実行が完了した後に自動的に行われ、信号強度、ピーク面積、及び信号対ノイズ比などのパラメータがJess機器を使用して計算された。各個々の試料について、プログラニユリンのレベルを、抗体に対する免疫反応性のピーク面積として測定した。すべての分析は、盲検化試料を用いて実施された。

10

### 【0239】

ここで記載されるアッセイを、非ヒト霊長類動物研究由来のCSF試料に対して実施した。プログラニユリン（PGRN）タンパク質をコードするrAAV構築物（PR006；図64を参照）を使用して、遺伝子療法の有効性を試験するために、プログラニユリンタンパク質の存在及びレベルについてCSF試料を試験した。この試験において、賦形剤またはPR006のいずれかが、NHP動物への大槽内（ICM）注入によって、PR006の低用量（ $1.8 \times 10^{10}$  vg/g脳重量）またはPR006の高用量（ $1.8 \times 10^{11}$  vg/g脳重量）で送達された。各群は3頭の動物からなった。9頭のNHP動物を感染後180日目に殺し（表16）、Jessベースのアッセイを使用してCSF試料を分析した。

20

表16：群分け及び投薬を示すNHP動物の要約

### 【表19】

| 群 | PR006の用量(vg/g脳重量)    | 動物の数<br>剖検(180日目) |
|---|----------------------|-------------------|
| 1 | 0                    | 2頭雄/1頭雌           |
| 2 | $1.8 \times 10^{10}$ | 2頭雄/1頭雌           |
| 3 | $1.8 \times 10^{11}$ | 2頭雄/1頭雌           |

30

表17：自動ウエスタンアッセイのための材料

### 【表20】

| 材料説明                                     | 製造業者          | 品番               |
|------------------------------------------|---------------|------------------|
| 12~230kDa Jess 分離モジュール、25 キャピラリーカートリッジ   | ProteinSimple | SM-W004          |
| EZ Standard Pack 1、12-230kDa             | ProteinSimple | PS-ST01EZ-8      |
| Jess 用抗マウス検出モジュール                        | ProteinSimple | DM-002           |
| プログラニユリンモノクローナル抗体(ヒト)、クローン PG359-7(一次抗体) | Adipogen      | AG-20A-0052-C100 |

40

注：すべての試薬は、バイアルを開く前に室温に温める必要がある。

### 【0240】

50

この方法を実施する際に、以下の手順に従った：

ストック溶液の調製：

1. 分離モジュール E Z S t a n d a r d P a c k におけるクリアチューブに 40  $\mu$  L の水を添加して、400 mM の D T T 溶液を調製する。優しく混ぜる。
2. マスター混合物を調製するために、E Z ピンクマスター混合物チューブに 20  $\mu$  L の 10  $\times$  試料緩衝液及び 20  $\mu$  L の 400 mM の D T T を添加する。優しく混ぜる。
3. ビオチン化ラダーを調製するために、20  $\mu$  L の水を、ピンク色のペレットを有する E Z クリアビオチン化ラダーチューブにピペットで入れる。優しく混ぜる。
4. それぞれ等量を添加して、ルミノール及び過酸化物の混合物を調製する。1 回の実行では、200  $\mu$  L のルミノールを 200  $\mu$  L の過酸化水素に添加する。
5. 25  $\mu$  L の一次抗体及び 225  $\mu$  L の抗体希釈剤 2 を混合することにより一次抗体希釈液（10 倍希釈）を調製する。

試料の調製：

1. 試料を 0.1  $\times$  試料緩衝液中に希釈する。10  $\mu$  L の 10  $\times$  試料緩衝液を 990  $\mu$  L の水に添加することによって、0.1  $\times$  試料緩衝液を調製する。
2. 必要に応じて試料を希釈する。例えば、N H P C S F 試料を、マスター混合物を添加する前に 4 倍希釈した。5  $\mu$  L の N H P C S F を 15  $\mu$  L の 0.1  $\times$  試料緩衝液に添加する。
3. 1  $\times$  のマスター混合物を 4  $\times$  の試料に添加することにより試料を調製する。技術的な複製を実行するために、合計 15  $\mu$  L の試料及び試料ごとのマスター混合物を準備する。例えば、12  $\mu$  L の希釈した試料に 3  $\mu$  L のマスター混合物を加える。優しく混ぜる。
4. 試料を 95  $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸する。
5. 卓上ミニ遠心分離機を使用して試料を短時間遠沈させる。試料を装填する前にボルテックスする。

試薬及び試料をカートリッジに充填する：

1. すべての試料をカートリッジマップに従ってピペットで入れる。
  - a. レーン E における各ウェルに 15  $\mu$  L のルミノール + 過酸化物混合物をピペットで入れる。
  - b. レーン D における第 1 のウェルに 10  $\mu$  L のストレプトアビジンをピペットで入れる。
  - c. レーン D における残りの 24 ウェルに 10  $\mu$  L の二次抗体をピペットで入れる。
  - d. レーン C の第 1 のウェルに 10  $\mu$  L の抗体希釈液をピペットで入れる。
  - e. レーン C における残りの 24 ウェルに 10  $\mu$  L の一次抗体希釈液をピペットで入れる。
  - f. レーン B におけるすべてのウェルに 10  $\mu$  L の抗体希釈剤をピペットで入れる。
  - g. レーン A における第 1 のウェルに 10  $\mu$  L の調整された E Z ラダーをピペットで入れる。
  - h. レーン A における複製レーンに 5  $\mu$  L の試料及びマスター混合物溶液をピペットで入れる。

2. カートリッジを室温で 5 分間、2500 RPM で回転させる。

キャピラリー及びカートリッジを機器に装填する：

1. スロットにキャピラリーを装填する。ライトが青色になっていることを確認する。
2. スピンカートリッジを装置に装填する。
3. 機器の青色のライトの点滅が止まった後、スタートボタンを押す。

【0241】

複製物についての C V （変動係数）のパーセンテージが 30 % 以下であれば、アッセイシステムの適合性が許容できるとみなした。

【0242】

アッセイを使用して N H P C S F 試料におけるプログラニューリンを検出する前に、アッセイを以下のように試験した。J e s s アッセイの適格性試験は、希釈線形性、選択性

10

20

30

40

50

、及び特異度の評価を含んだ。BioIVT由来の通常のCSF試料を使用して、Jessアッセイの希釈線形性を決定した。PGRN変異を有する前頭側頭型認知症（FTD）患者由来のCSF試料（National Centralized Repository for Alzheimer's Disease and Related Dementias（NCRAD、Indianapolis, Indiana）から入手）を使用して、Jessアッセイの選択性及び特異度を決定した。

表18：結果の要約

【表21】

|          | 要素                                                                                                                                                                                                                                                   | 許容基準                                                                        | 結果                                                                                      |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 希釈線形性    | <ul style="list-style-type: none"> <li>-単純なCSF試料（BioIVT）における内因性PGRNレベルを調査する。</li> <li>-マトリックスにおける空白試料の分析を行う。</li> <li>-必要最小限の希釈（MRD）は、2倍連続希釈で整頓されたマトリックスを希釈することによって決定される。</li> <li>-PGRNの内因性レベルがマトリックスにおいて低すぎる場合、希釈はスパイクマトリックスを使用して実行される。</li> </ul> | -MRDは、線形生信号または濃度が観察された場合に必要最小希釈として定義される。線形範囲内で、補正された観察濃度は、MRDの±30%である必要がある。 | <p>合格</p> <p>-試験したすべてのマトリックスは、MRDの±30%で線形希釈範囲を有することによって合格した（結果及び考察セクション、希釈線形性を参照）。</p>  |
| 選択性及び特異度 | -FTD患者CSF試料におけるPGRNレベルを調査する。                                                                                                                                                                                                                         | -MRDは希釈線形性試験によって定義される。                                                      | <p>合格</p> <p>-試験したすべてのマトリックスは、20%で技術的複製の%CVを有することによって合格した（結果及び考察セクション、選択性及び特異度を参照）。</p> |

#### 【0243】

#### 結果及び考察

#### 希釈線形性

Jessによって検出されたPGRNタンパク質の希釈線形性を、市販（BioIVT）されている正常な個体由来のCSF試料において試験した。CSF試料におけるPGRNの内因性レベルを測定して、希釈線形性を決定した。2個体を、2倍～64倍の範囲の2倍連続希釈で試験した。

#### 【0244】

表 19 は、J e s s によって検出された 58 k D a での P G R N タンパク質のピーク面積、及び 16 倍希釈からの各希釈の % 差を報告した。線形範囲内の結果は太字 (100 ± 30 % 差以内) である。希釈線形性は 4 ~ 16 倍以内であることが確立された。

【表 22】

表 19 : C S F 試料における希釈線形性

|      | CSF#1                          |              | CSF#2                          |              |
|------|--------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|
| 希釈倍数 | 58kDa の<br>ピーク面<br>積(希釈調<br>整) | % 差          | 58kDa の<br>ピーク面<br>積(希釈調<br>整) | % 差          |
| 1:2  | 3915099                        | -41.2        | 6392991                        | -38.8        |
| 1:4  | 6040885                        | <b>-9.2</b>  | 8020821                        | <b>-23.2</b> |
| 1:8  | 5773987                        | <b>-13.3</b> | 12615004                       | <b>20.8</b>  |
| 1:16 | 6656474                        | <b>0.0</b>   | 10446186                       | <b>0.0</b>   |
| 1:32 | 8911479                        | 33.9         | 11782404                       | <b>12.8</b>  |
| 1:64 | 12056943                       | 81.1         | 6795118                        | -35.0        |

10

20

【0245】

要約すると、試験したすべてのマトリックスは、マトリックス間で範囲のサイズ及び希釈量が異なったが、0 ± 30 % の差の許容基準に合格した許容可能な線形範囲を有した。試料線形性 M R D は 4 倍希釈であることが確立された。希釈線形性は、4 ~ 16 倍の希釈範囲内であることが確立された。C S F についての許容基準を合格する M R D 及び線形希釈範囲の概要を表 20 に示す。

表 20 : C S F の M R D 及び線形希釈範囲

30

【表 23】

| 組織  | 線形性 M R D | 線形希釈範囲     |
|-----|-----------|------------|
| CSF | 1:4       | 1:4 ~ 1:16 |

【0246】

選択性及び特異度

40

J e s s によって検出された P G R N タンパク質の選択性及び特異度を、N C R A D 由来の P R 006 F T D 患者試料由来の C S F 試料において試験した。C S F 試料の 3 つの群 (群 A、B、及び C) を、ヘテロ接合性 F T D 患者 (群 A)、家族性非保有者 (群 B または C)、及び正常個体 (群 B または C) から収集した。各群について 6 つの試料を分析した。試料の群を表 16 の F T D 患者 C S F 試料情報に記載する。

【0247】

C S F 試料は、P r o t e i n S i m p l e によって提供される 0.1 X 試料緩衝液中で 4 倍希釈され、技術的な複製物において試験された。結果の % C V が 20 % 超の試料の複製物を再分析した。% C V が 20 % 未満の結果を表 22 に報告した。表 22 は、J e s s によって検出された 58 k D a での P G R N タンパク質のピーク面積、及び複製物間の

50

%CVを報告した。結果は、群B及びCにおけるPGRNレベルが、A群と比較して約2倍高いことを示し、これは、CSF試料についてのPGRNレベルの決定においてのJesseアッセイの選択性及び特異度を示す（図55）。

表21：FTD患者のCSF試料情報

【表24-1】

| バーコード      | 代替MRN           | 来診                | キット<br>番号 | 検体の<br>型 | ボックス<br>名    | 位置 | 群 |
|------------|-----------------|-------------------|-----------|----------|--------------|----|---|
| 0003355598 | ST-<br>20000108 | サイクル<br>2-<br>CSF | 257282    | CSF      | 27488<br>CSF | 1  | C |
| 0004777338 | ST-<br>20000118 | サイクル<br>2-<br>CSF | 267633    | CSF      | 27488<br>CSF | 2  | C |
| 0004777329 | ST-<br>20000306 | サイクル<br>1-<br>CSF | 260551    | CSF      | 27488<br>CSF | 3  | A |
| 0004777326 | ST-<br>20000328 | サイクル<br>2-<br>CSF | 260544    | CSF      | 27488<br>CSF | 4  | C |
| 0004777335 | ST-<br>20000386 | サイクル<br>1-<br>CSF | 267110    | CSF      | 27488<br>CSF | 5  | A |
| 0004777345 | ST-<br>20000590 | サイクル<br>2-<br>CSF | 267859    | CSF      | 27488<br>CSF | 6  | B |
| 0004777332 | ST-<br>20000621 | サイクル<br>1-<br>CSF | 266413    | CSF      | 27488<br>CSF | 7  | B |
| 0004628923 | ST-<br>20000757 | サイクル<br>1-<br>CSF | 269817    | CSF      | 27488<br>CSF | 8  | B |
| 0004695103 | ST-<br>20001142 | サイクル<br>1-<br>CSF | 308149    | CSF      | 27488<br>CSF | 9  | A |
| 0004074629 | ST-<br>20000107 | サイクル<br>2-<br>CSF | 258212    | CSF      | 27488<br>CSF | 10 | C |
| 0003358475 | ST-<br>20000110 | サイクル<br>2-<br>CSF | 258210    | CSF      | 27488<br>CSF | 11 | C |

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

|            |                 |                    |        |     |              |    |   |
|------------|-----------------|--------------------|--------|-----|--------------|----|---|
| 0003358463 | ST-<br>20000274 | サイク<br>ル 2-<br>CSF | 257292 | CSF | 27488<br>CSF | 12 | A |
| 0004788828 | ST-<br>20000309 | サイク<br>ル 2-<br>CSF | 303093 | CSF | 27488<br>CSF | 13 | C |
| 0003358781 | ST-<br>20000615 | サイク<br>ル 1-<br>CSF | 257278 | CSF | 27488<br>CSF | 14 | B |
| 0003358793 | ST-<br>20000616 | サイク<br>ル 1-<br>CSF | 257305 | CSF | 27488<br>CSF | 15 | A |
| 0004777321 | ST-<br>20000637 | サイク<br>ル 1-<br>CSF | 257307 | CSF | 27488<br>CSF | 16 | B |
| 0004777341 | ST-<br>20000768 | サイク<br>ル 1-<br>CSF | 267857 | CSF | 27488<br>CSF | 17 | B |
| 0004695106 | ST-<br>20001165 | サイク<br>ル 1-<br>CSF | 317396 | CSF | 27488<br>CSF | 18 | A |

