

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7587275号**  
**(P7587275)**

(45)発行日 令和6年11月20日(2024.11.20)

(24)登録日 令和6年11月12日(2024.11.12)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	48/00 (2006.01)	F I	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/76 (2015.01)		A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	38/50 (2006.01)		A 6 1 K	38/50
A 6 1 P	21/00 (2006.01)		A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/02 (2006.01)		A 6 1 P	25/02

Z N A

請求項の数 14 (全43頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-511593(P2021-511593)

(86)(22)出願日 令和1年8月30日(2019.8.30)

(65)公表番号 特表2021-535168(P2021-535168)  
A)

(43)公表日 令和3年12月16日(2021.12.16)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/048985

(87)国際公開番号 WO2020/047368

(87)国際公開日 令和2年3月5日(2020.3.5)

審査請求日 令和4年6月2日(2022.6.2)

(31)優先権主張番号 62/724,780

(32)優先日 平成30年8月30日(2018.8.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

(73)特許権者 518138871

ローワン・ユニバーシティ

アメリカ合衆国、ニュージャージー州

08028、グラスボロ、マリカ ヒル

ロード 201

(74)代理人 110002077

園田・小林弁理士法人

(72)発明者 フランシス・ジェレミー

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08

034, チェリー ヒル, コッツウォ

ールド レーン 312

(72)発明者 レオーネ・パオラ

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08

034, チェリー ヒル, コッツウォ

ールド レーン 312

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 筋萎縮性側索硬化症の治療方法または予防方法

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターに担持された配列番号1のアミノ酸配列を有するアスパルトアシラーゼ(ASA PA)をコードする核酸を含む、

ミトコンドリア機能の利益のために脊髄及び脳におけるNAA異化作用を増加させることによって脊髄及び脳における神経アスパラギン酸の量を増加させることにより、ALSを発症するリスクがあるまたはALSに罹患している対象を治療することにおける使用のための、治療有効量の組成物であって、

対象は、ALSについて対象をスクリーニングすることにより同定される、使用のための組成物。

**【請求項2】**

前記組成物の投与は、前記対象において、脳及び脊髄組織におけるNAA異化作用を増加させ、且つ運動ニューロンの生存を強化する、請求項1に記載の使用のための組成物。

**【請求項3】**

前記対象は、第2の治療薬を投与される、請求項1または2に記載の使用のための組成物。

**【請求項4】**

前記第2の治療薬は、前記組成物の前に、後に、またはそれと同時に前記対象に投与される、請求項3に記載の使用のための組成物。

**【請求項5】**

前記第2の治療薬は、リルゾール、エダラボン、またはそれらの塩もしくは溶媒和物、またはそれらの組み合わせである、請求項4に記載の使用のための組成物。

**【請求項6】**

前記組成物は、遺伝子治療組成物として提供される、請求項1に記載の使用のための組成物。

**【請求項7】**

前記アミノ酸配列は、配列番号1の配列からなる、請求項1から6のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

**【請求項8】**

前記核酸は、ウイルス形質導入によって前記対象の少なくとも1つの細胞に導入され、好ましくは、前記組成物には、前記核酸を含むウイルスまたはウイルス様粒子が提供される、請求項1から7のいずれか一項に記載の使用のための組成物。 10

**【請求項9】**

前記組成物は、前記対象の脳及び脊髄の少なくとも一部に投与される、請求項1から8のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

**【請求項10】**

前記組成物は、経口、非経口、経皮、経肺、鼻腔内、頬側、髄腔内、および静脈内から選択される経路、好ましくは髄腔内経路、によって投与される、請求項1から9のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

**【請求項11】**

前記対象は哺乳動物であり、または、好ましくはヒトである、請求項1から10のいずれか一項に記載の使用のための組成物。 20

**【請求項12】**

対象の治療は、ALSの少なくとも1つの症状又はミトコンドリア機能障害を治療することを含む、請求項1から11のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

**【請求項13】**

rAAVベクターは、rAAV1ベクターである、請求項1から12のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

**【請求項14】**

ミトコンドリア機能の利益のために脊髄および脳におけるNAA異化作用を増加させることにより、脊髄および脳における神経アスパラギン酸の量を増加させることによって、ALSを発症するリスクがある、またはALSに罹患している対象を治療することにおける使用のためのキットであって、 30

前記キットは、rAAV1ベクターまたはrAAV1ベクターを含むウイルス様粒子を含み、

前記ウイルスまたはウイルス様粒子は、配列番号1の配列のアミノ酸配列を有するAS PAをコードする核酸を含む、キット。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)の下、2018年8月30日に出願された米国仮特許出願第62/724,780号に対する優先権を主張する。前述の出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

**【0002】**

本発明は、概して、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を治療または予防する方法に関し、より具体的には、アスパラギン酸を提供する目的で、罹患細胞集団において、罹患細胞に細胞質ゾルNADHを利用してミトコンドリアの酸化的リン酸化を促進する能力を提供するリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの律速成分であるアスパルトアシラーゼ(ASA PA)の細胞内活性を増加させることによって、ALSを治療する、軽減する、改善する、ま 40

10

20

30

40

50

たは逆転させる方法に関する。

【背景技術】

【0003】

運動ニューロン疾患（MND）またはルーゲーリック病としても知られる筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、随意筋を制御するニューロンの死を引き起こす疾患である。これは、成人発症性の進行性機能障害と、運動皮質の上位運動ニューロン、ならびに脳幹、脊髄、およびそれらに関連する索の下位運動ニューロンの喪失とを特徴とする。ALSに罹患している、またはそのリスクがある患者は、筋肉のこわばり、筋攣縮、筋肉のサイズの減少により次第に悪化する脱力感を呈する。その結果、発話、嚥下、そして最終的には呼吸が困難になる。

10

【0004】

ALSの治療法は判明していないが、FDAは、ALSの進行を遅らせることを特異的に目的とした2つの治療法を承認している。リルゾール（リルテック（登録商標））は、ALSのための最初のFDA承認薬であり、延髄発症を呈する有限臨床母集団において約2~3ヶ月寿命を延長することができる。エダラボン（Radicava（登録商標））は、静脈内投与されるALSのための別のFDA承認の治療選択肢である。臨床データは、対照プラセボ群と比較してALS機能評価尺度（ALSFRS-R）スコアが改善することを示唆している。しかしながら、ALS患者におけるエダラボンの長期有効性はまだ決定されていない。非侵襲的換気は、生活の質と寿命の両方を改善する可能性があるが、本質的には厳密に姑息的である。この疾患は、あらゆる年齢の人々に発症する可能性があるが、通常は60歳前後で始まり、遺伝性の場合は50歳前後で発症する。発症から死亡までの平均生存期間は2~4年である。約10%が10年以上生存し、ほとんどが呼吸不全で死亡する。

20

【0005】

したがって、ALSを予防する、治療する、または逆転させるための方法および試薬を提供するという、当該技術分野における差し迫った、満たされていない必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【0006】

本開示は、いくつかの態様において上記の必要性に対応する。一態様において、本開示は、それを必要とする対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の少なくとも1つの症状を治療する、改善する、または逆転させる方法を提供する。この方法は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化のための基質を提供することを目的として、対象の細胞中のアスパルトアシラーゼ（ASA）のレベルまたは活性を増加させる治療有効量の組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、投与組成物は、対象の細胞におけるASAのタンパク質発現レベルを増加させる。

30

【0007】

いくつかの実施形態において、組成物は、遺伝子治療組成物を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号1の配列と少なくとも75%、85%、95%、99%同一のアミノ酸配列を有する、ASAまたはその機能的断片をコードする核酸を含み得る。

40

【0008】

いくつかの実施形態において、この方法は、ウイルス形質導入によって対象の少なくとも1つの細胞に核酸を導入することを含む。組成物には、核酸を含むウイルスまたはウイルス様粒子を提供することができる。いくつかの実施形態において、核酸は、AAV9等の組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクター上に担持される。

【0009】

いくつかの実施形態において、この方法は、対象の脊髄の少なくとも一部に組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、対象の脊髄の一部に局所投与される。

50

**【0010】**

いくつかの実施形態において、この方法は、対象に第2の治療薬を投与することをさらに含む。第2の治療薬は、組成物の前に、後に、またはそれと同時に対象に投与することができる。いくつかの実施形態において、第2の治療薬は、リルゾール(6-(トリフルオロメトキシ)-2-ベンゾチアゾラミン)、またはその塩もしくは溶媒和物である。いくつかの実施形態において、第2の治療薬は、エダラボン(5-メチル-2-フェニル-4H-ピラゾール-3-オン)、またはその塩もしくは溶媒和物である。いくつかの実施形態において、組成物は、経口、非経口、経皮、経肺、鼻腔内、頸側、髄腔内、および静脈内から選択される経路によって投与することができる。

**【0011】**

10

いくつかの実施形態において、対象は、ヒト等の哺乳類である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの細胞は対象の脊髄内にある。いくつかの実施形態において、対象は、ALSに関連する少なくとも1つの症状または突然変異を示す。いくつかの実施形態において、ALSの少なくとも1つの症状は、ミトコンドリア機能障害である。ミトコンドリアの構造、ダイナミクス、および生体エネルギーの破壊は、ALS患者およびモデル系において広く報告されており、疾患の病因に直接関与していることが示唆されている。

**【0012】**

いくつかの実施形態において、組成物の投与は、対象におけるミトコンドリアのエネルギー代謝のための基質を増強するであろう。いくつかの実施形態において、組成物の投与は、対象における細胞の生存を増加させる。いくつかの実施形態において、組成物の投与は、対象における運動ニューロンの生存を増加させる。いくつかの実施形態において、組成物の投与は、対象の平均余命を延長する。

20

**【0013】**

また、この開示の範囲内にある対象の細胞中のASPAのレベルまたは活性を増加させるためのキットも本開示の範囲内である。キットは、rAAVベクターまたはウイルス様粒子を含み、ウイルスまたはウイルス様粒子は、配列番号1の配列と少なくとも75%、85%、95%、または99%同一のアミノ酸配列を有する、ASPAまたはその機能的断片をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、ASPAまたはその断片をコードする核酸は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、rAAVベクターはAAV9である。

30

**【図面の簡単な説明】****【0014】**

本発明を説明する目的で、本発明の特定の実施形態が図面に示されている。しかしながら、本発明は、図面に示される実施形態の正確な配置および手段に限定されるものではない。図に示されるデータについて、アスタリスクは以下のレベルの統計的有意性を示す：  
\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、および\*\*\* p < 0.001。

**【0015】**

【図1】確立された方法論を使用して、40日後にALS患者由来のiPSCからインビトロで分化させたニューロンを示している。(Kiskinis et al., 2014, Cell Stem Cell)。細胞は、ニューロンマーカー、TUJ-1および運動ニューロンマーカー、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)に陽性である。

40

【図2】AAV-ASPAによる処理後のミトコンドリアアデノシン三リン酸(ATP)合成の回復を示している。ALS iPSCから生成された運動ニューロン培養物は、ASPAまたはGFPのいずれかを送達するために、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)で28日目に培養物中で形質導入した。40日目に、無傷のミトコンドリアを細胞から単離し、ATP合成についてアッセイした。ナイーブ野生型、非ALS細胞(WT)、ナイーブALS SOD1変異細胞(ALS)、AAV-GFP SOD1変異細胞(ALS GFP)、およびAAV-ASPA SOD1変異細胞(ALS ASPA)をアッセイした(n = 5 /群)。AAV-GFP陰性対照と比較してATP合成速度の有意な1.5倍の増加(jiM ATP /分 / 単離されたミトコンドリアのjig、反応当たり15ji

50

g を使用)が、AAV - ASPA処理ALS細胞で観察された。\*\* p < 0.005、\* p < 0.05。

【図3】NAAは、解糖系由来のアセチル補酵素A(ACCoA)と、細胞質ゾル還元等価物(NADH)のミトコンドリア内膜への移動に使用されるアスパラギン酸とを含むことを示している。どちらもミトコンドリアATP合成の基質であり、アスパラギン酸が、解糖系を電子伝達系の複合体I~Vによる酸化的リン酸化に結び付ける上で重要な役割を果たす。したがって、神経変性病態の影響を受けたニューロンでこの基質を遊離させると、エネルギー保存が増大する。

【図4 A】(総称して「図4」)は、代謝遺伝子治療の標的ニューロンを示している。成体マウスの海馬に送達された緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するAAVレポーターベクター。図4 Aは、ニューロン核抗原(NeuN)に対する抗体で標識されたGFP発現ニューロンの低倍率の共焦点顕微鏡画像を示す。図4 Bは、パネルAの白い矢印で強調表示された領域のより高い倍率を示している。NeuNで共標識された個々のGFP陽性細胞体(図4 C)がマージされた黄色のシグナルを発しているのが示され(画像の白黒複製の薄い色調で現れる)(図4 D)、それによりインビボでのニューロン指向性が裏付けられる。したがって、適切なAAVを使用して、当該治療遺伝子を、適切にパッケージングできる範囲で哺乳動物の脳のニューロンに送達することができる。データは、公開された方法論を使用して生成した(Francis, et al., 2006, Journal of Neuroscience Research 84(1):151-169; Francis, et al., 2011, Glia 59(10):1435-1446)。

