

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2023-535576  
(P2023-535576A)

(43)公表日 令和5年8月18日(2023.8.18)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)		
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 P	25/08 (2006.01)	A 6 1 P	25/08		
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全63頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-504517(P2023-504517)	(71)出願人	521047960 ユーシーエル ビジネス エルティーディー U C L B u s i n e s s L t d 英国 ダブリュシー1イー 6 ピーティー ロンドン ガワー ストリート ユニバー シティー カレッジ ロンドン
(86)(22)出願日	令和3年7月21日(2021.7.21)	(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85)翻訳文提出日	令和5年3月1日(2023.3.1)	(74)代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/070455	(74)代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87)国際公開番号	WO2022/018171	(74)代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(87)国際公開日	令和4年1月27日(2022.1.27)	(74)代理人	100148699 最終頁に続く
(31)優先権主張番号	63/055,775		
(32)優先日	令和2年7月23日(2020.7.23)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA( AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 e E F 1 A 2 の遺伝子治療ベクターおよびその使用

## (57)【要約】

本明細書では、e E F 1 A 2 タンパク質またはその機能的バリエントを発現するためのベクターとして組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオンを使用した、神経疾患のための遺伝子治療が提供される。rAAVビリオンは、ニューロン特異的プロモーター、例えば、ヒトシナプシン1(hSYN)プロモーターを使用してもよい。キャプシドは、AAV9キャプシドまたはその機能的バリエントであってもよい。他のプロモーターまたはキャプシドを使用してもよい。さらに、rAAVビリオンの大脳内および/または静脈内などによる治療方法、ならびにその他の組成物および方法が提供される。

【選択図】図1



FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

キャプシドおよびベクターゲノムを含む、組換えアデノ隨伴ウイルス (rAAV) ビリオンであって、前記ベクターゲノムが、プロモーターに作動可能に連結された eEF1A 2 タンパク質またはその機能的バリエントをコードするポリヌクレオチド配列を含む、前記組換えアデノ隨伴ウイルス (rAAV) ビリオン。

**【請求項 2】**

前記プロモーターが、ニューロン特異的プロモーターである、請求項 1 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 3】**

前記プロモーターが、汎神経細胞プロモーターである、請求項 1 または請求項 2 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 4】**

前記プロモーターが、シナプシン 1 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 rAAV ビリオン。

**【請求項 5】**

前記シナプシン 1 プロモーターが、ヒトシナプシン 1 (hSYN) プロモーターである、請求項 4 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 6】**

前記 hSYN プロモーターが、配列番号 3 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% の同一性を共有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 5 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 7】**

前記 hSYN プロモーターが、配列番号 3 と少なくとも 95% または少なくとも 99% の同一性を共有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 6 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 8】**

前記 hSYN プロモーターが、配列番号 3 のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 7 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 9】**

前記プロモーターが、eSYN 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 rAAV ビリオン。

**【請求項 10】**

前記 eSYN プロモーターが、配列番号 64 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 99% または 100% の同一性を共有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 11】**

前記 eEF1A 2 タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 2 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% の同一性を共有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 12】**

前記 eEF1A 2 タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 2 と少なくとも 95% または少なくとも 99% の同一性を共有する、請求項 11 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 13】**

前記 eEF1A 2 タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 2 のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 12 に記載の rAAV ビリオン。

**【請求項 14】**

前記 eEF1A 2 タンパク質が、配列番号 1 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% の同一性を共有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の rAAV ビリオン。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 5】**

前記 e E F 1 A 2 タンパク質が、配列番号 1 と少なくとも 9 5 % または少なくとも 9 9 % の同一性を共有する、請求項 1 4 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 1 6】**

前記 e E F 1 A 2 タンパク質が、配列番号 1 のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 5 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 1 7】**

前記プロモーターが、シナプシン 1 プロモーターである、請求項 1 5 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 1 8】**

前記シナプシン 1 プロモーターが、ヒトシナプシン 1 ( h S Y N ) プロモーターである、請求項 1 7 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 1 9】**

前記 h S Y N プロモーターが、配列番号 3 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 0】**

前記プロモーターが、構成的プロモーターである、請求項 1 または 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 1】**

前記プロモーターが、C A G プロモーターであり、任意選択的に、前記 C A G プロモーターが、配列番号 1 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、請求項 1 、 1 1 ~ 1 5 、または 2 0 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 2】**

前記プロモーターが、C M V プロモーターであり、任意選択的に、前記 C M V プロモーターが、配列番号 1 6 または 1 7 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、請求項 1 、 1 1 ~ 1 5 、または 2 0 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 3】**

前記ベクターゲノムが、ポリアデニル化 ( ポリ A ) 部位を含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 4】**

前記ポリ A 配列が、b G H ポリアデニル化部位である、請求項 2 3 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 5】**

前記 b G H ポリアデニル化部位が、配列番号 5 3 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、請求項 2 4 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 6】**

前記ポリ A 配列が、h G H ポリアデニル化部位である、請求項 2 3 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 7】**

前記 h G H ポリアデニル化部位が、配列番号 5 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、請求項 2 6 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 8】**

前記ベクターゲノムが、W P R E ( × ) エレメントを含む、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 2 9】**

前記 W P R E ( × ) エレメントが、配列番号 4 2 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、請求項 2 8 に記載の r A A V ビリオン。

**【請求項 3 0】**

前記 W P R E ( × ) エレメントが、配列番号 4 1 または配列番号 4 3 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、請求項 2 8 に記載の r A A V ビリオン。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 1】**

前記ベクターゲノムが、コザック配列を含む、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 3 2】**

前記コザック配列が、配列番号 1 0 である、請求項 3 1 に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 3 3】**

前記ベクターゲノムが、配列番号 3 2 ~ 4 0 の一つまたは複数と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する 5 ' 非翻訳領域 ( U T R ) を含む、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 3 4】**

前記ベクターゲノムが、配列番号 4 1 ~ 4 9 の一つまたは複数と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する 3 ' 非翻訳領域 ( U T R ) を含む、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 3 5】**

前記ベクターゲノムが、配列番号 1 9 または配列番号 2 0 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を有する 5 ' 逆位末端反復 ( I T R ) を含む、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 3 6】**

前記ベクターゲノムが、配列番号 2 1 または配列番号 6 3 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を有する 3 ' 逆位末端反復 ( I T R ) を含む、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 3 7】**

前記 C A G プロモーターが、配列番号 1 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、請求項 2 1 に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 3 8】**

前記キャプシドが、A A V 9 キャプシドまたはその機能的バリアントである、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 3 9】**

前記キャプシドが、配列番号 1 5 と少なくとも 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を共有する、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の r A A V ピリオン。

**【請求項 4 0】**

前記ベクターゲノムが、発現力セットを含み、前記発現力セットが、5 ' から 3 ' の順序で、

a . H u B A プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( x ) 、および p A グロビン - O c ;

b . C M V プロモーター、T P L - e M L P エンハンサー、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( r ) 、および p A グロビン - O c ;

c . S y n プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( r ) 、3 ' U T R ( グロビン ) および p A G H - B t ;

d . C B A プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、および p A G H - B t ;

e . E F 1 プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、および p A グロビン - O c ;

f . H u B A プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、R 2 V 1 7 、および p A G H - B t ;

g . S y n プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( x ) 、3 ' U T R ( グロビン ) および p A G H - H s ;

h . C a M K I I a プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( r ) 、および p A G H - H s ;

10

20

30

40

50

i . C M V プロモーター、 T P L - e M L P エンハンサー、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( r )、および p A G H - H s ;

j . H u B A プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、および p A G H - H s ;

k . C M V プロモーター、 T P L / e M L P エンハンサー、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 R 2 V 1 7 、 3 ' U T R ( グロビン )、および p A G H - B t ;

l . E F 1 プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( r )、および p A G H - B t ;

m . S y n プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 R 2 V 1 7 、および p A グロビン - O c ;

n . C a M K I I a プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 R 2 V 1 7 、および p A グロビン - O c ;

o . C B A プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( x )、 3 ' U T R ( グロビン ) および p A G H - H s ;

p . C B A プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 3 ' U T R ( グロビン )、および p A グロビン - O c ;

q . C a M K I I a プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 R 2 V 1 7 、および p A G H - B t ;

r . E F 1 プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 R 2 V 1 7 、 3 ' U T R ( グロビン )、および p A G H - H s ;

s . C M V プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 R 2 V 1 7 、 3 ' U T R ( グロビン )、および p A G H - H s ;

t . C M V プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、および p A G H - H s ;

u . h S Y N プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( x )、および p A G H - B t ;

v . h S Y N プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( x )、および p A G H - H s ;

w . h S Y N プロモーター、コザック、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( x )、および p A G H - H s ;

x . C A G プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( x )、および p A G H - H s ;

y . C A G プロモーター、コザック、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( x )、および p A G H - H s ;

z . h S Y N プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、 W P R E ( x )、および p A G H - B t ;

a a . h S Y N プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、および p A G H - H s ;

b b . h S Y N プロモーター、コザック、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、および p A G H - H s ;

c c . C A G プロモーター、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、および p A G H - H s ; または

d d . C A G プロモーター、コザック、 e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、および p A G H - H s

を含む、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の r A A V ピリオン。

#### 【請求項 4 1】

前記ベクターゲノムが、配列番号 5 5 ~ 5 8 または配列番号 6 5 ~ 6 8 のいずれか一つと少なくとも 9 0 % 、 9 5 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を共有するポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列を含むか、前記ポリヌクレオチド配列から本質的になるか、または前記ポリヌクレオチド配列からなる、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

#### 【請求項 4 2】

その必要のある対象において神経疾患または障害を治療および／または予防する方法であって、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオンを前記対象に投与することを含む、前記方法。

#### 【請求項 4 3】

前記対象が、E E F 1 A 2 遺伝子に一つまたは複数の変異を有するか、または有する疑いがある、請求項 4 2 に記載の方法。

#### 【請求項 4 4】

前記神経疾患または障害が、てんかんを含む、請求項 4 2 または請求項 4 3 に記載の方法。

#### 【請求項 4 5】

前記神経疾患または障害が、知的障害を含む、請求項 4 2 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 4 6】

前記神経疾患または障害が、自閉症を含む、請求項 4 2 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 4 7】

前記投与する工程が、脳室内投与を含む、請求項 4 2 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 4 8】

前記投与する工程が、静脈内投与を含む、請求項 4 2 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 4 9】

前記投与する工程が、脳室内投与および静脈内投与の両方を同時または順次含む、請求項 4 2 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 5 0】

前記対象が哺乳動物である、請求項 4 2 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 5 1】

未処置の対照対象と比較して、前記対象における神経学的パフォーマンスの低下を防止する、請求項 4 2 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 5 2】

前記方法が、筋力および／または運動技能を改善し、任意選択的に筋力および／または運動技能が、インバーテッドグリッド試験またはロータロッド試験を使用して評価される、請求項 2 4 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 5 3】

その必要のある対象の脳内で e E F 1 A 2 を発現させる方法であって、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオンを前記対象に投与することを含む、前記方法。

#### 【請求項 5 4】

前記方法が、前脳においてより高い発現を引き起こし、任意選択的に、前記発現が、h S Y N プロモーター、コザック配列、e E F 1 A 2 導入遺伝子、および／またはヒトグロブリンポリアデニル化配列 (h G H) を含むベクターゲノムを含む参照ベクターと比較される、請求項 5 3 に記載の方法。

#### 【請求項 5 5】

前記方法が、皮質においてより高い発現を引き起こし、任意選択的に、前記発現が、h S Y N プロモーター、コザック配列、e E F 1 A 2 導入遺伝子、および／またはヒトグロブリンポリアデニル化配列 (h G H) を含むベクターゲノムを含む参照ベクターと比較される、請求項 5 3 に記載の方法。

#### 【請求項 5 6】

10

20

30

40

50

前記 r A A V ビリオンの前記ベクターゲノムが、コザック配列を含まない、請求項 5 3 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 7】**

前記 r A A V ビリオンの前記ベクターゲノムが、ヒトグロブリンポリアデニル化配列 ( h G H ) を含まない、請求項 5 3 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 8】**

前記 r A A V ビリオンの前記ベクターゲノムが、ウシグロブリンポリアデニル化配列 ( b G H ) を含む、請求項 5 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 9】**

前記対象が、E E F 1 A 2 遺伝子に一つまたは複数の変異を有するか、または有する疑いがある、請求項 5 3 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。 10

**【請求項 6 0】**

前記対象が、神経疾患または障害に罹患しているか、またはそのリスクがある、請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6 1】**

前記神経疾患または障害が、てんかんを含む、請求項 6 0 に記載の方法。

**【請求項 6 2】**

前記神経疾患または障害が、知的障害を含む、請求項 6 0 または請求項 6 1 に記載の方法。

**【請求項 6 3】**

前記神経疾患または障害が、自閉症を含む、請求項 6 0 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。 20

**【請求項 6 4】**

前記投与する工程が、脳室内投与を含む、請求項 5 3 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6 5】**

前記投与する工程が、静脈内投与を含む、請求項 5 3 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6 6】**

前記投与する工程が、脳室内投与および静脈内投与の両方を同時または順次含む、請求項 5 3 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。 30

**【請求項 6 7】**

前記対象が哺乳動物である、請求項 5 3 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6 8】**

未処置の対照対象と比較して、前記対象における神経学的パフォーマンスの低下を防止する、請求項 5 3 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6 9】**

前記方法が、筋力および / または運動技能を改善し、任意選択的に筋力および / または運動技能が、インバーテッドグリッド試験またはロータロッド試験を使用して評価される、請求項 5 3 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7 0】**

請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオンを含む、医薬組成物。

**【請求項 7 1】**

請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオンと、使用説明書とを含む、キット。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

関連出願の相互参照

本出願は、2020年7月23日に出願された米国仮特許出願第 6 3 / 0 5 5 , 7 7 5 50

号の優先利益を主張するものであり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

### 【0002】

#### 配列表に関する記述

本出願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書中に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名前は、R O P A \_ 0 1 9 \_ 0 2 W O \_ S T 2 5 . t x t である。テキストファイルは約 1 0 1 キロバイトで、2 0 2 1 年 7 月 2 0 日に作成され、E F S - W e b を介して電子的に提出されている。

### 【背景技術】

#### 【0003】

##### 背景

E E F 1 A 2 遺伝子は、タンパク質合成、アポトーシスの抑制、およびアクチン機能と細胞骨格構造の調節に関するタンパク質である真核生物伸長因子 1、アルファ - 2 ( e E F 1 A 2 ) をコードする。マウスおよびヒトのオルソログは、4 6 3 アミノ酸位置のうちの 4 6 2 で同一性を共有する。E E F 1 A 2 は、卵巣癌で過剰発現するため、潜在的な発癌遺伝子である。卵巣癌に関する研究では、E E F 1 A 2 をコードするレンチウイルスベクターを実験的に使用して、不死化卵巣表面上皮 ( I O S E ) 細胞を形質導入し、それによって、e E F 1 A 2 が非腫瘍形成性の前駆細胞における腫瘍形成を促進することを実証した。Sun et al. Int J Cancer. 123 ( 8 ) : 1761 - 1 7 6 ( 2 0 0 8 ) ( 非特許文献 1 )。

10

20

#### 【0004】

E E F 1 A 2 は、中枢神経系 ( C N S ) 、ならびに心臓および筋肉において高度に発現する。マウスでの E e f 1 a 2 の完全喪失は、運動神経変性を引き起こす。これは、遺伝子型が w s t と称される、「廃棄物」と呼ばれる表現型である。Davies et al. Sci Rep. 7 : 46019 ( 2 0 1 7 ) ( 非特許文献 2 )。ヒト E E F 1 A 2 遺伝子の点変異は、最近、てんかん、知的障害、および / または自閉症を様々に引き起こすことが実証されている。Cao et al. Human Molecular Genetics. 26 ( 1 8 ) : 3545 - 3552 ( 2 0 1 7 ) ( 非特許文献 3 ) ; Lam et al. Mol Genet Genomic Med. 4 ( 4 ) : 465 - 7 4 ( 2 0 1 6 ) ( 非特許文献 4 ) ; Nakajima et al. Clin Gene t. 87 ( 4 ) : 356 - 6 1 ( 2 0 1 5 ) ( 非特許文献 5 )。

30

#### 【0005】

細菌人工染色体 ( B A C ) 上に野生型 E e f 1 a 2 を担持するトランスジェニックマウスを用いた実験により、野生型 E e f 1 1 a 2 が、発生中に存在する場合、w s t 遺伝子型を補完することが確認された。Newbury et al. J. Bio. Chem. 282 : 2891 - 5 0 ( 2 0 0 7 ) ( 非特許文献 6 )。

#### 【0006】

E E F 1 A 2 関連疾患は稀である。E E F 1 A 2 に変異があると特定されたのは、世界中で約 1 0 0 人のみである。疾患の病因は未だ十分に理解されていない。したがって、野生型 E E F 1 A 2 の出生後発現による疾患表現型の救済が達成されるか否かは不明である。さらに、C N S への遺伝子治療の送達は困難かつ予測不可能である。

40

#### 【0007】

E E F 1 A 2 関連疾患に対する治療についての満たされていないニーズがある。本明細書中で提供する遺伝子治療によってこのニーズに対処する。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0008】

【非特許文献 1】 Sun et al. Int J Cancer. 123 ( 8 ) : 1761 - 1 7 6 ( 2 0 0 8 )

【非特許文献 2】 Davies et al. Sci Rep. 7 : 46019 ( 2 0 1 7 )

50

【非特許文献3】Cao et al. Human Molecular Genetics. 26(18):3545-3552(2017)

【非特許文献4】Lam et al. Mol Genet Genomic Med. 4(4):465-74(2016)

【非特許文献5】Nakajima et al. Clin Genet. 87(4):356-61(2015)

【非特許文献6】Newburry et al. J. Bio. Chem. 282:2891-50(2007)

### 【発明の概要】

#### 【0009】

##### 概要

本発明は、概して、eEF1A2をコードするポリヌクレオチドまたはその機能的バリアントのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベースの送達を用いた神経疾患または障害のための遺伝子治療に関する。

#### 【0010】

一態様では、本開示は、キャプシドおよびベクターゲノムを含む、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオンを提供し、当該ベクターゲノムは、プロモーターに作動可能に連結されたeEF1A2タンパク質またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列を含む。プロモーターは、ニューロン特異的プロモーター、例えば、ヒトシナプシン1(hSYN)プロモーターであってもよい。キャプシドは、AAV9キャプシドまたはその機能的バリアントであってもよい。他のプロモーターまたはキャプシドを使用してもよい。

#### 【0011】

別の態様では、本開示は、本開示のrAAVビリオンまたはその医薬組成物を、対象に投与することを含む、その必要のある対象において神経疾患または障害を治療および/または予防する方法を提供する。rAAVビリオンは、大脳内および/または静脈内に投与され得る。

#### 【0012】

別の態様では、本開示は、本開示のrAAVビリオンまたはその医薬組成物を、対象に投与することを含む、その必要のある対象の脳でeEF1A2を発現させる方法を提供する。rAAVビリオンは、大脳内および/または静脈内に投与され得る。

#### 【0013】

さらなる態様では、本開示は、ポリヌクレオチド(例えば、ベクターゲノム)、医薬組成物、キット、および他の組成物および方法を提供する。

#### 【0014】

様々な他の態様および実施形態が、続く詳細な説明において開示されている。本発明は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図1】図1は、疾患に関連する点変異を示すeEF1A2のドメイン図を示す。

【図2】図2は、ベクターゲノムの非限定的な例のベクター図を示す。

【図3】図3は、ベクターゲノムの非限定的な例のベクター図を示す。

【図4】図4は、ベクターゲノムの非限定的な例のベクター図を示す。

【図5】図5は、ベクターゲノムの非限定的な例のベクター図を示す。

【図6】図6は、ベクターゲノムの非限定的な例のベクター図を示す。

【図7】図7は、AAV9-hSyn-eEF1A2-2A-eGFPまたは対照を、新生児の大脳内(IC)または静脈内(IV)に注射した後のマウスの免疫蛍光顕微鏡写真を示す。スケールバー、300 μm。

【図8A】図8Aは、AAV9-hSyn-eEF1A2-2A-eGFPまたは対照を、新生児の大脳内(IC)または静脈内(IV)に注射した後のマウスの免疫組織化学的

分析を示す。

【図 8 B】図 8 B は、同じスライドの拡大図を示す。スケールバー、 $300\text{ }\mu\text{m}$ 。

【図 9 - 1】図 9 A は、未処置の w s t / w s t (ヌル) マウスの生存を、大脳内 ( I C )、静脈内 ( I V )、または両方の組み合わせ ( I C + I V ) で処置したマウスと比較して示す。図 9 B は、未処置の w s t / w s t (ヌル) マウスの体重減少を、大脳内 ( I C )、静脈内 ( I V )、または両方の組み合わせ ( I C + I V ) で処置したマウスと比較して示す。図 9 C は、未処置の w s t / w s t (ヌル) マウスのロータロッド試験を、大脳内 ( I C )、静脈内 ( I V )、または両方の組み合わせ ( I C + I V ) で処置したマウスと比較して示す。図 9 D は、未処置の w s t / w s t (ヌル) マウスのインバーテッドグリッド試験を、大脳内 ( I C )、静脈内 ( I V )、または両方の組み合わせ ( I C + I V ) で処置したマウスと比較して示す。  
10

【図 9 - 2】図 9 E は、未処置の w s t / w s t (ヌル) マウスの e E F 1 A 2 発現を、大脳内 ( I C )、静脈内 ( I V )、または両方の組み合わせ ( I C + I V ) で処置したマウスと比較して示す。スケールバー、 $125\text{ }\mu\text{m}$ 。図 9 F は、未処置の w s t / w s t (ヌル) マウスの e E F 1 A 2 発現を、大脳内 ( I C )、静脈内 ( I V )、または両方の組み合わせ ( I C + I V ) で処置したマウスと比較して示す。

【図 10 - 1】図 10 A ~ 図 10 K は、図 2 (「V 1」)、図 3 (「V 2」)、図 4 (「V 3」) および図 6 (「V 4」) に示すベクターゲノムを含む、AAV9ベクターを、  
2e10<sup>11</sup>vg / 動物で投与した場合の比較を示す。図 10 A は、V 1、V 2、V 3、  
および V 4 遺伝子治療で処置された、FBS 処置野生型、w s t / w s t 、脳室内処置 w  
s t / w s t 動物のカプラン・マイヤー生存プロットを示す。図 10 B は、マウスの体重  
を示す (データ平均  $\pm$  S.E.M.)。動物は、出生後 35 日まで毎日、その後は、定期  
犠牲点 P 60 または人道的エンドポイントの 15 % 体重減少まで毎週計量された。図 10  
C は、P 15 日目のインバーテッドグリッドによる筋力評価を示す。図 10 D は、P 15  
日目のロータロッドによる筋力評価を示す。  
20

【図 10 - 2】図 10 A ~ 図 10 K は、図 2 (「V 1」)、図 3 (「V 2」)、図 4 (「V 3」) および図 6 (「V 4」) に示すベクターゲノムを含む、AAV9ベクターを、  
2e10<sup>11</sup>vg / 動物で投与した場合の比較を示す。図 10 E は、P 23 日目のインバーテッドグリッドによる筋力評価を示す。図 10 F は、P 23 日目のロータロッドによる筋力評価を示す。  
30

【図 10 - 3】図 10 A ~ 図 10 K は、図 2 (「V 1」)、図 3 (「V 2」)、図 4 (「V 3」) および図 6 (「V 4」) に示すベクターゲノムを含む、AAV9ベクターを、  
2e10<sup>11</sup>vg / 動物で投与した場合の比較を示す。図 10 G は、野生型 FBS (製剤  
緩衝液) を生理学的基準として用いたフリーフローティング免疫組織化学による、脳全体  
にわたる e E F 1 A 2 の代表的な免疫染色を示す (群当たり n = 4 ~ 5、スケールバー 2  
 $50\text{ }\mu\text{m}$ )。図 10 H は、e E F 1 A 2 を共発現するニューロン (NeuNマーカー) の  
皮質脳領域における代表的な免疫組織蛍光を示す (群当たり n = 4 ~ 5、 $200\text{ }\mu\text{m}$ )。

【図 10 - 4】図 10 A ~ 図 10 K は、図 2 (「V 1」)、図 3 (「V 2」)、図 4 (「V 3」) および図 6 (「V 4」) に示すベクターゲノムを含む、AAV9ベクターを、  
2e10<sup>11</sup>vg / 動物で投与した場合の比較を示す。図 10 I は、脳における e E F 1  
A 2 の代表的な免疫プロットを示し、定量化は、V 4 ベクターと比較して、中脳、小脳、  
および後脳領域でより高い発現を有するすべての遺伝子治療ベクターで達成された脳全体  
の e E F 1 A 2 発現を示す (データ平均  $\pm$  S.E.M.、二元配置分散分析)。図 10 J は、  
前脳におけるヒト e E F 1 A 2 転写物発現の qPCR を示し、V 1 ベクターで最も高い  
mRNA 発現を示す (データ平均  $\pm$  S.E.M.、二元配置分散分析)。図 10 K は、皮質  
におけるヒト e E F 1 A 2 皮質発現の qPCR を示し、V 1 ベクターで最も高い mRNA  
発現を示す (データ平均  $\pm$  S.E.M.、二元配置分散分析)。  
40