表 2 2：選択性及び特異度の結果

10

20

30

40

50

【表 2 5】

| 群                            | 試料バーコード    | 58kD ピーク面積<br>(希釈調整) | %CV   |
|------------------------------|------------|----------------------|-------|
| 群(A)<br>ヘテロ接<br>合性 FTD<br>患者 | 0004777329 | 2838645              | 5.08  |
|                              | 0004777335 | 4293344              | 1.20  |
|                              | 0004695103 | 6738165              | 1.08  |
|                              | 0003358463 | 3594249              | 11.10 |
|                              | 0003358793 | 5992434              | 2.49  |
|                              | 0004695106 | 2472462              | 10.40 |
| 群(B)<br>正常また<br>は家族性<br>非保有者 | 0004777345 | 3836185              | 11.18 |
|                              | 0004777332 | 6006224              | 3.05  |
|                              | 0004628923 | 3758940              | 1.44  |
|                              | 0003358781 | 7860294              | 17.08 |
|                              | 0004777321 | 7187172              | 0.69  |
|                              | 0004777341 | 8450410              | 0.50  |
| 群(C)<br>正常また<br>は家族性<br>非保有者 | 0003355598 | 2981005              | 1.70  |
|                              | 0004777338 | 6803428              | 0.18  |
|                              | 0004777326 | 5030695              | 3.56  |
|                              | 0004074629 | 5448863              | 3.47  |
|                              | 0003358475 | 7892529              | 1.17  |
|                              | 0004788828 | 6944800              | 1.85  |

## 【0 2 4 8】

FTD患者由来のCSF試料試験（表21）も、ヒトPGRNのELISAキット（Adipogen, AG-45A-0018YEK-KI01）で分析した。ELISAからの結果（図56）は、Jessと同様の群間のPGRNレベルの傾向を示し、JessアッセイがCSF試料におけるPGRNレベルの評価に使用するのに最適であることを実証した。

## 【0 2 4 9】

結論として、このProteinSimple Automated Western Jessアッセイは、NHP CSF試料におけるPGRNレベルの評価に使用するのに最適であると判定された。

## 【0 2 5 0】

NHP CSF試料についてのJessデータを表23に示す。各試料は、2つの技術的複製にわたる平均を表す。試料レーンにおける58kDバンドについてのピーク面積を報告する。データは、技術的複製の平均ピーク面積及び調整された希釈倍率として提示される。

表 2 3：NHP CSF試料についてのJessデータ

10

20

30

40

50

【表 2 6】

| 試料 ID                | 用量群 | ピーク面積<br>(58kD) |
|----------------------|-----|-----------------|
| PRV-028 d180 CSF 101 | 低用量 | 4944754         |
| PRV-028 d180 CSF 102 | 対照  | 4449066         |
| PRV-028 d180 CSF 103 | 低用量 | 6222881         |
| PRV-028 d180 CSF 104 | 高用量 | 5499901         |
| PRV-028 d180 CSF 105 | 低用量 | 4293853         |
| PRV-028 d180 CSF 106 | 高用量 | 10149400        |
| PRV-028 d180 CSF 107 | 対照  | 1360173         |
| PRV-028 d180 CSF 108 | 対照  | 5742081         |
| PRV-028 d180 CSF 109 | 高用量 | 9658597         |

10

20

## 【0 2 5 1】

このアッセイの目的は、NHP試験のための目的の組織領域におけるPR006の形質導入後のプログラニュリン(PGRN)タンパク質発現レベルのレベルを確認することであった。これは、モノクローナル抗体を使用してプログラニュリンタンパク質を検出する自動ウエスタンプラットフォームを使用して実施された。プログラニュリン発現は、対照及びPR006処置のNHPの両方におけるCSFにおいて測定可能であり、このアッセイは、内因性プログラニュリンタンパク質とPR006A誘導プログラニュリンタンパク質を区別しない。

## 【0 2 5 2】

本出願は、参照により、以下の文書の内容全体を組み込む。国際PCT出願公開第WO 2019/070893号、国際PCT出願公開第WO 2019/070891号、2017年10月3日に出版され、「GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS」と題された米国仮特許出願第62/567,296号、2017年10月3日に出版され、「GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS」と題された同第62/567,311号、2017年10月3日に出版され、「GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS」と題された同第62/567,319号、2018年10月3日に出版され、「GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS」と題された同第62/567,301号、2017年10月3日に出版され、「GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS」と題された同第62/567,310号、2017年10月3日に出版され、「GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS」と題された同第62/567,303号、及び2017年10月3日に出版され、「GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS」と題された同第62/567,305号。

30

40

## 【0 2 5 3】

このように本発明の少なくとも1つの実施形態のいくつかの態様を説明したが、当業者は、様々な変更、修正、及び改善を容易に考えつくことが理解されるであろう。そのような変更、修正、及び改善は、本開示の一部であることが意図され、本発明の趣旨及び範囲内であることが意図されている。したがって、前述の説明及び図面は単なる例にすぎない。

50

## 【0254】

本明細書では本発明のいくつかの実施形態を記載及び例示説明したが、当業者は、本明細書に記載の機能を実行するために、及び／または、結果及び／または利点のうちの1つ以上を得るために様々な他の手段及び／または構造を容易に想起するであろうし、そのような変形及び／または修正の各々は本発明の範囲内であると見なされる。より一般的には、当業者は、本明細書に記載のすべてのパラメータ、寸法、材料、及び構成が例示であることを意図しており、実際のパラメータ、寸法、材料、及び／または構成は、本発明の教示が使用される特定の用途または複数の用途に依存することを容易に理解するであろう。当業者は、通常の実験のみを使用して本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の多くの同等物を認識するか、または確認することができるであろう。したがって、前述の実施形態は、単なる例として提示され、添付の特許請求の範囲及びその同等の範囲内で、本発明は、具体的に記載され特許請求される以外の方法で実施され得ることを理解されたい。本発明は、本明細書に記載される各個々の特徴、システム、物品、材料、及び／または方法を対象とする。さらに、2つ以上のそのような特徴、システム、物品、材料、及び／または方法の任意の組み合わせが、そのような特徴、システム、物品、材料、及び／または方法が相互に矛盾しない場合、本発明の範囲内に含まれる。

10

## 【0255】

本明細書及び特許請求の範囲において本願で使用される場合、不定冠詞「a」及び「an」は、反対に明確に示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解される必要がある。

20

## 【0256】

本明細書及び特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、「及び／または」という表現は、そのように結合された要素の「いずれかまたは両方」、すなわち、ある場合には結合して存在し、他の場合には分離して存在する要素を意味すると理解される必要がある。「及び／または」節によって具体的に特定される要素以外の他の要素は、反対に明確に示されない限り、具体的に特定される要素に関連するかどうかにかかわらず、任意に存在し得る。したがって、非限定的な例として、「含む」などの制限のない言語と組み合わせ使用される場合、「A及び／またはB」への言及は、一実施形態において、BのないA（任意にB以外の要素を含む）、別の実施形態において、AのないB（任意にA以外の要素を含む）、さらに別の実施形態において、A及びBの両方（任意に他の要素を含む）などを指し得る。

30

## 【0257】

本明細書及び特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、「または」は、上記で定義された「及び／または」と同じ意味を有すると理解される必要がある。例えば、リストにおいて項目を区切る場合、「または」または「及び／または」は包括的である、すなわち、多数の、またはリストの要素のうちの少なくとも1つを含むが、そのうちの1つより多く、及び任意に、追加のリストされていない項目を含むと解釈されるものとする。「のうちの1つのみ」または「のうちの正確に1つ」などの反対に明確に示される用語のみ、または特許請求の範囲で使用される場合の「からなる」は、多数の、またはリストの要素のうちの正確に1つの要素を含むことを指す。概して、本明細書で使用される時、「または」という用語は、「いずれか」、「のうちの1つ」、「のうちの1つのみ」、または「のうちの正確に1つ」などの排他性の用語が先行する場合にのみ、排他的代替（すなわち、「1つまたは他の、しかし両方ではない」）を示すものとして解釈されるべきである。

40

## 【0258】

本明細書及び特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、1つ以上の要素のリストに関連する「少なくとも1つ」という表現は、要素のリストの要素の任意の1つ以上から選択される少なくとも1つの要素を意味するが、必ずしも要素のリスト内に具体的に記載される各及びすべての要素のうちの少なくとも1つを含む必要はなく、要素のリストにおける要素の任意の組み合わせを除外しないことが理解される必要がある。この定義は

50

また、「少なくとも1つ」という表現が指す要素のリスト内で具体的に特定される要素以外の要素が、具体的に特定される要素に関連するかどうかにかかわらず、任意に存在し得ることを可能にする。したがって、非限定的な例として、「A及びBのうちの少なくとも1つ」（または同等に、「AまたはBのうちの少なくとも1つ」、または同等に、「A及び／またはBのうちの少なくとも1つ」）は、1つの実施形態において、少なくとも1つ、任意に1つ以上のAを含み、Bが存在しない（及び任意にB以外の要素を含む）、別の実施形態において、少なくとも1つ、任意に1つより多いBを含み、Aが存在しない（及び任意選択的にA以外の要素を含む）、さらに別の実施形態において、少なくとも1つ、任意に1つより多いA、及び少なくとも1つ、任意に1つ以上のBを含むこと（及び任意に他の要素を含む）を指し得る。

10

#### 【0259】

特許請求の範囲の要素を修飾するための特許請求の範囲における「第1の」、「第2の」、「第3の」などの順序用語の使用は、それ自体が、ある特許請求の範囲の要素の他の要素に対する重要度、優先度、もしくは順序、または方法の行為が実行される時間的順序を意味するものではなく、特許請求の範囲の要素を区別するために、特定の名前を有する1つの特許請求の範囲の要素を（順序用語の使用について以外で）同じ名前を有する別の要素から区別するためのラベルとしてのみ使用される。

#### 【0260】

また、反対に明確に示されない限り、1つより多いステップまたは行為を含む本明細書で請求される任意の方法において、方法のステップまたは行為の順序は、必ずしも、方法のステップまたは行為が列挙される順序に限定されないことも理解される必要がある。

20

#### 【0261】

本出願において参照されている米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、及び非特許刊行物の各々は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0262】

##### 配列

いくつかの実施形態において、1つ以上の遺伝子産物（例えば、第1、第2及び／または第3の遺伝子産物）をコードする発現カセットは、配列番号1～91のうちのいずれか1つに記載の配列を含むか、またはそれからなる（またはそれを有するペプチドをコードする）。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、配列番号1～91のうちのいずれか1つの部分（例えば、断片）によってコードされる。

30

#### 【0263】

##### 番号付けされた実施形態

添付の特許請求の範囲にかかわらず、本開示は、以下の番号付けされた本開示の実施形態を記載する。

#### 【0264】

1. 2つのアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復（ITR）に隣接するGcaseタンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

（i）前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR（配列番号29）に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

40

（ii）前記Gcaseタンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

#### 【0265】

2. 前記Gcaseタンパク質が、配列番号14に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態1に記載の単離核酸。

#### 【0266】

3. 前記Gcaseタンパク質が、コドン最適化核酸配列、任意に配列番号15に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態1または2に記載の単離核酸。

#### 【0267】

50

4. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記 I T R の外側に位置する「D」配列である、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【0268】

5. 前記修飾「D」配列を含む前記 I T R が、3' I T R である、実施形態 1～4 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【0269】

6. T R Y 配列をさらに含み、任意に前記 T R Y 配列が、配列番号 28 に記載されている、実施形態 1～5 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【0270】

7. 2つのアデノ随伴ウイルス (A A V) 逆位末端反復 (I T R) に隣接するプロサポシンタンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

10

(i) 前記 I T R のうちの少なくとも 1 つが、野生型 A A V 2 I T R (配列番号 29) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記プロサポシンタンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

【0271】

8. 前記プロサポシンタンパク質が、配列番号 16 に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態 7 に記載の単離核酸。

【0272】

9. 前記プロサポシンタンパク質が、コドン最適化核酸配列、任意に配列番号 17 に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態 7 または 8 に記載の単離核酸。

20

【0273】

10. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記 I T R の外側に位置する「D」配列である、実施形態 7～9 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【0274】

11. 前記修飾「D」配列を含む前記 I T R が、3' I T R である、実施形態 7～10 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【0275】

12. T R Y 配列をさらに含み、任意に前記 T R Y 配列が、配列番号 28 に記載されている、実施形態 7～11 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

30

【0276】

13. 2つのアデノ随伴ウイルス (A A V) 逆位末端反復 (I T R) に隣接する S C A R B 2 タンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記 I T R のうちの少なくとも 1 つが、野生型 A A V 2 I T R (配列番号 29) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記 S C A R B 2 タンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

【0277】

14. 前記 S C A R B 2 タンパク質が、配列番号 18 に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態 13 に記載の単離核酸。

40

【0278】

15. 前記 S C A R B 2 タンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号 19 に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態 13 または 14 に記載の単離核酸。

【0279】

16. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記 I T R の外側に位置する「D」配列である、実施形態 13～15 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【0280】

17. 前記修飾「D」配列を含む前記 I T R が、3' I T R である、実施形態 13～16 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【0281】

50

18. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態13～17のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0282】

19. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するGBA2タンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR(配列番号29)に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記GBA2タンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

【0283】

20. 前記GBA2タンパク質が、配列番号30に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態19に記載の単離核酸。

【0284】

21. 前記GBA2タンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号31に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態19または20に記載の単離核酸。

【0285】

22. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態19～21のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0286】

23. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3' ITRである、実施形態19～22のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0287】

24. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態19～23のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0288】

25. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するGALCタンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR(配列番号29)に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記GALCタンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

【0289】

26. 前記GALCタンパク質が、配列番号33に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態25に記載の単離核酸。

【0290】

27. 前記GALCタンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号34に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態25または26に記載の単離核酸。

【0291】

28. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態25～27のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0292】

29. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3' ITRである、実施形態25～28のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0293】

30. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態25～29のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0294】

31. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するCTSBタンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR(配列番号29

10

20

30

40

50

) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

( i i ) 前記 C T S B タンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

【 0 2 9 5 】

3 2 . 前記 C T S B タンパク質が、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態 3 1 に記載の単離核酸。

【 0 2 9 6 】

3 3 . 前記 C T S B タンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号 3 6 に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態 3 1 または 3 2 に記載の単離核酸。

【 0 2 9 7 】

3 4 . 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記 I T R の外側に位置する「D」配列である、実施形態 3 1 ～ 3 3 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【 0 2 9 8 】

3 5 . 前記修飾「D」配列を含む前記 I T R が、3' I T R である、実施形態 3 1 ～ 3 4 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【 0 2 9 9 】

3 6 . T R Y 配列をさらに含み、任意に前記 T R Y 配列が、配列番号 2 8 に記載されている、実施形態 3 1 ～ 3 5 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【 0 3 0 0 】