【図4 B】(総称して「図4」)は、代謝遺伝子治療の標的ニューロンを示している。成体マウスの海馬に送達された緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するAAVレポーターベクター。図4 Aは、ニューロン核抗原(NeuN)に対する抗体で標識されたGFP発現ニューロンの低倍率の共焦点顕微鏡画像を示す。図4 Bは、パネルAの白い矢印で強調表示された領域のより高い倍率を示している。NeuNで共標識された個々のGFP陽性細胞体(図4 C)がマージされた黄色のシグナルを発しているのが示され(画像の白黒複製の薄い色調で現れる)(図4 D)、それによりインビボでのニューロン指向性が裏付けられる。したがって、適切なAAVを使用して、当該治療遺伝子を、適切にパッケージングできる範囲で哺乳動物の脳のニューロンに送達することができる。データは、公開された方法論を使用して生成した(Francis, et al., 2006, Journal of Neuroscience Research 84(1):151-169; Francis, et al., 2011, Glia 59(10):1435-1446)。

【図4 C】(総称して「図4」)は、代謝遺伝子治療の標的ニューロンを示している。成体マウスの海馬に送達された緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するAAVレポーターベクター。図4 Aは、ニューロン核抗原(NeuN)に対する抗体で標識されたGFP発現ニューロンの低倍率の共焦点顕微鏡画像を示す。図4 Bは、パネルAの白い矢印で強調表示された領域のより高い倍率を示している。NeuNで共標識された個々のGFP陽性細胞体(図4 C)がマージされた黄色のシグナルを発しているのが示され(画像の白黒複製の薄い色調で現れる)(図4 D)、それによりインビボでのニューロン指向性が裏付けられる。したがって、適切なAAVを使用して、当該治療遺伝子を、適切にパッケージングできる範囲で哺乳動物の脳のニューロンに送達することができる。データは、公開された方法論を使用して生成した(Francis, et al., 2006, Journal of Neuroscience Research 84(1):151-169; Francis, et al., 2011, Glia 59(10):1435-1446)。

【図4 D】(総称して「図4」)は、代謝遺伝子治療の標的ニューロンを示している。成体マウスの海馬に送達された緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するAAVレポーターベクター。図4 Aは、ニューロン核抗原(NeuN)に対する抗体で標識されたGFP発現ニューロンの低倍率の共焦点顕微鏡画像を示す。図4 Bは、パネルAの白い矢印で強調表示された領域のより高い倍率を示している。NeuNで共標識された個々のGFP陽性細胞体(図4 C)がマージされた黄色のシグナルを発しているのが示され(画像の白黒複

10

20

30

40

50

製の薄い色調で現れる) (図4D)、それによりインビボでのニューロン指向性が裏付けられる。したがって、適切なAAVを使用して、当該治療遺伝子を、適切にパッケージングできる範囲で哺乳動物の脳のニューロンに送達することができる。データは、公開された方法論を使用して生成した(Francis, et al., 2006, Journal of Neuroscience Research 84(1): 151-169; Francis, et al., 2011, Glia 59(10): 1435-1446)。

【図5】遺伝子治療を用いたシナプス機能の標的化を示している。AAVによって送達される組換えASPAによって異化された内因性NAAは、エネルギー代謝の基質を増加させ、ニューロンのシナプス伝達を支持するために利用可能なATPを増加させる。

【図6】アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼによって水素イオンがアスパラギン酸に移動してリンゴ酸を生成することにより、細胞質ゾルの解糖系によって生成されたNADHの還元力がミトコンドリア内膜空間に輸送されることを示している。アスパラギン酸は、グルタミン酸と引き換えにミトコンドリアから細胞質ゾルに移動する。次いで、細胞質ゾルのアスパラギン酸はリンゴ酸に変換され、細胞質ゾルのNADHの水素イオンを運んで、ミトコンドリアに自由に移動することができる。いったん中に入ると、リンゴ酸はリンゴ酸脱水素酵素によって変換されてアスパラギン酸に戻り、それによって水素イオンを遊離させてNADHを形成し、NADHはミトコンドリアの酸化的リン酸化を促進するために利用することができる。

【図7】ASPAによるNAAの切断によって生成された遊離アスパラギン酸が、解糖によって生成された還元型NADHをミトコンドリアに移動させるリンゴ酸-アスパラギン酸シャトル(MAS)で利用できるようになることを示している。このように利用可能なNADHは、電子伝達系複合体I~Vを駆動し、新たに合成されたATPで最高潮に達する。

【図8】単離された脊髄ミトコンドリアにおける、ASPAによって生成された遊離アスパラギン酸が駆動する酸化的リン酸化およびATP合成の実証のための方法論の概略図である。(1) 60mm皿のHeLa細胞に、構成的に発現する野生型ヒトASPA(WT)または非機能的変異アイソフォーム(E285A)のプラスミドをトランスフェクトした。(2)トランスフェクトされた細胞は48時間後に回収され、超音波処理によって機械的に溶解される。(3) 5mMの精製NAAを含む反応混合物に50μlのライセートを加え、37℃で2時間インキュベートして、トランスフェクトされたASPA酵素にNAA基質を異化させる。(4) 異化反応は熱で不活性化され、発光ベースのATP合成アッセイ用の反応ミックス中で、単離されたミトコンドリアに50μlが添加される。

【図9】G93A SOD脊髄から単離され、野生型ASPAでトランスフェクトしたHeLa細胞、E285A ASPAでトランスフェクトしたHeLa細胞、または生理食塩水で処理したHeLa細胞に由来する反応混合物とインキュベートしたミトコンドリアにおけるATP合成速度を図8に概略的に示している。野生型ASPAを燃料とする反応生成物を添加すると、アリコートのアスパラギン酸含有量に比例したATP合成速度が大幅に増加した(p=0.039)(表1を参照)。

【図10】髄腔内投与した生理食塩水またはAAV9-ASPAのいずれかで処理されたSOD G93A変異マウスにおける12~16週齢での平均潜時を示している。3回の個別試行の平均が、平均の標準誤差とともに示される(n=15/群)。

【図11A】(総称して「図11」)は、野生型、生理食塩水で処理したSODおよびAAV9-ASPAで処理したSODの16週齢マウスの脊髄におけるNAAおよびアデノシン三リン酸(ATP):アデノシン-リン酸(AMP)比(これ以後、ATP:AMP比)のHPLC分析を示している。A). 脊髄NAAの有意な減少は、ATP:AMP比(B)の関連する低下とともに、年齢を一致させた野生型と比較して生理食塩水SODマウスで観察され、使用に対するATPの産生量の低下に応答したNAAの病理学的減少が示唆される(AMPのレベルに反映)。NAAのレベルは、AAV9-ASPAで処理したSOD脊髄でさらに減少するが、ATP:AMPの対応する増加と関連しており、ATP合成の増加を示唆している。

10

20

30

40

50

【図11B】(総称して「図11」)は、野生型、生理食塩水で処理したSODおよびAAV9 - ASPAで処理したSODの16週齢マウスの脊髄におけるNAAおよびアデノシン三リン酸(ATP) : アデノシンーリン酸(AMP)比(これ以降、ATP : AMP比)のHPLC分析を示している。A). 脊髄NAAの有意な減少は、ATP : AMP比(B)の関連する低下とともに、年齢を一致させた野生型と比較して生理食塩水SODマウスで観察され、使用に対するATPの産生量の低下に応答したNAAの病理学的減少が示唆される(AMPのレベルに反映)。NAAのレベルは、AAV9 - ASPAで処理したSOD脊髄でさらに減少するが、ATP : AMPの対応する増加と関連しており、ATP合成の増加を示唆している。

【図12】野生型、生理食塩水で処理したSODおよびAAV9 - ASPAで処理したSOD脊髄から単離されたミトコンドリアにおけるATP合成速度を示している。ミトコンドリアは、市販の発光ベースのキットを使用してアッセイした。AAV9 - ASPA形質導入SOD脊髄から単離されたミトコンドリアにおけるATP合成速度は、生理食塩水で処理したSOD脊髄ミトコンドリアよりも有意に優れており、ASPA遺伝子治療を介したNAA由来アスパラギン酸の供給がエネルギー代謝を増強する効果的な手段であり、ALSの運動機能に対する関連する利点を呈することが示唆される。平均ATP合成速度、+/-提示される標準誤差(n=5/群)。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0016】

本発明は、一態様において、細胞におけるアスパルトアシラーゼ(ASPA)等のアミノアシラーゼの発現の増加を使用して、それを必要とする対象におけるALSの1つ以上の症状を予防する、治療する、または逆転させることができるという予期せぬ発見に関する。特定の実施形態において、本発明の組成物および方法は、ALS患者のミトコンドリア機能障害を治療または予防する。他の実施形態において、本発明の組成物および方法は、ALSに冒された細胞におけるエネルギー代謝のための基質を増強する。さらに他の実施形態において、本発明の組成物および方法は、ALS患者の細胞生存を促進する。さらに他の実施形態において、本発明の組成物および方法は、ALS患者における運動ニューロンの生存を促進する。さらに他の実施形態において、脊髄におけるASPAの過剰発現は、ALS患者の平均余命を延長する。さらに他の実施形態において、治療は、人工多能性幹細胞(iPSC)から生成された患者由来の運動ニューロンを利用する。さらに他の実施形態において、治療は、患者の神経系の患部への移植のためにASPA(またはその機能的断片)を過剰発現するように操作された幹細胞、前駆細胞、または患者由来の人工多能性幹細胞(iPSC)を利用する。さらに他の実施形態において、ASPAの発現および送達構築物の構築は、エクスピボで行われる。いくつかの実施形態において、ASPAの発現は、ALS対象のものと比較して、エクスピボでのヒト筋肉組織外植片の変性率の低下を示し得る。別の実施形態において、治療は、ALSおよび関連する障害に対する1回限りの遺伝子治療である。

##### 【0017】

主要な神経変性疾患の病因は多因子的であり、完全には定義されていないが、ミトコンドリアの完全性を増強する治療戦略は、高次機能の進行性喪失を遅らせる可能性を有する。特にALSの場合、ミトコンドリア機能障害は、興奮毒性、タンパク質恒常性の喪失、および軸索輸送の欠陥等の、ALSに関連する全ての想定される毒性機構に直接的または間接的に関連していると考えられる。研究された異なるインビトロおよびインビボモデルにおいて想定される病原性機構の違いにもかかわらず、ミトコンドリア電子伝達系(ETC)活性およびATPレベルの低下は、家族性および孤発性ALSの両方に共通する特徴として現れる。

##### 【0018】

本発明は、ALSのニューロンに、内因性アミノ酸誘導体であるN-アセチルアスパラギン酸(NAA)内に隔離された特定のエネルギー基質にアクセスする手段を供給するための新規遺伝子治療介入を提供する(図3)。NAAは通常、グリア加水分解酵素ASP

10

20

30

40

50

Aによる異化作用によるA c C o Aの供給を介して、酸化的リン酸化から脂質合成を切り離すことにより、白質産生グリア細胞のATPを保存するように機能する。ニューロンはASPAを自然に発現しないため、NAAを異化することはできない。ASPAによるNAAの異化作用により、遊離酢酸（グリアがA c C o Aの合成に使用）およびアスパラギン酸が生じる。酢酸とは異なり、ニューロンのアスパラギン酸は、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトル（Aralar1）のサブユニットの特定の基質であるため、解糖系還元等価物をミトコンドリアに移動させるためのシャトル機構の不可欠な構成要素である（図3）。遊離酢酸塩は、グリア細胞と比較して、エネルギー代謝のために酢酸塩を処理することができる利用可能な生化学的機構が比較的少ないため、ニューロンのエネルギー代謝の基質としては不十分であり、酢酸塩は、ニューロン機能を支援する上でグルコースの代わりにはなれない。神経系に提供される放射標識酢酸のフラックスの分析は、実際、ニューロンと比較してグリア細胞による主な使用を実証しており、細胞質ゾルにおけるアスパラギン酸のリンゴ酸への変換を必要とするプロセスである、Aralar1による細胞質ゾルNADHのミトコンドリアETCへの移動には酢酸は関与していない。特定の非限定的な実施形態において、内因性NAAを異化する能力をニューロンに提供することにより、ミトコンドリアへの解糖系還元等価物のシャトルのためにアスパラギン酸を提供することによって、病理学的代謝異常に直面して予備のATP保存が促進される。少なくとも1つの実施形態において、本発明は、ALSを発症するリスクのあるまたはALSに罹患している対象において、ミトコンドリアへの解糖系還元等価物のシャトルのためのアスパラギン酸塩の利用可能性を高める方法に関する。10