【図 11 A】図 11 A は、FBS 処置野生型、FBS 処置 D 252H / + 、ノックアウト  
(D 252H - / - )、脳室内 V 3 遺伝子治療処置 D 252H - / - (野生型 FBS n =  
12、D 252H / + FBS n = 5、D 252H - / - FBS n = 4 および 2 × 10<sup>11</sup>

v g / 仔、V 3 処置 n = 5 ) のカプラン・マイヤー生存プロットを示す。

【図 11 B】図 11 B は、経時的な体重を示す(データ平均、± S . E . M .、一元配置分散分析、およびダネットの多重比較)。

【図 11 C】図 11 C は、ロータロッドによる運動評価を示す(データ平均 ± S . E . M .、二元配置分散分析、およびダネットの多重比較)。

【図 12 - 1】図 12 A は、V 3 高用量 (2 × 10<sup>11</sup> v g / 仔、n = 5) を受けている D e l 2 2 e x 3 、V 3 低用量 (2 × 10<sup>10</sup> v g / 仔、n = 5) を受けている D e l 2 2 e x 3 、製剤緩衝液を受けている D e l 2 2 e x 3 対照 (n = 3) 、および製剤緩衝液を受けている野生型対照 (n = 6) のカプラン・マイヤー生存プロットを示す。図 12 B は、経時的な体重を示す(データ平均 ± S . E . M .)。図 12 C は、握力測定による運動評価を示す P 2 2 - 2 5 (データ平均 ± S . E . M )。図 12 D は、P 2 3 での握力測定を示す(データ平均 ± S . E . M .、二元配置分散分析、およびテューキーの多重比較)。

【図 12 - 2】図 12 E は、ロータロッドによる運動評価を示す P 2 2 - 2 5 (データ平均 ± S . E . M )。図 12 F は、P 2 4 でのロータロッドデータを示す(データ平均 ± S . E . M .、二元配置分散分析、およびテューキーの多重比較)。図 12 G は、P 2 1 - 2 5 の神経学的スコアを示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

定義

セクション見出しあは、組織目的のみを目的としており、記述された主題を特定の態様または実施形態に限定するものとして解釈されるべきではない。

【0017】

別途定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が関連する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中に記載するものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施において使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書に記載されたすべての刊行物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、その全体が参照により明示的に組み込まれる。矛盾する場合は、定義を含めて本明細書が優先される。また、本明細書中に記載する材料、方法、および実施例は、例証に過ぎず、限定することを意図するものではない。

【0018】

本明細書中に記載する全ての刊行物および特許は、各々の個々の刊行物または特許が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているかのように、それらの全体が参照により本明細書中に組み込まれる。矛盾する場合は、本明細書の任意の定義を含めて本出願が優先される。しかし、本明細書中で引用される任意の参考文献、記事、刊行物、特許、特許公開、および特許出願の言及は、それらが有効な先行技術を構成する、または世界の任意の国で共通の一般知識の一部を形成するという承認、または任意の形態の提案とされるものではなく、またそのように解釈されるべきではない。

【0019】

本記載では、別段の示唆がない限り、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比範囲、または整数範囲は、列挙された範囲内の任意の整数の値、および適切な場合にはその分数(例えば、整数の十分の一および百分の一など)を含むと理解されるべきである。用語「約」は、数字または数の直前にある場合、その数字または数がプラスまたはマイナス 10 % の範囲であることを意味する。本明細書で使用される場合、用語「a」および「a n」は、別段の示唆がない限り、列挙された構成要素のうちの「一つまたは複数」を指すことが理解されるべきである。代替物(例、「または」)の使用は、代替物のいずれか一方、両方、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味すると理解されるべきである。用語「および / または」は、選択肢の一方または両方を意味すると理解されるべきである

10

20

30

40

50

。本明細書中で使用される場合、用語「含む（incude）」および「含む（comprise）」は同義で使用される。

#### 【0020】

本明細書中で使用される場合、用語「同一性」および「同一である」は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列に関して、例えばBLASTアルゴリズムにより生成されたアライメントなどの、その「クエリー」配列と「対象」配列とのアライメントにおける、正確に一致している残基のパーセンテージを指す。同一性は、特に明記しない限り、対象配列の全長にわたって計算される。したがって、クエリー配列が、対象配列と整列しているときに、対象配列中の残基の少なくとも $x\%$ （切り捨て）が、クエリー配列中の対応する残基と完全に一致するように整列される場合、クエリー配列は、対象配列と「少なくとも $x\%$ の同一性を共有する」。対象配列が可変位置（例、Xで示される残基）を有する場合、クエリー配列中の任意の残基へのアライメントは、一致としてカウントされる。10

#### 【0021】

本明細書中で使用される場合、「AAVベクター」または「rAAVベクター」は、AAV末端反復配列（ITR）が隣接する一つまたは複数の目的のポリヌクレオチド（または導入遺伝子）を含む組換えベクターを指す。そのようなAAVベクターは、repおよびcap遺伝子産物をコードし発現するプラスミドでトランスフェクトされた宿主細胞中に存在する場合に、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングすることができる。あるいは、AAVベクターは、rep遺伝子およびcap遺伝子を発現するように安定的に操作された宿主細胞を使用して、感染性粒子中にパッケージングすることができる。20

#### 【0022】

本明細書中で使用される場合、「AAVビリオン」または「AAVウイルス粒子」または「AAVベクター粒子」は、少なくとも一つのAAVキャプシドタンパク質およびキャプシド化ポリヌクレオチドAAVベクターで構成されるウイルス粒子を指す。本明細書中で使用される場合、粒子が、異種ポリヌクレオチド（即ち、哺乳動物細胞に送達される導入遺伝子などの野生型AAVゲノム以外のポリヌクレオチド）を含む場合、通常、これは、「AAVベクター粒子」または単に「AAVベクター」と呼ばれる。このように、AAVベクター粒子の產生は、ベクターがAAVベクター粒子内に含まれるため、必然的にAAVベクターの产生を含む。

#### 【0023】

本明細書中で使用される場合、「プロモーター」は、真核細胞においてポリヌクレオチドからのRNA転写の開始を促進することが可能なポリヌクレオチド配列を指す。30

#### 【0024】

本明細書中で使用される場合、「ベクターゲノム」は、ベクター（例、rAAVビリオン）によりパッケージングされたポリヌクレオチド配列を指し、隣接配列（AAV中、逆位末端反復）を含む。用語「発現カセット」および「ポリヌクレオチドカセット」は、隣接ITR配列間のベクターゲノムの部分を指す。「発現カセット」は、ベクターゲノムが、発現を駆動するエレメント（例、プロモーター）に作動可能に連結された遺伝子産物をコードする少なくとも一つの遺伝子を含むことを意味する。

#### 【0025】

本明細書中で使用される場合、用語「必要としている患者」または「必要としている対象」は、本明細書中に開示する組換え遺伝子治療ベクターまたは遺伝子編集システムを用いた治療または寛解に適している疾患、障害、または状態のリスクのあるまたは罹患している患者または対象を指す。必要とする患者または対象は、例えば、中枢神経系に関連する障害と診断された患者または対象であってもよい。対象は、EEF1A2遺伝子内の突然変異、またはEEF1A2遺伝子のすべてもしくは一部の欠失、または遺伝子調節配列を有してもよく、これらはeEF1A2タンパク質の異常な発現を引き起こす。「対象」および「患者」は、本明細書中では互換的に使用される。本明細書中に記載する方法により治療される対象は、成人または子供であってよい。対象は年齢において広範であり得る。40

## 【0026】

本明細書中で使用される場合、用語「バリアント」または「機能的バリアント」は、互換的に、親タンパク質の一つまたは複数の所望の活性を保持する親タンパク質と比較して、一つまたは複数のアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するタンパク質を指す。

## 【0027】

本明細書中で使用される場合、「遺伝的破壊」は、遺伝子における機能的部分的または完全な喪失あるいは異常な活性を意味する。例えば、対象は、対象の少なくとも一部の細胞（例、神経細胞）において、e E F 1 A 2 タンパク質の発現を減少させる、または e E F 1 A 2 タンパク質の喪失もしくは異常機能をもたらす、E E F 1 A 2 遺伝子における発現または機能における遺伝的破壊を被り得る。

10

## 【0028】

本明細書中で使用される場合、「治療する」は、疾患または障害の一つまたは複数の症状を寛解させることを指す。用語「予防する」は、疾患もしくは障害の一つまたは複数の症状の発症を遅延もしくは中断すること、または e E F 1 A 2 関連神経疾患もしくは障害の進行を遅らせることを指す。

## 【0029】

E E F 1 A 2 タンパク質またはポリヌクレオチド

本開示は、伸長因子 1 - アルファ 2 (e E F 1 A 2) タンパク質に関連する組成物および使用方法を企図する。図 1 に例証される E E F 1 A 2 における様々な変異は、てんかん、知的障害、および / または自閉症を含む神経学的障害と関連することが知られている。遺伝性変異およびデノボ変異の両方が観察されている。一部の症例では、ヘテロ接合性ミスセンス変異が、疾患を起こすのに十分である。

20

## 【0030】

e E F 1 A 2 のポリペプチド配列は以下の通りである。

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

30

## 【0031】

一部の実施形態では、e E F 1 A 2 タンパク質は、配列番号：1) と、少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一であるポリペプチド配列を含む。

40

## 【0032】

一部の実施形態では、本開示は、キャプシドおよびベクターゲノムを含む組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンを提供し、ベクターゲノムは、プロモーターに作動可能に連結された e E F 1 A 2 タンパク質またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、本開示は、キャプシドおよびベクターゲノムを含む組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンを提供し、ベクターゲノムは、プロモーターに作動可能に連結された e E F 1 A 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む。e E F 1 A 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下と、少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一であるポリヌクレオチド配列を含み得る。

50

ATGGGCAAGGAGAAGACCCACATCAACATCGTGGTCATCG  
 GCCACGTGGACTCCGGAAAGTCCACCAACCACGGGCCACCT  
 CATCTACAAATGC GGAGGTATTGACAAAAGGACCCATTGAG  
 AAGTTCGAGAAGGGAGGCGGCTGAGATGGGAAGGGATCCT  
 TCAAGTATGCCCTGGGTGCTGGACAAAGCTGAGGGCAGGCG  
 TGAGCGCGGCATCACCATCGACATCTCCCTCTGGAAAGTT  
 GAGACCAACCAAGTACTACATCACCATCATCGATGCCCG  
 GCCACCGCGACTTCATCAAGAACATGATCACGGGTACATC  
 CCAGGCGGACTGCGCAGTGCTGATCGTGGCGGCGGGCGTG  
 GGCGAGTTCGAGGGCGCATCTCCAAGAACATGGCAGACGC 10  
 GGGAGCATGCCCTGCTGGCCTACACGCTGGGTGTGAAGCA  
 GCTCATCGTGGGCGTGAACAAAATGGACTCCACAGAGCCG  
 GCCTACAGCGAGAAGCGCTACGACGAGATCGTCAAGGAAG  
 TCAGCGCCCTACATCAAGAACATCGGCTACAAACCCGGCCAC  
 CGTGCCTTTGTGCCATCTCCGGCTGGCACGGTGACAAC  
 ATGCTGGAGCCCTCCCCAACATGCCGTGGTTCAAGGGCT  
 GGAAGGTGGAGCGTAAGGAGGGCAACCGCAAGCGGGTGT  
 CCTGCTGGAGGCCCTGGACACCATCCTGCCCTGGCAGGACGT  
 CCCACGGACAAGCCCTGCGGCTGCCGCTGCAAGGACGT  
 ACAAGATTGGCGGCATTGGCACGGTGCCCCGTGGGCCGGT  
 GGAGACCGGCATCCTGCGGCCGGCATGGTGGTGACCTTT 20  
 CGGCCAGTGAACATCACCATGAGGTGAAGTCAGTGGAGA  
 TGCACCAACGAGGCTCTGAGCGAACGCTCTGCCGGGACAA  
 CGTCGGCTTCAATGTGAAGAACACGTGTCGGTGAAAGGACATC  
 CGCGGGGCAACGTGTGGGACAGCAAGTCTGACCCGC  
 CGCAGGAGGCTGCTCAGTTCACCTCCAGGTACATCCT  
 GAACCAACCGGGCAGATTAGCGCCGGCTACTCCCCGGTC  
 ATCGACTGCCACACAGCCCACATCGCCGTGCAAGTTGG  
 AGCTGAAGGAGAACGATTGACCGGGCTCTGGCAAGAACGCT  
 GGAGGACAACCCCAAGTCCCTGAAGGTCTGGAGACGCGGCC 30  
 ATCGTGGAGATGGTGCCGGAAAGCCCATGTTGTTGGAGA  
 GCTTCTCCCAGTACCCGCCCTCTGGCCGGCTTCGCCGTGCG  
 CGACATGAGGCAGACGGTGGCCGTAGGGCTACATCAAGAAC  
 GTGGAGAACAGAGCGGGCGCCGGCAAGGTCACCAAGT  
 CGCGCAGAACGGCGCAGAACGGCGGGCAAG (配列番号2)。

### 【0033】

eEF1A2タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、コドン最適化されてもよい。

### 【0034】

eEF1A2タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含み得る。

ATGGGTAAAGAAAAACACATATTAATATAGTAGTAATCG  
 GTCATGTTGACTCTGGAAAATCTACTACTACAGGGACATT  
 GATTTATAAAATGTGGAGGAATTGATAAAAGAACAAATAGAA  
 AAATTGAAAAAGAACGCTGCTGAAATGGTAAAGGTAGTT  
 TTAAATATGCTTGGTTTGGATAAAATTGAAAGCTGAAAG 40  
 AGAAAAGAGGAATTACAATTGATATTCTTGTGGAAATT  
 GAAACTACAAAATATTATAACAAATAATAGATGCTCCTG  
 GACATAGAGATTATTAAAGATGATTACAGGAACCTTC 50

T C A A G C A G A T T G T G C T G T T T G A T A G T A G C A G C A G G A G T T  
 G G T G A A T T C G A A G C A G G C A T T T C T A A A A A T G G A C A A A C T A  
 G A G A A C A T G C T T G T T G G C T T A T A C A T T G G G C G T A A A A C A  
 A T T G A T T G T A G G A G T T A A T A A A A T G G A T T C T A C T G A A C C T  
 G C A T A T T C T G A A A A A A G A T A T G A T G A A A T A G T A A A A G A A G  
 T T T C T G C T T A T A T A A A A A A T T G G T T A T A A T C C T G C T A C  
 A G T T C C A T T G T T C C T A T T T C T G G A T G G C A T G G A G A T A A T  
 A T G T T G G A A C C T A G T C C T A A T A T G C C T T G G T T A A A G G A T  
 G G A A A G T T G A A A G G A A A G A A G G A A A T G C A T C A G G A G T C T C  
 C T T G T T G G A A G C T T G G A T A C A A T C T T G C C T C C A A C A A G A  
 C C T A C A G A T A A A C C T T G A G A G A T T G C C T C T T C A A G A T G T A T  
 A T A A A A T A G G A G G A A T A G G A A C A G T G C C A G T T G G A A G A G T  
 A G A A A C A G G T A T A T G A G A C C T G G A A T G G T T G T A A C A T T T  
 G C A C C A G T T A A T A T A A C T A C T G A A G T A A A A T C T G T T G A A A  
 T G C A T C A T G A A G C T T G T C T G A A G G C T C T C C T G G A G A T A A  
 T G T A G G A T T T A A T G T T A A A A A T G T A A G T G T A A A A G A T A T A  
 A G A A G A G G A A A T G T A T G T G G T G A T A G T A A A T C A G A T C C A C  
 C T C A A G A A G C A G C T C A A T T T A C A T C A C A A G T A A T A A T A T T  
 G A A T C A T C C T G G A C A A A T T T C T G C A G G A T A T T C A C C A G T A  
 A T A G A T T G T C A T A C A G C A C A T A T A G C T T G T A A A T T T G C T G  
 A A T T G A A A G A A A A A A T T G A T A G A A G A A G T G G A A A A A A C T  
 T G A A G A T A A T C C T A A A T C A T T G A A A A T C A G G A G A T G C A G C T  
 A T T G T A G A A A T G G T A C C T G G A A A A C C A A T G T G T G T A G A A T  
 C T T T T T C T C A A T A T C C A C C T C T C G G A A G A T T T G C T G T T A G  
 A G A T A T G A G A C A A A C A G T T G C A G T A G G A G T T A T T A A A A A T  
 G T A G A A A A A A A A G C G G A G G T G C A G G A A A G G T T A C A A A A T  
 C C G C A C A A A A A G C T C A A A A A G C T G G T A A A T A A (配列番号4)。  
**【0035】**

e E F 1 A 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下と、少なくとも 7 5 %  
 、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %  
 、 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるポリヌクレオチド配列を含み得る。 30

A T G G G C A A A G A A A A A C A C A T A T A A A C A T T G T C G T T A T C G  
 G A C A C G T T G A T T C T G G T A A A A G T A C A A C A A C C G G T C A C T T  
 G A T A T A C A A A T G C G G G G T A T A G A C A A A C G C A C T A T T G A A  
 A A G T T C G A G A A A G A A G C T G C G G A G A T G G G C A A A G G C T C A T  
 T C A A G T A C G C G T G G G T A C T C G A T A A G T T G A A A G C T G A A C G  
 C G A G A G G G G A A T C A C C A T A G A C A T C T C A C T T T G G A A A T T C  
 G A G A C A A C C A A G T A T T A C A T A A C T A T T A T A G A T G C C C C A G  
 G C C A C A G G G A T T T C A T T A A A A A T A T G A T A A C C G G C A C A T C  
 T C A A G C C G A T T G C G C C G T A C T C A T C G T C G C C G C T G G T G T G  
 G G T G A G T T C G A G G C A G G T A T T T C T A A A A A T G G C C A G A C A C  
 G C G A A C A T G C T C T T C T G G C T T A T A C A C T C G G G G T T A A A C A  
 G C T C A T A G T A G G A G T G A A T A A G A T G G A C T C C A C T G A A C C C  
 G C C T A T T C A G A G A A G C G C T A T G A C G A A A T T G T A A A G G A G G  
 T C T C A G C A T A T A T T A A A A A A T T G G C T A T A A C C C A G C C A C  
 G G T G C C A T T C G T C C C G A T T A G T G G A T G G C A T G G T G A C A A T  
 A T G C T G G A A C C A A G T C C C A A T A T G C C T T G G T T T A A G G G T T  
 G G A A A G T A G A G C G G A A A G A G G G T A A T G C T T C C G G C T G T C  
 A T T G C T G G A G G G C G C T T G A C A C G A T A C T C C C A C C C A C A A G G  
 C C A A C T G A T A A G C C A C T C C G A T T G C C C T T G C A G G A C G T G T 50

A C A A G A T T G G G G G A A T T G G G A C T G T G C C C G T C G G G C G C G T  
 G G A G A C G G G C A T C C T C A G A C C T G G G A T G G T A G T C A C T T T T  
 G C C C C C G T C A A C A T A A C G A C T G A A G T T A A A T C A G T G G A A A  
 T G C A T C A C G A A G C T T G A G T G A G G C G C T T C C C G G A G A T A A  
 C G T T G G A T T T A A T G T C A A A A A T G T C T C C G T T A A A G A T A T A  
 A G A A G A G G A A A C G T C T G C G G T G A C T C A A A G T C A G A C C C A C  
 C A C A G G A G G G C T G C T C A A T T T A C G A G T C A A G T A A T A A T T C T  
 G A A T C A C C C T G G G C A A A T A A G T G C G G G A T A C T C T C A G T C  
 A T C G A T T G T C A C A C C G C C C A T A T T G C A T G T A A G T T C G C A G  
 A A C T T A A G G A A A A G A T C G A C C G A A G A A G C G G A A A A A A A T T 10  
 G G A A G A T A A T C C G A A A A G T T G A A A A G C G G T G A C G C G G C G  
 A T T G T A G A G A T G G T C C C T G G C A A A C C G A T G T G T G T G G A G T  
 C T T T C A G T C A A T A T C C A C C A C T C G G T C G C T T T G C C G T G C G  
 G G A T A T G C G A C A G A C C G T T G C T G T C G G C G T A A T A A A A A C  
 G T C G A A A A A A A A G A G G C G G T G G G G C T G G A A A A G T T A C A A A A T  
 C C G C T C A A A A G G C A C A G A A G G C G G G C A A G T G A (配列番号5)。

## 【0036】

eEF1A2タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含み得る。 20

A T G G G T A A A G A A A A G A C C C A C A T T A A C A T A G T A G T A A T C G  
 G T C A T G T T G A C T C T G G G A A A A G C A C T A C T A C C G G A C A T T T  
 G A T C T A T A A A T G T G G G G G C A T C G A C A A A A G A A C G A T A G A G  
 A A G T T T G A G A A G G A G G G C G G G A G A T G G G T A A A G G T A G T T  
 T T A A G T A C G C T T G G G T T T G G A C A A A T T G A A A G C C G A G C G  
 C G A G C G G G C A T T A C C A T T G A C A T T T C T C T C T G G A A A T T C  
 G A A A C T A C G A A G T A T T A T A A C A A T A A T A G A C G C C C C C G  
 G C C A T C G G G A C T T T A T T A A A A A C A T G A T T A C A G G A A C T A G  
 C C A A G C A G A T T G T G C T G T G C T G A T A G T A G C G G G C A G G G G T C  
 G G G G A G T T C G A A G C A G G C A T C T C T A A A A A T G G A C A A A C T C 30  
 G A G A G C A C G C C T T G T T G G C T T A T A C C T T G G G C G T A A A G C A  
 G C T G A T C G T A G G A G T T A A T A A A A T G G A T T C C A C T G A A C C C  
 G C A T A T A G C G A A A A G C G A T A T G A C G A A A T A G T A A A G G A A G  
 T C T C A G C T T A T A T C A A G A A A A T C G G T T A C A A T C C T G C G A C  
 G G T T C C A T T C G T T C C T A T C T C C G G G T G G C A C G G C G A T A A T  
 A T G C T T G A G C C C A G T C C C A A T A T G C C C T G G T T C A A G G G G T  
 G G A A G G T T G A G A G G A A G G A A G G C A A T G C A T C A G G C G T C A G  
 C T T G T T G G A A G C T C T C G A C A C C A T C C T G C C G C C C A C G A G G  
 C C C A C A G A C A A A C C G T T G C G A C T G C C T C T T C A A G A T G T A T  
 A C A A A A T A G G C G G G A T A G G A A C C G T G C C G G T T G G A C G A G T  
 A G A G A C G G G T A T A C T G C G G C C C G G A A T G G T C G T G A C G T T T 40  
 G C A C C C G T G A A T A T A A C T A C T G A G G G T G A A G A G G C G T C G A G A  
 T G C A C C A T G A A G C G G C T G A G T G A A G G C T C T C C C T G G G C G A T A A  
 C G T A G G G T T C A A C G T G A A A A A C G T A A G T G T A A A G G A T A T A  
 A G G C G C G G A A A T G T A T G T G G G T G A C A G T A A A A A G C G A C C C G C  
 C G C A A G A G G C G G C G C A A T T C A C A T C A C A G G T A A T A A T A T T  
 G A A T C A C C C C G G C C A A A T T T C C G C A G G G C T A C T C A C C A G T C  
 A T A G A T T G C C A C A C C G C C C A C A T A G C T T G T A A G T T C G C T G  
 A G T T G A A A A G A G A A G A G T T G A T A G A C G A A G T G G G A A G A A A C T  
 T G A A G A C A A T C C G A A G T C C C T G A A G T C C G G T G A C G C A G C G 50

AT T G T A G A A A T G G T A C C G G G C A A G C C A A T G T G T G T A G A G T  
 C T T T C A G C C A G T A C C C A C C A C T G G G G C G G T T C G C G G T G C G  
 A G A C A T G A G G C A A A C G G T T G C G G T C G G C G T C A T T A A A A A T  
 G T C G A A A A A A A G A G T G G C G G T G C A G G T A A G G T C A C A A A A A  
 G C G C A C A A A A G G C C A G A A A G C C G G T A A G T G A (配列番号6)。

## 【0037】

e E F 1 A 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下と、少なくとも 75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100% 同一であるポリヌクレオチド配列を含み得る。