3 7 . 2 つのアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 逆位末端反復 ( I T R ) に隣接する S M P D 1 タンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

( i ) 前記 I T R のうちの少なくとも 1 つが、野生型 A A V 2 I T R ( 配列番号 2 9 ) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

( i i ) 前記 S M P D 1 タンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

【 0 3 0 1 】

3 8 . 前記 S M P D 1 タンパク質が、配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態 3 7 に記載の単離核酸。

【 0 3 0 2 】

3 9 . 前記 S M P D 1 タンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号 3 8 に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態 3 7 または 3 8 に記載の単離核酸。

【 0 3 0 3 】

4 0 . 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記 I T R の外側に位置する「D」配列である、実施形態 3 7 ～ 3 9 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【 0 3 0 4 】

4 1 . 前記修飾「D」配列を含む前記 I T R が、3' I T R である、実施形態 3 7 ～ 4 0 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【 0 3 0 5 】

4 2 . T R Y 配列をさらに含み、任意に前記 T R Y 配列が、配列番号 2 8 に記載されている、実施形態 3 7 ～ 4 1 のいずれか 1 つに記載の単離核酸。

【 0 3 0 6 】

4 3 . 2 つのアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 逆位末端反復 ( I T R ) に隣接する G C H 1 タンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

( i ) 前記 I T R のうちの少なくとも 1 つが、野生型 A A V 2 I T R ( 配列番号 2 9 ) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

( i i ) 前記 G C H 1 タンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

【 0 3 0 7 】

4 4 . 前記 G C H 1 タンパク質が、配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態 4 3 に記載の単離核酸。

10

20

30

40

50

## 【0308】

45. 前記GCH1タンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号46に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態43または44に記載の単離核酸。

## 【0309】

46. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態43～45のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0310】

47. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3' ITRである、実施形態43～46のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0311】

48. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態43～47のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0312】

49. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するRAB7Lタンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR (配列番号29) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記RAB7Lタンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

## 【0313】

50. 前記RAB7Lタンパク質が、配列番号47に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態49に記載の単離核酸。

## 【0314】

51. 前記RAB7Lタンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号48に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態49または50に記載の単離核酸。

## 【0315】

52. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態49～51のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0316】

53. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3' ITRである、実施形態49～52のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0317】

54. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態49～53のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0318】

55. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するVPS35タンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR (配列番号29) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記VPS35タンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

## 【0319】

56. 前記VPS35タンパク質が、配列番号49に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態55に記載の単離核酸。

## 【0320】

57. 前記VPS35タンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号50に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態55または56に記載の単離核酸。

## 【0321】

58. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態55～57のいずれか1つに記載の単離核酸。

10

20

30

40

50

## 【0322】

59. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3'ITRである、実施形態55～58のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0323】

60. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態55～59のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0324】

61. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するIL-34タンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR (配列番号29) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記IL-34タンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

## 【0325】

62. 前記IL-34タンパク質が、配列番号55に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態61に記載の単離核酸。

## 【0326】

63. 前記IL-34タンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号56に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態61または62に記載の単離核酸。

## 【0327】

64. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態61～63のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0328】

65. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3'ITRである、実施形態61～64のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0329】

66. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態61～65のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0330】

67. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するTREM2タンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR (配列番号29) に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記TREM2タンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

## 【0331】

68. 前記TREM2タンパク質が、配列番号57に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態67に記載の単離核酸。

## 【0332】

69. 前記TREM2タンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号58に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態67または68に記載の単離核酸。

## 【0333】

70. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態67～69のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0334】

71. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3'ITRである、実施形態67～70のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0335】

72. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態67～71のいずれか1つに記載の単離核酸。

10

20

30

40

50

## 【0336】

73. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するTMEM106Bタンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR(配列番号29)に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記TMEM106Bタンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

## 【0337】

74. 前記TMEM106Bタンパク質が、配列番号63に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態73に記載の単離核酸。

## 【0338】

75. 前記TMEM106Bタンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号64に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態73または74に記載の単離核酸。

## 【0339】

76. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態73～75のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0340】

77. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3' ITRである、実施形態73～76のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0341】

78. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態73～77のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0342】

79. 2つのアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)に隣接するプログラニュリン(PGRN)タンパク質をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、

(i) 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR(配列番号29)に対して修飾「D」領域を含み、及び／または

(ii) 前記PGRNタンパク質が、コドン最適化核酸配列によってコードされる、前記単離核酸。

## 【0343】

80. 前記PGRNタンパク質が、配列番号67に記載のアミノ酸配列またはその一部分を含む、実施形態79に記載の単離核酸。

## 【0344】

81. 前記PGRNタンパク質が、コドン最適化核酸配列、または配列番号68に記載の核酸配列によってコードされる、実施形態79または80に記載の単離核酸。

## 【0345】

82. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態79～81のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0346】

83. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3' ITRである、実施形態79～82のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0347】

84. TRY配列をさらに含み、任意に前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態79～83のいずれか1つに記載の単離核酸。

## 【0348】

85. 第1の遺伝子産物及び第2の遺伝子産物をコードする発現構築物を含む単離核酸であって、各遺伝子産物が、独立して、表1に記載の遺伝子産物またはその一部から選択される、前記単離核酸。

## 【0349】

86. 前記第1の遺伝子産物が、Gcaseタンパク質またはその一部分である、実施

10

20

30

40

50

形態 85 に記載の単離核酸。

【0350】

87. 前記第2の遺伝子産物が、LIMP2もしくはその一部分、またはプロサポシンもしくはその一部分である、実施形態85または86に記載の単離核酸。

【0351】

88. 干渉核酸（例えば、shRNA、miRNA、dsRNAなど）をさらにコードし、任意に、前記干渉核酸が、 $\alpha$ -SynまたはTMEM106Bの発現を阻害する、実施形態85～87のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0352】

89. 1つ以上のプロモーターをさらに含み、任意に、前記1つ以上のプロモーターの各々が、独立して、ニワトリベータアクチン（CBA）プロモーター、CAGプロモーター、CD68プロモーター、またはJeTプロモーターである、実施形態85～88のいずれか1つに記載の単離核酸。

10

【0353】

90. 内部リボソーム侵入部位（IRES）をさらに含み、任意に、前記IRESが、第1の遺伝子産物及び第2の遺伝子産物の間に位置する、実施形態85～89のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0354】

91. 自己切断ペプチドコーディング配列をさらに含み、任意に、前記自己切断ペプチドがT2Aである、実施形態85～90のいずれか1つに記載の単離核酸。

20

【0355】

92. 前記発現構築物が、前記第1の遺伝子産物及び前記第2の遺伝子産物に隣接する2つのアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復（ITR）配列を含み、任意に、前記ITR配列のうちの1つが、機能的な末端解離部位を欠く、実施形態85～91のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0356】

93. 前記ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAV2 ITR（配列番号29）に対して修飾「D」領域を含む、実施形態92に記載の単離核酸。

【0357】

94. 前記修飾「D」領域が、前記発現構築物に対して前記ITRの外側に位置する「D」配列である、実施形態93に記載の単離核酸。

30

【0358】

95. 前記修飾「D」配列を含む前記ITRが、3' ITRである、実施形態93または94に記載の単離核酸。

【0359】

96. TRY配列をさらに含み、任意に、前記TRY配列が、配列番号28に記載されている、実施形態85～95のいずれか1つに記載の単離核酸。

【0360】

97. 配列番号1～91のうちのいずれか1つに記載の配列を有する、単離核酸。

【0361】

98. 実施形態1～97のいずれか1つに記載の単離核酸を含む、ベクター。

40

【0362】

99. 前記ベクターがプラスミドである、実施形態98に記載のベクター。

【0363】

100. 前記ベクターが、ウイルスベクターであり、任意に、前記ウイルスベクターが、組換えAAV（rAAV）ベクターまたはバキュロウイルスベクターである、実施形態98に記載のベクター。

【0364】

101. 実施形態1～97のいずれか1つに記載の単離核酸、または実施形態98～100のいずれか1つに記載のベクターを含む、組成物。

50

## 【0365】

102. 実施形態1～97のいずれか1つに記載の単離核酸または実施形態98～100のいずれか1つに記載のベクターを含む、宿主細胞。

## 【0366】

103.

(i) キャプシドタンパク質、及び

(ii) 実施形態1～97のいずれか1つに記載の単離核酸、または実施形態98～100のいずれか1つに記載のベクターを含む、  
組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV)。

## 【0367】

104. 前記キャプシドタンパク質が、血液脳関門を通過することができ、任意に、前記キャプシドタンパク質が、AAV9キャプシドタンパク質またはAAVrh.10キャプシドタンパク質である、実施形態103に記載のrAAV。

## 【0368】

105. 前記rAAVが、中枢神経系 (CNS) の神経細胞及び非神経細胞を形質導入する、実施形態103または104に記載のrAAV。

## 【0369】

106. パーキンソン病を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法であって、前記対象に、実施形態1～97のいずれか1つに記載の単離核酸、実施形態98～100のいずれか1つに記載のベクター、実施形態101に記載の組成物、または実施形態103～105のいずれか1つに記載のrAAVを投与することを含む、前記方法。

## 【0370】

107. 前記投与が、前記対象の前記CNSへの直接注射を含み、任意に、前記直接注射が、脳内注射、実質内注射、くも膜下腔内注射、大槽内注射、またはそれらの任意の組み合わせである、実施形態106に記載の方法。

## 【0371】

108. 前記対象の前記CNSへの前記直接注射が、対流増強送達 (CED) を含む、実施形態107に記載の方法。

## 【0372】

109. 前記投与が、末梢注射を含み、任意に、前記末梢注射が、静脈内注射である、実施形態106～108のいずれか1つに記載の方法。

## 【0373】

110. GRN変異を有する前頭側頭型認知症を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法であって、

(i) PGRNタンパク質をコードする導入遺伝子挿入物に作動可能に連結したプロモーターを含む発現構築物を含む核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターであって、前記導入遺伝子挿入物が配列番号68のヌクレオチド配列を含む、前記rAAVベクターと、

(ii) AAV9キャプシドタンパク質と、  
を含むrAAVを、前記対象に投与することを含む、前記方法。

## 【0374】

111. 前記rAAVが、約 $1 \times 10^{13}$ ベクターゲノム (vg) ～約 $7 \times 10^{14}$  vgの範囲の用量で前記対象に投与される、実施形態110に記載の方法。

## 【0375】

112. 前記rAAVが、大槽への注射を介して投与される、実施形態110または111に記載の方法。

## 【0376】

113. 前記プロモーターが、ニワトリベータアクチン (CBA) プロモーターである、実施形態110～112のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【0377】

114. 前記 rAAV ベクターが、サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサーをさらに含む、実施形態 110～113 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【0378】

115. 前記 rAAV ベクターが、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素 (WPRE) をさらに含む、実施形態 110～114 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【0379】

116. 前記 rAAV ベクターが、ウシ成長ホルモンポリ A シグナル尾部をさらに含む、実施形態 110～115 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【0380】

117. 前記核酸が、前記発現構築物に隣接する 2 つのアデノ随伴ウイルス逆位末端反復 (ITR) 配列を含む、実施形態 110～116 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【0381】

118. 各 ITR 配列が、野生型 AAV2 ITR 配列である、実施形態 117 に記載の方法。

## 【0382】

119. 前記 rAAV ベクターが、5' ITR 及び前記発現構築物の間に TRY 領域をさらに含み、前記 TRY 領域が、配列番号 28 を含む、実施形態 110～118 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【0383】

120. GRN 変異を有する前頭側頭型認知症を有するか、または有する疑いのある対象を治療するための方法であって、

(i) 5' から 3' の順に、

(a) AAV2 ITR、

(b) CMV エンハンサー、

(c) CBA プロモーター、

(d) PGRN タンパク質をコードする導入遺伝子挿入物であって、前記導入遺伝子挿入物が配列番号 68 のヌクレオチド配列を含む、前記導入遺伝子挿入物、

(e) WPRE、

(f) ウシ成長ホルモンポリ A シグナル尾部、及び

(g) AAV2 ITR 含む核酸を含む、rAAV ベクターと、

(ii) AAV9 キャプシドタンパク質と、

を含む rAAV を、前記対象に投与することを含む、前記方法。

## 【0384】

121. 前記 rAAV が、約  $1 \times 10^{13}$  v g ～ 約  $7 \times 10^{14}$  v g の範囲の用量で前記対象に投与される、実施形態 120 に記載の方法。

## 【0385】

122. 前記 rAAV が、大槽への注射を介して投与される、実施形態 120 または 121 に記載の方法。

## 【0386】

123. 前記 rAAV が、約 20 mM の Tris (pH 8.0)、約 1 mM の  $MgCl_2$ 、約 200 mM の NaCl、及び約 0.001 % w/v のポリキサマー 188 を含む製剤で投与される、実施形態 110～122 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【0387】

124.

(i)

(a) PGRN タンパク質をコードする導入遺伝子挿入物に作動可能に連結したプロモーターを含む発現構築物を含む核酸を含む rAAV ベクターであって、前記導入遺伝子挿入物が配列番号 68 のヌクレオチド配列を含む、前記 rAAV ベクター、及び

(b) AAV9 キャプシドタンパク質を含む

10

20

30

40

50

r A A V と、

( i i ) 約 20 m M の T r i s ( p H 8 . 0 ) と、

( i i i ) 約 1 m M の M g C l <sub>2</sub> と、

( i v ) 約 200 m M の N a C l と、

( v ) 約 0 . 001 % w / v の ポロキサマー 188 と、を含む、医薬組成物。

【 0388 】

125 .