#### 【0019】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、確立された臨床的安全性および有効性プロファイルを備えた遺伝子送達への非常に有望で魅力的なアプローチとして浮上しており、ニューロンの標的化に非常に効率的である。AAVベクターの設計と関連する投与技術の進歩により、脳および脊髄における広範な遺伝子送達が可能になり、AAVは神経変性疾患の治療に非常に適するようになった。少なくとも1つの実施形態において、本発明は、配列番号1の配列と少なくとも75%、85%、95%、99%同一のアミノ酸配列を有する、ASPAまたはその機能的断片をコードする核酸を含む遺伝子治療組成物を送達するためのAAV血清型を用いる。20

#### 【0020】

本開示は、SOD（G93A）トランスジェニックマウスの加速ロータロッドの成績によって測定されるように、ALSマウスマodelの脊髄の運動ニューロンにおけるアミノアシラーゼの発現が、運動機能の長期的な改善をもたらすことを示した。ロータロッドの成績の改善は、検出可能な脊髄エネルギー通貨（ATP）の増加および検出可能な遊離アスパラギン酸の関連する増加に関連していた。この結果は、アスパラギン酸の生物学的利用能およびミトコンドリア機能と、ALSの病理に直面した際のETC機能およびエネルギー通貨の生成との機構的関連を示唆するものであった。具体的には、ASPA活性の増加に起因する余分な生物学的に利用可能なアスパラギン酸の提供は、ATPの形態でエネルギー通貨を生成するために、アスパラギン酸が律速的であるリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの活性を促進することが示されている。少なくとも1つの実施形態において、本発明の方法論は、ALSを発症するリスクのあるまたはALSに罹患している対象の脊髄におけるアスパラギン酸の生物学的利用能を増加させる。30

#### 【0021】

一態様において、本開示は、それを必要とする対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の少なくとも1つの症状を治療する、改善する、または逆転させる方法を提供する。この方法は、対象の細胞中のアスパルトアシラーゼ（ASPA）のレベルまたは活性を増加させる治療有効量の組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、投与組成物は、対象の細胞におけるASPAのタンパク質発現レベルを増加させる。さらに別の実施形態において、本発明の方法は、ALSに罹患している患者の脊髄におけるNAA異化作用を増加させることに関する。40

### 【 0 0 2 2 】

別の実施形態において、本発明の治療を必要とする対象は、運動機能の低下を経験したか、または認知障害とは異なる病状を伴う運動機能障害を経験するリスクがある対象である。別の実施形態において、運動障害のリスクがあり、ハリスおよびベネディクトの式に基づいて測定した場合に 1 を超える代謝比を示し得る代謝亢進状態を呈する対象は、提案された介入の候補である。別の実施形態において、必要とする対象は、主に運動系に影響を及ぼさない他の疾患によって提示されない可能性がある活動電位の維持に対する高い代謝要求を有する脊髄の運動ニューロンに関連する欠陥を呈し得る。他の実施形態において、必要とする対象は、つまずき、物を落とす、腕および / または脚の異常な倦怠感、不明瞭な発話、筋肉の痙攣および攣縮、ならびに / または制御不能な笑いまたは泣きの期間を伴って、漸進的な発症、無痛、進行性の筋力低下を示し得る。いくつかの実施形態において、呼吸筋の衰弱に苦しんでいる対象は、呼吸を補助するために恒久的な換気支援を必要とし得る。

### 【 0 0 2 3 】

他の実施形態において、本発明の治療を必要とする対象は、例えば、A L S 2 (アルシン)、T B K 1 (T A N K 結合キナーゼ 1)、T U B A 4 A (チューブリン、アルファ 4 A)、A N G (アンギオゲニン)、M A T R 3 (マトリン - 3)、C H C H D 1 0 (コイルドコイルヘリックスコイルドコイルヘリックスドメイン含有 10)、N E K 1、P F N 1 (プロフィリン - 1)、C 2 1 O R F 2、M O B P、S C F D 1、S E T X (セナタキシン)、F U S、T D P 4 3、V C P (バロシン含有タンパク質)、またはA L S に関連する酵素 (例えば、K I F 5 A、イネシンファミリーメンバー 5 A)、およびO P T N (オプチニューリン) に突然変異を含む、A L S の適切な診断および発症において決定的であり得る突然変異を示し得る。別の実施形態において、突然変異は、C 9 O R F 7 2 遺伝子にあり得るか、または遺伝子が突然変異したときに起こるR N A の蓄積を引き起こし得る。さらに別の実施形態において、対象は、そのような突然変異の存在について最初にスクリーニングされ得る。さらにいくつかの実施形態において、スクリーニングは、上記に特定した突然変異のうちの少なくともいずれか 2 つ以上を特定するためのものである。

### 【 0 0 2 4 】

別の実施形態において、本発明は、A L S 2、T B K 1、T U B A 4 A、A N G、M A T R 3、C H C H D 1 0、N E K 1、P F N 1、C 2 1 O R F 2、M O B P、S C F D 1、S E T X、F U S、T D P 4 3、V C P、またはO P T N に突然変異を示す対象に治療的に有効な遺伝子治療薬を投与することに関する。さらに別の態様において、適切なスクリーニングされた対象は、配列番号 1 の配列と少なくとも 7 5 %、8 5 %、9 5 %、または 9 9 % 同一のアミノ酸配列を有する、A S P A またはその機能的断片をコードする核酸を含む遺伝子治療組成物を投与され得る。別の実施形態において、同定された対象は、配列番号 1 およびA A V - 9 を含む遺伝子治療組成物を投与され得、脊髄において増加したレベルのN A A 異化作用を呈する。少なくとも 1 つの実施形態において、本発明は、A L S の臨床症状を呈する患者、ならびに上記の遺伝子突然変異または細胞軸索動態に関するタンパク質および細胞のクリアランス機構に関するタンパク質に発生する遺伝子突然変異の少なくとも 1 つを同定することにより、T B K 1、T U B A 4 A、N E K 1、C 2 1 O R F 2、M O B P、S C F D 1、F U S、およびT D P 4 3 における突然変異、またはそのような突然変異の任意の組み合わせを示し得るA L S 症状を呈する患者に、開示される遺伝子治療薬を投与することに関する。

### 【 0 0 2 5 】

少なくとも 1 つの実施形態において、本発明は、C u / Z n スーパーオキシドジスムターゼ (S O D 1) に突然変異を示す対象に本発明の遺伝子治療薬を投与し、特に、A L S の少なくとも 1 つの臨床症状を呈するそのような患者の脊髄ミトコンドリアにおけるN A A 異化作用のレベルを増加させることに関する。遺伝的起源を有する (家族性A L S ) のは 5 ~ 1 0 % のみであり、家族性A L S 症例の約 2 0 % のみがC u / Z n スーパーオキシドジスムターゼ (S O D 1) に変異を有することが示唆されている。A L S に関連するS

10

20

30

40

50

O D 1 の変異は、タンパク質安定性の低下を引き起こす。これらの突然変異は、活性部位、シート、モノマー界面を含むタンパク質構造全体に発生する。この目的のために、本発明の少なくとも 1 つの実施形態は、S O D 1 突然変異を示す患者に本発明の遺伝子治療薬を投与する方法に関する。さらに別の実施形態において、本発明は、S O D 1 突然変異を有する対象を同定することと、A S P A またはその断片をコードする核酸を含み、配列番号 1 および A A V - 9 のアミノ酸配列を含む組成物を前記対象に投与することと、そのような対象の脊髄における N A A 異化作用のレベルを増加させることを含む方法に関する。

#### 【 0 0 2 6 】

他の実施形態において、必要とする対象は、健康な患者と比較して、進行性脳幹変性を伴うもしくは伴わない上位および下位運動ニューロン変性、神経状態の低下、または筋電図検査 (EMG) による試験後の筋力低下を示す。しかし、そのような患者は、ドーパミン受容体占有率の低下を示さず、L-ドーパの投与に反応せず、また、そのような対象は、アルツハイマー病に罹患する患者のように認知喪失に関連する症状を示さない。

10

#### 【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態において、組成物は、遺伝子治療組成物を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号 1 の配列と少なくとも 75%、85%、95%、または 99% 同一のアミノ酸配列を有する、A S P A またはその機能的断片をコードする核酸を含み得る。いくつかの実施形態において、A S P A またはその断片をコードする核酸は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。

20

#### 【表 1】

配列番号	配列	情報
配列番号 1	MTSCHIAEEHIQKVAIFGGTHGNELTGVFLVKHWLENGAEIQRT GLEVKPFITNPRAVKKCTRYIDCDLNRFIDLENLGKKMSEDLPY EVRAQEINHLFGPKDSEDSYDIIFDLHNTTSNMGCTLILEDSRN NFLIQMFHYIKTS LAPLPCYVYLIEHPSLKYATTRSIAKYPVGIEV GPQPQGVLRADILDQMRKMIKHALDFIHHFNEGKEFPPCAIEVY KIIEKVDYPRDENGEIAIIHPNLQDQDWKPLHPGDPMFLTLDG KTIPLGGDCTVYPVFVNEAAYYEKKEFAKTTKLTLNAKSIRCC LH	ASPA(UniParc P45381-1)

30

#### 【 0 0 2 8 】

また、本開示の範囲内には、A S P A と有意な同一性を有するバリエント、変異体、および相同体が含まれる。例えば、そのようなバリエントおよび相同体は、本明細書に記載の A S P A の配列と、少なくとも約 70%、約 71%、約 72%、約 73%、約 74%、約 75%、約 76%、約 77%、約 78%、約 79%、約 80%、約 81%、約 82%、約 83%、約 84%、約 85%、約 86%、約 87%、約 88%、約 89%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、または約 99% の配列同一性を有する。

40

#### 【 0 0 2 9 】

ポリペプチドに関して使用される場合の「バリエント」および「変異体」という用語は、1 つ以上のアミノ酸が別の通常関連するポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を指す。バリエントは、置換アミノ酸が、類似の構造的特性または化学的特性を有する、「保存的」変化を有し得る。ある種の保存的アミノ酸置換は、類似の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸のグループは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族 - ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸のグループは、セリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、アスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸のグループは

50

、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸のグループは、リジン、アルギニン、およびヒスチジンであり；硫黄含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的なアミノ酸置換基は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、およびアスパラギン - グルタミンである。ごくまれに、バリアントは、「非保存的」な変化を有し得る（例えば、グリシンのトリプトファンへの置換）。類似の軽微な変化はまた、アミノ酸の欠失もしくは挿入（すなわち付加）、またはその両方を含み得る。どのおよびいくつのアミノ酸残基が、生物学的活性を消失させることなく置換、挿入または欠失され得るかを決定する際の指針は、当該技術分野で周知のコンピュータプログラム、例えばDNASTarソフトウェアを用いて見出すことができる。バリアントは、機能アッセイで試験することができる。好ましいバリアントは、10%未満、好ましくは5%未満、さらにより好ましくは2%未満の変化（置換、欠失等）を有する。

#### 【0030】

「相同体」または「相同」という用語は、ポリペプチドに関して使用される場合、2つのポリペプチド間の高度な配列同一性、または三次元構造間の高度の類似性、または活性部位と作用機序の間の高度な類似性を指す。好ましい実施形態において、相同体は、参照配列と、60%を超える配列同一性、より好ましくは75%を超える配列同一性、さらにより好ましくは90%を超える配列同一性を有する。ポリペプチドに適用される「実質的な同一性」という用語は、デフォルトのギャップ重みを使用するプログラムGAPまたはBESTFIT等によって最適に整列された場合に、2つのペプチド配列が少なくとも75%の配列同一性を共有することを意味する。

#### 【0031】

本明細書で使用される場合、遺伝子を発現することは、細胞が、遺伝子によってコードされる完全長ポリペプチドまたは完全長ポリペプチドの機能的断片のいずれかを产生することを意味する。「機能的」という用語は、「断片」と組み合わせて使用される場合、その断片である実体または分子の生物学的活性に実質的に類似する生物学的活性を有するポリペプチドを指す。この文脈における「実質的に類似する」とは、対応する野生型ペプチドの関連するまたは所望の生物学的活性の少なくとも25%、少なくとも35%、少なくとも50%が保持されることを意味する。例えば、ポリペプチドの機能的断片は、細胞で発現される遺伝子によってコードされる完全長ポリペプチドの酵素活性と実質的に類似の酵素活性を保持する。