AT G G G A A A G G A A A A A C T C A C A T A A A C A T T G T C G T C A T C G 10  
 G T C A C G T A G A C A G T G G C A A A T C A A C G A C C A C T G G A C A T C T  
 C A T C T A T A A G T G T G G C G G T A T T G A C A A A C G C A C T A T C G A G  
 A A A T T C G A A A A G G A G G G C T G C T G A G A T G G G C A A A G G C T C T T  
 T C A A G T A C G C A T G G G T C C T G G A T A A G C T G A A A G C G G A G C G  
 A G A G A G A G G G A T C A C C A T C G A T A T A T C T C T G T G G A A A T T T  
 G A A A C C A C C A A G T A C T A C A T C A C A A T T A T T G A T G C C C C A G  
 G T C A T A G G G A T T T T A T C A A G A A C A T G A T C A C C G G G A C A A G 20  
 C C A A G C C G A C T G C G C A G T T C T C A T A G T G G C G G C T G G A G T A  
 G G G G A G T T T G A A G C A G G G A T A T C T A A G A A T G G A C A G A C C C  
 G C G A G C A C G C C T T G C T G G C C T A C A C C C T G G G A G T G A A G C A  
 G C T C A T A G T T G G C G T C A A T A A G A T G G A C A G C A C C G A A C C C 30  
 G C C T A C A G T G A G A A G A G G G T A T G A C G A G A T T G T G A A G G A G G  
 T T T C T G C T T A C A T T A A A A A G A T T G G C T A T A A C C C A G C T A C  
 T G T C C C A T T C G T T C C A A T C A G C G G C T G G C A C G G T G A T A A C  
 A T G C T G G A G C C T A G T C C C A A C A T G C C G T G G T T C A A G G G G T  
 G G A A G G T T G A A C G C A A G G A G G G G A A T G C C T C A G G C G T T T C  
 C C T G C T G G A G G G C C T C G A T A C A A T A C T C C C C C C G A C C C G G  
 C C T A C A G A T A A A C C G C T G C G A C T G C C T C T T C A G G A C G T G T  
 A T A A A A T C G G G G G A A T C G G C A C A G T G C C C G T G G G C A G G G T  
 A G A G A C T G G C A T C T T G C G G C C T G G A A T G G T A G T C A C C T T T 40  
 G C C C C G G T T A A T A T C A C A A C G G A G G G T G A A A T C T G T G G A G A  
 T G C A T C A C G A A G C A C T G A G C G A G G G C T C T G C C T G G T G A C A A  
 C G T G G G A T T T A A C G T C A A A A A C G T G T C A G T C A A G G A C A T C  
 C G C C G C G G T A A C G T T T G C G G A G G G A T T C T A A G T C C G A T C C C C  
 C C C A G G A G G C A G C C C A A T T T A C C T C C C A A G T G A T C A T T C T  
 G A A T C A C C C A G G C C A A A T T T C G C C G G G T A T T C C C C T G T G  
 A T T G A C T G T C A C A C A G C A C A C A T C G C A T G C A A A T T C G C C G  
 A A C T C A A G G A G A A A A T T G A T C G G A G A A G C G G T A A A A A A C T  
 G G A G G A C A A C C C A A A G T C C C T C A A G T C T G G G G A T G C C G C C  
 A T C G T G G A G A T G G T A C C A G G C A A A C C T A T G T G C G T G G A A A 50  
 G T T T T A G C C A G T A C C C T C C A C T G G G T C G C T T T G C T G T T C G  
 G G A T A T G C G G C A G A C A G T A G C G G T T G G G G T C A T A A A A A A C  
 G T C G A G A A A A A G A G G C G G A G G G A G C T G G G A A A G T T A C C A A A T  
 C C G C A C A G A A G G C A C A A A A A G C C G G A A A A T G A (配列番号7)。

## 【0038】

e E F 1 A 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下と、少なくとも 75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100% 同一であるポリヌクレオチド配列を含み得る。

AT G G G C A A A G A G A A A A C A C A T A T T A A C A T T G T T G T T A T C G  
 G G C A C G T T G A T A G C G G C A A G T C C A C T A C C A C T T G G C C A T C T 50

G A T T T A C A A G T G C G G C G G A A T C G A T A A A C G A A C T A T T G A A  
 A A G T T C G A A A A A G A A G G C C G C C G A G A T G G G A A A G G G G C T C C T  
 T T A A A T A C G C T T G G G T C C T C G A T A A A C T C A A A G C A G A A C G  
 G G A G A G A G G A A T C A C C A T C G A T A T A T C C T T G T G G A A G T T C  
 G A A A C T A C A A A A T A T T A C A T T A C C A T C A T T G A T G C G C T G  
 G G C A C C G C G A C T T C A T T A A G A A C A T G A T T A C T G G C A C C T C  
 T C A A G C C G A C T G C G C A G T G T T G A T C G T A G C C G C A G G C G T C  
 G G G G A G T T C G A A G C T G G G A T C A G C A A G A A C G G G C A G A C T A  
 G G G A A C A C G C T C T G C T C G C A T A T A C T C T T G G C G T G A A A C A  
 G T T G A T C G T T G G C G T G A A C A A G A T G G A T T C A A C T G A G C C T  
 G C C T A T T C T G A G A A A C G A T A C G A C G A G A T T G T G A A A G A G G 10  
 T T T C A G C T T A C A T C A A G A A A A T T G G G T A T A A T C C C G C A A C  
 A G T T C C C T T C G T G C C C A T C T C T G G G T G G C A C G G C G A C A A C  
 A T G C T C G A A C C A T C C C C A A A T A T G C C A T G G T T C A A G G G A T  
 G G A A G G T G G A G G C G C A A A G A A G G C A A C G C C T C C G G A G T G T C  
 T C T G C T C G A G G C C C T G G A C A C C A T T C T G C C C C C A A C A C G A  
 C C C A C T G A T A A G C C T C T G A G A C T G C C A C T G C A A G A C G T T T  
 A C A A A A T T G G G G G A A T T G G A A C C G T G C C T G T G G G T C G G G T  
 G G A A A C C G G A A T C C T C A G A C C C G G C A T G G T G G T C A C C T T C  
 G C A C C A G T G A A T A T A A C G A C A G A G G G T C A A A T C T G T G G A G A 20  
 T G C A C C A T G A G G C A T T G A G C G A G G C A C T C C C A G G A G A C A A  
 C G T G G G T T T C A A C G T G A A A A A T G T C T C A G T T A A G G A C A T C  
 C G A C G C G G C A A C G T G T G C G G A G A T A G C A A A T C T G A C C C C C  
 C C C A G G A G G C C G C T C A A T T C A C A A G T C A G G T T A T C A T C C T  
 T A A T C A C C C T G G C C A A A T A T C T G C A G G C T A C A G C C C C G T G  
 A T C G A T T G T C A C A C A G C T C A T A T C G C C T G T A A A T T T G C T G  
 A A C T C A A A G A A A A A G A T T G A C C G C A G A T C A G G A A A A A G C T  
 G G A G G A C A A C C C T A A A A G T C T G A A G T C C G G C G A C G C T G C C 30  
 A T C G T G G A G A T G G T C C C T G G G A A A C C C A T G T G C G T G G A G T  
 C C T T T T C T C A G T A C C C C C T C T G G G A C G A T T C G C C G T G C G  
 C G A C A T G A G A C A G A G A C T G T C G C C G T G G G C G T C A T T A A A A A T  
 G T G G A A A A A A A A A T C A G G A G G G T G C A G G G A A A G T G A C A A A G A  
 G T G C C C A G A A A G C A C A G A A G G C T G G C A A G T G A (配列番号 8)。  
**【0039】**

任意選択的に、ベクターゲノムをコードするポリヌクレオチド配列は、G C C A C C A T G G G (配列番号 10) を含むがこれに限定されないコザック配列を含んでもよい。コザック配列は、e E F 1 A 2 タンパク質またはその機能的バリエントをコードするポリヌクレオチド配列と重複してもよい。例えば、ベクターゲノムは、以下と少なくとも 75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるポリヌクレオチド配列（コザック下線あり）を含んでもよい。

g c c a c c A T G G G C A A G G A G A A G A C C C A C A T C A A A C A T C G T G G  
 T C A T C G G C C A C G T G G A C T C C G G A A A G T C C A C C A C C A C G G G  
 C C A C C T C A T C T A C A A A T G C G G A G G G T A T T G A C A A A A G G A C C  
 A T T G A G A A G T T C G A G A A G G A G G G C G G C T G A G A G A T G G G G A A G G  
 G A T C C T T C A A G T A T G C C T G G G T G C T G G A C A A G C T G A A G G C  
 G G A G C G T G A G C G C G G C A T C A C C A T C G A C A T C T C C C T C T G G  
 A A G T T C G A G A C C A C C A A G T A C T A C A T C A C C A T C G A T G  
 C C C C C G G C C A C C G C G A C T T C A T C A A G A A C A T G A T C A C G G G  
 T A C A T C C C A G G C G G A C T G C G C A G T G C T G A T C G T G G C G G C G 50

G G C G T G G G C G A G T T C G A G G C G G G C A T C T C C A A G A A T G G G C  
 A G A C G C G G G A G C A T G C C C T G C T G G C C T A C A C G C T G G G T G T  
 G A A G C A G C T C A T C G T G G G C G T G A A C A A A A T G G A C T C C A C A  
 G A G C C G G C C T A C A G C G A G A A G C G C T A C G A C G A G A T C G T C A  
 A G G A A G T C A G C G C T A C A T C A A G A A G A T C G G C T A C A A C C C  
 G G C C A C C G T G C C C T T T G T G C C C A T C T C C G G C T G G C A C G G T  
 G A C A A C A T G C T G G A G C C C T C C C C A A C A T G C C G T G G T T C A  
 A G G G C T G G A A G G T G G A G C G T A A G G A G G G C A A C G C A A G C G G  
 C G T G T C C C T G C T G G A G G C C C T G G A C A C C A T C C T G C C C C C C  
 A C G C G C C C A C G G A C A A G C C C C T G C G C C T G C C G C T G C A G G 10  
 A C G T G T A C A A G A T T G G C G G C A T T G G C A C G G T G C C C G T G G G G  
 C C G G G T G G A G A C C G G C A T C C T G C G G C C G G G C A T G G T G G T G  
 A C C T T T G C G C C A G T G A A C A C A T C A C C A C T G A G G T G A A G T C A G  
 T G G A G A T G C A C C A C G A G G G C T C T G A G G C G A A G C T C T G C C C G G  
 C G A C A A C G T C G G C T T C A A T G T G A A G A A C G T G T C G G T G A A G  
 G A C A T C C G G C G G G G C A A C G T G T G T G G G G A C A G C A A G T C T G  
 A C C C G C C G C A G G A G G G C T G C T C A G T T C A C C T C C C A G G T C A T  
 C A T C C T G A A C C A C C C G G G G C A G A T T A G C G C C G G C T A C T C C  
 C C G G T C A T C G A C T G C C A C A C A G C C C A C A T C G C C T G C A A G T  
 T T G C G G A G C T G A A G G A G A A G A T T G A C C G G C G C T C T G G C A A 20  
 G A A G C T G G A G G A C A A C C C A A G T C C C T G A A G T C T G G A G A C  
 G C G G C C A T C G T G G A G A T G G T G C C G G G A A A G C C C A T G T G T G  
 T G G A G A G G C T T C T C C C A G T A C C C G C C T C T C G G C C G C T T C G C  
 C G T G C G C G A C A T G A G G C A G A C G G T G G C C G T A G G C G T C A T C  
 A A G A A C G T G G A G A A G A A G A G G C G G C G C G C G G C A A G G T C A  
 C C A A G T C G G C G C A G A A G G C G C A G A A G G C G G G C A A G (配列番号  
 9)。

#### 【0040】

一部の実施形態では、コザック配列は、以下のうちのいずれか一つを含むまたはからなる代替コザック配列である。

( g c c ) g c c R c c A U G G (配列番号11) ;  
 A G N N A U G N ;  
 A N N A U G G ;  
 A C C A U G G ;  
 G A C A C C A U G G (配列番号12)。

#### 【0041】

一部の実施形態では、ベクターゲノムは、コザック配列を含まない。

#### 【0042】

ベクターゲノム

本開示のAAVビリオンは、ベクターゲノムを含む。ベクターゲノムは、発現カセット（またはポリヌクレオチド配列の発現を要求しない遺伝子編集用途のためのポリヌクレオチドカセット）を含んでもよい。任意の適切な逆位末端反復（ITR）を使用してもよい。ITRは、キャプシドと同じ血清型由来であってもよく、または異なる血清型由来であってもよい（例えば、AAV2 IT Rが使用され得る）。

#### 【0043】

一部の実施形態では、5'ITRは、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

C C T G C A G G C A G C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G C  
 C C G G G C A A A G C C C G G G C G T C G G G G C G A C C T T G G T C G C C C G

10

20

30

40

50

G C C T C A G T G A G C G A G C G C G C G C A G A G A G G G A G T G G C C A  
A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T (配列番号 18 )

## 【 0 0 4 4 】

一部の実施形態では、5'ITRは、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G C C C G G G C A A A G C C C  
G G G C G T C G G G C G A C C T T T G G T C G C C C G G C C T C A G T G A G C G  
A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G G C C A A C T C C A T C A C T A G  
G G G T T C C T T G T A G T T A A T G A T T A A C C C G C C A T G C T A C T T A 10  
T C T A C G T A (配列番号 19 )

## 【 0 0 4 5 】

一部の実施形態では、5'ITRは、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G C C C G G G C A A A G C  
C C G G G C G T C G G G C G A C C T T T G G T C G C C C G G C C T C A G T G A G  
C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G G C C A A C T C C A T C A C T  
A G G G G T T C C T T G T A G T T A A T G A T T A A C C C G C C A T G C T A C T  
T A T C T A C G T A (配列番号 20 ) 20

## 【 0 0 4 6 】

一部の実施形態では、3'ITRは、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

A G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G  
C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C  
C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C  
G A G C G C G C A G C T G C C T G C A G G (配列番号 21 )

## 【 0 0 4 7 】

一部の実施形態では、3'ITRは、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。 30

T A C G T A G A T A A G T A G C A T G G C G G G T T A A T C A T T A A C T A C A  
A G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G  
C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C  
C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C  
G A G C G C G C (配列番号 63 )

## 【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、ベクターゲノムは、例えば、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である一つまたは複数のフィラー(filler)配列を含む。 40

G C G G C A A T T C A G T C G A T A A C T A T A A C G G T C C T A A G G T A G C  
G A T T T A A A T A C G C G C T C T C T T A A G G T A G C C C C G G G A C G C G  
T C A A T T G A C T A C A A A C C G A G T A T C T G C A G A G G G C C C T G C G  
T A T G (配列番号 22 ) ;

C T T C T G A G G C G G A A A G A A C C A G A T C C T C T C T T A A G G T A G C  
A T C G A G A T T T A A A T T A G G G A T A A C A G G G T A A T G G C G C G G G  
C C G C (配列番号 23 ) ; または

G T T A C C C A G G C T G G A G T G C A G T G G C A C A T T T C T G C T C A C T  
G C A A C C T C C T C C C T G G G T T C (配列番号 24 ) 。 50

## 【 0 0 4 9 】

## プロモーター

一部の実施形態では、e E F 1 A 2 タンパク質またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列は、プロモーターに作動可能に連結される。

## 【 0 0 5 0 】

本開示は、様々なプロモーターの使用を企図する。本開示の実施形態で有用なプロモーターとしては、限定されないが、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター、またはCMVエンハンサーと、ニワトリベータ-アクチンプロモーターおよびウサギベータ-グロビン遺伝子の一部(CAG)とから構成されるプロモーター配列が挙げられる。一部の場合では、プロモーターは合成プロモーターであってもよい。例示的な合成プロモーターが、Schlabbach et al. PNAS USA 107(6): 2538 - 43(2010)により提供されている。一部の実施形態では、プロモーターは、以下と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A A C G A C  
 C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C C A T A G  
 T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G G T G G A  
 G T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A G T A C A T C A A G T G  
 T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C T A T T G A C G T C A A T G A C G  
 G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A G T A C A T G A C C T T  
 A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C T A C G T A T T A G T C  
 A T C G C T A T T A C C A T G G T C G A G G T G A G C C C C A C G T T C T G C T  
 T C A C T C T C C C C A T C T C C C C C C C T C C C C A C C C C C A T T T T  
 G T A T T T A T T T A T T T T A A T T A T T T T G T G C A G C G A T G G G G  
 G C G G G G G G G G G G G G G C G C G C G C G C A G G C G G G G C G G G G C G G  
 G G C G A G G G G C G G G G C G G G G C G A G G C G G G A G G G T G C G G G C G G  
 C A G C C A A T C A G A G C G G C G C G C T C C G A A A G T T T C C T T T A T  
 G G C G A G G C G G C G G C G G C G G C C C T A T A A A A A G C G A A G C  
 G C G C G G C G G G C G G (配列番号14)

## 【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、e E F 1 A 2 タンパク質、またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列は、誘導性プロモーターに作動可能に連結される。誘導性プロモーターは、薬剤の添加もしくは蓄積に応答して、または薬剤の除去、分解、もしくは希釈に応答して、ポリヌクレオチド配列を転写的に発現させる、または転写的に発現させないように構成され得る。薬剤は薬物であってもよい。薬剤は、テトラサイクリンまたはその誘導体の一つであってもよく、これには限定されないが、ドキシサイクリンが含まれる。一部の場合では、誘導性プロモーターは、t e t - o n プロモーター、t e t - o f f プロモーター、化学的に調節されたプロモーター、物理的に調節されたプロモーター(即ち、光の存在もしくは非存在に、または低温もしくは高温に応答するプロモーター)である。誘導性プロモーターには、重金属イオン誘導性プロモーター(マウス乳腺腫瘍ウイルス(mMTV)プロモーターまたは様々な成長ホルモンプロモーターなど)、およびT7 RNAポリメラーゼの存在下で活性なT7ファージ由来のプロモーターが含まれる。誘導性プロモーターのこのリストは非限定的である。

## 【 0 0 5 2 】

場合によっては、プロモーターは、非神経細胞よりもニューロンで発現を駆動することができるプロモーターなどの組織特異的プロモーターである。一部の実施形態では、組織特異的プロモーターは、h S Y N 1(ヒトシナプシン)、I N A(アルファインターネキシン)、N E S(ネスチン)、T H(チロシンヒドロキシラーゼ)、F O X A 2(フォークヘッドボックスA2)、C a M K I I(カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII)

10

20

30

40

50

)、およびNSE(ニューロン特異的エノラーゼ)を含むがこれに限定されない、任意の様々なニューロン特異的プロモーターから選択される。場合によっては、プロモーターはユビキタスプロモーターである。「ユビキタスプロモーター」は、実験条件または臨床条件下で組織特異的ではないプロモーターを指す。一部の場合では、ユビキタスプロモーターは、CMV、CAG、UBC、PGK、EF1-アルファ、GAPDH、SV40、HBV、ニワトリベータ-アクチン、およびヒトベータ-アクチンプロモーターのいずれか一つである。

【0053】

一部の実施形態では、プロモーター配列は、表3から選択される。一部の実施形態では、プロモーターは、配列番号3、14、16～17、および25～30と、少なくとも7 10 5%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

【0054】

10

20

30

40

50

## 【表3】

表3

プロモーター	配列番号：
ヒトベーター アクチン (H u B a)	2 5
ニワトリベー ターアクチン (C B A)	2 6
サイトメガロ ウイルス (C M V)	1 6
サイトメガロ ウイルス (C M V) (第二 バージョン)	1 7
C A G プロモ ーター	1 4
ヒトE F 1 - アルファ (E F 1 - $\alpha$ )	2 7
ヒトシナプシ ン 1 (S y n)、ショー トバージョン	2 8
3' 伸長を伴 うヒトシナプ シン 1 (S y n)	3
5' 伸長を伴 うヒトシナプ シン 1 (S y n)	2 9
ヒトC a m K I I a (C a M K I I a)	3 0
e S Y N プロ モーター	6 4

10

20

30

40

## 【0055】

好みしい実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号3と、少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

## 【0056】

プロモーターのさらなる例示的な例は、シミアンウイルス40由来のS V 40後期プロモーター、バキュロウイルス多面体エンハンサー／プロモーター-エレメント、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V t k)、サイトメガロウイルス (C M V)由来の最初期プロモーター、およびL T R エレメントを含む様々なレトロウイルスプロモーターである。多種多様な他のプロモーターが公知であり、当技術分野において一般的に利用可能であり、多くのそのようなプロモーターの配列は、G e n B a n k データベースなどの

50

配列データベースにおいて利用可能である。

### 【0057】

#### 他の調節エレメント

一部の場合では、本開示のベクターは、エンハンサー、イントロン、ポリAシグナル、2Aペプチドコード配列、WPRE（ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント）、およびHPRE（B型肝炎転写後調節エレメント）からなる群から選択される一つまたは複数の調節エレメントをさらに含む。

### 【0058】

一部の実施形態では、ベクターはCMVエンハンサーを含む。

### 【0059】

特定の実施形態では、ベクターは、一つまたは複数のエンハンサーを含む。特定の実施形態では、エンハンサーは、CMVエンハンサー配列、GAPDHエンハンサー配列、-アクチンエンハンサー配列、またはEF1-エンハンサー配列である。前述の配列は、当技術分野において公知である。例えば、CMV最初期（IE）エンハンサーの配列は、以下のとおりである。

```
ACTTACGGTAAATGGCCCCGCCCTGGCTGACCGCCAACGAC
CCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
GTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTG
TATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACG
GTAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT
ATGGGACTTCCACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
ATCGCTATTACCA (配列番号31)
```

### 【0060】

特定の実施形態では、ベクターは、一つまたは複数のイントロンを含む。特定の実施形態では、イントロンは、ウサギグロビンイントロン配列、ニワトリ-アクチンイントロン配列、合成イントロン配列、またはEF1-イントロン配列である。

### 【0061】

特定の実施形態では、ベクターはポリA配列を含む。特定の実施形態では、ポリA配列は、ウサギグロビンポリA配列、ヒト成長ホルモンポリA配列、ウシ成長ホルモンポリA配列、PGKポリA配列、SV40ポリA配列、またはTKポリA配列である。一部の実施形態では、ポリAシグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（bGHpA）であってもよい。

### 【0062】

特定の実施形態では、ベクターは、一つまたは複数の転写物安定化エレメントを含む。特定の実施形態では、転写物安定化エレメントは、WPRE配列、HPRE配列、足場付着領域、3'UTR、または5'UTRである。特定の実施形態では、ベクターは、5'UTRおよび3'UTRの両方を含む。

### 【0063】

一部の実施形態では、ベクターは、表4から選択される5'非翻訳領域（UTR）を含む。一部の実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号32～40のいずれか一つと少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

### 【0064】

10

20

30

40

50

【表4】

表4

5' 非翻訳領域	配列番号:
ヒトベーターアクチ ンエクソン／イント ロン	32
ニワトリベーターアク チンエクソン／イン トロン＋ウサギグロ ビンイントロン	33
5' UTR-Syn 1 Hs	34
CMV IEエクソ ン	35
TPL-eMLP (アデノウイルス由 来エンハンサーエレ メント)	36
ヒトEF1- $\alpha$ イン トロン／エクソン	37
ヒトEF1- $\alpha$ 、イ ントロンA	38
5' UTRヒトCa mKIIa	39
B-グロビンイント ロン	40

10

20

30

40

50

【0065】

一部の実施形態では、ベクターは、表5から選択される3'非翻訳領域を含む。一部の実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号41～49のいずれか一つと少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

【0066】

## 【表5】

表5

3' 非翻訳領域	配列番号 :
W P R E (x) (変異型ウッドチャック肝炎調節エレメントバージョン1)	4 1
W P R E (x) (変異型ウッドチャック肝炎調節エレメントバージョン2)	4 2
W P R E (x) (変異型ウッドチャック肝炎調節エレメントバージョン3)	4 3
C A A X	4 4
E E S	4 5
H P R E	4 6
R 2 V 1 7 (H e p B由来エンハンサーエレメント)	4 7
3' U T R (グロビン)	4 8
W P R E (r)	4 9

10

20

30

40

50

## 【0067】

一部の実施形態では、ベクターは、表6から選択されるポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む。一部の実施形態では、ポリAシグナルは、配列番号50～54のいずれか一つと少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

## 【0068】

表6

ポリアデニル化部位	配列番号 :
ウサギグロビン(p A G l o b i n-O c)	5 0
ウシ成長ホルモン(p A G H-B t -バージョン1)	5 1
ウシ成長ホルモン(p A G H-B t -バージョン2)	5 2
ウシ成長ホルモン(p A G H-B t -バージョン3)	5 3
ヒト成長ホルモン(p A G H-H s)	5 4

【0069】

例示的ベクターゲノムは、配列番号55～58または65～68として提供される図2～5に示される。一部の実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号55～58または65～68のいずれか一つと少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一性を共有するポリヌクレオチド配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなり、場合により、小文字のITR配列を伴うまたは伴わない。コード配列は下線付きである。代替ベクターゲノム配列は、配列番号65～68として提供される。