( a ) P G R N タンパク質をコードする導入遺伝子挿入物に作動可能に連結したプロモーターを含む発現構築物を含む核酸を含む r A A V ベクターであって、前記導入遺伝子挿入物が配列番号 68 のヌクレオチド配列を含む、前記 r A A V ベクターと、

( b ) A A V 9 キャプシドタンパク質と、を含む、

対象において G R N 変異を有する前頭側頭型認知症を治療する方法において使用するための、r A A V。

【 0389 】

126 . 脳脊髄液 ( C S F ) 試料における P G R N タンパク質レベルを定量する方法であって、

( 1 ) 前記 C S F 試料を、ジチオスレイトール ( D T T ) 及び試料緩衝液を含有するマスター混合物において希釈することと、

( 2 ) 前記希釈 C S F 試料、抗プログラニューリン抗体、前記抗プログラニューリン抗体を検出する二次抗体、ルミノール及び過酸化物を、キャピラリーカートリッジのウェルに充填することと、

( 3 ) 前記キャピラリーカートリッジを自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器に装填することと、

( 4 ) 前記自動ウエスタンブロットイムノアッセイ機器を使用して、シグナル強度、ピーク面積、及びシグナル対ノイズ比を計算することと、

( 5 ) 前記 C S F 試料におけるプログラニューリンタンパク質レベルを、免疫反応性の前記抗プログラニューリン抗体に対する前記ピーク面積として定量することと、を含む、前記方法。

10

20

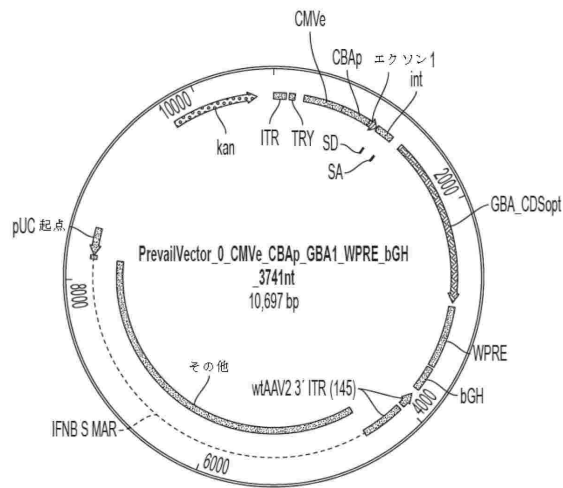
30

40

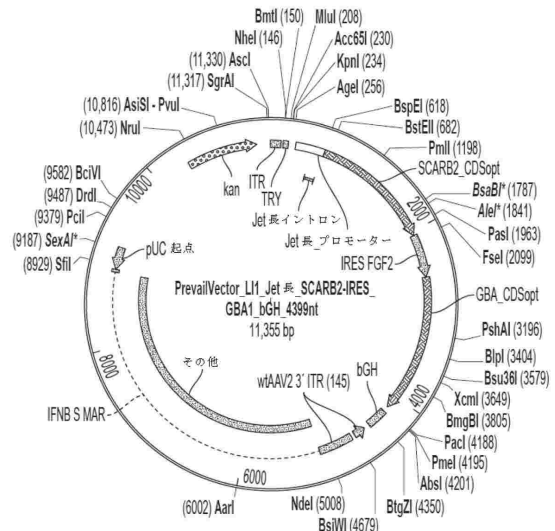
50

【図面】

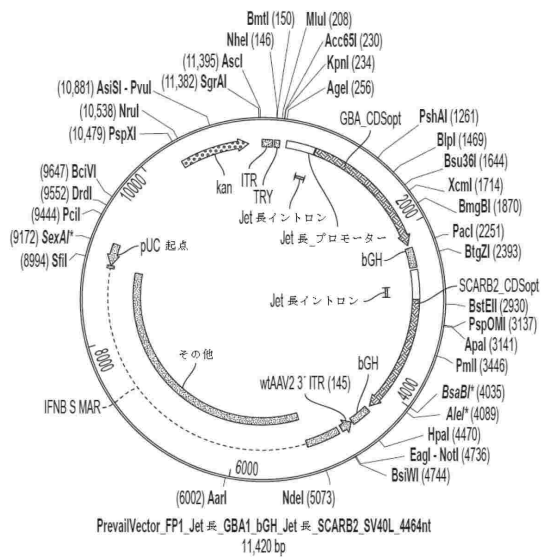
【図 1】



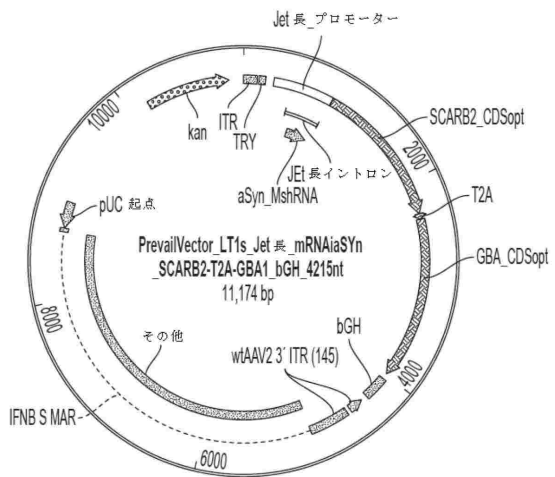
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

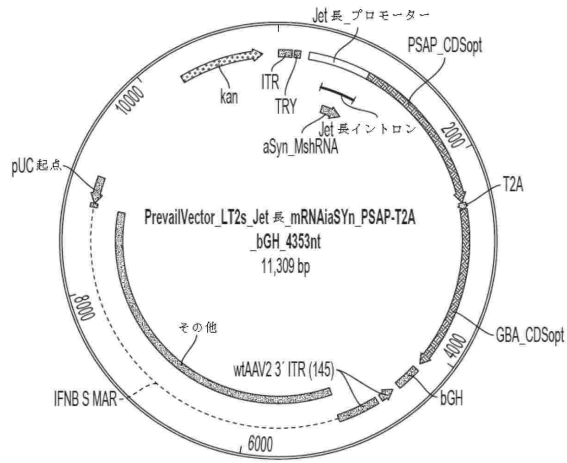
20

30

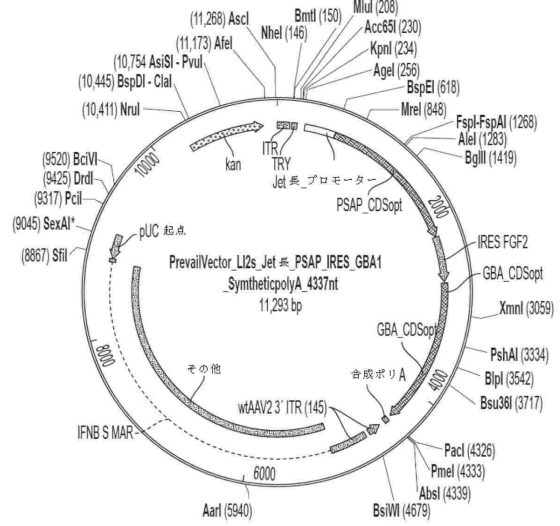
40

50

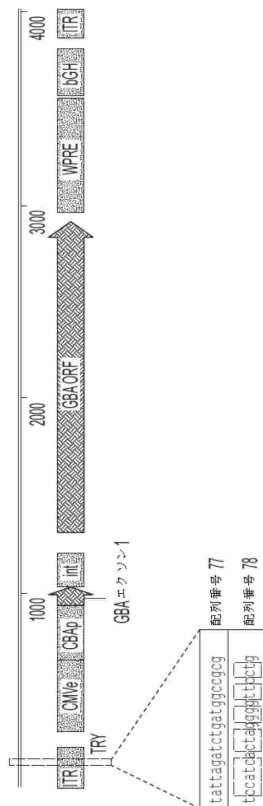
【図 5】



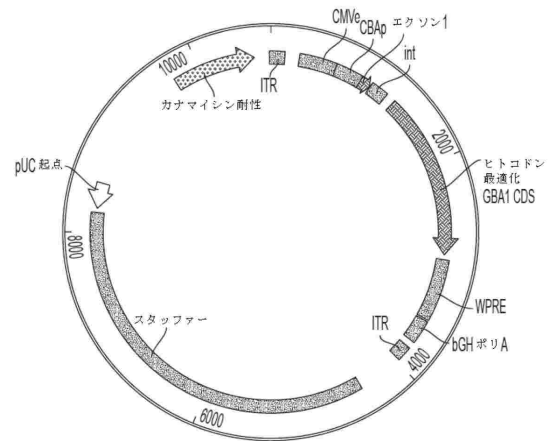
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

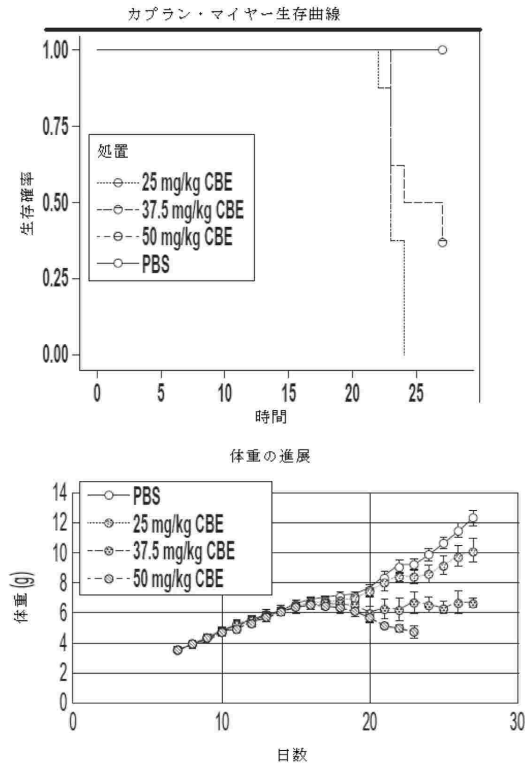
20

30

40

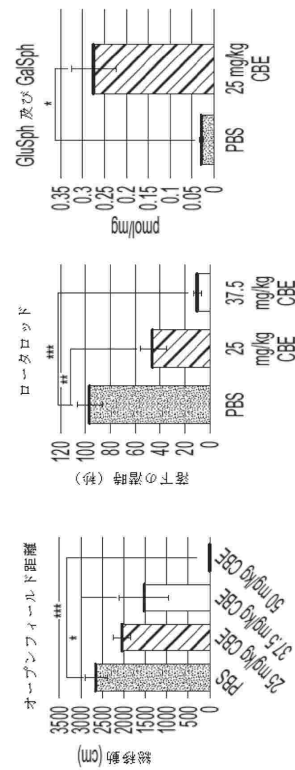
50

【図 9 - 1】

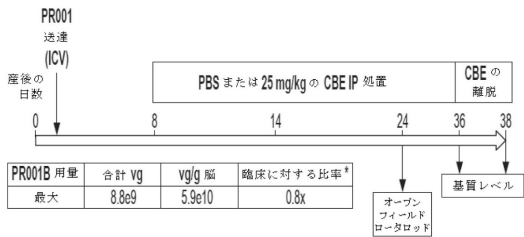


【図 9 - 2】

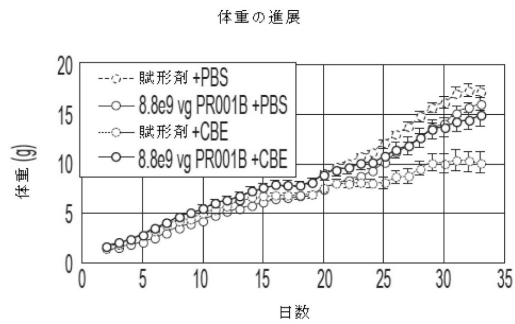
(続き)



【図 10】

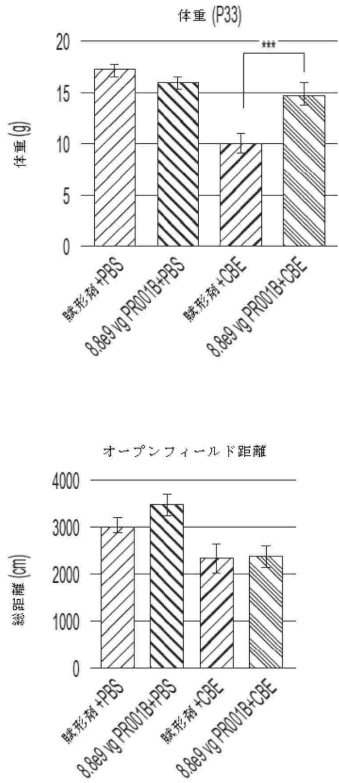


【図 11 - 1】



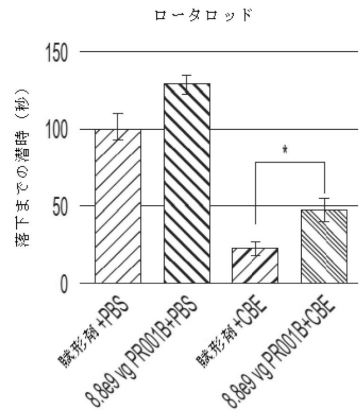
【図 1 1 - 2】

(続き)



【図 1 1 - 3】

(続き)

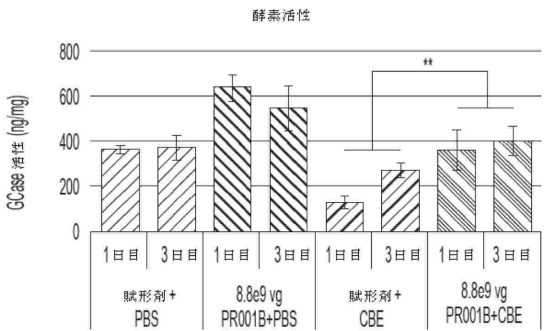


10

20

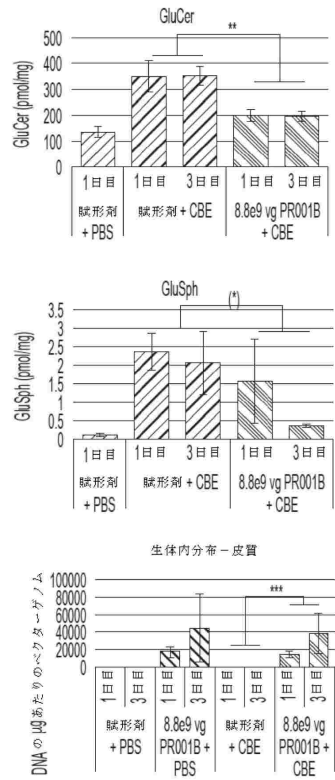
【図 1 2 - 1】

(続き)



【図 1 2 - 2】

(続き)

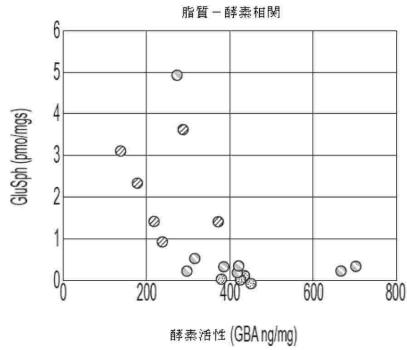
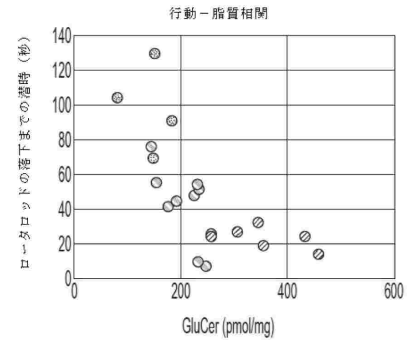