#### 【0032】

「過剰発現」は、正常または非形質転換細胞／生物における産生のレベルを超える細胞／生物における遺伝子産物の産生を指す。例えば、それは、基礎レベルのmRNAを発現する（例えば、ASPAタンパク質をコードするもの）または基礎レベルのタンパク質を有する類似の対応する未修飾細胞／生物と比較した場合の、タンパク質（複数可）（例えば、ASPAタンパク質またはその相同体）をコードするmRNAの高いレベル（例えば、異常なレベル）、および／またはタンパク質（複数可）（例えば、ASPA）の高いレベルを指し得る。特定の実施形態において、ASPAまたはその相同体は、増加したmRNA、タンパク質、および／またはASPAの活性を示すように設計された細胞／生物において、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、15倍、またはそれ以上過剰発現され得る。

#### 【0033】

ASPAの発現は、ASPAポリペプチドまたはその断片の1つ以上をコードする核酸を有する1つ以上の発現ベクターを導入することによって誘導することができる。ポリペプチドまたはその断片は、ベクターの適切な部位に挿入することができる（例えば、プロモーターに作動可能に連結される）。発現ベクターは、トランスフェクション、形質導入、感染、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、もしくはDEAE - デキストラン法または他の既知の技術等の周知の方法によって、增幅およ

10

20

30

40

50

び／またはポリペプチド発現のために選択された宿主細胞に導入される。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知である。

#### 【0034】

A S P A タンパク質の発現には多種多様なベクターを使用することができる。特定のウイルスが受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞に感染もしくは侵入する能力、および宿主細胞ゲノムに組み込まれてウイルス遺伝子を安定的かつ効率的に発現する能力のために、それらは外来核酸を細胞に異動する魅力的な候補となっている。したがって、特定の実施形態において、ウイルスベクターを使用して、A S P A タンパク質またはその断片をコードするヌクレオチド配列を、発現のために宿主細胞に導入する。ウイルスベクターは、1つ以上の制御配列、例えばプロモーターに作動可能に連結されたA S P A タンパク質またはその断片をコードするヌクレオチド配列を含み得る。あるいは、ウイルスベクターは制御配列を含まない場合があり、代わりに、宿主細胞内の制御配列に依存して、A S P A タンパク質またはその断片の発現を駆動する。核酸を送達するために使用され得るウイルスベクターの非限定的な例は、アデノウイルスベクター、A A V ベクター、およびレトロウイルスベクターを含む。

#### 【0035】

例えば、アデノ随伴ウイルス（A A V）を使用して、A S P A タンパク質またはその断片をコードするヌクレオチド配列を、発現のために宿主細胞に導入することができる。A A V 系は以前に記載されており、当該技術分野で一般的に周知である（K e l l e h e r and V o s , Biotechniques , 17 ( 6 ) : 1 1 1 0 - 7 , 1 9 9 4 ; C o t t e n et al . , Proc Natl Acad Sci U S A , 8 9 ( 1 3 ) : 6 0 9 4 - 6 0 9 8 , 1 9 9 2 ; C u r i e l , Nat Immun , 1 3 ( 2 - 3 ) : 1 4 1 - 6 4 , 1 9 9 4 ; M u z y c z k a , Curr Top Microbiol Immunol , 1 5 8 : 9 7 - 1 2 9 , 1 9 9 2 ）。r A A V ベクターの生成および使用に関する詳細は、例えば、米国特許第5,139,941号および同第4,797,368号に記載されており、それぞれ、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0036】

いくつかの実施形態において、レトロウイルス発現ベクターを使用して、A S P A タンパク質またはその断片をコードするヌクレオチド配列を、発現のために宿主細胞に導入することができる。これらの系は以前に記載されており、当該技術分野で一般的に周知されている（N i c o l a s and R u b i n s t e i n , In : V e c t o r s : A s u r v e y o f m o l e c u l a r c l o n i n g v e c t o r s a n d t h e i r u s e s , R o d r i g u e z and D e n h a r d t , eds . , S t o n e h a m : Butterworth , pp . 4 9 4 - 5 1 3 , 1 9 8 8 ; T e m i n , In : G e n e T r a n s f e r , K u c h e r l a p a t i ( ed . ) , N e w Y o r k : P l e n u m P r e s s , pp . 1 4 9 - 1 8 8 , 1 9 8 6 ）哺乳動物細胞における真核生物発現のためのベクターの例は、C M V 、S V 4 0 、E F - 1 、U b C 、R S V 、A D V 、B P V 、- アクチン等のプロモーターを使用する、A D 5 、p S V L 、p C M V 、p R c / R S V 、p c D N A 3 、P b p v 等、およびワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス等のウイルス系に由来するベクターを含む。

#### 【0037】

レトロウイルスと適切なパッケージング株との組み合わせも有用であり得、キャプシドタンパク質が標的細胞を感染させるために機能する。通常、細胞およびウイルスは培養培地中で少なくとも約24時間培養される。細胞は、次いで、いくつかの用途において短期間、例えば24～73時間、または少なくとも2週間、培養培地中で増殖させられ、分析前に5週間以上増殖させられ得る。一般的に使用されるレトロウイルスベクターには「欠陥がある」、すなわち、増殖感染に必要なウイルスタンパク質を産生することができない。ベクターの複製には、パッケージング細胞株での増殖が必要である。レトロウイルスの

10

20

30

40

50

宿主細胞特異性は、エンベロープタンパク質env (p120) によって決定される。エンベロープタンパク質は、パッケージング細胞株によって提供される。エンベロープタンパク質には、同種指向性、両種指向性、異種指向性の少なくとも3つの種類がある。同種指向性エンベロープタンパク質をパッケージングされたレトロウイルス、例えばMMLVは、ほとんどのマウスおよびラットの細胞型に感染することができる。同種指向性パッケージング細胞株はBOSC23を含む。両種指向性エンベロープタンパク質を有するレトロウイルス、例えば4070Aは、ヒト、イヌ、およびマウスを含むほとんどの哺乳動物細胞型に感染することができる。両種指向性パッケージング細胞株は、PA12およびPA317を含む。異種指向性エンベロープタンパク質をパッケージングされたレトロウイルス、例えばAKR envは、マウス細胞を除くほとんどの哺乳動物細胞型に感染することができる。ベクターは、例えば、Cre / Lox等のリコンビナーゼ系を用いて後に除去されなければならない遺伝子を含み得るか、または、それらを発現する細胞は、例えばヘルペスウイルスTK、bcl-xS等の選択的毒性を可能にする遺伝子を含むことによって破壊される。適切な誘導性プロモーターは、トランسفェクトされた細胞またはその子孫のいずれかである、所望の標的細胞型において活性化される。

#### 【0038】

いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas9系、デザイナーリンガード、転写活性化因子様エフェクター(TALE)、またはホーミングメガヌクレアーゼ等のゲノム編集技術が、細胞において記載されるASPAタンパク質の発現を誘導するため利用可能である。一般に、「CRISPR/Cas9系」は、Cas遺伝子をコードする配列、tracr(トランス活性化CRISPR)配列(例えば、tracrRNAまたは活性部分tracrRNA)、tracr-mate配列(内因性CRISPR系に関して「ダイレクトリピート」およびtracrRNAによりプロセシングされる部分ダイレクトリピートを包含)、ガイド配列(内因性CRISPR系に関して「スペーサー」とも称される)、またはCRISPR遺伝子座からの他の配列および転写物を含む、CRISPR関連('Cas')遺伝子の発現またはその活性の誘導に関する転写物および他のエレメントを集合的に指す。CRISPR系の1つ以上のエレメントは、I型、II型、またはIII型CRISPR系に由来し得る。あるいは、CRISPRシステムの1つ以上のエレメントは、化膿性連鎖球菌等の内因性CRISPR系を含む特定の生物に由来し得る。一般に、CRISPR系は、標的配列の部位でのCRISPR複合体の形成を促進するエレメント(内因性CRISPR系に関してプロトスペーサーとも称される)によって特徴付けられる。いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas9系、デザイナーリンガード、転写活性化因子様エフェクター(TALE)、またはホーミングメガヌクレアーゼ等のゲノム編集技術が、細胞において記載されるASPAタンパク質の発現を誘導するために利用可能であり、ミトコンドリアの酸化的リン酸化のための基質を増加させる。

#### 【0039】

いくつかの実施形態において、この方法は、ウイルス形質導入によって、対象の少なくとも1つの細胞に核酸を導入することを含む。組成物は、核酸を含むウイルスまたはウイルス様粒子を提供され得る。いくつかの実施形態において、核酸は、AAV9等の組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターに担持される。

#### 【0040】

いくつかの実施形態において、rAAVは、その天然の環境から(例えば、宿主細胞、組織または対象から)人工的に生成される。例えば、単離されたAAVは、組換え法を使用して生成することができる。そのようなrAAVは、好ましくは、AAV導入遺伝子が1つ以上の所定の組織に特異的に送達されるような組織特異的標的化能力を有する。AAVキャプシドは、それらの組織特異的標的化を決定する上で重要な要因である。そのためには、少なくとも1つの実施形態において、脊髄組織に適したキャプシドを有する組換えAAVを選択することができる。所望のキャプシドタンパク質を有する組換えAAVを得るための方法は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる特許出願公開第2

003 / 0138772号に記載されている。

**【0041】**

別の態様において、本発明は、細胞内アスパラギン酸レベルの増加を必要とする患者を同定することにより、それを必要とする対象におけるALSの少なくとも1つの症状を治療する、改善する、または逆転させる方法であって、対象の少なくとも1つの細胞におけるアスパルトアシラーゼ(ASPA)のレベルまたは活性を増加させる治療有効量の組成物を対象に投与することを含み、組成物は、配列番号1の配列と少なくとも75%同一のアミノ酸配列を有する、ASPAまたはその機能的断片をコードする核酸を含む、方法を提供する。

**【0042】**

いくつかの実施形態において、方法は、対象の脊髄の少なくとも一部に組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、対象の脊髄の一部に局所投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、ALSの治療に使用するために脳幹に投与され得る。別の実施形態において、ALSの治療に使用するための本発明の組成物は、上位および下位運動ニューロン変性を治療するか、進行を遅らせるか、または上位および下位運動機能を改善するために、第2の医薬化合物と組み合わせることができる。いくつかの実施形態において、第2の医薬化合物は、2-アミノ-6-トリフルオロメトキシベンゾチアゾールまたはそれらのぞれぞれの薬学的に許容される塩(限定されないが、メシリ酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、エシレート、p-トルエンスルホン酸塩、安息香酸塩、酢酸塩、リン酸塩および硫酸塩を含む)と組み合われたR(+)-N-プロパルギル-1-アミノインダンであり得る。

10

**【0043】**

遺伝子治療：

本発明内で有用なタンパク質(複数可)をコードする核酸は、脳および脊髄の上位および下位運動ニューロンを含む、運動機能を支持する中枢神経系および末梢神経系の細胞におけるエネルギー不足を特徴とする疾患等の、本明細書で企図される疾患または障害の治療のための遺伝子治療プロトコルで使用され得る。特定の実施形態において、疾患または障害は、筋萎縮性側索硬化症(スーパーオキシドジスムターゼの凝集)を含む。タンパク質(複数可)をコードする改良された構築物は、適切な遺伝子治療ベクターに挿入され、当該疾患または障害を治療または予防するために患者に投与され得る。

20

**【0044】**

ウイルスベクター等のベクターは、多種多様な異なる標的細胞に遺伝子を導入するために従来技術で使用してきた。典型的には、所望のポリペプチド(例えば、受容体)の発現から有用な治療効果または予防効果を提供するのに十分な割合で形質転換が起こることができるように、ベクターが標的細胞に曝露される。トランスフェクトされた核酸は、標的細胞の各々のゲノムに恒久的に組み込まれ、長期的な効果を提供し得るか、あるいは、治療を定期的に繰り返さなければならない場合がある。

30

**【0045】**

ウイルスベクターおよびプラスミドベクターの両方の様々なベクターが当該技術分野で既知である(例えば、米国特許第5,252,479号およびWO93/07282を参照されたい)。特に、SV40等のパボバウイルス、ワクシニアウイルス、HSVおよびEBVを含むヘルペスウイルス、およびレトロウイルスを含む、多数のウイルスが遺伝子導入ベクターとして使用してきた。従来技術における多くの遺伝子治療プロトコルは、欠陥のあるマウスレトロウイルスを用いている。最近発行されたいくつかの特許は、遺伝子治療を実施するための方法および組成物に関するものである(例えば、米国特許第6,168,916号、同第6,135,976号、同第5,965,541号および動第6,129,705号を参照)。前述の特許の各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

**【0046】**

AAV媒介性の遺伝子治療：

50

Dependovirus 属に属するバルボウイルスである AAV は、遺伝子治療用途に特に適したいくつかの特徴を有する。例えば、AAV は、非分裂細胞を含む広範な宿主細胞に感染することができる。さらに、AAV は様々な種の細胞に感染することができる。重要なことに、AAV は、いずれのヒトまたは動物の疾患とも関連性がなく、組み込まれた時に宿主細胞の生理学的特性を変更するとは考えられない。