V1 - ベクターゲノム - 3 , 144 bp (図2) (配列番号55)

```

c c t g c a g g c a g c t g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c g c
c c g g g c a a a g c c c g g g c g t c g g g c g a c c t t g g t c g c c c g
g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c g c a g a g a g g g a g t g g c c a
a c t c c a t c a c t a g g g g t t c c t G C G G C A A T T C A G T C G A T A A
C T A T A A C G G T C C T A A G G T A G C G A T T T A A A T A C G C G C T C T C
T T A A G G T A G C C C C G G G A C G C G T C A A T T G A C T A C A A A C C G A
G T A T C T G C A G A G G G C C C T G C G T A T G A G T G C A A G T G G G T T T
T A G G A C C A G G A T G A G G C G G G G T G G G G G T G C C T A C C T G A C G
A C C G A C C C C G A C C C A C T T G G A C A A G C A C C C A A C C C C C A T T C
C C C A A A T T G C G C A T C C C C T A T C A G A G A G G G G G A G G G G A A A
C A G G A T G C G G C G A G G G C G C G T G C G C A C T G C C A G C T T C A G C A
C C G C G G A C A G T G C C T T C G C C C C G C C T G G C G G C G C G C G C C
A C C G C C G C C T C A G C A C T G A A G G G C G C G C T G A C G T C A C T C G C
C G G T C C C C C G C A A A C T C C C C T T C C C G G C C A C C T T G G T C G C
G T C C G C G C C G C C G C C A G C C G G A C C G C A C C A C G C G A
G G C G C G A G A T A G G G G G G C A C G G G C G C G A C C A T C T G C G C T G
C G G C G C C G G C G A C T C A G C G C T G C C T C A G T C T G C G G T G G G C
A G C G G A G G A G T C G T G C G C C T G A G A G C G C A G A T G G G C A
A G G A G A A G A C C C A C A T C A A C A T C G T G G T C A T C G G C C A C G T
G G A C T C C G G A A A G T C C A C C A C C A C G G G C C A C C T C A T C T A C
A A A T G C G G G A G G T A T T G A C A A A A G G A C C A T T G A G A A G T T C G
A G A A G G A G G G C G G C T G A G A G T G G G G A A G G G A T C C T T C A A G T A
T G C C T G G G T G C T G G A C A A G C T G A A G G G C G G G A G C G T G A G C G C
G G C A T C A C C A T C G A C A T C T C C C T C T G G A A G T T C G A G A C C A
C C A A G T A C T A C A T C A C C A T C A T C G A T G C C C C C G G C C A C C G
C G A C T T C A T C A A G A A C A T G A T C A C G G G T A C A T C C C A G G C G
G A C T G C G C A G T G C T G A T C G T G G C G G G C G G G C G T G G G C G A G T
T C G A G G G C G G G C A T C T C C A A G A A T T G G A C T C C A C A G A G G C C G G G A G G C A
T G C C C T G C T G G C C T A C A C G C T G G G T G T G A A G C A G C T C A T C
G T G G G C G T G A A C A A A A T T G G A C T C C A C A G A G G C C G G C C T A C A
G C G A G A A G C G C T A C G A C G A G A T C G T C A A G G A A G T C A G C G C
C T A C A T C A A G A A G A T C G G C T A C A A C C C G G C C A C C G T G C C C
T T T G T G C C C A T C T C C G G C T G G C A C G G T G A C A A C A T G C T G G
A G C C C T C C C C C A A C A T G C C G T G G T T C A A G G G C T G G A A G G T
G G A G C G T A A G G A G G G C A A C G C A A G C G G G C G T G T C C C T G C T G
G A G G C C C T G G A C A C C A T C C C T G C C C C C C A C G C G C C C A C G G
A C A A G C C C C T G C G C C T G C C G C T G C A G G A C G T G T A C A A G A T
T G G C G G C A T T G G C A C G G T G C C C G T G G G C C G G G T G G A G A C C
G G C A T C C T G C G G C C G G G C A T G G T G G T G A C C T T T G C G C C A G
T G A A C A T C A C C A C T G A G G G T G A A G T C A G T G G A G A T G C A C C A
C G A G G C T C T G A G C G A A G C T C T G C C C G G C A C A C G T C G G G C

```

10

20

30

40

50

T T C A A T G T G A A G A A C G T G T C G G T G A A G G A C A T C C G G C G G G  
 G C A A C G T G T G T G G G G A C A G C A A G T C T G A C C C G C C G C A G G A  
 G G C T G C T C A G T T C A C C T C C C A G G T C A T C A T C C C T G A A C C A C  
 C C G G G G C A G A T T A G C G C C G G C T A C T C C C C G G T C A T C G A C T  
 G C C A C A C A G C C C A C A T C G C C T G C A A G T T T G C G G A G G C T G A A  
 G G A G A A G A T T G A C C G G C G C T C T G G C A A G A A G G C T G G A G G A C  
 A A C C C C A A G T C C C T G A A G T C T G G A G A C G C G G C C A T C G T G G  
 A G A T G G T G C C G G G A A A G C C C A T G T G T G T G G A G A G C T T C T C  
 C C A G T A C C C G C C T C T C G G C C G C T T C G C C G T G C G C G A C A T G  
 A G G C A G A C G G T G G C C G T A G G C G T C A T C A A G A A C G T G G A G A  
 A G A A G A G G C G G C G G C G C C G G C A A G G T C A C C A A G T C G G C G C A  
 G A A G G C G C A G A A G G C G G G C A A G T G A A A T C A A C C T C T G G A T  
 T A C A A A A T T T G T G A A A G A T T G A C T G G T A T T C T T A A C T A T G  
 T T G C T C C T T T A C G C T A T G T G G A T A C G C T G C T T T A A T G C C  
 T T T G T A T C A T G C T A T T G C T T C C C G T A T G G C T T T C A T T T C  
 T C C T C C T T G T A T A A A T C C T G G T T G C T G T C T C T T T A T G A G G  
 A G T T G T G G C C C G T T G T C A G G C A A C C C C A C T G G T T G G G G C A T T G C C  
 T G T G T T T G C T G A C G C A A C C C C A C T G G T T G G G G C A T T G C C  
 A C C A C C T G T C A G C T C C T T C C G G G A C T T T C G C T T T C C C C C  
 T C C C T A T T G C C A C G G C G G A A C T C A T C G C C G C C T G C C T T G C  
 C C G C T G C T G G A C A G G G G C T C G G C T G T T G G G C A C T G A C A A T  
 T C C G T G G T G T T G T C G G G G A A A T C A T C G T C C T T C C T T G G C  
 T G C T C G C C T G T G T T G C C A C C T G G A T T C T G C G C G G G A C G T C  
 C T T C T G C T A C G T C C C T T C G G C C C T C A A T C C A G C G G A C C T T  
 C C T T C C C G C G G C C T G C T G C C G G C T C T G C G G C C T C T T C C G C  
 G T C T T C G C C T T C G C C C T C A G A C G A G T C G G A T C T C C C T T T G  
 G G C C G C C T C C C C G C C T G T G C C T T C T A G T T G C C A G C C A T C T  
 G T T G T T T G C C C C T C C C C C G T G C C T T C C T T G A C C C T G G A A G  
 G T G C C A C T C C C A C T G T C C T T C C T A A T A A A A T G A G G A A A T  
 T G C A T C G C A T T G T C T G A G T A G G T G T C A T T C T A T T C T G G G G  
 G G T G G G G T G G G G C A G G A C A G C A A G G G G G A G G A T T G G G A A G  
 A C A A T A G C A G G C A T G C T G G G G A T G C G G G T G G G C T C T A T G G C  
 T T C T G A G G C G G A A A G A A C C A G A T C C C T C T C T T A A G G T A G C A  
 T C G A G A T T A A A T T A G G G A T A A C A G G G T A A T G G C G C G G G C  
 C G C a g g a a c c c c t a g t g a t g g a g t t g g c c a c t c c c t c t c t  
 g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c g g g c g a c c a a a g g t c  
 g c c c g a c g c c c g g g c t t g c c c g g g c g g c c t c a g t g a g c g  
 a g c g a g c g c g c a g c t g c c t g c a g g

V 2 - ベクターゲノム - 3 , 0 3 5 b p ( 図 3 ) ( 配列番号 5 6 )

g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c c g c c c g g g c a a a g c c c  
 g g g c g t c g g g c g a c c t t t g g t c g c c c g g c c t c a g t g a g c g  
 a g c g a g c g c g c a g a g a g g g a g t g g c c a a c t c c a t c a c t a g  
 g g g t t c c t t g t a g t t a a t g a t t a a c c c g c c a t g c t a c t t a  
 t c t a c g t a A G T G C A A G T G G G T T T A G G A C C A G G A T G A G G C  
 G G G G T G G G G G T G C C T A C C T G A C G A C C G A C C C C G A C C C A C T  
 G G A C A A G C A C C C A A C C C C C A T T C C C C A A A T T G C G C A T C C C  
 C T A T C A G A G A G G G G G A G G G G A A A C A G G A T G C G G C G A G G C G  
 C G T G C G C A C T G C C A G C T T C A G C A C C G C G G A C A G T G C C T T C  
 G C C C C C G C C T G G C G G C G C G C C A C C G C C G C C T C A G C A C T  
 G A A G G C G C G C T G A C G T C A C T C G C C G G T C C C C C G C A A A C T C 40  
 50

C C C T T C C C G G C C A C C T T G G T C G C G T C C G C G C C G C C G G  
 C C C A G C C G G A C C G C A C C A C G C G A G G G C G C G A G A T A G G G G G G  
 C A C G G G C G C G A C C A T C T G C G C T G C G G C G C C G G C G A C T C A G  
 C G C T G C C T C A G T C T G C G G T G G G C A G C G G A G G A G T C G T G T C  
 G T G C C T G A G A G C G C A G G C C A C C A T G G G C A A G G A G A A G A C C  
C A C A T C A A C A C A T C G T G G T C A T C G G C C A C G T G G A C T C C G G A A  
 A G T C C A C C A C C A C G G G C C A C C T C A T C T A C A A A T G C G G A G G  
 T A T T G A C A A A A G G A C C A T T G A G A A G T T C G A G A A G G A G G G C G  
 G C T G A G A T G G G A A G G A T C C T T C A A G T A T G C C T G G G T G C  
 T G G A C A A G C T G A A G G C G G A G C G T G A G C G C G G C A T C A C C A T  
 C G A C A T C T C C C T C T G G A A G T T C G A G A C C A C C A A G T A C T A C  
 A T C A C C A T C A T C G A T G C C C C C G G C C A C C G C G A C T T C A T C A  
 A G A A C A T G A T C A C G G G T A C A T C C C A G G C G G A C T G C G C A G T  
 G C T G A T C G T G G C G G C G G C G T G G G C G A G T T C G A G G G C G G G C  
 A T C T C C A A G A A T G G G C A G A C G C G G G A G G C A T G C C C T G C T G G  
 C C T A C A C G C T G G G T G T G A A G G A C G T C A T C G T G G G C G T G A A  
 C A A A A T G G A C T C C A C A G A G C C G G C C T A C A G C G A G A A G C G C  
 T A C G A C G A G A T C G T C A A G G A A G T C A G C G C C T A C A T C A A G A  
 A G A T C G G G C T A C A A C C C G G C C A C C G T G C C C T T T G T G C C C A T  
 C T C C G G G C T G G C A C C G G T G A C A A C A T G C T G G A G C C C T C C C C  
 A A C A T G C C G T G G T T C A A G G G C T G G A A G G T G G A G C G G T A A G G  
 A G G G C A A C G C A A G C G G G C G T G C C C T G C T G G A G G G C C C T G G A  
 C A C C A T C C T G C C C C C C A C G C G C C C C A C G G A C A A G C C C C T G  
 C G C C T G C C G C T G C A G G A C G T G T A C A A G A T T G G C G G C A T T G  
 G C A C G G T G C C C G T G G G C C G G G T G G A G A C C G G C A T C C T G C G  
 G C C G G G C A T G G T G G T G A C C T T G C G C C A G T G A A C A T C A C C  
 A C T G A G G G T G A A G T C A G T G G A G A T G C A C C A C G G A G G G C T C T G A  
 G C G A A G G C T C T G C C C G G G C A C A A C G T C G G G C T T C A A T G T G A A  
 G A A C G T G T C G G T G A A G G A C A T C C G G C G G G G C A A C G T G T G T  
 G G G G A C A G C A A G T C T G A C C C G C C G C A G G G A G G G C T G C T C A G T  
 T C A C C T C C C A G G T C A T C A T C C T G A A A C C A C C C G G G G C A G A T  
 T A G C G C C G G C T A C T C C C C G G T C A T C G A C T G C C A C A C A G G C C  
 C A C A T C G C C T G C A A G T T T G C G G G A G C T G A A G G A G A A G A T T G  
 A C C G G G C G C T G G C A A G A A G G C T G G A G G A C A A C C C A A G T C  
 C C T G A A G T C T G G A G A C G C G G G C A T C G T G G A G A G C T T C T C C A G T A C C C G C  
 G G A A A G G C C C A T G T G T G T G G A G A G G C T T C T C C A G T A C C C G C  
 C T C T C G G C C G C T T C G C C G T G C G C G A C A T G A G G G C A G A C G G T  
 G G C C G T A G G C G T C A T C A A G A A C G T G G A G A A G A A G G A G C G G G C  
 G G C G C C G G C A A G G T C A C C A A G T C G G C G C A G A A G G G C G C A G A  
A G G C G G G C A A G T G A T C A A C C T C T G G A T T A C A A A A T T T G T G  
 A A A G A T T G A C T G G T A T T C T T A A C T A T G T T G C T C C T T T A C  
 G C T A T G T G G A T A C G C T G C T T T A A T G C C T T T G T A T C A T G C T  
 A T T G C T T C C C G T A T G G C T T T C A T T T C T C C C T T G T A T A  
 A A T C C T G G T T G C T G T C T C T T T A T G A G G G A G T T G T G G C C C G T  
 T G T C A G G C A A C G T G G C G T G G G T G C A C T G T G T T T G C T G A C  
 G C A A C C C C C A C T G G T T G G G G C A T T G C C A C C A C C T G T C A G C  
 T C C T T T C C G G G A C T T T C G C T T T C C C C C T C C C T A T T G C C A C  
 G G C G G A A C T C A T C G C C G C C T G C C T T G C C C G C T G C T G G A C A  
 G G G G C T C G G C T G T T G G G C A C T G A C A A T T C C G T G G G T T T G T  
 C G G G G A A A T C A T C G T C C T T C C T T G G C T G C T C G C C T G T G T 50

T G C C A C C T G G A T T C T G C G C G G G A C G T C C T T C T G C T A C G T C  
 C C T T C G G C C C T C A A T C C A G C G G A C C T T C C T T C C G G C C T C G G C C  
 T G C T G C C G G C T C T G C G G C C T C T T C C G C G T C T T C G C C T T C G  
 C C C T C A G A C G A G T C G G A T C T C C C T T G G G C C G C C T C C C C G  
 C A C T G C C C G G G T G G C A T C C C T G T G A C C C C T C C C C A G T G C C  
 T C T C C T G G C C C T G G A A G T T G C C A C T C C A G T G C C C A C C A G C  
 C T T G T C C T A A T A A A A T T A A G T T G C A T C A T T T G T C T G A C T  
 A G G T G T C C T T C T A T A A T T A T G G G G T G G A G G G G G G G G T G G T  
 A T G G A G C A A G G G G C C C A A G T T G G G A A G A A A C C T G T A G G G C  
 C T G C G T T A C C C A G G C T G G A G T G C A G T G G C A C A T T T C T G C T 10  
 C A C T G C A A C C T C C C T C C C T G G G T T C t a c g t a g a t a a g t  
 a g c a t g g c g g g t t a a t c a t t a a c t a c a a g g a a c c c c t a g t  
 g a t g g a g t t g g c c a c t c c c t c t g c g c g c t c g c t c g c t c  
 a c t g a g g c c g g g c g a c c a a a g g t c g c c c g a c g c c c g g g c t  
 t t g c c c g g g c g g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g g c g c  
 V 3 - ベクターゲノム - 3 , 2 6 3 b p ( 図 4 ) ( 配列番号 57 )  
 g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g g c c g c c c g g g c a a a g c c c  
 g g g c g t c g g g c g a c c t t t g g t c g c c c g g c c t c a g t g a g c g  
 a g c g a g c g c g c a g a g a g g g a g t g g c c a a c t c c a t c a c t a g  
 g g g t t c c t t g t a g t t a a t g a t t a a c c c g c c a t g c t a c t t a 20  
 t c t a c g t a A G T G C A A G T G G G T T T A G G A C C A G G A T G A G G C  
 G G G G T G G G G T G C C T A C C T G A C G A C C G A C C C G A C C C A C T  
 G G A C A A G C A C C C A A C C C C A T T C C C C A A A T T G C G C A T C C C  
 C T A T C A G A G A G G G G G A G G G A A A C A G G A T G C G G C G A G G C G  
 C G T G C G C A C T G C C A G C T T C A G C A C C G C G G A C A G T G C C T T C  
 G C C C C C G C C T G G C G G C G C G C A C C G C C G C C T C A G C A C T  
 G A A G G C G C G C T G A C G T C A C T C G C C G G T C C C C C G C A A A C T C  
 C C C T T C C C G G C C A C C T T G G T C G C G T C C G C G C C G C C G C G G  
 C C C A G C C G G A C C G C A C C A C G C G A G G C G G C G A G A T A G G G G G  
 C A C G G G C G C G A C C A T C T G C G C T G C G G C G C G A C T C A G 30  
 C G C T G C C T C A G T C T G C G G T G G G C A G C G G A G G A G T C G T G T C  
 G T G C C T G A G A G C G C A G A G T C T G C G G T G G G C A G C G G A G G A G  
 T C G T G T C G T G C C T G A G A G C G C A G C T G T G C T C C T G G G C A C C  
 G C G C A G T C C G C C C C G C G G C T C C T G G C C A G A C C A C C C C T A  
 G G A C C C C C T G C C C C A A G T C G C A G C C A C C A T G G G C A A G G A G  
 A A G A C C C A C A T C A A C A T C G T G G T C A T C G G C C A C G T G G A C T  
 C C G G A A A G T C C A C C A C C A C G G G C C A C C T C A T C A C A A A T G  
 C G G A G G T A T T G A C A A A A G G A C C A T T G A G A A G T T C G A G A A G  
 G A G G C G G G C T G A G A T G G G G A A G G G A T C C T T C A A G T A T G C C T  
 G G G T G C T G G A C A A G C T G A A G G C G G G C G C G T G A G C G G G C A T 40  
 C A C C A T C G A C A T C T C C C T C T G G A A G T T C G A G A C C A C C A A G  
 T A C T A C A T C A C C A T C A T C G A T G C C C C C G C C A C C G C G A C T  
 T C A T C A A G A A C A T G A T C A C G G G T A C A T C C C A G G C G G A C T G  
 C G C A G T G C T G A T C G T G G C G G G G G C G T G G G C G A G T T C G A G  
 G C G G G C A T C T C C A A G A A T G G G C A G A C G C G G G A G C A T G C C C  
 T G C T G G C C T A C A C G C T G G G T G T G A A G C A G C T C A T C G T G G G  
 C G T G A A C A A A A T G G A C T C C A C A G A G C C G G C C T A C A G C G A G  
 A A G C G C T A C G A C G A G A T C G T C A A G G A A G T C A G C G C C T A C A  
 T C A A G A A G A T C G G C T A C A A C C C G G C C A C C G T G C C C T T T G T  
 G C C C A T C T C C G G C T G G C A C G G T G A C A A C A T G C T G G A G C C C 50

T C C C C C C A A C A T G C C G T G G T T C A A G G G C T G G A A G G T G G A G C  
 G T A A G G A G G G C A A C G C A A G C G G C G T G T C C C T G C T G G A G G C  
 C C T G G A C A C C A T C C T G C C C C C C A C G C G C C C A C G G A C A A G  
 C C C C T G C G C C T G C C G C T G C A G G A C G T G T A C A A G A T T G G C G  
 G C A T T G G C A C G G T G C C C G T G G G C C G G G T G G A G A C C G G C A T  
 C C T G C G G C C G G G C A T G G T G G G T G A C C T T T G C G C C A G T G A A C  
 A T C A C C A C T G A G G T G A A G T C A G T G G A G A T G C A C C A C G A G G  
 C T C T G A G G C G A A G C T C T G C C C G G C G A C A A C G T C G G C T T C A A  
 T G T G A A G A A C G T G T C G G T G A A G G A C A T C C G G C G G G G C A A C  
 G T G T G T G G G G A C A G C A A G T C T G A C C C G C C G A G G A G G G C T G  
 C T C A G T T C A C C T C C C A G G T C A T C A T C C T G A A C C A C C C G G G  
 G C A G A T T A G C G C C G G C T A C T C C C C G G T C A T C G A C T G C C A C  
 A C A G C C C A C A T C G C C T G C A A G T T T G C G G A G C T G A A G G A G A  
 A G A T T G A C C G G C G C T T G G C A A G A A G C T G G A G G A C A A C C C  
 C A A G T C C C T G A A G T C T G G A G A C G C G G C C A T C G T G G A G A T G  
 G T G C C G G G A A A G C C C A T G T G T G T G G A G A G C T T T C T C C A G T  
 A C C C G C C T C T C G G C C G C T T C G C C G T G C G C G A C A T G A G G C A  
 G A C G G T G G C C G T A G G C G T C A T C A A G A A C G T G G A G A A G A A G  
 A G C G G C G G C C G G C A A G G T C A C C A A G T C G G C G C A G A A G G  
 C G C A G A A G G C G G G C A A G T G A T C A A C C T C T G G A T T A C A A A A  
 T T T G T G A A A G A T T G A C T G G T A T T C T T A A C T A T G T T G C T C C  
 T T T T A C G C T A T G T G G A T A C G C T G C T T T A A T G C C T T T G T A T  
 C A T G C T A T T G C T T C C C G T A T G G C T T T C A T T T T C T C C T C C T  
 T G T A T A A A T C C T G G T T G C T G T C T C T T T A T G A G G A G T T G T G  
 G C C C G T T G T C A G G C A A C G T G G C G T G G T G C A C T G T G T T  
 G C T G A C G C A A C C C C C A C T G G T T G G G G C A T T G C C A C C A C C T  
 G T C A G C T C C T T T C C G G G A C T T T C G C T T T C C C C C T C C C T A T  
 T G C C A C G G C G G A A C T C A T C G C C G C C T G C C T T G C C C G C T G C  
 T G G A C A G G G G C T C G G C T G T T G G G C A C T G A C A A T T C C G T G G  
 T G T T G T C G G G G A A A T C A T C G T C C T T C C T T G G C T G C T C G C  
 C T G T G T T G C C A C C T G G A T T C T G C G C G G G A C G T C C T T C T G C  
 T A C G T C C C T T C G G C C C T C A A T C C A G C G G A C C T T C C T T C C C  
 G C G G C C T G C T G C C G G C T C T G C G G C C T C T T C C G C G T C T T C G  
 C C T T C G C C C T C A G A C G A G T C G G A T C T C C C C T T T G G G C C G C C  
 T C C C C G C A G C T G G A G G C C T C G G T A G G C G T T C C T C C T G C C C G  
 C T G G G G C C T C C C A A C G G G C C C T C C T C C C C T C C T G C A C C G G  
 C C C T T C C T G G T C T T G A A A T A A A T T C A T T G C C T G C C C G G G T  
 G G C A T C C C T G T G A C C C C T C C C C A G T G C C T C T C C T G G C C C T  
 G G A A G T T G C C A C T C C A G T G C C C A C C A G C C T T G T C C T A A T A  
 A A A T T A A G T T G C A T C A T T T G T C T G A C T A G G T G T C C T T C T  
 A T A A T A T T A T G G G G T G G A G G G G G G T G G T A T G G A G C A A G G G  
 G C C C A A G T T G G G A A G A A A C C T G T A G G G G C T G C G T T A C C C A  
 G G C T G G A G T G C A G T G G C A C A T T T C T G C T C A C T G C A A C C T C  
 C T C C C T C C C T G G G T T C t a c g t a g a t a a g t a g c a t g g c g g g t  
 t a a t c a t t a a c t a c a a g g a a c c c c t a g t g a t g g a g t t g g c  
 c a c t c c c t c t g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c g g g  
 c g a c c a a a g g t c g c c c g a c g c c c g g g c t t g c c c g g g c g g  
 c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c g c  
 V 4 - ベクターゲノム - 4 , 299 b p (図5) (配列番号58)  
 g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c c g c c c g g g c a a a g c c c