30

40

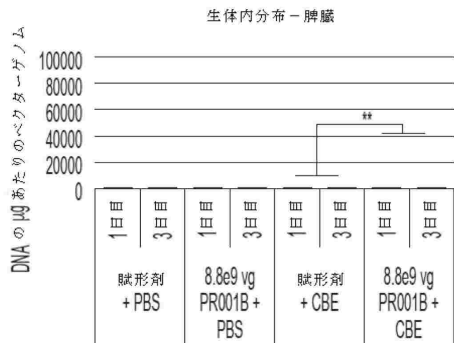
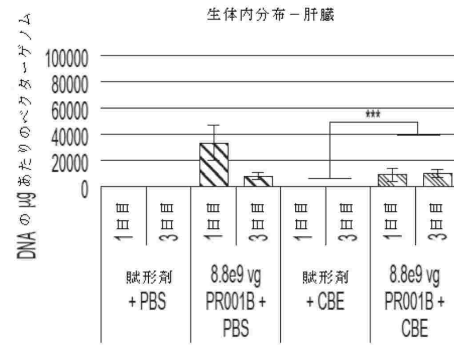
50

【図 1 3】



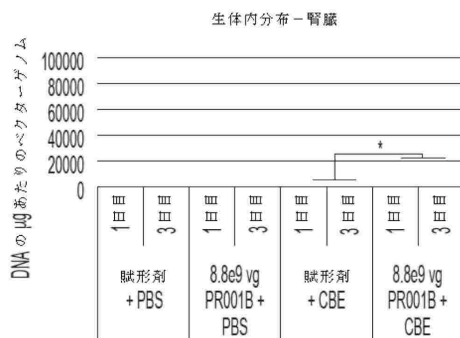
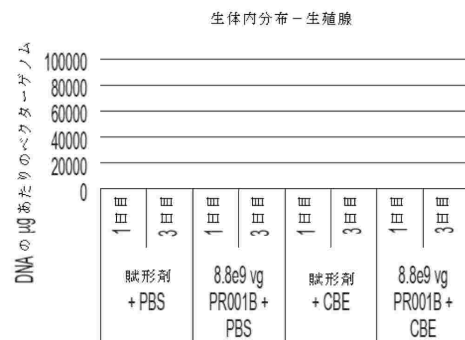
● 賦形剤 + PBS    ● 賦形剤 + CBE    ● 8.8e9 vg PR001B + CBE

【図 1 4 - 1】

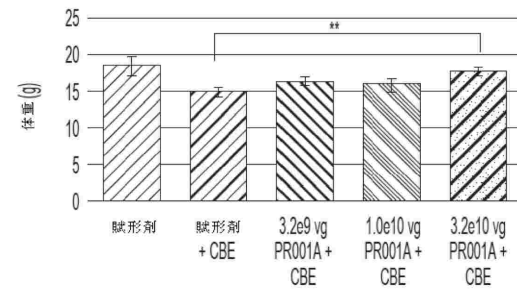
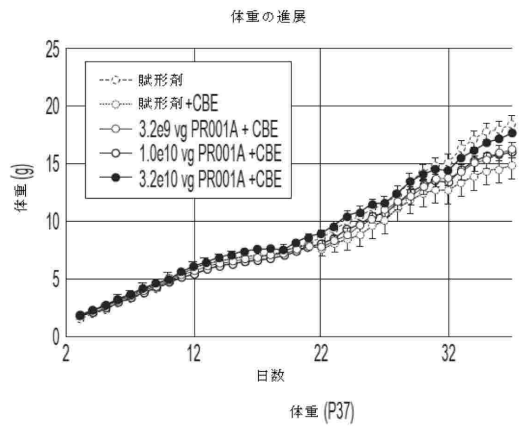


【図 1 4 - 2】

(続き)



【図 1 5 - 1】



10

20

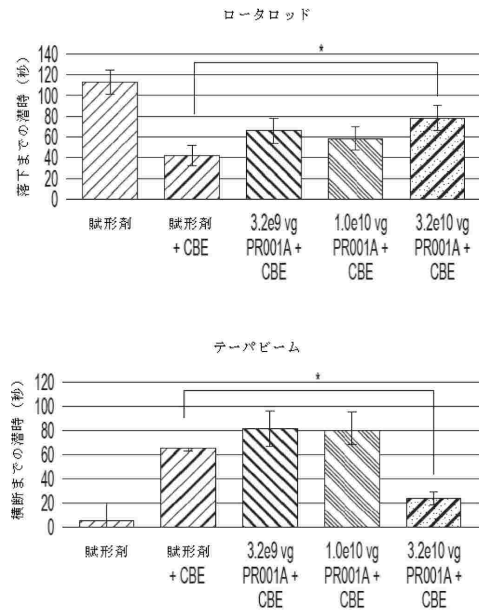
30

40

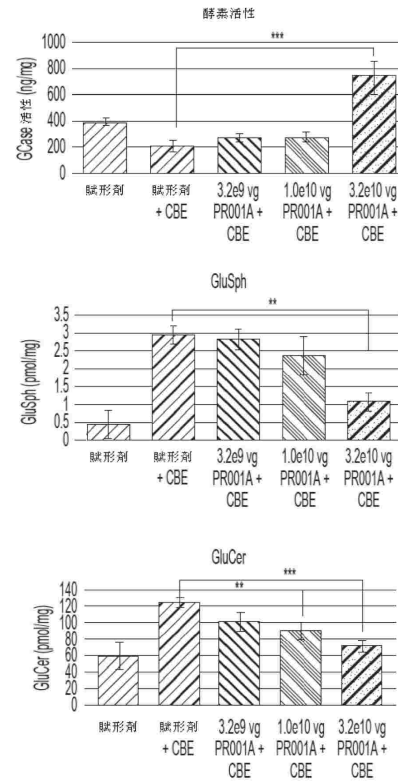
50

【図 15-2】

(続き)

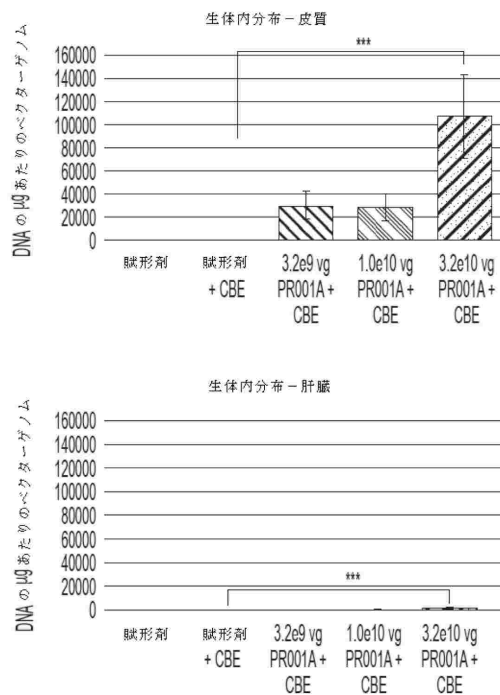


【図 16-1】

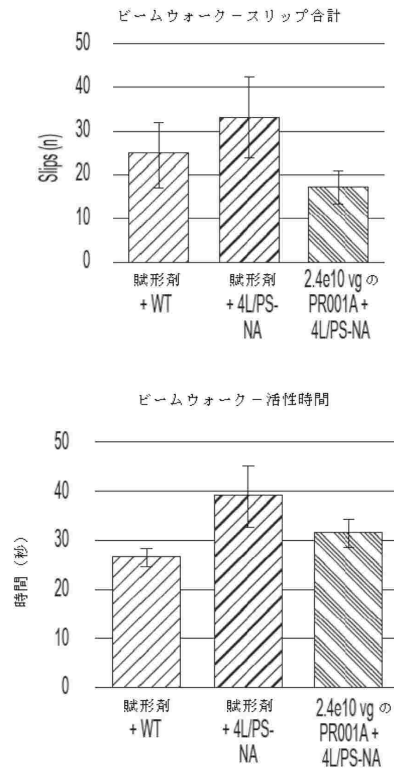


【図 16-2】

(続き)



【図 17-1】



10

20

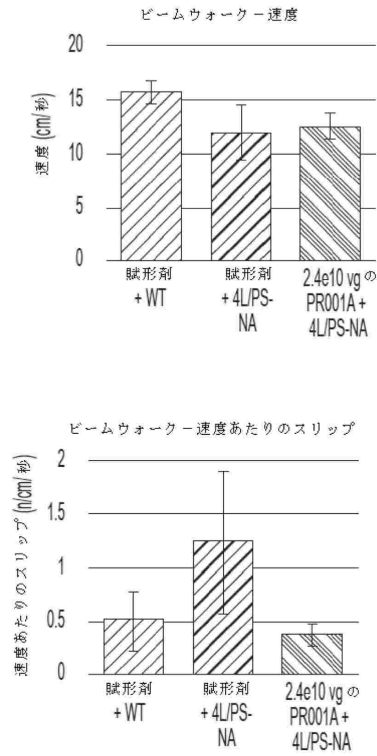
30

40

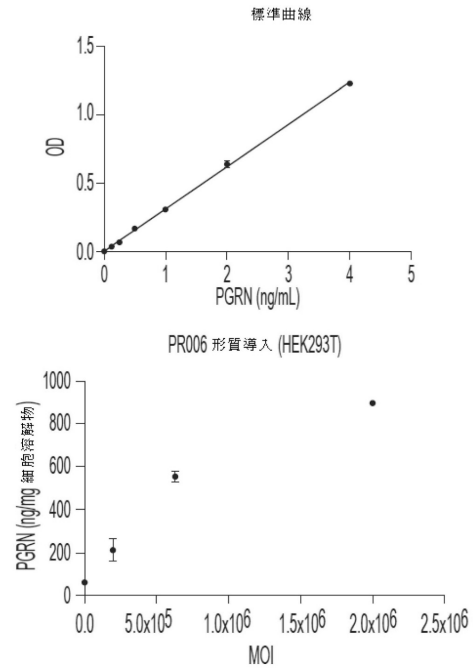
50

【図 17-2】

(続き)



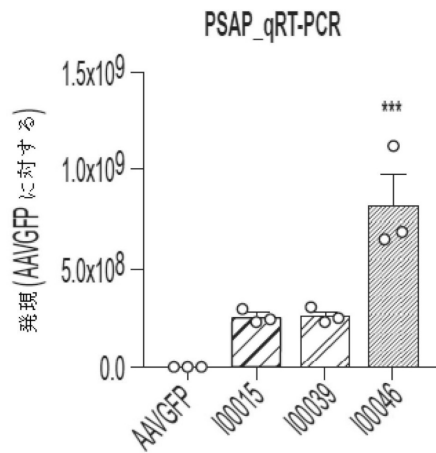
【図 18】



10

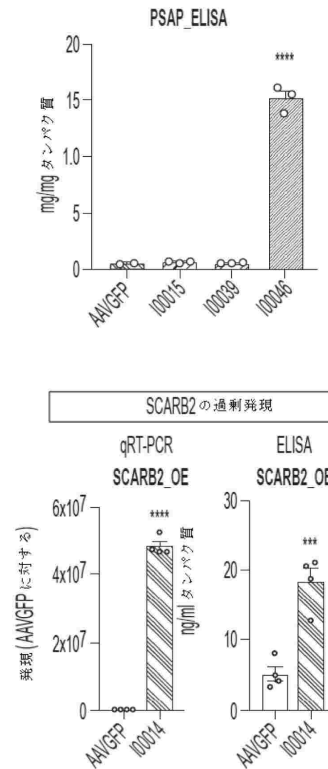
20

【図 19-1】



【図 19-2】

(続き)



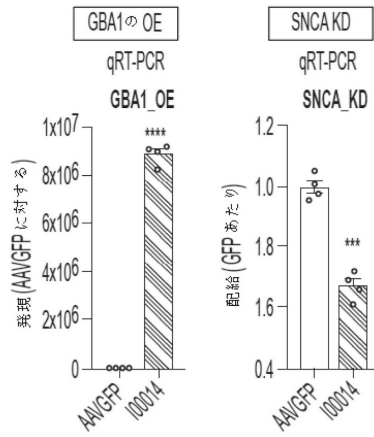
30

40

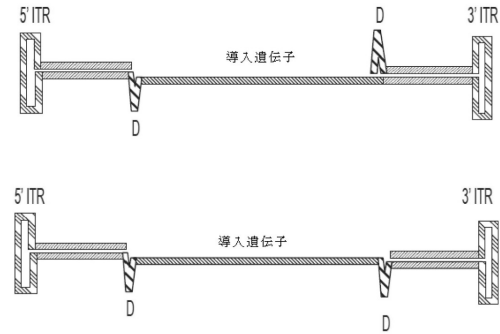
50

【図 19-3】

(続き)