#### 【0047】

最後に、AAV は、広範な物理的および化学的条件において安定であり、そのため、製造、保存、および輸送の要件に適している。約 4,700 ヌクレオチドを含む直鎖状の一本鎖 DNA 分子である AAV ゲノム (AAV - 2 ゲノムは 4,681 ヌクレオチドからなり、AAV - 4 ゲノムは 4,767 からなる) は、一般に、両方の末端に末端逆位配列 (ITR) が隣接する内部非反復セグメントを含む。ITR は約 145 ヌクレオチド長であり (AAV - 1 は 143 ヌクレオチドの ITR を有する)、複製起点としての機能およびウイルスゲノムのパッケージングシグナルとしての機能を含む複数の機能を有する。ゲノムの内部非反復部分は、AAV 複製 (rep) およびキャプシド (cap) 領域として知られる 2 つの大きなオープンリーディングフレーム (ORF) を含む。これらの ORF は、複製およびキャプシド遺伝子産物をコードし、完全な AAV ビリオンの複製、組み立て、およびパッケージングを可能にする。より具体的には、Rep78、Rep68、Rep52、および Rep40 の少なくとも 4 つのウイルスタンパク質のファミリーが、AAV rep 領域から発現され、これらは全て、それらの見かけの分子量から命名されている。AAV cap 領域は、VP1、VP2、および VP3 の少なくとも 3 つのタンパク質をコードする。AAV はヘルパー依存型ウイルスである、すなわち、機能的に完全な AAV ビリオンを形成するためには、ヘルパーウイルス (例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはワクシニアウイルス) との同時感染が必要である。ヘルパーウイルスとの同時感染がない場合、AAV は、ウイルスゲノムを宿主細胞の染色体に挿入するか、またはウイルスゲノムがエピソーム形態で存在する、潜伏状態を確立するが、感染性ビリオンは生成されない。

#### 【0048】

ヘルパーウイルスによるその後の感染は、組み込まれたゲノムを「回復」させ、それを複製してウイルスキャプシドにパッケージングすることを可能にし、それによって感染性ビリオンを再構成する。AAV は異なる種の細胞に感染することができるが、ヘルパーウイルスは宿主細胞と同じ種でなくてはならない。したがって、例えば、ヒト AAV は、イヌアデノウイルスに同時感染したイヌ細胞において複製する。

#### 【0049】

異種核酸配列を含む感染性組換え AAV (rAAV) を作製するために、適切な宿主細胞株に、異種核酸配列を含むが AAV ヘルパー機能遺伝子、rep および cap を欠く AAV ベクターをトランスフェクトすることができる。次いで、AAV ヘルパー機能遺伝子を別のベクターに提供することができる。また、複製能力のあるヘルパーウイルス (アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはワクシニア等) を提供するのではなく、AAV 產生に必要なヘルパーウイルス遺伝子 (すなわち、アクセサリー機能遺伝子) のみをベクターに提供することができる。

#### 【0050】

まとめると、AAV ヘルパー機能遺伝子 (すなわち、rep および cap) およびアクセサリー機能遺伝子は、1 つ以上のベクターに提供することができる。次いで、ヘルパーおよびアクセサリー機能遺伝子産物を宿主細胞で発現させることができ、そこでそれらは異種核酸配列を含む rAAV ベクターにおいてトランスで作用する。次いで、異種核酸配列を含む rAAV ベクターが、野生型 (wt) AAV ゲノムであるかのように複製およびパッケージングされ、組換えビリオンを形成する。患者の細胞が結果として生じる rAAV ビリオンに感染すると、異種核酸配列が進入し、患者の細胞において発現する。患者の細胞は、rep 遺伝子および cap 遺伝子、ならびにアクセサリー機能遺伝子を欠いているため、rAAV はそれらのゲノムをさらに複製してパッケージングすることはできない

10

20

30

40

50

。さらに、*r e p*および*c a p*遺伝子の供給源がなければ、*w t A A V*は患者の細胞で形成することはできない。

#### 【0051】

本発明の一態様において、適切な*A A V*血清型または血清型バリアントは、*A A V 2*、*A A V 2 . 5*、*A A V 5*、*A A V 6*、*A V 6 . 2*、*A A V 7*、*A A V 8*、*A A V 9*、*A A V 10*、*A A V 11*、および*A A V 12*等の*A A V 1 ~ A A V 12*、ならびに合理的に操作された*A A V 9 H R*等の*A A V*ベースのベクターのこれらのキャプシドバリアントを含む。

#### 【0052】

*A A V - 1 ~ A A V - 11*は当該技術分野で記載されている(Mori, et al., 2004, *Virology* 330(2): 375-83)。*A A V - 2*は、ヒト集団で最も一般的な血清型である。ある研究では、一般集団の少なくとも80%が*w t A A V - 2*に感染していると推定された(Berns and Linden, 1995, *Bioessays* 17: 237-245)。*A A V - 3*および*A A V - 5*もヒト集団において一般的であり、感染率は最大60%である(Georg-Fries, et al., 1984, *Virology* 134: 64-71)。*A A V - 1*および*A A V - 4*はサルの分離株であるが、どちらの血清型もヒト細胞に形質導入することができる(Chiorini, et al., 1997, *J Virol* 71: 6823-6833; Chou, et al., 2000, *Mol Ther* 2: 619-623)。6つの既知の血清型のうち、*A A V - 2*が最もよく特徴付けられている。例えば、*A A V - 2*は、幅広いインビオ形質導入実験に使用されており、次のような異なる組織型を形質導入することが示されている：マウス(米国特許第5,858,351号、米国特許第6,093,392号)、イヌの筋肉；マウスの肝臓(Couto, et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12725-12730; Couto, et al., 1997, *J. Virol.* 73: 5438-5447; Nakai, et al., 1999, *J. Virol.* 73: 5438-5447; およびSnyder, et al., 1997, *Nat. Genet.* 16: 270-276)；マウスの心臓(Su, et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13801-13806)；ウサギの肺(Flotte, et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10613-10617)；およびげっ歯類の光受容体(Flannery et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6916-6921)。

#### 【0053】

*A A V - 2*の広範な組織指向性は、組織特異的な導入遺伝子を送達するために利用され得る。例えば、*A A V - 2*ベクターは以下の遺伝子を送達するために使用されてきた：囊胞性線維症膜貫通コンダクタンスレギュレーター遺伝子をウサギの肺へ(Flotte, et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10613-10617)；第NII因子遺伝子(Burton, et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12725-12730)および第IX因子遺伝子((Nakai, et al., 1999, *J. Virol.* 73: 5438-5447; Snyder, et al., 1997, *Nat. Genet.* 16: 270-276；米国特許第6,093,392号)をマウス肝臓、イヌ、およびマウスの筋肉へ(米国特許第6,093,392号)；エリスロポエチン遺伝子をマウスの筋肉へ(米国特許第5,858,351号)；血管内皮増殖因子(VEGF)遺伝子をマウスの心臓へ(Su, et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13801-13806)；および芳香族1-アミノ酸デカルボキシラーゼ遺伝子をサルのニューロンへ。特定の*r A A V*によって送達される導入遺伝子の発現は、実験動物において治療効果がある：たとえば、第IX因子の発現により、血友病Bのイヌモデルで表現型の正常性が回復したことが報告されている(米国特許第6,093,392号)。さらに、マウス心筋に*r A A V*によって送達されるNEGFの発現は、新生

10

20

30

40

50

血管形成をもたらし (Su, et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 13801 - 13806)、およびパーキンソン病のサルの脳に rAAV によって送達される ADC の発現は、ドーパミン作動性機能の回復をもたらした。

#### 【0054】

哺乳動物の細胞への当該タンパク質の送達は、最初に当該タンパク質をコードする DNA を含む AAV ベクターを生成し、次にそのベクターを哺乳動物に投与することによって達成される。したがって、本発明は、当該タンパク質をコードする DNA を含む AAV ベクターを含むと解釈されるべきである。本発明を理解すると、これらのタンパク質をコードする DNA を含む AAV ベクターの生成は、当業者には明らかであろう。

10

#### 【0055】

特定の実施形態において、本発明の rAAV ベクターは、いくつかの不可欠な DNA エレメントを含む。特定の実施形態において、これらの DNA エレメントは、AAV IT R 配列の少なくとも 2 つのコピー、プロモーター / エンハンサー要素、転写終結シグナル、当該タンパク質またはその生物学的に活性な断片をコードする DNA に隣接する任意の必要な 5' または 3' 非翻訳領域を含む。本発明の rAAV ベクターはまた、当該タンパク質のイントロンの一部を含み得る。また、任意選択的に、本発明の rAAV ベクターは、当該変異タンパク質をコードする DNA を含む。

#### 【0056】

特定の実施形態において、ベクターは、多くの異なる細胞型において異種遺伝子の発現を高レベルに駆動することができるプロミスカスプロモーターを含むプロモーター / 調節配列を含む。そのようなプロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) 前初期プロモーター / エンハンサー配列、ラウス肉腫ウイルスプロモーター / エンハンサー配列等を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の rAAV ベクターにおけるプロモーター / 調節配列は、CMV 前初期プロモーター / エンハンサーである。しかしながら、異種遺伝子の発現を駆動するために使用されるプロモーター配列はまた、誘導性プロモーター、例えば、限定されないが、ステロイド誘導性プロモーターであり得るか、または組織特異的プロモーター、例えば、限定されないが、筋肉組織特異的である骨格アクチンプロモーターおよび筋肉クレアチニーゼプロモーター / エンハンサー等であり得る。

20

#### 【0057】

特定の実施形態において、本発明の rAAV ベクターは、転写終結シグナルを含む。任意の転写終結シグナルが本発明のベクターに含まれ得るが、特定の実施形態において、転写終結シグナルは、SV40 転写終結シグナルである。

#### 【0058】

特定の実施形態において、本発明の rAAV ベクターは、当該タンパク質、または当該タンパク質の生物学的に活性な断片をコードする単離された DNA を含む。本発明は、既知または未知のいずれかである当該タンパク質の任意の哺乳動物配列を含むと解釈されるべきである。したがって、本発明は、タンパク質がヒトタンパク質と実質的に同様の方法で機能する、ヒト以外の哺乳動物由来の遺伝子を含むと解釈されるべきである。好ましくは、当該タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列は、当該タンパク質をコードする遺伝子と約 50% 相同、より好ましくは約 70% 相同、さらにより好ましくは約 80% または 85% 相同、そして最も好ましくは約 90%、95%、または 99% 相同である。

40

#### 【0059】

さらに、本発明は、野生型タンパク質配列の天然に存在するバリエントまたは組換え由来の変異体を含むと解釈されるべきであり、バリエントまたは変異体はそれによってコードされるタンパク質を、本発明の遺伝子治療法において全長タンパク質と同じくらい治療的に有効にするか、または全長タンパク質よりもさらに治療的に有効にする。

#### 【0060】

50

本発明はまた、タンパク質の生物学的活性を保持するバリアントをコードするDNAを含むと解釈されるべきである。そのようなバリアントは、組換えDNA技術を使用して修飾された、または修飾され得るタンパク質またはポリペプチドを含むため、タンパク質またはポリペプチドは、本明細書に記載の方法における使用への適合性を増強する追加の特性を有し、例えば、限定されないが、バリアントは、血漿中のタンパク質に対する増強された安定性およびタンパク質の高い比活性を付与する。類似体は、保存的なアミノ酸配列の違いによって、または配列に影響を与えない修飾によって、あるいはその両方によって、天然に存在するタンパク質またはペプチドとは異なり得る。例えば、保存的なアミノ酸変化が行われる場合があり、それらはタンパク質またはペプチドの一次配列を変更するが、通常その機能は変更しない。

10

#### 【0061】

本発明は、実験例に例示された特定のrAAVベクターに限定されない。むしろ、本発明は、AAV-1、AAV2.5、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-8、AAV-9等に基づくベクターを含むがこれらに限定されない、任意の適切なAAVベクターを含むと解釈されるべきである。

#### 【0062】

また、本発明は、治療効果を提供するのに有効な量で疾患または障害を有する哺乳動物を治療する方法を含む。この方法は、当該タンパク質を含むrAAVベクターを哺乳動物に投与することを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

20

#### 【0063】

典型的には、単回注射で投与されるウイルスベクターゲノム／哺乳動物の数は、約 $1 \times 10^8$ ～約 $5 \times 10^{16}$ の範囲である。好ましくは、単回注射で投与されるウイルスベクターゲノム／哺乳動物の数は、約 $1 \times 10^{10}$ ～約 $1 \times 10^{15}$ であり、より好ましくは、単回注射で投与されるウイルスベクターゲノム／哺乳動物の数は、約 $5 \times 10^{10}$ ～約 $5 \times 10^{15}$ であり、最も好ましくは、単回注射で哺乳動物に投与されるウイルスベクターゲノムの数は、約 $5 \times 10^{11}$ ～約 $5 \times 10^{14}$ である。

