(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-508910
(P2025-508910A)
(43)公表日　令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*15/864 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/86 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/86	Ｚ	４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	４Ｃ０８６

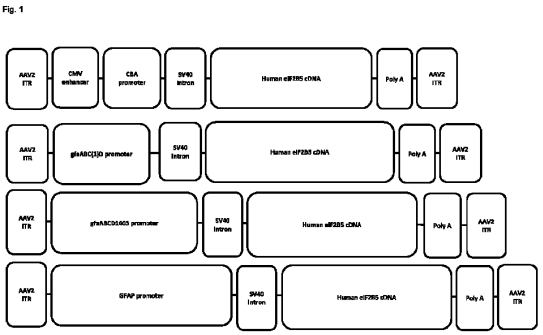
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全89頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-550836(P2024-550836)
(86)(22)出願日　令和5年3月3日(2023.3.3)
(85)翻訳文提出日　令和6年8月28日(2024.8.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/063676
(87)国際公開番号　WO2023/168400
(87)国際公開日　令和5年9月7日(2023.9.7)
(31)優先権主張番号　63/316,241
(32)優先日　令和4年3月3日(2022.3.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/387,223
(32)優先日　令和4年12月13日(2022.12.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　515289842
リサーチ インスティチュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０５，コロンバス， チルドレンズ ドライブ ７００， ルーム ダブリュー１７２
(71)出願人　516070955
ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ ファンデーション
アメリカ合衆国，ユタ ８４１１２，ソルト レイク シティ，サウス プレジデンツ サークル ２０１，ルーム ２１０
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田 誠
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＥＩＦ２Ｂ５の変異及びそれに起因する疾患の治療のための材料及び方法

(57)【要約】
真核生物翻訳開始因子２Ｂサブユニットイプシロン（ＥＩＦ２Ｂ５）遺伝子の変異の治療のために設計された、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などの遺伝子治療ベクターが提供される。ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子は、ｅＩＦ２Ｂタンパク質の５つのサブユニットのうちの１つ、具体的には、このタンパク質のイプシロンサブユニットを作製するための指示を提供する。そのような変異は、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、及び／又は巨大軸索ニューロパチーなどの疾患又は障害に関連する。そのような白質脳症又は白質ジストロフィーとしては、白質消失病（ＶＷＭ）が挙げられるが、これに限定されない。開示される遺伝子治療ベクターは、必要とする対象にＥＩＦ２Ｂ５　ｃＤＮＡを提供し、これは、野生型又は機能



【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）１つ以上の調節制御エレメント、及び
（ｂ）真核生物翻訳開始因子２Ｂサブユニットイプシロン５（ＥＩＦ２Ｂ５）ｃＤＮＡ配列、を含むポリヌクレオチドを含む、核酸。
【請求項２】
前記ＥＩＦ２ＢＢ５　ｃＤＮＡが、
（ａ）配列番号１に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、
（ｂ）配列番号１に示されるヌクレオチド配列、又は
（ｃ）配列番号２に示されるアミノ配列を含むＥＩＦ２ＢＢ５をコードするヌクレオチド配列、を含む、請求項１に記載の核酸。
【請求項３】
前記１つ以上の調節制御エレメントが、ＣＡＧプロモーター、ｇｆａＡＢＣ１Ｄプロモーター、ＧＦＡＰプロモーター、又はｇｆａ１４０５プロモーターである、請求項１～３のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項４】
前記調節制御エレメントが、
（ａ）配列番号３、４、５、若しくは１５に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は
（ｂ）配列番号３、４、５、若しくは１５に示されるヌクレオチド配列、を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項５】
ＳＶ４０イントロン及び転写後ポリアデニル化（ポリＡ）配列を更に含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項６】
（ａ）配列番号６～８及び１６のうちのいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は
（ｂ）配列番号６～８及び１６のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列、を含む、請求項５に記載の核酸。
【請求項７】
逆位末端反復配列を更に含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項８】
（ａ）配列番号９～１１及び１７のうちのいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は
（ｂ）配列番号９～１１及び１７のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列、を含む、請求項７に記載の核酸。
【請求項９】
（ａ）配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は
（ｂ）配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列、を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項１０】
請求項１～８のいずれか一項に記載の核酸又はそれらの任意の１つ以上の組み合わせを含む、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、又はベクター。
【請求項１１】
前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項１０に記載のベクター。
【請求項１２】
前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、バキュロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、又は合成ウイルスである、請求項１１に記載のウイルスベクター

。
【請求項１３】
前記ウイルスベクターが、ＡＡＶである、請求項１１又は１２に記載のウイルスベクター。
【請求項１４】
前記ＡＡＶが、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く、請求項１３に記載のウイルスベクター。
【請求項１５】
前記ＡＡＶが、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）、自己相補的組換えＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）、又は一本鎖組換えＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）である、請求項１３又は１４に記載のウイルスベクター。
【請求項１６】
ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶａｎｃ８０、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、若しくはＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、又はそれらの誘導体のうちのいずれか、請求項１３～１５のいずれか一項に記載のＡＡＶ。
【請求項１７】
前記ＡＡＶが、ＡＡＶ９である、請求項１３～１６のいずれか一項に記載のＡＡＶ。
【請求項１８】
請求項１２～１６のいずれか一項に記載のＡＡＶを含む、ｒＡＡＶ粒子。
【請求項１９】
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項１０に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項１１～１７のいずれか一項に記載のウイルスベクター、又は
（ｄ）請求項１８に記載のｒＡＡＶ粒子、及び
薬学的に許容される担体、を含む、組成物。
【請求項２０】
髄腔内脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達用に製剤化される、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
細胞におけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子又はＥＩＦ２Ｂ５タンパク質の発現を増加させる方法であって、前記細胞を、
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項１０に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項１１～１７のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項１８に記載のｒＡＡＶ粒子、又は、
（ｅ）請求項１９若しくは２０に記載の組成物、と接触させることを含む、方法。
【請求項２２】
前記細胞が、アストロサイトである、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項２０又は２１に記載の方法。
【請求項２４】
前記細胞が、ヒト対象中にある、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
ＥＩＦ２ＢＢ５遺伝子の変異を含む対象を治療する方法であって、前記対象に、有効量の
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項１０に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項１１～１７のいずれか一項に記載のウイルスベクター、

（ｄ）請求項１８に記載のｒＡＡＶ粒子、又は、
（ｅ）請求項１９若しくは２０に記載の組成物、を投与することを含む、方法。
【請求項２６】
前記対象が、ヒト対象である、請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＥＩＦ２ＢＢ５遺伝子の変異が、対象に、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、及び／又は巨大軸索ニューロパチーを罹患させるか、又は罹患のリスクを引き起こす、請求項２５又は２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記白質脳症又は白質ジストロフィーが、白質消失病（ＶＷＭ）である、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上を前記対象に投与することを更に含む、請求項２５～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
前記核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成物が、髄腔内脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達によって投与される、請求項２５～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
細胞におけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子又はタンパク質の発現を増加させるための医薬の調製のための、
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項１０に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項１１～１７のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項１８に記載のｒＡＡＶ粒子、又は、
（ｅ）請求項１９若しくは２０に記載の組成物、の使用。
【請求項３２】
前記細胞が、ヒト対象中にある、請求項３１に記載の使用。
【請求項３３】
変異ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子を含む対象の治療における、
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項１０に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項１１～１７のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項１８に記載のｒＡＡＶ粒子、又は、
（ｅ）請求項１９若しくは２０に記載の組成物、の使用。
【請求項３４】
前記対象が、ヒト対象である、請求項３３に記載の使用。
【請求項３５】
前記対象が、ＥＩＦ２Ｂ５の変異を患う、請求項３１～３４のいずれか一項に記載の使用。
【請求項３６】
前記ＥＩＦ２Ｂ５の変異が、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、及び／又は白

質消失（ＶＷＭ）病に関連する、請求項３５に記載の使用。
【請求項３７】
前記医薬が、コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上とともに投与される、請求項３１～３６のいずれか一項に記載の使用。
【請求項３８】
前記医薬が、髄腔内脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達用に製剤化される、請求項３１～３７のいずれか一項に記載の使用。
【請求項３９】
対象におけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子の変異、白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、及び／又は大頭型白質脳症を治療するための組成物であって、
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項１０に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項１１～１７のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項１８に記載のｒＡＡＶ粒子、又は、
（ｅ）請求項１９若しくは２０に記載の組成物、を含む、組成物。
【請求項４０】
前記対象が、ヒト対象である、請求項３９に記載の組成物。
【請求項４１】
前記白質脳症又は白質ジストロフィーが、白質消失病（ＶＷＭ）である、請求項３９又は４０に記載の組成物。
【請求項４２】
前記核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、組成物、又は医薬が、脳脊髄液（ＣＳＦ）への髄腔内注射、血流への静脈内注射、脳内注射、脳室内注射、槽内注射、又はエアロゾル投与用に製剤化される、
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項１０に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項１１～１７のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項１８に記載のｒＡＡＶ粒子、
（ｅ）請求項１９若しくは２０に記載の組成物、
（ｆ）請求項２１～３０のいずれか一項に記載の方法、又は
（ｇ）請求項３１～３８のいずれか一項に記載の使用。
【請求項４３】
（ａ）配列番号１５に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は
（ｂ）配列番号１５に示されるヌクレオチド配列、を含むｇｆａ１４０５プロモーターを含む、核酸。
【請求項４４】
逆位末端反復配列を更に含む、請求項４３に記載の核酸。
【請求項４５】
（ａ）配列番号１７に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は
（ｂ）配列番号１７に示されるヌクレオチド配列、を含む、請求項４４に記載の核酸。
【請求項４６】
（ａ）配列番号１８に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は
（ｂ）配列番号１８に示されるヌクレオチド配列、を含む、請求項４３～４５のいずれ

か一項に記載の核酸。
【請求項４７】
請求項４３～４５のいずれか一項に記載の核酸又はそれらの任意の１つ以上の組み合わせを含む、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、又はベクター。
【請求項４８】
前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項４７に記載のベクター。
【請求項４９】
前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、バキュロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、又は合成ウイルスである、請求項４８に記載のウイルスベクター。
【請求項５０】
前記ウイルスベクターが、ＡＡＶである、請求項４８又は４９に記載のウイルスベクター。
【請求項５１】
前記ＡＡＶが、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く、請求項５０に記載のウイルスベクター。
【請求項５２】
前記ＡＡＶが、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）、自己相補的組換えＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）、又は一本鎖組換えＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）である、請求項５０又は５１に記載のウイルスベクター。
【請求項５３】
ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶａｎｃ８０、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、若しくはＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、又はそれらの誘導体のうちのいずれか、請求項５０～５２のいずれか一項に記載のＡＡＶ。
【請求項５４】
前記ＡＡＶが、ＡＡＶ９である、請求項５０～５３のいずれか一項に記載のＡＡＶ。
【請求項５５】
請求項５０～５４のいずれか一項に記載のＡＡＶを含む、ｒＡＡＶ粒子。
【請求項５６】
（ａ）請求項４３～４６のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項４７に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項４８～５２のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項５３若しくは５４に記載のＡＡＶ、又は
（ｅ）請求項５５に記載のｒＡＡＶ粒子、及び
薬学的に許容される担体、を含む、組成物。
【請求項５７】
髄腔内脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達用に製剤化される、請求項５６に記載の組成物。
【請求項５８】
細胞における遺伝子又はタンパク質の発現を増加させる方法であって、前記細胞を、
（ａ）請求項４３～４６のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項４７に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項４８～５２のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項５３若しくは５４に記載のＡＡＶ、
（ｅ）請求項５５に記載のｒＡＡＶ粒子、又は
（ｆ）請求項５６若しくは５７に記載の組成物、と接触させることを含む、方法。
【請求項５９】

前記細胞が、アストロサイト又はニューロンである、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項５８又は５９に記載の方法。
【請求項６１】
前記細胞が、ヒト対象中にある、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
対象のアストロサイト又はニューロンにおいて通常発現される遺伝子に変異を含む前記対象を治療する方法であって、前記対象に、有効量の
（ａ）請求項４３～４６のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項４７に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項４８～５２のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項５３若しくは５４に記載のＡＡＶ、
（ｅ）請求項５５に記載のｒＡＡＶ粒子、又は
（ｆ）請求項５６若しくは５７に記載の組成物、を投与することを含む、方法。
【請求項６３】
前記対象が、ヒト対象である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記遺伝子の変異が、対象に、アストロサイト又はニューロン障害又は疾患に罹患させるか、又は罹患のリスクを引き起こす、請求項６２又は６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記障害又は疾患が、白質脳症又は白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、及び／又は大頭型白質脳症である、請求項６２～６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
前記白質脳症又は白質ジストロフィーが、白質消失病（ＶＷＭ）である、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上を前記対象に投与することを更に含む、請求項６２～６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
前記核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成物が、髄腔内脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達によって投与される、請求項６２～６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９】
細胞における遺伝子又はタンパク質の発現を増加させるための医薬の調製のための、
（ａ）請求項４３～４６のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項４７に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項４８～５２のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項５３若しくは５４に記載のＡＡＶ、
（ｅ）請求項５５に記載のｒＡＡＶ粒子、又は
（ｆ）請求項５６若しくは５７に記載の組成物、
の使用。
【請求項７０】
前記細胞が、ヒト対象中にある、請求項６９に記載の使用。
【請求項７１】
変異遺伝子を含む対象の治療における、
（ａ）請求項４３～４６のいずれか一項に記載の核酸、

（ｂ）請求項４７に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項４８～５２のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項５３若しくは５４に記載のＡＡＶ、
（ｅ）請求項５５に記載のｒＡＡＶ粒子、
（ｆ）請求項５６若しくは５７に記載の組成物、又は
（ｇ）請求項５８～６８のいずれか一項に記載の方法、の使用。

【請求項７２】

前記対象が、ヒト対象である、請求項７１に記載の使用。

【請求項７３】

前記対象が、中枢神経系及び／又は脳に影響を及ぼす遺伝子の変異、又は障害若しくは疾患に罹患している、請求項６９～７２のいずれか一項に記載の使用。

【請求項７４】

前記対象が、脳のアストロサイト若しくはニューロンに影響を及ぼす、遺伝子の変異、又は障害若しくは疾患に罹患している、請求項６９～７２のいずれか一項に記載の使用。

【請求項７５】

前記対象が、白質脳症又は白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、及び／又は大頭型白質脳症に罹患している、請求項７３又は７４に記載の使用。

【請求項７６】

前記白質脳症又は白質ジストロフィーが、白質消失病（ＶＷＭ）である、請求項７５に記載の使用。

【請求項７７】

前記医薬が、コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上とともに投与される、請求項６９～７６のいずれか一項に記載の使用。

【請求項７８】

前記医薬が、髄腔内脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達用に製剤化される、請求項６９～７７のいずれか一項に記載の使用。

【請求項７９】

対象の中枢神経系及び／又は脳における遺伝子の変異、又は疾患若しくは障害を治療するための組成物であって、
（ａ）請求項４３～４６のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項４７に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項４８～５２のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項５３若しくは５４に記載のＡＡＶ、
（ｅ）請求項５５に記載のｒＡＡＶ粒子、又は
（ｆ）請求項５６若しくは５７に記載の組成物、を含む、組成物。

【請求項８０】

前記対象が、ヒト対象である、請求項７９に記載の組成物。

【請求項８１】

前記対象が、前記脳のアストロサイト又はニューロンに影響を及ぼす、遺伝子の変異、又は障害若しくは疾患に罹患している、請求項７９又は８０に記載の組成物。

【請求項８２】

前記対象が、白質脳症又は白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、及び／又は大頭型白質脳症に罹患している、

請求項８０又は８１に記載の組成物。
【請求項８３】
前記白質脳症又は白質ジストロフィーが、白質消失病（ＶＷＭ）である、請求項８２に記載の組成物。
【請求項８４】
前記核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、組成物、又は医薬が、脳脊髄液（ＣＳＦ）への髄腔内注射、血流への静脈内注射、脳内注射、脳室内注射、槽内注射、又はエアロゾル投与用に製剤化される、
（ａ）請求項４３～４６のいずれか一項に記載の核酸、
（ｂ）請求項４７に記載のナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、若しくはベクター、
（ｃ）請求項４８～５２のいずれか一項に記載のウイルスベクター、
（ｄ）請求項５３若しくは５４に記載のＡＡＶ、
（ｅ）請求項５５に記載のｒＡＡＶ粒子、又は
（ｆ）請求項５６若しくは５７、若しくは７９～８３に記載の組成物、
（ｇ）請求項５８～６８のいずれか一項に記載の方法、又は
（ｈ）請求項６９～７８のいずれか一項に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、本開示の別個の部分として、参照によりその全体が組み込まれ、以下のように特定されるコンピュータ可読形態の配列表を含む：５６４４０＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ．ＸＭＬ、サイズ：　７０，３９５バイト、作成日：２０２３年２月１６日。
【０００２】
本開示は、真核生物翻訳開始因子２Ｂサブユニットイプシロン５（ＥＩＦ２Ｂ５）タンパク質をコードする遺伝子の変異の治療のために設計された、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などの遺伝子治療ベクターを提供する。ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子におけるそのような変異は、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、又は白質消失（ＶＷＭ）病に関連する。開示される遺伝子治療ベクターは、必要とする対象にＥＩＦ２Ｂ５　ｃＤＮＡ又は野生型ＥＩＦ２Ｂ５　ｃＤＮＡを提供し、これは機能的又は野生型ＥＩＦ２Ｂ５タンパク質の発現をもたらす。本開示はまた、アストロサイト及び／又はニューロンにおける発現を標的とするように設計された新規のプロモーターを提供する。
【背景技術】
【０００３】
白質消失病（ＶＷＭ）は、深刻な白質ジストロフィーである（１～３）。ＶＷＭは、タンパク質翻訳の最初のステップに必要な、真核生物開始因子２Ｂ（ＥＩＦ２Ｂ）複合体の５つのサブユニット遺伝子における常染色体潜性変異によって引き起こされる。現在、ＶＷＭ疾患に対する治療法は存在しない。
【０００４】
研究は、ＶＷＭ変異の大部分がＥＩＦ２Ｂ５遺伝子内にあり、続いてＥＩＦ２Ｂ２遺伝子内にあることを示している（１、４）。病理の正確なメカニズムは不明のままであるが、グリア細胞の機能不全が病態生理の基礎であることは明らかである。ＥＩＦ２Ｂ５　ＶＷＭを有する個体の脳からの確立された細胞培養物により、健康な乏突起膠細胞は容易に生成されたことが明らかになったが、アストロサイトはほとんど存在しなかった。更に、アストロサイトの誘導は著しく減少し、生成された少数のアストロサイトは一様ではなかった。インビボの病変はまた、グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）陽性（ＧＦＡＰ＋）アストロサイトを欠いていた。更に、ＲＮＡ干渉によるｅＩＦ２Ｂ５の標的化は、正

常なヒトグリア前駆細胞からのＧＦＡＰ＋アストロサイトの誘導を著しく損なった（５）。現在、ｅＩＦ２Ｂ５　ＶＷＭのマウスモデルは３つ存在する（６～８）。白質アストロサイトの成熟障害は、発症前にあり、２つのモデルにおいて疾患の重症度及び進行と対応していた。共培養では、ＶＷＭアストロサイトは乏突起膠細胞の成熟を阻害する因子を分泌したが、ＷＴアストロサイトはＶＷＭ乏突起膠細胞の正常な成熟を可能にした（７）。まとめると、ヒト患者及びマウスモデルからのこれらの研究は、アストロサイトが、ＶＷＭの病理の中心であり、潜在的な治療標的を構成することを実証している。

【０００５】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターの進歩は、単回注射で治療用導入遺伝子を送達するためのより安全でより効率的なウイルスビヒクルをもたらしており、遺伝子治療は現在、単一遺伝子疾患のための好ましい治療的介入である。ＡＡＶ血清型９は、神経学的適応症のために最も広く使用されているベクターとなり、臨床における安全性プロファイルを確立している。ＡＡＶ９の髄腔内投与は、神経系全体に導入遺伝子を播種することを可能にし、現在、神経セロイドリポフスチン症３（ＣＬＮ３、ＮＣＴ０３７７０５７２）、ＣＬＮ６（ＮＣＴ０２７２５５８０）、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ、ＮＣＴ０３３８１７２９）、及び巨大軸索ニューロパチー（ＧＡＮ、ＮＣＴ０２３６２４３８）の治療に向けた治験中である。また一方、ＡＡＶ９は主にニューロンを標的とし、ＶＷＭ疾患及び他の白質ジストロフィーの明確な治療標的であるグリアを効果的に標的化できないことが、マウス（９）、イヌ（１０）、及び非ヒト霊長類（１１、１２）を含む種にわたって示されている。それでもなお、今では、選択プロモーターを用いて導入遺伝子の発現を駆動することによって、強力な細胞特異的指向性を達成することが可能である。特に、ＧＦＡＰプロモーター駆動型導入遺伝子発現は、新生及び成体マウスの脳へのＡＡＶ注入後、アストロサイトに対して高度に特異的であることが示されている（１３）。

【０００６】

ｅＩＦ２Ｂ５遺伝子に変異を有する患者は、白質消失を伴う白質脳症に罹患しているか、又は罹患のリスクがあるため、新しい治療選択肢が緊急に必要である。更に、ｅＩＦ２Ｂ５の変異は、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、及び巨大軸索ニューロパチーなどの他の疾患又は障害に関与している。本開示は、ＥＩＦ２Ｂ２遺伝子における変異を治療し、そのような変異に起因する白質ジストロフィー、白質脳症、及び／又はＶＷＭ疾患を治療、予防、又は改善するための実現可能な治療戦略としての、置換ｅＩＦ２Ｂ５核酸及びＥＩＦ２Ｂ２遺伝子置換を提供する。したがって、本開示は、ｅＩＦ２Ｂ５の変異を治療するための、ｅＩＦ２Ｂ５遺伝子を含む核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、組換えＡＡＶ粒子、及び組成物を提供する。開示される産物、方法及び使用は、ヒト脳の細胞におけるｅＩＦ２Ｂ５タンパク質、又は機能的ｅＩＦ２Ｂ５の堅牢かつ長期的な発現のための実現可能なアプローチを提供する。

【発明の概要】

【０００７】

「真核生物翻訳開始因子２Ｂサブユニットイプシロン５（ＥＩＦ２Ｂ５）」をコードする遺伝子における変異を治療するための、並びにＥＩＦ２Ｂ５遺伝子の変異に起因する疾患の治療、改善、進行の遅延、及び／又は予防における、産物、方法、及び使用が本明細書に提供される。

【０００８】

本開示は、（ａ）１つ以上の調節制御エレメント、及び（ｂ）ＥＩＦ２Ｂ５　ｃＤＮＡ配列を含むポリヌクレオチドを含む核酸を提供する。いくつかの態様では、ＥＩＦ２Ｂ５ｃＤＮＡは、（ａ）配列番号１に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、（ｂ）配列番号１に示されるヌクレオチド配列、又は（ｃ）配列番号２に示さ

れるアミノ酸配列を含むＥＩＦ２Ｂ５をコードするヌクレオチド配列を含む。
【０００９】
いくつかの態様では、１つ以上の調節制御エレメントは、ＣＡＧプロモーター、ｇｆａＡＢＣ１Ｄプロモーター、ＧＦＡＰプロモーター、又はＣＡＧプロモーター、ｇｆａＡＢＣ１Ｄプロモーター、若しくはＧＦＡＰプロモーターのうちのいずれかの機能的断片である。いくつかの態様では、調節制御エレメントは、（ａ）配列番号３、４、５、若しくは１５に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は（ｂ）配列番号３、４、５、若しくは１５に示されるヌクレオチド配列を含む。
【００１０】
いくつかの態様では、核酸は、ＳＶ４０イントロン及び転写後ポリアデニル化（ポリＡ）配列を更に含む。いくつかの態様では、核酸は、（ａ）配列番号６～８及び１６のうちのいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は（ｂ）配列番号６～８及び１６のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。
【００１１】
いくつかの態様では、核酸は、逆位末端反復配列を更に含む。いくつかの態様では、核酸は、（ａ）配列番号９～１１及び１７のうちのいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は（ｂ）配列番号９～１１及び１７のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。
【００１２】
いくつかの態様では、核酸は、ＡＡＶゲノムの追加の配列を更に含む。いくつかの態様では、核酸は、（ａ）配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は（ｂ）配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。
【００１３】
いくつかの態様では、本開示の核酸は、（ａ）配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は（ｂ）（１）５’ＩＴＲ、（２）ＣＡＧ、ｇｆａＡＢＣ（１）、ＧＦＡＰ、若しくはｇｆａ１４０５プロモーター、（３）ＳＶ４０イントロン、（４）ｅＩＦ２Ｂ５　ＯＲＦ、（５）ポリＡ、（６）Ｆ１起源、（７）カナマイシン耐性遺伝子、及び（８）配列番号１２～１４及び１８、並びに図１２～１４及び図２１のうちのいずれか１つに示される配列に示されるｐＭＢ１起源のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。
【００１４】
本開示は、本開示の核酸のうちのいずれか、又はそれらの任意の１つ以上の組み合わせを含む、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、又はベクターを提供する。いくつかの態様では、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、バキュロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、又は合成ウイルスである。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、ＡＡＶである。いくつかの態様では、ＡＡＶは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を含む。いくつかの態様では、ＡＡＶは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く。いくつかの態様では、ＡＡＶは、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）、自己相補的組換えＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）、又は一本鎖組換えＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）である。いくつかの態様では、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶａｎｃ８０、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、若しくはＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、又はそれらの誘導体のうちのいずれかである。いくつかの態様では、ＡＡＶは、ＡＡＶ９である。いくつかの態様では、ＡＡＶに存在するＩＴＲ配列は、ＡＡＶ２からである。いくつかの特定の態様では、ＡＡＶは、ｓｓＡＡＶ又は

ｓｓｒＡＡＶである。
【００１５】
本開示は、本開示のＡＡＶのうちのいずれかを含むｒＡＡＶ粒子を提供する。
本開示は、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、又はｒＡＡＶ粒子のうちの任意の１つ以上と、薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。いくつかの態様では、組成物は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、槽内（又は大槽内（ＩＣＭ）、又はエアロゾル送達用に製剤化される。
【００１６】
本開示は、細胞におけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子又はＥＩＦ２Ｂ５タンパク質の発現を増加させる方法を提供し、上記方法は、細胞を、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの任意の１つ以上と接触させることを含む。いくつかの態様では、細胞は、アストロサイト、ニューロン、又はグリア細胞である。いくつかの態様では、細胞は、アストロサイトである。いくつかの態様では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの態様では、細胞は、ヒト対象中にある。
【００１７】
本開示は、有効量の、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの任意の１つ以上を対象に投与することを含む、ＥＩＦ２ＢＢ５遺伝子の変異を含む対象を治療する方法を提供する。いくつかの態様では、対象は、ヒト対象である。いくつかの態様では、ＥＩＦ２ＢＢ５遺伝子の変異は、対象に、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、又は白質消失（ＶＷＭ）病を罹患させるか、又は罹患のリスクを引き起こす。いくつかの態様では、方法は、併用療法を更に含む。いくつかの態様では、方法は、コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上を対象に投与することを更に含む。いくつかの態様では、核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成物は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、槽内（又は大槽内（ＩＣＭ）、又はエアロゾル送達によって投与される。
【００１８】
本開示は、細胞におけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子又はタンパク質の発現を増加させるための医薬の調製のための、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの任意の１つ以上の使用を提供する。いくつかの態様では、細胞は、ヒト対象中にある。いくつかの態様では、対象は、ＥＩＦ２Ｂ５の変異を患い、いくつかの態様では、この変異は、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、又は白質消失（ＶＷＭ）病に関連する。いくつかの特定の態様では、白質脳症又は白質ジストロフィーは、白質消失病（ＶＷＭ）である。いくつかの態様では、医薬は、別の医薬と組み合わせて投与される。いくつかの態様では、医薬は、コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上とともに投与される。いくつかの態様では、医薬は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、槽内（又は大槽内（ＩＣＭ）、又はエアロゾル送達用に製剤化される。
【００１９】
本開示は、変異ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子を含む対象の治療における、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成

物のうちの任意の１つ以上の使用を提供する。いくつかの態様では、細胞は、ヒト対象中にある。いくつかの態様では、対象は、ＥＩＦ２Ｂ５の変異、白質脳症、又は白質ジストロフィーに罹患している。いくつかの態様では、白質脳症又は白質ジストロフィーは、白質消失病（ＶＷＭ）である。いくつかの態様では、医薬は、別の医薬と組み合わせて投与される。いくつかの態様では、医薬は、コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上とともに投与される。いくつかの態様では、医薬は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、又はエアロゾル送達用に製剤化される。

【００２０】

本開示は、対象におけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子の変異、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、又は白質消失（ＶＷＭ）病を治療するための組成物を提供し、上記組成物は、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの任意の１つ以上を含む。いくつかの態様では、対象は、ヒト対象である。いくつかの態様では、白質脳症又は白質ジストロフィーは、白質消失病（ＶＷＭ）である。

【００２１】

本開示は、本明細書に記載の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、ｒＡＡＶ粒子、組成物、方法、使用、又は医薬のうちの任意の１つ以上を提供する。いくつかの態様では、そのような核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、組成物、又は医薬は、髄腔内（ＣＳＦへの直接注射）、血流への静脈内注射、脳内注射、脳室内注射、槽内（又は大槽内（ＩＣＭ）、又はエアロゾル送達又は投与用に製剤化される。

【００２２】

本開示はまた、（ａ）配列番号１５に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は（ｂ）配列番号１５に示されるヌクレオチド配列を含む、新規のｇｆａ１４０５プロモーターを含む核酸を提供する。いくつかの態様では、核酸は、逆位末端反復配列を更に含む。したがって、いくつかの態様では、核酸は、（ａ）配列番号１７若しくは１８に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は（ｂ）配列番号１７若しくは１８に示されるヌクレオチド配列を含む。

【００２３】

本開示は、そのような核酸又はそれらの任意の１つ以上の組み合わせを含む、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、又はベクターを提供する。いくつかの態様では、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、バキュロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、又は合成ウイルスである。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、ＡＡＶである。いくつかの態様では、ＡＡＶは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く。いくつかの態様では、ＡＡＶは、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）、自己相補的組換えＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）、又は一本鎖組換えＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）である。いくつかの特定の態様では、ＡＡＶは、ｓｓＡＡＶ又はｓｓｒＡＡＶである。いくつかの態様では、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶａｎｃ８０、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、若しくはＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、又はそれらの誘導体のうちのいずれかである。いくつかの態様では、ＡＡＶは、ＡＡＶ９である。

【００２４】

本開示は、本開示のＡＡＶのうちのいずれかを含むｒＡＡＶ粒子を提供する。

本開示は、核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、又はｒＡＡＶ粒子のうちの任意の１つ以上と、薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。いくつかの態様では、組成物は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達用に製剤化される。

【００２５】

本開示は、細胞における遺伝子又はタンパク質の発現を増加させる方法を提供し、上記方法は、細胞を、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、又はｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの任意の１つ以上と接触させることを含む。いくつかの態様では、細胞は、アストロサイト又はニューロンである。いくつかの態様では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの態様では、細胞は、ヒト対象中にある。

【００２６】

本開示は、対象のアストロサイト又はニューロンにおいて通常発現される遺伝子に変異を含む対象を治療する方法を提供し、上記方法は、有効量の、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、又はｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの任意の１つ以上を対象に投与することを含む。いくつかの態様では、対象は、ヒト対象である。いくつかの態様では、遺伝子の変異は、対象に、アストロサイト又はニューロン障害又は疾患に罹患させるか、又は罹患のリスクを引き起こす。いくつかの態様では、障害又は疾患は、白質脳症又は白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、又は大頭型白質脳症である。いくつかの態様では、白質脳症又は白質ジストロフィーは、白質消失病（ＶＷＭ）である。いくつかの態様では、本開示の方法は、コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上を対象に投与することを更に含む。いくつかの態様では、核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ｒＡＡＶ粒子、又は組成物は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、槽内（又は大槽内（ＩＣＭ）、又はエアロゾル送達によって投与される。

【００２７】

本開示は、細胞における遺伝子又はタンパク質の発現を増加させるための医薬の調製のための、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、又はｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの任意の１つ以上の使用を提供する。いくつかの態様では、細胞は、ヒト対象中にある。

【００２８】

本開示は、変異遺伝子を含む対象を治療するための、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、又はｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの１つ以上の使用を提供する。いくつかの態様では、対象は、ヒト対象である。いくつかの態様では、対象は、中枢神経系及び／又は脳に影響を及ぼす遺伝子の変異、又は障害若しくは疾患に罹患している。いくつかの態様では、対象は、脳のアストロサイト又はニューロンに影響を及ぼす遺伝子の変異、又は障害若しくは疾患に罹患している。いくつかの態様では、対象は、白質脳症又は白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、又は大頭型白質脳症に罹患している。いくつかの態様では、白質脳症又は白質ジストロフィーは、白質消失病（ＶＷＭ）である。いくつかの態様では、医薬は、コルチコステロイド、リツキシマブ、及びラパマイシンのうちの任意の１つ以上とともに投与される。いくつかの態様では、医薬は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、槽内（又は大槽内（ＩＣＭ）、又はエアロゾル送達用に製剤化され

る。
【００２９】
本開示は、対象の中枢神経系及び／又は脳における遺伝子の変異、又は疾患若しくは障害を治療するための組成物を提供し、上記組成物は、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、又はｒＡＡＶ粒子、又は組成物のうちの１つ以上を含む。いくつかの態様では、対象は、ヒト対象である。いくつかの態様では、対象は、中枢神経系及び／又は脳に影響を及ぼす遺伝子の変異、又は障害若しくは疾患に罹患している。いくつかの態様では、対象は、脳のアストロサイト又はニューロンに影響を及ぼす遺伝子の変異、又は障害若しくは疾患に罹患している。いくつかの態様では、対象は、白質脳症又は白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、及び／又は大頭型白質脳症に罹患している。いくつかの態様では、白質脳症又は白質ジストロフィーは、白質消失病（ＶＷＭ）である。
【００３０】
本開示は、核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、ｒＡＡＶ粒子、組成物、又は医薬のうちの１つ以上を提供し、上記核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ベクター、ウイルスベクター、又はｒＡＡＶ粒子、組成物又は医薬は、脳脊髄液（ＣＳＦ）への髄腔内注射、血流への静脈内注射、脳内注射、脳室内注射、槽内注射、又はエアロゾル投与用に製剤化される。
【００３１】
本開示の他の特徴及び利点は、以下の図面の説明及び詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、図面、詳細な説明及び実施例は、開示される主題の実施形態を示すものの、本開示の趣旨及び範囲内にある様々な変更及び改変が上記図面、詳細な説明及び実施例から明らかになり得るので、単なる例示としてのみ与えられることを理解されたい。
【００３２】
本特許又は出願ファイルは、少なくとも１つのカラーで作成された図面を含む。カラーの図面を含む本特許又は特許出願公開のコピーは、請求により、必要な費用の支払いに応じて、米国特許商標庁によって提供される。
【図面の簡単な説明】
【００３３】
【図１】設計された４つのＡＡＶ構築物を示す。これらの構築物には、アストロサイトを標的とするプロモーター：全長ＧＦＡＰ及び短縮型バージョンｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ、新規ｇｆａＡＢＣＤ１４０５（又はｇｆａ１４０５）プロモーター、並びにＣＢＡプロモーター及びＣＭＶエンハンサーからなるユビキタスプロモーター（ＣＡＧとも称される）が含まれる。ベクターの他の重要な構成要素には、ＣＮＳの効率的な標的化のためのＡＡＶ９カプシド、より大きなパッケージング能力を有する一本鎖構築物を作製するＡＡＶ２逆位末端反復（ＩＴＲ）、ＳＶ４０イントロン、ヒトｅＩＦ２Ｂ５コード配列、及び転写後ポリアデニル化（ポリＡ）配列が含まれる。
【図２】３つのｅＧＦＰ構築物（ＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰ、ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ、及びＡＡＶ９－ＣＢＡ－ＧＦＰベクター）のそれぞれについて、トランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＧＦＰのインビトロ発現を示す。具体的には、ＨＥＫ２９３細胞をリポフェクタミンによってトランスフェクトし、トランスフェクション後７２時間の細胞をｅＧＦＰのｍＲＮＡ発現分析のために回収した。ＨＥＫ細胞は、アストロサイトがこれらの構築物の標的細胞であるため、理想的な細胞モデルではなかったが、ＨＥＫ２９３細胞は、プラスミドが目的の遺伝子を発現したかどうかを判定するための迅速なインビトロ分析を可能にした。トランスフェクション後７２時間で、ＧＦＰ陽性細胞を顕微鏡によって検出可能であった（左パネル）。加えて、細胞ペレットに対す

るｍＲＮＡ発現の定量的ＰＣＲは、非トランスフェクション対照細胞よりも、増加した発現、ＣＡＧが約３５００倍、ＧＦＡＰが約１２００倍、及びＧｆａＡＢＣ（１）Ｄが約９００倍を示した（右パネル）。これらの結果は、インビトロでの細胞において、様々なプロモーターによって駆動される導入遺伝子の発現を示した。

【図３】アストロサイトのマーカーであるグリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）で染色された、線維芽細胞に由来するアストロサイトを示す。アストロサイトを、本開示の遺伝子治療構築物を試験するための関連するインビトロ系として確立した。アストロサイトは、確認済みのｅＩＦ２Ｂ５　ＶＭＤ病を有する患者の皮膚生検から培養された線維芽細胞に由来した。これは、疾患のメカニズムを研究し、治療法を試験するための、ＶＷＭアストロサイトのインビトロ系を提供する。