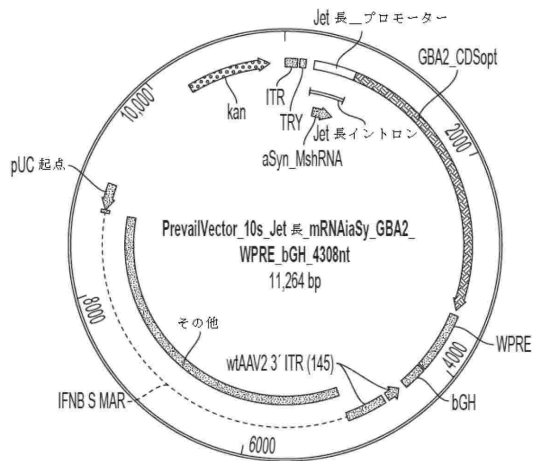


【図 20】

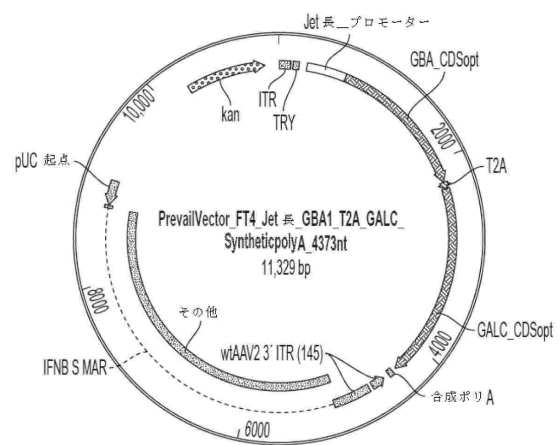


10

【図 21】



【図 22】



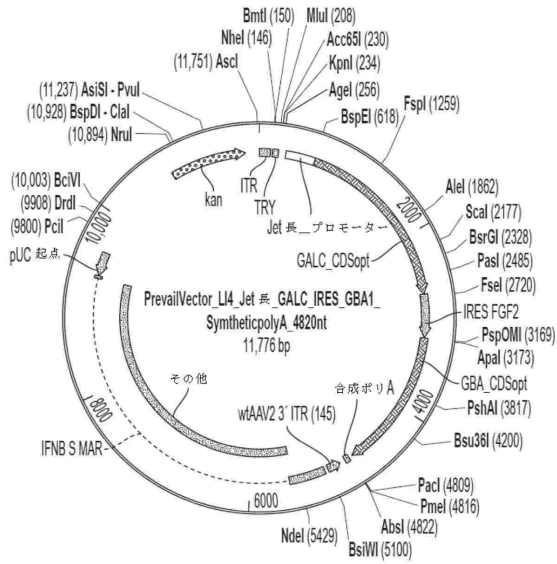
20

30

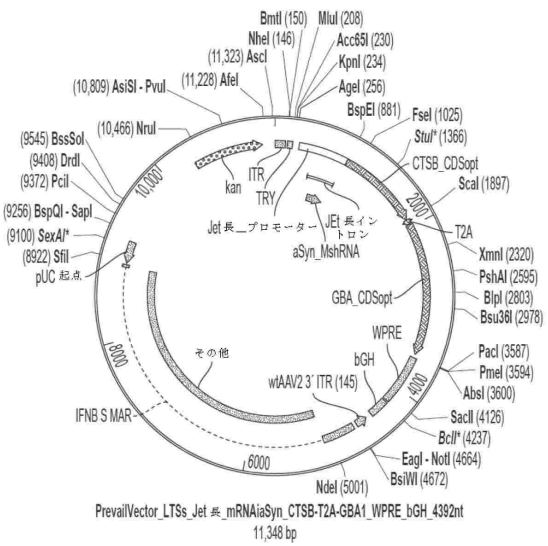
40

50

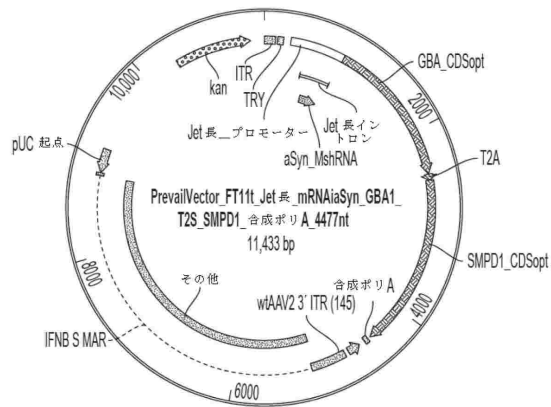
【図 2 3】



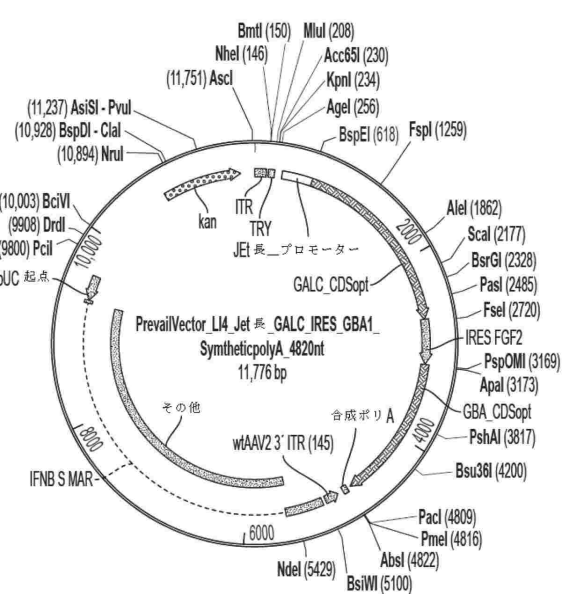
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

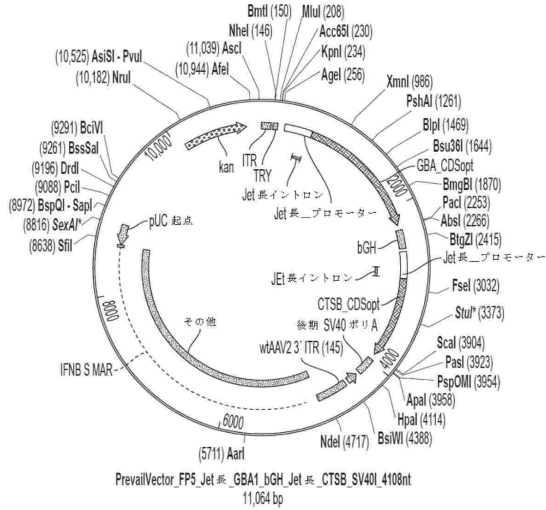
20

30

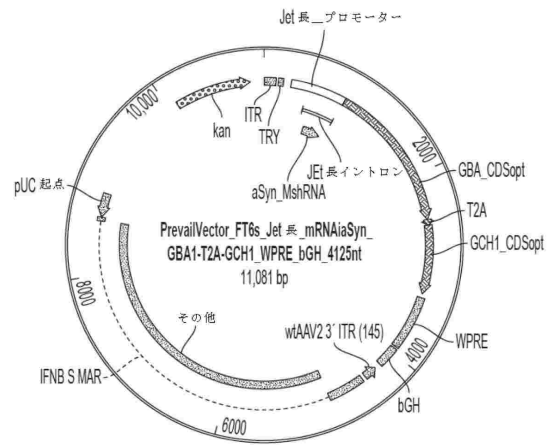
40

50

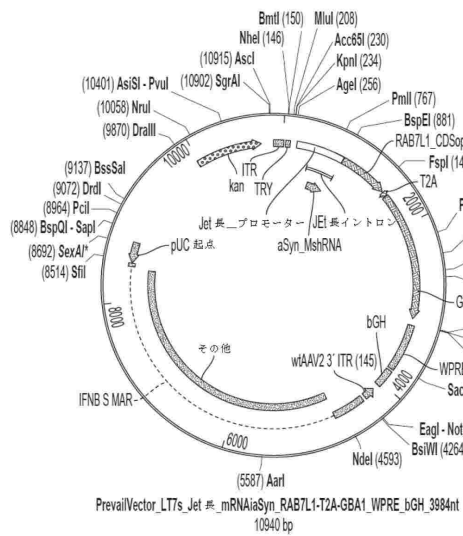
【図 27】



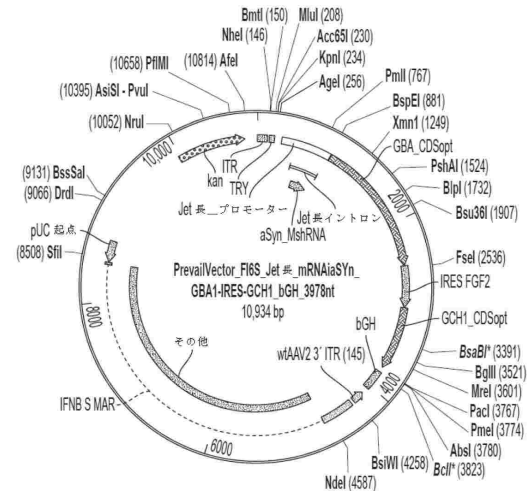
【図 28】



【図 29】



【図 30】



10

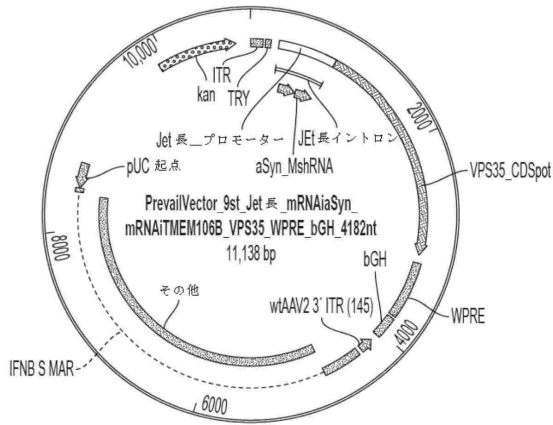
20

30

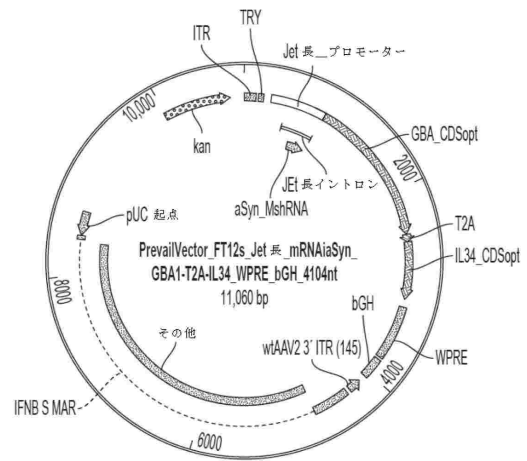
40

50

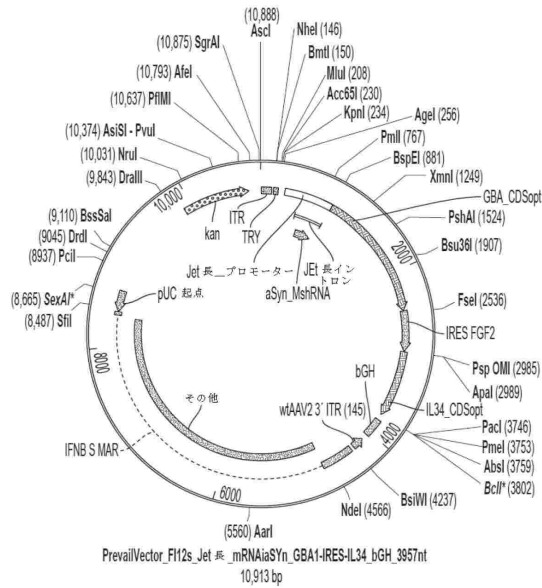
【図 3 1】



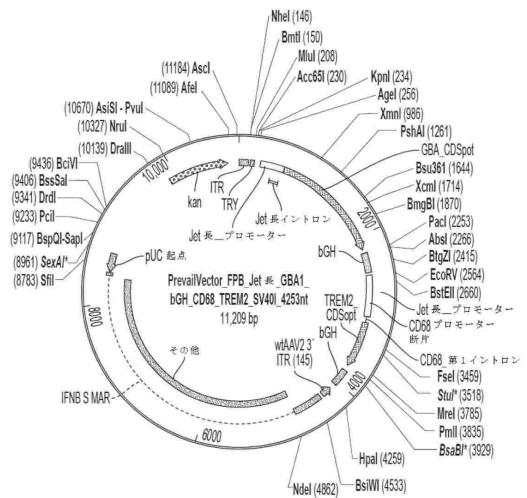
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