#### 【0064】

本発明の方法が複数部位同時注射、または数時間（例えば、約1時間未満から約2または3時間）の期間にわたる異なる部位への注射を含むいくつかの複数部位注射を含む場合、投与されるウイルスベクターゲノムの総数は、単一部位注射法で列挙されたものと同一、またはその一部またはその倍数であり得る。

30

#### 【0065】

単一部位注射における本発明のrAAVベクターの投与のために、特定の実施形態において、ウイルスを含む組成物は、対象の脳に直接注射される。哺乳動物への投与のために、rAAVベクターは、薬学的に許容される担体、例えば、約7.8のpHのHEPES緩衝生理食塩水に懸濁され得る。他の有用な薬学的に許容される担体は、グリセロール、水、生理食塩水、エタノール、およびリン酸塩および有機酸の塩等の他の薬学的に許容される塩溶液を含むが、これらに限定されない。これらおよび他の薬学的に許容される担体の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences (1991, Mack Publication Co., New Jersey)に記載されている。

40

#### 【0066】

本発明のrAAVベクターはまた、キットの形態で提供されてもよく、キットは、例えば、乾燥塩製剤中のベクターの凍結乾燥調製物、ベクター／塩組成物の懸濁のための滅菌水、およびベクターの懸濁および哺乳動物へのその投与のための指示書を含む。

#### 【0067】

##### 併用療法

本明細書に記載の方法を使用して同定された組成物は、本明細書で企図される疾患の治療または障害の症状の緩和に有用な1つ以上の追加の化合物または組成物と組み合わせた本発明の方法において有用である。これらの追加の化合物は、本明細書で同定される化合

50

物、または本明細書で企図される疾患または障害の症状を治療、予防、または軽減するこ  
とが知られている化合物、例えば市販の化合物を含み得る。

#### 【0068】

追加の化合物の非限定的な例は、それぞれ、リルゾール、エダラボンまたはそれらの塩  
もしくは溶媒和物、またはそれらの組み合わせを含む。フルオキセチン等の選択的セロト  
ニン再取り込み阻害薬（SSRI）を単独で、またはデキストロメトルファン、および／  
もしくはキニジンと組み合わせて含む他の化合物も、本発明の遺伝子治療レジメンと組み  
合わせて使用することができる。したがって、相乗効果は、例えば、例えば、Sigmoid  
id - Emax方程式（Holford & Scheiner, 19981, Clin. Pharmacokinetic. 6: 429 - 453）、Loewe加法性の方程式（Loe  
we & Muischnek, 1926, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 114: 313 - 326）および中央値効果の方程式（Chou & Talala  
y, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22: 27 - 55）等の適切な方法を用いて計算することができる。上述の各方程式を実験データに適用して、対応するグラ  
フを生成し、薬物の組み合わせの効果を評価するのに役立てることができる。上述の方程  
式に関連した対応するグラフは、それぞれ、濃度効果曲線、アイソボログラム曲線、およ  
び組み合わせ指数曲線である。

10

#### 【0069】

医薬組成物および製剤：

本発明はまた、本発明の方法を実施するための本発明の医薬組成物の使用を包含する。  
そのような医薬組成物は、対象への投与に適した形態で提供され得、1つ以上の薬学的に  
許容される担体、1つ以上の追加の成分、またはこれらのいくつかの組み合わせを含み得  
る。本発明の少なくとも1つの組成物は、当該技術分野で周知のように、生理学的に許容  
される陽イオンまたは陰イオンと組み合わせて本発明内で企図される化合物等の生理学的  
に許容される塩を含み得る。

20

#### 【0070】

一実施形態において、本発明の方法を実施するのに有用な医薬組成物は、1ng/kg/  
日～100mg/kg/日の用量を送達するように投与され得る。別の実施形態において、本発明を実施するためには有用な医薬組成物は、1ng/kg/日～500mg/kg/  
日の用量を送達するように投与され得る。

30

#### 【0071】

本発明の医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される担体、および任意の追加の成分  
の相対量は、治療される対象の同一性、サイズ、および状態に応じて、さらには組成物が  
投与される経路に応じて変化する。例として、組成物は、0.1%～100%（w/w）  
の活性成分を含み得る。

#### 【0072】

本発明の方法において有用な医薬組成物は、吸入、経口、直腸内、腔内、非経口、局所  
、経皮、経肺、鼻腔内、頸側、点眼、髄腔内、頭蓋内、静脈内または別の投与経路のた  
めに適切に開発され得る。他の企図される製剤は、想定されるナノ粒子、リポソーム調製物  
、活性成分を含む再密封された赤血球、および免疫学に基づく製剤を含む。投与経路（複  
数可）は、当業者には容易に明らかであり、治療される疾患の種類および重症度、治療さ  
れる動物またはヒト患者の種類および年齢等を含む任意の数の要因に依存するであろう。  
本明細書に記載の医薬組成物の製剤は、薬理学の分野で既知であるか、または今後開発さ  
れる任意の方法によって調製することができる。一般に、そのような調製方法は、活性成  
分を担体または1つ以上の他の付属成分と会合させ、次いで、必要なまたは望ましい場合  
、生成物を所望の単回または複数回投与単位に成形またはパッケージングするステップを  
含む。

40

#### 【0073】

本明細書で使用される場合、「単位用量」は、所定量の活性成分を含む医薬組成物の個  
別の量である。活性成分の量は、一般に、対象に投与されるであろう活性成分の投与量、

50

またはそのような投与量の都合のよい画分、例えば、そのような投与量の2分の1または3分の1に等しい。単位剤形は、1日1回投与または1日複数回投与のため（例えば、1日当たり約1から4回以上）であり得る。1日複数回投与が用いられる場合、単位剤形は、各用量で同じであっても異なっていてもよい。

#### 【0074】

本明細書に提供される医薬組成物の記述は、主にヒトへの倫理的な投与に適した医薬組成物に関するものであるが、当業者は、そのような組成物が、あらゆる種類の動物への投与に一般に適していることを理解するであろう。組成物を種々の動物への投与に適したものにするためにヒトへの投与に適した医薬組成物を修飾することは十分に理解されており、獣医学の当業者は、このような修飾を、たとえ行うにしてもわずかな実験で設計し、実施することができる。本発明の医薬組成物の投与が企図される対象は、ヒトおよび他の霊長類、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、およびイヌ等の商業的に関連性のある哺乳動物を含むが、これらに限定されない。

10

#### 【0075】

一実施形態において、本発明の組成物は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤または担体を使用して製剤化される。他の実施形態において、本発明の医薬組成物は、治療有効量の少なくとも1つの本発明の組成物および薬学的に許容される担体を含む。有用な薬学的に許容される担体は、グリセロール、水、生理食塩水、エタノール、およびリン酸塩および有機酸の塩等の他の薬学的を含むが、これらに限定されない許容される塩溶液が。これらおよび他の薬学的に許容される担体の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences (1991, Mack Publication Co., New Jersey) に記載されている。

20

#### 【0076】

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、および液体ポリエチレングリコール等）、それらの適切な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散液の場合には必要とされる粒径の維持によって、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、アスコルビン酸、チメロサール等によって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウム、またはマンニトールおよびソルビトール等の多価アルコールを組成物に含めることが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期吸収は、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またはゼラチンを組成物に含めることによってもたらされ得る。

30

#### 【0077】

製剤は、従来の賦形剤、すなわち、経口、非経口、髄腔内、経鼻、静脈内、皮下、経腸、または当該技術分野で既知の任意の他の適切な投与様式に適した薬学的に許容される有機または無機の担体物質との混合物で使用することができる。医薬製剤は、滅菌され得、必要に応じて、補助剤、例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧緩衝剤に影響を与えるための塩、着色物質、着香物質および/または芳香物質等と混合され得る。それらはまた、必要に応じて、他の活性剤、例えば、他の鎮痛剤と組み合わせることができる。

40

#### 【0078】

本明細書で使用される場合、「追加の成分」は、以下のうちの1つまたは複数を含むが、これらに限定されない：賦形剤；界面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；造粒および崩壊剤；結合剤；潤滑剤；甘味剤；着香剤；着色剤；防腐剤；ゼラチン等の生分解性組成物；水性ビヒクルおよび溶媒；油性ビヒクルおよび溶媒；懸濁剤；分散剤または湿潤剤；乳化剤、粘滑剤；緩衝剤；塩；増粘剤；增量剤；乳化剤；抗酸化剤；抗生物質；抗真菌剤；安定剤；および薬学的に許容されるポリマー性または疎水性材料。本発明の医薬組成物に含まれ得る他の「追加の成分」は、当該技術分野で既知であり、例えば、参照により本明細

50

書に組み込まれる Genaro, ed. (1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA) に記載されている。

#### 【0079】

本発明の組成物は、組成物の総重量の約 0.005 重量% ~ 2.0 重量% の防腐剤を含み得る。防腐剤は、環境中の汚染物質に曝露された場合の腐敗を防ぐために使用される。本発明による有用な防腐剤の例は、ベンジルアルコール、ソルビン酸、パラベン、イミド尿素、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるものを含むが、これらに限定されない。防腐剤の例は、約 0.5% ~ 2.0% のベンジルアルコールと 0.05% から 0.5% のソルビン酸の組み合わせである。

10

#### 【0080】

組成物は、好ましくは、化合物の分解を阻害する抗酸化剤およびキレート剤を含む。いくつかの化合物の好ましい抗酸化剤は、組成物の総重量の約 0.01 重量% ~ 0.3 重量% の好ましい範囲の BHT、BHA、-トコフェロールおよびアスコルビン酸であり、より好ましくは 0.03 重量% ~ 0.1 重量% の範囲の BHT である。好ましくは、キレート剤は、組成物の総重量の 0.01 重量% ~ 0.5 重量% の量で存在する。特に好ましいキレート剤は、組成物の総重量の約 0.01 重量% ~ 0.1 重量% の範囲、より好ましくは 0.02 重量% ~ 0.10 重量% の範囲のエデト酸塩（エデト酸二ナトリウム）およびクエン酸を含む。キレート剤は、製剤の有効期間に悪影響を及ぼす可能性がある組成物中の金属イオンをキレート化するのに有用である。BHT およびエデト酸二ナトリウムは、それぞれ、ある化合物にとって特に好ましい抗酸化剤およびキレート剤であるが、当業者に既知であるように、他の適切かつ同等な抗酸化剤およびキレート剤がしたがって置き換えるてもよい。

20

#### 【0081】

液体懸濁液は、水性または油性ビヒクル中の活性成分の懸濁を達成するための従来の方法を使用して調製することができる。水性ビヒクルは、例えば、水、および等張食塩水を含む。油性ビヒクルは、例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、またはココナッツ油等の植物油、分別植物油、および液体パラフィン等の鉛油を含む。液体懸濁液は、懸濁剤、分散剤または湿潤剤、乳化剤、粘滑剤、防腐剤、緩衝液、塩、着香料、着色剤、および甘味剤を含むがこれらに限定されない 1 つ以上の追加の成分をさらに含み得る。油性懸濁液は、増粘剤をさらに含み得る。既知の懸濁剤は、ソルビトールシロップ、水素添加された食用油脂、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガントガム、アカシアゴム、およびカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース誘導体を含むが、これらに限定されない。既知の分散剤または湿潤剤は、レシチン等の天然に存在するホスファチド、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、脂肪酸由来の部分エステルおよびヘキシトールとの縮合生成物、または脂肪酸由来の部分エステルおよび無水ヘキシトールとの縮合生成物（例えば、それぞれ、ポリオキシエチレンステアレート、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）を含むが、これらに限定されない。既知の乳化剤は、レシチン、およびアカシアを含むが、これらに限定されない。既知の防腐剤は、メチル、エチル、または n-プロピルバラヒドロキシベンゾエート、アスコルビン酸、およびソルビン酸を含むが、これらに限定されない。既知の甘味剤は、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、スクロース、およびサッカリンを含む。油性懸濁液の既知の増粘剤は、例えば、蜜蠍、硬質パラフィン、およびセチルアルコールを含む。

30

#### 【0082】

水性または油性溶媒中の活性成分の液体溶液は、液体懸濁液と実質的に同じ方法で調製することができるが、主な違いは、活性成分が溶媒中に懸濁されるのではなく、溶解されるということである。本明細書で使用される場合、「油性」液体は、炭素含有液体分子を