10

20

30

40

50

g g g c g t c g g g c g a c c t t g g t c g c c c g g c c t c a g t g a g c g  
 a g c g a g c g c g c a g a g a g g g a g t g g c c a a c t c c a t c a c t a g  
 g g g t t c c t t g t a g t t a a t g a t t a a c c c g c c a t g c t a c t t a  
 t c t a c g t a C T C T G G A G A C G C G T T A C A T A A C T T A C G G T A A A  
 T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A A C G A C C C C G C C C A T T G  
 A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C C A T A G T A A C G C C A A T A G  
 G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G G T G G A G T A T T T A C G G T A  
 A A C T G C C C A C T T G G C A G T A C A T C A A G T G T A T C A T A T G C C A  
 A G T A C G C C C C C T A T T G A C G T C A A T G A C G G T A A A T G G C C C G  
 C C T G G C A T T A T G C C C A G T A C A T G A C C T T A T G G G A C T T T C C 10  
 T A C T T G G G C A G T A C A T C T A C G T A T T A G T C A T C G C T A T T A C C  
 A T G G T C G A G G T G A G G C C C C A C G T T C T G C T T C A C T C T C C C C A  
 T C T C C C C C C C C T C C C C A C C C C C A A T T T G T A T T T A T T T A T  
 T T T T A A T T A T T T G T G C A G C G A T G G G G G G G G G G G G G G G G G G  
 G G G G C G C G G C C A G  
 G G C G G G G G C G A G G G C G G A G A G G T G C G G C G G C A G C C A A T C A G A  
 G C G G G C G G C T C C G A A A G T T T C C T T T A T G G C G A G G G C G G C G  
 G C G G G C G G C G C C C T A T A A A A A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G  
 G G A G T C G C T G C G C G C T G C C T T C G C C C C G T G C C C C G C T C C G  
 C C G C C G C C T C G C G C C G C C C G G C T C T G A C T G A C C C G C 20  
 G T T A C T C C C A C A G G T G A G C G G G C G G G A C G G C C C T T C T C C T  
 C C G G G C T G T A A T T A G C G C T T G G T T T A A T G A C G G C T T G T T T  
 C T T T C T G T G G C T G C G T G A A A G C C T T G A G G G G C T C C G G G A  
 G G G C C C T T T G T G C G G G G G G A G C G G C G C T C G G G G G G T G C G T G C  
 G T G T G T G T G C G T G G G G A G C G C C G C G T G C G G C T C C G C G  
 T G C C C G G C G G C T G T G A G C G C T G C G G G C G C G C G C G G G C T  
 T T G T G C G C T C C G C A G T G T G C G C G A G G G G A G C G C G C G G C C G G G  
 G G C G G T G C C C C G C G G T G C G G G G G G G C T G C G A G G G G A A C A  
 A A G G C T G C G T G C G G G G T G T G C G T G G G G G G G T G A G C A G G  
 G G G T G T G G G C G C G T C G G T C G G G C T G C A A C C C C C C T G C A C 30  
 C C C C C T C C C C G A G T T G C T G A G C A C G G C C C G G C T T C G G G T G  
 C G G G G C T C C G T A C G G G G G C G T G G C G C G G G C T C G C C G T G C C  
 G G G C G G G G G G T G G G C G G C A G G T G G G G G T G C C G G G C G G G G C G  
 G G G C C G C C T C G G G C C G G G A G G G G C T C G G G G G A G G G G C G C G  
 G C G G C C C C C G G A G C G C C G G C G G C T G T C G A G G G C G C G G C G A G  
 C C G C A G C C A T T G C C T T T A T G G T A A T C G T G C G A G A G G G C G  
 C A G G G A C T T C C T T T G T C C C A A A T C T G T G C G G A G C C G A A A T  
 C T G G G A G G C G C C G C C G C A C C C C C T C T A G C G G G C G C G G G C  
 G A A G C G G T G C G G C G C C G G C A G G A A G G A A T G G G C G G G G A G  
 G G C C T T C G T G C G T C G C C G C G C G C G C G C G C G C G C G C G C G C G 40  
 T C C A G C C T C G G G G C T G T C C G C G G G G G A C G G C T G C C T T C G  
 G G G G G A C G G G G C A G G G C G G G G T T C G G C T T C T G G C G T G T G  
 A C C G G C G G C T C T A G A G C C T C T G C T A A C C A T G T T C A T G C C T  
 T C T T C T T T T C C T A C A G C G C C A C C A T G G G C A A G G A G A A G A  
C C C A C A T C A A C A T C G T G G T C A T C G G C C A C G T G G A C T C C G G  
A A A G T C C A C C A C C A C G G G C C A C C T C A T C T A C A A A T G C G G A  
G G T A T T G A C A A A A G G A C C A T T G A G A A G T T C G A G A A G G A G G  
C G G C T G A G A T G G G G A A G G G A T C C T T C A A G T A T G C C T G G G T  
G C T G G A C A A G G C T G A A G G G C G G A G C G T G A G C G C G G C A T C A C C  
A T C G A C A T C T C C C T C T G G A A G T T C G A G A C C A C C A A G T A C T 50

A C A T C A C C A T C A T C G A T G C C C C C G G C C A C C G C G A C T T C A T  
 C A A G A A C A T G A T C A C G G G T A C A T C C C A G G C G G A C T G C G C A  
 G T G C T G A T C G T G G G G G G G G G T G G G G G A G T T C G A G G G G G  
 G C A T C T C C A A G A A T G G G C A G A C G C G G G A G C A T G C C C T G C T  
 G G C C T A C A C G C T G G G T G T G A A G C A G C A G C T C A T C G T G G G C G T G  
 A A C A A A A T G G A C T C C A C A G A G G C C G G C T A C A G C G A G A A G C  
 G C T A C G A C G A G A T C G T C A A G G A A G T C A G C G C C T A C A T C A A  
 G A A G A T C G G C T A C A A C C C G G C C A C C G T G C C C T T T G T G C C C  
 A T C T C C G G C T G G C A C G G T G A C A A C A T G C T G G A G G C C C T C C C  
 C C A A C A T G C C G T G G T T C A A G G G C T G G A A G G T G G A G G C G T A A  
 G G A G G G C A A C G C A A G C G G G C G T G T C C C T G C T G G A G G G C C C T G  
 G A C A C C A T C C T G C C C C C C A C G C G C C C A C G G A C A A G C C C C  
 T G C G C C T G C C G C T G C A G G A C G T G T A C A A G A T T G G C G G C A T  
 T G G C A C G G T G C C C G T G G G C C G G G T G G A G A C C G G C A T C C T G  
 C G G C C G G G C A T G G T G G T G A C C T T T G C G C C A G T G A A C A T C A  
 C C A C T G A G G T G A A G T C A G T G G A G A T G C A C C A C G A G G C T C T  
 G A G C G A A G C T C T G C C C G G C G A C A A C G T C G G C T T C A A T G T G  
 A A G A A C G T G T C G G T G A A G G A C A T C C G G C G G G C A A C G T G T  
 G T G G G G A C A G C A A G T C T G A C C C G C C G A G G A G G C T G C T C A  
 G T T C A C C T C C C A G G T C A T C A T C C T G A A C C A C C C G G G G C A G  
 A T T A G C G C C G G C T A C T C C C C G G T C A T C G A C T G C C A C A C A G  
 C C C A C A T C G C C T G C A A G T T T G C G G A G C T G A A G G A G A A G A T  
 T G A C C G G G C G C T C T G G C A A A G A A G C T G G A G G A C A A C C C C A A G  
 T C C C T G A A G T C T G G A G A C G C G G C C A T C G T G G A G A T G G T G C  
 C G G G A A A G C C C A T G T G T G T G G A G A G C T T C T C C C A G T A C C C  
 G C C T C T C G G C C G C T T C G C C G T G C G C G A C A T G A G G C A G A C G  
 G T G G C C G T A G G G C G T C A T C A A G A A C G T G G A G A A G A A G A G C G  
 G C G G C G C C G G C A A G G T C A C C A A G T C G G G G C A G A A G G C G C A  
 G A A G G C G G G C A A G T G A T C A A C C T C T G G A T T A C A A A A T T T G  
 T G A A A G A T T G A C T G G T A T T C T T A A C T A T G T G C T C C T T T T  
 A C G C T A T G T G G A T A C G C T G C T T T A A T G C C T T T G T A T C A T G  
 C T A T T G C T T C C C G T A T G G C T T T C A T T T C T C C T C C T T G T A  
 T A A A T C C T G G T T G C T G T C T C T T A T G A G G A G T T G T G G C C C  
 G T T G T C A G G C A A C G T G G C G T G G T G T G C A C T G T G T T G C T G  
 A C G C A A C C C C C A C T G G T T G G G G C A T T G C C A C C A C C T G T C A  
 G C T C C T T C C G G G A C T T C G C T T T C C C C C T C C C T A T T G C C  
 A C G G G C G G A A C T C A T C G C C G C C T G C C T T G C C C G C T G C T G G A  
 C A G G G G C T C G G C T G T T G G G C A C T G A C A A T T C C G T G G T G T T  
 G T C G G G G A A A T C A T C G T C C T T C C T T G G C T G C T C G C C T G T  
 G T T G C C A C C T G G A T T C T G C G G G G A C G T C C T T C T G C T A C G  
 T C C C T T C G G C C C T C A A T C C A G C G G G A C C T T C C T T C C G C G G  
 C C T G C T G C C G G C T C T G C G G G C C T C T C C G G T C T T C G C C T T  
 C G C C C T C A G A C G A G T C G G A T C T C C C T T G G G C C G C C T C C C  
 C G C A G C T G G A G G C C T C G G T A G G C G T T C C T C C T G C C C G C T G G  
 G C C T C C C A A C G G G G C C T C C T C C C C T C C T G C A C C G G C C C T  
 T C C T G G T C T T T G A A T A A A T T C A T T G C C T G C C C G G G T G G C A  
 T C C C T G T G A C C C C T C C C C A G T G C C T C T C C T G G C C C T G G A A  
 G T T G C C A C T C C A G T G C C C A C C A G C C T T G T C C T A A T A A A A T  
 T A A G T T G C A T C A T T T G T C T G A C T A G G T G T C C T T C T A T A A A  
 T A T T A T G G G G T G G A G G G G G G T G G T A T G G A G G C A A G G G G C C C

10

20

30

40

50

A A G T T G G G A A G A A A C C T G T A G G G C C T G C G T T A C C C A G G C T  
 G G A G T G C A G T G G C A C A T T T C T G C T C A C T G C A A C C T C C T C C  
 T C C C T G G G T T C t a c g t a g a t a a g t a g c a t g g c g g g t t a a t  
 c a t t a a c t a c a a g g a a c c c c t a g t g a t g g a g t t g g c c a c t  
 c c c t c t c t g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c g g g c g a c  
 c a a a g g t c g c c c g a c g c c c g g g c t t t g c c c g g g c g g c c t c  
 a g t g a g c g a g c g a g c g c g c

**【0070】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、HuBAプロモーター、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( x 10 )、およびp A グロビン - O c を含む。

**【0071】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、CMVプロモーター、T P L - e M L P エンハンサー、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( r )、およびp A グロビン - O c を含む。

**【0072】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、Synプロモーター、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( r )、3' UTR ( グロビン )、およびp A G H - B t を含む。

**【0073】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、CBAプロモーター、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、およびp A G H - B t を含む。

**【0074】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、EF1プロモーター、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、およびp A グロビン - O c を含む。

**【0075】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、HuBAプロモーター、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、R 2 V 1 7、30 およびp A G H - B t を含む。

**【0076】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、Synプロモーター、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( x )、3' UTR ( グロビン )、およびp A G H - H s を含む。

**【0077】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、CaMKIIaプロモーター、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( r )、およびp A G H - H s を含む。

**【0078】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、CMVプロモーター、T P L - e M L P エンハンサー、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E ( r )、およびp A G H - H s を含む。

**【0079】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、HuBAプロモーター、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、およびp A G H - H s を含む。

**【0080】**

一実施形態では、発現力セットは、5'から3'の順序で、CMVプロモーター、T P L / e M L P エンハンサー、e E F 1 A 2またはその機能的バリアントをコードするポリヌ

20

40

50

クレオチド配列、R 2 V 1 7、3' U T R (グロビン)、およびp A G H - B t を含む。

【0 0 8 1】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、E F 1 プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E (r )、およびp A G H - B t を含む。

【0 0 8 2】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、S y n プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、R 2 V 1 7、およびp A グロビン - O c を含む。

【0 0 8 3】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、C a M K I I a プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、R 2 V 1 7、およびp A グロビン - O c を含む。

【0 0 8 4】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、C B A プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E (x )、3' U T R (グロビン)、およびp A G H - H s を含む。

【0 0 8 5】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、C B A プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、3' U T R (グロビン)、およびp A グロビン - O c を含む。

【0 0 8 6】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、C a M K I I a プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、R 2 V 1 7、およびp A G H - B t を含む。

【0 0 8 7】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、E F 1 プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、R 2 V 1 7、3' U T R (グロビン)、およびp A G H - H s を含む。

【0 0 8 8】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、C M V プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、R 2 V 1 7、3' U T R (グロビン)、およびp A G H - H s を含む。

【0 0 8 9】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、C M V プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、およびp A G H - H s を含む。

【0 0 9 0】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、h S Y N プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E (x )、およびp A G H - B t を含む。

【0 0 9 1】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、h S Y N プロモーター、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E (x )、およびp A G H - H s を含む。

【0 0 9 2】

一実施形態では、発現力セットは、5' から 3' の順序で、h S Y N プロモーター、コザック、e E F 1 A 2 またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、W P R E (x )、およびp A G H - H s を含む。

【0 0 9 3】

10

30

50

一実施形態では、発現カセットは、5'から3'の順序で、CAGプロモーター、eEF1A2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、WPRE(×)、およびpAGH-Hsを含む。

#### 【0094】

一実施形態では、発現カセットは、5'から3'の順序で、CAGプロモーター、コザック、eEF1A2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、WPRE(×)、およびpAGH-Hsを含む。

#### 【0095】

一実施形態では、発現カセットは、5'から3'の順序で、hSYNプロモーター、eEF1A2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、WPRE(× 10)、およびpAGH-Btを含む。

#### 【0096】

一実施形態では、発現カセットは、5'から3'の順序で、hSYNプロモーター、eEF1A2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、およびpAGH-Hsを含む。

#### 【0097】

一実施形態では、発現カセットは、5'から3'の順序で、hSYNプロモーター、コザック、eEF1A2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、およびpAGH-Hsを含む。

#### 【0098】

一実施形態では、発現カセットは、5'から3'の順序で、CAGプロモーター、eEF1A2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、およびpAGH-Hsを含む。

#### 【0099】

一実施形態では、発現カセットは、5'から3'の順序で、CAGプロモーター、コザック、eEF1A2またはその機能的バリアントをコードするポリヌクレオチド配列、およびpAGH-Hsを含む。

#### 【0100】

#### アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルス(AAV)は複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖DNAゲノムは約4.7kbの長さであり、二つの145ヌクレオチド逆位末端反復(ITR)を含む。AAVには複数の公知のバリアントがあり、抗原エピトープにより分類される場合、血清型と呼ばれることがある。AAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列は公知である。例えば、AAV-1の全ゲノムは、GenBank登録番号NC\_002077で提供され、AAV-2の全ゲノムは、GenBank登録番号NC\_001401およびSrivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983)で提供され、AAV-3の全ゲノムは、GenBank登録番号NC\_1829で提供され、AAV-4の全ゲノムは、GenBank登録番号NC\_001829で提供され、AAV-5のゲノムは、GenBank登録番号AF085716で提供され、AAV-6の全ゲノムは、GenBank登録番号NC\_001862で提供され、AAV-7およびAAV-8ゲノムの少なくとも一部は、それぞれGenBank登録番号AX753246およびAX753249で提供され、AAV-9のゲノムは、Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004)で提供され、AAV-10のゲノムはMol. Ther., 13(1): 67-76 (2006)で提供され、AAV-11ゲノムはVirology, 330(2): 375-383 (2004)で提供される。AAVrh.74ゲノムの配列は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,434,928号で提供されている。ウイルスDNA複製(rep)、キャプシド形成/パッケージング、および宿主細胞染色体組込みを導くシス作用配列は、AAV\_ITR内に含まれる。三つのAAVプロモーター(それらの相対マップ位置からp5、p19、およびp40と命名)は、rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする二つ

20

30

40

50

の AAV 内部オーブ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（ヌクレオチド 2107 および 2227）のディファレンシャルスプライシング（*differential splicing*）と連動して二つの rep プロモーター（p5 および p19）は、rep 遺伝子から四つの rep タンパク質（rep78、rep68、rep52、および rep40）を产生する。Rep タンパク質は、ウイルスゲノムの複製を最終的に担う複数の酵素特性を持つ。cap 遺伝子は、p40 プロモーターから発現され、それは、三つのキャプシドタンパク質 VP1, VP2、および VP3 をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位は、三つの関連するキャプシドタンパク質の产生に関与する。単一の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 に位置付けられる。AAV のライフサイクルと遺伝学は、Muzychuk, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97 - 129 (1992) で概説されている。  
10

### 【0101】

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魅力的となる独自の特色を持つ。培養中の細胞の AAV 感染は非細胞変性であり、ヒトおよび他の動物の自然感染は無症状および無症候性である。さらに、AAV は多くの哺乳動物細胞に感染し、インビオで多くの異なる組織を標的化する可能性を許容する。さらに、AAV はゆっくりと分裂する細胞と分裂しない細胞に形質導入し、転写的に活性な核エピソーム（染色体外エレメント）として、これらの細胞の生存期間にわたり本質的に存続することができる。AAV プロウイルスゲノムは、プラスミド中でクローン化 DNA として挿入され、これによって組換えゲノムの構築が実現可能となる。さらに、AAV 複製およびゲノムのキャプシド化を指示するシグナルは、AAV ゲノムの ITR 内に含まれているため、ゲノムの内部約 4.3 kb の一部または全部（複製および構造キャプシドタンパク質、rep-cap をコードする）は、外来 DNA で置換されてもよい。AAV ベクターを生成するために、rep タンパク質および cap タンパク質をトランスで提供してもよい。AAV の別の重要な特色は、AAV が極度に安定した強力なウイルスであることがある。アデノウイルスの不活化に使用される条件（56° ~ 65° で数時間）に容易に耐え、AAV の低温保存の重要性を軽減する。AAV は凍結乾燥することもできる。最後に、AAV 感染細胞は重複感染に耐性がない。  
20

### 【0102】

rAAV ゲノム中の AAV DNA は、組換えウイルスが誘導され得る任意の AAV バリアントまたは血清型由来であってもよく、AAV バリアントまたは血清型には、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、および AA V rh 10 が含まれるが、これらに限定されない。シュードタイプ化された rAAV の产生は、例えば、国際特許公開第 01 / 83692 号に開示されている。他の型の rAAV バリアント、例えば、キャプシド変異を伴う rAAV なども企図されている。例えば、Marsig et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900 - 1909 (2014) を参照のこと。様々な AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当技術分野において公知である。  
30

### 【0103】

場合によっては、rAAV は自己相補的なゲノムを含む。本明細書で定義されるように、「自己相補的」または「二本鎖」ゲノムを含む rAAV は、McCarty et al. に記載されるように、rAAV のコード領域が分子内二本鎖 DNA 鑄型を形成するように構成されるように操作された rAAV を指す。自己相補的な組換えアデノ随伴ウイルス（scAAV）ベクターは、DNA 合成とは独立した効率的な形質導入を促進する。Gene Therapy, 8(16): 1248 - 54 (2001)。本開示は、感染（形質導入のような）時に、rAAV ゲノムの第二の鎖の細胞介在性合成を待つのではなく、scAAV の二つの相補的な半分が、すぐに複製および転写ができる一つの二重鎖 DNA (dsDNA) ユニットを形成するので、場合によっては、自己相補的ゲノムを含む r  
40

AAVの使用を企図する。rAAVにおいて見出される完全コード容量(4.7~6kb)の代わりに、自己相補的ゲノムを含むrAAVは、その量の約半分(およそ2.4kb)だけを保持することが理解されよう。

#### 【0104】

他の場合には、rAAVベクターは一本鎖ゲノムを含む。本明細書中で定義されるように、「単一標準」ゲノムは、自己相補的ではないゲノムを指す。大半の場合では、非組換えAAVは一本鎖DNAゲノムを有する。rAAVは、細胞の効率的な形質導入を達成するためにscAAVであるべきといういくつかの指標があった。本開示は、しかし、rAAVベクターの他の遺伝子改変が、標的細胞において最適な遺伝子転写を得るために有益であり得るという理解から、自己相補的ゲノムではなく、一本鎖ゲノムを有するかもしれないrAAVベクターを企図している。一部の場合では、本開示は、マウス眼の前眼部への効率的な遺伝子導入を達成することが可能な一本鎖rAAVベクターに関する。Wang et al. Single stranded adeno-associated virus achieves efficient gene transfer to anterior segment in the mouse eye. PLoS ONE 12(8): e0182473 (2017)を参照のこと。10

#### 【0105】

一部の場合では、rAAVベクターは、血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh10、またはAAVrh74である。シュードタイプ化されたrAAVの产生は、例えば、国際特許公開第01/83692号に開示されている。他の型のrAAVバリエント、例えば、キャプシド変異を伴うrAAVなども企図されている。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014)を参照のこと。一部の場合では、rAAVベクターは血清型AAV9であり、一本鎖ゲノムを含む。一部の実施形態では、当該rAAVベクターは、血清型AAV9であり、自己相補的ゲノムを含む。一部の実施形態では、rAAVベクターは、AAV2の逆位末端反復(ITS)配列を含む。一部の実施形態では、rAAVベクターはAAV2ゲノムを含み、その結果、rAAVベクターはAAV-2/9ベクター、AAV-2/6ベクター、またはAAV-2/8ベクターである。20

#### 【0106】

最も良く知られているAAVに対する完全長配列およびキャプシド遺伝子の配列は、米国特許第8,524,446号に提供され、その全体が本明細書に組み込まれる。30

#### 【0107】

AAVベクターは、野生型AAV配列を含んでよく、またはそれらは野生型AAV配列に対する一つまたは複数の改変を含んでもよい。特定の実施形態では、AAVベクターは、キャプシドタンパク質、例えば、VP1、VP2および/またはVP3内に、一つまたは複数のアミノ酸改変、例えば、置換、欠失、または挿入を含む。特定の実施形態では、改変は、AAVベクターが対象に提供される場合、低下した免疫原性を提供する。

#### 【0108】

rAAVのキャプシドタンパク質は、rAAVがニューロン、またはより具体的にはドバミン作動性ニューロンなどの対象の特定標的組織に標的化されるように改変されてもよい。例えば、Albert et al. AAV Vector-Mediated Gene Delivery to Substantia Nigra Dopamine Neurons: Implications for Gene Therapy and Disease Models. Genes. 2017年2月8日を参照のこと。また、米国特許第6,180,613号および米国特許公開第US20120082650A1号も参照のこと。その両方の開示は参考により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、rAAVは対象の黒質に直接注射される。40

#### 【0109】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、rAAVピリオンは、AAV2 rAAVピリオンである。キャプシドの多くは、AAV2キャプシドまたはその機能的バリアントである。一部の実施形態では、AAV2キャプシドは、例えば、以下などの参照AAV2キャプシドと少なくとも98%、99%、または100%の同一性を共有する。

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKP G P P P P KPAERHKD  
 DS RGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGE PVNEADAAL EHDKAYD  
 RQL DSGDNPYLKYNHADA E F Q E RLKEDTSFGGNLGRAV F Q  
 AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTG  
 KAGQQPARKRLNF G QTGDADSV PDPQPLGQPPAAPSGLGT  
 NTMATGSGAPMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVI 10  
 TTSTRTWALPTYN NHLYKQISSQSGASNDNH YFGYSTPWG  
 YFD FNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGF RPKRLNF KLFN I QV  
 KEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGS AHQG  
 CLPPFPADVF MV P Q Y G Y L TLNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPS  
 QMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAH SQSLDR LMNP LIDQ  
 YLYYL SRTNTPSGTTQSRLQFSQAGASDI RDQSRNWLP G  
 PCYRQQR VSKTSADNNNSEY SWTGATKYH L NGRDSL VNPG  
 PAMASHKDDEEKF FPQSGVLI FGKQGSEKTNVDIEKVMI T  
 DEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV  
 LPGMVWQDRDVYLQGPIWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK 20  
 HPPPQILIKNTPV PANP STTFSAAKFASFITQYSTGQV SV  
 EIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGV Y  
 SEPRPIGTRYLTRNL (配列番号59)

### 【0110】

一部の実施形態では、rAAVピリオンは、AAV9 rAAVピリオンである。キャプシドの多くは、AAV9キャプシドまたはその機能的バリアントである。一部の実施形態では、AAV9キャプシドは、例えば、以下などの参照AAV9キャプシドと少なくとも98%、99%、または100%の同一性を共有する。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQD  
 NARGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGE PVNAADAAL EHDKAYD 30  
 QQLKAGDNPYLKYNHADA E F Q E RLKEDTSFGGNLGRAV F Q  
 AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQE PDSSAGIG  
 KSGAQPAKKRLNF G QTGDTE SV PDPQPIGEPPAAPS GVG S  
 LTMASGGGAPVADNNNEGADGVGS S SGNWHCD S QWL GDRVI  
 TTSTRTWALPTYN NHLYKQISNSTSGGSSNDNA YFGYSTP  
 WGYFD FNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGF RPKRLNF KLFN I  
 QVKEVTDNNNGVKTTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGS AH  
 EGCLPPFPADVF MIPQYGYLT LNDGSQAVGRSSFYCLEYF  
 PSQMLRTGNNFQFSYEFENVPF HSSYAH SQSLDR LMNP L I  
 DQYLYYL SKTINGSGQNQQT LKF SVAGPSNMAVQGRNYIP 40  
 GPSYRQQR VSTT V TQNNNSEFAWP GASSWALN G RNS L MN P  
 GPAMASHKEGEDRFFPLSGS LIFGKQGTGRDNVDADKVM I  
 TNEEEIKTTNPVATESY G QVATNHQS AQA Q A Q T G W V Q N Q G  
 ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKI PHTDGNFHPSPLMGGF GM  
 KH PPPQILIKNTPV PADPPTAFN KDKLNSFITQYSTGQV S  
 VEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSN NV F AVN TEG V  
 YSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号15)