【図４】出生後１日目（ＰＮＤ１）でＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した野生型マウスを用いた実験の結果を示す。脳の矢状断面は、ＧＦＰ（緑色）の分布を示す。ＤＡＰＩ（青色）は、核を示す。挿入図１～６は、矢状断面での関連するボクセルのより高い倍率を示す。

【図５】ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した野生型マウスを用いた実験の結果を示す。脳の矢状断面は、ＧＦＰ（緑色）の分布を示す。ＤＡＰＩ（青色）は、核を示す。挿入図は、ＧＦＰ陽性グリア及びニューロン細胞のより高い倍率を示す。

【図６】ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した４匹の野生型マウスを用いた実験の結果を示す。各マウス脳の矢状断面は、ＧＦＰ（緑色）の分布を示す。ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰを用いた新生野生型マウスの注射は、ＡＡＶ９－ＣＢＡ－ＧＦＰと比較して、白質におけるより大きな分布及び中枢神経軸全体にわたるより広範な分布をもたらした。特に顕著なのは、ボックス２の小脳の白質領域を含む尾側脳領域におけるＧＦＰ発現の増加である。更に、発現は、ボックス４の形態によって示されるように、主にアストロサイト内であった。

【図７】ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した野生型マウスを用いた実験の結果を示す。脳の矢状断面は、ＧＦＰ（緑色）の分布を示す。挿入図１～３は、矢状断面での関連するボクセルのより高い倍率を示す。挿入図４は、アストロサイトの形態を実証するために、挿入図３のより高い倍率を示す。

【図８】ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した３匹の野生型マウスを用いた実験の結果を示す。脳の矢状断面は、ＧＦＰ（緑色）の分布を示す。

【図９】ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した野生型マウスを用いた実験の結果を示す。脳の矢状断面は、ＧＦＰ（緑色）の分布を示す。挿入図は、赤い矢印で示される小脳白質の高い倍率を示す。これまでのところ、ＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰを用いた新生野生型マウスの注射は、ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ及びＡＡＶ９－ＣＢＡ－ＧＦＰベクターの両方と比較して、より広範囲の分布及びより大きな発現をもたらした。発現は、アストロサイトに対して保持されたままである。

【図１０】ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した４匹の野生型マウスを用いた実験の結果を示す。脳の矢状断面は、ＧＦＰ（緑色）の分布を示す。同様の生体内分布パターンが、注射されたマウス間で見られた。

【図１１】ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した野生型マウスを用いた実験の結果を示す。共標識は、ＧＦＰ（緑色）発現が、ニューロンマーカー（ＮｅｕＮ、赤色）ではなく、アストロサイトマーカー（ＧＦＡＰ、紫色）と共局在化することを示す。アストロサイトにおけるＧＦＰ発現は、アストロサイト（ＧＦＡＰ、紫色）及びニューロン（ＮｅｕＮ、赤色）に特異的な抗体との共標識によって確認された。ＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰ（図示）及びＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ（図示せず）での処理後のＧＦＰ発現は、アストロサイトにおいて明らかに存在した。このように、発現は、主に標的細胞であるアストロサイトにおいて起こることが確認され

た。
【図１２－１】ＡＡＶ．ＣＡＧ．ｅＩＦ２Ｂ５の注釈付き配列（配列番号１２）を提供する。
【図１２－２】同上。
【図１２－３】同上。
【図１３－１】ＡＡＶ．ｇｆａＡＢＣ１Ｄ．ｅＩＦ２Ｂ５の注釈付き配列（配列番号１３）を提供する。
【図１３－２】同上。
【図１３－３】同上。
【図１４－１】ＡＡＶ．ＧＦＡＰ．ｅＩＦ２Ｂ５の注釈付き配列（配列番号１４）を提供する。
【図１４－２】同上。
【図１４－３】同上。
【図１５】新規のｇｆａ１４０５プロモーター（ｇｆａＡＢＣＤ１４０５プロモーターとも呼ばれる）の配列（配列番号１５）を提供する。
【図１６－１】完全なＩＴＲ－ｇｆａ１４０５－ｅＩＦ２Ｂ５－ポリＡ－ＩＴＲ配列の注釈付き配列（配列番号１７）を提供する。
【図１６－２】同上。
【図１７】新規のｇｆａ１４０５プロモーターの設計及び構成要素を示す。
【図１８】完全なＩＴＲ－ｇｆａ１４０５－ｅＩＦ２Ｂ５－ポリＡ－ＩＴＲ配列の設計及び構成要素を示す。
【図１９】ｐＡＡＶ．ｇｆａ１４０５．ＥＩＦ２Ｂ５（配列番号１８の７０８６ｂｐ）のプラスミドマップを示す。
【図２０Ａ】ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＧＦＰ発現が、新規のｇｆａ１４０５プロモーターを含む、ユビキタス及びアストロサイト特異的プロモーターの両方によって達成され得ることを示す。図２０Ａは、本明細書で論じられる４つの様々なプロモーター、すなわち、ＣＡＧ、ＧＦＡＰ、ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ、及びｇｆａＡＢＣＤ１４０５（又はｇｆａ１４０５）を用いたトランスフェクション後７２時間のＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＧＦＰ発現を示す。
【図２０Ｂ】図２０Ｂは、ハウスキーピングタンパク質ＧＡＰＤＨの発現に対して比較して、全ての構築物のＧＦＰ発現のウエスタンブロットを３連で実施した後の、ＣＡＧ発現に対するパーセントでの定量化の結果を示す。ＧＦＰタンパク質の発現は、ＧＦＡＰ及びｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ構築物のそれよりも、ｇｆａＡＢＣＤ１４０５（ｇｆａ１４０５）構築物の方が高かったが、ユビキタスプロモーターＣＡＧ構築物のそれほど高くはなかった。
【図２１－１】ＡＡＶ．ｇｆａ１４０５．ｅＩＦ２Ｂ５の注釈付き配列（配列番号１８）（７０８６ｂｐ）を提供する。
【図２１－２】同上。
【図２１－３】同上。
【図２２】異なるＡＡＶレポーター構築物により細胞特異的発現を評価するために、遺伝子治療構築物がどのように設計されたかを示す。
【図２３】ＰＮＤ１での脳室内（ＩＣＶ）によるＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰのＩＣＶ送達後４週間（上段）及び８週間（下段）のマウス脳におけるＧＦＰ発現を示す。緑色染色はＧＦＰを表し、青色はＤＡＰＩを表す。このデータは、図４～６に示されるデータを強化するものである。
【図２４】ＰＮＤ１での脳室内（ＩＣＶ）によるＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰのＩＣＶ送達後４週間（上段）及び８週間（下段）のマウス脳におけるＧＦＰ発現を示す。緑色染色はＧＦＰを表し、青色はＤＡＰＩを表す。このデータは、図９～１１に示されるデータを強化するものである。
【図２５】ＰＮＤ１での脳室内（ＩＣＶ）によるＡＡＶ９－ｇｆＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ

のＩＣＶ送達後４週間（上段）及び８週間（下段）のマウス脳におけるＧＦＰ発現を示す。緑色染色はＧＦＰを表し、青色はＤＡＰＩを表す。このデータは、図７及び８に示されるデータを強化するものである。

【図２６】ＰＮＤ１での脳室内（ＩＣＶ）によるＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰ、ＡＡＶ９－ｇｆＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ、ＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰのＩＣＶ送達後４週間及び８週間の、ＧＦＰ構築物のＩＦ定量化、すなわち、全マウス脳におけるＧＦＰ陽性領域パーセンテージ及びＧＦＰ陽性領域におけるＧＦＰ強度を示す。

【図２７】ＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰ、ＡＡＶ９－ｇｆＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ、ＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰのＩＣＶ送達後４週間の全脳におけるＧＦＰ発現を示す。下段のパネルは、処理後４週間及び８週間の、ハウスキーピング遺伝子ＧＡＰＤＨに対して比較した、ＧＦＰタンパク質のウエスタンブロット分析を示す。

【図２８】アストロサイト（ＧＦＡＰ）及びニューロン（ＮｅｕＮ）マーカーとのＧＦＰの共局在化を示し、ＧＦＡＰ及びｇｆａＡＢＣ（１）Ｄプロモーターを用いた発現はアストロサイトに限定された一方、ＣＡＧはニューロン及びアストロサイトにおいてＧＦＰ発現をもたらしたことを実証している。

【図２９】ＰＮＤ１での脳室内（ＩＣＶ）によるＡＡＶ９－ｇｆａ１４０５－ＧＦＰのＩＣＶ送達後４週間のマウス脳におけるＧＦＰ発現を示す。

【図３０】ＶＷＭ疾患（ＶＷＭマウス）のモデルの治療における、ＥＩＦ２Ｂ５導入遺伝子を含む細胞特異的遺伝子治療構築物の有効性を評価するために使用される様々な方法を示す。

【図３１】ＶＷＭマウスの処理における治療的有効性を示す。ＥＩＦ２Ｂ５の２つの異なるマウスモデル（５０日目のＥｉｆ２ｂ５^{Ｉ９８Ｍ}、及び６ヶ月目のＥｉｆ２ｂ５^{Ｒ１９１Ｈ}）におけるロータロッドデータ。両方のモデルは、ＡＡＶ９－ｇｆＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰによる処理後の正規化された潜時（Ｅｉｆ２ｂ５^{Ｉ９８Ｍ}）又は落下時ＲＰＭ（Ｅｉｆ２ｂ５^{Ｒ１９１Ｈ}）を示す。ＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰ及びＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰプロモーターを用いると、より少ない改善が見られた。

【発明を実施するための形態】

【００３４】

本開示は、ＥＩＦ２Ｂ５をコードする遺伝子の変異を治療し、その結果、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、又は白質消失（ＶＷＭ）病を含むがこれらに限定されない、変異に起因する疾患又は障害を治療、改善、進行の遅延、又は予防するための実現可能な治療戦略として、真核生物翻訳開始因子２Ｂサブユニットイプシロン５（ＥＩＦ２Ｂ５）遺伝子置換を提供する。開示される産物、方法及び使用は、白質脳症、大頭型白質脳症、白質ジストロフィー、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、加齢におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、又は白質消失（ＶＷＭ）病の治療において、ヒトニューロン及びグリア細胞におけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子の堅牢かつ長期的な発現のための実現可能なアプローチを提供する。

【００３５】

白質ジストロフィーは、非常に多様な臨床症状及び病理学的メカニズムを有する障害の不均一なグループである。それらは、通常、中枢神経系（ＣＮＳ）における白質異常の初期所見に基づいて、歴史的には肉眼的な病理に基づいて、そして現在はしばしば神経画像化に基づいて、大まかにグループ化される。しかしながら、このグループの障害についての正式な定義又は分類は存在しない。白質ジストロフィーという用語は、技術的には脳の

白質（ｌｅｕｋｏ）の衰弱（ジストロフィー）を伴う障害を指し、伝統的に遺伝性障害向けであるが、この用語をどのように適用すべきかについてのコンセンサスは欠如している。

【００３６】

白質ジストロフィーの定義を更に複雑にすると、関連するが異なる用語「白質脳症」が文献に存在する。この用語は、毒性、後天性の血管又は感染性の傷害、並びに遺伝性障害の文脈で見られる障害に特徴的に適用されている。加えて、髄鞘低形成、脱髄及び髄鞘異形成などの異なる用語が使用されており、混乱の原因となっている。

【００３７】

ＶＷＭは、真核生物開始因子２Ｂ（ｅＩＦ２Ｂ）と呼ばれるタンパク質の５つのサブユニットをコードする５つの遺伝子ＥＩＦ２Ｂ１、ＥＩＦ２Ｂ２、ＥＩＦ２Ｂ３、ＥＩＦ２Ｂ４及びＥＩＦ２Ｂ５のうちの１つにおける変異によって引き起こされる白質ジストロフィーの１つのタイプである。このタンパク質は、体内の他の全てのタンパク質の産生、及びタンパク質産生の速度、特に発熱及び感染などのストレス状態中のタンパク質合成の減少を調節するために必要である。これらの遺伝子のうちのいずれかが完全に機能していないか、又は存在しない場合には、誰も生きることができないことは非常に重要である。ＶＷＭは、ｅＩＦ２Ｂの機能を低下させるこれらの遺伝子の小さい変化によって引き起こされ、脳における特定の細胞は、この機能の喪失に対して特に脆弱である。機能の低下は、発熱、感染、又は頭部外傷のエピソード中に特に問題となり、そのようなエピソードに続いて悪化が加速する。

【００３８】

ＶＷＭは、常染色体潜性様式で遺伝性である。ＶＷＭの他の臨床名としては、びまん性ＣＮＳ髄鞘低形成を伴う小児運動失調症（ＣＡＣＨ）、白質消失性白質ジストロフィー、Ｃｒｅｅ白質脳症、卵巣不全を伴う白質ジストロフィー、卵巣白質ジストロフィー、及びｅＩＦ２Ｂ関連障害が挙げられるが、これらに限定されない。ＶＷＭは、白質ジストロフィーであり、小児で最も一般的に発生する神経変性白質障害である。臨床的には、運動失調、痙縮、神経学的低下、及び早期死亡につながる発作を呈する。現在、ＶＷＭに対する治療は存在しない。ＶＷＭは、真核生物開始因子２Ｂ（ＥＩＦ２Ｂ）のサブユニットにおける常染色体潜性の機能喪失変異によって引き起こされ、ＥＩＦ２Ｂ５における病理学的バリアントが最も一般的である。ＶＷＭの単一遺伝子の性質のため、それは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介遺伝子置換療法の良い候補である。ＶＷＭの病理は、アストロサイトが、それらの分化、形態、及び機能が損なわれることにより、疾患の進行を媒介するため、治療のための重要な標的であることを示唆している。したがって、本開示は、導入遺伝子のアストロサイト特異的又はユビキタス発現を比較するための遺伝子置換構築物を提供する。

【００３９】

ＥＩＦ２Ｂ１遺伝子は、ｅＩＦ２Ｂと呼ばれるタンパク質の５つの部分のうちの１つ、具体的にはこのタンパク質のアルファサブユニットを作製するための指示を提供する。ｅＩＦ２Ｂタンパク質は、別のタンパク質であるｅＩＦ２と相互作用することによって、細胞における全体的なタンパク質産生（合成）を調節するのに役立つ。ｅＩＦ２タンパク質は、タンパク質合成の開始（ｓｔａｒｔｉｎｇ）（開始（ｉｎｉｔｉａｔｉｎｇ））に関与するため、開始因子と呼ばれる。いくつかの条件下では、ｅＩＦ２Ｂは、開始因子にエネルギーを運ぶＧＴＰと呼ばれる分子のリサイクルを助けることによって、タンパク質合成を増加させる。他の条件下では、開始因子にしっかりと結合することによってタンパク質合成を遅らせ、これは、ｅＩＦ２Ｂタンパク質を不活性な形態に変換し、ＧＴＰのリサイクルを防止する。タンパク質合成の適切な調節は、細胞が変化する条件に対処するために、正しいレベルのタンパク質が利用可能であることを確実にするために不可欠である。例えば、細胞は、安静状態にある場合よりも増殖している場合に、タンパク質をはるかに速く合成しなければならない。

【００４０】

ＥＩＦ２Ｂ１遺伝子（ＨＧＮＣ：３２５７　ＮＣＢＩ　Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子：１９６７　アンサンブル：ＥＮＳＧ００００００１１１３６１　ＯＭＩＭ（登録商標）：６０６６８６　ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｑ１４２３２）は、真核生物翻訳開始因子２Ｂ（ＥＩＦ２Ｂ）の５つのサブユニットのうちの１つ、真核生物開始因子２のＧＴＰ交換因子、及びタンパク質合成のための必須調節因子をコードする。この遺伝子及び他のＥＩＦ２Ｂサブユニットをコードする遺伝子の変異は、白質消失を伴う白質脳症と関連している。

【００４１】

本開示は、正常又は機能的に活性なＥＩＦ２Ｂタンパク質を発現させるために、ＥＩＦ２Ｂ置換遺伝子又は「導入遺伝子」を提供することに焦点を当てている。これを達成するために、具体的に設計されたＥＩＦ２Ｂ置換遺伝子又は「導入遺伝子」が提供される。

【００４２】

いくつかの態様では、ＥＩＦ２Ｂ置換遺伝子の核酸は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列、又は配列番号１に示されるヌクレオチド配列のコドン最適化バリアントを含む。様々な態様では、核酸は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列ヌクレオチド配列のアイソフォーム又はバリアントである。いくつかの態様では、アイソフォーム又はバリアントは、配列番号１に示されるヌクレオチド配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含む。

【００４３】

いくつかの態様では、ポリペプチドは、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含むＥＩＦ２Ｂポリペプチドである。様々な態様では、ポリペプチドは、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含むＥＩＦ２Ｂポリペプチドのアイソフォーム又はバリアントである。いくつかの態様では、アイソフォーム又はバリアントは、配列番号２に示されるアミノ酸配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含む。

【００４４】

いくつかの態様では、導入遺伝子のポリヌクレオチド配列は、標的細胞内で機能的である転写制御エレメント（プロモーター、エンハンサー及び／又はポリアデニル化シグナル配列を含むが、これらに限定されない）に作動可能に連結される。いくつかの態様では、プロモーターは、アストロサイトを標的とするように選択される。いくつかの態様では、プロモーターは、ＣＡＧプロモーター、ＧＦＡＰプロモーター、ｇｆａＡＢＣ１Ｄプロモーター、又はｇｆａ１４０５（ｇｆａＡＢＣＤ１４０５とも呼ばれる）プロモーターである。

【００４５】

ｇｆａ１４０５又はｇｆａＡＢＣＤ１４０５プロモーターは、初めて本明細書に記載された（より詳細を実施例５に含む）新規のプロモーターであり、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む。ｇｆａ１４０５プロモーターは、アストロサイト及びニューロンを特異的に標的とするように設計され、アストロサイト又はニューロンにおいて発現されることが望まれる任意の遺伝子を発現するために使用され得る。したがって、いくつかの態様では、ｇｆａ１４０５プロモーターは、ｅＩＦ２Ｂ５を発現するように設計及び使用される。図１９は、ＡＡＶベクターにｅＩＦ２Ｂ５導入遺伝子配列とともにｇｆａ１４０５プロモーター、すなわち、配列番号１５を含む７０８６ｂｐ（配列番号１８）を含むプラスミドｐＡＡＶ．ｇｆａ１４０５．ｅＩＦ２Ｂ５の概略図を提供する。図２１は、配列番号１８の７０８６ｂｐ配列の詳細な記載を提供する。

【００４６】

ＣＡＧプロモーターは、ニューロン及びアストロサイトを標的とするユビキタスプロモ

ーターである。ｇｆａＡＢＣ１Ｄプロモーター及びＧＦＡＰプロモーターは、主にアストロサイトに対して導入遺伝子の発現を駆動する。

【００４７】

したがって、いくつかの態様では、プロモーターは、ＣＡＧプロモーター、ｇｆａＡＢＣ１Ｄプロモーター、ＧＦＡＰプロモーター、又は新規ｇｆａ１４０５プロモーターである。ＣＡＧプロモーターは、一般に「ＣＡＧプロモーター」とだけ称されるが、プロモーター及びエンハンサーの両方を含むため、厳密な意味ではプロモーターではない。配列番号３のＣＡＧプロモーターは、ＣＭＶエンハンサー（配列番号３のヌクレオチド１～３０６）及びＣＢＡプロモーター（配列番号３のヌクレオチド３０７～５８１）を含む。

【００４８】

いくつかの態様では、ＣＡＧプロモーターは、配列番号３に示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、ｇｆａＡＢＣ１Ｄプロモーターは、配列番号４に示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、ＧＦＡＰプロモーターは、配列番号５に示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、ｇｆａ１４０５プロモーターは、配列番号１５に示されるヌクレオチド配列を含む。したがって、いくつかの例示的な態様では、核酸は、配列番号３～５及び１５のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含むプロモーターを含む。様々な態様では、核酸は、配列番号３～５のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む核酸のアイソフォーム又はバリアントである。いくつかの態様では、アイソフォーム又はバリアントは、配列番号３～５及び１５のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含む。

【００４９】

【表１－１】

表１．ヒトｅＩＦ２Ｂ５遺伝子、ｅＩＦ２Ｂ５タンパク質、及び脳細胞特異的プロモーターの配列。

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
eIF2B5 遺伝子	ATGGCGGCCC CTGTAGTGGC GCCGCCTGGT GTGGTGGTTA GTCGGGCTAA CAAGCGCAGC GGCGCGGGGC CGGGAGGCAG CGGTGGCGGG GGAGCCAGAG GGGCGGAGGA GGAACCGCCG CCGCCCCTAC AAGCAGTTCT GGTGGCCGAT AGCTTCGATC GCCGCTTCTT CCCCATCTCC AAGGACCAGC CTCGGGTCCT CTTGCCCCTG GCCAATGTGG CATTAATTGA CTACACTCTG GAATTCCTGA CTGCCACAGG TGTACAGGAA ACATTTGTCT TTTGTTGCTG GAAAGCTGCT CAAATCAAAG AACATTTACT GAAGTCAAAG TGGTGCCGCC CTACATCTCT CAATGTGGTT CGAATAATTA CATCAGAGCT CTATCGATCA CTGGGAGATG TCCTCCGTGA TGTTGATGCC AAGGCTTTGG TGCGCTCTGA CTTTCTTCTG GTGTATGGGG ATGTCATCTC AAACATCAAT ATCACCAGAG CCCTTGAGGA ACACAGGTTG AGACGGAAGC TAGAAAAAAA TGTTTCTGTG ATGACGATGA TCTTCAAGGA GTCATCCCCC AGCCACCCAA CTCGTTGCCA CGAAGACAAT GTGGTAGTGG CTGTGGATAG TACCACAAAC AGGGTTCTCC ATTTTCAGAA GACCCAGGGT CTCCGGCGTT TTGCATTTCC TCTGAGCCTG TTTCAGGGCA GTAGTGATGG AGTGGAGGTT CGATATGATT TACTGGATTG TCATATCAGC ATCTGTTCTC CTCAGGTGGC ACAACTCTTT ACAGACAACT TTGACTACCA AACTCGAGAT GACTTTGTGC GAGGTCTCTT AGTGAATGAG GAGATCCTAG GGAACCAGAT CCACATGCAC GTAACAGCTA AGGAATATGG TGCCCGTGTC TCCAACCTAC ACATGTACTC AGCTGTCTGT GCTGACGTCA TCCGCCGATG GGTCTACCCT CTCACCCCAG AGGCGAACTT CACTGACAGC ACCACCCAGA GCTGCACTCA TTCCCGGCAC AACATCTACC GAGGGCCTGA GGTCAGCCTG GGCCATGGCA GCATCCTAGA GGAAAATGTG CTCCTGGGCT CTGGCACTGT CATTGGCAGC AATTGCTTTA TCACCAACAG TGTCATTGGC CCCGGCTGCC ACATTGGTGA TAACGTGGTG CTGGACCAGA CCTACCTGTG GCAGGGTGTT CGAGTGGCGG CTGGAGCACA GATCCATCAG TCTCTGCTTT GTGACAATGC TGAGGTCAAG GAACGAGTGA CACTGAAACC ACGCTCTGTC CTCACTTCCC AGGTGGTCGT GGGCCCAAAT ATCACGCTGC CTGAGGGCTC GGTGATCTCT TTGCACCCTC CAGATGCAGA GGAAGATGAA GATGATGGCG AGTTCAGTGA TGATTCTGGG GCTGACCAAG AAAAGGACAA AGTGAAGATG AAAGGTTACA ATCCAGCAGA AGTAGGAGCT GCTGGCAAGG GCTACCTCTG GAAAGCTGCA GGCATGAACA TGGAGGAAGA	1

【００５０】

【表１－２】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	GGAGGAACTG CAGCAGAATC TGTGGGGACT CAAGATCAAC ATGGAAGAAG AGAGTGAAAG TGAAAGTGAG CAAAGTATGG ATTCTGAGGA GCCGGACAGC CGGGGAGGCT CCCCTCAGAT GGATGACATC AAAGTGTTCC AGAATGAAGT TTTAGGAACA CTACAGCGGG GCAAAGAGGA GAACATTTCT TGTGACAATC TCGTCCTGGA AATCAACTCT CTCAAGTATG CCTATAACAT AAGTCTAAAG GAGGTGATGC AGGTACTGAG CCACGTGGTC CTGGAGTTCC CCCTGCAACA GATGGATTCC CCGCTTGACT CAAGCCGCTA CTGTGCCCTG CTGCTTCCTC TGCTAAAGGC CTGGAGCCCT GTTTTTAGGA ACTACATAAA GCGCGCAGCC GACCATTTGG AAGCGTTAGC AGCCATTGAG GACTTCTTCC TAGAGCATGA AGCTCTTGGT ATTTCCATGG CCAAGGTACT GATGGCTTTC TACCAGCTGG AGATCCTGGC TGAGGAAACA ATTCTGAGCT GGTTCAGCCA AAGAGATACA ACTGACAAGG GCCAGCAGTT GCGCAAGAAT CAACAGCTGC AGAGGTTCAT CCAGTGGCTA AAAGAGGCAG AAGAGGAGTC ATCTGAAGAT GACTGA	
eIF2B5 タンパク質	MAAPVVAPPGVVVSRANKRSGAGPGGSGGGGARGAEEEPPP PLQAVLVADSFDRRFFPISKDQPRVLLPLANVALIDYTLEFLT ATGVQETFVFCCWKAAQIKEHLLKSKWCRPTSLNVVRIITSE LYRSLGDVLRDVDAKALVRSDFLLVYGDVISNINITRALEEH RLRRKLEKNVSVMTMIFKESSPSHPTRCHEDNVVVAVDSTTN RVLHFQKTQGLRRFAFPLSLFQGSSDGVEVRYDLLDCHISICS PQVAQLFTDNFDYQTRDDFVRGLLVNEEILGNQIHMHVTAK EYGARVSNLHMYSAVCADVIRRWVYPLTPEANFTDSTTQSC THSRHNIYRGPEVSLGHGSILEENVLLGSGTVIGSNCFITNSVI GPGCHIGDNVVLDQTYLWQGVRVAAGAQIHQSLLCDNAEV KERVTLKPRSVLTSQVVVGPNITLPEGSVISLHPPDAEEDEDD GEFSDDSGADQEKDKVKMKGYNPAEVGAAGKGYLWKAAG MNMEEEEELQQNLWGLKINMEEESESESEQSMDSEEPDSRG GSPQMDDIKVFQNEVLGTLQRGKEENISCDNLVLEINSLKYA YNISLKEVMQVLSHVVLEFPLQQMDSPLDSSRYCALLLPLLK AWSPVFRNYIKRAADHLEALAAIEDFFLEHEALGISMAKVLM AFYQLEILAEETILSWFSQRDTTDKGQQLRKNQQLQRFIQWL KEAEEESSEDD	2
CAG プロモーター(CMV エンハンサー(配列番号 3 の nt1~306)及び CBA プロモーター(配列番号 3 の nt307~581)を含む)	CGTT ACATAACTTA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC TGACCGCCCA ACGACCCCCG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGACTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA TGACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG ACTTTCCTAC TTGGCAGTAC ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG GGTCGAGGTG AGCCCCACGT TCTGCTTCAC TCTCCCCATC TCCCCCCCCT CCCCACCCCC AATTTTGTAT TTATTTATTT TTTAATTATT TTGTGCAGCG ATGGGGGCGG GGGGGGGGGG GGCGCGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG	3

【００５１】

【表１－３】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG CGGAGAGGTG CGGCGGCAGC CAATCAGAGC GGCGCGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG AGGCGGCGGC GGCGGCGGCC CTATAAAAAG CGAAGCGCGC GGCGGGC	
gfaABC1D プロモーター (647nt)	GGTA CCAACATATC CTGGTGTGGA GTAGGGGACG CTGCTCTGAC AGAGGCTCGG GGGCCTGAGC TGGCTCTGTG AGCTGGGGAG GAGGCAGACA GCCAGGCCTT GTCTGCAAGC AGACCTGGCA GCATTGGGCT GGCCGCCCCC CAGGGCCTCC TCTTCATGCC CAGTGAATGA CTCACCTTGG CACAGACACA ATGTTCGGGG TGGGCACAGT GCCTGCTTCC CGCCGCACCC CAGCCCCCCT CAAATGCCTT CCGAGAAGCC CATTGAGCAG GGGGCTTGCA TTGCACCCCA GCCTGACAGC CTGGCATCTT GGGATAAAAG CAGCACAGCC CCCTAGGGGC TGCCCTTGCT GTGTGGCGCC ACCGGCGGTG GAGAACAAGG CTCTATTCAG CCTGTGCCCA GGAAAGGGGA TCAGGGGATG CCCAGGCATG GACAGTGGGT GGCAGGGGGG GAGAGGAGGG CTGTCTGCTT CCCAGAAGTC CAAGGACACA AATGGGTGAG GGGAGAGCTC TCCCCATAGC TGGGCTGCGG CCCAACCCCA CCCCCTCAGG CTATGCCAGG GGGTGTTGCC AGGGGCACCC GGGCATCGCC AGTCTAGCCC ACTCCTTCAT AAAGCCCTCG CATCCCAGGA GCGAGCAGAG CCA	4
GFAP プロモーター (2208nt)	CCCA CCTCCCTCTC TGTGCTGGGA CTCACAGAGG GAGACCTCAG GAGGCAGTCT GTCCATCACA TGTCCAAATG CAGAGCATAC CCTGGGCTGG GCGCAGTGGC GCACAACTGT AATTCCAGCA CTTTGGGAGG CTGATGTGGA AGGATCACTT GAGCCCAGAA GTTCTAGACC AGCCTGGGCA ACATGGCAAG ACCCTATCTC TACAAAAAAA GTTAAAAAAT CAGCCACGTG TGGTGACACA CACCTGTAGT CCCAGCTATT CAGGAGGCTG AGGTGAGGGG ATCACTTAAG GCTGGGAGGT TGAGGCTGCA GTGAGTCGTG GTTGCGCCAC TGCACTCCAG CCTGGGCAAC AGTGAGACCC TGTCTCAAAA GACAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAGAAC ATATCCTGGT GTGGAGTAGG GGACGCTGCT CTGACAGAGG CTCGGGGGCC TGAGCTGGCT CTGTGAGCTG GGGAGGAGGC AGACAGCCAG GCCTTGTCTG CAAGCAGACC TGGCAGCATT GGGCTGGCCG CCCCCCAGGG CCTCCTCTTC ATGCCCAGTG AATGACTCAC CTTGGCACAG ACACAATGTT CGGGGTGGGC ACAGTGCCTG CTTCCCGCCG CACCCCAGCC CCCCTCAAAT GCCTTCCGAG AAGCCCATTG AGCAGGGGGC TTGCATTGCA CCCCAGCCTG ACAGCCTGGC ATCTTGGGAT AAAAGCAGCA CAGCCCCCTA GGGGCTGCCC TTGCTGTGTG GCGCCACCGG CGGTGGAGAA CAAGGCTCTA TTCAGCCTGT GCCCAGGAAA GGGGATCAGG GGATGCCCAG GCATGGACAG	5

【００５２】

【表１－４】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	TGGGTGGCAG GGGGGGAGAG GAGGGCTGTC TGCTTCCCAG AAGTCCAAGG ACACAAATGG GTGAGGGGAC TGGGCAGGGT TCTGACCCTG TGGGACCAGA GTGGAGGGCG TAGATGGACC TGAAGTCTCC AGGGACAACA GGGCCCAGGT CTCAGGCTCC TAGTTGGGCC CAGTGGCTCC AGCGTTTCCA AACCCATCCA TCCCCAGAGG TTCTTCCCAT CTCTCCAGGC TGATGTGTGG GAACTCGAGG AAATAAATCT CCAGTGGGAG ACGGAGGGGT GGCCAGGGAA ACGGGGCGCT GCAGGAATAA AGACGAGCCA GCACAGCCAG CTCATGTGTA ACGGCTTTGT GGAGCTGTCA AGGCCTGGTC TCTGGGAGAG AGGCACAGGG AGGCCAGACA AGGAAGGGGT GACCTGGAGG GACAGATCCA GGGGCTAAAG TCCTGATAAG GCAAGAGAGT GCCGGCCCCC TCTTGCCCTA TCAGGACCTC CACTGCCACA TAGAGGCCAT GATTGACCCT TAGACAAAGG GCTGGTGTCC AATCCCAGCC CCCAGCCCCA GAACTCCAGG GAATGAATGG GCAGAGAGCA GGAATGTGGG ACATCTGTGT TCAAGGGAAG GACTCCAGGA GTCTGCTGGG AATGAGGCCT AGTAGGAAAT GAGGTGGCCC TTGAGGGTAC AGAACAGGTT CATTCTTCGC CAAATTCCCA GCACCTTGCA GGCACTTACA GCTGAGTGAG ATAATGCCTG GGTTATGAAA TCAAAAAGTT GGAAAGCAGG TCAGAGGTCA TCTGGTACAG CCCTTCCTTC CCTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGTGAGACAA GGTCTCTCTC TGTTGCCCAG GCTGGAGTGG CGCAAACACA GCTCACTGCA GCCTCAACCT ACTGGGCTCA AGCAATCCTC CAGCCTCAGC CTCCCAAAGT GCTGGGATTA CAAGCATGAG CCACCCCACT CAGCCCTTTC CTTCCTTTTT AATTGATGCA TAATAATTGT AAGTATTCAT CATGGTCCAA CCAACCCTTT CTTGACCCAC CTTCCTAGAG AGAGGGTCCT CTTGCTTCAG CGGTCAGGGC CCCAGACCCA TGGTCTGGCT CCAGGTACCA CCTGCCTCAT GCAGGAGTTG GCGTGCCCAG GAAGCTCTGC CTCTGGGCAC AGTGACCTCA GTGGGGTGAG GGGAGCTCTC CCCATAGCTG GGCTGCGGCC CAACCCCACC CCCTCAGGCT ATGCCAGGGG GTGTTGCCAG GGGCACCCGG GCATCGCCAG TCTAGCCCAC TCCTTCATAA AGCCCTCGCA TCCCAGGAGC GAGCAGAGCC AGAGCAGGTT GGAGAGGAGA CGCATCACCT CCGCTGCTCG CCGG	
gfa1405 プロモーター (1405nt)	ACTAGTAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTC TGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGG GGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCT GGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCA TGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTC GGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCC CCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCT TGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATA	15

【００５３】

【表１－５】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	AAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGG CGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTG CCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCCAGGCATGGACAG TGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAG AAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGGAGGGGTGGCC AGGGAAACGGGGCGCTGCAGGAATAAAGACGAGCCAGCA CAGCCAGCTCATGTGTAACGGCTTTGTGGAGCTGTCAAGG CCTGGTCTCTGGGAGAGAGGCACAGGGAGGCCAGACAAG GAAGGGGTGACCTGGAGGGACAGATCCAGGGGCTAAAGT CCTGATAAGGCAAGAGAGTGCCGGCCCCCTCTTGCCCTAT CAGGACCTCCACTGCCACATAGAGGCCATGATTGACCCTT AGACAGCTGAGTGAGATAATGCCTGGGTTATGAAATCAAA AAGTTGGAAAGCAGGTCAGAGGTCATCTGGTACAGCCCTT CCTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAAGGTCTCTC TCTGTTGCCCAGGCTGGAGTGGCGCAAACACAGCTCACTG CAGCCTCAACCTACTGGGCTCAAGCAATCCTCCAGCCTCA GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGAGCCACCCCA CTCAGCCCTTTCCTTCCTTTTTAATTGATGCATAATAATTGT AAGTATTCATCATGGTCCAACCAACCCTTTCTTGACCCACC TTCCTAGAGAGAGGGTCCTCTTGCTTCAGCGGTCAGGGCC CCAGACCCATGGTCTGGCTCCAGGTACCACCTGCCTCATG CAGGAGTTGGCGTGCCCAGGAAGCTCTGCCTCTGGGCACA GTGACCTCAGTGGGGTGAGGGGAGCTCTCCCCATAGCTGG GCTGCGGCCCAACCCCACCCCCTCAGGCTATGCCAGGGGG TGTTGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCCACT CCTTCATAAAGCCCTCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCA GAGCAGGTTGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGT CCGGA	

【００５４】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、プロモーター、ＳＶ４０イントロン、ｅＩＦ２Ｂ５オープンリーディングフレーム、及びポリＡテールを含む（表２）。表２の配列は、５’及び３’ＩＴＲ配列を含まないｅＩＦ２Ｂ５導入遺伝子配列のヌクレオチド配列である。なぜならば、導入遺伝子配列は、様々な態様では、自己相補的及び／又は一本鎖ＡＡＶウイルスベクターで使用されるからである。

【００５５】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、配列番号６～８及び１６（表２）のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。様々な態様では、核酸は、配列番号６～８及び１６のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列のバリアントである。いくつかの態様では、バリアントは、配列番号６～８及び１６のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含む。