10

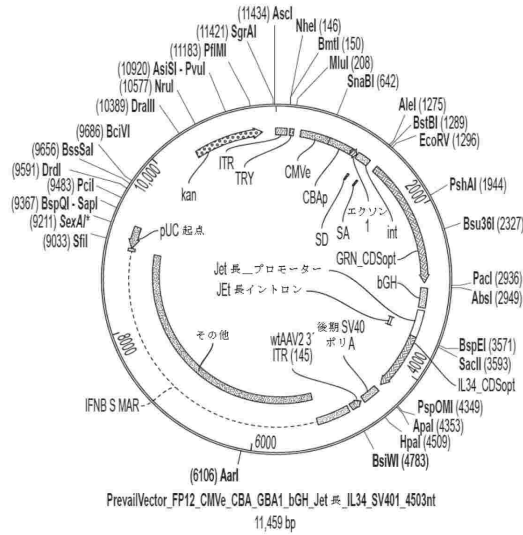
20

30

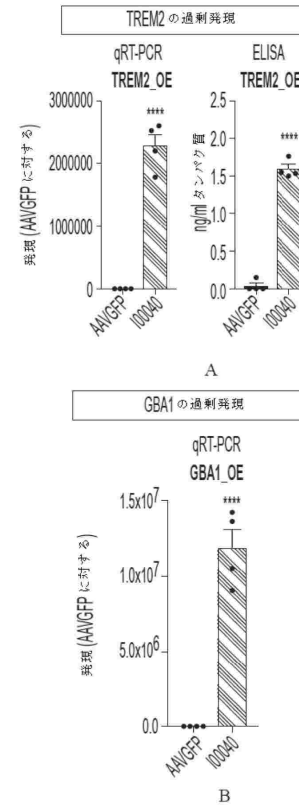
40

50

【図 35】



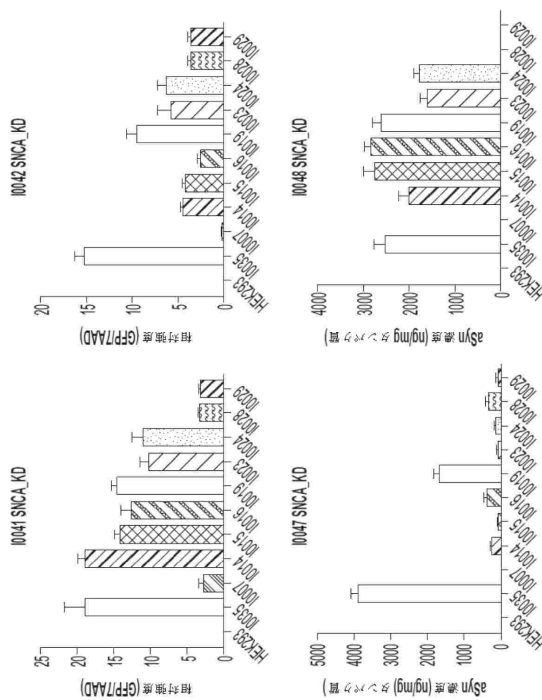
【図 36】



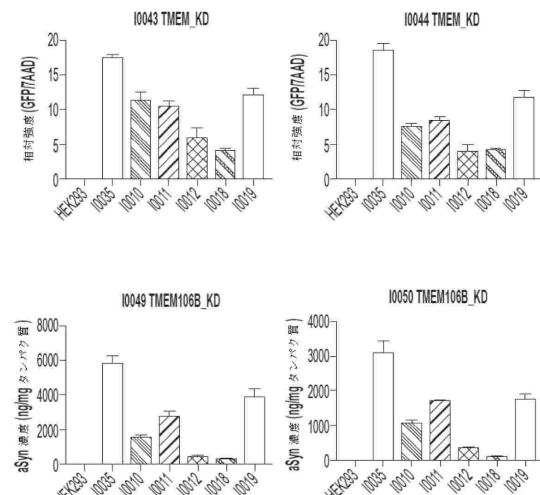
10

20

【図 37】



【図 38】

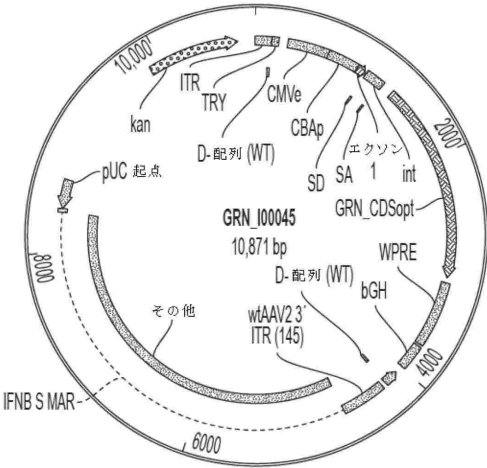


30

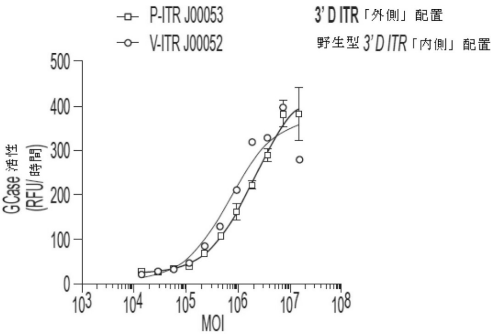
40

50

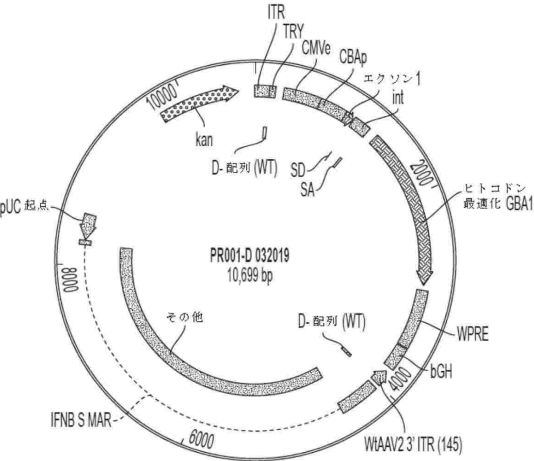
【図 39】



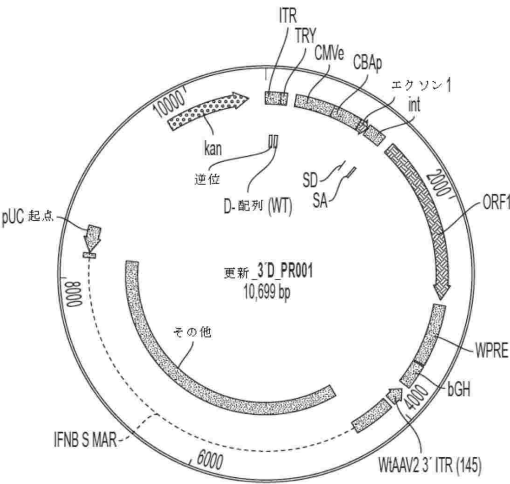
【図 40】



【図 41】



【図 42】



10

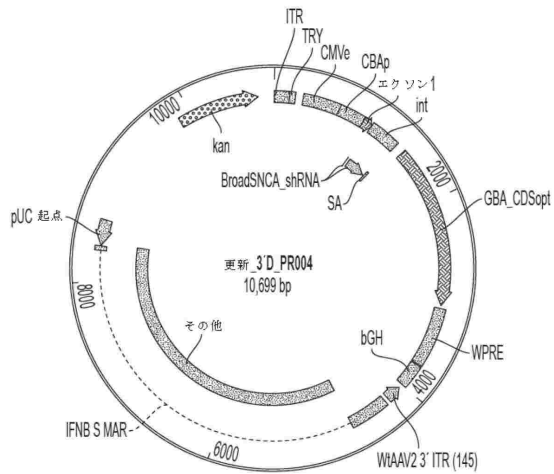
20

30

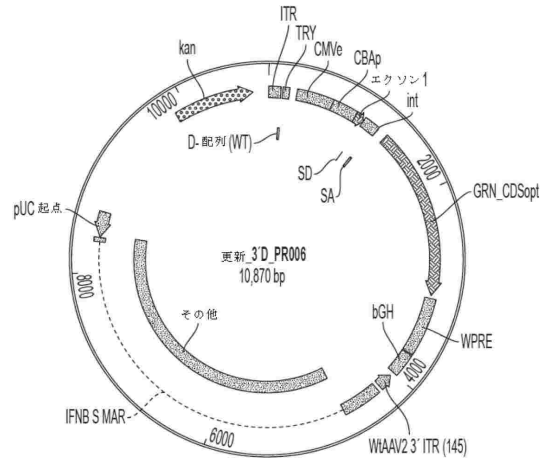
40

50

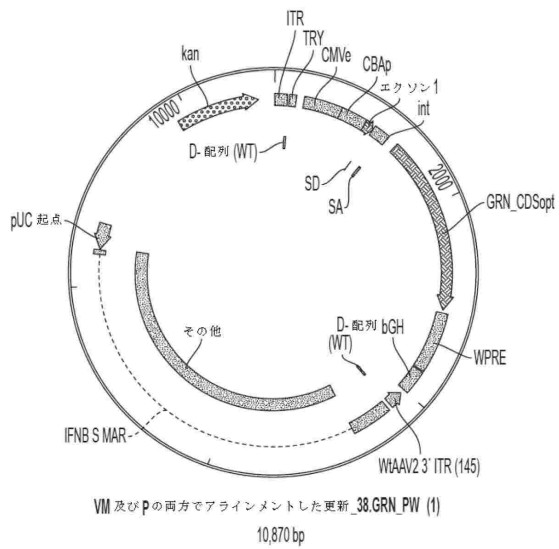
【図 4 3】



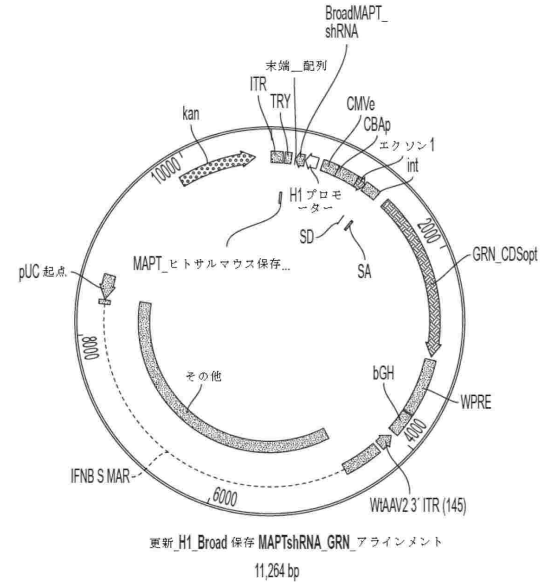
【図 4 4】



【図 4 5】



【図 4 6】



10

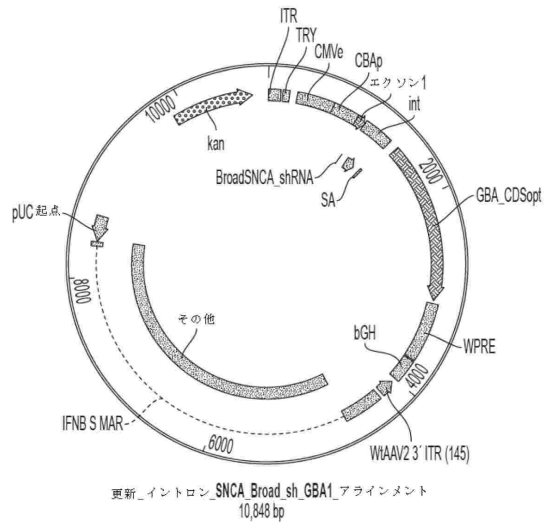
20

30

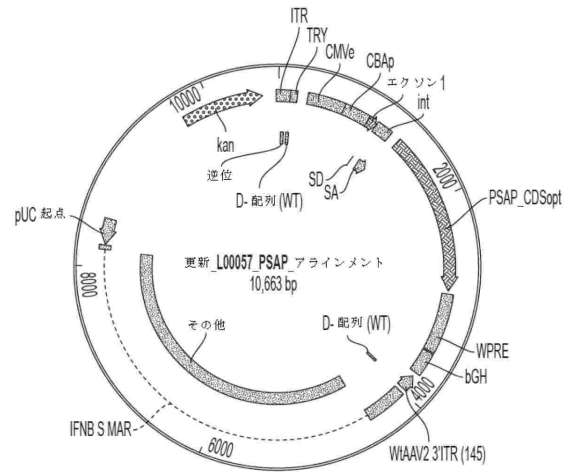
40

50

【図 47】

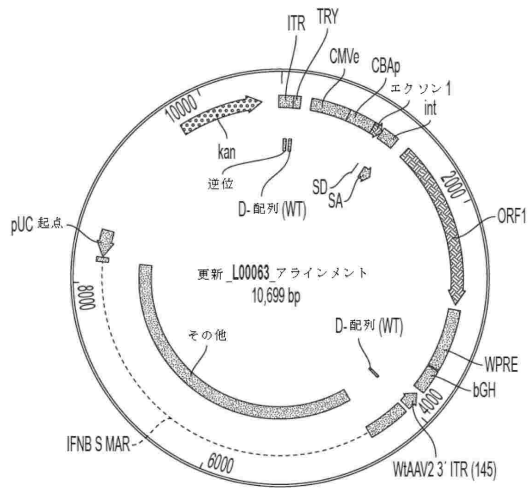


【図 48】

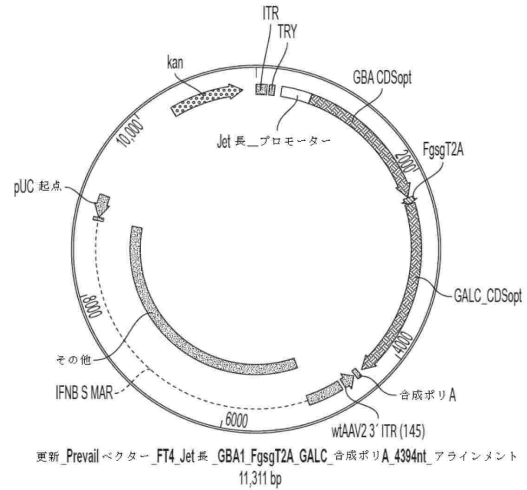


10

【図 49】



【図 50】



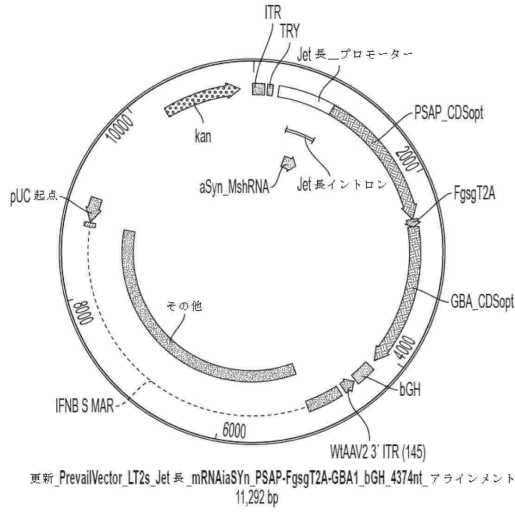
20

30

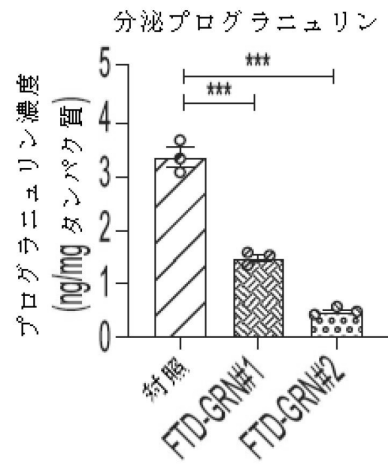
40

50

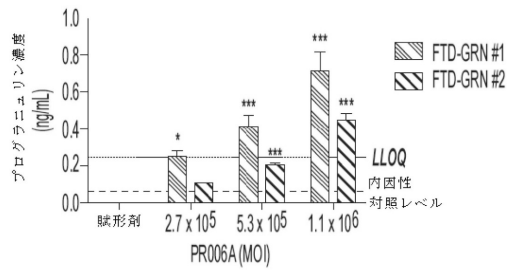
【図 5 1】



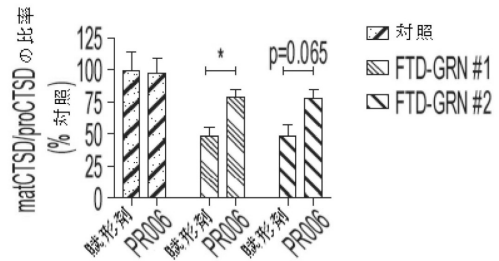
【図 5 2 A】



【図 5 2 B】



【図 5 2 C】



10

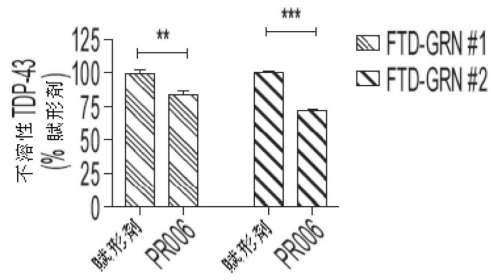
20

30

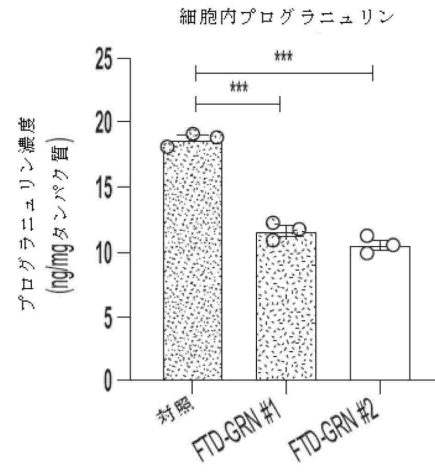
40

50

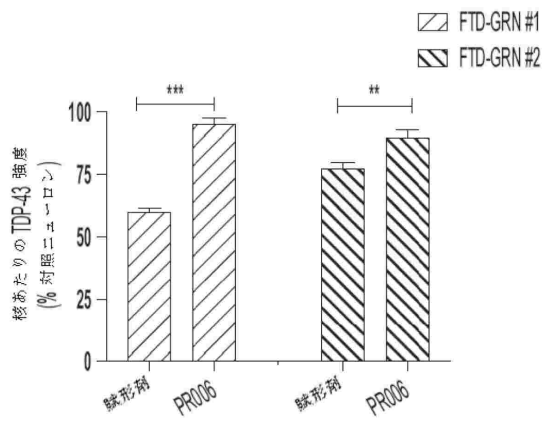
【図 5 2 D】



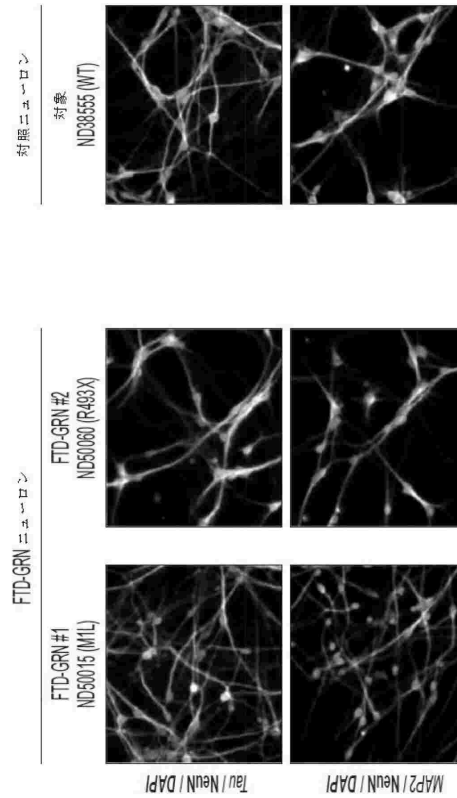
【図 5 2 E】



【図 5 2 F】



【図 5 2 G】



10

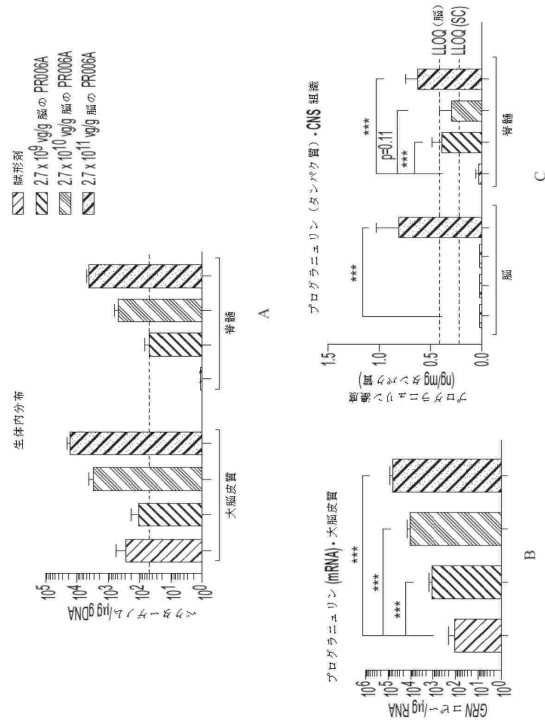
20

30

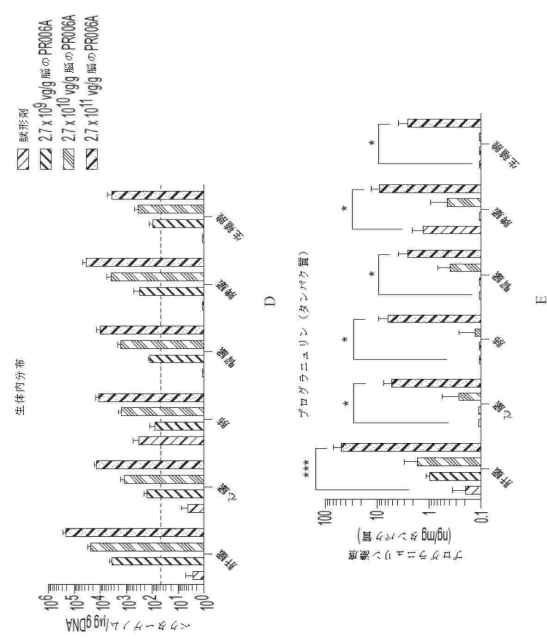
40

50

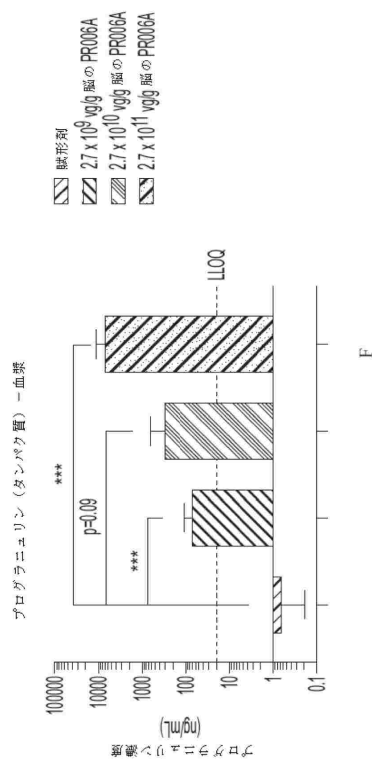
【図 5 3 - 1】



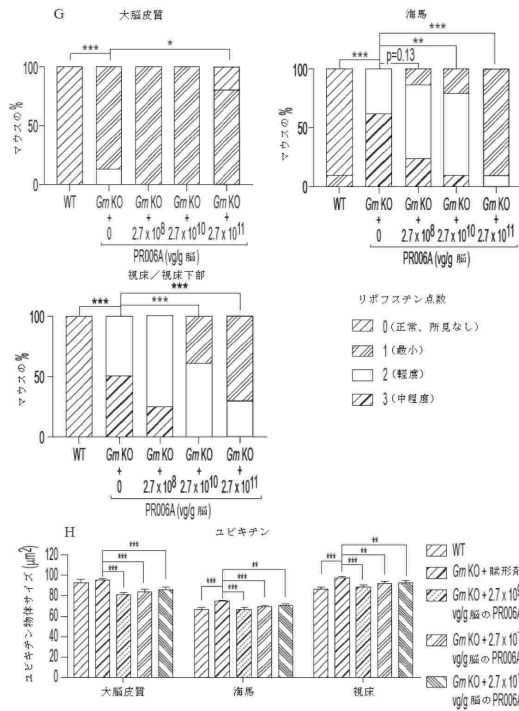
【図 5 3 - 2】



【図 5 3 - 3】



【図 5 3 - 4】



10

20

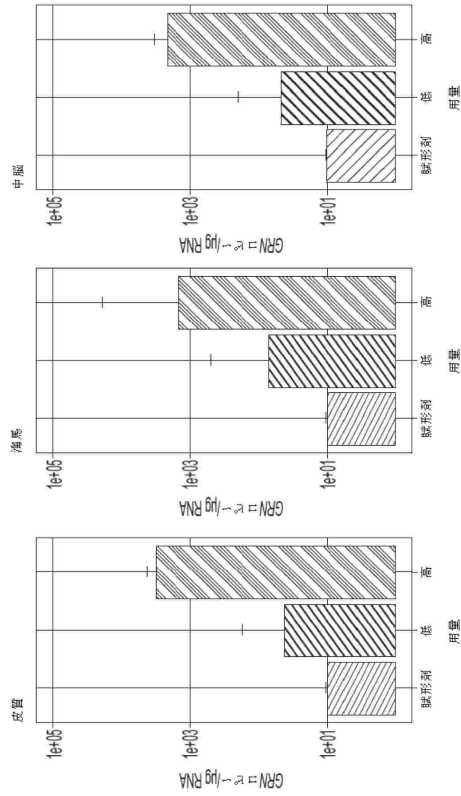
30

40

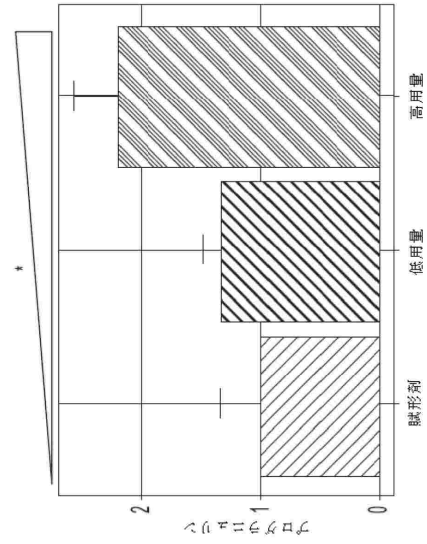
50



【図 5 4 C】



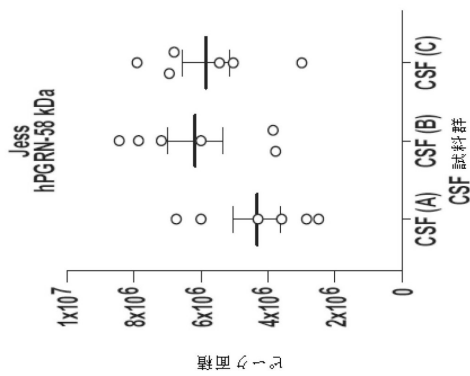
【図 5 4 D】