### 【0111】

一部の実施形態では、rAAVピリオンは、AAV-PHP.B rAAVピリオンまたはその好中球性バリアントであり、例えば、国際特許公開第2015/038958 A

1号および国際特許公開第2017/100671A1号において開示されているものなどであるが、これらに限定されない。例えば、AAVキャプシドは、配列TLAVPFK(配列番号61)またはKFPVALT(配列番号62)からの少なくとも4つの連続アミノ酸を含んでもよく、例えば、AAV9のアミノ酸588および589をコードする配列の間に挿入される。

#### 【0112】

キャプシドの多くは、AAV-PHP.Bキャプシドまたはその機能的バリアントである。一部の実施形態では、AAV-PHP.Bキャプシドは、例えば、以下などの参照AAV-PHP.Bキャプシドと少なくとも98%、99%、または100%の同一性を共有する。

MAAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNAAADAAALEHDKAYDQLKAGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLPEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDWQRЛИNNNWGFРPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIHQYGYLTLDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSLSDRLMNPLIDQYLYYLSSRTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAMQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWP GAS SWALN GRNS LMNP GPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQGVATNHQSAQTLAVPFKAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPTH DGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFN KDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL(配列番号60)

#### 【0113】

本開示のrAAVビリオンに使用される更なるAAVキャプシドには、国際特許公開第2009/012176A2号および国際特許公開第2015/168666A2号において開示されているものが含まれる。

#### 【0114】

##### 医薬組成物およびキット

一態様では、本開示は、本開示のrAAVビリオンと、一つまたは複数の薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤と、を含む医薬組成物を提供する。

#### 【0115】

例えば、注射による投与の目的のために、様々な溶液、例えば滅菌水溶液などを用いることができる。このような水溶液は、所望により緩衝されてもよく、液体希釈剤は、生理食塩水またはグルコースによって最初に等張ることができる。遊離酸(DNAは酸性リノン酸基を含有する)または薬理学的に許容可能な塩としてのrAAVの溶液は、0.001%または0.01%の例えばPluronnic(F-68などの界面活性剤と好適に混合された水中で調製することができる。rAAVの分散体は、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびその混合物、ならびに油中で調製されてもよい。通常の保存および使用の条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防ぐための防腐剤を含有する。この関連で、用いられる滅菌水性媒体は全て、当業者に周知の標準技術により容易に取得可能である。

#### 【0116】

注射可能な使用に適した医薬品形態としては、これらに限定されないが、滅菌水溶液ま

10

20

30

40

50

たは分散液、ならびに滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。いずれの場合も、形態は滅菌されており、容易に注射可能な(syringability)程度に流動的でなければならない。製造および保管の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されていなければならない。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など)、それらの好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散体の場合に必要な粒子サイズの維持によって、およ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、様々な抗菌剤および抗真菌剤、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、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の長期間の吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

10

20

30

40

50

#### 【0117】

滅菌注射溶液は、必要に応じて、上で列挙された様々な他の成分と、適した溶媒中に必要な量のrAAVを組み込み、それに続く濾過滅菌により調製され得る。一般的に、分散剤は、滅菌された活性成分を、基本的な分散媒体および上記で列挙されたものから必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌された注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、活性成分に加えて、事前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末が得られる。

#### 【0118】

別の態様では、本開示は、本開示のrAAVビリオンと、使用説明書と、含む、キットを含む。

#### 【0119】

##### 使用方法

ある態様において、本開示は、細胞においてeEF1A2活性を増加させる方法を提供し、この方法は、細胞を本開示のrAAVと接触させることを含む。別の態様では、本開示は、対象におけるeEF1A2活性を増加させる方法を提供し、この方法は、本開示のrAAVに投与することを含む。一部の実施形態では、細胞および/または対象は、eEF1A2の発現レベルおよび/または活性が欠損しており、および/またはeEF1A2における機能喪失突然変異を含む。細胞は、ニューロン、例えば、ドパミン作動性ニューロンであってもよい。

#### 【0120】

一部の実施形態では、本方法は、細胞培養および/またはインビオでのニューロンの生存を促進する。

#### 【0121】

##### 治療方法

別の態様では、本開示は、疾患または障害の治療を必要とする対象においてそれを治療する方法を提供し、この方法は、有効量の本開示のrAAVビリオンを対象に投与することを含む。一部の実施形態では、疾患または障害は、神経疾患または障害である。一部の実施形態では、対象は、eEF1A2発現または機能における遺伝的破壊を被る。一部の実施形態では、疾患または障害は、eEF1A2欠損症および/またはeEF1A2-関連神経疾患(OMIM番号617309、616393、616409)表現型スペクトル、例えば、知的障害、精神遅滞、てんかん性脳症および自閉症スペクトル障害である。

#### 【0122】

rAAVを介したeEF1A2タンパク質のCNSへの送達は、寿命を延長し、神経変性を予防し、神経行動学的欠損、変性てんかん性運動障害性脳症、てんかん、およびジストニアを予防または減弱させる可能性がある。

#### 【0123】

併用治療も本発明により企図される。本発明の方法の標準的な医学的治療（例えば、コルチコステロイドまたは局所的減圧薬）との組み合わせが、新規の療法との組み合わせと同様に、具体的に企図される。場合によっては、対象は、本明細書に記載されるrAAVの投与に対する免疫反応を防止または低減するためにステロイドで治療され得る。

#### 【0124】

治療有効量のrAAVベクター、例えば、脳室内（ICV）または大槽内（ICM）注射は、脳重量で、約1e12vg/kg～約5e12vg/kg、または約1e13vg/kg～約5e13vg/kg、または約1e14vg/kg～約5e14vg/kg、または約1e15vg/kg～約5e15vg/kgのrAAVの用量である。または静脈内送達用量は、体重で1213-1e14vg/kgの範囲である。本発明はまた、これらの範囲のrAAVベクターを含む組成物を含む。  
10

#### 【0125】

例えば、特定の実施形態では、治療有効量のrAAVベクターは、約1e10vg、約2e10vg、約3e10vg、約4e10vg、約5e10vg、約6e10vg、約7e10vg、約8e10vg、約9e10vg、約1e12vg、約2e12vg、約3e12vg、約4e12vg、または約5e12vgの用量である。本発明はまた、これらの用量のrAAVベクターを含む組成物を含む。

#### 【0126】

一部の実施形態では、例えば、ICV注射が行われる場合、治療有効量のrAAVベクターは、1e10vg/半球～1e13vg/半球の範囲、または約1e10vg/半球、約1e11vg/半球、約1e12vg/半球、または約1e13vg/半球の用量である。一部の実施形態では、例えば、ICM注射が行われる場合、治療有効量のrAAVベクターは、合計1e10vg～合計1e14vgの範囲、または合計約1e10vg、合計約1e11vg、合計約1e12vg、合計約1e13vg、または合計約1e14vgの用量である。  
20

#### 【0127】

一部の実施形態では、治療用組成物は、注入された治療用組成物の体積当たり、約1e9、1e10、または1e11を超えるrAAVベクターのゲノムを含む。実施形態の場合では、治療用組成物は、1mL当たりおよそ1e10、1e11、1e12、または1e13を超えるrAAVベクターのゲノムを含む。ある特定の実施形態では、治療用組成物は、1mL当たり約1e14、1e13または1e12未満のrAAVベクターのゲノムを含む。  
30

#### 【0128】

患者の機能改善、臨床的有益性または有効性の証拠は、発作頻度（ミオクローヌス性および全身性強直間代発作）の減少、UK-WHO小児頭団、身長および体重パーセンタイルチャートを使用した脳の成長および体の成長などの代替マーカーの分析によって評価され得る。小児発作一覧表や投薬記録など、標準的な疾患評価尺度を使用して、認知、運動、発話、言語機能を測定する。ピーボディ発達運動尺度2（PDMS-2）およびベイリー乳幼児発達尺度3を含む認知・発達評価を、子供の障害のレベルに応じて適用する。粗大運動機能測定（GFMF-88）、小児障害評価表（PEDI）。これらの尺度、あるいは類似の尺度、ならびに患者の申告によるQOLに関する成果として、3段階評価（平均持続時間の減少、変化なし、増加）のCaregiver Global Impression of Change in Seizure Duration（CGIC-SD）、Pediatric Quality of Life Inventory（PedSQL（商標））およびVineland Adaptive Behavior Scales-2ndなどが疾患の構成要素の改善を実証し得る。ベースラインおよび治療後の脳磁気共鳴画像は、ミエリン化および脳容積の改善を示すことがある。心筋症、大動脈欠損症、および心室中隔欠損症を含む、常染色体優性EEF1A2-関連神経発達障害を有する患者では、心臓欠陥が観察されている（Kaneko et al., 2021, Carvill et al., 2020; McLachlan et al., 50

, 2019)。EEF1A2のホモ接合型バリアントは、全体的な発達遅延、てんかん、発育不全、拡張型心筋症、および早期死亡を伴う单一血統で特定された(Cao et al., 2017)。心臓状態の測定は、ベースラインの心電図および心エコー図を通してモニタリングされ得る。

#### 【0129】

臨床的有益性は、寿命の延長、正常な神経発達のマイルストーンの達成、てんかん発作活動(ミオクローヌス性、間代性、全身性強直間代性、および/またはてんかん性痙攣を含む)の頻度または大きさの減少、舞蹈病アテトーゼ、ジストニア、および/または運動失調症などの筋緊張低下または運動障害の改善、またはこれらの発症の欠如として観察され得る。神経保護効果および/または神経回復効果の証拠は、発達全体にわたるミエリン化の程度、脳梁の厚さ、および皮質および/または小脳萎縮の程度を特徴付けることによって、磁気共鳴撮像法(MRI)で明らかであり得る。脳波(EEG)活動の有益な変化は、多焦点放電および/または全般的なスパイク活動の減少によって明らかであろう。

#### 【0130】

一部の実施形態では、例えば、静脈内投与が行われる場合、治療的に有効なrAAVベクターの量は、対象の総体重で約1e12vg/kg~1e14vg/kgの範囲の用量である。例えば、特定の実施形態では、治療有効量のrAAVベクターは、約1e12vg/kg、約2e12vg/kg、約3e12vg/kg、約4e12vg/kg、約5e12vg/kg、約6e12vg/kg、約7e12vg/kg、約8e12vg/kg、約9e12vg/kg、約1e13vg/kg、約2e13vg/kg、約3e13vg/kg、約4e13vg/kg、5e13vg/kg、約6e13vg/kg、約7e13vg/kg、約8e13vg/kg、約9e13vg/kg、または約1e14vgの用量である。心臓の有益性の証拠には、心エコー図での安定した心機能が含まれ得る。

#### 【0131】

##### 組成物の投与

組成物の有効用量の投与は、限定されないが、全身的、局所的、直接注射、静脈内、脳内、脳脊髄内、くも膜下腔内、大槽内、被殻内、海馬内、黄斑内、線条体内(被殻および/または尾状核)、皮質内、または脳室内投与を含む、当技術分野の標準的な経路によるものであってよい。場合によっては、投与は、静脈内、脳内、脳脊髄、くも膜下腔内、大槽内、被殻内、海馬内、線条体内(被殻および/または尾状核)、または脳室内注射を含む。投与は、トレンドレンブルク傾斜を伴う、または伴わなくも膜下腔内注射によって行われてもよい。

#### 【0132】

一部の実施形態では、本開示は、有効用量の本発明のrAAVおよび組成物の局所投与および全身投与を提供する。例えば、全身投与は、全身が影響を受けるように、循環系中の投与であり得る。全身投与は、注射、注入、または移植を通じた親(parental)投与を含む。

#### 【0133】

特に、本発明のrAAVの投与は、rAAV組換えベクターを動物の標的組織に輸送する任意の物理的方法を使用することによって達成され得る。投与には、以下に限定されないが、中枢神経系(CNS)または脳脊髄液(CSF)への注射、および/または脳への直接の注射が含まれる。

#### 【0134】

一部の実施形態では、本開示の方法は、脳室内、大槽内、くも膜下腔内、または脳実質内の送達を含む。注入は、注入ポンプを使用して、専用カニューレ、カテーテル、シリンジ/針を使用して行われてもよい。任意選択的に、注射部位の標的化は、MRIガイドイメージングを用いて達成されてもよい。投与は、有効量のrAAVビリオン、またはrAAVビリオンを含む医薬組成物のCNSへの送達を含み得る。これらは、例えば、片側脳室内注入法、両側脳室内注入法、トレンドレンブルク傾斜手順を伴う大槽内(intra-

10

20

30

40

50

cisternal magna) 注入、またはトレンデレンブルク傾斜処置を伴わない大槽内注入、トレンデレンブルク傾斜処置を伴うくも膜下腔内注入、またはトレンデレンブルク傾斜処置を伴わなくも膜下腔内注入を介して達成され得る。本開示の組成物は、さらに静脈内投与されてもよい。

#### 【0135】

CNSへの直接送達には、脳室内、片側または両側、特定の神経細胞領域、あるいは神経細胞標的を含むより一般的な脳領域を標的とすることが考えられる。個々の患者の脳室内空間、脳領域および/または神経標的の選択、ならびにその後のAAVの術中送達は、多数の撮像技術(MRI、CT、MRIマージと組み合わせたCT)を使用して、任意の数のソフトウェア計画プログラム(例えば、Stealth System、Clear point Neuronavigation System、Brainlab、Neuroinspireなど)を採用することによって達成することができる。脳室内空間または脳領域の標的化および送達には、標準的な定位固定フレーム(Leksell、CRW)の使用が関与するか、または術中MRIの有無に関わらず、フレームレスアプローチを使用することができる。AAVの実際の送達は、AAVベクターの吸着を防止するために、材料で被覆した内側ルーメンを有する、または有さない針またはカニューレを通じた注射による場合がある(例えば、Smartflowカニューレ、MRI Interventionsカニューレ)。送達デバイスは、シリソジを、事前にプログラムされた注入速度および容量を有する自動注入またはマイクロ注入ポンプとインターフェイスで接続する。シリソジ/針の組み合わせ、または針のみは、定位固定フレームと直接インターフェイスで接続されてもよい。注入は、一定の流量、または対流性強化送達による変動速度を含み得る。

#### 【実施例】

#### 【0136】

##### 実施例1：プロモーターの選択

ニューロンにおけるeEF1A2の発現を回復させるプロモーターを選択するために、野生型新生児マウスにおける生体内分布試験を実施した。ヒトシナプシン(hSYN)プロモーターは、表1に示すように、他のすべての候補プロモーターと比較して、神経系に対する優れた選択性および強力なニューロン発現を示した。驚くべきことに、hSYNプロモーターは、試験されたeSYNおよび他のプロモーターよりも高いニューロン選択性を示した。

#### 【0137】

#### 【表6】

表6

プロモーター	eEF1A2導入遺伝子の脳細胞指向性
CMV	ニューロンおよびグリア
EF1a	強力なニューロン
強化されたシナプシン(eSYN)	ニューロンおよびグリア
ヒトシナプシン(Syn)	強力なニューロン

#### 【0138】

##### 実施例2：EEF1A2ノックアウトマウスマodelのAAV9遺伝子治療レスキュー

EEF1A2遺伝子の変異に影響を受けた対象(例えば、子供)のための新しい治療方法を開発した。真核生物翻訳伸長因子1アルファ2(eEF1A2)は、アミノアシル転写RNAをタンパク質合成のためにリボソームに送達するために不可欠である。EEF1A2遺伝子の変異は、重度の知的障害、自閉症、およびてんかんと関連している。現在有効な治療法はない。EEF1A2ノックアウトマウスマodel(消耗(wasted)マウス)は、十分に特徴解析されている。消耗(wst/wst)マウスは、離乳後に歩行障害および振戦を呈し、その後、23日齢までに麻痺および運動ニューロンの変性が見られ

10

20

30

40

50

るようになった。このマウスモデルを使用して、発明者らは、遺伝子治療によりタンパク質の機能を回復できるかどうかを試験した。ヒト E E F 1 A 2 c D N A ( h S y n - e E F 1 A 2 ) の発現を駆動するために、汎ニューロンプロモーターであるヒトシナプシンを使用してアデノ随伴ウイルス 9 ( A A V 9 ) を設計した。インビボで構築物の発現を追跡するために、e G F P マーカー遺伝子が含まれていた。免疫蛍光法 ( 図 7 ) は、A A V 9 - h S y n - e E F 1 A 2 - T 2 A - e G F P の新生児 I C または I V 注射後の神経細胞標的化を明らかにした。免疫組織化学染色 ( 図 8 ) は、r A A V ( e E F 1 A 2 - 2 A - e G F P または e G F P マーカー単独の両方について ) の単回注射から両方の投与経路後に C N S における広範な導入遺伝子発現を確認した。

## 【 0 1 3 9 】

10

遺伝子治療ベクターは、消耗 ( w s t / w s t ) マウスの治療に有効であることが証明された。E e f 1 a 2 - / - ノックアウトマウス ( w s t / w s t ) は、I C を注射するとほとんどが生存し ( 3 / 4 ) 、I C および I V の両方を注射するとすべてが生存した ( 図 9 A ) 。未処置マウスは、P 2 3 で死亡した。I C または I C / I V マウスは、同様に W T マウスと比較して体重減少を示さなかったのに対し、未処置の対照マウスは、P 2 3 で死亡につながる体重減少を呈した ( 図 9 B ) 。ロータロッドおよびインバーテッドグリッド分析では、処置後のパフォーマンスの低下は見られなかった ( 図 9 C および図 9 D ) 。結果は、二元配置分散分析およびダネットの多重比較検定のいずれによっても有意であった。

## 【 0 1 4 0 】

20

e E F 1 A 2 発現は、野生型、I C 、および併用治療において脳全体にわたって観察された ( 図 9 E および図 9 F ) 。e E F 1 A 2 発現は、野生型、I C 、および併用治療群の脊髄組織に存在した。しかし、発現は、未処置の消耗群および I V 処置群 ( F ) では存在しなかった。

## 【 0 1 4 1 】

実施例 3 : E E F 1 A 2 D 2 5 2 H 、または E E F 1 A 2 G 7 0 S 、または E E F 1 A 2 E 1 2 2 K マウスモデルの A A V 9 遺伝子治療レスキュー

図 2 ~ 図 5 および図 6 に示すベクター設計の有効性、ならびに様々なコドン最適化を比較して、優れた有効性を有するベクターを識別する。実験は、ヒトに見られる三つの変異 ( D 2 5 2 H 、 G 7 0 S および / または E 1 2 2 K ) および / または重度の神経変性表現型 ( D e l . 2 2 . e x 3 ) を有するマウスモデルを再現するマウスモデルで実施される。実験は、e E F 1 A 2 をコードする A A V ベクターが生存、体重減少、および行動表現型を救うことができることを確認するために、新生児マウス、および成体までの後期発達段階の両方で実施される。神経行動検査に対する有益な効果の評価には、回転シリンド ( ロータロッド ) でのパフォーマンス、吊り下げられたワイヤ表面にしがみつく能力 ( ワイヤハング試験 ) 、フットフォールト試験、インバーテッドグリッド行動、握力、および通常の探索活動または異常行動 ( 例えば、「痙攣行動」 ) の観察を含む、オープンフィールドでの行動が含まれる。A A V 9 - e E F 1 A 2 を注射したマウスの神経行動機能を評価するために、未処置の対照と比較して、後肢の握り、歩行、脊柱後弯症、および棚に沿って歩く能力の分析を含む、一連の検査で集合的な神経スコアを取得することができる。寿命が延長された D e l . 2 2 . e x 3 ( または異常な E E G を有する他のマウス系統 ) マウスにおける発作の頻度および脳波 ( E E G ) の変化は、C N S における異常な電気活動を軽減する有益な効果を明らかにする。生化学的および組織学的解析により、e E F 1 A 2 発現レベルおよび C N S 内の分布に対するベクター設計の優れた有効性が確認されている。組織分析には、ウェスタンプロットおよび E L I S A による新鮮な組織、および免疫標識による C N S の固定切片における m R N A 、 D N A 、ベクターコピー数、および導入遺伝子タンパク質発現の検出が含まれる。

## 【 0 1 4 2 】

実施例 4 : E E F 1 A 2 欠乏の W S T / W S T マウスモデルにおける、中枢神経系へのヒト E E F 1 A 2 タンパク質の A A V 9 を介した送達の効果

50

e E F 1 A 2 関連障害の代表的なモデルは、E E f 1 A 2 遺伝子の第一のエクソンおよびすべてのプロモーター要素の自然欠失が、e E F 1 A 2 ヌル (w s t / w s t ) をもたらす、消耗マウスモデルである。未処置の動物では、w s t / w s t マウスの 31% が P 20 - 22 の間に死亡し、生き残った w s t / w s t マウスは、体重の減弱、振戻、それに続いて体重減少を示し、残りはすべて 24 日目までに死亡した。未処置の動物は、握力の低下およびロータロッドのパフォーマンスの低下も示す可能性があり、最も長く生き延びた動物では、振戻、進行性麻痺、および体重減少が見られる。我々の w s t / w s t 口口ニーの動物は、より深刻で、より急に衰弱し、より早期に死亡しているように見える。P 23 にインバーテッドグリッド潜時が低下することによって、握力障害を観察した。w s t / w s t 動物が P 24 までしか生存しなかったため、w s t / w s t を野生型動物と有意に区別するためのロータロッドパフォーマンスの低下は観察されていない。10

#### 【 0 1 4 3 】

材料および方法

動物福祉

すべての動物実験は、英国内務省および 1986 年の動物（科学的手順）法に準拠し、ユニバーシティ・カレッジ・ロンドンの倫理審査委員会のガイドラインの範囲内で実施された。本試験で使用する w s t / w s t e E F 1 A 2 ヌルマウスモデルは、以前に説明した ( Chambers D et al . PNAS 95 : 4463 - 8 ( 1998 ) ) 。ヘテロ接合マウスを時間交配させて、混合遺伝子型同腹仔を生成した。仔をプライマー（プライマー E E F 1 A 2 Mut F 5' ACCAGTGGTTCACCTGCT C 3' , E E F 1 A 2 Common R 5' CACTG TGGGG GCTCTGGT TT 3' , E E F 1 A 2 WT F 5' CAGAGCTTCACTCAGTCTG 3' ）を使用して P 0 で遺伝子型を決定した。20

#### 【 0 1 4 4 】

A A V 9 - e E F 1 A 2 ベクターまたは対照物質の投与は、P 0 で新生児ホモ接合体 w s t / w s t または W T 同腹仔に対する両側脳室内注射により行われ、動物は、人道的エンドポイント（体重減少 15% ）または時限犠牲点 P 60 まで追跡された。脳室内注射は、前述したように P 0 - 1 マウスの側脳室に向けられた ( Newbery H J , et al . J Neuropathol Exp Neurol 64 : 295 - 303 ( 2005 ) ) 。 33 ゲージ針（ハミルトン）を、注射部位に垂直に深さ 3 mm まで挿入し、 5 μl のベクターを 5 秒かけて側脳室に投与した。仔は速やかに雌親に戻された。群サイズは、遺伝子治療を行った w s t / w s t マウスが 6 、 7 腹から対照の同腹仔が 14 ~ 16 であった。30

#### 【 0 1 4 5 】

行動研究

マウスは定期的に計量され、一般的な健康状態の変化および人道的エンドポイントを満たすことについて評価された。ロータロッドの行動試験、およびインバーテッドグリッド試験を P 23 で実施した。すべての行動試験は、動物治療群に対して盲検化された研究者によって実施された。マウスを、 4 ~ 40 r . p . m . の連続加速下で、最大 5 分間、ロータロッド ( Harvard Apparatus ( 登録商標 ) ) 上に置いた。マウスがロッドから落ちた時間を、各試験日に各動物について 3 回の試行（落下までの潜時）で記録した。インバーテッドグリッド試験は、 30 cm の高さの透明なプラスチックの箱の上に置いたステンレス鋼グリッド ( 41 × 25 cm ) 上にマウスを置くことが含まれた。インバーテッドグリッドから落ちる潜時を最大 5 分で記録した。試験の各日にマウス当たり 3 回、インバーテッドグリッド試験を繰り返した。40

#### 【 0 1 4 6 】

マウス組織の組織学的および免疫組織化学的解析

マウスを、 P B S を使用した終末経心腔的灌流によって殺処分した。収集された組織（脳および内臓器官）を半分にし、異なる処理技術を可能にした。免疫組織化学に使用した脳を、 4 % P F A に 48 時間、後固定し、 30 % スクロース溶液に移し、切片化まで 450