【００５６】

【表２－１】

表２．５’及び３’ＩＴＲ配列を含まないｅＩＦ２Ｂ５導入遺伝子配列の配列。

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
CAG.eIF2B5 (5’及び3’ ITRを含まない)	cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgt caataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggacta tttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgac gtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctactt ggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttca ctctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtatttatttatttttttaattattttgtgcagcgat gggggcgggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcgg ggcggggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttc cttttatggcgaggcggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgtcc ggaactggtaagtttagtctttttgtcttttatttcaggtcccggatccggtggtggtgcaaatcaaag aactgctcctcagtggatgttgcctttacttctaggcctgtacggaagtgttacttctgctctaaaagc tgcggaattgtacccgcggccaattctgcagtcgacggtaccgcgggcccgggatccaccggtt cgccaccatggcggccccctgtagtggcgccgcctggtgtggtggttagtcgggctaacaagcg cagcggcgcgggggccgggaggcagcggtggcgggggagccagaggggcggaggaggaa ccgccgccgcccctacaagcagttctggtggccgatagcttcgatcgccgcttcttccccatctcc aaggaccagcctcgggtcctcttgcccctggccaatgtggcattaattgactacactctggaattc ctgactgccacaggtgtacaggaaacatttgtcttttgttgctggaaagctgctcaaatcaaagaac atttactgaagtcaaagtggtgccgccctacatctctcaatgtggttcgaataattacatcagagctc tatcgatcactgggagatgtcctccgtgatgttgatgccaaggctttggtgcgctctgactttcttctg gtgtatggggatgtcatctcaaacatcaatatcaccagagcccttgaggaacacaggttgagacg gaagctagaaaaaaatgtttctgtgatgacgatgatcttcaaggagtcatcccccagccacccaac tcgttgccacgaagacaatgtggtagtggctgtggatagtaccacaaacagggttctccattttca gaagacccagggtctccggcgttttgcatttcctctgagcctgtttcagggcagtagtgatggagt ggaggttcgatatgatttactggattgtcatatcagcatctgttctcctcaggtggcacaactctttac agacaactttgactaccaaactcgagatgactttgtgcgaggtctcttagtgaatgaggagatccta gggaaccagatccacatgcacgtaacagctaaggaatatggtgcccgtgtctccaacctacacat gtactcagctgtctgtgctgacgtcatccgccgatgggtctaccctctcaccccagaggcgaactt cactgacagcaccacccagagctgcactcattcccggcacaacatctaccgagggcctgaggtc agcctgggccatggcagcatcctagaggaaaatgtgctcctgggctctggcactgtcattggcag caattgctttatcaccaacagtgtcattggccccggctgccacattggtgataacgtggtgctggac cagacctacctgtggcagggtgttcgagtggcggctggagcacagatccatcagtctctgctttgt gacaatgctgaggtcaaggaacgagtgacactgaaaccacgctctgtcctcacttcccaggtggt cgtgggcccaaatatcacgctgcctgagggctcggtgatctctttgcaccctccagatgcagagg aagatgaagatgatggcgagttcagtgatgattctggggctgaccaagaaaaggacaaagtgaa gatgaaaggttacaatccagcagaagtaggagctgctggcaagggctacctctggaaagctgca ggcatgaacatggaggaagaggaggaactgcagcagaatctgtggggactcaagatcaacatg gaagaagagagtgaaagtgaaagtgagcaaagtatggattctgaggagccggacagccgggg aggctcccctcagatggatgacatcaaagtgttccagaatgaagttttaggaacactacagcggg gcaaagaggagaacatttcttgtgacaatctcgtcctggaaatcaactctctcaagtatgcctataa cataagtctaaaggaggtgatgcaggtactgagccacgtggtcctggagttccccctgcaacag atggattcccgcttgactcaagccgctactgtgccctgctgcttcctctgctaaaggcctggagc cctgtttttaggaactacataaagcgcgcagccgaccatttggaagcgttagcagccattgagga cttcttcctagagcatgaagctcttggtatttccatggccaaggtactgatggctttctaccagctgg agatcctggctgaggaaacaattctgagctggttcagccaaagagatacaactgacaagggcca gcagttgcgcaagaatcaacagctgcagaggttcatccagtggctaaaagaggcagaagagga gtcatctgaagatgactgacgcgcgcgagatctacgggtggcatccctgtgacccctccccagt gcctctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgtcctaataaaattaagttgc	6

【００５７】

【表２－２】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	atcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaagg ggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcag tggcacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcc cgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaatttttgtttttttggtagagacggg gtttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctccc aaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttccctgtccttctgattttgtaggtaaccac gtgcggaccga	
gfaABC(1)D.eIF2B5 (5’及び3’ITRを含まない)	ggtaccaacatatcctggtgtggagtaggggacgctgctctgacagaggctcgggggcctgag ctggctctgtgagctggggaggaggcagacagccaggccttgtctgcaagcagacctggcagc attgggctggccgccccccagggcctcctcttcatgcccagtgaatgactcaccttggcacagac acaatgttcggggtgggcacagtgcctgcttcccgccgcaccccagcccccctcaaatgccttcc gagaagcccattgagcaggggcttgcattgcaccccagcctgacagcctggcatcttgggata aaagcagcacagccccctagggggctgcccttgctgtgtggcgccaccggcggtggagaacaa ggctctattcagcctgtgcccaggaaaggggatcaggggatgcccaggcatggacagtgggtg gcagggggggagaggagggctgtctgcttcccagaagtccaaggacacaaatgggtgaggg gagagctctccccatagctgggctgcggcccaaccccaccccctcaggctatgccaggggtg ttgccaggggcacccgggcatcgccagtctagcccactccttcataaagccctcgcatcccagg agcgagcagagccatccggaactggtaagtttagtctttttgtcttttatttcaggtcccggatccgg tggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtggatgttgcctttacttctaggcctgtacggaagt gttacttctgctctaaaagctgcggaattgtacccgcggccaattctgcagtcgacggtaccgcgg gcccgggatccaccggttcgccaccatggcggccccctgtagtggcgccgcctggtgtggtggtt agtcgggctaacaagcgcagcggcgcggggccgggaggcagcggtggcgggggagccag aggggcggaggaggaaccgccgccgccccctacaagcagttctggtggccgatagcttcgatc gccgcttcttccccatctccaaggaccagctcgggtcctcttgccccctggccaatgtggcattaat tgactacactctggaattcctgactgccacaggtgtacaggaaacatttgtcttttgttgctggaaag ctgctcaaatcaaagaacatttactgaagtcaaagtggtgccgccctacatctctcaatgtggttcg aataattacatcagagctctatcgatcactgggagatgtcctccgtgatgttgatgccaaggctttg gtgcgctctgactttcttctggtgtatggggatgtcatctcaaacatcaatatcaccagagcccttga ggaacacaggttgagacggaagctagaaaaaaatgtttctgtgatgacgatgatcttcaaggagt catccccagccacccaactcgttgccacgaagacaatgtggtagtggctgtggatagtaccaca aacagggttctccatttttcagaagacccagggtctccggcgttttgcatttcctctgagcctgtttca gggcagtagtgatggagtggaggttcgatatgatttactggattgtcatatcagcatctgttctcctc aggtggcacaactctttacagacaactttgactaccaaactcgagatgactttgtgcgaggtctctt agtgaatgaggagatcctagggaaccagatccacatgcacgtaacagctaaggaatatggtgcc cgtgtctccaacctacacatgtactcagctgtctgtgctgacgtcatccgccgatgggtctaccctc tcaccccagaggcgaacttcactgacagcaccacccagagctgcactcattcccggcacaacat ctaccgagggcctgaggtcagcctgggccatggcagcatcctagaggaaaatgtgctcctggg ctctggcactgtcattggcagcaattgctttatcaccaacagtgtcattggccccggctgccacatt ggtgataacgtggtgctggaccagacctacctgtggcagggtgttcgagtggcggctggagcac agatccatcagtctctgctttgtgacaatgctgaggtcaaggaacgagtgacactgaaaccacgct ctgtcctcacttcccaggtggtcgtgggcccaaatatcacgctgcctgagggctcggtgatctctttt gcaccctccagatgcagaggaagatgaagatgatggcgagttcagtgatgattctggggctgac caagaaaaggacaaagtgaagatgaaaggttacaatccagcagaagtaggagctgctggcaag ggctacctctggaaagctgcaggcatgaacatggaggaagaggaggaactgcagcagaatctg tggggactcaagatcaacatggaagaagagagtgaaagtgaaagtgagcaaagtatggattctg aggagccggacagccggggaggctcccctcagatggatgacatcaaagtgttccagaatgaag ttttaggaacactacagcggggcaaagaggagaacatttcttgtgacaatctcgtcctggaaatca actctctcaagtatgcctataacataagtctaaaggaggtgatgcaggtactgagccacgtggtcc tggagttcccctgcaacagatggattcccgcttgactcaagccgctactgtgccctgctgcttc ctctgctaaaggcctggagccctgtttttaggaactacataaagcgcgcagccgaccatttggaa gcgttagcagccattgaggacttcttcctagagcatgaagctcttggtatttccatggccaaggtac tgatggctttctaccagctggagatcctggctgaggaaacaattctgagctggttcagccaaagag	7

【００５８】

【表２－３】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	atacaactgacaagggccagcagttgcgcaagaatcaacagctgcagaggttcatccagtggct aaaagaggcagaagaggagtcatctgaagatgactgacgcgcgcgagatctacgggtggcatc cctgtgacccctccccagtgcctctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttg tcctaataaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggg ggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattggga accaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctgggttcaagcga ttctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaatttttg ttttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaatctcaggtgat ctacccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttccctgtcctt ctgattttgtaggtaaccacgtgcggaccga	10
GFAP.eIF2B5 (5’及び3’ ITRを含まない)	cccacctccctctctgtgctgggactcacagagggagacctcaggaggcagtctgtccatcacat gtccaaatgcagagcatacctgggctgggcgcagtggcgcacaactgtaattccagcactttg ggaggctgatgtggaaggatcacttgagcccagaagttctagaccagcctgggcaacatggca agaccctatctctacaaaaaaaagttaaaaaatcagccacgtgtggtgacacacacctgtagtccca gctattcaggaggctgaggtgaggggatcacttaaggctgggaggttgaggctgcagtgagtcg tggttgcgccactgcactccagcctgggcaacagtgagaccctgtctcaaaagacaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaagaacatatcctggtgtggagtaggggacgctgctctgacagaggctcgg gggcctgagctggctctgtgagctggggaggaggcagacagccaggccttgtctgcaagcag acctggcagcattgggctggccgccccccagggcctcctcttcatgcccagtgaatgactcacct tggcacagacacaatgttcggggtgggcacagtgcctgcttcccgccgcaccccagcccccctc aaatgccttccgagaagcccattgagcaggggcttgcattgcaccccagcctgacagcctggc atcttgggataaaagcagcacagccccctagggggctgcccttgctgtgtggcgccaccggcggt ggagaacaaggctctattcagcctgtgcccaggaaaggggatcaggggatgcccaggcatgg acagtgggtggcaggggggggagaggagggctgtctgcttcccagaagtccaaggacacaaat gggtgaggggactgggcagggttctgaccctgtgggaccagagtggagggcgtagatggacc tgaagtctccagggacaacagggcccaggtctcaggctcctagttgggcccagtggctccagc gtttccaaacccatccatccccagaggttcttcccatctctccaggctgatgtgtgggaactcgag gaaataaatctccagtgggagacggaggggtggccagggaaacggggcgctgcaggaataa agacgagccagcacagccagctcatgtgtaacggctttgtggagctgtcaaggcctggtctctgg gagagaggcacagggaggccagacaaggaaggggtgacctggagggacagatccaggggc taaagtcctgataaggcaagagagtgccggccccctcttgccctatcaggacctccactgccaca tagaggccatgattgacccttagacaaagggctggtgtccaatcccagcccccagccccagaac tccagggaatgaatgggcagagagcaggaatgtgggacatctgtgttcaagggaaggactcca ggagtctgctgggaatgaggcctagtaggaaatgaggtggcccttgagggtacagaacaggttc attcttcgccaaattcccagcaccttgcaggcacttacagctgagtgagataatgcctgggttatga aatcaaaaagttggaaagcaggtcagaggtcatctggtacagcccttccttccctttttttttttttttt tgtgagacaaggtctctctctgttgcccaggctggagtggcgcaaacacagctcactgcagcctc aacctactgggctcaagcaatcctccagcctcagcctcccaaagtgctgggattacaagcatgag ccaccccactcagccctttccttccttttaattgatgcataataattgtaagtattcatcatggtccaac caaccctttcttgacccaccttcctagagagagggtcctcttgcttcagcggtcagggccccagac ccatggtctggctccaggtaccacctgcctcatgcaggagttggcgtgcccaggaagctctgcct ctgggcacagtgacctcagtggggtgaggggagctctccccatagctgggctgcggcccaacc ccacccctcaggctatgccaggggggtgttgccaggggcacccgggcatcgccagtctagccc actccttcataaagccctcgcatcccaggagcgagcagagccagagcaggttggagaggagac gcatcacctccgctgctcgccggtccggaactggtaagtttagtctttttgtcttttatttcaggtccc ggatccggtggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtggatgttgcctttacttctaggcctgt acggaagtgttacttctgctctaaaagctgcggaattgtacccgcggccaattctgcagtcgacgg taccgcgggcccgggatccaccggttcgccaccatggcggccccctgtagtggcgccgcctggt gtggtggttagtcgggctaacaagcgcagcggcgcggggccgggaggcagcggtggcgggg ggagccagaggggcggaggaggaaccgccgccgcccctacaagcagttctggtggccgata gcttcgatcgccgcttcttcccatctccaaggaccagcctcgggtcctcttgccccctggccaatgt ggcattaattgactacactctggaattcctgactgccacaggtgtacaggaaacatttgtcttttgttg	8

【００５９】

【表２－４】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	ctggaaagctgctcaaatcaaagaacatttactgaagtcaaagtggtgccgccctacatctctcaat gtggttcgaataattacatcagagctctatcgatcactgggagatgtcctccgtgatgttgatgcca aggctttggtgcgctctgactttcttctggtgtatggggatgtcatctcaaacatcaatatcaccaga gcccttgaggaacacaggttgagacggaagctagaaaaaaatgtttctgtgatgacgatgatcttc aaggagtcatcccccagccacccaactcgttgccacgaagacaatgtggtagtggctgtggata gtaccacaaacagggttctccatttttcagaagacccagggtctccggcgttttgcatttcctctgag cctgtttcagggcagtagtgatggagtggaggttcgatatgatttactggattgtcatatcagcatct gttctcctcaggtggcacaactctttacagacaactttgactaccaaactcgagatgactttgtgcg aggtctcttagtgaatgaggagatcctagggaaccagatccacatgcacgtaacagctaaggaat atggtgcccgtgtctccaacctacacatgtactcagctgtctgtgctgacgtcatccgccgatgggt ctaccctctcaccccagaggcgaacttcactgacagcaccacccagagctgcactcattcccgg cacaacatctaccgagggcctgaggtcagcctgggccatggcagcatcctagaggaaaatgtg ctcctgggctctggcactgtcattggcagcaattgctttatcaccaacagtgtcattggccccggct gccacattggtgataacgtggtgctggaccagacctacctgtggcagggtgttcgagtggcggct ggagcacagatccatcagtctctgctttgtgacaatgctgaggtcaaggaacgagtgacactgaa accacgctctgtcctcacttcccaggtggtcgtgggcccaaatatcacgctgcctgagggctcgg tgatctctttgcaccctccagatgcagaggaagatgaagatgatggcgagttcagtgatgattctg gggctgaccaagaaaaggacaaagtgaagatgaaaggttacaatccagcagaagtaggagct gctggcaagggctacctctggaaagctgcaggcatgaacatggaggaagaggaggaactgca gcagaatctgtggggactcaagatcaacatggaagaagagagtgaaagtgaaagtgagcaaag tatggattctgaggagccggacagccgggggaggctcccctcagatggatgacatcaaagtgttc cagaatgaagttttaggaacactacagcggggcaaagaggagaacatttcttgtgacaatctcgt cctggaaatcaactctctcaagtatgcctataacataagtctaaaggaggtgatgcaggtactgag ccacgtggtcctggagttcccccctgcaacagatggattccccgcttgactcaagccgctactgtgc cctgctgcttcctctgctaaaggcctggagccctgtttttaggaactacataaagcgcgcagccga ccatttggaagcgttagcagccattgaggacttcttcctagagcatgaagctcttggtatttccatgg ccaaggtactgatggctttctaccagctggagatcctggctgaggaaacaattctgagctggttca gccaaagagatacaactgacaagggccagcagttgcgcaagaatcaacagctgcagaggttca tccagtggctaaaagaggcagaagaggagtcatctgaagatgactgacgcgcgcgagatctac gggtggcatccctgtgacccctccccagtgcctctcctggccctggaagttgccactccagtgcc caccagccttgtcctaataaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatgg ggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcgg ggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctg ggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggct cagctaatttttgtttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactccta atctcaggtgatctacccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctcc cttccctgtccttctgattttgtaggtaaccacgtgcggaccga	
gfa1405.eIF2B5 (5’及び3’ITRを含まない)	GCGGCCGCATCGATTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAA TACATCTAGATATCGGATCCACTAGTAACATATCCTGGTGT GGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTG AGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGG CCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGC CCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCT TGGCACAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCT TCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAA GCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGAC AGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGG GGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACA AGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGG ATGCCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGG AGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGG TGAGGGGGAGGGGTGGCCAGGGAAACGGGGCGCTGCAGG	16

【００６０】

【表２－５】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	AATAAAGACGAGCCAGCACAGCCAGCTCATGTGTAACGGC TTTGTGGAGCTGTCAAGGCCTGGTCTCTGGGAGAGAGGCA CAGGGAGGCCAGACAAGGAAGGGGTGACCTGGAGGGACA GATCCAGGGGCTAAAGTCCTGATAAGGCAAGAGAGTGCC GGCCCCCTCTTGCCCTATCAGGACCTCCACTGCCACATAGA GGCCATGATTGACCCTTAGACAGCTGAGTGAGATAATGCC TGGGTTATGAAATCAAAAAGTTGGAAAGCAGGTCAGAGGT CATCTGGTACAGCCCTTCCTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTG TGAGACAAGGTCTCTCTCTGTTGCCCAGGCTGGAGTGGCG CAAACACAGCTCACTGCAGCCTCAACCTACTGGGCTCAAG CAATCCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACA AGCATGAGCCACCCCACTCAGCCCTTTCCTTCCTTTTTAAT TGATGCATAATAATTGTAAGTATTCATCATGGTCCAACCA ACCCTTTCTTGACCCACCTTCCTAGAGAGAGGGTCCTCTTG CTTCAGCGGTCAGGGCCCCAGACCCATGGTCTGGCTCCAG GTACCACCTGCCTCATGCAGGAGTTGGCGTGCCCAGGAAG CTCTGCCTCTGGGCACAGTGACCTCAGTGGGGTGAGGGGA GCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCAACCCCACCCCCTC AGGCTATGCCAGGGGGTGTTGCCAGGGGCACCCGGGCATC GCCAGTCTAGCCCACTCCTTCATAAAGCCCTCGCATCCCAG GAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTTGGAGAGGAGACGCAT CACCTCCGCTGCTCGTCCGGAACTGGTAAGTTTAGTCTTTT TGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAAT CAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGG CCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAA TTGTACCCGCGGCCAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGG CCCGGGATCCACCGGTTCGCCACCATGGCGGCCCCTGTAG TGGCGCCGCCTGGTGTGGTGGTTAGTCGGGCTAACAAGCG CAGCGGCGCGGGGCCGGGAGGCAGCGGTGGCGGGGGAGC CAGAGGGGCGGAGGAGGAACCGCCGCCGCCCCTACAAGC AGTTCTGGTGGCCGATAGCTTCGATCGCCGCTTCTTCCCCA TCTCCAAGGACCAGCCTCGGGTCCTCTTGCCCCTGGCCAAT GTGGCATTAATTGACTACACTCTGGAATTCCTGACTGCCAC AGGTGTACAGGAAACATTTGTCTTTTGTTGCTGGAAAGCT GCTCAAATCAAAGAACATTTACTGAAGTCAAAGTGGTGCC GCCCTACATCTCTCAATGTGGTTCGAATAATTACATCAGAG CTCTATCGATCACTGGGAGATGTCCTCCGTGATGTTGATGC CAAGGCTTTGGTGCGCTCTGACTTTCTTCTGGTGTATGGGG ATGTCATCTCAAACATCAATATCACCAGAGCCCTTGAGGA ACACAGGTTGAGACGGAAGCTAGAAAAAAAATGTTTCTGTG ATGACGATGATCTTCAAGGAGTCATCCCCCAGCCACCCAA CTCGTTGCCACGAAGACAATGTGGTAGTGGCTGTGGATAG TACCACAAACAGGGTTCTCCATTTTCAGAAGACCCAGGGT CTCCGGCGTTTTGCATTTCCTCTGAGCCTGTTTCAGGGCAG TAGTGATGGAGTGGAGGTTCGATATGATTTACTGGATTGT CATATCAGCATCTGTTCTCCTCAGGTGGCACAACTCTTTAC AGACAACTTTGACTACCAAACTCGAGATGACTTTGTGCGA GGTCTCTTAGTGAATGAGGAGATCCTAGGGAACCAGATCC ACATGCACGTAACAGCTAAGGAATATGGTGCCCGTGTCTC CAACCTACACATGTACTCAGCTGTCTGTGCTGACGTCATCC GCCGATGGGTCTACCCTCTCACCCCAGAGGCGAACTTCAC TGACAGCACCACCCAGAGCTGCACTCATTCCCGGCACAAC	

【００６１】

【表２－６】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	ATCTACCGAGGGCCTGAGGTCAGCCTGGGCCATGGCAGCA TCCTAGAGGAAAATGTGCTCCTGGGCTCTGGCACTGTCATT GGCAGCAATTGCTTTATCACCAACAGTGTCATTGGCCCCG GCTGCCACATTGGTGATAACGTGGTGCTGGACCAGACCTA CCTGTGGCAGGGTGTTCGAGTGGCGGCTGGAGCACAGATC CATCAGTCTCTGCTTTGTGACAATGCTGAGGTCAAGGAAC GAGTGACACTGAAACCACGCTCTGTCCTCACTTCCCAGGT GGTCGTGGGCCCAAATATCACGCTGCCTGAGGGCTCGGTG ATCTCTTTGCACCCTCCAGATGCAGAGGAAGATGAAGATG ATGGCGAGTTCAGTGATGATTCTGGGGCTGACCAAGAAAA GGACAAAGTGAAGATGAAAGGTTACAATCCAGCAGAAGT AGGAGCTGCTGGCAAGGGCTACCTCTGGAAAGCTGCAGGC ATGAACATGGAGGAAGAGGAGGAACTGCAGCAGAATCTG TGGGGACTCAAGATCAACATGGAAGAAGAGAGTGAAAGT GAAAGTGAGCAAAGTATGGATTCTGAGGAGCCGGACAGC CGGGGAGGCTCCCCTCAGATGGATGACATCAAAGTGTTCC AGAATGAAGTTTTAGGAACACTACAGCGGGGCAAAGAGG AGAACATTTCTTGTGACAATCTCGTCCTGGAAATCAACTCT CTCAAGTATGCCTATAACATAAGTCTAAAGGAGGTGATGC AGGTACTGAGCCACGTGGTCCTGGAGTTCCCCCTGCAACA GATGGATTCCCCGCTTGACTCAAGCCGCTACTGTGCCCTGC TGCTTCCTCTGCTAAAGGCCTGGAGCCCTGTTTTTAGGAAC TACATAAAGCGCGCAGCCGACCATTTGGAAGCGTTAGCAG CCATTGAGGACTTCTTCCTAGAGCATGAAGCTCTTGGTATT TCCATGGCCAAGGTACTGATGGCTTTCTACCAGCTGGAGA TCCTGGCTGAGGAAACAATTCTGAGCTGGTTCAGCCAAAG AGATACAACTGACAAGGGCCAGCAGTTGCGCAAGAATCA ACAGCTGCAGAGGTTCATCCAGTGGCTAAAAGAGGCAGA AGAGGAGTCATCTGAAGATGACTGACGCGCGCGAGATCTA CGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGG CCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTA ATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTT CTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAG GGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCT ATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCT CACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGC CTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGAC CAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTT TCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAG GTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACA GGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTTCTGATTTTGT AGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGGCCGC	

【００６２】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、５’ＩＴＲ、プロモーター、ＳＶ４０イントロン、ｅＩＦ２Ｂ５オープンリーディングフレーム、ポリＡテール、及び３’ＩＴＲを含む（表３）。いくつかの態様では、本開示の核酸は、表３に示される５’ＩＴＲ、プロモーター、ＳＶ４０イントロン、ｅＩＦ２Ｂ５オープンリーディングフレーム、ポリＡテール、及び３’ＩＴＲを含むヌクレオチド配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含むヌクレオチド配列を

含む。

【００６３】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、配列番号９～１１及び１７（表３）のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。表３の配列は、５’及び３’ＩＴＲ配列を含むｅＩＦ２Ｂ５導入遺伝子配列のヌクレオチド配列である。様々な態様では、核酸は、配列番号９～１１及び１７のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列のバリアントである。いくつかの態様では、バリアントは、配列番号９～１１及び１７のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含む。

【００６４】

【表３－１】

表３．５’及び３’ＩＴＲ配列を含むｅＩＦ２Ｂ５導入遺伝子配列の配列。

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
ITR-CAG.eIF2B5-ITR (5’及び3’ ITRを含む)	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggggttcctgcggccgcatcgattgaattcgagctcggtacctcgcgaatacatctagatatcggatccactagtcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccctccccacccccaattttgtatttatttatttttttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcggcccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgtccggaactggtaagtttagtcttttgtcttttatttcaggtcccggatccggtggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtggatgttgcctttacttctaggcctgtacggaagtgttacttctgctctaaaagctgcggaattgtacccgcggccaattctgcagtcgacggtaccgcgggcccgggatccaccggttcgccaccatggcggccccgtagtggcgccgcctggtgtggtggttagtcgggctaacaagcgcagcggcgcgggcgcgggaggcagcggtggcgggggagccagaggggcggaggaggaaccgccgccgcccctacaagcagttctggtggccgatagcttcgatcgccgcttcttcccccatctccaaggaccagcctcgggtcctcttgccccctggccaatgtggcattaattgactacactctggaattcctgactgccacaggtgtacaggaaacatttgtcttttgttgctggaaagctgctcaaatcaaagaacatttactgaagtcaaagtggtgccgccctacatctctcaatgtggttcgaataattacatcagagctctatcgatcactgggagatgtcctccgtgatgttgatgccaaggctttggtgcgctctgacttttcttctggtgtatggggatgtcatctcaaacatcaatatcaccagagcccttgaggaacacaggttgagacggaagctagaaaaaaatgtttctgtgatgacgatgatcttcaaggagtcatccccccagccacccaactcgttgccacgaagacaatgtggtagtggctgtggatagtaccacaaacagggttctccattttcagaagacccagggtctccggcgttttgcatttcctctgagcctgtttcagggcagtagtgatggagtggaggttcgatatgatttactggattgtcatatcagcatctgttctcctcaggtggcacaactctttacagacaactttgactaccaaactcgagatgactttgtgcgaggtctcttagtgaatgaggagatcctagggaaccagatccacatgcacgtaacagctaaggaatatggtgcccgtgtctccaacctacacatgtactcagctgtctgtgctgacgtcatccgccgatgggtctaccctctcaccccagaggcgaacttcactgacagcaccacccagagctgcactcattcccggcacaacatctaccgagggcctgaggtcagcctgggccatggcagcatcctagaggaaaatgtgctcctgggctctggcactgtcattggcagcaattgctttatcaccaacagtgtcattggccccggctgccacattggtgataacgtggtgctggaccagacctacctgtggcagggtgttcgagtggcggctggagcacagatccatcagtctctgctttgtgacaatgctgaggtcaaggaacgagtgacactgaaaccacgctctgtcctcacttccaggtggtcgtgggcccaaatatcacgctgcctgagggctcggtgatctctttgcaccctccagatgcagaggaagatgaagatgatggcgagttcagtgatgattctggggctgaccaagaaaaggacaaagtgaagatgaaaggttacaatccagcagaagtaggagctgctggcaagggctacctctggaaagctgcaggcatgaacatggaggaagaggaggaactgcagcagaatctgtggggactcaagatcaacatggaagaagagagtgaaagtgaaagtgagcaaagtatggattctgaggagccggacagccggggaggctcccctcagatggatgacatcaaagtgttccagaatgaagttttaggaacactacagcggggcaaagaggagaacatttcttgtgacaatctcgtcctggaaatcaactctctcaagtatgcctataacataagtctaaaggaggtgatgcaggtactgagccacgtggtcctggagttcccctgcaacagatggattcccgcttgactcaagccgctactgtgccctgctgcttcctctgctaaaggcctggagccctgtttttaggaactacataaagcgcgcagccgaccatttggaagcgttagcagccattgaggacttcttcctagagcatgaagctcttggtatttccatggccaaggtactgatggctttctaccagctggagatcctggctgaggaaacaattctgagctggttcagccaaagagatacaactgacaagggccagcagttgcgcaagaatcaacagctgcagaggttcatccagtggctaaaagaggcagaagaggagtcatctgaagatgactgacgcgcgcgagatctacgggtggcatccctgtgacccctc	9

【００６５】

【表３－２】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	cccagtgcctctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgtcctaataaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaatttttgtttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttccctgtccttctgattttgtaggtaaccacgtgcggaccgagcggccgcaggaaccccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg	10
ITR-gfaABC(1)D.eIF2B5-ITR (5’及び3’ ITRを含む)	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggggttcctgcggccgcatcgattgaattcgagctcggtacctcgcgaatacatctagatatcggatccactagtggtaccaacatatcctggtgtggagtaggggacgctgctctgacagaggctcgggggcctgagctggctctgtgagctggggaggaggcagacagccaggccttgtctgcaagcagacctggcagcattgggctggccgcccccccagggcctcctcttcatgcccagtgaatgactcaccttggcacagacacaatgttcggggtgggcacagtgcctgcttcccgccgcaccccagccccctcaaatgccttccgagaagcccattgagcaggggcttgcattgcaccccagcctgacagcctggcatcttggataaaagcagcacagccccctagggggctgccccttgctgtgtggcgccaccggcggtggagaacaaggctctattcagcctgtgcccaggaaaggggatcaggggatgcccaggcatggacagtgggtggcaggggggagaggagggctgtctgcttcccagaagtccaaggacacaaatgggtgaggggagagctctccccatagctgggctgcggcccaaccccaccccctcaggctatgccagggggtgttgccaggggcacccgggcatcgccagtctagcccactccttcataaagccctcgcatcccaggagcgagcagagccatccggaactggtaagtttagtctttttgtctttttatttcaggtcccggatccggtggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtggatgttgcctttacttctaggcctgtacggaagtgttacttctgctctaaaagctgcggaattgtacccgcggccaattctgcagtcgacggtaccgcgggcccgggatccaccggttcgccaccatggcggcccctgtagtggcgccgcctggtgtggtggttagtcgggctaacaagcgcagcggcgcggggccgggaggcagcggtggcgggggagccagaggggcggaggaggaaccgccgccgcccctacaagcagttctggtggccgatagcttcgatcgccgcttcttccccatctccaaggaccagcctcgggtcctcttgcccctggccaatgtggcattaattgactacactctggaattcctgactgccacaggtgtacaggaaacatttgtcttttgttgctggaaagctgctcaaatcaaagaacatttactgaagtcaaagtggtgccgcccctacatctctcaatgtggttcgaataattacatcagagctctatcgatcactgggagatgtcctccgtgatgttgatgccaaggctttggtgcgctctgactttcttctggtgtatggggatgtcatctcaaacatcaatatcaccagagcccttgaggaacacaggttgagacggaagctagaaaaaaatgtttctgtgatgacgatgatcttcaaggagtcatcccccagccacccaactcgttgccacgaagacaatgtggtagtggctgtggatagtaccacaaacagggttctccatttttcagaagacccagggtctccggcgttttgcatttcctctgagcctgtttcagggcagtagtgatggagtggaggttcgatatgatttactggattgtcatatcagcatctgttctcctcaggtggcacaactctttacagacaactttgactaccaaactcgagatgactttgtgcgaggtctcttagtgaatgaggagatcctagggaaccagatccacatgcacgtaacagctaaggaatatggtgccccgtgtctccaacctacacatgtactcagctgtctgtgctgacgtcatccgccgatgggtctacctctcaccccagaggcgaacttcactgacagcaccacccagagctgcactcattcccggcacaacatctaccgagggcctgaggtcagcctgggccatggcagcatcctagaggaaaatgtgctcctgggctctggcactgtcattggcagcaattgctttatcaccaacagtgtcattggccccggctgccacattggtgataacgtggtgctggaccagacctacctgtggcagggtgttcgagtggcggctggagcacagatccatcagtctctgctttgtgacaatgctgaggtcaaggaacgagtgacactgaaaccacgctctgtcctcacttcccaggtggtcgtgggcccaaatatcacgctgcctgagggctcggtgatctctttgcaccctccagatgcagaggaagatgaagatgatggcgagttcagtgatgattctggggctgaccaagaaaaggacaaagtgaagatgaaaggttacaatccagcagaagtaggagctgctggcaaggctacctctggaaagctgcaggcatgaacatggaggaagaggaggaactgcagcagaatctggggactcaagatcaacatggaagaagagagtgaaagtgaaagtgagcaaagtatggattctgaggagccggacagccggggaggctcccctcagatggatgacatcaaagtgttccagaatgaag	10

【００６６】

【表３－３】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	ttttaggaacactacagcggggcaaagaggagaacatttcttgtgacaatctcgtcctggaaatca actctctcaagtatgcctataacataagtctaaaggaggtgatgcaggtactgagccacgtggtcc tggagttccccctgcaacagatggattccccgcttgactcaagccgctactgtgccctgctgcttc ctctgctaaaggcctggagccctgtttttaggaactacataaagcgcgcagccgaccatttggaa gcgttagcagccattgaggacttcttcctagagcatgaagctcttggtatttccatggccaaggtac tgatggctttctaccagctggagatcctggctgaggaaacaattctgagctggttcagccaaagag atacaactgacaagggccagcagttgcgcaagaatcaacagctgcagaggttcatccagtggct aaaagaggcagaagaggagtcatctgaagatgactgacgcgcgcgagatctacggg tggcatccctgtgacccctccccagtgcctctcctggccctggaagttgccactccagtgcccacc agccttgtcctaataaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtg gaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtct attgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctgggttc aagcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagct aatttttgttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaatctca ggtgatctacccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttccct gtccttctgattttgtaggtaaccacgtgcggaccgagcggccgcaggaaccctagtgatggag ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgac gcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg	10
ITR-GFAP.eIF2B5-ITR (5’及び3’ ITRを含む)	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggt cgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggg gttcctgcggccgcatcgattgaattcgagctcggtacctcgcgaatacatctagatatcggatcc actagtcccacctccctctctgtgctgggactcacagagggagacctcaggaggcagtctgtcca tcacatgtccaaatgcagagcataccctgggctgggcgcagtggcgcacaactgtaattccagc actttgggaggctgatgtggaaggatcacttgagcccagaagttctagaccagcctgggcaacat ggcaagaccctatctctacaaaaaaaagttaaaaaatcagccacgtgtggtgacacacacctgtag tcccagctattcaggaggctgaggtgaggggatcacttaaggctgggaggttgaggctgcagtg agtcgtggttgcgccactgcactccagcctgggcaacagtgagaccctgtctcaaaagacaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaacatatcctggtgtggagtaggggacgctgctctgacagagg ctcgggggcctgagctggctctgtgagctggggaggaggcagacagccaggccttgtctgcaa gcagacctggcagcattgggctggccgccccccagggcctcctcttcatgcccagtgaatgact caccttggcacagacacaatgttcggggtgggcacagtgcctgcttcccgccgcaccccagccc ccctcaaatgccttccgagaagcccattgagcaggggcttgcattgcaccccagcctgacagc ctggcatcttgggataaaagcagcacagccccctaggggctgcccttgctgtgtggcgccaccg gcggtggagaacaaggctctattcagcctgtgcccaggaaaggggatcaggggatgcccagg catggacagtgggtggcaggggggagaggagggctgtctgcttcccagaagtccaaggaca caaatgggtgaggggactgggcagggttctgaccctgtgggaccagagtggagggcgtagat ggacctgaagtctccagggacaacagggcccaggtctcaggctcctagttgggcccagtggct ccagcgtttccaaacccatccatccccagaggttcttcccatctctccaggctgatgtgtgggaact cgaggaaataaatctccagtgggagacggaggggtggccagggaaacggggcgctgcagga ataaagacgagccagcacagccagctcatgtgtaacggctttgtggagctgtcaaggcctggtct ctgggagaggaggcacagggaggccagacaaggaaggggtgacctggagggacagatccag gggctaaagtcctgataaggcaagagagtgccggccccctcttgccctatcaggacctccactg ccacatagaggccatgattgacccttagacaaagggctggtgtccaatcccagccccagcccc agaactccagggaatgaatgggcagagagcaggaatgtgggacatctgtgttcaagggaagga ctccaggagtctgctgggaatgaggcctagtaggaaatgaggtggcccttgagggtacagaaca ggttcattcttcgccaaattcccagcaccttgcaggcacttacagctgagtgagataatgcctgggt tatgaaatcaaaaagttggaaagcaggtcagaggtcatctggtacagcccttccttccctttttttttt ttttttttgtgagacaaggtctctctctgttgcccaggctggagtggcgcaaacacagctcactgca gcctcaacctactgggctcaagcaatcctccagcctcagcctcccaaagtgctgggattacaagc atgagccacccccactcagccctttccttccttttttaattgatgcataataattgtaagtattcatcatggt ccaaccaaccctttcttgacccaccttcctagagagagggtcctcttgcttcagcggtcagggccc cagacccatggtctggctccaggtaccacctgcctcatgcaggagttggcgtgcccaggaagct	11