40

50

含み、水よりも極性が低い特性を示すものである。本発明の医薬組成物の液体溶液は、液体懸濁液に関して記載された成分の各々を含んでもよく、懸濁剤は、必ずしも溶媒中の活性成分の溶解を助けるとは限らないことを理解されたい。水性溶媒は、例えば、水、および等張食塩水を含む。油性溶媒は、例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、またはココナッツ油等の植物油、分別植物油、および液体パラフィン等の鉛油を含む。本発明の医薬調製物の粉末状および粒状製剤は、既知の方法を使用して調製することができる。そのような製剤は、対象に直接投与され得、例えば、錠剤を形成するために、カプセルを充填するために、またはそれに水性もしくは油性ビヒクルを添加することによって水性もしくは油性懸濁液もしくは溶液を調製するために使用され得る。これらの製剤の各々は、分散剤または潤滑剤、懸濁剤、および防腐剤のうちの1つ以上をさらに含み得る。增量剤および甘味剤、着香剤、または着色剤等の追加の賦形剤も、これらの製剤に含まれ得る。

#### 【0083】

本発明の医薬組成物はまた、水中油型エマルジョンまたは油中水型エマルジョンの形態で調製、包装、または販売され得る。油相は、オリーブ油またはラッカセイ油等の植物油、流動パラフィン等の鉛油、またはこれらの組み合わせであり得る。そのような組成物は、アカシアゴムまたはトラガントガム等の天然に存在するゴム、ダイズまたはレシチンホスファチドなどの天然に存在するホスファチド、ソルビタンモノオレート等の脂肪酸と無水ヘキシトールの組み合わせに由来するエステルまたは部分エステル、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート等のそのような部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物等、1つ以上の乳化剤をさらに含み得る。これらのエマルジョンはまた、例えば、甘味剤または着香剤を含む追加の成分を含んでもよい。

#### 【0084】

化学組成物を含む材料を含浸またはコーティングするための方法は当該技術分野で既知であり、化学組成物を表面に堆積または結合させる方法、材料の合成の間に化学組成物を該材料の構造内に組み込む方法（すなわち、例えば、生理学的に分解可能な材料とともに）、および後続する乾燥を伴ってまたは伴わずに、水性または油性の溶液または懸濁液を吸収性材料に吸収させる方法を含むが、これらに限定されない。

#### 【0085】

##### 投与 / 投薬 :

投与計画は、有効量を構成するものに影響を及ぼし得る。治療用製剤は、疾患または状態に関連する症状が出現する前または後に患者に投与することができる。さらに、いくつかの分割された投与量、および時間差のある投与量が、毎日もしくは順次投与され得るか、または用量は、連続的に注入され得るか、もしくはボーラス注射であり得る。さらに、治療用製剤の投与量は、治療的または予防的状況の緊急性によって示されるように、比例的に増加または減少されてもよい。

#### 【0086】

本発明の組成物の患者、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトへの投与は、既知の手順を使用して、患者の疾患または状態を治療するのに有効な投与量および期間で行われ得る。治療効果を達成するために必要な治療化合物の有効量は、使用される特定の化合物の活性；投与時期；化合物の排泄率；治療期間；化合物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物または材料；疾患または障害の状態；治療を受ける患者の年齢、性別、体重、状態、一般的な健康状態、および以前の病歴等の医療分野で周知の要因によって異なり得る。投与計画は、最適な治療反応を提供するように調整することができる。例えば、いくつかの分割された用量が毎日投与され得るか、または用量は、治療状況の緊急性によって示されるように比例的に減少され得る。本発明の治療化合物の有効用量範囲の非限定的な例は、約0.01～50mg/kg体重/日である。当業者は、関連する要因を調べ、過度の実験なしに治療化合物の有効量に関する決定を行うことができるであろう。

#### 【0087】

化合物は、1日数回の頻度で動物に投与することができるか、またはより少ない頻度で

10

20

30

40

50

、例えば、1日1回、1週間に1回、2週間に1回、1ヶ月に1回、または、数ヶ月に1回もしくはさらには1年に1回以下等のさらに少ない頻度で投与されてもよい。1日当たりに投与される化合物の量は、非限定的な例において、毎日、隔日、2日ごと、3日ごと、4日ごと、または5日ごとに投与され得ることを理解されたい。例えば、1日おきの投与では、月曜日に5mg / 日の用量が開始され、第1の後続の5mg / 日の用量が水曜日に投与され、第2目の後続の5mg / 日の用量が金曜日に投与される等である。投与の頻度は、当業者には容易に明らかであり、限定されないが、治療される疾患の種類および重症度、動物の種類および年齢等の任意の数の要因に依存するであろう。

#### 【0088】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、患者に有害であることなく、特定の患者、組成物、および投与様式で所望の治療反応を達成するのに有効な活性成分の量を得るように変更することができる。

10

#### 【0089】

当該技術分野で通常の技術を有する医師、例えば、内科医または獣医が、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定し、処方することができる、例えば、内科医または獣医は、医薬組成物に使用される本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を達成するために必要なレベルよりも低いレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることができる。

#### 【0090】

投与の容易さおよび投与量の均一性のために、化合物を投与単位剤形に製剤化することが特に有利である。本明細書で使用される「投与単位剤形」は、治療される患者の単位投与量として適した物理的に別個の単位を指す：各単位は、必要な薬学的ビヒクルと共同して所望の治療効果をもたらすように計算された所定量の治療化合物を含む。本発明の投与単位剤形は、(a)治療化合物の固有の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに(b)患者における癌の治療のためにそのような治療化合物を配合/製剤化する当該技術分野に固有の制限によって決定され、かつそれに直接依存する。

20

#### 【0091】

一実施形態において、本発明の組成物は、1日当たり1回～5回またはそれ以上の範囲の投与量で患者に投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、限定されないが、毎日1回、2日ごと、3日ごと～1週間に1回、および2週間に1回を含む投与量の範囲で患者に投与される。本発明の様々な組み合わせ組成物の投与頻度が、年齢、治療される疾患または障害、性別、全体的な健康、および他の要因を含むがそれらに限定されない多くの要因に応じて対象ごとに異なることは、当業者には容易に明らかであろう。したがって、本発明は、いずれか特定の投与計画に限定されると解釈されるべきではなく、任意の患者に投与される正確な投与量および組成物は、患者に関する他の全ての要因を考慮に入れて、主治医によって決定される。

30

#### 【0092】

投与される本発明の化合物は、約1.0g～約7,500mg、約2.0.0g～約7,000mg、約4.0.0g～約6,500mg、約8.0.0g～約6,000mg、約10.0.0g～約5,500mg、約20.0.0g～約5,000mg、約40.0.0g～約4,000mg、約80.0.0g～約3,000mg、約1mg～約2,500mg、約2mg～約2,000mg、約5mg～約1,000mg、約10mg～約750mg、約20mg～約600mg、約30mg～約500mg、約40mg～約400mg、約50mg～約300mg、約60mg～約250mg、約70mg～約200mg、約80mg～約150mgの範囲、およびその間のありとあらゆる全増分および部分的増分であり得る。

40

#### 【0093】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物の用量は、約0.5.0g～約5000mgである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組成物に使用される本発明の化合物の用量は、約5000mg未満、または約4000mg未満、または約3000

50

m g 未満、または約 2 0 0 0 m g 未満、または約 1 , 0 0 0 m g 未満、または約 8 0 0 m g 未満、または約 6 0 0 m g 未満、または約 5 0 0 m g 未満、または約 2 0 0 m g 未満、または約 5 0 m g 未満である。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書に記載の第2の化合物の用量は、約 1 , 0 0 0 m g 未満、または約 8 0 0 m g 未満、または約 6 0 0 m g 未満、または約 5 0 0 m g 未満、または約 4 0 0 m g 未満、または約 3 0 0 m g 未満、または約 2 0 0 m g 未満、または約 1 0 0 m g 未満、または約 5 0 m g 未満、または約 4 0 m g 未満、または約 3 0 m g 未満、または約 2 5 m g 未満、または約 2 0 m g 未満、または約 1 5 m g 未満、または約 1 0 m g 未満、または約 5 m g 未満、または約 2 m g 未満、または約 1 m g 未満、または約 0 . 5 m g 未満、およびその間のありとあらゆる全増分および部分的増分である。

10

#### 【 0 0 9 4 】

一実施形態において、本発明は、治療有効量の本発明の化合物を、単独でまたは第2の医薬品と組み合わせて収容する容器と、患者における疾患または障害の1つ以上の症状を治療、予防、または軽減するために化合物を使用するための指示書とを含む、包装された医薬組成物に関する。

#### 【 0 0 9 5 】

「容器」という用語は、医薬組成物を収容するための任意の入れ物を含む。例えば、一実施形態において、容器は、医薬組成物を含むパッケージである。他の実施形態において、容器は、医薬組成物を含むパッケージではない、すなわち、容器は、包装された医薬組成物または包装されていない医薬組成物、ならびに医薬組成物の使用に関する指示書を含む箱またはバイアル等の入れ物である。さらに、包装技術は当該技術分野で周知である。医薬組成物の使用に関する指示書は、医薬組成物を収容するパッケージ上に含まれてもよく、そのため、指示書は包装された製品との機能的な関係を向上させると理解されたい。しかしながら、指示書は、化合物がその意図された機能、例えば、患者の疾患または障害を治療、予防、または軽減する能力に関する情報を含み得ることを理解されたい。

20

#### 【 0 0 9 6 】

##### 投与経路 :

本発明の任意の組成物の投与経路は、吸入、経口、経鼻、直腸内、非経口、舌下、経皮、経粘膜（例えば、舌下、舌、（経）頬、（経）尿道、腔（例えば、経腔および腔周囲）、鼻腔（内）、および（経）直腸）、膀胱内、肺内、十二指腸内、胃内、髄腔内、皮下、筋肉内、皮内、頭蓋内、動脈内、静脈内、気管支内、吸入、および局所投与を含む。

30

#### 【 0 0 9 7 】

適切な組成物および剤形は、例えば、錠剤、カプセル、カプレット、ピル、ゲルキャップ、トローチ、分散剤、懸濁剤、液剤、シロップ、顆粒、ビーズ、経皮パッチ、ゲル、散剤、ペレット、マグマ剤、ロゼンジ、クリーム、ペースト、軟膏剤、ローション、ディスク、坐剤、経鼻または経口投与用の液体スプレー、吸入用の乾燥粉末またはエアロゾル製剤、膀胱内投与用の組成物および製剤等を含む本発明において有用であろう製剤および組成物は、本明細書に記載される特定の製剤および組成物に限定されないことを理解されたい。

#### 【 0 0 9 8 】

40

##### 経口投与

経口適用には、錠剤、糖衣錠、液体、ドロップ、坐剤、またはカプセル、カプレットおよびゲルキャップが特に適している。経口投与に適した他の製剤は、粉末状または粒状製剤、水性または油性の懸濁液、水性または油性の溶液、ペースト、ゲル、練り歯磨き、口腔洗浄薬、コーティング、経口リンス、またはエマルジョンを含むが、これらに限定されない。経口使用を目的とした組成物は、当該技術分野で既知の任意の方法に従って調製することができ、そのような組成物は、錠剤の製造に適した不活性で非毒性の医薬賦形剤からなる群から選択される1つ以上の薬剤を含み得る。そのような賦形剤は、ラクトース等の不活性希釈剤、コーンスターク等の造粒剤および崩壊剤、デンプン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤を含む。

50

## 【0099】

錠剤は、コーティングされていなくてもよいが、または対象の胃腸管における崩壊の遅延を達成し、それによって活性成分の持続放出および吸収を提供するように、既知の方法を使用してコーティングされてもよい。例として、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の材料を使用して錠剤をコーティングすることができる。さらに例として、錠剤は、浸透圧制御放出錠剤を形成するために、米国特許第4,256,108号、同第4,160,452号、同第4,265,874号に記載される方法を使用してコーティングされてもよい。錠剤は、薬学的に優れた口当たりの良い調製物を提供するために、甘味剤、着香剤、着色剤、防腐剤、またはこれらのいくつかの組み合わせをさらに含み得る。

10

## 【0100】

経口投与の場合、本発明の化合物は、結合剤、增量剤、潤滑剤、崩壊剤、または湿潤剤等の薬学的に許容される賦形剤を用いて、従来の手段によって調製された錠剤またはカプセルの形態であり得る。必要に応じて、錠剤は、適切な方法およびコーティング材料、例えば、Colorcon, West Point, Pa. のカラーコンから入手可能なOPADRY TM フィルムコーティングシステム（例えば、OPADRY TM OY Type、OYC Type、Organic Enteric OY-P Type、Aqueous Enteric OY-A Type、OY-PM Type およびOPADRY TM White, 32K18400）を用いてコーティングされてもよい。

20

## 【0101】

経口投与用の液体調製物は、溶液、シロップまたは懸濁液の形態であり得る。液体調製物は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、メチルセルロースまたは水素添加された食用油脂）、乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油性エステルまたはエチルアルコール）；および防腐剤（例えば、メチルまたはプロピルパラヒドロキシ安息香酸またはソルビン酸）等の薬学的に許容される添加物を用いた従来の手段によって調製することができる。経口投与に適した本発明の医薬組成物の液体製剤は、液体形態で、または使用前に水もしくは別の適切なビヒクルで再構成することを目的とした乾燥製品の形態で、調製、包装、および販売されてもよい。