で凍結保護した。脳を、凍結ミクロトーム（Thermo Fisher（登録商標）HM 430）に、厚さ40μmで、いずれかの冠状面に取り付けた。全脳免疫組織化学のために240μm間隔で選択された脳切片を用いて、フリーフローティング免疫組織化学ベースの分析を実施した。簡潔に述べると、フリーフローティング切片を、15%の正常ヤギ血清（Vector Laboratories（登録商標））-0.1%トリトン-X（TBS-T）（Sigma（登録商標））を含むトリス緩衝生理食塩水で、室温で1時間ブロックし、10%の正常ヤギ血清-TBS-T中の一次抗体ウサギeEF1A2（Proteintech（登録商標））で、4で一晩、インキュベートした。翌日、切片をそれぞれ種特異的二次抗体（Vector Laboratories（登録商標））と共に、室温で1時間インキュベートし、TBSで洗浄した後、ベクタステインアビジン-ビオチン溶液（Vector Laboratories（登録商標））と共にインキュベートする。反応を、3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）（Sigma（登録商標））で可視化した。DAB反応を、氷冷1×TBSを使用して停止し、切片を洗浄して、二重コーティングされたゼラチン化ガラススライドに取り付けた。取り付けられた切片を風乾し、100%エタノールで10分間、脱水溶液（Histoclear（商標）、National Diagnostics（登録商標））で30分間脱水した後、カバースリップ用の封入剤（DPX、VWR International（登録商標））で被覆した。

#### 【0147】

免疫蛍光法では、脳切片を15%のヤギ血清で30分間ブロックし、次いで、10%の正常なヤギ血清TBS-T 0.3%で希釈した一次抗体（ウサギeEF1A2 1:1000 Proteintech（登録商標））およびマウスNeuN 1:1000 Millipore）と共に4で一晩インキュベートした。切片を1×TBSで洗浄し、10%の正常なヤギ血清で希釈したAlexa 488およびAlexa 594（すべてInvitrogen（登録商標））で標識したそれぞれの種特異的二次抗体と共に、室温で2時間インキュベートした。NV4eiをDAPI（Sigma Aldrich（登録商標））で2分間染色した。脳切片を、二重コーティングされたスライド上に取り付け、Fluromount G（商標）（Thermofisher Scientific（登録商標））を使用してカバースリップした。

#### 【0148】

光顕微鏡および蛍光イメージングは、ライカDFC420カメラシステムにリンクされたライカDM 4000を使用して実施された。共焦点画像を、ライカTCS SP5 AOB S共焦点顕微鏡を使用して捕捉した。Image Jソフトウェア（国立衛生研究所）を用いて画像を分析した。

#### 【0149】

##### イムノプロット

Qiagen（登録商標）組織ライザーを使用して、プロテアーゼ阻害剤（Rocke（登録商標））を補充した氷冷0.32Mのスクロース中でマウス脳組織からタンパク質を抽出し、4度で15分間遠心分離した。タンパク質濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit（Thermo Scientific（登録商標））で測定した。10μgのタンパク質を、ジチオスレイトール（DTT）を含むLaemmli緩衝液（Bio-Rad Laboratories（登録商標））で変性させた。タンパク質を、Mini-PROTEAN TGX（商標）Stain Free Gels（Bio-Rad Laboratories（登録商標））で分離し、Trans-Blot Turbo Transfer膜（Bio-Rad Laboratories（登録商標））に移した。Biorad（登録商標）ブロッキング緩衝液で室温で1時間ブロッキングした後、膜を一次抗体ウサギeEF1A2（Proteintech（登録商標））、1:1000）およびマウスGAPDH（Ab Cam（登録商標））、1:10,000）と共に4で一晩インキュベートした。次いで、膜を、二次的Star Bright（商標）Blue 520ヤギ抗ウサギIgG（1:3000）およびSt

10

20

30

40

50

ar Bright (商標) Blue 700 ヤギ抗マウス IgG (1 : 3000) と共にインキュベートした。免疫反応性タンパク質は、Chemidoc MP (Bio-Rad Laboratories (登録商標)) を用いて可視化した。ロードされたサンプル n = 4 ~ 5 生物学的複製

#### 【0150】

##### qRT-PCR mRNA 転写物発現解析

RNAを、製造業者の指示に従って、RNeasy (商標) miniキット (Qiagen (登録商標)) で抽出した脳ホモジネート (前脳、皮質 n = 4 ~ 5 生物学的複製 / 群) から抽出し、Omega Fluostar (商標) で定量化した。混入DNAを、DNase I精製キット (NEB (登録商標)) を使用して全RNA (1 μg) から除去した後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Bioscience (登録商標)) を用いて逆転写を行った。次いで、10ngのDNAまたは合成cDNAを使用して、マルチブレックス hEEF1A2 および mGAPDH RT-qPCR (eEF1A2\_Fwd1 : ATCGTGGGCGTGAACAAA, eEF1A2\_Rev1 : GGTTGTAGCC GATCTTCTTGAT, eEF1A2\_Probe : ATCGTCAAAGGAAGT CAGCGCCTAC および マウスGAPDH For : ACGGCAAATTCAA CGGCAC, Rev : TAGTGGGTCCTCGCTCCTGG, Probe : TT GTCAATCAACGGGAAGCCCCATCA を Luna Taqman (商標) master mix (NEB (登録商標)) と共に Quantstudio (商標) Real-Time PCR System (Applied Biosystems (登録商標)) で実施した。GAPDHを内因性対照として使用し、相対的倍率変化を計算した。

#### 【0151】

##### 統計解析

GraphPad Prism (商標) バージョン8を使用して、各実験に合わせてカスタマイズされた統計解析を実施した。インビオ実験設計およびサンプルサイズは、NC3Rガイダンスおよび出力計算を使用して設計した。動物実験のほとんどの解析については、一元配置または二元配置分散分析を、ボンフェローニまたはテューキーの多重比較のいずれかを用いて実施した。

#### 【0152】

##### 結果

図10A～図10Kは、図2 (「V1」；配列番号55)、図3 (「V2」；配列番号56)、図4 (「V3」；配列番号57) および図6 (「V4」、配列番号58) に示すベクターゲノムを含む、AAV9ベクターを 2e10<sup>11</sup> vg / 動物で投与した場合の比較を示す。

#### 【0153】

図10A V1、V2、V3、およびV4 遺伝子治療で処置されたFBS処置野生型、wst/wst、脳室内処置wst/wst動物のカプラン・マイヤー生存プロット (2 × 10<sup>11</sup> vg / 仔、全遺伝子治療処置群 n = 6、野生型FBS n = 14、wst/wst FBS = 17)。遺伝子治療処置を受けた動物はすべて、有意な延命を示した (平均延命 V1 = 4.4 日、p = 0.001、V2 = 3.8 日 p = 0.0014、V3 10.7 日 p < 0.0001、V4 = 4.4 日 p = 0.001 Logrank Mantel-Cox検定)。図10B マウス動物の体重 (データ平均 ± S.E.M.) を、生後35日まで毎日、その後、時限犠牲点P60または人道的エンドポイントの15%体重減少まで毎週計量した。図10C、図10D、図10E、および図10F インバーテッドグリッド試験およびロータロッドによる筋力評価 (群当たり n = 4 ~ 7、各動物は15日および23日齢で3回試験した)。これらの試験では、ロータロッドのwst/wst および野生型FBS 対照群間で有意差は観察されなかった。wst/wst FBS動物では、野生型と比較して、P23で有意な握力の低下が観察され、これらの行動結果に遺伝子治療ベクターの効果は見られなかった (データ平均 ± S.E.M.、二元配置分散分

10

20

30

40

40

50

析)。図10G 野生型FBSを生理学的参照としたフリーフロー-ティング免疫組織化学法による、脳全体のeEF1A2の代表的な免疫染色(群当たりn=4~5、スケールバー-250μm) V1~4を注射したすべてのwst/wst動物は、脳全体でeEF1A2を発現し、V3で最も濃い染色および最も高い発現が観察された。図10H eEF1A2を共発現するニューロン(NeuNマーカー)の皮質脳領域における代表的な免疫組織蛍光(群当たりn=4~5、200μm)。すべてが、野生型と比較して高い発現を伴うニューロン発現プロファイルを示す。蛍光強度によって観察された最も高い発現は、すべての皮質層を通して発現を示すV3であった。すべての画像は、一定の画像設定で取り込まれた。V2およびV4では、皮質層4および5でより離散的な発現が観察された。図10I 脳全体でeEF1A2発現を示す、定量化を伴う脳におけるeEF1A2の代表的な免疫プロットは、V4ベクターと比較して、中脳、小脳、および後脳領域においてより高い発現を有する、すべての遺伝子治療ベクターで達成された(データ平均±S.E.M、二元配置分散分析)。図10J V1ベクターで最も高いmRNA発現を示す、前脳におけるヒトeEF1A2転写物発現に対するqPCR(データ平均±S.E.M、二元配置分散分析)。図10K V1ベクターで最も高いmRNA発現を示す、前脳におけるヒトeEF1A2皮質発現に対するqPCR(データ平均±S.E.M、二元配置分散分析)。

10

#### 【0154】

##### 結論

これらの実験は、四つのベクターすべてが、EEF1A2遺伝子にホモ接合性ヌル変異を有するマウスモデル(マウスではwstと呼ばれる)において、eEF1A2の発現を回復できることを実証する。驚くべきことに、ベクターV1、V2、およびV3は、wst/wstマウスの生存を、P23を超えて、効果的かつ有意に延長することができる。(図10A)。さらに、実験は、脳、特に前脳(図10J)および皮質(図10K)におけるeEF1A2導入遺伝子の発現が、V1、V2またはV4よりもV3において大きいことを予想外に示している。理論に拘束されるものではないが、5'UTR(配列番号34)および/または3'UTR(配列番号48)を含むことは、予想に反して、遺伝子発現を治療的に増加させ、生存を延長するようである。

20

#### 【0155】

実施例5：EEF1A2疾患のD252Hマウスモデルにおける、中枢神経系へのヒトEEF1A2タンパク質のAAV9を介した送達の効果

組織特異的翻訳伸長因子eEF1A2をコードするEEF1A2におけるヘテロ接合性デノボ変異は、しばしば重度のてんかんおよび知的障害を含む、神経発達障害を引き起こすことが示されている。約50種類のミスセンス変異が特定されているが、明らかな機能喪失変異は存在しない。しかし、大きなヘテロ接合性欠失は、生命に適合することが知られている。ミスセンスD252H変異を引き起こす疾患を担持するノックインeEF1A2マウスモデルは、同じ遺伝的背景を持つヌルホモ接合体よりも深刻な影響を受け、体重の減弱、神経スコアの増加、およびP23までの死亡を示す。ミスセンス変異に対してヘテロ接合性のマウスは、行動異常は示さないが、一過性の握力障害を伴う体格および運動機能において性特異的欠損を有する。d122ex3ヌルマウスマルクと並んで、このD252H新規マウスの表現型解析は、D252H変異を支持し、機能獲得をもたらす(Davies, Faith CJ, et al. Human Molecular Genetics (2020))。本実施例は、ヘテロ接合性およびホモ接合性のD252Hマウスの両方における遺伝子治療研究について説明する。

40

#### 【0156】

##### 材料および方法

処置マウスおよび未処置マウスの生存および体重は、発症過程にわたってモニタリングされた。行動試験も、P18~24日齢の間に実施された。

#### 【0157】

##### 動物福祉

50

すべての動物実験は、英国内務省および1986年の動物（科学的手順）法に準拠し、ユニバーシティ・カレッジ・ロンドンの倫理審査委員会のガイドラインの範囲内で実施された。ヘテロ接合性D252H-eEFF1A2ノックインマウスを時間交配させて、混合遺伝子型同腹仔を生成した。仔は、プライマー5'-3'AGGCTACCCCTTAGGCAGGT, TGAACAAATGGTAGGTTGGGAGGを使用して、P0で遺伝子型決定した。PCR増幅後、試料をHin1II (Thermo Fisher)による制限消化にかけた。

#### 【0158】

##### 試験物質および対照物質の投与

新生児ホモ接合性ノックインマウス (D252H-/-) に対し、 $5 \mu\text{L}$  の V3 ベクターまたは製剤緩衝液 (FB) 物品の投与を、 $1.8 \times 10^{11} \text{ vg}$  / 仔の用量で片側脳室内注射により達成した。試験物質または FB 対照物質を、以下によって説明された注入部位座標を用いて、33ゲージのハミルトン針 (Fisher Scientific (登録商標)、Loughborough, UK) を介して、野生型およびヘテロ接合体 D252H に投与した。Kim et al. Kim, J.Y. et al. J Vis Exp 91:51863 (2014)。ラムダ縫合は、新生仔において識別可能であり、意図される注射部位は、ラムダ縫合から眼球への 2/5、矢状縫合から約 0.8 mm ~ 1 mm 外側、ラムダとブレグマの中間の位置である。注射後、仔は雌親に戻された。

#### 【0159】

##### 体重

個々の動物の体重を P1 - P32 から収集し、その後毎週収集した。15%以上の体重減少は、安樂死の人道的エンドポイントに達する。

#### 【0160】

##### 行動試験

すべての行動試験アッセイは、動物治療群に対して盲検化された研究者によって実施された。ロータロッド試験：P18 - 24 からロータロッド訓練 / 試験を実施した。マウスを、4 ~ 40 r.p.m. の連続加速度で、最大 2 分間、ロータロッド (Harvard Apparatus) 上に置いた。マウスがロッドから落ちた時間を、各試験日に各動物について 3 回の試行 (落下までの潜時) で記録した。インバーテッドグリッド試験：インバーテッドグリッド試験は、30 cm の高さの透明なプラスチックの箱の上に置くステンレス鋼グリッド ( $41 \times 25 \text{ cm}$ ) 上にマウスを置くことが含まれる。インバーテッドグリッドから落ちる潜時を最大 2 分で記録する。試験の各日に、マウス当たり 3 回、インバーテッドグリッド試験を繰り返す。

#### 【0161】

##### 結果

図 11A ~ 図 11C は、未処理の D252H-/- マウスの表現型を示す。図 11A : FB S 処置野生型、ノックアウト (D252H-/-)、脳室内 V3 遺伝子治療処置 D252H-/- ( $2 \times 10^{11} \text{ vg}$  / 仔、V3 処置 = 2、V4 処置 = 1、野生型 FB S n = 5、D252H-/- FB S = 3 のカプラン・マイヤー生存プロット。図 11B マウスの体重 (データ平均  $\pm$  S.E.M.)。図 11C ロータロッドによる運動評価 (データ平均  $\pm$  S.E.M.、二元配置分散分析、およびダネットの多重比較)。

#### 【0162】

##### 結論

これらの実験は、V3 を有する D252H-/- マウスにおける eEFF1A2 の AA V9 を介した発現が、未処置の D252H-/- 対照と比較して生存率を高め得ることを示す。さらに、D252H-/- ホモ接合性マウスでは、ロータロッドのパフォーマンスは一貫して低いものの、D252H-/- V3 処置マウスでは経時に一貫して改善傾向が観察される。アリオリに定義された長期安全性 / 忍容性試験では、D252H-/- ヘテロ接合性マウスにおける V3 の脳室内投与後の eEFF1A2 の過剰発現は、生存または機能的転帰測定に有害な影響を与えるようには見えない。ホモ接合性およびヘテロ接合性

10

20

30

40

50

の D 2 5 2 H マウスの両方で進行中の解析は、この e E F 1 A 2 欠損モデルにおける A A V 9 を介した e E F 1 A 2 過剰発現の長期的な影響をさらに特徴付ける。

#### 【 0 1 6 3 】

実施例 6 : E E F 1 A 2 疾患の D E L 2 2 E X 3 マウスモデルにおける、中枢神経系へのヒト E E F 1 A 2 タンパク質の A A V 9 を介した送達の効果

C R I S P R / C a s 9 生成された D e l . 2 2 . e x . 3 e E F 1 A 2 マウスモデルを生成して、e E F 1 A 2 発現をノックアウトした (D a v i e s , F a i t h C J , e t a l . H u m a n M o l e c u l a r G e n e t i c s 2 0 2 0 )。C R I S P R / C a s 9 変異誘導から生成された E e f 1 a 2 のエクソン 3 内の 2 2 塩基対の欠失は、ヌル変異をもたらした。これらの D e l 2 2 e x 3 マウスは、発症後 (約 2 1 ~ 2 5 日)、早期発症の運動ニューロン変性と麻痺に加え、致命的なてんかん発作という臨床的に相対する症状に苦しみ、あまり長く生存できない重度の表現型を呈する。本実施例は、ホモ接合性 D e l 2 2 e x 3 e E F 1 A 2 ヌルマウスにおける遺伝子治療研究を記述するものである。  
10

#### 【 0 1 6 4 】

##### 材料および方法

処置されたマウスおよび未処置マウスの生存および体重を、発達過程にわたって監視した。行動試験も、P 2 1 - 2 5 日齢のクリティカルウィンドウの間で実施された。

#### 【 0 1 6 5 】

##### 動物福祉

すべての動物実験は、英国内務省および 1 9 8 6 年の動物（科学的手順）法に準拠し、ユニバーシティ・カレッジ・ロンドンの倫理審査委員会のガイドラインの範囲内で実施された。ヘテロ接合性 D e l 2 2 e x 3 マウスを時間交配させて、混合遺伝子型の同腹仔を生成した。仔をプライマー 5 ' - 3 ' 5 ' - T G A G T T G T G C C T C T A C C C T T - 3 ' および 5 ' - T A C A G G C A C A T C C C A G G T G T - 3 ' を使用して P 0 で遺伝子型決定した。  
20

#### 【 0 1 6 6 】

##### 試験物質および対照物質の投与

V 3 ベクターまたは製剤緩衝液 (F B S) 1 0 μ L (各半球 5 μ L、両側) の脳室内注射を、2 × 1 0<sup>1 1</sup> v g / 仔 (V 3 高用量) または 2 × 1 0<sup>1 0</sup> v g / 仔 (V 3 低用量) の用量で、新生児ホモ接合性 D e l 2 2 e x 3 マウス (D e l 2 2 e x 3) に投与した。対照としての製剤緩衝液 (F B S、5 μ L、両側) を、野生型およびホモ接合性 D e l 2 2 e x 3 マウスに 3 3 ゲージのハミルトン針 (F i s h e r S c i e n t i f i c (登録商標), L o u g h b o r o u g h , U K) を介して、以下に描写された注射部位座標を用いて投与した。K i m e t a l . K i m , J . Y . e t a l . J V i s E x p 9 1 : 5 1 8 6 3 (2 0 1 4)。ラムダ縫合は、新生仔において識別可能であり、意図される注射部位は、ラムダ縫合から眼球への 2 / 5 、矢状縫合から約 0 . 8 m m ~ 1 m m 外側、ラムダとブレグマの中間の位置である。注射後、仔は雌親に戻された。  
30

#### 【 0 1 6 7 】

##### 体重

個々の動物の体重を P 1 - P 3 0 は毎日収集し、その後毎週収集した。1 5 % 以上の体重減少を、安楽死に対する人道的エンドポイントの基準として使用した。  
40

#### 【 0 1 6 8 】

##### 行動試験

P 2 1 - 2 5 日目 (P 2 1 は訓練日とみなされる) に、ロー・タロッドの訓練および試験が行われた。すべての行動アッセイは、動物治療群に対して盲検化された研究者によって実施された。マウスを、4 ~ 4 0 r . p . m . の連続加速度で、最大 2 分間、ロー・タロッド (H a r v a r d A p p a r a t u s) 上に置いた。マウスがロッドから落ちた時間を、各試験日に各動物について 3 回の試行 (落下までの潜時) で記録した。

#### 【 0 1 6 9 】

10

20

40

50

握力メーター（Biosedb（登録商標））を使用して、P21-25の間の筋力を測定した（P21は訓練日とみなされる）。すべての四肢または前肢の握力を三回測定し、各試験の間に1分間の休憩を入れ、マウスが休ませるようにした。各試験では、マウスを尾の付け根で保持し、前肢または四肢すべてで掴むまでグリッド上に降ろした。

#### 【0170】

##### 神経スコア

レッジ試験：各マウスを、空のケージの棚に配置し、自由に探索させた。マウスがケージの端に沿って歩き、その中に着地するのを観察し、それに応じて採点した：0 = 自信をもった歩き方と良い着地、1 = 歩行中につまずきとぐらつき、2 = つまずきとぐらつき、棚から滑るが持ち直す、3 = 棚に沿って歩くことができない

10

#### 【0171】

後肢の掴み試験：マウスの尾の付け根近くを掴み、10秒間空中に吊るした。後肢の位置を観察し、以下のように採点した：0 = 後肢は一貫して腹部から外側を向いている、1 = 後肢を身体側にわずかに引き寄せる動作が吊るされた時間の50%以上、2 = 後肢を腹部の方へ下向きにしているのが吊るされた時間の50%以上、3 = 後肢を完全に引き寄せて腹部に触れているのが吊るされた時間の50%以上。

#### 【0172】

歩行試験：動物を平らな表面上に置き、その頭部が治験責任医師とは反対に向かって歩行する様子を後方から観察し、行動を以下のように採点した：0 = マウスは正常に動く、体重は全肢で支持される、腹部は地面に触れない、両方の後肢が均等に参加している、1 = 軽度の振戦が観察される、骨盤のわずかな隆起またはわずかなぐらつきが認められる、2 = 重度の振戦、骨盤の隆起または顕著なぐらつき、3 = 動きがばらばら、骨盤の隆起および重度のぐらつきを伴うつまずき。マウスは全く動かない場合もある。

20

#### 【0173】

脊柱後弯症検査：マウスを平坦な表面上に置き、歩行中に側面から観察し、以下のように採点した：0 = 歩きながら脊椎を簡単にまっすぐにできる、1 = 軽度の脊柱後弯症（脊椎の湾曲）だが、歩行時、ほとんどまっすぐにできる、2 = 脊椎を完全にまっすぐにできず、軽度だが持続的な脊柱後弯症を維持する、3 = 歩行時または座位時に、顕著な脊柱後弯症を維持する。

30

#### 【0174】

握力測定：肢の筋力は、握力計（Biosedb（登録商標））を使用して、P21-25歳で測定され、また、P30歳およびP60歳で測定される。前肢の握力を三回測定し、各試験の間に1分間の休憩を入れ、マウスが休ませるようにする。各試験では、マウスを尾の付け根で保持し、前肢で掴むまでグリッド上に降ろす。

#### 【0175】

##### 結果

図12A V3高用量（ $2 \times 10^{11}$  vg / 仔 n = 5）を受けているD122ex3マウス、V3低用量（ $2 \times 10^{10}$  vg / 仔 n = 5）を受けているD122ex3マウス、製剤緩衝液（n = 3）を受けているD122ex3対照、および製剤緩衝液（n = 6）を受けている野生型対照のカプラン・マイヤー生存プロット。図12B 経時的なマウスの体重（データ平均 ± S.E.M.）。図12C P22-25での握力測定による運動評価（データ平均 ± S.E.M.）

40

図12D P23での握力測定。（データ平均 ± S.E.M.、二元配置分散分析、およびテューキーの多重比較）。図12E P22-25でのロータロッドによる運動評価（データ平均 ± S.E.M.）

図12F P24でのロータロッド（データ平均 ± S.E.M.、二元配置分散分析、およびテューキーの多重比較）。

図12G P21-25の神経学的スコア。

#### 【0176】

##### 結論

50

この実験は、V3を有するホモ接合性De122e×3マウスにおけるeEFlA2のAAV9を介した発現による用量関連の利益を実証する。治療効果は、生後36日目（これまでの最終評価時点）までの生存年齢の延長、体重増加、握力およびロータロッドによって測定される筋力および運動行動、ならびに神経学的スコアの正常な悪化の改善によって示される。V3高用量処置動物では、最大でも生後25日目までしか生存しない未治療のホモ接合性De122e×3対照と比較して、より長期の生後36日目までの生存が観察される。また、V3低用量群では、対照と比較して、生存期間も生後28日目まで延長される。V3高用量群では、野生型同腹仔対照に匹敵する体重増加がある。握力測定は、未処置の対照では筋力の低下を示し、野生型動物では年齢の増加と共に握力の増加を示す。V3高用量処置動物では、未処置の対照と比較して、P22~25まで持続する握力増加が見られる。生後23日目に、V3高用量処置マウスは、野生型同腹仔と同等に、有意に強い握力測定( $p = 0.0046$ )を示す。V3低用量では効果は認められない。ロータロッド落下の潜時は、未処置およびV3低用量と比較して、生後22~25日目のV3高用量で持続的なパフォーマンスを示し、両方とも年齢と共に低下の傾向を示す。生後24日目に、V3高用量処置動物は、未処置と比較して、有意に高いロータロッドパフォーマンスを示し( $p = 0.0016$ )、野生型同腹仔と同等である。V3低用量群には効果は認められない。AAV9-eEFlA2の有益性に関する追加の証拠は、V3処置動物の神経学的スコアに見出すことができる。De122e未処理対照の神経スコアは、P21~25の年齢と共に増加し、神経行動学的低下と一致する。これは、V3高用量処置動物が、生後21~25日に野生型同腹仔と同等であるため、観察されない。また、V3低用量群でも、少なくともP24まで、De122e未処理動物と比較して、持続的に低い神経スコアが観察される。

10

20

30

40

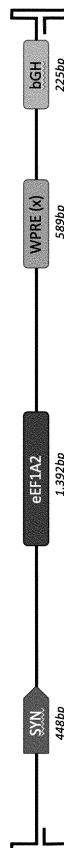
50

## 【図面】

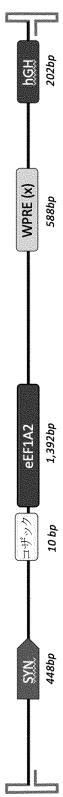
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】