【００６７】

【表３－４】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	ctgcctctgggcacagtgacctcagtggggtgaggggagctctccccatagctgggctgcggc ccaaccccacccccctcaggctatgccaggggggtgttgccaggggcacccgggcatcgccagtc tagcccactccttcataaagccctcgcatcccaggagcgagcagagccagagcaggttggaga ggagacgcatcacctccgctgctcgccggtccggaactggtaagtttagtctttttgtcttttatttca ggtcccggatccggtggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtggatgttgcctttacttctag gcctgtacggaagtgttacttctgctctaaaagctgcggaattgtacccgcggccaattctgcagtc gacggtaccgcgggcccgggatccaccggttcgccaccatggcggccccctgtagtggcgccg cctggtgtggtggttagtcgggctaacaagcgcagcggcgcggggccgggaggcagcggtg gcgggggagccagaggggcggaggaggaaccgccgccgcccctacaagcagttctggtgg ccgatagcttcgatcgccgcttcttcccatctccaaggaccagcctcgggtcctcttgccctgg ccaatgtggcattaattgactacactctggaattcctgactgccacaggtgtacaggaaacatttgt cttttgttgctggaaagctgctcaaatcaaagaacatttactgaagtcaaagtggtgccgccctaca tctctcaatgtggttcgaataattacatcagagctctatcgatcactgggagatgtcctccgtgatgtt gatgccaaggctttggtgcgctctgactttcttctggtgtatggggatgtcatctcaaacatcaatat caccagagcccttgaggaacacaggttgagacggaagctagaaaaaaatgtttctgtgatgacg atgatcttcaaggagtcatcccccagccacccaactcgttgccacgaagacaatgtggtagtggc tgtggatagtaccacaaacagggttctccatttttcagaagacccagggtctccggcgttttgcattt cctctgagcctgtttcagggcagtagtgatggagtggaggttcgatatgatttactggattgtcatat cagcatctgttctcctcaggtggcacaactctttacagacaactttgactaccaaactcgagatgac tttgtgcgaggtctcttagtgaatgaggagatcctagggaaccagatccacatgcacgtaacagct aaggaatatggtgcccgtgtctccaacctacacatgtactcagctgtctgtgctgacgtcatccgc cgatgggtctaccctctcaccccagaggcgaacttcactgacagcaccacccagagctgcactc attcccggcacaacatctaccgagggcctgaggtcagcctgggccatggcagcatcctagagg aaaatgtgctcctgggctctggcactgtcattggcagcaattgctttatcaccaacagtgtcattgg ccccggctgccacattggtgataacgtggtgctggaccagacctacctgtggcagggtgttcga gtggcggctggagcacagatccatcagtctctgctttgtgacaatgctgaggtcaaggaacgagt gacactgaaaccacgctctgtcctcacttcccaggtggtcgtgggcccaaatatcacgctgcctg agggctcggtgatctctttgcaccctccagatgcagaggaagatgaagatgatggcgagttcagt gatgattctggggctgaccaagaaaaggacaaagtgaagatgaaaggttacaatccagcagaa gtaggagctgctggcaagggctacctctggaaagctgcaggcatgaacatggaggaagagga ggaactgcagcagaatctgtggggactcaagatcaacatggaagaagagagtgaaagtgaaag tgagcaaagtatggattctgaggagccggacagccggggaggctcccctcagatggatgacat caaagtgttccagaatgaagttttaggaacactacagcggggcaaagaggagaacatttcttgtg acaatctcgtcctggaaatcaactctctcaagtatgcctataacataagtctaaaggaggtgatgca ggtactgagccacgtggtcctggagttccccctgcaacagatggattcccgcttgactcaagcc gctactgtgccctgctgcttcctctgctaaaggcctggagccctgtttttaggaactacataaagcg cgcagccgaccatttggaagcgttagcagccattgaggacttcttcctagagcatgaagctcttgg tatttccatggccaaggtactgatggctttctaccagctggagatcctggctgaggaaacaattctg agctggttcagccaaagagatacaactgacaagggccagcagttgcgcaagaatcaacagctg cagaggttcatccagtggctaaaagaggcagaagaggagtcatctgaagatgactgacgcgcg cgagatctacgggtggcatccctgtgacccctccccagtgcctctcctggccctggaagttgcca ctccagtgcccaccagccttgtcctaataaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttcta taatattatggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtag ggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatct ccgcctcctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcat gaccaggctcagctaatttttgtttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctc caactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaac cactgctcccttccctgtccttctgattttgtaggtaaccacgtgcggaccgagcggccgcaggaa cccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgac caaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcag ctgcctgcagg	

【００６８】

【表３－５】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
ITR-gfa1405.eIF2B5-ITR (5’及び3’ ITRを含む)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC CCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC TAGGGGTTCCTGCGGCCGCATCGATTGAATTCGAGCTCGG TACCTCGCGAATACATCTAGATATCGGATCCACTAGTAAC ATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGG CTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGC AGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATT GGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTG AATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTCGGGGTGGGC ACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCAAAT GCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCA CCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCA CAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGG CGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCAGGAAA GGGGATCAGGGGATGCCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCA GGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAA GGACACAAATGGGTGAGGGGGAGGGGTGGCCAGGGAAAC GGGGCGCTGCAGGAATAAAGACGAGCCAGCACAGCCAGC TCATGTGTAACGGCTTTGTGGAGCTGTCAAGGCCTGGTCTC TGGGAGAGAGGCACAGGGAGGCCAGACAAGGAAGGGGTG ACCTGGAGGGACAGATCCAGGGGCTAAAGTCCTGATAAG GCAAGAGAGTGCCGGCCCCCTCTTGCCCTATCAGGACCTC CACTGCCACATAGAGGCCATGATTGACCCTTAGACAGCTG AGTGAGATAATGCCTGGGTTATGAAATCAAAAAGTTGGAA AGCAGGTCAGAGGTCATCTGGTACAGCCCTTCCTTCCCTTT TTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAAGGTCTCTCTCTGTTGCCC AGGCTGGAGTGGCGCAAACACAGCTCACTGCAGCCTCAAC CTACTGGGCTCAAGCAATCCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAA GTGCTGGGATTACAAGCATGAGCCACCCCACTCAGCCCTT TCCTTCCTTTTTAATTGATGCATAATAATTGTAAGTATTCA TCATGGTCCAACCAACCCTTTCTTGACCCACCTTCCTAGAG AGAGGGTCCTCTTGCTTCAGCGGTCAGGGCCCCAGACCCA TGGTCTGGCTCCAGGTACCACCTGCCTCATGCAGGAGTTG GCGTGCCCAGGAAGCTCTGCCTCTGGGCACAGTGACCTCA GTGGGGTGAGGGGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCC CAACCCCACCCCCTCAGGCTATGCCAGGGGGTGTTGCCAG GGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCCACTCCTTCATAA AGCCCTCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTT GGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGTCCGGAACTG GTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCC GGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGT TGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCT CTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCAATTCTGCAGT CGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTTCGCCACCA TGGCGGCCCCTGTAGTGGCGCCGCCTGGTGTGGTGGTTAG TCGGGCTAACAAGCGCAGCGGCGCGGGGCCGGGAGGCAG CGGTGGCGGGGGAGCCAGAGGGGCGGAGGAGGAACCGCC GCCGCCCCTACAAGCAGTTCTGGTGGCCGATAGCTTCGAT CGCCGCTTCTTCCCCATCTCCAAGGACCAGCCTCGGGTCCT CTTGCCCCTGGCCAATGTGGCATTAATTGACTACACTCTGG AATTCCTGACTGCCACAGGTGTACAGGAAACATTTGTCTTT	17

【００６９】

【表３－６】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	TGTTGCTGGAAAGCTGCTCAAATCAAAGAACATTTACTGA AGTCAAAGTGGTGCCGCCCTACATCTCTCAATGTGGTTCG AATAATTACATCAGAGCTCTATCGATCACTGGGAGATGTC CTCCGTGATGTTGATGCCAAGGCTTTGGTGCGCTCTGACTT TCTTCTGGTGTATGGGGATGTCATCTCAAACATCAATATCA CCAGAGCCCTTGAGGAACACAGGTTGAGACGGAAGCTAG AAAAAAATGTTTCTGTGATGACGATGATCTTCAAGGAGTC ATCCCCCAGCCACCCAACTCGTTGCCACGAAGACAATGTG GTAGTGGCTGTGGATAGTACCACAAACAGGGTTCTCCATT TTCAGAAGACCCAGGGTCTCCGGCGTTTTGCATTTCCTCTG AGCCTGTTTCAGGGCAGTAGTGATGGAGTGGAGGTTCGAT ATGATTTACTGGATTGTCATATCAGCATCTGTTCTCCTCAG GTGGCACAACTCTTTACAGACAACTTTGACTACCAAACTC GAGATGACTTTGTGCGAGGTCTCTTAGTGAATGAGGAGAT CCTAGGGAACCAGATCCACATGCACGTAACAGCTAAGGAA TATGGTGCCCGTGTCTCCAACCTACACATGTACTCAGCTGT CTGTGCTGACGTCATCCGCCGATGGGTCTACCCTCTCACCC CAGAGGCGAACTTCACTGACAGCACCACCCAGAGCTGCAC TCATTCCCGGCACAACATCTACCGAGGGCCTGAGGTCAGC CTGGGCCATGGCAGCATCCTAGAGGAAAATGTGCTCCTGG GCTCTGGCACTGTCATTGGCAGCAATTGCTTTATCACCAAC AGTGTCATTGGCCCCGGCTGCCACATTGGTGATAACGTGG TGCTGGACCAGACCTACCTGTGGCAGGGTGTTCGAGTGGC GGCTGGAGCACAGATCCATCAGTCTCTGCTTTGTGACAAT GCTGAGGTCAAGGAACGAGTGACACTGAAACCACGCTCTG TCCTCACTTCCCAGGTGGTCGTGGGCCCAAATATCACGCTG CCTGAGGGCTCGGTGATCTCTTTGCACCCTCCAGATGCAG AGGAAGATGAAGATGATGGCGAGTTCAGTGATGATTCTGG GGCTGACCAAGAAAAGGACAAAGTGAAGATGAAAGGTTA CAATCCAGCAGAAGTAGGAGCTGCTGGCAAGGGCTACCTC TGGAAAGCTGCAGGCATGAACATGGAGGAAGAGGAGGAA CTGCAGCAGAATCTGTGGGGACTCAAGATCAACATGGAAG AAGAGAGTGAAAGTGAAAGTGAGCAAAGTATGGATTCTG AGGAGCCGGACAGCCGGGGAGGCTCCCCTCAGATGGATG ACATCAAAGTGTTCCAGAATGAAGTTTTAGGAACACTACA GCGGGGCAAAGAGGAGAACATTTCTTGTGACAATCTCGTC CTGGAAATCAACTCTCTCAAGTATGCCTATAACATAAGTCT AAAGGAGGTGATGCAGGTACTGAGCCACGTGGTCCTGGAG TTCCCCCTGCAACAGATGGATTCCCCGCTTGACTCAAGCCG CTACTGTGCCCTGCTGCTTCCTCTGCTAAAGGCCTGGAGCC CTGTTTTTAGGAACTACATAAAGCGCGCAGCCGACCATTT GGAAGCGTTAGCAGCCATTGAGGACTTCTTCCTAGAGCAT GAAGCTCTTGGTATTTCCATGGCCAAGGTACTGATGGCTTT CTACCAGCTGGAGATCCTGGCTGAGGAAACAATTCTGAGC TGGTTCAGCCAAAGAGATACAACTGACAAGGGCCAGCAGT TGCGCAAGAATCAACAGCTGCAGAGGTTCATCCAGTGGCT AAAAGAGGCAGAAGAGGAGTCATCTGAAGATGACTGACG CGCGCGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCC AGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCA CCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCT GACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGG TGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTA	

【００７０】

【表３－７】

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
	GGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGT GGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTC AAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTC CAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTG GTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCC AACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAA ATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTG TCCTTCTGATTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGG CCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	

【００７１】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、図１２～１４、１６、及び１９に示されるように、５’ＩＴＲ、プロモーター、ＳＶ４０イントロン、ｅＩＦ２Ｂ５オープンリーディングフレーム、ポリＡテール、及び３’ＩＴＲを含むＡＡＶ９ベクターを含む。いくつかの特定の態様では、ＡＡＶは、ｓｓＡＡＶ又はｓｓｒＡＡＶである。いくつかの態様では、本開示の核酸は、図１２～１４及び１９のうちのいずれか１つに示されるように、５’から３’に、プロモーター、ＳＶ４０イントロン、ｅＩＦ２Ｂ５オープンリーディングフレーム、及びポリＡテールを含むヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、本開示の核酸は、図１２～１４、１６、及び１９のうちのいずれか１つに示されるように、５’から３’に、５’ＩＴＲ、プロモーター、ＳＶ４０イントロン、ｅＩＦ２Ｂ５オープンリーディングフレーム、ポリＡテール、及び３’ＩＴＲを含むヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、追加のエレメントを含んでもよく、又はいくつかのエレメントは、改変又は排除されてもよい。いくつかの態様では、図１２～１４、１６、及び１９に示される５’ＩＴＲ、プロモーター、ＳＶ４０イントロン、ｅＩＦ２Ｂ５オープンリーディングフレーム、ポリＡテール、又は３’ＩＴＲのうちのいずれかのヌクレオチド配列は、図１２～１４、１６、及び１９に示される５’ＩＴＲ、プロモーター、ＳＶ４０イントロン、ｅＩＦ２Ｂ５オープンリーディングフレーム、ポリＡテール、又は３’ＩＴＲ配列のうちのいずれかのヌクレオチド配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含むバリアントであってもよい。

【００７２】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、配列番号１２～１４及び１８（すなわち、図１２～１４、１６、及び１９を参照）のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む。様々な態様では、核酸は、配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに示される配列を含むヌクレオチド配列のバリアントである。いくつかの態様では、バリアントは、配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含む。

【００７３】

【表４】

表４．ｅＩＦ２Ｂ５導入遺伝子配列を含む、それぞれのＡＡＶ９ベクターの配列。

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
AAV9.CAG.eIF2B5 (6275bp)	図 12 を参照されたい。	12
AAV9.gfaABC(1)D.eIF2B5 (6340bp)	図 13 を参照されたい。	13
AAV9.GFAP.eIF2B5 (7901bp)	図 14 を参照されたい。	14
AAV9.gfa1405.eiF2B5(7086bp)	図 21 を参照されたい。	18

【００７４】

配列インデックス表（表５）が、配列表に提供される配列を参照するために、以下に提供される。

【００７５】

【表５】

表５－配列インデックス。

配列番号	配列記述子
1	ヒト EIF2B5 ヌクレオチド
2	ヒト EIF2B5 ポリペプチド
3	CAG プロモーター
4	gfaABC1D プロモーター
5	GFAP プロモーター
6	CAG.EIF2B5(様々な他のエレメントを含むが、5’及び 3’ITR を含まない)
7	gfaABC1D.EIF2B5(様々な他のエレメントを含むが、5’及び 3’ITR を含まない)
8	GFAP.EIF2B5(様々な他のエレメントを含むが、5’及び 3’ITR を含まない)
9	ITR-CAG.EIF2B5-ITR(様々な他のエレメントを含み、5’及び 3’ITR を含む)
10	ITR-gfaABC1D.EIF2B5-ITR(様々な他のエレメントを含むが、5’及び 3’ITR を含む)
11	ITR-GFAP.EIF2B5-ITR(様々な他のエレメントを含むが、5’及び 3’ITR を含む)
12	AAV9. CAG.eIF2B5(6275bp)
13	AAV9.gfaABC(1)D.eIF2B5(6340bp)
14	AAV9.GFAP.eIF2B5(7901bp)
15	gfa1405 プロモーター
16	gfa1405.EIF2B5(様々な他のエレメントを含むが、5’及び 3’ITR を含まない)
17	gfa1405.EIF2B5(様々な他のエレメントを含み、5’及び 3’ITR を含む)
18	AAV9.gfa1405.eiF2B5(7086bp)

【００７６】

いくつかの態様では、本開示は、ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子置換を提供するための、本開示の核酸のうちのいずれか、又はそれらの任意の１つ以上の組み合わせを含む、ナノ粒子、細

胞外小胞、エクソソーム、又はベクターを含む。いくつかの態様では、これらの配列の１つ以上のコピーが、単一ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、又はベクターに組み合わされる。

【００７７】

したがって、本開示は、本開示の核酸又は本開示の核酸の組み合わせを含むベクターを含む。本開示の実施形態は、本明細書に開示される核酸を送達するために、ベクター（例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ウマ随伴ウイルス、アルファウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルス、又は合成ウイルス、例えば、キメラウイルス、モザイクウイルス、若しくはシュードタイプウイルス、及び／又は外来タンパク質、合成ポリマー、ナノ粒子、若しくは小分子を含むウイルス）を利用する。

【００７８】

本開示は、ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子に変異を含む対象の治療における使用のための、ＥＩＦ２Ｂ５タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む組換え（ｒ）ＡＡＶベクターを提供する。いくつかの特定の態様では、ＡＡＶは、ｓｓＡＡＶ又はｓｓｒＡＡＶである。いくつかの態様では、本開示の核酸は、配列番号１（表１）に示されるヌクレオチド配列を含むＡＡＶベクターを含む。いくつかの態様では、本開示の核酸は、配列番号６～８及び１６（表２）のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含むＡＡＶベクターを含む。いくつかの態様では、本開示の核酸は、配列番号９～１１及び１７（表３）のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含むＡＡＶベクターを含む。様々な態様では、核酸は、配列番号１、６～１１、１６、及び１７のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列のバリアントである。いくつかの態様では、バリアントは、配列番号１、６～１１、１６、及び１７のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列に対して９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、又は７０％の同一性を含む。

【００７９】

ＡＡＶは、ウイルスゲノムとして、その安全性プロファイルにおいて独特であり、そのキャリア細胞に形質導入されると、エピソームＤＮＡとして安定して発現したままであり、ごく稀にしか宿主ゲノムに組み込まれない。

【００８０】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、ＡＡＶを利用して、ＥＩＦ２Ｂ５タンパク質をコードするＤＮＡなどのＥＩＦ２Ｂ５導入遺伝子を送達する。本明細書で使用される場合、「ＡＡＶ」という用語は、アデノ随伴ウイルスの標準的な略語である。本明細書で使用される「ＡＡＶベクター」とは、ＡＡＶ末端反復配列（ＩＴＲ）が隣接している１つ以上の目的のポリヌクレオチド（又は導入遺伝子）を含むベクターを指す。

【００８１】

そのようなＡＡＶベクターは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子産物をコード及び発現するベクターでトランスフェクトされた宿主細胞内に存在する場合に、感染性ウイルス粒子に複製及びパッケージングされ得る。ＡＡＶは、ある特定の機能が同時感染のヘルパーウイルスによって提供される細胞においてのみ増殖する、一本鎖複製欠損ＤＮＡパルボウイルスである。ＡＡＶのゲノムは、１４５ヌクレオチドの逆位末端反復（ＩＴＲ）を含む約４．７ｋｂの長さである。特徴付けされている複数のＡＡＶの血清型が存在する。ＡＡＶの一般的な情報及び概説は、例えば、Ｃａｒｔｅｒ，１９８９，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓｅｓ，Ｖｏｌ．１，ｐｐ．１６９－２２８、及びＢｅｒｎｓ，１９９０，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，ｐｐ．１７４３－１７６４，Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，（ＮｅｗＹｏｒｋ）に見出すことができる。また一方、様々な血清型は、構造的及び機能的の両方で、遺伝子レベルでさえも非常に密接に関連していることがよく知られているため、これ

らの同じ原理が追加のＡＡＶ血清型に適用可能であることが十分に予想される。（例えば、Ｂｌａｃｋｌｏｗｅ，１９８８，Ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓｅｓ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｄｉｓｅａｓｅ，Ｊ．Ｒ．Ｐａｔｔｉｓｏｎ，ｅｄ．のｐｐ．１６５－１７４、及びＲｏｓｅ，Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ３：１－６１（１９７４）を参照されたい）。例えば、全てのＡＡＶ血清型は、相同ｒｅｐ遺伝子によって媒介される非常に類似した複製特性を明らかに呈し、これらは全て、ＡＡＶ２で発現されるものなどの３つの関連するカプシドタンパク質を有する。関連性の程度は、ゲノムの長さに沿った血清型間の広範な交差ハイブリダイゼーション、及び「逆位末端反復配列」（ＩＴＲ）に対応する末端における類似の自己アニーリングセグメントの存在を明らかにするヘテロデュプレックス分析によって更に示唆されている。類似の感染性パターンは、各血清型における複製機能が類似の調節制御下にあることも示唆する。

【００８２】

ＡＡＶには複数の血清型がある。いくつかの態様では、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶａｎｃ８０、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ １Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、若しくはＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、又はそれらの誘導体のうちのいずれかである。他のタイプのｒＡＡＶバリアント、例えば、カプシド変異を有するｒＡＡＶも本開示に含まれる。例えば、Ｍａｒｓｉｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ２２（１１）： １９００－１９０９（２０１４）を参照されたい。上に示される、様々なＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当該技術分野において既知である。同族構成要素の使用が、特に企図される。シュードタイプｒＡＡＶの産生は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ０１／８３６９２に開示されている。

【００８３】

ＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列は既知である。例えば、ＡＡＶ１の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００２０７７に提供されており、ＡＡＶ２の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１４０１及びＳｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，４５： ５５５－５６４｛１９８３）に提供されており、ＡＡＶ３の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿１８２９に提供されており、ＡＡＶ４の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１８２９に提供されており、ＡＡＶ５ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０８５７１６に提供されており、ＡＡＶ６の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１８６２に提供されており、ＡＡＶ７及びＡＡＶ８ゲノムの少なくとも一部は、それぞれＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＸ７５３２４６及びＡＸ７５３２４９に提供されており（ＡＡＶ８に関連する米国特許第７，２８２，１９９号及び同第７，７９０，４４９号も参照されたい）、ＡＡＶ９ゲノムは、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７８： ６３８１－６３８８（２００４）に提供されており、ＡＡＶ１０ゲノムは、Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１３（１）： ６７－７６（２００６）に提供されており、ＡＡＶ１１ゲノムは、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，３３０（２）： ３７５－３８３（２００４）に提供されている。ＭｙｏＡＡＶ １Ａに関する情報は、Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒ ｅｔ ａｌ．（Ｃｅｌｌ １８４（１９）： ４９１９－３８（２０２１））に提供されている。ＡＡＶＭＹＯに関する情報は、Ｗｅｉｎｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ １１：５４３２（２０２０）、ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１４６７－０２０－１９２３０）に提供されている。ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶａｎｃ８０、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．１０、及びＡＡＶ－Ｂ１のゲノムも、当該技術分野で既知である。ウイルスＤＮＡ複製（ｒｅｐ）、カプシド形成／パッケージング、及び宿主細胞染色体組み込みを指示するシス作用配列は、ＡＡＶ ＩＴＲ内に含まれる。３つのＡＡＶプロモーター（それらの相対マップ位置に対してｐ５、ｐ１９、及びｐ４０と名付けられる）は、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をコードする２つのＡＡＶ内部オープンリーディングフレー

ムの発現を駆動する。単一のＡＡＶイントロンの差異的スプライシング（ヌクレオチド２１０７及び２２２７における）と相まって、２つのｒｅｐプロモーター（ｐ５及びｐ１９）により、ｒｅｐ遺伝子から４つのｒｅｐタンパク質（ｒｅｐ７８、ｒｅｐ６８、ｒｅｐ５２、及びｒｅｐ４０）が産生される。ｒｅｐタンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性を有する。ｃａｐ遺伝子は、ｐ４０プロモーターから発現され、３つのカプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３をコードする。選択的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位は、３つの関連するカプシドタンパク質の産生に関与する。単一コンセンサスポリアデニル化部位は、ＡＡＶゲノムのマップ位置９５に位置する。ＡＡＶのライフサイクル及び遺伝学は、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１５８：９７－１２９（１９９２）に概説されている。

【００８４】

ウイルスＤＮＡ複製（ｒｅｐ）、カプシド形成／パッケージング、及び宿主細胞染色体組み込みを指示するシス作用配列は、ＡＡＶ ＩＴＲ内に含まれる。３つのＡＡＶプロモーター（それらの相対マップ位置に対してｐ５、ｐ１９、及びｐ４０と名付けられる）は、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をコードする２つのＡＡＶ内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。単一のＡＡＶイントロンの差異的スプライシング（ヌクレオチド２１０７及び２２２７における）と相まって、２つのｒｅｐプロモーター（ｐ５及びｐ１９）により、ｒｅｐ遺伝子から４つのｒｅｐタンパク質（ｒｅｐ７８、ｒｅｐ６８、ｒｅｐ５２、及びｒｅｐ４０）が産生される。ｒｅｐタンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性を有する。ｃａｐ遺伝子は、ｐ４０プロモーターから発現され、３つのカプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３をコードする。選択的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位は、３つの関連するカプシドタンパク質の産生に関与する。単一コンセンサスポリアデニル化部位は、ＡＡＶゲノムのマップ位置９５に位置する。ＡＡＶのライフサイクル及び遺伝学は、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１５８：９７－１２９（１９９２）に概説されている。

【００８５】

ＡＡＶは、例えば、遺伝子治療において、外来ＤＮＡを細胞に送達するためのベクターとしてそれを魅力的にする固有の特徴を有する。培養中の細胞のＡＡＶ感染は非細胞変性であり、ヒト及び他の動物の自然感染はサイレント及び無症候性である。更に、ＡＡＶは、多くの哺乳動物細胞に感染し、インビボで多くの異なる組織を標的とする可能性を可能にする。更に、ＡＡＶは、緩徐に分裂する細胞及び非分裂細胞を形質導入し、転写的に活性な核エピソーム（染色体外要素）として本質的にそれらの細胞の寿命にわたって存続し得る。ＡＡＶプロウイルスゲノムは、プラスミドにおいてクローニングされたＤＮＡとして感染性であり、組換えゲノムの構築を実現可能にする。更に、ＡＡＶ複製及びゲノムカプシド形成及び組み込みを指示するシグナルが、ＡＡＶゲノムのＩＴＲ内に含まれるために、内部の約４．３ｋｂのゲノム（複製及び構造カプシドタンパク質をコードする、ｒｅｐ－ｃａｐ）の一部又は全てが、外来ＤＮＡで置き換えられてもよい。ｒｅｐ及びｃａｐタンパク質は、トランスで提供され得る。ＡＡＶの別の重要な特徴は、それが極めて安定かつ頑健なウイルスであることである。これは、アデノウイルスを不活性化するために使用される条件に容易に耐え、ＡＡＶの低温保存の重要性を低くする。ＡＡＶは、凍結乾燥され得、ＡＡＶ感染細胞は、重複感染に耐性ではない。

【００８６】

いくつかの態様では、ＡＡＶは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く。いくつかの態様では、ＡＡＶは、組換え直鎖ＡＡＶ（ｒＡＡＶ）、一本鎖ＡＡＶ、又は組換え自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）である。自己相補的（ｓｃ）技術は、一本鎖ウイルスＤＮＡゲノムのそれ自体への結合を可能にし、それによって第２の鎖ＤＮＡ合成をプライミングする。このｓｃエレメントは、ｓｃエレメントを欠く構築物と比較して、遺伝子発現を高速化及び強化する。いくつかの特定の態様では、ＡＡＶは、ｓｓＡＡＶ又はｓｓｒＡＡＶである。

【００８７】
ＡＡＶベクターの進歩は、単回注射で治療用導入遺伝子を送達するためのより安全でより効率的なウイルスビヒクルをもたらしており、遺伝子治療は現在、単一遺伝子疾患のための好ましい治療的介入である。ＡＡＶベクターは、有糸分裂後の標的組織における遺伝子産物の長期的な発現を提供することができる。したがって、現在のＡＡＶベースの戦略は、１回限りのベクター投与のみを必要とし得る。
【００８８】
本開示の組換えＡＡＶゲノムは、配列番号１及び６～１１に示される配列のうちの任意の１つ以上を含む、例えば、１つ以上のＥＩＦ２Ｂ５ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドに隣接する１つ以上のＡＡＶ　ＩＴＲを含む。１つ以上のＥＩＦ２Ｂ５遺伝子を各々含むｒＡＡＶが、本明細書に提供される。１つ以上のＥＩＦ２Ｂ５遺伝子を含むｒＡＡＶは、１、２、３、４、５、６、７又は８つのＥＩＦ２Ｂ５タンパク質をコードし得る。
【００８９】
したがって、いくつかの態様では、ウイルスベクターは、ＡＡＶ、例えばＡＡＶ１（すなわち、ＡＡＶ１逆位末端反復（ＩＴＲ）及びＡＡＶ１カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ２（すなわち、ＡＡＶ２　ＩＴＲ及びＡＡＶ２カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ３（すなわち、ＡＡＶ３　ＩＴＲ及びＡＡＶ３カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ４（すなわち、ＡＡＶ４　ＩＴＲ及びＡＡＶ４カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ５（すなわち、ＡＡＶ５　ＩＴＲ及びＡＡＶ５カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ６（すなわち、ＡＡＶ６　ＩＴＲ及びＡＡＶ６カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ７（すなわち、ＡＡＶ７　ＩＴＲ及びＡＡＶ７カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ８（すなわち、ＡＡＶ８　ＩＴＲ及びＡＡＶ８カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ９（すなわち、ＡＡＶ９　ＩＴＲ及びＡＡＶ９カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ１０（すなわち、ＡＡＶ１０　ＩＴＲ及びＡＡＶ１０カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ１１（すなわち、ＡＡＶ１１　ＩＴＲ及びＡＡＶ１１カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ１２（すなわち、ＡＡＶ１２　ＩＴＲ及びＡＡＶ１２カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶ１３（すなわち、ＡＡＶ１３　ＩＴＲ及びＡＡＶ１３カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶａｎｃ８０（すなわち、ＡＡＶａｎｃ８０　ＩＴＲ及びＡＡＶａｎｃ８０カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶｒｈ．７４（すなわち、ＡＡＶｒｈ．７４　ＩＴＲ及びＡＡＶｒｈ．７４カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶｒｈ．８（すなわち、ＡＡＶｒｈ．８　ＩＴＲ及びＡＡＶｒｈ．８カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＡＡＶｒｈ．１０（すなわち、ＡＡＶｒｈ．１０　ＩＴＲ及びＡＡＶｒｈ．１０カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、若しくはＡＡＶ－Ｂ１、若しくはシュードタイプＡＡＶ、例えばＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、若しくはＡＡＶ２／９、若しくはＡＡＶＭＹＯ、又はそれらの誘導体のうちのいずれかである。
【００９０】
様々な態様では、ＡＡＶは、ＡＡＶ９である。ＡＡＶ９は、臨床において確立された安全性プロファイルを有する筋肉及び／又は神経学的適応症のための最も広く使用されているベクターとなっている。ＡＡＶ９の髄腔内投与は、神経系全体に導入遺伝子を播種することを可能にし、現在、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ、ＮＣＴ０３３８１７２９）に対してＦＤＡにより承認されており、かつ神経セロイドリポフスチン症３（ＣＬＮ３、ＮＣＴ０３７７０５７２）、ＣＬＮ６（ＮＣＴ０２７２５５８０）、巨大軸索ニューロパチー（ＧＡＮ、ＮＣＴ０２３６２４３８）、ムコ多糖症３Ａ型（ＮＣＴ０２７１６２４６）及び３Ｂ型（ＮＣＴ０３３１５１８２）、並びにＤＭＤ遺伝子におけるエクソン２重複（ＮＣＴ０４２４０３１４）の治療に向けた治験中である。そのような特徴は、ＡＡＶ９を、中枢神経系の白質異常をもたらす、ＥＩＦ２Ｂ５の変異などの遺伝性障害の治療のための理想的な遺伝子送達方法とする。ＡＡＶ９はまた、シュワン細胞、及び他の末梢性ニューロパチーを標的とすることができることが示されている。より重要なことに、ＡＡＶ９は、大型

動物及び非ヒト霊長類においてシュワン細胞を形質導入することが報告されており、このことは、治療用遺伝子のヒトシュワン細胞への送達を必要とする臨床応用のための望ましいウイルスベクターであることを示す。最後に、ＣＮＳ疾患の他のモデルにおける研究からのデータは、ＡＡＶ９ベクターがＣＮＳを効率的にトランスフェクトすることを示す（Ｌｕｋａｓｈｃｈｕｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　３：１５０５５，２０１６、ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｍｔｍ．２０１５．５５）。

【００９１】

本開示のＤＮＡプラスミドは、本開示のｒＡＡＶゲノムを含む。ＤＮＡプラスミドは、ｒＡＡＶゲノムの感染性ウイルス粒子への組み立てのために、ＡＡＶのヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、Ｅ１欠失アデノウイルス、又はヘルペスウイルス）の感染に許容される細胞に移行される。パッケージングされるＡＡＶゲノム、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が細胞に提供される、ｒＡＡＶ粒子を産生する技法は、当該技術分野において標準的である。ｒＡＡＶの産生は、以下の構成要素、ｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムとは分離した（すなわち、その中に存在しない）ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が、単一細胞（本明細書でパッケージング細胞と表される）内に存在することを必要とする。ＡＡＶ　ｒｅｐ遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来してもよく、ＡＡＶ血清型ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶａｎｃ８０、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、又はＡＡＶ－Ｂ１を含むがこれらに限定されない、ｒＡＡＶゲノムＩＴＲとは異なるＡＡＶ血清型に由来してもよい。いくつかの態様では、ｒＡＡＶゲノムのＡＡＶ　ＤＮＡは、ＡＡＶ血清型ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶａｎｃ８０、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、又はＡＡＶ－Ｂ１を含むがこれらに限定されない、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来する。他のタイプのｒＡＡＶバリアント、例えば、カプシド変異を有するｒＡＡＶも本開示に含まれる。例えばＭａｒｓｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２２（１１）：１９００－１９０９（２０１４）を参照されたい。上に示される、様々なＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当該技術分野において既知である。同族構成要素の使用が、特に企図される。シュードタイプｒＡＡＶの産生は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ０１／８３６９２に開示されている。「ＡＡＶビリオン」又は「ＡＡＶウイルス粒子」又は「ＡＡＶ粒子」又は「ＡＡＶベクター粒子」とは、少なくとも１つのＡＡＶカプシドタンパク質及びカプシド化されたポリヌクレオチドＡＡＶベクターからなるウイルス粒子を指す。粒子が異種ポリヌクレオチド（すなわち、野生型ＡＡＶゲノム以外のポリヌクレオチド、例えば、哺乳動物細胞に送達される導入遺伝子）を含む場合、それは、通常、「ＡＡＶベクター粒子」又は単に「ＡＡＶベクター」と称される。したがって、そのようなベクターがＡＡＶベクター粒子内に含まれるため、ＡＡＶベクター粒子の産生には、必然的にＡＡＶベクターの産生が含まれる。パッケージングされるＡＡＶゲノム、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が細胞に提供される、ｒＡＡＶ粒子を産生する技法は、当該技術分野において標準的である。ｒＡＡＶの産生は、以下の構成要素、ｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムとは分離した（すなわち、その中に存在しない）ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が、単一細胞（本明細書でパッケージング細胞と表される）内に存在することを必要とする。ＡＡＶ　ｒｅｐ遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来してもよく、ＡＡＶ血清型ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、又はＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、又はＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶＡｎｃ８０、ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、又はＡＡＶ２／９及びそれらの誘導体を含むがこれ

らに限定されない、ｒＡＡＶゲノムＩＴＲとは異なるＡＡＶ血清型に由来してもよい。いくつかの態様では、ｒＡＡＶゲノムのＡＡＶ　ＤＮＡは、ＡＡＶ血清型ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、又はＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、又はＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶＡｎｃ８０、ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、又はＡＡＶ２／９及びそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来する。他のタイプのｒＡＡＶバリアント（例えば、カプシド変異を有するものを含む）も本開示に含まれる。そのようなバリアントとしては、ＭｙｏＡＡＶ又はＡＡＶＭＹＯ、並びに例えば、Ｍａｒｓｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２２（１１）：１９００－１９０９（２０１４）、Ｗｅｉｓｍａｎｎ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ　１１（１）：５４３２（２０２０）及びＴａｂｅｂｏｒｄｂａｒ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１８４（１９）：４９１９－４９３８　ｅ２２（２０２１）（これらは、参照によりそれらの全体が本明細書での使用のために組み込まれる）に記載される他のバリアントが挙げられるが、これらに限定されない。上に示される、様々なＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当該技術分野において既知である。同族構成要素の使用が、特に企図される。シュードタイプｒＡＡＶの産生は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ０１／８３６９２に開示されている。

【００９２】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、シュードタイプＡＡＶであり、１つのＡＡＶ血清型由来のＩＴＲと、異なるＡＡＶ血清型由来のカプシドタンパク質とを含む。いくつかの実施形態では、シュードタイプＡＡＶは、ＡＡＶ２／９（すなわち、ＡＡＶ２ＩＴＲ及びＡＡＶ９カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）である。いくつかの実施形態では、シュードタイプＡＡＶは、ＡＡＶ２／８（すなわち、ＡＡＶ２　ＩＴＲ及びＡＡＶ８カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）である。いくつかの実施形態では、シュードタイプＡＡＶは、ＡＡＶ２／１（すなわち、ＡＡＶ２　ＩＴＲ及びＡＡＶ１カプシドタンパク質を含むＡＡＶ）である。

【００９３】

いくつかの実施形態では、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、又はＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、又はＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶＡｎｃ８０、ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、又はＡＡＶ２／９及びそれらの誘導体からの１つ以上のカプシドタンパク質のキメラを含むカプシドタンパク質などの組換えカプシドタンパク質を含む。他のタイプのｒＡＡＶバリアント、例えば、カプシド変異を有するｒＡＡＶも企図される。例えば、Ｍａｒｓｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，２２（１１）：１９００－１９０９（２０１４）を参照されたい。様々なＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当該技術分野において既知である。

【００９４】

複数の研究は、長期（＞１．５年）の組換えＡＡＶ媒介性タンパク質の発現を実証している。Ｃｌａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ，８：　６５９－６６９（１９９７）[32]、Ｋｅｓｓｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔ．Ａｃａｄ　Ｓｃ．ＵＳＡ，９３：　１４０８２－１４０８７（１９９６）、及びＸｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ，７０：　８０９８－８１０８（１９９６）を参照されたい。Ｃｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ，２：６１９－６２３（２０００）及びＣｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ，４：２１７－２２２（２００１）も参照されたい。