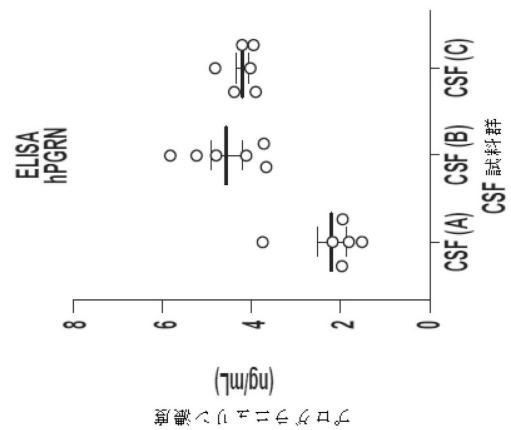
10

20

【図 5 5】



【図 5 6】



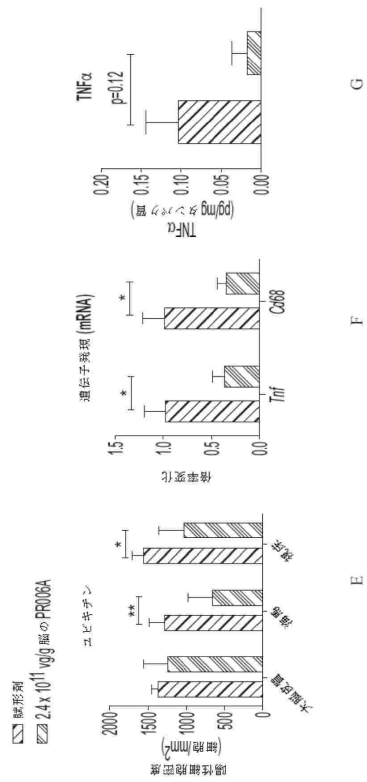
30

40

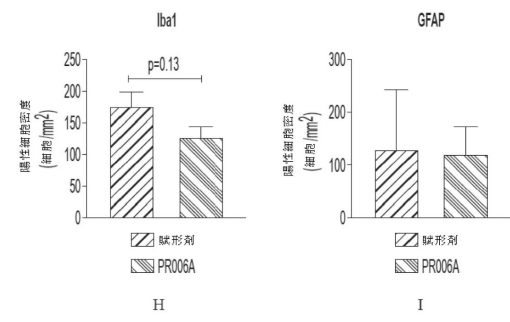
50



【図 5 9 - 3】



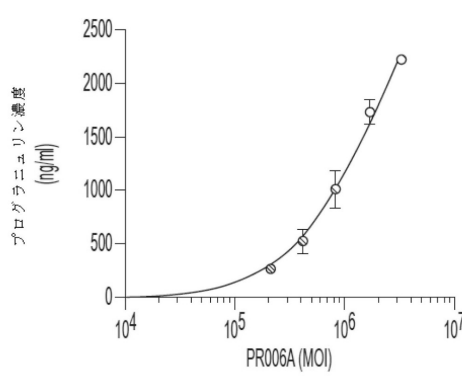
【図 5 9 - 4】



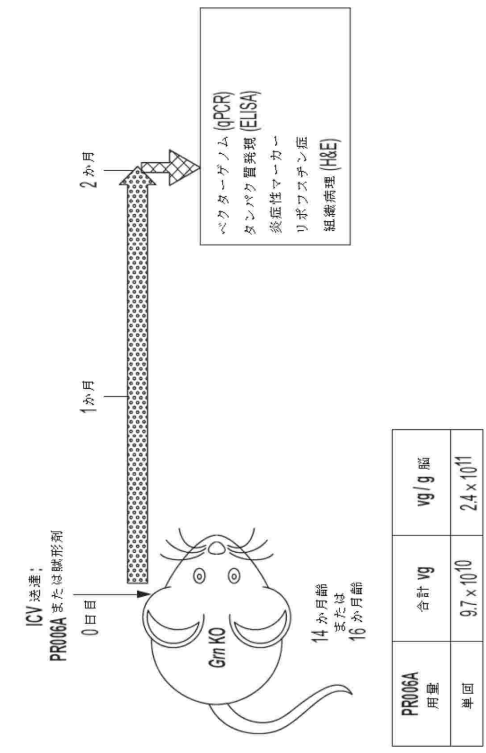
10

20

【図 6 0】



【図 6 1】



30

40

50



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

|         |       |           |         |       |
|---------|-------|-----------|---------|-------|
| A 6 1 K | 47/02 | (2006.01) | A 6 1 K | 47/02 |
| A 6 1 K | 47/34 | (2017.01) | A 6 1 K | 47/34 |
| A 6 1 K | 9/08  | (2006.01) | A 6 1 K | 9/08  |

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/954,089

## (32)優先日 令和1年12月27日(2019.12.27)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/960,471

## (32)優先日 令和2年1月13日(2020.1.13)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/988,665

## (32)優先日 令和2年3月12日(2020.3.12)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、イースト 3 5 ス ストリート 2 0  
、アパートメント 1 5 イー

## (72)発明者 ヘックマン, ローラ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、イースト 2 9 ス ストリート 4 3  
0、スイート 9 4 0

## (72)発明者 ウォン, リー チン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、イースト 2 9 ス ストリート 4 3  
0、スイート 9 4 0

## (72)発明者 リン, シュアンニ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、イースト 2 9 ス ストリート 4 3  
0、スイート 9 4 0

## (72)発明者 ヘフティ, フランツ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 1、ニューヨーク、イースト 7 4 ス ストリート 2 0  
、アパートメント 1 4 エフ

## (72)発明者 ライン, エルベ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、イースト 2 9 ス ストリート 4 3  
0、スイート 9 4 0

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 AMADO, D.A. et al., bioRxiv, 2018年04月27日, doi: <https://doi.org/10.1101/308692>

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K

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