10

20

30

40

50

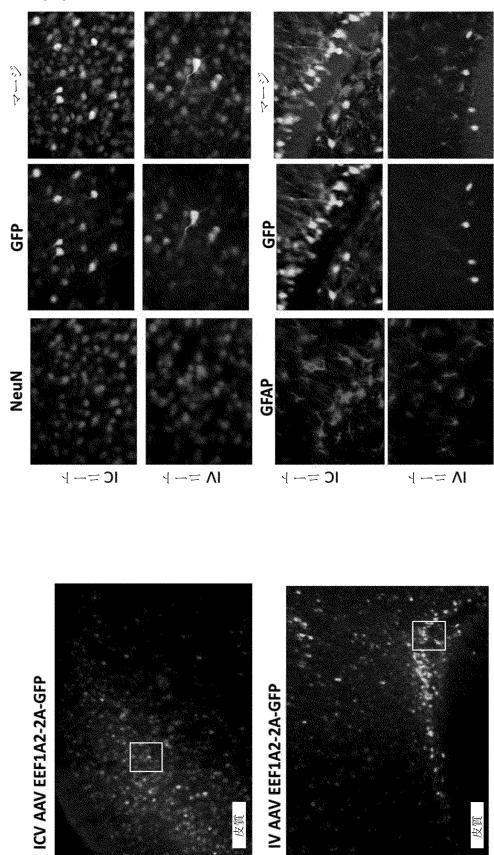
【図5】



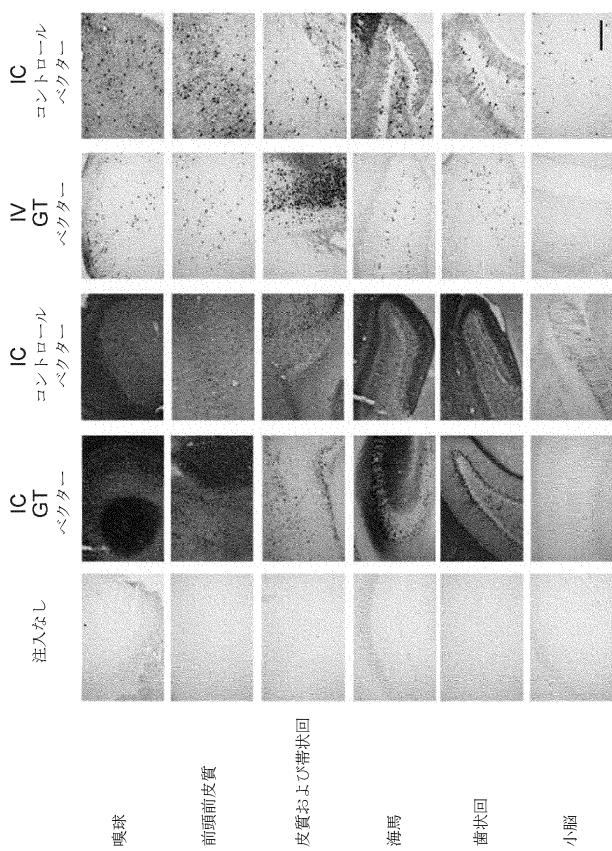
【図6】



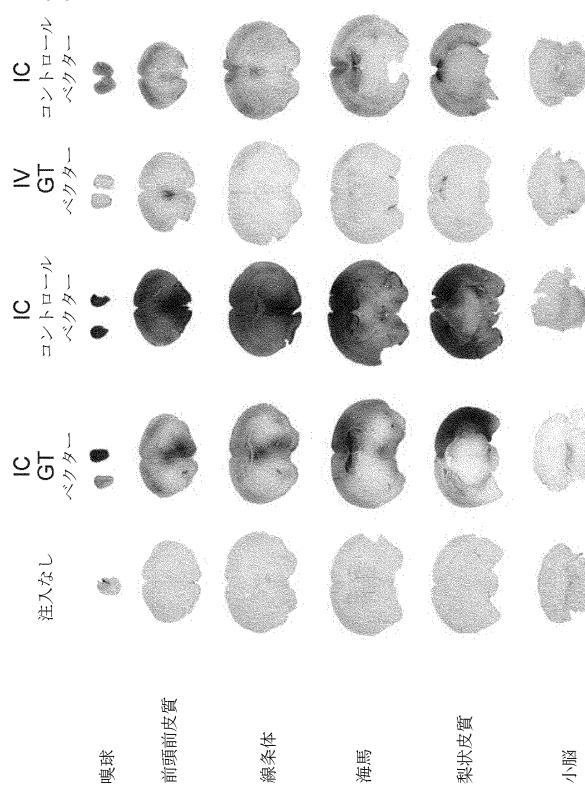
【図7】



【図8 B】



【図8 A】



10

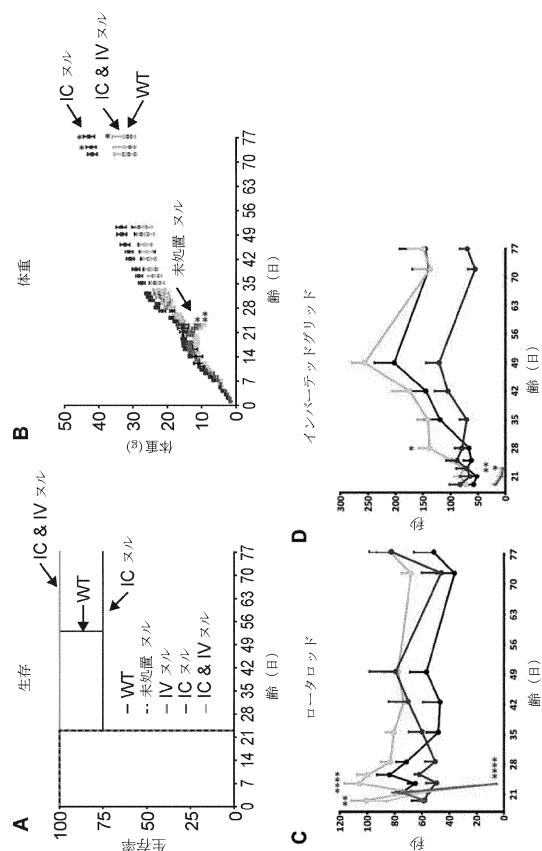
20

30

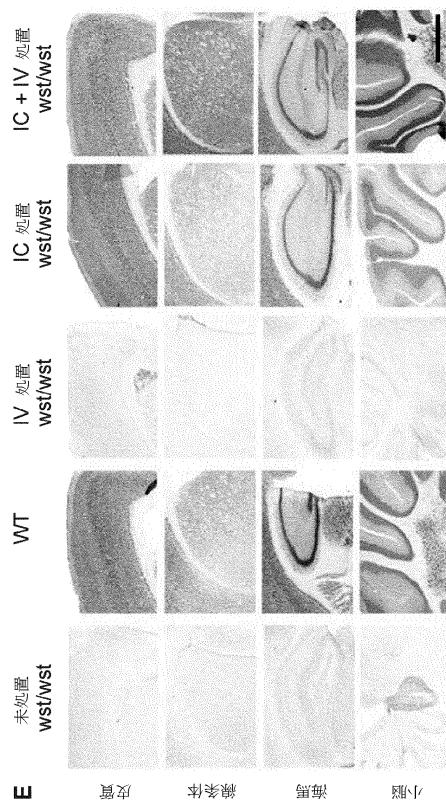
40

50

【図9 - 1】

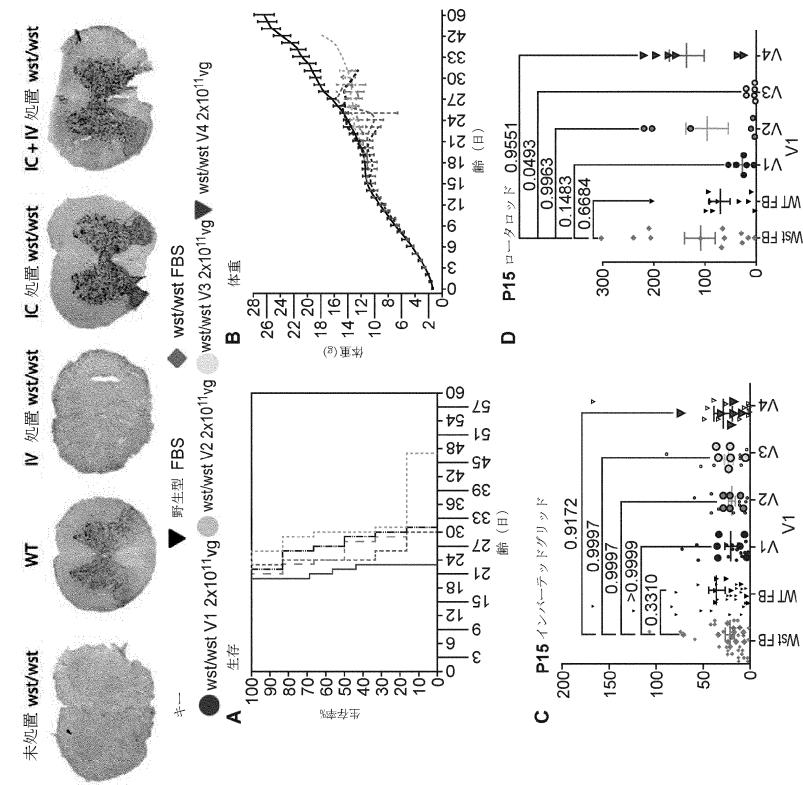


【図 9 - 2】



E 小脳 海馬 陳側体 背側体

【図 10 - 1】



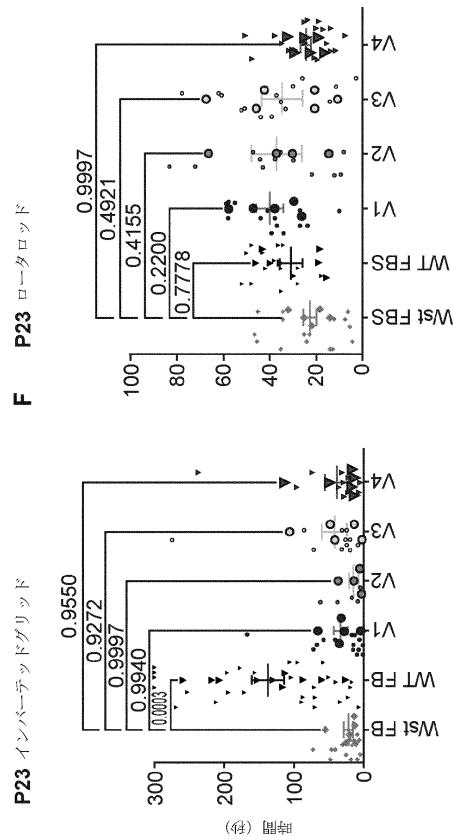
10

20

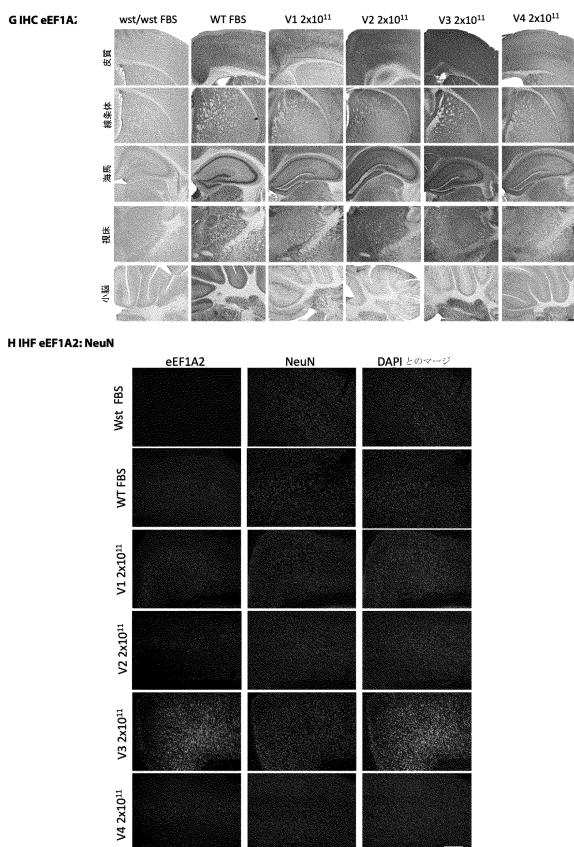
30

40

【図 10 - 2】

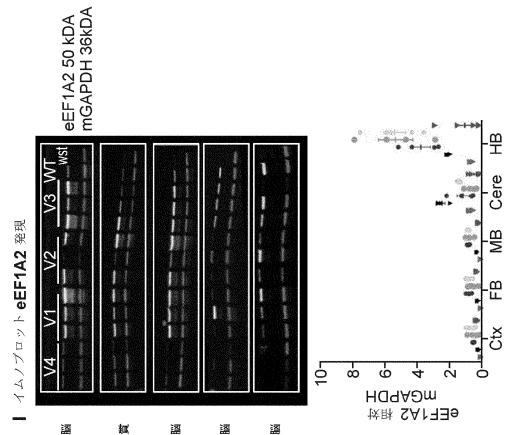
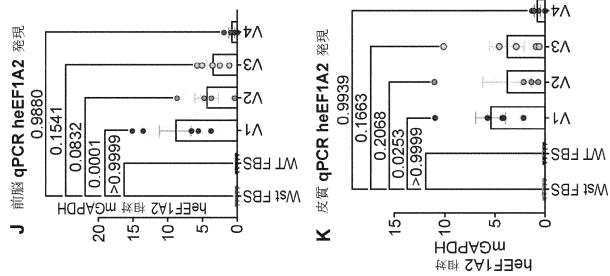
E P23 インバーテッドグリッド  
F WST FB  
G WST FBS  
H IHF eEF1A2:NeuN

【図 10 - 3】



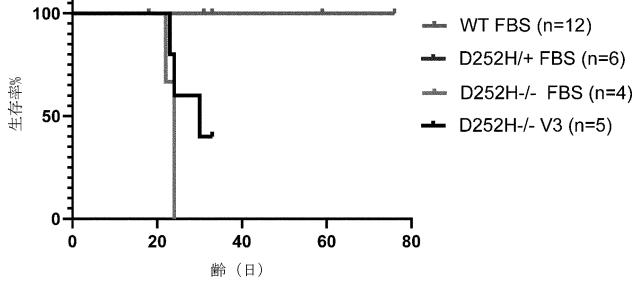
50

【図 1 0 - 4】



【図 1 1 A】

【図 1 1 A】



10

20

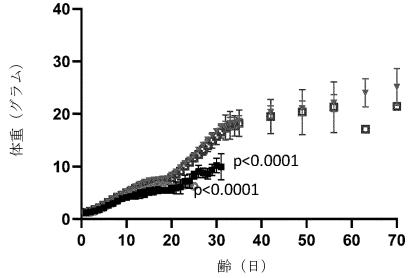
30

40

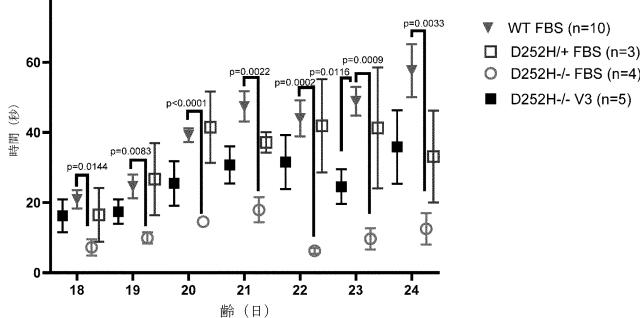
50

【図 1 1 B】

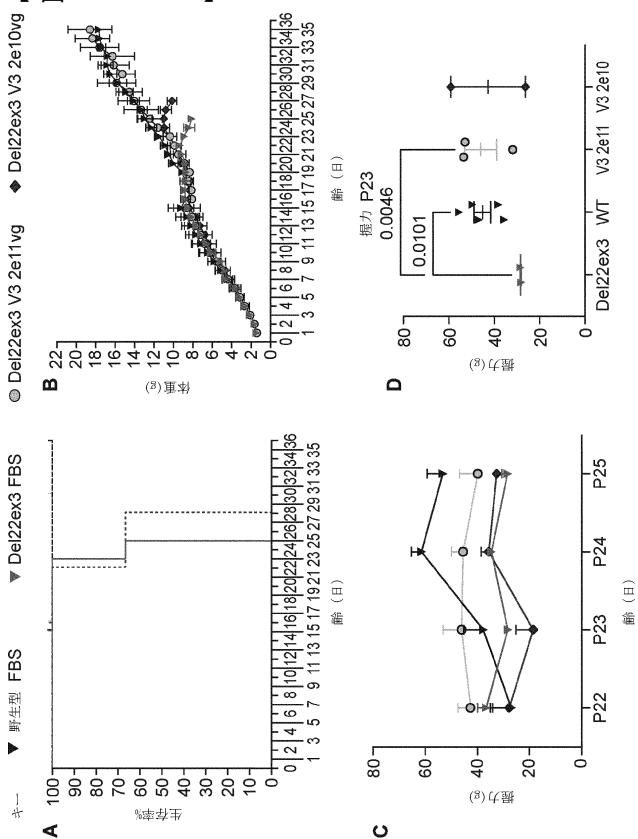
- ▼ WT FBS (n=12)
- D252H/+ FBS (n=6)
- D252H-/- FBS (n=4)
- D252H-/- V3 (n=5)



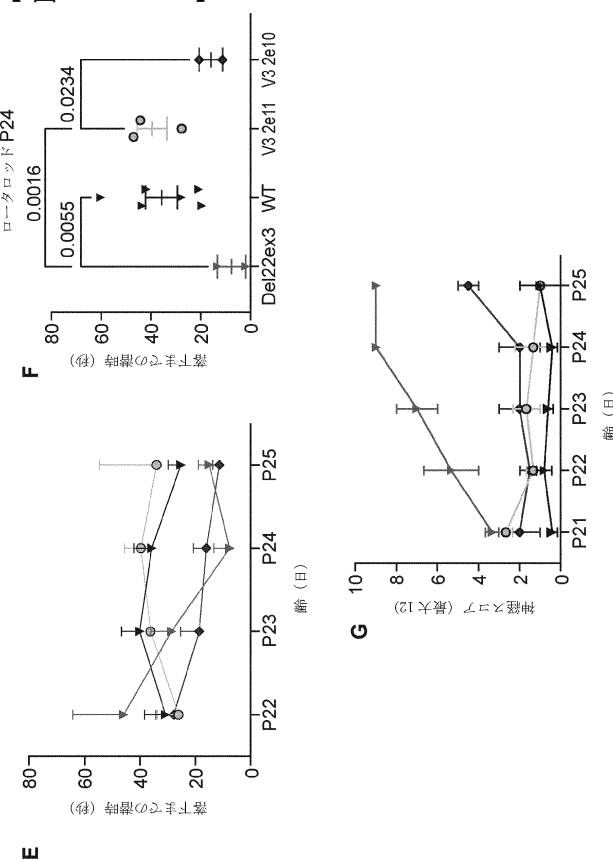
【図 1 1 C】



【図 1 2 - 1】



【図 1 2 - 2】



## 【配列表】

2023535576000001.app

10

20

30

40

50

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2021/070455
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K48/00 C12N15/86 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 C07K A61K

10

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, 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	<p>NG J ET AL: "OR02: AAV9 gene therapy rescue of an eEF1A2 knockout mouse model", HUMAN GENE THERAPY; ANNUAL CONFERENCE OF THE BRITISH-SOCIETY-FOR-GENE-AND-CELL-THERAPY, MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, GB; SHEFFIELD, UK</p> <p>, vol. 30, no. 8 1 August 2019 (2019-08-01), page A10, XP009527089, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/HUM.2019.29087.ABSTRACTS Retrieved from the Internet: URL:<a href="http://online.liebertpub.com/loi/hum">http://online.liebertpub.com/loi/hum</a> [retrieved on 2019-08-16] abstract</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-71

20

<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/>	See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>			
			"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	11 November 2021	Date of mailing of the international search report	23/11/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer	Luo, Xinmei	

30

40

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

page 1 of 2

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2021/070455

**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:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/EP2021/070455
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NG JOANNE ET AL: "194. AAV9 Gene Therapy Rescue of an eEF1A2 Knockout Mouse Model", MOLECULAR THERAPY; 23RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-FOR-GENE-AND-CELL-THERAPY , ELSEVIER INC, US</p> <p>, vol. 28, no. 4, Suppl. 1 28 April 2020 (2020-04-28), pages 95-96, XP009527090, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/J.YMTHE.2020.04.019 Retrieved from the Internet: URL:<a href="https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(20)30200-8">https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(20)30200-8</a> [retrieved on 2020-04-28]</p> <p>abstract</p> <p>-----</p>	1-71
A	<p>SUN YU ET AL: "The eukaryotic translation elongation factor eEF1A2 induces neoplastic properties and mediates tumorigenic effects of ZNF217 in precursor cells of human ovarian carcinomas", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 123, no. 8, 15 October 2008 (2008-10-15), pages 1761-1769, XP055798826, US</p> <p>ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.23708 the whole document</p> <p>-----</p>	1-71
A	<p>WO 2015/168666 A2 (GENZYME CORP [US]) 5 November 2015 (2015-11-05) paragraph [0001] - paragraph [0010]</p> <p>-----</p>	1-71
A	<p>WO 2017/049252 A1 (SWITCH BIO INC [US]) 23 March 2017 (2017-03-23) paragraph [0001] - paragraph [0022]</p> <p>-----</p>	1-71
1		40

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/070455

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2015168666	A2 05-11-2015	AU 2015252797 A1 AU 2021200242 A1 BR 112016025263 A2 CA 2946593 A1 CL 2016002713 A1 CL 2018000170 A1 CN 106661591 A CR 20160555 A DK 3137497 T3 DO P2016000280 A EA 201692206 A1 EP 3137497 A2 EP 3913061 A1 GT 201600227 A HR P20211024 T1 HU E054768 T2 JP 6741591 B2 JP 2017518271 A JP 2020164540 A KR 20160147974 A LT 3137497 T PE 20170260 A1 PH 12016502046 A1 PL 3137497 T3 PT 3137497 T SG 10201809739Q A SG 10201912977R A SG 11201607991W A SI 3137497 T1 TW 201625792 A US 2017096683 A1 US 2021189430 A1 UY 36106 A WO 2015168666 A2	17-11-2016 18-03-2021 20-02-2018 05-11-2015 11-08-2017 29-06-2018 10-05-2017 27-01-2017 12-07-2021 30-11-2016 31-03-2017 08-03-2017 24-11-2021 22-01-2018 01-10-2021 28-09-2021 19-08-2020 06-07-2017 08-10-2020 23-12-2016 26-07-2021 12-04-2017 06-02-2017 25-10-2021 12-07-2021 28-12-2018 27-02-2020 28-10-2016 31-08-2021 16-07-2016 06-04-2017 24-06-2021 30-11-2015 05-11-2015	10
WO 2017049252	A1 23-03-2017	AU 2016324317 A1 CA 2998491 A1 CN 108348528 A EP 3349760 A1 HK 1252741 A1 JP 2018531926 A KR 20200108514 A US 2018193414 A1 WO 2017049252 A1	08-03-2018 23-03-2017 31-07-2018 25-07-2018 31-05-2019 01-11-2018 21-09-2020 12-07-2018 23-03-2017	20
				30
				40

## フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード(参考)

A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A
A 6 1 K 38/18 (2006.01)	A 6 1 K 38/18	

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,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,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

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ワディントン サイモン ニコラス

英国 ダブリュ3 6 ピーエイ ロンドン アクトン バーリントン ガーデンズ 4シー

(72)発明者 カルダ ラジヴィンダー

英国 エスエル6 0 ピービー パークシャー メイデンヘッド タプロウ バス ロード 711

(72)発明者 ハルツォク クリストファー ディーン

アメリカ合衆国 101118 ニューヨーク州 ニューヨーク フィフス アベニュー 350 ジ エンパイア ステート ビルディング スイート 7530 ロケット ファーマシューティカルズ リミテッド内

(72)発明者 エング ジョアン

英国 エスイー1 7 ジーディー ロンドン ベルヴェディア ロード 1ビー カウンティ ホール サウス ブロック 122

(72)発明者 サクラメント チェスター

アメリカ合衆国 101118 ニューヨーク州 ニューヨーク フィフス アベニュー 350 ジ エンパイア ステート ビルディング スイート 7530 ロケット ファーマシューティカルズ リミテッド内

(72)発明者 ショルジ ステファニー

英国 エヌ7 6 ピーエス ロンドン アクミンスター ロード ジーエフエフ 104

(72)発明者 リックス デイビッド

アメリカ合衆国 101118 ニューヨーク州 ニューヨーク フィフス アベニュー 350 ジ エンパイア ステート ビルディング スイート 7530 ロケット ファーマシューティカルズ リミテッド内

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DB52 MA66

NA14 ZA021 ZA022 ZA061 ZA062 ZA941 ZA942

4C087 AA01 AA02 BC83 CA08 CA12 MA66 NA14 ZA02 ZA06 ZA94