【００９５】

組換えＡＡＶゲノムは、様々な態様では、本開示の核酸及び核酸に隣接する１つ以上のＡＡＶ　ＩＴＲを含む。ｒＡＡＶゲノムのＡＡＶ　ＤＮＡは、ＡＡＶ血清型（例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、Ａ

ＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、又はＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、又はＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶＡｎｃ８０、ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、又はＡＡＶ２／９及びそれらの誘導体）を含むがこれらに限定されない、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来してもよい。シュードタイプｒＡＡＶの産生は、例えば、ＷＯ０１／８３６９２に開示されている。他のタイプのｒＡＡＶバリアント、例えば、カプシド変異を有するｒＡＡＶも企図される。例えば、Ｍａｒｓｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，２２（１１）：１９００－１９０９（２０１４）[29]を参照されたい。上記の背景セクションに示される、様々なＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当該技術分野において既知である。

【００９６】

提供される組換えＡＡＶ（すなわち、感染性カプシド化ｒＡＡＶ粒子）は、ｒＡＡＶゲノムを含む。「ｒＡＡＶゲノム」という用語は、改変されている天然のＡＡＶゲノムに由来するポリヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、天然のｃａｐ及びｒｅｐ遺伝子を除去するために改変されている。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、内因性５’及び３’逆位末端反復（ＩＴＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶゲノムが由来したＡＡＶ血清型とは異なるＡＡＶ血清型由来のＩＴＲを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、逆位末端反復（ＩＴＲ）が５’端及び３’端に隣接した目的の導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、「遺伝子カセット」を含む。いくつかの例示的な実施形態では、両方のｒＡＡＶのゲノムは、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ　ＤＮＡを欠く、すなわち、ゲノムのＩＴＲ間にＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ　ＤＮＡは存在しない。

【００９７】

本開示のＤＮＡプラスミドは、本開示のｒＡＡＶゲノムを含む。ＤＮＡプラスミドは、ｒＡＡＶゲノムの感染性ウイルス粒子への組み立てのために、ＡＡＶのヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、Ｅ１欠失アデノウイルス、又はヘルペスウイルス）の感染に許容される細胞に移行される。パッケージングされるＡＡＶゲノム、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が細胞に提供される、ｒＡＡＶ粒子を産生する技法は、当該技術分野において標準的である。ｒＡＡＶの産生は、以下の構成要素、ｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムとは分離した（すなわち、その中に存在しない）ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が、単一細胞（本明細書でパッケージング細胞と表される）内に存在することを必要とする。ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来してもよく、ＡＡＶ血清型ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶｒｈ．８、又はＡＡＶｒｈ．１０、ＭｙｏＡＡＶ　１Ａ、ＡＡＶＭＹＯ、又はＡＡＶ－Ｂ１、ＡＡＶＡｎｃ８０、ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／８、又はＡＡＶ２／９及びそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない、ｒＡＡＶゲノムＩＴＲとは異なるＡＡＶ血清型に由来してもよい。シュードタイプｒＡＡＶの産生は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ０１／８３６９２に開示されている。

【００９８】

本開示の組換えＡＡＶゲノムは、例えば、１つ以上のＥＩＦ２Ｂ５をコードするポリヌクレオチドに隣接する１つ以上のＡＡＶ　ＩＴＲを含む。したがって、本開示の実施形態は、配列番号１、６～１１、１６及び１７のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列、又は配列番号１、６～１１、１６及び１７のうちのいずれか１つに示される配列に対して、少なくとも、若しくは約、若しくは少なくとも約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、若しくは約９９％の同一性を含むヌクレオチド配列を含む核酸を含む、ｒＡＡＶゲノムを含む。

【００９９】

本開示の実施形態は、配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに示されるヌクレオチド配列、又は配列番号１２～１４及び１８のうちのいずれか１つに示される配列に対して、少なくとも、若しくは約、若しくは少なくとも約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の同一性を含むヌクレオチド配列を含む、ｒＡＡＶゲノムを含む核酸を含む。

【０１００】

パッケージング細胞を生成する方法は、ＡＡＶ粒子の作成に必要な全ての構成要素を安定して発現する細胞株を作製することである。例えば、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠くｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムとは分離したＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにネオマイシン耐性遺伝子などの選択可能なマーカーを含むプラスミド（又は複数のプラスミド）が、細胞のゲノムに組み込まれる。ＡＡＶゲノムは、ＧＣテーリング、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む合成リンカーの付加[41]、又は直接的な平滑末端ライゲーションなどの手順によって細菌プラスミドに導入されている。次いで、パッケージング細胞株を、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスに感染させる。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、ｒＡＡＶの大規模産生に好適であることである。好適な方法の他の例は、ｒＡＡＶゲノム及び／又はｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をパッケージング細胞に導入するためのプラスミドではなく、アデノウイルス又はバキュロウイルスを用いる。

【０１０１】

ｒＡＡＶ産生の一般的原理は、例えば、Ｃａｒｔｅｒ，１９９２，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１５３３－５３９、及びＭｕｚｙｃｚｋａ，１９９２，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ　ｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ．ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５８：９７－１２９に概説されている。様々なアプローチは、Ｒａｔｓｃｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２（１９８４）、Ｈｅｒｍｏｎａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６４６６（１９８４）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１（１９８５）、ＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６２：１９６３（１９８８）、及びＬｅｂｋｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，Ｏｃｔ；８（１０）：３９８８－９６（１９８８）、Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６３：３８２２－３８２８（１９８９）、米国特許第５，１７３，４１４号、ＷＯ９５／１３３６５及び対応する米国特許第５，６５８．７７６号、ＷＯ９５／１３３９２、ＷＯ９６／１７９４７、ＰＣＴ／ＵＳ９８／１８６００、ＷＯ９７／０９４４１（ＰＣＴ／ＵＳ９６／１４４２３）、ＷＯ９７／０８２９８（ＰＣＴ／ＵＳ９６／１３８７２）、ＷＯ９７／２１８２５（ＰＣＴ／ＵＳ９６／２０７７７）、ＷＯ９７／０６２４３（ＰＣＴ／ＦＲ９６／０１０６４）、ＷＯ９９／１１７６４、Ｐｅｒｒｉｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｖａｃｃｉｎｅ　１３：１２４４－１２５０（１９９５）、Ｐａｕｌ　ｅｔ　ａｌ．Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　４：６０９－６１５（１９９３）、Ｃｌａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　３：１１２４－１１３２（１９９６）、米国特許第５，７８６，２１１号、米国特許第５，８７１，９８２号、及び米国特許第６，２５８，５９５号に記載されている。前述の文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、ｒＡＡＶ産生に関する文書のそれらの部分を特に強調する。自己相補的（ｓｃ）ｒＡＡＶの製造及び使用が具体的に企図され、例示される。

【０１０２】

したがって、本開示は、感染性ｒＡＡＶを産生するパッケージング細胞を提供する。一実施形態では、パッケージング細胞は、ＨｅＬａ細胞、２９３細胞、及びＰｅｒＣ．６細胞（同族２９３株）などの、安定して形質転換されたがん細胞である。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換されたがん細胞ではない細胞、例えば、低継代数の２９３細胞（アデノウイルスのＥ１で形質転換されたヒト胎児腎細胞）、ＭＲＣ－５細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、ＷＩ－３８細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、Ｖｅｒｏ細胞（サル腎

臓細胞）、及びＦＲｈＬ－２細胞（アカゲザル胎児肺細胞）である。

【０１０３】

いくつかの態様では、ｒＡＡＶは、当該技術分野で標準的な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィー又は塩化セシウム勾配によって精製される。ヘルパーウイルスからｒＡＡＶベクターを精製する方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｃｌａｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，１０（６）： １０３１－１０３９（１９９９）、Ｓｃｈｅｎｐｐ ａｎｄ Ｃｌａｒｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，６９ ４２７－４４３（２００２）、米国特許第６，５６６，１１８号及びＷＯ９８／０９６５７に開示されている方法を含む。

【０１０４】

本開示の核酸及びウイルスベクターを含む組成物が提供される。本明細書に記載の送達ビヒクル（ｒＡＡＶなど）を含む組成物が提供される。様々な態様では、そのような組成物はまた、薬学的に許容される担体を含む。いくつかの態様では、薬学的に許容される担体は、希釈剤、賦形剤、又は緩衝剤である。組成物はまた、アジュバントなどの他の成分を含んでもよい。

【０１０５】

許容される担体、希釈剤、賦形剤、及びアジュバントは、レシピエントに非毒性であり、好ましくは、用いられる投与量及び濃度では不活性であり、リン酸塩、クエン酸塩、若しくは他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む、単糖、二糖、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡなどのキレート剤；マンニトール若しくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；並びに／又はＴｗｅｅｎ（登録商標）、プルロニック（登録商標）、若しくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【０１０６】

滅菌されている注射可能な溶液は、必要な量のｒＡＡＶを適切な溶媒に、必要に応じて上に列挙した様々な他の成分とともに組み込み、その後濾過滅菌することによって調製される。一般的に、分散液は滅菌した活性成分を、基礎的な分散媒及び上に列挙されるものからの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクルへと組み込むことによって調製される。滅菌されている注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥及び凍結乾燥技法であり、それは、活性成分プラス予め滅菌濾過したそれらの溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす。

【０１０７】

本開示の方法で投与されるｒＡＡＶの力価は、例えば、特定のｒＡＡＶ、投与モード、治療目標、個体、及び標的化された細胞型に応じて異なり、当該技術分野における標準の方法によって決定され得る。ｒＡＡＶの力価は、１ｍＬ当たり約１×１０^{6}、約１×１０^{7}、約１×１０^{8}、約１×１０^{9}、約１×１０^{10}、約１×１０^{11}、約１×１０^{12}、約１×１０^{13}～約１×１０^{14}、又はそれ以上のＤＮａｓｅ耐性粒子（ＤＲＰ）の範囲であり得る。

【０１０８】

本開示の方法で投与されるｒＡＡＶの投与量は、例えば、特定のｒＡＡＶ、投与モード、投与の時間、治療目標、個体、及び標的化された細胞型に応じて異なり、当該技術分野における標準の方法によって決定され得る。投与量は、ウイルスゲノム（ｖｇ）の単位で表されてもよい。本明細書で企図される投与量としては、約１×１０^{7}、約１×１０^{8}、約１×１０^{9}、約５×１０^{9}、約６×１０^{9}、約７×１０^{9}、約８×１０^{9}、約９×１０^{9}、約１×１０^{10}、約２×１０^{10}、約３×１０^{10}、約４×１０^{10}、約５×１０^{10}、約６×１０^{10}、約７×１０^{10}、約８×１０^{10}、約９×１０^{10}、約１×１０^{11}、約２×１０^{11}、約３×１０^{11}、約４×１０^{11}、約５×１０^{11}、約６×１０^{11}、約

７×１０^{11}、約８×１０^{11}、約９×１０^{11}、約１×１０^{12}、約２×１０^{12}、約３×１０^{12}、約４×１０^{12}、約５×１０^{12}、約６×１０^{12}、約７×１０^{12}、約８×１０^{12}、約９×１０^{12}、約１×１０^{13}、約１．１×１０^{13}、約１．２×１０^{13}、約１．３×１０^{13}、約１．５×１０^{13}、約２×１０^{13}、約２．５×１０^{13}、約３×１０^{13}、約３．５×１０^{13}、約４×１０^{13}、約４．５×１０^{13}、約５×１０^{13}、約６×１０^{13}、約７×１０^{13}、約８×１０^{13}、約９×１０^{13}、約１×１０^{14}、約２×１０^{14}、約３×１０^{14}、約４×１０^{14}、約５×１０^{14}、約１×１０^{15}～約１×１０^{16}、又はそれ以上の総ウイルスゲノムの投与量が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０９】

約１×１０^{9}～約１×１０^{10}、約５×１０^{9}～約５×１０^{10}、約１×１０^{10}～約１×１０^{11}、約１×１０^{11}～約１×１０^{15}ｖｇ、約１×１０^{12}～約１×１０^{15}ｖｇ、約１×１０^{12}～約１×１０^{14}ｖｇ、約１×１０^{13}～約６×１０^{14}ｖｇ、約１×１０^{13}～約１×１０^{15}ｖｇ、及び約６×１０^{13}～約１．０×１０^{14}ｖｇの投与量も企図される。本明細書で例示される１つの用量は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達を介して投与される１ｘ１０^{13}ｖｇである。

【０１１０】

投与されるｒＡＡＶの投与量はまた、様々な態様では、ｖｇ／ｋｇの単位で表される。そのような投与量としては、約１×１０^{7}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{8}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{9}ｖｇ／ｋｇ、約５×１０^{9}ｖｇ／ｋｇ、約６×１０^{9}ｖｇ／ｋｇ、約７×１０^{9}ｖｇ／ｋｇ、約８×１０^{9}ｖｇ／ｋｇ、約９×１０^{9}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{10}ｖｇ／ｋｇ、約２×１０^{10}ｖｇ／ｋｇ、約３×１０^{10}ｖｇ／ｋｇ、約４×１０^{10}ｖｇ／ｋｇ、約５×１０^{10}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{11}ｖｇ／ｋｇ、約５×１０^{11}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約２×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約３×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約４×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約５×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約６×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約７×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約８×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約９×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約１．１×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約１．２×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約１．３×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約１．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約２×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約２．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約３×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約３．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約４×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約４．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約６×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約７×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約８×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約９×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{14}ｖｇ／ｋｇ、約２×１０^{14}ｖｇ／ｋｇ、約３×１０^{14}ｖｇ／ｋｇ、約４×１０^{14}ｖｇ／ｋｇ、約５×１０^{14}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{15}ｖｇ／ｋｇ、又は約１×１０^{16}ｖｇ／ｋｇの投与量が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１１】

約１×１０^{9}ｖｇ／ｋｇ～約１×１０^{10}ｖｇ／ｋｇ、約５×１０^{9}ｖｇ／ｋｇ～約５×１０^{10}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{10}ｖｇ／ｋｇ～約１×１０^{11}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{11}ｖｇ／ｋｇ～約１×１０^{15}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ～約１×１０^{15}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ～約１×１０^{14}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ～約２×１０^{14}ｖｇ／ｋｇ、約１×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ～約１×１０^{15}ｖｇ／ｋｇ、及び約６×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ～約１．０×１０^{14}ｖｇ／ｋｇの投与量も、様々な態様では含まれる。本明細書で例示されるいくつかの用量は、髄腔内、脳室内、脳内、静脈内、槽内、又はエアロゾル送達を介して投与される約１．５×１０^{11}ｖｇ／ｋｇ又は約３×１０^{13}ｖｇ／ｋｇである。

【０１１２】

本開示のｒＡＡＶを用いた細胞の形質導入又はトランスフェクションは、ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子／タンパク質の持続的発現をもたらす。本明細書で使用される場合、「形質導入」及び「トランスフェクション」という用語は互換的に使用される。「形質導入」又は「トランスフェクション」という用語は、例として、標的細胞によるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子／タ

ンパク質の発現をもたらす本明細書に記載の複製欠損ｒＡＡＶを介して、インビボ又はインビトロのいずれかで、ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子の標的細胞への投与／送達を指すために使用される。したがって、本開示は、ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子を発現するｒＡＡＶを、細胞又は対象に投与／送達する方法を提供する。いくつかの態様では、対象は、哺乳動物である。いくつかの態様では、哺乳動物は、ヒトである。これらの方法は、細胞及び組織（アストロサイト、ニューロン、グリア、末梢運動ニューロン、感覚運動ニューロン、ニューロン、シュワン細胞、並びに筋肉、肝臓、及び脳などの他の組織又は器官を含むが、これらに限定されない）を、本明細書に記載の１つ以上のｒＡＡＶを用いて形質導入することを含む。形質導入は、細胞特異的な制御エレメントを含む遺伝子カセットを用いて実施することができる。

【０１１３】

インビボ又はインビトロで、標的細胞、例えば、アストロサイトを、送達ビヒクル（例えば、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、又はベクター（例えば、ｒＡＡＶ））を用いて形質導入する方法が提供される。インビボでの方法は、有効用量又は有効複数用量の、送達ビヒクル（ｒＡＡＶなど）を含む組成物を、それを必要とする動物（ヒト対象又は患者を含む）に投与するステップを含む。用量が障害／疾患の発症前に投与される場合、投与は予防的である。用量が障害／疾患の発症後に投与される場合、投与は治療的である。有効用量とは、治療される障害／疾患状態に関連する少なくとも１つの症状を緩和（排除若しくは低減）する、障害／疾患状態に対する進行を遅延若しくは予防する、障害／疾患状態の進行を遅延若しくは予防する、疾患の程度を軽減する、疾患の寛解（部分又は完全）をもたらす、及び／又は生存を延長する用量のことである。したがって、有効用量（又は本質的に同時に投与される用量、又は間隔を置いて投与される用量）の本明細書に記載のｒＡＡＶを、それを必要とする対象に投与する方法が提供される。

【０１１４】

本明細書で提供されるのは、変異ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子又は異常ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子の発現に関連する疾患を治療、改善、又は予防するための医薬及び方法である。分子的、生化学的、組織学的、及び機能的転帰尺度は、方法の治療的有効性を示す。動物及び／又はヒトにおけるヒトＥＩＦ２Ｂ５転写産物のレベルは、ＲＴ－ＰＣＲ及び／又はＲＮＡｓｅｑによって確認することができる。目的の組織及び器官におけるＥＩＦ２Ｂ５タンパク質の発現レベルは、ウエスタンブロッティングを使用して評価することができる。ＥＩＦ２Ｂ５の局在化は、免疫組織化学によって確認することができる。マウスにおける潜在的な治療の有効性を評価するために、機能の測定は、ロータロッド試験及び当該技術分野で既知の白質ジストロフィーに対する他の機能試験方法を含むがこれらに限定されない、様々な機能的転帰尺度を使用して行うことができる。患者において、成功を収める治療を評価するために、様々な機能的転帰尺度を使用してもよい。これには、歩行分析、ＭＲＩ／ＤＴＩ、発作モニタリング（ＥＥＧ）、及び当該技術分野で既知の白質ジストロフィーに対する他の試験方法が含まれるが、これらに限定されない。更に、例えば、Ｐａｒｉｋｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ Ｍｅｔａｂ ２０１５；１１４（４）：５０１－５１５を参照されたい。

【０１１５】

本開示の方法では、ＥＩＦ２Ｂ５タンパク質の発現は、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも９５、少なくとも９８パーセント、少なくとも９９パーセント、又は１００パーセント増加する。

【０１１６】

併用療法も本開示によって企図される。本明細書で使用される組み合わせは、同時治療又は連続治療を含む。新規療法との組み合わせであるとして、本開示の方法と標準的な医学的治療との組み合わせが特に企図される。いくつかの実施形態では、併用療法は、本明細書に開示の遺伝子治療と組み合わせて免疫抑制剤を投与することを含む。

【０１１７】

免疫抑制剤は、遺伝子治療の投与後の対象におけるｒＡＡＶに対する免疫応答の開始前又は後に投与され得る。更に、免疫抑制剤は、遺伝子治療又はタンパク質置換療法と同時に投与されてもよい。対象における免疫応答としては、対象へのｒＡＡＶの投与に続くか、又はそれによって引き起こされる、有害な免疫応答又は炎症反応が挙げられる。免疫応答は、投与されたｒＡＡＶに応答する、対象における抗体の産生であってもよい。

【０１１８】

例示的な免疫抑制剤としては、グルココルチコステロイド、ヤヌスキナーゼ阻害剤、カルシニューリン阻害剤、ｍＴＯＲ阻害剤、サイクトスタティック剤、例えば、プリン類似体、メトトレキサート、及びシクロホスファミド、イノシン一リン酸デヒドロゲナーゼ（ＩＭＤＨ）阻害剤、生物製剤、例えば、モノクローナル抗体又は融合タンパク質及びポリペプチド、並びにジペプチドボロン酸分子、例えば、ボルテゾミブが挙げられる。

【０１１９】

免疫抑制剤は、対象の炎症を減少させ、免疫系を抑制又は調節するステロイドである、抗炎症性ステロイドであってもよい。例示的な抗炎症性ステロイドは、グルココルチコイド、例えば、プレドニゾロン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、メトトレキサート、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、デフラザコート、ブデソニド、又はプレドニゾンである。

【０１２０】

ヤヌスキナーゼ阻害剤は、ヤヌスキナーゼファミリーの酵素のうちの１つ以上を標的とすることによる、ＪＡＫ／ＳＴＡＴシグナル伝達経路の阻害剤である。例示的なヤヌスキナーゼ阻害剤としては、トファシチニブ、バリシチニブ、ウパダシチニブ、ペフィシチニブ、及びオクラシチニブが挙げられる。

【０１２１】

カルシニューリン阻害剤は、シクロフィリンに結合し、カルシニューリンの活性を阻害する。例示的なカルシニューリン阻害剤としては、シクロスポリン、タクロリムス、及びピセクロリムスが挙げられる。

【０１２２】

ｍＴＯＲ阻害剤は、セリン／スレオニン特異的タンパク質キナーゼｍＴＯＲを低減又は阻害する。例示的なｍＴＯＲ阻害剤としては、ラパマイシン（シロリムスとしても知られる）、エベロリムス、及びテムシロリムスが挙げられる。

【０１２３】

免疫抑制剤には、免疫抑制マクロライドが含まれる。「免疫抑制マクロライド」という用語は、対象の免疫系を抑制又は調節するマクロライド剤を指す。マクロライドは、クラジノース又はデソアミンなどの１つ以上のデオキシ糖が付着した大きな大環状ラクトン環を含む薬剤のクラスである。ラクトン環は通常、１４、１５、又は１６員である。マクロライドは、ポリケチドクラスの薬剤に属し、天然産物であり得る。免疫抑制マクロライドの例としては、タクロリムス、ピメクロリムス、及びラパマイシン（シロリムスとしても知られる）が挙げられる。

【０１２４】

プリン類似体は、ヌクレオチド合成を阻止し、ＩＭＤＨ阻害剤を含む。例示的なプリン類似体としては、アザチオプリン、ミコフェノレート、例えば、ミコフェノレート酸又はミコフェノール酸モフェチル、及びレフノミドが挙げられる。

【０１２５】

例示的な免疫抑制生物製剤としては、アバタセプト、アダリムマブ、アナキンラ、セルトリズマブ、エタネルセプト、ゴリムマブ、インフリキシマブ、イキセキズマブ、ナタリズマブ、リツキシマブ、セクキヌマブ、トシリズマブ、ウステキネヌマブ、ベドリズマブ、バシリキシマブ、ベラタセプト、及びダクリズマブが挙げられる。

【０１２６】

特に、免疫抑制剤は、抗ＣＤ２０抗体である。抗ＣＤ２０特異的抗体という用語は、ＣＤ２０に特異的に結合するか、又はＣＤ２０の発現若しくは活性を阻害若しくは低減する

抗体を指す。例示的な抗ＣＤ２０抗体としては、リツキシマブ、オクレリズマブ、又はオファツムマブが挙げられる。

【０１２７】

免疫抑制抗体の追加の例としては、抗ＣＤ２５抗体（又は抗ＩＬ２抗体又は抗ＴＡＣ抗体）、例えば、バシリキシマブ及びダクリズマブ、並びに抗ＣＤ３抗体、例えば、ムロモナブ－ＣＤ３、オテリキシズマブ、テプリズマブ、及びビシリズマブ、抗ＣＤ５２抗体、例えば、アレムツズマブが挙げられる。

【０１２８】

１つの例示的な併用療法は、ＡＡＶベクターの送達の前の、又はそれと同時の、ラパマイシン及びリツキシマブの送達である。別の例示的な併用療法は、ラパマイシン、リツキシマブ、及びコルチコステロイド、例えば、プレドニゾンの送達である。

【０１２９】

有効用量の、本開示の核酸、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、ウイルスベクター、又は組成物の投与は、髄腔内、脳内、脳室内、槽内、筋肉内、非経口、血管内、静脈内、経口、頬側、経鼻、肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、又は膣を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で標準的な経路によるものであり得る。様々な態様では、有効用量は、経路の組み合わせによって送達される。例えば、様々な態様では、有効用量は、髄腔内、脳内、脳室内、静脈内、槽内、及び／若しくは筋肉内、又は髄腔内及び／若しくは静脈内及び／若しくは脳室内などで送達される。いくつかの態様では、有効用量は、順に、又は連続して送達される。いくつかの態様では、有効用量は、同時に送達される。投与経路及び本開示のｒＡＡＶのＡＡＶ構成要素の血清型（特に、ＡＡＶ　ＩＴＲ及びカプシドタンパク質）は、治療される感染及び／又は疾患状態、並びにＥＩＦ２Ｂ５遺伝子を発現する標的細胞／組織を考慮して、当業者によって選択及び／又は適合されてもよい。

【０１３０】

特に、送達ビヒクル（ｒＡＡＶなど）の実際の投与は、送達ビヒクル（ｒＡＡＶなど）を対象の標的細胞（すなわち、アストロサイト）に輸送するであろう任意の物理的方法を使用することによって達成されてもよい。投与としては、脳脊髄液（ＣＳＦ）への注射（髄腔内）、脳室内注射、脳内注射、血流への注射及び／又は神経系への直接注射、槽内注射（又は大槽内注射（ＩＣＭ））、又は鼻腔内が挙げられるが、これらに限定されない。単純にリン酸塩緩衝生理食塩水にｒＡＡＶを再懸濁させることは、組織発現に有用なビヒクルを提供するために十分であることが実証されており、ｒＡＡＶと共投与することができる担体又は他の構成要素に関して、既知の制限はない（しかしながら、ＤＮＡを分解する組成物は、ｒＡＡＶを用いる通常の様式では回避されるべきである）。ｒＡＡＶのカプシドタンパク質は、ｒＡＡＶがニューロンなどの目的の特定の標的組織に標的化されるように改変され得る。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ０２／０５３７０３を参照されたい。医薬組成物は、髄腔内注射のための注射可能な製剤として、又は吸入のためのエアロゾル製剤として調製され得る。髄腔内、脳室内、脳内、又は槽内注射のための多数の製剤が先行して開発されており、本開示の方法を実施する際に使用され得る。送達ビヒクル（ｒＡＡＶなど）は、投与及び取り扱いを容易にするために、任意の薬学的に許容される担体とともに使用することができる。

【０１３１】

送達ビヒクル（ｒＡＡＶなど）の分散液は、グリセロール、ソルビトール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中で、並びに油中で調製することができる。通常の保存条件及び使用下においては、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含む。これに関連して、用いられる滅菌水性媒体は全て、当業者に周知の標準的な技法によって容易に入手可能である。

【０１３２】

注射可能な使用に好適な薬学的形態としては、滅菌水溶液又は分散液、及び滅菌注射可能溶液又は分散液の即時調製用の滅菌粉末が挙げられる。全ての場合において、この形態は、滅菌でなければならず、容易なシリンジ注射可能性（ｓｙｒｉｎｇｅａｂｉｌｉｔｙ

）である程度に流動的でなければならない。製造及び保存の条件下で安定していなければならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール、ソルビトールなど）、それらの好適な混合物、及び植物油を含む、溶媒又は分散媒体であり得る。適切な流動性は、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には、必要な粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、ｓｕＭＰＺ又は塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の持続吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの使用によってもたらされ得る。

【０１３３】

滅菌されている注射可能な溶液は、必要な量のｒＡＡＶを適切な溶媒に、必要に応じて上に列挙した様々な他の成分とともに組み込み、その後濾過滅菌することによって調製される。一般的に、分散液は滅菌した活性成分を、基礎的な分散媒及び上に列挙されるものからの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクルへと組み込むことによって調製される。滅菌されている注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥及び凍結乾燥技法であり、それは、活性成分プラス予め滅菌濾過したそれらの溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす。

【０１３４】

本開示はまた、本明細書に記載の疾患又は障害の治療に使用するためのキットを提供する。そのようなキットは、薬学的に許容される担体中に、上述の本明細書に記載の核酸のうちのいずれか、又は上述の本明細書に記載のウイルスベクターのうちのいずれかを含む、少なくとも第１の無菌組成物を含む。別の構成要素は、任意選択的に、治療用組成物の投与のための好適な容器及びビヒクルとともに、障害の治療のための第２の治療剤である。キットは、第１及び第２の組成物を懸濁し、希釈し、又はその送達を行うための溶液又は緩衝液を任意選択的に含む。

【０１３５】

一実施形態では、そのようなキットは、密封されたボトル又はベッセルなどの容器にパッケージングされた希釈剤中の核酸又はベクターを含み、核酸若しくはベクターの使用を説明するラベルが容器に貼られているか、又はラベルがパッケージに含まれている。一実施形態では、希釈剤は、容器内のヘッドスペースの量（例えば、液体製剤と容器の上部との間の空気の量）が非常に少なくなるように、容器内にある。好ましくは、ヘッドスペースの量は無視できる（すなわち、ほとんどない）。

【０１３６】

いくつかの態様では、製剤は、安定剤を含む。「安定剤」という用語は、加熱又は凍結中に生じるものなどの有害な条件から製剤を保護する、及び／又は安定状態で製剤の安定性又は保存期間を延長する物質又は賦形剤を指す。安定剤の例としては、スクロース、ラクトース及びマンノースなどの安定剤；マンニトールなどの糖アルコール；グリシン又はグルタミン酸などのアミノ酸；並びにヒト血清アルブミン又はゼラチンなどのタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３７】

いくつかの態様では、製剤は、抗微生物保存剤を含む。「抗微生物保存剤」という用語は、組成物に加えられて、使用されるバイアル又は容器の反復穿刺時に導入され得る微生物の増殖を阻害する任意の物質を指す。抗微生物保存剤の例としては、チメロサール、２－フェノキシエタノール、塩化ベンゼトニウム、及びフェノールなどの物質が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３８】

いくつかの態様では、キットは、キット中に提供される試薬の使用を説明するラベル及

び／又は説明書を含む。キットはまた、本明細書に記載の方法で使用される組成物のうちの１つ以上を送達するためのカテーテル、シリンジ、又は他の送達デバイスを任意選択的に含む。

【０１３９】

この文書全体は、統一された開示として関連することが意図されており、特徴の組み合わせがこの文書と同じ文章、又は段落、又はセクションで一緒に見られない場合でも、本明細書に記載の特徴の全ての組み合わせが企図されることを理解されたい。本開示はまた、例えば、上で具体的に言及される変形よりもいくらか範囲が狭い本開示の全ての実施形態を含む。属として記載される本開示の態様に関して、全ての個々の種は、本開示の別個の態様とみなされる。「ａ」又は「ａｎ」とともに記載又は特許請求される本開示の態様に関して、これらの用語は、文脈がより限定された意味を明確に必要としない限り、「１つ以上」を意味することを理解されたい。本開示の態様が特徴を「含む」と記載される場合、実施形態もまた、特徴「からなる」又は「から本質的になる」と企図される。

【０１４０】

本明細書で引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は、各個別の刊行物又は特許出願が、本開示と矛盾しない範囲内において、参照によりその全体が組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１４１】

本明細書に記載の実施例及び実施形態は、例示的な目的のみのためのものであり、それらの観点から様々な修正又は変更が当業者に示唆されるが、本出願の趣旨及び範囲、並びに添付の特許請求の範囲内に含まれることを理解されたい。したがって、以下の実施例は、限定ではなく例示として提供される。

【実施例】

【０１４２】

実施例１

ＥＩＦ２Ｂ５タンパク質をコードする遺伝子治療構築物、並びに材料及び方法

最初に、ＥＩＦ２Ｂ５をコードする３つのＡＡＶゲノムベクター構築物を生成した。これらの構築物は、アストロサイトを標的とするプロモーター：ＣＢＡプロモーター及びＣＭＶエンハンサーを含むユビキタスプロモーター（ＣＡＧプロモーターと称される）（配列番号３）、全長グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）プロモーター（配列番号５）、及びＧＦＡＰプロモーターの短縮型バージョン、すなわち、ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄプロモーター（配列番号４）を含む。ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄプロモーターは、従来の約２．２ｋｂのヒトＧＦＡＰプロモーターに由来するコンパクトなＧＦＡＰプロモーターである。ベクターの他の重要な構成要素としては、ＣＮＳを効率的に標的化するためのＡＡＶ９カプシド、（目的の遺伝子に対して）より大きなパッケージング能力を有する一本鎖構築物を作製するＡＡＶ２逆位末端反復（ＩＴＲ）、ヒトｅＩＦ２Ｂ５コード配列、及び転写後ポリアデニル化（ポリＡ）配列が挙げられる（図１）。

【０１４３】

図１２～１４に示すように、ＣＡＧプロモーター（配列番号３）、ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄプロモーター（配列番号４）、又はＧＦＡＰプロモーター（配列番号５）の制御下でのＥＩＦ２Ｂ５　ｃＤＮＡの全長転写産物、及び様々な他の構成要素を含むこれらの配列のそれぞれ。これらの構築物のそれぞれは、ＥＩＦ２Ｂ５発現の回復を試験するように設計された。３つの構築物それぞれの具体的な配列を表１～３に提供し、図１２～１４に示す。

【０１４４】

ＧＦＡＰ、ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ、及びＣＢＡプロモーターを、それぞれｅＩＦ２Ｂ５を有するプラスミドにクローニングした。ＧＦＡＰ（２．２ｋｂ）及びｅＩＦ２Ｂ５（２．２ｋｂ）、及びわずか６８１ｂｐの短縮型ｇｆＡＢＣ（１）Ｄプロモーターを評価した。各構築物を配列決定し、ｅＩＦ２Ｂ５のｍＲＮＡ及びタンパク質レベルをインビトロで評価した。クローニング、配列決定、及びインビトロ発現分析を実施した。

【０１４５】
材料及び方法
ベクター作成。
組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクターを、Ａｎｄｅｌｙｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓにおいて、接着性ＨＥＫ２９３細胞におけるリン酸カルシウム媒介性トリプルトランスフェクションを使用し、続いて精製することにより製造した。簡潔には、回収された培地を濾過し、濃縮し、次いで勾配超遠心分離、続いてイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。ベクターを２０ｍＭのトリス（ｐＨ８．０）、１ｍＭの$MgCl_2$、及び２００ｍＭのＮａＣｌ及び０．００１％のプルロニックＦ６８中に配合し、滅菌濾過した。ＡＡＶ作成プロセスは、Ｒａｂｉｎｏｗｏｔｉｚ ｅｔ ａｌ．（Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．２００２ ７６（２）：７９１－８０１、ｄｏｉ： １０．１１２８／ｊｖｉ．７６．２．７９１－８０１．２００２により記載された方法を使用して開発した。物理的力価の決定は、ウイルスカプシドの消化後の非カプシド化ＤＮＡの分解に基づいて、ｄｄＰＣＲによって求めた。

【０１４６】
細胞株。
ヒト胎児腎２９３（ＨＥＫ２９３）細胞（ＡＴＣＣカタログ番号ＣＲＬ－１５７３）を使用して、プラスミドＤＮＡのトランスフェクションを確認した。

【０１４７】
疾患メカニズムを研究するための関連するインビトロ系として、アストロサイト細胞株を確立し、本開示のＡＡＶ構築物を試験するために、皮膚生検を、ｅＩＦ２Ｂ５ ＶＷＭが確認された患者に対して行った。患者の皮膚生検から線維芽細胞培養を確立し、線維芽細胞を目的の一次細胞型であるアストロサイトに変換した（図３）。

【０１４８】
インビトロでのＧＦＰ発現。
６ウェルプレートで９０％のコンフルエントＨＥＫ２９３細胞を、製造業者のプロトコルに従って、リポフェクタミン３０００を使用して、２．５ｕｇのプラスミドＤＮＡを用いてトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、細胞を撮像、回収し、細胞ペレットを－８０Ｃで凍結させた。非トランスフェクション細胞の１つのウェルも、陰性対照として同時に回収した。

【０１４９】
ＲＮＡを、Ｔｒｉｚｏｌを使用して細胞から単離し、ＤＮＡｓｅＩ処理し、ｃＤＮＡを、Ｑｉａｇｅｎ ＲＴ２ Ｆｉｒｓｔ Ｓｔｒａｎｄ合成キットを使用して生成した。相対ＧＦＰ ｍＲＮＡレベルを、ＳＹＢＲグリーンと、ＧＦＰに特異的なプライマーと、内因性対照としてのベータアクチンに特異的なプライマーとを用いた比較ＣＴ法を使用して、ｑＰＣＲにより定量化した。

【０１５０】
マウス及びマウスの供給源。
野生型（ＷＴ）マウス。
新生（出生後１～３日目）のＣ５７ＢＬ／６マウスを、様々な実験で使用した。

【０１５１】
Ｒ１９１Ｈ ＶＷＭマウス。
Ｒ１９１Ｈ ＶＷＭマウス（Ｗｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（ｅＬｉｆｅ．２０１９；８：ｅ４２９４０、ｄｏｉ： １０．７５５４／ｅＬｉｆｅ．４２９４０）に記載される）を、ＶＷＭの動物モデルとして使用する。記載される変異は、ヒトＧ５８４Ａ変異、Ａｒｇ１９５Ｈ、Ｃｒｅｅ白質脳炎に対応する（Ｆｏｇｌｉ ｅｔ ａｌ．（Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ５２（４）：５０６－１０，２００２）、ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１００２／ａｎａ．１０３３９）により記載される）。これは、最も急速に進行する白質脳症のうちの１つであり、３～９ヶ月で発症し、２１ヶ月までに１００％の死亡である。このマウスモデルは、約８ヶ月の生存期間を有し、５ヶ月での運動障害、２８日までのＭ

ＢＰ発現減少、７ヶ月での軸索変化、Ｐ１４からのアストロサイト数の増加及び疾患進行とともに増加し、前脳溶解物でＧＦＡＰδタンパク質レベルが増加したという様々な症状が報告されている。

【０１５２】

ＩＣＶ注射。

全ての動物手順は、Ｎａｔｉｏｎｗｉｄｅ Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ Ｈｏｓｐｉｔａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＩＡＣＵＣ）によって承認された。新生（出生後１～３日）マウス（Ｃ５７ＢＬ／６）を、脳室内（ＩＣＶ）注射の前に冷凍麻酔（約２分）した。ＩＣＶ注射を、ハミルトンシリンジ（Ｃａｌ７６３５－０１）及び３３ＧＡ ３０°ベベルニードル（Ｈａｍｉｌｔｏｎ、７８０３－０５）を用いて、ラムダ縫合から眼までの距離の２／５で左半球に行った。新生児に、ＧＦＡＰ、ＣＡＧ及び短縮型バリアントｇｆａＢＣ（１）Ｄ（ＧＦＡＰ）プロモーター下の、ＧＦＰをコードする７．５０Ｅ＋１０ｖｇのｓｓＡＡＶ９ベクターを注射した。

【０１５３】

ＡＡＶ９ ＩＣＶ注射後の動物組織におけるＧＦＰ生体内分布の評価。

ＩＣＶ注射の４又は８週間後、マウスをケタミン／キシラジン（１００／１０ｍｇ／ｋｇ ｉ．ｐ．）で終末麻酔し、氷冷の０．９％ヘパリン化生理食塩水で経心灌流した。組織を解剖し、１２時間、ＰＢＳ中の４％ＰＦＡにて後固定した。固定後、右脳半球を、ＰＢＳ中の３０％スクロースにて、４℃で３日間凍結保護した。全ての試料を包埋し、ＯＳＴ化合物（Ｔｉｓｓｕｅ Ｐｌｕｓ、Ｆｉｓｈｅｒ）中で凍結させた。矢状断面をクライオスタット（１９５０ ＬＥＩＣＡ）にて２５ｍｍの厚さで切断した。自由浮遊断片をＰＢＳ中で洗浄し、ＰＢＳ中のＤＡＰＩ溶液とともに、１分間、室温でインキュベートした。ＰＦＡ固定された組織から抗原を取り出すために、切片を、室温で１５分間、１×ＰＢＳ中の０．１％水素化ホウ素ナトリウムで処理した。特定の細胞マーカーとのＧＦＰ共局在化の免疫組織化学分析のために、全ての切片を、室温で１時間、０．３％のＴｒｉｔｏｎ（ＰＢＳＴ）を含む１ＸＰＢＳ中の１０％の正常なヤギ血清中でブロックし、透過させ、続いて４Ｃで、ニワトリ抗ＧＦＡＰ（ＡｂＣａｍ、１：３００）及びウサギ抗ＮｅｕＮ（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、１：５００）を含む新鮮なＰＢＳＴ中で一晩インキュベーションした。断片を１ＸＰＢＳ中で洗浄し、ＰＢＳＴ中で、ロバ抗ニワトリＣｙ５（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、１：５００）及びロバ抗ウサギＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５６８（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、１：５００）の二次抗体とともに、１０％の正常なロバ血清を含むＰＢＳＴ中、室温で１時間インキュベートした。断片を１ＸＰＢＳ中で洗浄し、ＰｒｏＬｏｎｇ Ｇｏｌｄアンチフェード試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）のスライドに取り付けた。画像は、Ｎｉｋｏｎ Ｔｉ２Ｅ蛍光顕微鏡を使用して取得し、ＮＩＳ－Ｅｌｅｍｅｎｔｓソフトウェア（Ｎｉｋｏｎ）及びＰｒｉｓｍ（ＧｒａｐｈＰａｄ）を使用して解析した。ＧＦＰ分布のパーセンテージを、各断片においてＧＦＰ及びＤＡＰＩによってカバーされる領域内で評価した。ＧＦＰシグナルの強度を、全てのＧＦＰ陽性領域内で評価した。

【０１５４】

タンパク質抽出及びウエスタンブロッティング分析。

マウスを処理した後、タンパク質抽出及びウエスタンブロッティング分析を行った。総タンパク質を、組織タンパク質抽出試薬（Ｔ－ＰＥＲ組織タンパク質抽出試薬；７８５１０、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び１０ｍＬの抽出試薬当たり１錠のプロテアーゼ阻害剤（Ｐｉｅｒｃｅプロテアーゼ阻害剤タブレット、Ａ３２９５３、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、選択された動物組織から抽出した。スチールビーズを試料及び抽出試薬に添加し、試料をＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ ＩＩを使用して均質化した。次いで、スチールビーズを除去し、試料を１５秒間２回、超音波処理した。

【０１５５】

抽出された総タンパク質を、ＤＣタンパク質アッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して定量した。２５μｇの試料を４～１２％のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、湿式転写システムを使用してニトロセルロース膜に移した。ポンソー染色を行い、その後、膜を、１％のＴｗｅｅｎを補充したＰＢＳ中でそれぞれ１０分間、３回洗浄した。膜を、Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中、室温で１時間ブロッキングした。次いで、ニトロセルロース膜を、以下の抗体：ＧＡＰＤＨに対するマウスモノクローナル抗体（Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中１：５０００、２７４１０２、Ｓｙｎａｐｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＧＦＰに対するニワトリポリクローナル抗体（Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中１：５０００、ａｂ１３９７０、ＡｂＣａｍ）とともに、４Ｃで一晩インキュベートした。次いで、膜を、ＰＢＳＴ緩衝液でそれぞれ１０分間、３回洗浄した。

【０１５６】

次いで、膜を、以下の抗体：ニワトリに対するヤギ抗体ＡＦ４８８（Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中１：１０００、ａｂ１５０１６９、ＡｂＣａｍ）、マウスに対するロバ抗体ＡＦ５６８（Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中１：１０００、Ａ１００３７、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とともに、室温で１時間インキュベートした。次いで、膜を、ＰＢＳＴ緩衝液でそれぞれ１０分間、３回洗浄した。

【０１５７】

その後、ブロットを、ブロットイメージャーを使用して画像化した。バンドの定量化は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ ＩｍａｇｅＬａｂを使用して行った。

トランスフェクション後のタンパク質抽出及びウエスタンブロッティング分析．

タンパク質抽出及びウエスタンブロッティング分析は、トランスフェクション後７２時間の細胞を収集し、ＰＢＳ中で洗浄し、遠心分離し、フラッシュ凍結した後に行った。総タンパク質を、最初に細胞ペレットを氷上で１５分間解凍し、次いでペレット当たり３０ｕＬのＲＩＰＡ緩衝液（Ｐｉｅｒｃｅ、ＲＩＰＡ溶解及び抽出緩衝液８９９０１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び１０ｍＬの抽出試薬当たり１錠のプロテアーゼ阻害剤（Ｐｉｅｒｃｅプロテアーゼ阻害剤タブレット、Ａ３２９５３、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用することによって、１００万～２００万個のＨＥＫ２９３Ｔ細胞から抽出した。試料をピペットを使用して穏やかに均質化し、４Ｃ、１５分間氷上で溶解させ、短時間超音波処理し、次いで１０分間１０，０００ｇで遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、総タンパク質を定量した。

【０１５８】

抽出された総タンパク質を、ＤＣタンパク質アッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して定量した。５０μｇの試料を４～１２％のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、湿式転写システムを使用してニトロセルロース膜に移した。ポンソー染色を行い、その後、膜を、１％のＴｗｅｅｎを補充したＰＢＳ中でそれぞれ１０分間、３回洗浄した。膜を、Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中、室温で１時間ブロッキングした。次いで、ニトロセルロース膜を、以下の抗体：ＧＡＰＤＨに対するマウスモノクローナル抗体（Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中１：５０００、２７４１０２、Ｓｙｎａｐｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＧＦＰに対するニワトリポリクローナル抗体（Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中１：５０００、ａｂ１３９７０、ＡｂＣａｍ）とともに、４Ｃで一晩インキュベートした。次いで、膜を、ＰＢＳＴ緩衝液でそれぞれ１０分間、３回洗浄した。

【０１５９】

次いで、膜を、以下の抗体：ニワトリに対するヤギ抗体ＡＦ４８８（Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中１：１０００、ａｂ１５０１６９、ＡｂＣａｍ）、マウスに対するロバ抗体ＡＦ５６８（Ｐｉｅｒｃｅタンパク質不含ブロッキング緩衝液中１：１０００、Ａ１００３７、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とともに、室温で１時間インキュベートした。次いで、膜を、ＰＢＳＴ緩衝液でそれぞれ１０分間、３回洗浄した。

【０１６０】

その後、ブロットを、ブロットイメージャーを使用して画像化した。バンドの定量化は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＩｍａｇｅＬａｂを使用して行った。

実施例２

インビトロでの細胞におけるＥＩＦ２Ｂ５タンパク質遺伝子置換

以下の実験を実施して、目的の様々なプロモーターを含むＡＡＶ９が、成功した非常に良いＥＩＦ２Ｂ５の発現のために使用され得ることを確認した。しかしながら、この実施例では、ＧＦＰを伴う目的のプロモーターを含むＡＡＶを、ＨＥＫ細胞及びインビトロで線維芽細胞に由来するアストロサイトにトランスフェクトした。発現分析を、ＨＥＫ細胞（図２）及び線維芽細胞に由来するアストロサイト（図３）において、３つのｅＧＦＰ構築物：ＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰ、ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ、及びＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰに対して遂行した。

【０１６１】

具体的には、ＨＥＫ２９３細胞をリポフェクタミンによってトランスフェクトし、トランスフェクション後７２時間の細胞をｅＧＦＰのｍＲＮＡ発現解析のために回収した。ＨＥＫ細胞は理想的な細胞モデルではなかったが（すなわち、アストロサイトが、これらの構築物に対する究極の標的細胞であるため）、ＨＥＫ２９３細胞は、プラスミドが目的の遺伝子を成功裏に発現させることができるかどうかを判定するための迅速なインビトロ分析を可能にするため、最初に使用して発現を観察した。

【０１６２】

トランスフェクション後７２時間で、ＧＦＰ陽性細胞を顕微鏡で検出可能であった（図２、左パネル）。加えて、細胞ペレットに対するｍＲＮＡ発現の定量的ＰＣＲは、非トランスフェクション対照細胞に対して、増加した発現、ＣＡＧで約３５００倍、ＧＦＡＰで約１２００倍、及びＧｆａＡＢＣ（１）Ｄで約９００倍を示した（図２、右パネル）。これらの結果は、インビトロでのＨＥＫ細胞において、様々なプロモーターによって駆動される導入遺伝子の成功した発現を示した。図３は、ＧＦＡＰで染色された、線維芽細胞に由来するアストロサイトを示す。

【０１６３】

実施例３

野生型マウスにおけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子置換

以下の研究を実施して、本明細書に記載のＡＡＶ９－ｅＩＦ２Ｂ５構築物が、導入遺伝子、この例ではＧＦＰを、マウスの脳内の目的の細胞に送達することができることを確認し、様々なプロモーターの細胞特異的形質導入及び生体内分布を比較した。健康なＣ５７／ＢＬ６野生型マウス（雄及び雌）に、出生後１日目（ＰＮＤ１）で、３つのレポーター構築物：ＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＧＦＰ、ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ、又はＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　　殺した。マウスの組織を単離し、ＧＦＰの存在について分析した。

【０１６４】

予想通り、ＡＡＶ９－ＣＢＡ－ＧＦＰでの注射は、グリア及びニューロンの両方の形質導入をもたらした（図４及び５）。脳の矢状断面を調製し、ＧＦＰ（緑色）の分布を示し、ＤＡＰＩ（青色）は核を示す。挿入図１～６は、矢状断面での関連するボクセルのより高い倍率を示す（図４）。挿入図は、ＧＦＰ陽性グリア細胞及びニューロン細胞のより高い倍率を示す（図５及び２８）。４週齢及び８週齢の両方での複数のマウスの調査は、中枢神経軸全体にわたる分布を示す（図２３）。全脳領域における陽性ＧＦＰの％を定量化し、ＧＦＡＰ及びｇｆａＡＢＣ（１）Ｄプロモーターと比較して減少した（図２６）。ウエスタンブロットによるタンパク質定量化を、図２７に示す。

【０１６５】

ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰを用いた新生野生型マウスの注射は、ＡＡＶ９－ＣＢＡ－ＧＦＰと比較して、白質におけるより大きな分布及び中枢神経軸全体にわたるより広範な分布をもたらした（図６）。特に顕著なのは、ボックス２の小脳の白質領域を含む尾側脳領域におけるＧＦＰ発現の増加であった。更に、発現は、ボックス４及び図

２８の形態によって示されるように、主にアストロサイトにおいてであった。４週齢及び８週齢の両方での複数のマウスの調査は、中枢神経軸全体にわたり中程度の発現（図２５）を示し、これを組織学的に（図２６）及びウエスタンブロット（図２７）によって定量化した。

【０１６６】

ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰを新生野生型マウスに注射し、注射の２８日後に　殺した結果を図７に示す。挿入図１～３は、矢状断面での関連するボクセルのより高い倍率を示す。挿入図４は、アストロサイトの形態を実証するための挿入図３のより高い倍率を示す。これらの結果は、アストロサイトプロモーターの使用が、白質における分布及びアストロサイトにおける発現を増加させることを示す。図２８は、コホート間での共標識の比較を提供する。

【０１６７】

図９は、ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した野生型マウスからの結果を示す。これまでのところ、ＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰを用いた新生野生型マウスの注射は、ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ及びＡＡＶ９－ＣＢＡ－ＧＦＰベクターの両方と比較して、より広範囲の分布及びより大きな発現をもたらした。導入遺伝子の発現は、アストロサイトに特異的なままである。

【０１６８】

図１０は、ＰＮＤ１でＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰを注射し、注射の２８日後に　殺した４匹の野生型マウスを用いた実験の結果を示す。脳の矢状断面は、ＧＦＰ（緑色）の分布を示す。同様の生体内分布パターンが、注射されたマウス間で見られた。４週齢及び８週齢の両方での複数のマウスの調査は、中枢神経軸全体にわたり堅牢な発現（図２４）を示し、これを組織学的に（図２６）及びウエスタンブロット（図２７）によって定量化した。

【０１６９】

ＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰの送達後の共標識（図１１）は、ＧＦＰ（緑色）発現が、ニューロンマーカー（ＮｅｕＮ、赤色）ではなく、アストロサイトマーカー（ＧＦＡＰ、紫色）と共局在化することを示す。アストロサイトにおけるＧＦＰ発現は、アストロサイト（ＧＦＡＰ、紫色）及びニューロン（ＮｅｕＮ、赤色）に特異的な抗体との共標識によって確認された。ＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ＧＦＰ（図示）及びＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＧＦＰ（図示せず）での処理後のＧＦＰ発現は、アストロサイトにおいて明らかに存在した。このように、導入遺伝子の発現は、標的細胞であるアストロサイトで主に起こることが確認された。レポータータンパク質を駆動するＡＡＶを用いたこれらのデータは、アストロサイト特異的プロモーターの使用が、ＡＡＶの指向性を白質におけるより大きな発現及び中枢神経軸全体にわたるより広範な分布に変化させることを裏付ける。図２８は、コホート間での共標識の比較を提供する。

【０１７０】

実施例４

Ｒ１９１Ｈ　ＶＷＭマウスにおけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子置換

以下の研究を実施して、ｅＩＦ２Ｂ５のマウスモデル、すなわちＲ１９１Ｈ　ＶＷＭマウスにおけるＡＡＶ９－ｅＩＦ２Ｂ５のＣＳＦ送達を評価し、ＶＷＭのこのマウスモデルにおけるＥＩＦ２Ｂ５導入遺伝子の効果を求めた。本明細書に記載されるように、ＡＡＶ９－ｅＩＦ２Ｂ５構築物は、アストロサイトを標的とし、また、乏突起膠細胞の病理（これは、アストロサイト機能不全に二次的な下流シグナル伝達効果に起因する）を改善するように設計された。更に、より広範なＣＮＳ形質導入も評価するために、よりユビキタスなプロモーターも評価した。

【０１７１】

発症前のｅＩＦ２Ｂ５マウス（すなわち、Ｒ１９１Ｈ　ＶＷＭマウス）を、上記に記載のように、いずれかのアストロサイト特異的プロモーターを含む、以下の３つのＡＡＶベクター構築物のうちのいずれか１つを脳室内（ＩＣＶ）注射によって処理した：１）ＡＡ

Ｖ９－ＧＦＡＰ－ｅＩＦ２Ｂ５、又は２）ＧＦＡＰの短縮型形態を含むＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）－ｅＩＦ２Ｂ５、又はよりユビキタスに発現するプロモーター：３）ＡＡＶ９－ＣＢＡ－ｅＩＦ２Ｂ５。ベクターを、用量漸増的に送達した。未処理のＶＷＭマウスの表現型特徴付けに基づいて、ＡＡＶ処理されたマウスをそれに応じて評価した。これらの評価には、体重、運動検査、ＭＲＩ、及び生存が含まれたが、これらに限定されない。追加の死後評価としては、ｅＩＦ２Ｂ５の観察及び定量化、並びにＥＲストレスマーカーの発現レベルの選択が挙げられる。組織学的に、髄鞘形成、ＥＲストレス、アストロサイト、及び乏突起膠細胞を評価した。ＡＡＶ９の生体内分布は、ｑＰＣＲによって実施される。

【０１７２】

図３１は、６ヶ月でのロータロッドデータによって実証されるように、このＶＷＭマウスモデルの処理における治療的有効性を示す（図３１、右）。６ヶ月齢のＲ１９１Ｈマウスを加速回転ロッド（ロータロッド）に置き、マウスが落下した毎分回転数（ＲＰＭ）を記録した。このアッセイは、ＶＷＭのこのモデル、並びにＶＷＭ患者において重度に影響を受けることが示されている運動機能を正確に測定することができる。落下時のより高いＲＰＭは、より良好な運動性を示す。このデータは、ＡＡＶ９．ＧＦＡＰ．ｅＩＦ２Ｂ５で処理されたＲ１９１Ｈモデルが、６ヶ月でわずかであるが有意な改善を示した一方で、ＡＡＶ９．ＣＡＧ．ｅＩＦ２Ｂ５で処理されたマウスが、前述のベクターと比較したとき、運動性においてより良い改善を有したことを示す。最後に、ＡＡＶ９．ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ｅＩＦ２Ｂ５で処理された６ヶ月齢のマウスは、最大の改善を有し、野生型マウスと有意差はなく、この治療用ベクターの処理の有望性を示した。

【０１７３】

実施例５

Ｉ９８Ｍ　ＶＷＭマウスにおけるＥＩＦ２Ｂ５遺伝子置換

以下の研究を実施して、ｅＩＦ２Ｂ５の追加のマウスモデル、すなわち、Ｉ９８Ｍ　ＶＷＭマウスにおけるＡＡＶ９－ｅＩＦ２Ｂ５のＣＳＦ送達を評価し、ＶＷＭのこのマウスモデルにおけるＥＩＦ２Ｂ５導入遺伝子の効果を求めた。本明細書に記載されるように、ＡＡＶ９－ｅＩＦ２Ｂ５構築物は、アストロサイトを標的とし、また、乏突起膠細胞の病理（これは、アストロサイト機能不全に二次的な下流シグナル伝達効果に起因する）を改善するように設計された。更に、より広範なＣＮＳ形質導入も評価するために、よりユビキタスなプロモーターも評価した。

【０１７４】

発症前のｅＩＦ２Ｂ５マウス（すなわち、Ｉ９８Ｍ　ＶＷＭマウス）を、上記に記載のように、いずれかのアストロサイト特異的プロモーターを含む、以下の３つのＡＡＶベクター構築物のうちのいずれか１つを脳室内（ＩＣＶ）注射によって処理した：１）ＡＡＶ９－ＧＦＡＰ－ｅＩＦ２Ｂ５、又は２）ＧＦＡＰの短縮型形態を含むＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）－ｅＩＦ２Ｂ５、又はよりユビキタスに発現するプロモーター：３）ＡＡＶ９－ＣＢＡ－ｅＩＦ２Ｂ５。ベクターを、用量漸増的に送達した。未処理のＶＷＭマウスの表現型特徴付けに基づいて、ＡＡＶ処理されたマウスをそれに応じて評価した。これらの評価には、体重、運動検査、ＭＲＩ、及び生存が含まれたが、これらに限定されない。追加の死後評価としては、ｅＩＦ２Ｂ５の観察及び定量化、並びにＥＲストレスマーカーの発現レベルの選択が挙げられる。組織学的に、髄鞘形成、ＥＲストレス、アストロサイト、及び乏突起膠細胞を評価した。ＡＡＶ９の生体内分布は、ｑＰＣＲによって実施される。

【０１７５】

図３１は、５０日でのロータロッドデータによって実証されるように、このＶＷＭマウスモデルの処理における治療的有効性を示す（左）。５０日齢のＩ９８Ｍマウスを加速回転ロッド（ロータロッド）に置き、マウスが留まり得る持続時間（秒単位）を記録した。このアッセイは、このマウスモデル、並びにＶＷＭ患者において重度に影響を受けることが示されている運動機能を正確に測定することができる。この場合、落下までの潜時が長

いことは、より良い運動機能を示す。このデータは、未処理のＩ９８Ｍマウスが、野生型又はヘテロ接合型マウスよりも、有意に短い落下まで潜時を有することを示す。しかしながら、５０日齢でＡＡＶ９．ＧＦＡＰ．ｅＩＦ２Ｂ５、ＡＡＶ９．ＣＡＧ．ｅＩＦ２Ｂ５、及びＡＡＶ９．ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ｅＩＦ２Ｂ５で処理されたＩ９８Ｍマウスは、野生型マウスと統計的に区別できず、これらの治療用ベクターの有望性を示す。

【０１７６】

実施例６

ＥＩＦ２Ｂ５遺伝子置換における新規プロモーターｇｆａ１４０５の使用

グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）は、ＣＮＳのアストロサイトにおいて豊富にかつほぼ排他的に発現される中間径フィラメントタンパク質である。したがって、ＧＦＡＰプロモーターは、遺伝子のアストロサイト特異的発現を指示する（Ｂｒｅｎｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１００４ Ｍａｒ；１４（３ Ｐｔ １）：１０３０－７、ｄｏｉ： １０．１５２３／ＪＮＥＵＲＯＳＣＩ．１４－０３－０１０３０．１９９４）。しかしながら、ＧＦＡＰプロモーターは、２．２ｋｂを構成する、かなり大きなサイズである。より具体的には、一本鎖ＡＡＶゲノムのパッケージサイズ能力（４．８ｋｂ）のために、２．２ｋｂのアストロサイトプロモーターであるＧＦＡＰは、適切な遺伝子発現に必要な調節エレメントと一緒では、ＥＩＦ２Ｂ５導入遺伝子（２．３ｋｂ）とうまく適合しない。したがって、ＧＦＡＰの短縮型バージョン、すなわち、６８１ｂｐのみを含むｇｆａＡＢＣ（１）Ｄを利用したＥＩＦ２Ｂ５発現の予備研究を実施した。ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄプロモーターはまた、アストロサイトを標的とするが、内因性ＧＦＡＰプロモーターと同じ強度ではない。

【０１７７】

前述のパッケージサイズ能力のために、新しいプロモーターｇｆａ１４０５プロモーターを、より小さなアストロサイト特異的プロモーターを得るために設計した。ｇｆａ１４０５プロモーターは、阻害領域（Ｃ２）を除外したまま、Ｃ構成要素（Ｃ３、Ｃ５、及びＣ６）の重要な転写因子結合領域を系統的に戻すことによる短縮型ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ１プロモーターの設計を記載した刊行物（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｌｉａ．２００８；５６：４８１－４９３）に基づいて、設計された。この新規プロモーターｇｆａ１４０５プロモーターは、１４０５塩基対（配列番号１５）であり、ＥＩＦ２Ｂ５（すなわち、配列番号１６又は１７）と組み合わせた場合、ＡＡＶのパッケージング閾値４．８ｋｂ未満のままである（それぞれ、図１５及び１６を参照されたい）。更に、新しいプロモーター（図１７）及びＥＩＦ２Ｂ５導入遺伝子を伴うｇｆａ１４０５プロモーター（図１８）の構成要素を示す図１７及び１８に示される概略図を参照されたい。

【０１７８】

【表６】

表６．ｇｆａ１４０５プロモーター、及びｅＩＦ２Ｂ５導入遺伝子配列を伴うｇｆａ１４０５プロモーターの配列。

配列名	配列(5’-3’)	配列番号
gfa1405 プロモーター(1405bp)	図 15 を参照されたい。	15
gfa1405.EIF2B5(様々な他のエレメントを含むが、5’及び 3’ITR を含まない)	表 2 を参照されたい。	16
完全な ITR-gfa1405-eIF2B5-ポリ A-ITR 配列 (4640bp)	表 3 及び図 16 を参照されたい。	17
AAV9.gfa1405.eiF2B5 (7086bp)	表 4 並びに図 19 及び 21 を参照されたい。	18

【０１７９】

図１９は、ＡＡＶベクターにｅＩＦ２Ｂ５導入遺伝子配列とともにｇｆａ１４０５プロモーターを含む７０８６ｂｐ（配列番号１８）を含むプラスミドｐＡＡＶ．ｇｆａ１４０５．ｅＩＦ２Ｂ５の概略図を提供する。図２１は、配列番号１８の７０８６ｂｐ配列の詳細な記載を提供する。このように、ＥＩＦ２Ｂ５をコードする第４のＡＡＶゲノムベクター構築物を生成した。

【０１８０】

新規プロモーターの有効性を試験するために、ｇｆａＡＢＣＤ１４０５．ｅＧＦＰプラスミドを、ユビキタスなＣＡＧ．ｅＧＦＰ構築物、及び前に公開された２つのアストロサイト構築物であるＧＦＡＰ．ｅＧＦＰ及びｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ｅＧＦＰと並行してヒト胎児腎細胞にトランスフェクトした。タンパク質抽出及びウエスタンブロッティング方法の詳細は、実施例１に記載される。

【０１８１】

ＧＦＰの発現は、トランスフェクション後７２時間で観察され（図２０Ａ）、新規ｇｆａＡＢＣＤ１４０５プロモーターが、ＨＥＫ２９３細胞におけるＧＦＰ発現を駆動することは明らかであった。トランスフェクションの７２時間後、細胞を回収し、タンパク質をウエスタンブロット分析のために単離した。図２０Ｂに、ハウスキーピングタンパク質ＧＡＰＤＨの発現に対して比較して、全ての構築物のＧＦＰ発現のウエスタンブロットを３連で実施した後の、ＣＡＧ発現に対するパーセントでの定量化の結果を示す。ウエスタンブロットの定量化（図２０Ｂの棒グラフに示される）は、ｇｆａＡＢＣＤ１４０５（ｇｆａ１４０５）のＧＦＰタンパク質の発現が、ＧＦＡＰ及びｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ構築物のそれよりも大きかったが、ユビキタスプロモーターＣＡＧ構築物のそれほど大きくはなかったことを示す。これは、ＧＦＡＰ、ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ及びｇｆａＡＢＣＤ１４０５が、アストロサイトにより特異的であると考えられ、このことは、腎臓細胞におけるより低い発現を説明し得る。それにもかかわらず、結果は、新規のプロモーターｇｆａ１４０５が、他の前に公開されたアストロサイト特異的プロモーターよりも大きな量のタンパク質発現を駆動したことを示す。

【０１８２】

その結果、新しいプロモーターｇｆａ１４０５は、他の細胞型を標的としないが、アストロサイトにおける遺伝子の発現を駆動するように設計されているため、アストロサイト及びニューロン疾患の治療に有用であるように設計された。アストロサイトもニューロンとクロストークするため、ニューロン特異的疾患においてこのプロモーターを用いてアストロサイトを標的とすることも、ニューロン疾患に治療効果をもたらす可能性がある。したがって、このプロモーターを使用してアストロサイト及びニューロンを標的とする治療から利益を得ることができる疾患又は状態としては、白質消失病、脳卒中、片頭痛、てんかん、多発性硬化症（ＭＳ）、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、老化におけるアストログリオーシス、ハンチントン病（ＨＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アレキサンダー病、肝性脳症（ＨＥ）、エカルディ・グティエール症候群、ＣＬＣ－２関連疾患、眼歯指異形成症、巨大軸索ニューロパチー、及び大頭型白質脳症が挙げられるが、これらに限定されない（Ｒｉｃｃｉ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｐｈｙｓ ３５，３１７－３３６、ｄｏｉ：１０．１００７／ｓ１０８６７－００９－９１５７－９（２００９）、Ｐｈａｔｎａｎｉ，Ｈ．＆Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．Ａｓｔｒｏｃｙｔｅｓ ｉｎ ｎｅｕｒｏｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ ｄｉｓｅａｓｅ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｅｒｓｐｅｃｔ Ｂｉｏｌ ７、ｄｏｉ：１０．１１０１／ｃｓｈｐｅｒｓｐｅｃｔ．ａ０２０６２８（２０１５）、Ｌａｎｃｉｏｔｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ Ｍｏｌ Ｓｃｉ ２３、ｄｏｉ：１０．３３９０／ｉｊｍｓ２３０１０２７４（２０２１））。

【０１８３】

結果として、新規プロモーター、すなわち、ｇｆａ１４０５（本明細書ではｇｆａＡＢＣＤ１４０５とも称される）は、健康な対象のアストロサイト又はニューロンにおいて通常発現される遺伝子に変異を含む対象を治療する方法において有用であり、この方法は、

変異した遺伝子を含む対象において導入遺伝子が発現されるように、有効量のｇｆａ１４０５プロモーターに結合した導入遺伝子を対象に投与することを含む。

【０１８４】

実施例７

ｇｆａＡＢＣＤ１４０５プロモーターを用いたアストロサイト標的化遺伝子治療

野生型（ＷＴ）マウスを、ＰＮＤ０～１で、ＡＡＶ９．ｇｆａＡＢＣＤ１４０５－ＧＦＰを用いた脳室内（ＩＣＶ）送達により１．２Ｅ１１ｖｇの用量で処理した。中枢神経軸全体にわたる堅牢なＧＦＰ発現は、処理後４週間に見られた。発現は、組織学的に測定した場合、ＧＦＡＰ発現に匹敵するか、又はそれよりも高い。ｇｆａＡＢＣＤ１４０５プロモーターによって駆動されるＧＦＰを発現する細胞の形態は、ニューロンなどの他のＣＮＳ細胞型における遺伝子発現を制限しつつ、ＣＮＳ内のアストロサイトの強力な標的化を示唆する。図２９を参照されたい。これらの実験は、本明細書に記載のアストロサイト特異的レポーターｇｆａＡＢＣＤ１４０５が、ｅｉＦ２Ｂ５を含むがこれらに限定されない遺伝子の発現におけるその有用性をもたらすアストロサイトにおいて、導入遺伝子の適切な発現を達成したことを示した。

【０１８５】

実施例８

ＶＷＭ疾患のモデルにおいて、アストロサイト標的化遺伝子治療は、疾患の進行を遅延させ、体重をレスキューし、落下までの潜時を増加させる

レポータータンパク質ＧＦＰを発現するベクターを野生型マウスに脳室内（ＩＣＶ）注射すると、本明細書に記載のアストロサイト特異的レポーター構築物（ＡＡＶ９．ＧＦＡＰ．ｅＧＦＰ及びＡＡＶ９．ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ｅＧＦＰ）は、アストロサイトにおいて導入遺伝子の適切な発現を達成したことが明らかになり、ＡＡＶ９．ＧＦＡＰ．ｅＧＦＰベクターは、その短縮された、又はユビキタスな対応物（ＡＡＶ９．ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ．ｅＧＦＰ及びＡＡＶ９．ＣＡＧ．ｅＧＦＰ）と比較して、中枢神経軸全体にわたり有意により大きな生体内分布を有する。

【０１８６】

潜在的な治療的有効性を評価するために、ＥＩＦ２Ｂ５導入遺伝子の発現を駆動する３つの構築物を最初に生成した。しかしながら、ＡＡＶ（４．８ｋｂ）のサイズ能力のために、ＥＩＦ２Ｂ５導入遺伝子（２．２ｋｂ）及び必要な調節エレメントと組み合わせたＧＦＡＰプロモーター（２．２ｋｂ）は、大きすぎる構築物、その後の不良なパッケージング、及び低いウイルス力価をもたらした。ＧＦＰレポーター研究における全長及び短縮型アストロサイトプロモーター間の発現の有意差のために、研究は、内因性ＧＦＡＰプロモーターからその短縮型ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ対応物に重要な配列を復元するテイラードプロモーターを生成することによって、生体内分布を増加させるように設計された。したがって、中程度のｇｆａＡＢＣＤ１４０５プロモーターを設計及び作製し、研究により、全長ＧＦＡＰに匹敵する発現を実証している。

【０１８７】

４つのＡＡＶ構築物を、２つのマウスＶＷＭモデル、Ｅｉｆ２ｂ５^{Ａｒｇ１９１Ｈｉｓ}及びＥｉｆ２ｂ５^{Ｉｌｅ９８Ｍｅｔ}において評価した。これらは、有意な歩行欠損、ミエリン喪失、及び寿命の短縮を示す。疾患の進行をモニタリングした。ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＥＩＦ２Ｂ５で処理したＥｉｆ２ｂ５^{Ａｒｇ１９１Ｈｉｓ}及びＥｉｆ２ｂ５^{Ｉｌｅ９８Ｍｅｔ}マウスは、５０日齢を超えた場合、ロータロッドでは正常マウスと区別できず、未処理のＲ１９１Ｈ罹患マウスと比較して有意に改善した（Ｐ≦０．００１）（図３１）。ＣＡＧ及びＧＦＡＰプロモーターを含むベクターを用いた処理は、マウスにおいて中程度の効果を示す。ＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣＤ１４０５－ＥＩＦ２Ｂ５で処理したＥｉｆ２ｂ５^{Ａｒｇ１９１Ｈｉｓ}及びＥｉｆ２ｂ５^{Ｉｌｅ９８Ｍｅｔ}は、まだ５０日齢に達していない。これまでのデータは、本明細書に記載のアストロサイト標的化遺伝子治療、特にＡＡＶ９－ｇｆａＡＢＣ（１）Ｄ－ＥＩＦ２Ｂ５が、両方の疾患モデルにおいて、ユビキタスな（ＡＡＶ９－ＣＡＧ－ＥＩＦ２Ｂ５）遺伝子治療よりも有意に大きい程度に、ロータ

ロッドで落下するまでの潜時を有意に増加させることができることを示す（図３１を参照されたい）。

【０１８８】

これらの療法によって引き起こされるロータロッドでの落下するまでの改善された潜時は、マウスモデル並びにＶＷＭ患者の両方で重度に制限されることが示されている、増加した協調及び運動機能を示す。落下時ＲＰＭは、回転しているロッドがどのくらい速く加速しているかを具体的に示す。したがって、より高いＲＰＭの測定値は、増加した協調及び運動機能も示している。これらの２つの測定の違いは、ＲＰＭはロータロッドがどのくらい速く回転しているかを測定している一方で、落下までの潜時は持続時間（すなわち、ロータロッド上での時間）を測定していることである。これらの２つの変数は関連している。したがって、より長い持続時間（より長い時間）は、より大きいＲＰＭを意味し、逆も同様である。処理後の両方の測定における有意な改善は、ＶＷＭのための潜在的な療法として、開示された治療方法の有望性を示す。

【０１８９】

本発明の範囲内の修正は、当業者には明らかであり得るため、前述の説明は、理解の明確さのためだけに与えられ、そこから不必要な制限は理解されないべきである。

本明細書及び後に続く特許請求の範囲全体を通して、文脈が別段必要としない限り、単語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」並びに「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」及び「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの変形例は、記載された整数若しくはステップ、又は整数若しくはステップの群を含むことを意味するが、任意の他の整数若しくはステップ、又は整数若しくはステップの群を除外することを意味しないと理解されたい。

【０１９０】

本明細書全体にわたって、組成物が構成要素又は材料を含むと記載される場合、別段の記載がない限り、組成物は、列挙された構成要素又は材料の任意の組み合わせから本質的になるか、又はそれからなることもできることが企図される。同様に、方法が特定のステップを含むと記載される場合、別段の記載がない限り、方法はまた、列挙されたステップの任意の組み合わせから本質的になるか、又はそれからなることもできることが企図される。本明細書に例示的に開示される本発明は、本明細書に具体的に開示されていない任意の要素又はステップの不在下で好適に実施され得る。

【０１９１】

本明細書に開示される方法の実施、及びその個々のステップは、手動で及び／又は電子機器によって提供される自動化の助けとともに実行することができる。特定の実施形態を参照してプロセスが記載されているが、当業者であれば、方法に関連する行為を実行する他の方法を使用し得ることを容易に理解するであろう。例えば、別段の記載がない限り、様々なステップの順序を、方法の範囲又は趣旨から逸脱することなく変更することができる。加えて、個々のステップのうちのいくつかは、組み合わせるか、省略するか、又は更に追加のステップに細分化することができる。

【０１９２】

本明細書で引用される全ての特許、刊行物、及び参考文献は、参照により完全に組み込まれる。本開示と組み込まれた特許、刊行物、及び参考文献との間に矛盾がある場合、本開示に従う。付番を伴う本明細書に言及される参考文献は、本明細書に以下に示されるように、完全な引用で提供される。

【０１９３】

参考文献

１．Ｆｏｇｌｉ Ａ，Ｓｃｈｉｆｆｍａｎｎ Ｒ，Ｂｅｒｔｉｎｉ Ｅ，Ｕｇｈｅｔｔｏ Ｓ，Ｃｏｍｂｅｓ Ｐ，Ｅｙｍａｒｄ－Ｐｉｅｒｒｅ Ｅ，ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｇｅｎｏｔｙｐｅ ｏｎ ｔｈｅ ｎａｔｕｒａｌ ｈｉｓｔｏｒｙ ｏｆ ｅＩＦ２Ｂ－ｒｅｌａｔｅｄ ｌｅｕｋｏｄｙｓｔｒｏｐｈｉｅｓ．Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ．２００４；６２（９）：１５０９－１７．

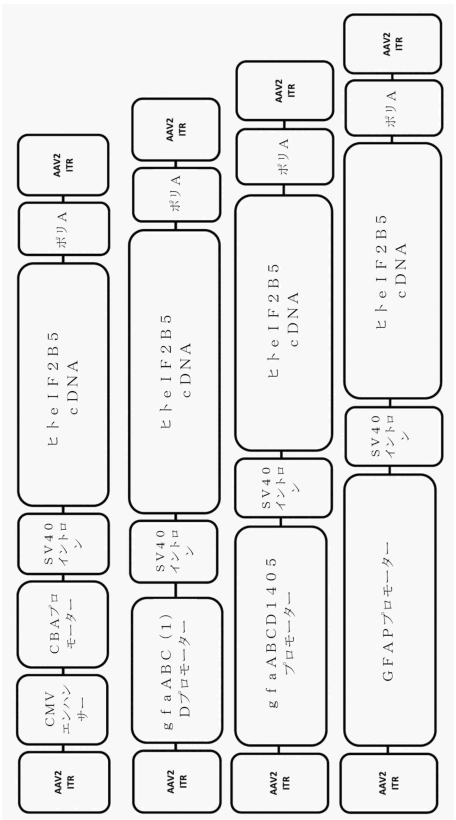
２．ｖａｎ ｄｅｒ Ｋｎａａｐ ＭＳ，Ｐｒｏｎｋ ＪＣ，ａｎｄ Ｓｃｈｅｐｅｒ

GC. Vanishing white matter disease. Lancet Neurol. 2006;5(5):413-23.
3. Bonkowsky JL, Nelson C, Kingston JL, Filloux FM, Mundorff MB, and Srivastava R. The burden of inherited leukodystrophies in children. Neurology. 2010;75(8):718-25.
4. Zhou L, Zhang HH, Chen N, Zhang ZB, Liu M, Dai LF, et al. [Clinical features of 54 cases of leukoencephalopathy with vanishing white matter disease in children]. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2019;57(11):837-43.
5. Dietrich J, Lacagnina M, Gass D, Richfield E, Mayer-Proschel M, Noble M, et al. EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. Nat Med. 2005;11(3):277-83.
6. Geva M, Cabilly Y, Assaf Y, Mindroul N, Marom L, Raini G, et al. A mouse model for eukaryotic translation initiation factor 2B-leucodystrophy reveals abnormal development of brain white matter. Brain. 2010;133(Pt 8):2448-61.
7. Dooves S, Bugiani M, Postma NL, Polder E, Land N, Horan ST, et al. Astrocytes are central in the pathomechanisms of vanishing white matter. J Clin Invest. 2016;126(4):1512-24.
8. Terumitsu-Tsujita M, Kitaura H, Miura I, Kiyama Y, Goto F, Muraki Y, et al. Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene:a vanishing white matter disease model. J Neurochem. 2019.
9. Cearley CN, and Wolfe JH. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. Mol Ther. 2006;13(3):528-37.
10. Swain GP, Prociuk M, Bagel JH, O'Donnell P, Berger K, Drobatz K, et al. Adeno-associated virus serotypes 9 and rh10 mediate strong neuronal transduction of the dog brain. Gene Ther. 2014;21(1):28-36.
11. Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, Kells AP, Foust KD, Bringas JR, et al. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. Human gene therapy. 2012;23(4):382-9.
12. Hordeaux J, Hinderer C, Buza EL, Louboutin JP, Jahan T, Bell P, et al. Safe and Su

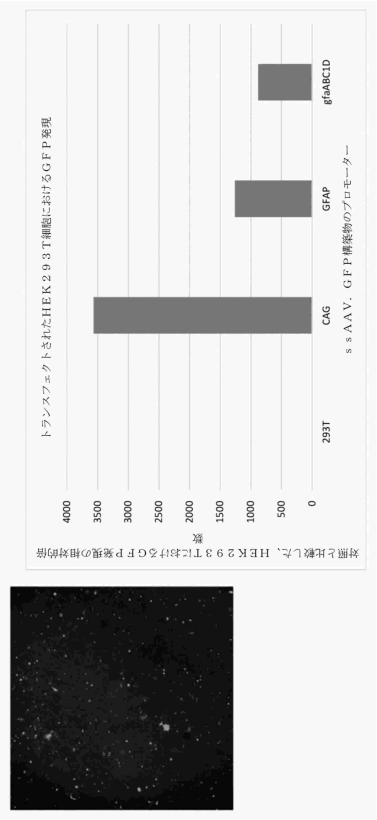
stained Expression of Human Iduronidase After Intrathecal Administration of Adeno-Associated Virus Serotype 9 in Infant Rhesus Monkeys. Hum Gene Ther. 2019;30(8):957-66.
13. von Jonquieres G, Mersmann N, Klugmann CB, Harasta AE, Lutz B, Teahan O, et al. Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain. PLoS One. 2013;8(6):e65646.
14. Lee, Y., Messing, A., Su, M. & Brenner, M. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. Glia 56, 481-493, doi:10.1002/glia.20622 (2008).
15. Ricci, G., Volpi, L., Pasquali, L., Petrozzi, L. & Siciliano, G. Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. J Biol Phys 35, 317-336, doi:10.1007/s10867-009-9157-9 (2009).
16. Phatnani, H. & Maniatis, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 7, doi:10.1101/cshperspect.a020628 (2015).
17. Lanciotti, A., Brignone, M. S., Macioce, P., Visentin, S. & Ambrosini, E. Human iPSC-Derived Astrocytes: A Powerful Tool to Study Primary Astrocyte Dysfunction in the Pathogenesis of Rare Leukodystrophies. Int J Mol Sci 23, doi:10.3390/ijms23010274 (2021).

【図面】

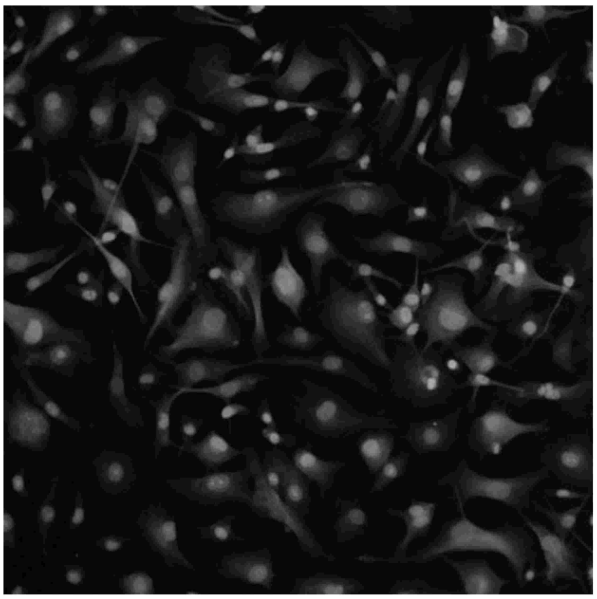
【図１】


AAV2 ITR
CMV エンハンサー
CBAプロモーター
SV40 イントロン
ヒトeIF2B5 cDNA
ポリA
AAV2 ITR
AAV2 ITR
gfaABC（1）Dプロモーター
SV40 イントロン
ヒトeIF2B5 cDNA
ポリA
AAV2 ITR
AAV2 ITR
gfaABCD1405プロモーター
SV40 イントロン
ヒトeIF2B5 cDNA
ポリA
AAV2 ITR
AAV2 ITR
GFAPプロモーター
SV40 イントロン
ヒトeIF2B5 cDNA
ポリA
AAV2 ITR

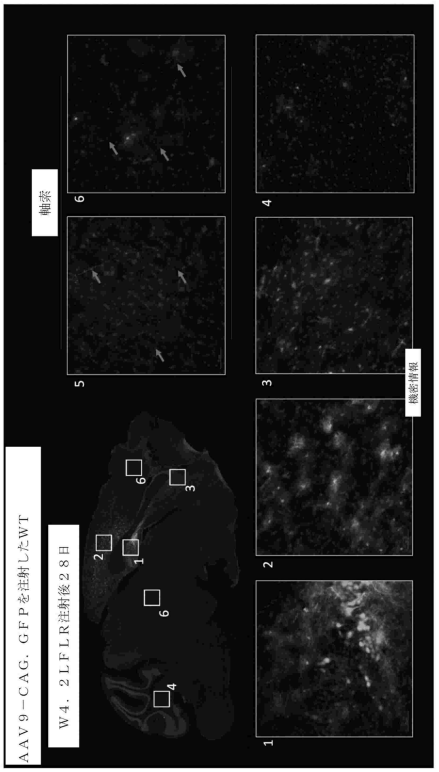
【図２】


対照と比較した，HEK293T上皮由来GFP発現の相対的倍率
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
293T
CAG
GFAP
gfaABC1D
ssAAV．GFP構築物のプロモーター
トランスフェクトされたHEK293T細胞におけるGFP発現

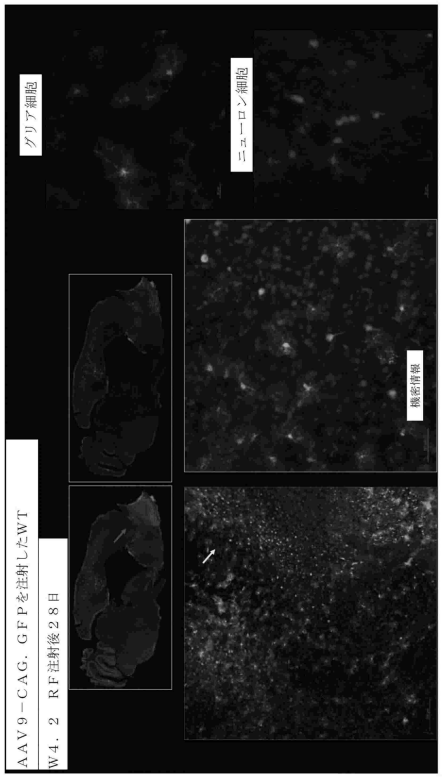
【図３】



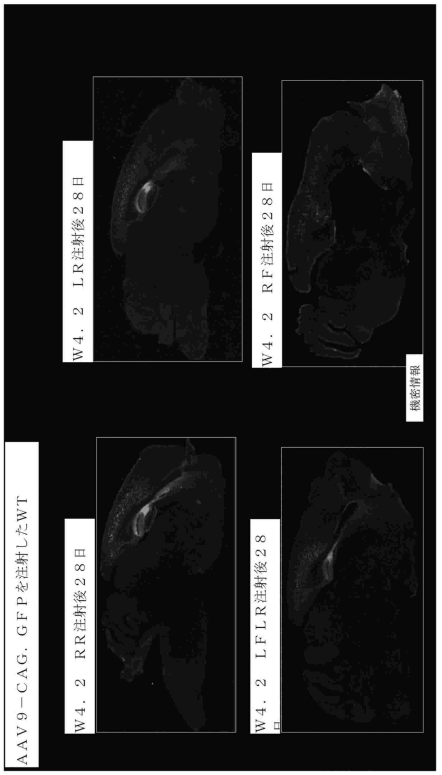
【図４】


AAV9－CAG．GFPを注射したWT
W4．2LFLR注射後28日
軸索
機密情報

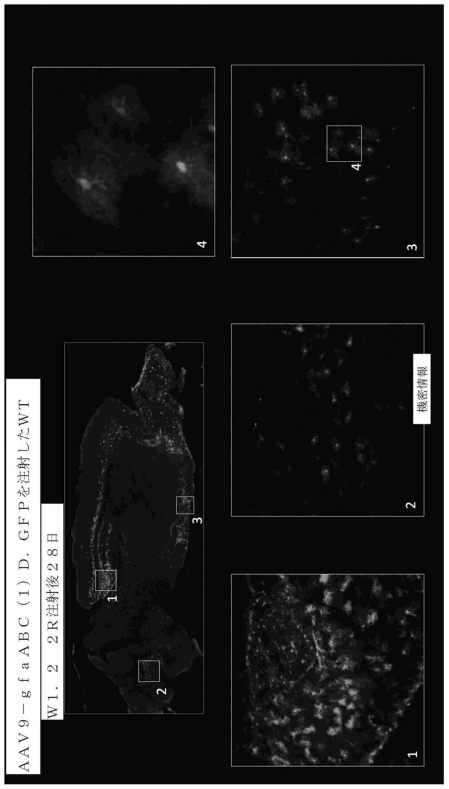
【図５】


AAV9－CAG．GFPを注射したWT
W4．2　RF注射後28日
グリア細胞
ニューロン細胞
機密情報

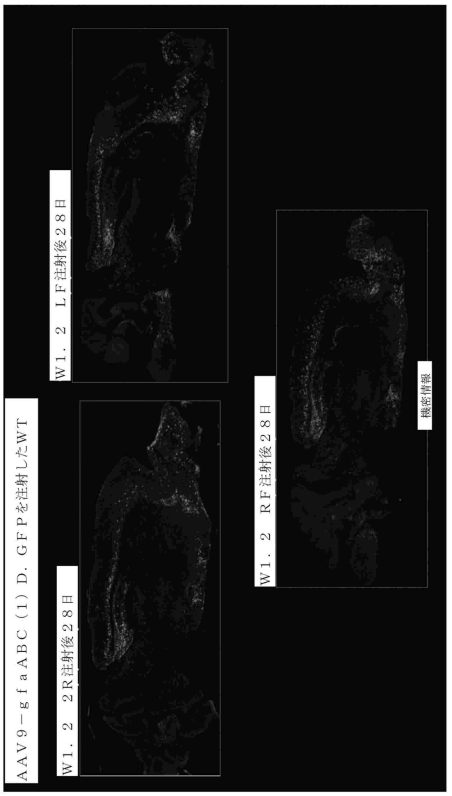
【図６】


AAV9－CAG．GFPを注射したWT
W4．2　RR注射後28日
W4．2　LR注射後28日
W4．2　LFLR注射後28日
W4．2　RF注射後28日
機密情報

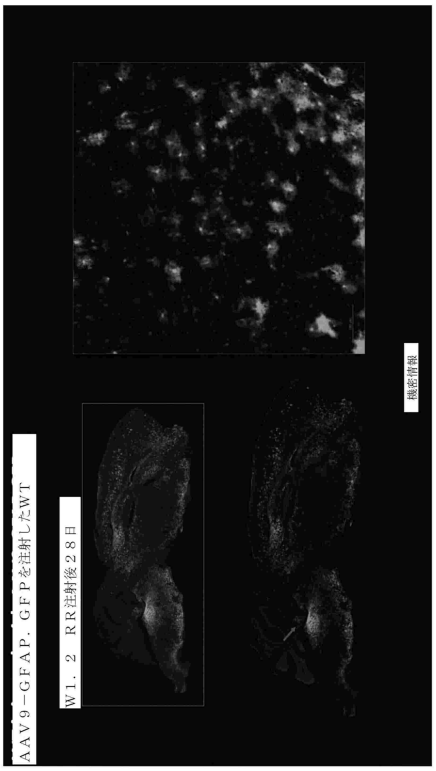
【図７】


AAV9－gfaABC（1）D．GFPを注射したWT
W1．2　2R注射後28日
機密情報

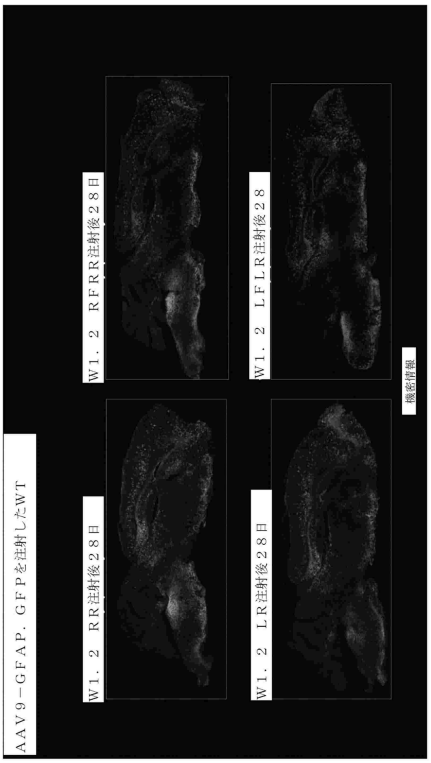
【図８】


AAV9－gfaABC（1）D．GFPを注射したWT
W1．2　2R注射後28日
W1．2　LF注射後28日
W1．2　RF注射後28日
機密情報

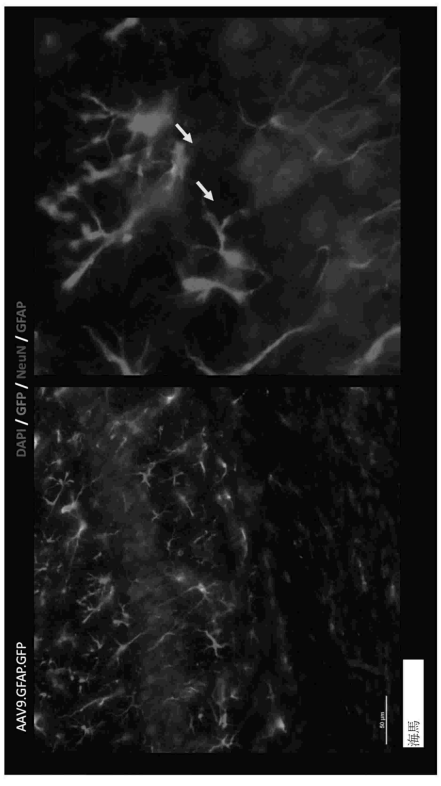
【図９】



【図１０】



【図１１】



【図１２－１】

AAV.CAG.eIF2B5 (配列番号　12) – 6275 nt

5' ITR	1-130
マルチクローニング部位（MCS）	**131-196**
CAGプロモーター（以下に列挙される構成要素）	197-777
CMVエンハンサー	197-502
CBAプロモーター	503-777
クローニング部位	778-788
SV40イントロン	**789-885**
クローニング部位及びコザック	886-990
eIF2B5 ORF	991-3156
クローニング部位	3157-3170
hGHポリA	3171-3680
クローニング部位	***3681-3688***
3' ITR	3689-3829
F1起源	3904-4359
カナマイシン耐性遺伝子	相補体4695-5504
pMB1起源	5600-6273

```
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt      60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact     120
aggggttcct gcggccgcat cgattgaatt cgagctcggt acctcgcgaa tacatctaga     180
tatcggatcc actagtcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca     240
acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagggа     300
ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc     360
aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct     420
ggcatttatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat     480
tagtcatcgc tattaccatg gtcgaggtg agccccacgt tctgcttcac tctccccatc     540
tccccccccc ccccaccccc aattttgtat ttatttattt tttaattatt ttgtgcagcg     600
atgggggcgg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg     660
cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc     720
ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcgtc     780
cggaactcgt aagtttagtc tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg     840
caaatcaaag aactgctcct cagtggatgt tgcctttact tctagggcctg tacggaagtg     900
ttacttctgc tctaaaagct gcggaattgt acccgcggcc aattctgcag tcgacggtac     960
cgcgggcccg ggatccaccg gttcgccacc atggcggccc ctgtagtggc gccgcctggt    1020
gtggtggtta gtcgggctaa caagcgcagc ggcgcggggc cgggaggcag cggtggcggg    1080
ggagccagag gggcggagga ggaaccgccg ccgcccctac aagcagttct ggtggccgat    1140
agcttcgatc gccgcttctt ccccatctcc aaggaccagc ctcgggtcct cttgcccctg    1200
gccaatgtgg cattaattga ctacactctg gaattcctga ctgccacagg tgtacaggaa    1260
acatttgtct tttgttgctg gaaagctgct caaatcaaag aacatttact gaagtcaaag    1320
tggtgccgcc ctacatctct caatgtggtt cgaataatta catcagagct ctatcgatca    1380
ctgggagatg tcctccgtga tgttgatgcc aaggctttgg tgcgctctga ctttcttctg    1440
gtgtatgggg atgtcatctc aaacatcaat atcaccagag cccttgagga acacaggttg    1500
agacggaagc tagaaaaaaa tgtttctgtg atgacgatga tcttcaagga gtcatccccc    1560
agccacccaa ctcgttgcca cgaagacaat gtggtagtgg ctgtggatag taccacaaac    1620
agggttctcc attttcagaa gacccagggt ctccggcgtt ttgcatttcc tctgagcctg    1680
tttcagggca gtagtgatgg agtggaggtt cgatatgatt tactggattg tcatatcagc    1740
atctgttctc ctcaggtggc acaactcttt acagacaact ttgactacca aactcgagat    1800
gactttgtgc gaggtctctt agtgaatgag gagatcctag ggaaccagat ccacatgcac    1860
gtaacagcta aggaatatgg tgcccgtgtc tccaacctac acatgtactc agctgtctgt    1920
gctgacgtca tccgccgatg ggtctaccct ctcaccccag aggcgaactt cactgacagc    1980
accacccaga gctgcactca ttcccggcac aacatctacc gagggcctga ggtcagcctg    2040
```

【図１２－２】

```
ggccatggca gcatcctaga ggaaaatgtg ctcctgggct ctggcactgt cattggcagc     2100
aattgcttta tcaccaacag tgtcattggc cccggctgcc acattggtga taacgtggtg     2160
ctggaccaga cctacctgtg gcagggtgtt cgagtggcgg ctggagcaca gatccatcag     2220
tctctgcttt gtgacaatgc tgaggtcaag gaacgagtga cactgaaacc acgctctgtc     2280
ctcacttccc aggtggtcgt gggcccaaat atcacggctgg ctgagggctc ggtgatctct     2340
ttgcaccctc cagatgcaga ggaagatgaa gatgatggcg agttcagtga tgattctggg     2400
gctgaccaag aaaaggacaa agtgaagatg aaaggttaca atccagcaga agtaggagct     2460
gctggcaagg gctacctctg gaaagctgca ggcatgaaca tggaggaaga ggaggaactg     2520
cagcagaatc tgtggggact caagatcaac atggaagaag agagtgaaag tgaaagtgag     2580
caaagtatgg attctgagga gccggacagc cggggaggct cccctcagat ggatgacatc     2640
aaagtgttcc agaatgaagt tttaggaaca ctacagcggg gcaaagagga gaacatttct     2700
tgtgacaatc tcgtcctgga aatcaactct ctcaagtatg cctataacat aagtctaaag     2760
gaggtgatgc aggtactgag ccacgtggtc ctggagttcc ccctgcaaca gatggattcc     2820
ccgcttgact caagccgcta ctgtgccctg ctgcttcctc tgctaaaggc ctggagccct     2880
gtttttagga actacatataa gcgcgcagcc gaccatttgg aagcgttagc agccattgag     2940
gacttcttcc tagagcatga agctcttggt atttccatgg ccaaggtact gatggctttc     3000
taccagctgg agatcctggc tgaggaaaca attctgagct ggttcagcca aagagataca     3060
actgacaagg gccagcagtt gcgcaagaat caacagctgc agaggttcat ccagtggcta     3120
aaagaggcag aagaggagtc atctgaagat gactgacgcg cgcgagatct acggggtggca     3180
tcccgtgagc cccccccaag tgcctctgct ggccctgaga gttgccactc cagtgccgac     3240
cagccttgtc ctaataaaat taagttgcat cattttgtct gactaggtgt ccttctataa     3300
tattatgggg tggaggggtg tggtatggag caaggggcaa gttgggaaga caacctgtag     3360
ggcctgcggg gtctattgag aaccaagctg gagtgcagtg gcacaatctt ggctcactgc     3420
aatcttcgcc tcctgggttc aagcgattct cctgcctcag cctcccgagt tgttgggatt     3480
ccaggcatgc atgaccaggc tcagctaatt tttgtttttt tggtagagac gggggtttcac     3540
catattggcc aggctggtct ccaactccta atctcaggtg atctacccac cttggcctcc     3600
caaattgctg ggattacagg cgtgaaccac tgctcccttc cctgtccttc tgattttgta     3660
ggtaaccacg tacgcaccga gcggccgcag gaacccctag tgatggagtt ggccactccc     3720
tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc     3780
tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct gcctgcaggg gcgcctgatg     3840
cggtatttcc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatacgtca aagcaaccat     3900
agtacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga     3960
ccgctacact tgccagcgcc ttagcgcccg ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg     4020
ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctccctttа gggttccgat     4080
ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgattt gggtgatggt tcacgtagtg     4140
ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata     4200
gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaactctat ctcgggctat tcttttgatt     4260
tataagggat tttgccgatt tcggtctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat     4320
ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttt atggtgcact ctcagtacaa     4380
tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc     4440
cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga     4500
gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg     4560
tgatacgcct attttatag gttaatgtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga     4620
tccttttaaa ttaaaaatg agttttaaat caagcccaat ctgaataatg ttacaaccaa     4680
ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata     4740
tcaggattat caataccata tttttgaaaa agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca     4800
ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc tggtatcggt ctgccattcc gactcgtcca     4860
acatcaatac aacctattaa tttcccctcg tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca     4920
ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat ggcaaaagtt tatgcatttc tttccagact     4980
tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccgtta     5040
ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta     5100
caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg aacactgcca gcgcatcaac aatattttca     5160
cctgaatcag gatattcttc taatacctgg aatgctgttt ttccggggat cgcagtggtg     5220
agtaaccatg catcatcagg agtacggata aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat     5280
tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat cattggcaac gctacctttg     5340
ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg ggcttcccat acaagcgata gattgtcgca     5400
cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc atccatgttg     5460
gaatttaatc gcggcctcga cgtttcccgt tgaatatggc tcataacacc ccttgtatta     5520
ctgtttatgt aagcagacag ttttattgtt catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc     5580
gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttt      5640
tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt     5700
```

【図１２－３】

```
gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat     5760
accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc     5820
accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa     5880
gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg     5940
ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag     6000
atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag     6060
gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa     6120
cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgatttt      6180
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg     6240
gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgt                               6275
```

【図１３－１】

AAV.gfaABC1D.eIF2B5 (配列番号 13) – 6340 nt

5' ITR	1-130
マルチクローニング部位（MCS）	131-196
g f a A B C 1 D プロモーター	**197-843**
クローニング部位	844-853
S V 4 0 イントロン	854-950
クローニング部位及びコザック	951-1055
eIF2B5 ORF	*1056-3221*
クローニング部位	3222-3235
h G H ポリA	***3236-3745***
クローニング部位	3746-3753
3' ITR	3754-3894
F 1 起源	3969-4424
カナマイシン耐性遺伝子	相補体 4 7 6 0 – 5 5 6 9
p M B 1 起源	5665-6338

```
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt       60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact      120
aggggttcct gcggccgcat cgattgaatt cgagctcggt acctcgcgaa tacatctaga      180
tatcggatcc actagtggta ccaacatatc ctggtgtgga gtaggggacg ctgctctgac      240
agaggctcgg gggcctgagc tggctctgtg agctggggag gaggcagaca gccaggcctt      300
gtctgcaagc agacctggca gcattgggct ggccgccccc cagggcctcc tcttcatgcc      360
cagtgaatga ctcaccttgg cacagacaca atgttcgggg tgggcacagt gcctgcttcc      420
cgccgcaccc cagccccact caaatgcctt ccgagaagcc cattgagcag gggcttgca       480
ttgcacccca gcctgacagc ctggcatctt gggataaaag cagcacagcc ccctaggggc      540
tgccctgct gtgtggcgcc accggcggtg gagaacaagg ctctattcag cctgtgccca       600
ggaaaggga tcaggggatg cccaggcatg gacagtgggt ggcaggggag gagaggaggg       660
ctgtctgctt cccagaagtc caaggacaca aatgggtgag gggagagctc tcccctagc       720
tgggctgcgg cccaacccca ccccctcagg ctatgccagg gggtgttgcc aggggcaccc      780
gggcatcgcc agtctagccc actccttcat aaagccctcg catccccagga gcgagcagag     840
ccagccggaa ctgtaagtt tagtcttttt gtcttttatt tcaggtcccg gatccggtgg       900
tggtgcaaat caaagaactg ctcctcagtg gatgttgcct ttacttctag gcctgtacgg      960
aagtgttact tctgctctaa aagctgcgga attgtcaccg cggccaattc tgcagtcgac      1020
ggtaccgcgg gcccgggatc caccggttcg ccaccatggc ggccccttgta gtggcgccgc     1080
ctggtgtggt ggttagtcgg gctaacaagc gcagcggcgc ggggccggga ggcagcggtg      1140
gcggggggagc cagaggggcg gaggaggaac cgccgccgcc cctacaagca gttctggtgg     1200
ccgatagctt cgatcgccgc ttcttcccca tctccaagga ccagcctcgg gtcctcttgc      1260
ccctggccaa tgtggcatta attgactaca ctctggaatt cctgactgcc acaggtgtac      1320
aggaaacatt tgtcttttgt tgctggaaag ctgctcaaat caaagaacat ttactgaagt      1380
caaagtggtg ccgccctaca tctctcaatg tggttcgaat aattacatca gagctctatc      1440
gatcactggg agatgtcctc cgtgatgttg atgccaaggc tttggtgcgc tctgactttc      1500
ttctggtgta tggggatgtc atctcaaaca tcaatatcac cagagccctt gaggaacaca      1560
ggttgagacg gaagctagaa aaaaatgttt ctgtgatgac gatgatcttc aaggagtcat      1620
ccccacgccca cccaactcgt tgccacgaag acaatgtggt agtggctgtg gatagtacca     1680
caaacagggt tctccatttt cagaagaccc agggtctccg gcgtttttgca tttcctctga     1740
gcctgtttca gggcagtagt gatggagtgg aggttcgata tgatttactg gattgtcata      1800
tcagcatctg ttctcctcag gtggcacaac tctttacaga caactttgac taccaaactc      1860
gagatgactt tgtgcgaggt ctcttagtga atgaggagat cctaggaac cagatccaca       1920
tgcacgtaac agctaaggaa tatggtgccc gtgtctccaa cctacacatg tactcagctg      1980
tctgtgctga cgtcatccgc cgatgggtct accctctcac cccagaggcg aacttcactg      2040
acagcaccac ccagagctgc actcattccc ggcacaacat ctaccgaggg cctgaggtca      2100
gcctgggcca tggcagcatc ctagaggaaa atgtgctcct gggctctggc actgtcattg      2160
gcagcaattg ctttatcacc aacagtgtca ttggccccgg ctgccacatt ggtgataacg      2220
tggtgctgga ccagacctac ctgtggcagg gtgttcgagt ggcggctgga gcacagatcc      2280
atcagtctct gctttgtgac aatgctgagg ttcaaggaacg agtgacactg aaaccacgct      2340
ctgtcctcac ttcccaggtg gtcgtgggcc caaatatcac gctgcctgag ggctcggtga      2400
```

【図１３－２】

```
tctctttgca ccctccagat gcagaggaag atgaagatga tggcgagttc agtgatgatt      2460
ctggggctga ccaagaaaag gacaaagtga agatgaaagg ttacaatcca gcagaagtag      2520
gagctgctgg caagggctac ctctggaaag ctgcaggcat gaacatggag gaagaggagg      2580
aactgcagca gaatctgtgg ggactcaaga tcaacatgga agaagagagt gaaagtgaaa      2640
gtgagcaaag tatggattct gaggagccgg acagccgggg aggctcccct cagatggatg      2700
acatcaaagt gttccagaat gaagttttag gaacactaca gcggggcaaa gaggagaaca      2760
tttcttgtga caatctcgtc ctggaaatca actctctcaa gtatgcctat aacataagtc      2820
taaaggaggt gatgcaggta ctgagccacg tggtcctgga gttccccctg caacagatgg      2880
attccccgct tgactcaagc cgctactgtg ccctgctgct tcctctgcta aaggcctgga      2940
gccctgtttt taggaactac ataaagcgcg cagccgacca tttggaagcg ttagcagcca      3000
ttgaggactt cttctagag catgaagctc ttggtatttc catggccaag gtactgatgg      3060
ctttctacca gctggagatc ctggctgagg aaacaattct gagctggttc agccaaagag      3120
atacaactga caaggccag cagttgcgca agaatcaaca gctgcagagg ttcatccagt      3180
ggctaaaaga ggcagaagag gagtcatctg aagatgactg acgcgcgcga gatctacggg      3240
tggcatccct gtgaccccta cccagtgcct ctcctggccc tggaagttgc cactccagtg      3300
ccccaccagcc ttgtcctaat aaaattaagt tgcatcattt tgtctgacta ggtgtccttc      3360
tataatatta tgggtggag gggggtggta tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc      3420
tgtagggcct gcgggtctca ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc      3480
actgcaatct ccgcctcctg ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc cgagttgttg      3540
ggattccagg catgcatgac caggctcagc taatttttgt ttttttggta gagacggggt      3600
ttcaccatat tggccaggct ggtctccaac tcctaatctc aggtgatcta ccacccttgg      3660
cctcccaaat tgctgggatt acaggcgtga accaccatgc cctcccctgt ccttctgatt      3720
ttgtaggtaa ccacgtgcgg accgacggcg cgccaggaacc cctagtgatg gagttggcca      3780
ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc      3840
cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagctgcctg caggggcgcc      3900
tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata cgtcaaagca      3960
accatagtac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag      4020
cgtgaccgct acacttgcca gcgccttagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt      4080
tctcgccacg ttcgccggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt      4140
ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gatttgggtg atggttcacg      4200
tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt      4260
taatagtgga ctcttgttcc aaactgaaac aacactcaac tctatctcgg gctattcttt      4320
tgatttataa gggatttttgc cgatttcggt ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca      4380
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca attttatggt gcactctcag      4440
tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagccccga cacccgccaa cacccgctga      4500
cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc      4560
cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcatcaccg aaacgcgcga gacgaaaggg      4620
cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ttatcaaaaa ggatcttcac      4680
ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaagc ccaatctgaa taatgttaca      4740
accaattaac caattctgat tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat      4800
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa      4860
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc      4920
gtccaacatc aatacaacct attaattttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga      4980
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc      5040
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac      5100
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac      5160
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat      5220
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgtttttccg gggatcgcag      5280
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca      5340
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac      5400
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaag cgatagattg      5460
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca      5520
tgttggaatt taatcgcggc ctcgacgttt cccgttgaat atggctcata acaccccttg      5580
tattactgtt tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga ccaaaatccc ttaacgtgag      5640
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct      5700
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt      5760
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg      5820
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct      5880
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc      5940
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg      6000
tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa      6060
```

【図１３－３】

```
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg      6120
gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg      6180
ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga      6240
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt      6300
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt                            6340
```

【図１４－１】

AAV.GFAP.eIF2B5 (配列番号 14) – 7901

5' ITR	1-130
マルチクローニング部位（MCS）	131-196
GFAPプロモーター	*197 - 2404*
クローニング部位	**2405-2414**
SV40イントロン	2415-2511
クローニング部位及びコザック	2512-2616
eIF2B5 ORF	2617-4782
クローニング部	4783-4796
hGHポリA	***4797-5306***
クローニング部	5307-5314
3' ITR	5315-5455
F1起源	5530-5985
カナマイシン耐性遺伝子	相補体6321－7130
pMB1起源	7226-7899

```
cctacaagca gctgcagcat cggtcgtcga ctgaggccgc ccgggcatcg ggcgaccttt      60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact      120
aggggttcct gcggccgcat cgattgaatt cgagctcggt acctcgcgaa tacatctaga      180
tatcggatcc actagtccca cctccctctc tgtgctggga ctcacagagg gagacctcag      240
gaggcagtct gtccatcaca tgtccaaatg cagagcatac cctgggctgg gcgcagtggc      300
gcacaactgt aattccagca ctttgggagg ctgatgtgga aggatcactt gagcccagaa      360
gttctagacc agcctgggca acatggcaag accctatctc tacaaaaaaa gttaaaaaat      420
cagccacgtg tggtgacaca cacctgtagt cccagctatt caggaggctg aggtgagggg      480
atcacttaag gctgggaggt tgaggctgca gtgagtcgtg gttgcgccac tgcactccag      540
cctgggcaac agtgagaccc tgtctcaaaa gacaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaac       600
atatcctggt gtggagtagg ggacgctgct ctgacagagg ctcgggggcc tgagctggct      660
ctgtgagctg gggaggaggc agacagccag gccttgtctg caagcagacc tggcagcatt      720
gggctggccg ccccccaggg cctcctcttc atgcccagtg aatgactcac cttggcacag      780
acacaatgtt cggggtgggc acagtgcctg cttcccgccg caccccagcc cccctcaaat      840
gccttccgag aagcccattg agcaggggcc ttgcattgca ccccagcctg acagcctggc      900
atcttgggat aaaagcagca cagccccctа ggggctgccc ttgctgtgtg gcgccaccgg      960
cggtggagaa caaggctcta ttcagcctgt gcccaggaaa ggggatcagg ggatgcccag      1020
gcatggacag tgggtggcag ggggggagag gagggctgtc tgcttcccag aagtccaagg      1080
acacaaatgg gtgaggggac tgggcagggt tctgaccctg tgggaccaga gtggagggcg      1140
tagatggacc tgaagtctcc agggacaaca gggcccaggt ctcaggctcc tagttgggcc      1200
cagtggctcc agcgtttcca aacccatcca tccccagagg ttcttcccat ctctccaggc      1260
tgatgtgtgg gaactcgagg aaataaatct ccagtgggag acggaggggt ggccagggaa      1320
acggggcgct gcaggaataa agacgagcca gcacagccag ctcatgtgta acggctttgt      1380
ggagctgtca aggcctggtc tctgggagag aggcacaggg aggccagaca aggaaggggt      1440
gacctggagg gacagatcca ggggctaaag tcctgataag gcaagagagt gccggccccc      1500
tcttgcccta tcaggacctc cactgccaca tagaggccat gattgaccct tagacaaagg      1560
gctggtgtcc aatcccagcc cccagcccca gaactccagg gaatgaatgg gcagagagca      1620
ggaatgtggg acatctgtgt tcaagggaag gactccagga gtctgctggg aatgaggcct      1680
agtaggaaat gaggtggccc ttgagggtac agaacaggtt cattcttcgc caaattccca      1740
gcaccttgca ggcacttaca gctgagtgag ataatgcctg ggttatgaaa tcaaaaagtt      1800
ggaaagcagg tcagaggtca tctggtacag cccttccttc ccttttttct ttttttttct      1860
tgtgagacaa ggtctctctc tgttgcccag gctggagtgg cgcaaacaca gctcactgca      1920
gcctcaacct actgggctca agcaatcctc cagcctcagc ctcccaaagt gctgggatta      1980
caagcatgag ccaccccact cagccctttc cttcttttt aattgatgca taataattgt      2040
aagtattcat catggtccaa ccaacctttt cttgacccac cttcctagag agagggtcct      2100
cttgcttcag cggtcagggc cccagaccca tggtctggct ccaggtacca cctgcctcat      2160
gcaggagttg gcgtgcccag gaagctctgc ctctgggcac agtgacctca gtggggtgag      2220
gggagctctc cccatagctg ggctgcggcc caaccccacc ccctcaggct atgccagggg      2280
gtgttgccag gggcacccgg gcatcgccag tctagcccac tccttcataa agccctcgca      2340
tcccaggagc gagcagagcc agagcaggtt ggagaggaga cgcatcacct ccgctgctcg      2400
```

【図１４－２】

```
ccggtccgga actggtaagt ttagtctttt tgtctttttat ttcaggtccc ggatccggtg      2460
gtggtggcaaa tcaaaaaact gctcctcagt ggatgttgcc tttacttcta gacctgtacg      2520
gaagtgttac ttctgctcta aaagctgcgg aattgtaccc gcggccaatt ctgcagtcga      2580
cggtaccgcg ggcccgggat ccaccggttc gccaccatgg cggcccctgt agtggcgccg      2640
cctggtgtgg tggttagtcg ggctaacaag cgcagcggcg cgggggcggg aggcagcggt      2700
ggcgggggag ccagagggcc ggagggaggaa ccgccgccgc ccctacaagc agttctggtg      2760
gccgatagct tcgatcgccg cttcttcccc atctccaagg accagcctcg ggtcctcttg      2820
cccctggcca atgtggcatt aattgactac actctgaaat tcctgactgc cacaggtgta      2880
cagaaaacat ttgtctttg ttgctggaaa gctgctcaaa tcaaaagaca tttactgaag      2940
tcaaagtggt gccgccctac atctctcaat gtagttcgaa taattacatc agagctctat      3000
cgatcactgg gagatgtcct ccgtgatgtt gatgccaaag ctttggtgcg ctctgacttt      3060
cttctggtgt atgggaatgt catctcaaac atcaatatca ccagagcccct tgaggaacac      3120
aggttgaagc ggaagctaga aaaaaatgtt tctgtgatga cgatgatctt caaggaagtca      3180
tcccccagcc acccaactcg ttgccacgaa gacaatgtag tagtggctgt ggatagtacc      3240
acaaacaggg ttctccattt tcagaagacc cagggtctcc ggcgttttgc atttcctctg      3300
agcctgtttc agggcagtag tgatggagtg gagggttcgat atgatttact ggattgtcat      3360
atcagcatct gttctcctca ggtggcacaa ctctttacag acaacttttga ctaccaaact      3420
cgagatgact ttgtgcgagg tctcttagtg aatgaggaga tcctaggaaa ccagatccac      3480
atgcacgtaa cagctaagga atatggtgcc cgtgtctcca acctacacat gtactcagct      3540
gtctgtgctg acgtcatccg ccgatgggtc taccctctca ccccagaggc gaacttcact      3600
gacagcacca cccagaagctg cactcattcc cggcacaaca tctaccgagg gcctgaggtc      3660
agcctgggcc atggcaagcat cctagaaggaa aatgtgctcc tgggctctgg cactgtcatt      3720
ggcagcaatt gctttatcac caacagtgtc attggccccg gctgccacat tggtgataac      3780
gtggtgctgg accagacctа cctgtggcag ggtgttccgag tggccgctgg agcacagatc      3840
catcagtctc tgctttgtga caatgctgag gtcaaggaac gagtcaccct caaaccagcc      3900
tctgtcctca cttcccaggt ggtcgtgggc ccaaatatca cgctgcctga gggctcggtg      3960
atctctttgc accctccaga tgcagaggaa gatgaagatg atggcgagtt cagtgatgat      4020
tctgggggctg accaagaaaa ggacaaagtg aagatgaaag gttacaatcc agcagaagta      4080
ggagctgctg gcaaagggcta cctctggaaa gctgcaggca tgaacatgga ggaagaggag      4140
gaactgcagc agaatctgtg gggactcaag atcaacatgg aagaagagag tgaaaatgaa      4200
agtgagcaaa gtatggattc tgaggagccg gacagccggg gaggctcccc tcagatggat      4260
gacatcaaag tgttccagaa tgaagtttta ggaacactac agcgggggcaa agaggagaac      4320
atttcttgtg acaatctcgt cctggaaatc aactctctca agtatgccta taacataagt      4380
ctaaaggaag tgatgcaggt actgaagccac gtaggtcctg agttccccct gcaacagatg      4440
gattccccgc ttgactcaag ccgctactgt gccctgctgc ttcctctgct aaaggcctgg      4500
agccctgttt ttaggaacta cataaagcgc gcagccgacc atttgagaagc gttagcagcc      4560
attgaggact tcttcctaga gcatgaagct cttggtattt ccatggccaa ggtactgatg      4620
gctttctacc agctggagat cctggctgag gaaacaattc tgagctggtt cagccaaaga      4680
gatacaactg acaaggccca gcagttgcac aagaatcaac agctgcagag gttcatccag      4740
tggctaaaag aggcagaaga ggagtcatct gaagatgact gacgcgcgcg agatct***acgg***      ***4800***
***gtggcatccc tgtgacccct ccccagtgcc tctcctggcc ctggaagttg ccactccagt***      ***4860***
***gcccaccagc cttgtcctaa taaaattaag ttgcatcatt ttgtctgact aggtgtcctt***      ***4920***
***ctataatatt atggggtgga ggggggtggt atggagcaag gggcaagttg ggaagacaac***      ***4980***
***ctgtagggcc tgcggggtct attgggaacc aagctggagt gcagtggcac aatcttggct***      ***5040***
***cactgcaatc tccgcctcct gggttcaagc gattctcctg cctcagcctc ccgagttgtt***      ***5100***
***gggattccag gcatgcatga ccaggctcag ctaatttttg ttttttggt agagacgggg***      ***5160***
***tttcaccata ttggccaggc tggtctccaa ctcctaatct caggtgatct acccaccttg***      ***5220***
***gcctcccaaa ttgctgggat tacaggcgtg aaccactgct cccttcctg tcttctgat***      ***5280***
***tttgtaggta accacgtgcg gaccga***gcgg ccgcagggaa cccgtattgat tgaattgggc      5340
actcgctgtg tggcggctcg ctcgctcgct gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc      5400
cgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct gcagg ggcgc      5460
ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat acgtcaaagc      5520
aaccatagta cgcgccctgt agcggcgcat taagcgcggc gggtgtggtg gttacgcgca      5580
gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccctag cgcccgctcc tttcgctttc ttcccttcct      5640
ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt      5700
tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgatttgggt gatggttcac      5760
gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct      5820
ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg ggctattctt      5880
ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac      5940
aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttac aattttatgg tgcactctca      6000
gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg      6060
```

【図１４－３】

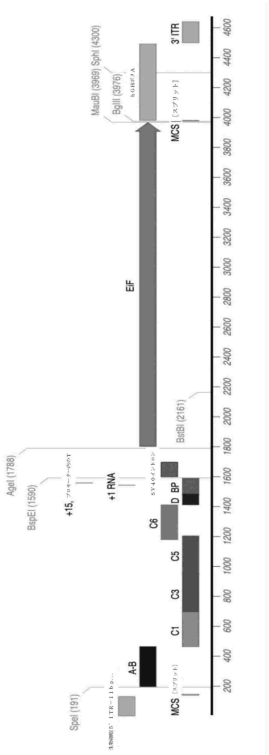
```
acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct      6120
ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg      6180
gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta atgtcatgag attatcaaaa aggatcttca      6240
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaag cccaatctga ataatgttac      6300
aaccaattaa ccaattctga **ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta**      **6360**
**ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc gttttctgtaa tgaaggagaa**      **6420**
**aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact**      **6480**
**cgtccaacat caatacaacc tattaatttc cctcgtcaaa aaataaggtt atcaagtgag**      **6540**
**aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca aaagtttatg catttctttc**      **6600**
**cagacttgtt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa**      **6660**
**ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga**      **6720**
**caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata**      **6780**
**ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat acctggaatg ctgtttttcc ggggatcgca**      **6840**
**gtggtgagta accatgcatc atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc**      **6900**
**ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta**      **6960**
**cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatacaa gcgatagatt**      **7020**
**gtcgcacctg attgcccgac attatcgcga gcccatttat acccatataa atcagcatcc**      **7080**
**atgttggaat ttaatcgcgg cctcgacgtt tcccgttgaa tatggctcat** aacacccctt      7140
gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatg accaaaatcc cttaacgtga      7200
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc      7260
ttttttctgc cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt      7320
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc      7380
gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc      7440
tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg      7500
cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg      7560
gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga      7620
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc      7680
ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg      7740
gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg      7800
atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt      7860
tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg t                          7901
```

【図１５】

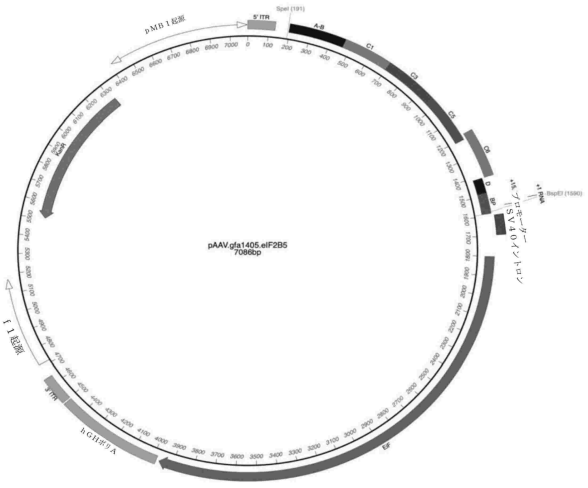
gfa1405プロモーター配列（配列番号１５）

ACTAGTAACATATCTGGTGTGAGTAGGGACGCTGCTCTGACAAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGAGGAGG
CAGACAGCCAGGGCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCGCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTC
ACCTTGGCACAGACAACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGTCTCCGCGCGACCCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCA
TTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTG
TGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCATTCAGCCTGTGCCCAGGAAATGGGATCAGGGATGCCCAGGCATGGAGG
TGGCAGGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGTGAGGGGAGGGGTGGCCAGGAAACGGGG
CGCTGCAGGAATAAGACGAGCCAGCACAGCCATGTGTAACGGCTTGTGGACTGTCAAGGCCTGGTCTGTGGAGAGGCA
CAGGGAGGCCAGACAAGGAAGGGGTGACCTGGAGGGACAGATCCAGGGGCTAAAGTCCTGATAAGGCAAGAGATGCCGGCCCCCT
TGCCCTATCAGGACCTCCACTGCCACATAGAGGCCATGATTGACCCTTAGACAGCTGAGTGAGATAATGCCTGGGTTATGAAATCAAAAG
TTGGAAAGCAGGTCAGAGGTCATCTGGTACAGCCTTCCTCCCTTT

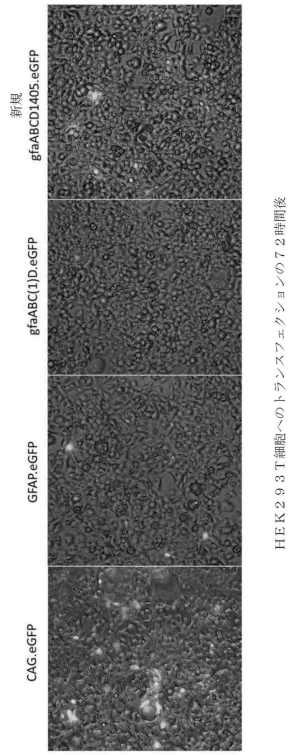
【図１８】



【図１９】

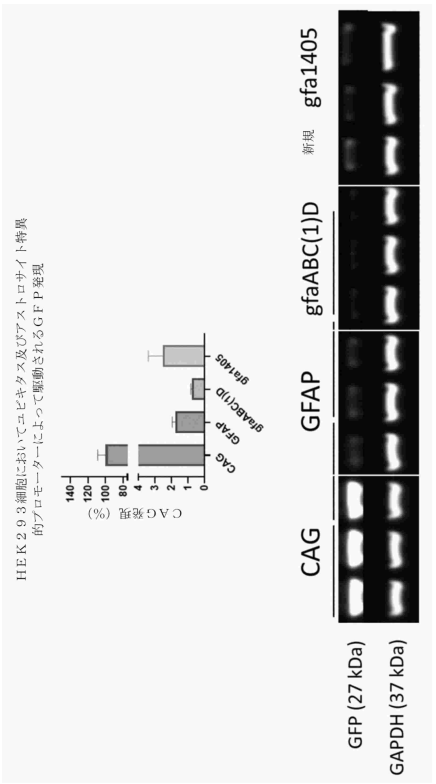


【図２０Ａ】

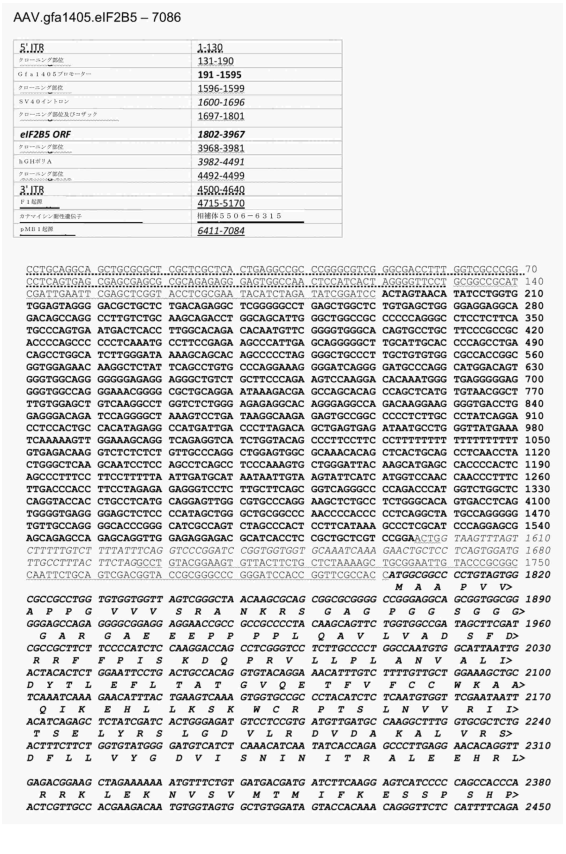


ＨＥＫ２９３Ｔ細胞へのトランスフェクション０７２時間後

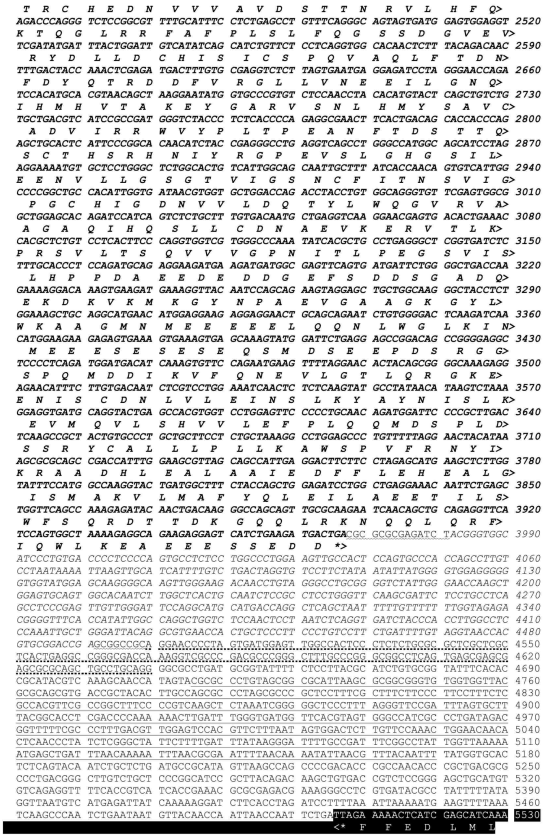
【図２０Ｂ】



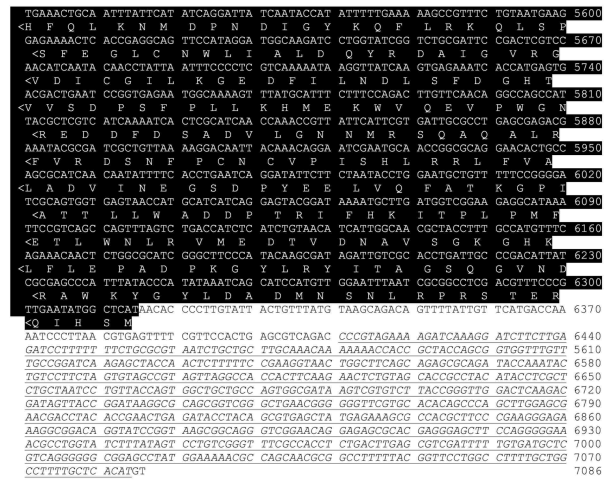
【図２１－１】



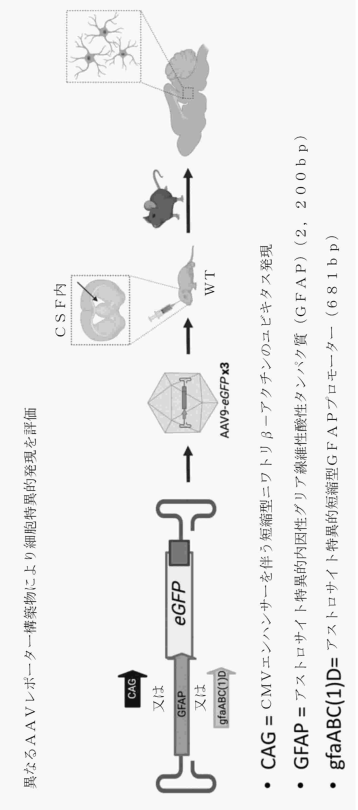
【図２１－２】



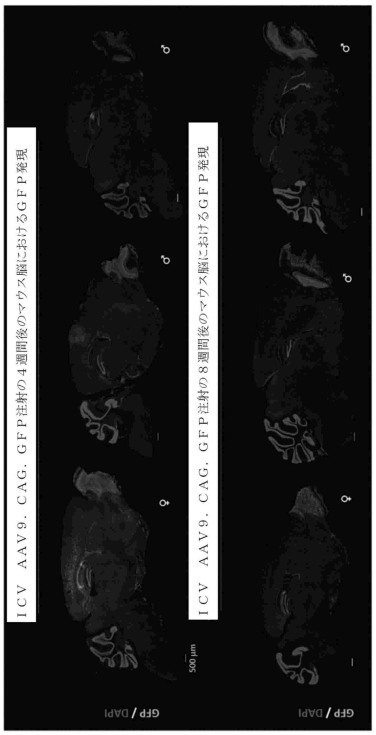
【図２１－３】



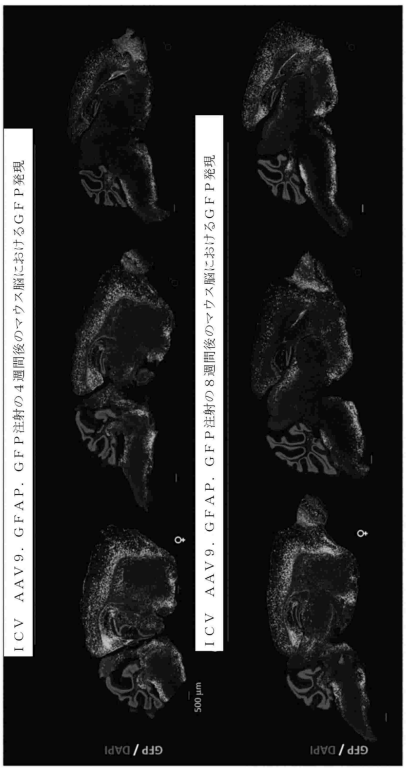
【図２２】



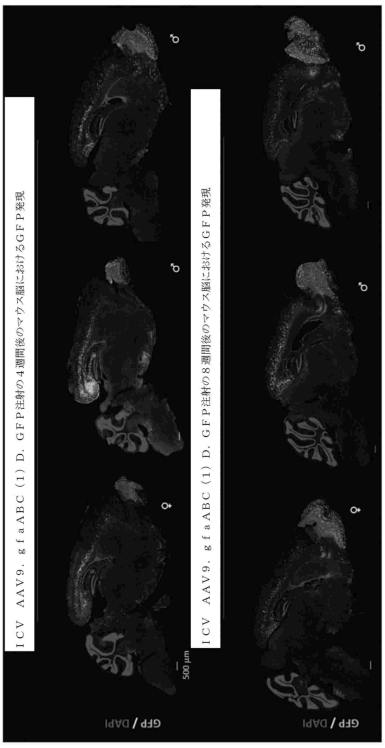
【図２３】



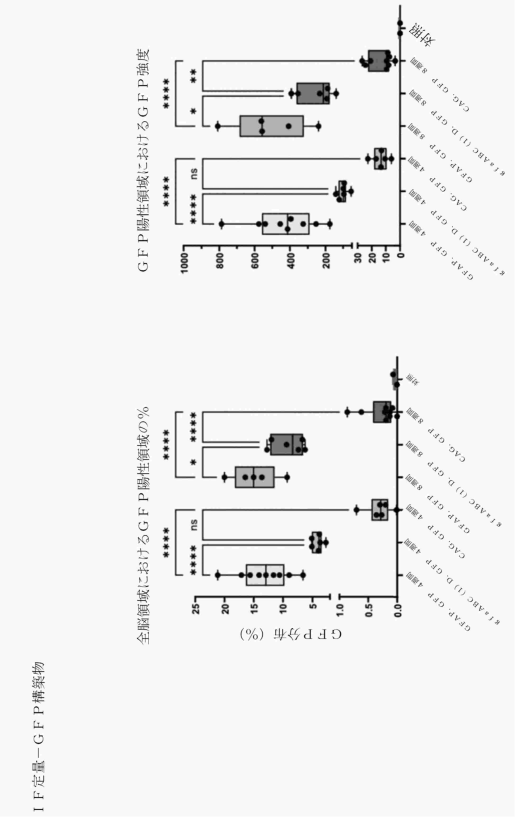
【図２４】



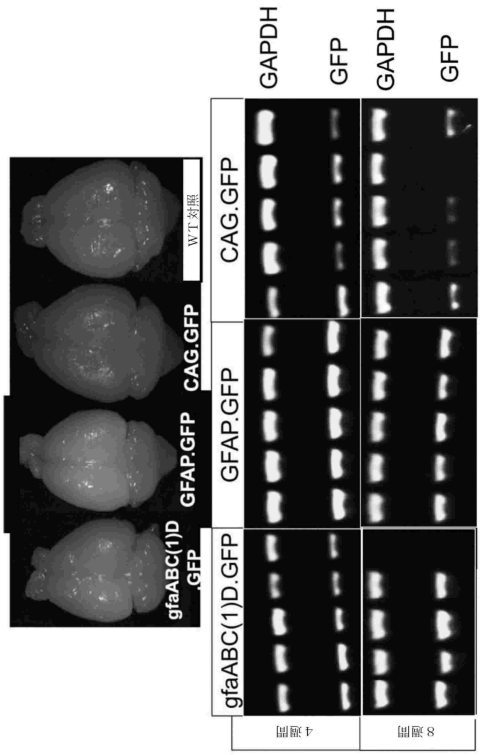
【図２５】



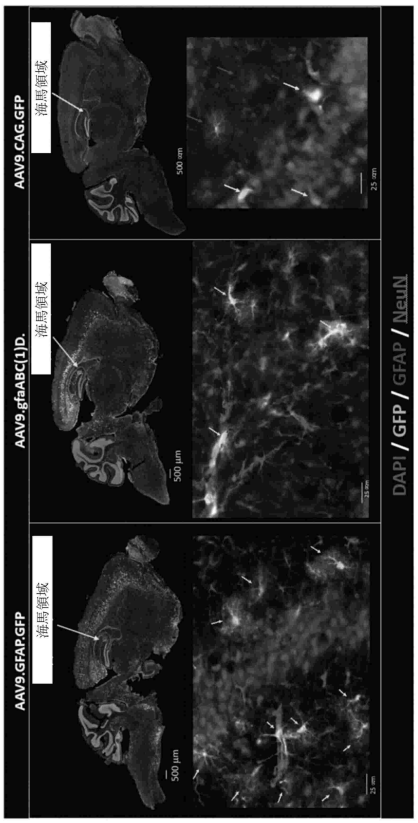
【図２６】



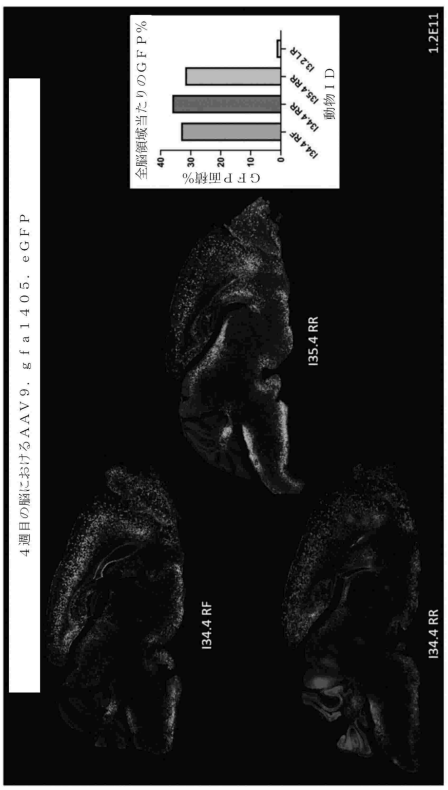
【図２７】



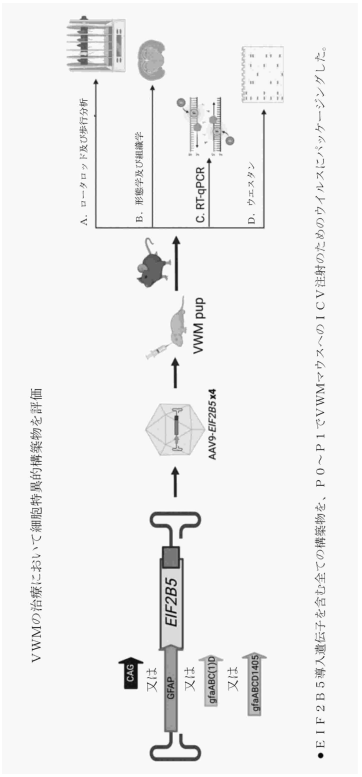
【図２８】



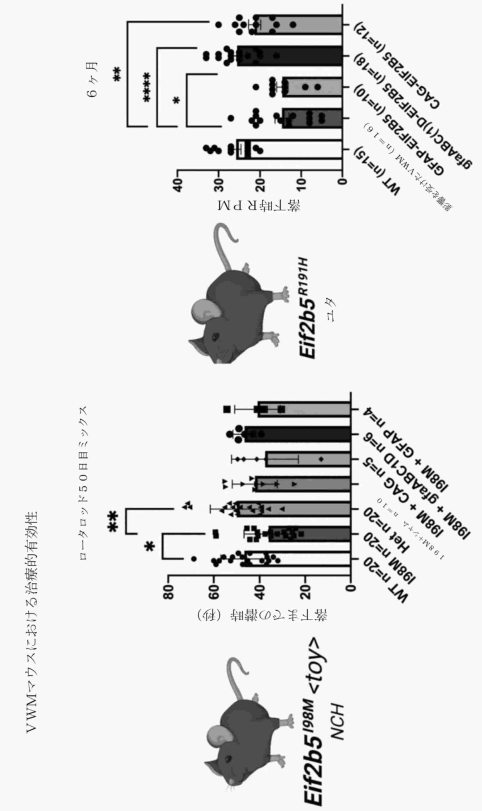
【図２９】



【図３０】



【図３１】



【配列表】

<u>20255089100000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/063676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/85 C12N15/86 A61K48/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DIETRICH JÖRG ET AL: "EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy", NATURE MEDICINE, vol. 11, no. 3, 20 February 2005 (2005-02-20), pages 277-283, XP093059695, New York ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm1195 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/nm1195> see section "EIF2B5 expression and RNA interference"; Genbank Acc. NM_003907; figure 2G ----- -/--	1,2, 10-12, 19-23, 31,38,42

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 August 2023	26/10/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Brenz Verca, Stefano

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/063676

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 10 September 2001 (2001-09-10), Strausberg R L: "Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5", XP093059918, retrieved from EBI Database accession no. BC013590	1-3
Y	the whole document	1-4,7, 10-28, 30-36, 38-42

Y	WO 2018/060712 A1 (UNIV OXFORD INNOVATION LTD [GB]) 5 April 2018 (2018-04-05) sequence 23	1-4,7, 10-28, 30-36, 38-42

Y	VON JONQUIERES GEORG ET AL: "Emerging Concepts in Vector Development for Glial Gene Therapy: Implications for Leukodystrophies", FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE, vol. 15, 22 June 2021 (2021-06-22), XP093059675, DOI: 10.3389/fncel.2021.661857 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8258421/pdf/fncel-15-661857.pdf> page 17, right-hand column, last paragraph - page 18, left-hand column, paragraph 2; tables 1,2	1-4,7, 10-28, 30-36, 38-42

Y	WO 2020/072873 A1 (UNIV MASSACHUSETTS [US]) 9 April 2020 (2020-04-09) example 10; sequence 14	1-4,7, 10-28, 30-36, 38-42

Y	CN 114 107 387 A (PRECISION MEASUREMENT SCIENCE AND TECH INNOVATION RESEARCH INSTITUTE O) 1 March 2022 (2022-03-01) example 1; sequence 1	1-4,7, 10-28, 30-36, 38-42

	-/--	

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/063676

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TERUMITSU-TSUJITA MIKA ET AL: "Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene: a vanishing white matter disease model", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 154, no. 1, 28 October 2019 (2019-10-28), pages 25-40, XP093059909, GB ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1111/jnc.14887 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1111/jnc.14887> the whole document -----	1-42
A	DOOVES STEPHANIE ET AL: "Astrocytes are central in the pathomechanisms of vanishing white matter", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 126, no. 4, 1 April 2016 (2016-04-01), pages 1512-1524, XP093059910, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI83908 the whole document -----	1-42
A	HILLEN ANNE E.J. ET AL: "In vivo targeting of a variant causing vanishing white matter using CRISPR/Cas9", MOLECULAR THERAPY- METHODS & CLINICAL DEVELOPMENT, vol. 25, 23 February 2022 (2022-02-23), pages 17-25, XP093059912, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1016/j.omtm.2022.02.006 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8917273/pdf/main.pdf> the whole document -----	1-42

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/063676

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/063676

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-42

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2023/063676

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-42

1. A nucleic acid comprising a polynucleotide comprising(a) one or more regulatory control element(s); and(b) a Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Subunit Epsilon 5 (EIF2B5) cDNA sequence.
10. A nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector comprising said nucleic acid.
18. An rAAV particle comprising an AAV comprising said nucleic acid.
19. A composition comprising: said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle; and a pharmaceutically acceptable carrier.
21. A method of increasing the expression of a EIF2B5 gene or EIF2B5 protein in a cell comprising contacting the cell with said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition.
25. A method of treating a subject comprising a EIF2BB5 gene mutation comprising administering to the subject an effective amount of said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition.
31. Use of said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition for the preparation of a medicament for increasing expression of the EIF2B5 gene or protein in a cell.
33. Use of said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition in treating a subject comprising a mutant EIF2B5 gene.
39. A composition for treating a EIF2B5 gene mutation, a leukoencephalopathy, leukodystrophy, a stroke, a migraine, epilepsy, multiple sclerosis (MS), Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), astrogliosis in aging, Huntington's Disease (HD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Alexander disease, hepatic encephalopathy (HE), AicardiDGoutieres syndrome, CLC-2-related disease, oculodentodigital dysplasia, giant axonal neuropathy, and/or a megalencephalic leukoencephalopathy in a subject, wherein the composition comprises said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition.

---

2. claims: 43-84

43. A nucleic acid comprising a gfa1405 promoter comprising(a) a nucleotide sequence having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO: 15; or(b) the nucleotide

International Application No. PCT/US2023/063676

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

sequence set forth in SEQ ID NO: 15.
47. A nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector comprising said nucleic acid.
55. An rAAV particle comprising an AAV comprising said nucleic acid.
56. A composition comprising: said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle; and a pharmaceutically acceptable carrier.
58. A method of increasing the expression of a gene or a protein in a cell comprising contacting the cell with said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition.
62. A method of treating a subject comprising a mutation in a gene normally expressed in an astrocyte or neuron of the subject, the method comprising administering to the subject an effective amount of said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition.
69. Use of said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition for the preparation of a medicament for increasing expression of a gene or protein in a cell.
71. Use of said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition in treating a subject comprising a mutant gene.
79. A composition for treating a gene mutation, or a disease or disorder in the central nervous system and/or brain of a subject, wherein the composition comprises said nucleic acid, nanoparticle, extracellular vesicle, exosome, or vector or said rAAV particle or said composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/063676

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018060712 A1	05-04-2018	EP 3519576 A1	07-08-2019
		US 2020261600 A1	20-08-2020
		WO 2018060712 A1	05-04-2018
WO 2020072873 A1	09-04-2020	BR 112021006344 A2	06-07-2021
		CA 3115251 A1	09-04-2020
		CN 113166780 A	23-07-2021
		EP 3861121 A1	11-08-2021
		JP 2022504260 A	13-01-2022
		KR 20210087462 A	12-07-2021
		US 2021381004 A1	09-12-2021
		WO 2020072873 A1	09-04-2020
CN 114107387 A	01-03-2022	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61K 9/08	*(2006.01)*	A61K	9/08		4C087
A61K 9/12	*(2006.01)*	A61K	9/12		4C091
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	25/00		
A61P 9/00	*(2006.01)*	A61P	9/00		
A61P 9/08	*(2006.01)*	A61P	9/08		
A61P 9/06	*(2006.01)*	A61P	9/06		
A61P 25/16	*(2006.01)*	A61P	25/16		
A61P 25/28	*(2006.01)*	A61P	25/28		
A61P 25/14	*(2006.01)*	A61P	25/14		
A61P 21/00	*(2006.01)*	A61P	21/00		
A61K 35/12	*(2015.01)*	A61K	35/12		
A61K 35/76	*(2015.01)*	A61K	35/76		
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61K 31/7088	*(2006.01)*	A61K	31/7088		
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61K 31/573	*(2006.01)*	A61K	31/573		
A61K 31/58	*(2006.01)*	A61K	31/58		
A61K 31/436	*(2006.01)*	A61K	31/436		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
C12N 5/0793	*(2010.01)*	C12N	5/0793		
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C07J 5/00	*(2006.01)*	C07J	5/00		
C07J 71/00	*(2006.01)*	C07J	71/00		
C07D 498/18	*(2006.01)*	C07D	498/18		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

(74)代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣
(74)代理人 100142907
弁理士 本田 淳
(74)代理人 100152489
弁理士 中村 美樹
(72)発明者 フラニガン、ケビン
アメリカ合衆国 ４３２０５ オハイオ州 コロンバス チルドレンズ ドライブ ７００
(72)発明者 ブラッドベリ、アリソン マリー
アメリカ合衆国 ４３２０５ オハイオ州 コロンバス チルドレンズ ドライブ ７００
(72)発明者 ボンコウスキー、ジョシュア
アメリカ合衆国 ８４１１３ ユタ州 ソルト レイク シティ マリオ カペッキ ドライブ ８１
(72)発明者 パイン、ネッティ ケイト
アメリカ合衆国 ４３２０５ オハイオ州 コロンバス チルドレンズ ドライブ ７００
(72)発明者 ハースティン、ジェシカ
アメリカ合衆国 ４３２０５ オハイオ州 コロンバス チルドレンズ ドライブ ７００

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 CA44
4C076 AA11 AA24 BB11 BB13 BB21 CC01 CC11 FF11 FF34
4C084 AA13 AA19 MA01 MA02 MA13 MA16 MA17 MA55 MA65 NA13 NA14 ZA01 ZA06 ZA15 ZA16 ZA36 ZA94
4C085 AA14 EE03 GG01 GG02
4C086 AA01 AA02 CB22 DA10 DA12 EA16 MA01 MA02 MA04 MA13 MA16 MA17 MA55 MA65 NA05 NA13 NA14 ZA01 ZA06 ZA15 ZA16 ZA36 ZA94 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB65 CA12 CA20 MA02 MA13 MA16 MA17 MA55 MA65 NA13 NA14 ZA01 ZA06 ZA15 ZA16 ZA36 ZA94
4C091 AA01 BB03 BB05 CC01 DD01 EE07 FF01 FF04 FF13 GG01 HH03 JJ03 KK12 LL01 MM03 NN01 NN04 PA02 PA03 PA05 PA09 PB02 QQ01

【要約の続き】
的ＥＩＦ２Ｂ５タンパク質の発現をもたらす。アストロサイト及びニューロンを標的とするように設計された、ｇｆａ１４０５と称される新しいプロモーターも提供される。したがって、ｇｆａ１４０５プロモーターを含む組成物、ナノ粒子、細胞外小胞、エクソソーム、又はベクター、及びその使用方法も提供される。
【選択図】図１