## 【0102】

30

## 非経口投与

本明細書で使用される場合、医薬組成物の「非経口投与」は、対象の組織に物理的に穴を作り、その組織にある穴を通して医薬組成物を投与することを特徴とする任意の投与経路を含む。したがって、非経口投与は、組成物の注射、外科的切開部を通した組成物の適用、組織を貫通する非外科的創傷を通した組成物の適用等による医薬組成物の投与を含むが、これらに限定されない。特に、非経口投与は、頭蓋内、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、脊髄内、胸骨内、髄腔内、脳幹注射、および腎臓透析注入技術を含むことが企図されるが、これらに限定されない。

## 【0103】

40

非経口投与に適した医薬組成物の製剤は、滅菌水または滅菌等張食塩水等の薬学的に許容される担体と組み合わされた活性成分を含む。そのような製剤は、ボーラス投与または連続投与に適した形態で調製、包装、または販売され得る。注射可能な製剤は、単位剤形で、例えばアンプル中に、または防腐剤を含む複数回投与容器中に、調製、包装、または販売され得る。非経口投与用の製剤は、懸濁液、溶液、油性または水性ビヒクル中のエマルジョン、ペースト、および移植可能な持続放出性または生分解性の製剤を含むが、これらに限定されない。そのような製剤は、懸濁剤、安定剤、または分散剤を含むがこれらに限定されない1つ以上の追加の成分をさらに含み得る。非経口投与用の製剤の一実施形態において、活性成分は、再構成された組成物の非経口投与の前に適切なビヒクル（例えば、滅菌バイロジエンフリー水）で再構成するために、乾燥（すなわち、粉末状または粒状）形態で提供される。

## 【0104】

50

医薬組成物は、滅菌した注射可能な水性または油性の懸濁液または溶液の形態で調製、包装、または販売され得る。この懸濁液または溶液は、既知の技術に従って製剤化することができ、活性成分に加えて、本明細書に記載の分散剤、湿潤剤、または懸濁剤等の追加の成分を含むことができる。そのような滅菌した注射可能な製剤は、例えば、水または1,3-ブタンジオール等の非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒を使用して調製することができる。他の許容される希釈剤および溶媒は、リングル液、等張塩化ナトリウム溶液、および合成モノグリセリドまたはジグリセリド等の固定油を含むが、これらに限定されない。有用な他の非経口的に投与可能な製剤は、微結晶形態の、リポソーム調製物の、または生分解性ポリマー系の成分として活性成分を含むものを含む。持続放出または移植用の組成物は、エマルジョン、イオン交換樹脂、難溶性ポリマー、または難溶性塩等の薬学的に許容されるポリマーまたは疎水性材料を含み得る。

10

#### 【0105】

##### さらなる投与形態

本発明の追加の剤形は、米国特許第6,340,475号、同第6,488,962号、同第6,451,808号、同第5,972,389号、同第5,582,837号、および同第5,007,790号に記載されている剤形を含む。本発明の追加の剤形はまた、米国特許出願第2003/0147952号、2003/0104062号、2003/0104053号、2003/0044466号、2003/0039688号、および2002/0051820号に記載されている剤形も含む。本発明の追加の剤形はまた、PCT出願番号WO03/35041、WO03/35040、WO03/35029、WO03/35177、WO03/35039、WO02/96404、WO02/32416、WO01/97783、WO01/56544、WO01/32217、WO98/55107、WO98/11879、WO97/47285、WO93/18755、およびWO90/11757に記載されている剤形も含む。

20

#### 【0106】

##### 徐放性製剤および薬物送達系

本発明の医薬組成物の徐放性または持続放出製剤は、従来の技術を使用して作製することができる。場合によっては、使用される剤形は、異なる比率の所望の放出プロファイルを提供するために、例えば、ヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、浸透圧系、多層コーティング、微粒子、リポソーム、もしくはミクロスフェア、またはそれらの組み合わせを用いて、その中の1つ以上の活性成分の緩徐な放出または徐放として提供され得る。本明細書に記載のものを含む、当業者に既知の適切な徐放性製剤は、本発明の医薬組成物とともに使用するために容易に選択することができる。したがって、徐放に適合させた錠剤、カプセル、ゲルキャップ、およびカプレット等の経口投与に適した単一単位剤形が本発明に含まれる。

30

#### 【0107】

ほとんどの徐放性医薬品は、それらの対応する非制御医薬品によって達成されるものよりも薬物療法を向上させるという共通の目標を有する。理想的には、医薬治療における最適に設計された徐放性製剤の使用は、最小限の時間で状態を治癒または制御するために最小限の原薬が使用されることを特徴とする。

40

#### 【0108】

徐放性製剤の利点として、薬物活性の延長、投与頻度の減少、および患者コンプライアンスの向上が挙げられる。さらに、作用の開始時間、または薬物の血中レベル等の他の特性に影響を与えるために徐放性製剤を使用することができ、したがって、副作用の発生に影響を与えることができる。

#### 【0109】

ほとんどの徐放性製剤は、最初に所望の治療効果を迅速にもたらす量の薬物を放出し、長期間にわたってこのレベルの治療効果を維持するために、他の量の薬物を徐々にかつ継続して放出するように設計される。この一定レベルの薬物を体内で維持するためには、体から代謝および排出される薬物の量を置き換える速度で剤形から薬物が放出されなければ

50

ならない。

**【 0 1 1 0 】**

活性成分の徐放は、様々な誘導因子、例えば、pH、温度、酵素、水、または他の生理学的条件もしくは化合物によって刺激され得る。本発明の文脈における「徐放成分」という用語は、活性成分の徐放を促進する、ポリマー、ポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、リポソーム、もしくはミクロスフェア、またはそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない化合物（単数または複数）として本明細書において定義される。

**【 0 1 1 1 】**

特定の実施形態において、本発明の製剤は、限定されないが、短期、急速な消失、ならびに徐放性、例えば、持続放出性、遅延放出性、およびパルス放出性の製剤であり得る。

10

**【 0 1 1 2 】**

持続放出という用語は、長期間にわたって薬物を徐々に放出し、必ずではないが、長期間にわたって実質的に一定の薬物血中レベルをもたらし得る薬物製剤を指すために、その従来の意味で使用される。期間は1ヶ月以上にも及ぶ場合があり、ボーラス形態で投与される同じ量の薬剤よりも長い放出になるはずである。

**【 0 1 1 3 】**

持続放出のために、化合物は、化合物に持続放出特性を提供する適切なポリマーまたは疎水性材料を用いて製剤化され得る。したがって、本発明の方法を使用するための化合物は、例えば、注射によって微粒子の形態で、または移植によってウェーハもしくはディスクの形態で投与されてもよい。本発明の好ましい実施形態において、本発明の化合物は、持続放出製剤を用いて、単独で、または別の医薬品と組み合わせて、患者に投与される。

20

**【 0 1 1 4 】**

遅延放出という用語は、薬物投与に続いているかの遅延後に薬物を最初に放出し、必ずではないが、約10分～最大約12時間の遅延を含み得る薬物製剤を指すために、本明細書においてその従来の意味で使用される。

**【 0 1 1 5 】**

パルス放出という用語は、薬物投与後に薬物のパルス状血漿プロファイルを生成するような様式で薬物を放出する薬物製剤を指すために、本明細書においてその従来の意味で使用される。

30

**【 0 1 1 6 】**

即時放出という用語は、薬物投与の直後に薬物の放出する製剤を指すために、その従来の意味で使用される。

**【 0 1 1 7 】**

本明細書で使用される場合、短期は、薬物投与後、約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、約40分、約20分、または約10分まで、かつこれらを含む任意の期間、ならびにその任意のまたは全増分もしくは部分的増分を指す。

**【 0 1 1 8 】**

本明細書で使用される場合、急速な消失は、薬物投与後、約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、約40分、約20分、または約10分まで、かつこれらを含む任意の期間、ならびにその任意のおよび全増分もしくは部分的増分を指す。

40

**【 0 1 1 9 】**

当業者は、日常的な実験だけを用いて、本明細書に記載の特定の手順、実施形態、特許請求の範囲、および実施例に対する多数の等価物を認識または確認することができるであろう。そのような等価物は、本発明の範囲内であると見なされ、本明細書に添付される特許請求の範囲によって包含される。例えば、反応時間、反応サイズ／体積、ならびに溶媒、触媒等の実験試薬、圧力、雰囲気条件、例えば窒素雰囲気、および還元剤／酸化剤を含むがこれらに限定されない反応条件の、当該技術分野で認識されている代替物による、かつ日常的な実験だけを用いた改変は、本出願の範囲内であることを理解されたい。

50

## 【0120】

## 定義

本開示による組成物および方法の詳細な説明を理解するのを助けるために、いくつかの明示の定義を提供して、本開示の様々な態様の明確な開示を容易にする。別段の定義のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

## 【0121】

本明細書で使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがDNAテンプレートから(mRNAまたは他のRNA転写物等に)転写されるプロセス、および/または転写されたmRNAが、続いてペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物およびコードされたポリペプチドは、集合的に「遺伝子産物」と称することができる。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は真核細胞でのmRNAのスプライシングを含み得る。

10

## 【0122】

「遺伝子」という用語は、RNA、またはポリペプチドもしくはその前駆体(例えば、プロインスリン)の产生に必要なコード配列を含む核酸(例えば、DNAまたはRNA)配列を指す。機能的ポリペプチドは、ポリペプチドの所望の活性または機能特性(例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達等)が保持されている限り、全長コード配列またはコード配列の任意の一部によってコードされ得る。遺伝子に関して使用される場合の「一部」という用語は、その遺伝子の断片を指す。断片のサイズは、数ヌクレオチドから、遺伝子配列全体から1ヌクレオチドを引いたものまで様々であり得る。したがって、「遺伝子の少なくとも一部を含むヌクレオチド」は、遺伝子の断片または遺伝子全体を含んでもよい。

20

## 【0123】

「遺伝子」という用語は、構造遺伝子のコード領域も包含し、遺伝子が完全長mRNAの長さに対応するように、両端に約1kbの距離で5'および3'末端の両方のコード領域に隣接して位置する配列を含む。コード領域の5'に位置し、mRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と称される。コード領域の3'または下流に位置し、mRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と称される。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNAおよびゲノム形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と称される非コード配列で中断されたコード領域を含む。イントロンは、核RNA(hnRNA)に転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンは、エンハンサー等の調節エレメントを含む場合がある。イントロンは、核転写物または一次転写物から除去または「スプライシング」され、したがって、イントロンはメッセンジャーRNA(mRNA)転写物には存在しない。mRNAは翻訳中に機能し、新生ポリペプチドのアミノ酸の配列または順序を指定する。

30

## 【0124】

「遺伝子導入」および「遺伝子送達」は、特定の核酸配列を標的細胞に確実に挿入するための方法またはシステムを指す。

## 【0125】

核酸分子に関してなされるときの「組換え」という用語は、分子生物学的技術によって一緒に結合された核酸のセグメントから構成される核酸分子を指す。「組換え」という用語は、タンパク質またはポリペプチドに関してなされる場合、組換え核酸分子を使用して発現されるタンパク質分子を指す。

40

## 【0126】

「作動可能に連結された」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の、後者の発現をもたらす機能的連結を指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的関係に置かれる場合、第1の核酸配列は、第2の核酸配列と作動可能に連結している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、プロモーターはコード配列に作動可能に連結している。一般に、作動可能に連結したDNA配列は近接してお

50

り、2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、同じリーディングフレーム内にある。

【0127】

本明細書で使用される場合、「インピトロ」という用語は、多細胞生物内ではなく、人工環境、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養中等で発生する事象を指す。

【0128】

本明細書で使用される場合、「インピボ」という用語は、非ヒト動物等の多細胞生物内で発生する事象を指す。

【0129】

本明細書で使用される場合、「治療」もしくは「治療すること」、または「緩和すること」または「改善すること」は互換的に使用される。これらの用語は、治療的利益および/または予防的利益を含むがこれらに限定されない、有益なまたは望ましい結果を得るためにアプローチを指す。治療的利益とは、治療中の1つ以上の疾患、状態、または症状における任意の治療に関連する改善またはそれらに対する効果を意味する。予防的利益の場合、たとえ疾患、状態、または症状がまだ出現していない場合であっても、特定の疾患、状態、もしくは症状を発症するリスクのある対象、または疾患の生理学的症状の1つ以上を報告する対象に組成物を投与することができる。

10

【0130】

「予防する」、「予防すること」、「予防」、「予防的治療」等の用語は、障害または状態を発症していないが、発症するリスクがあるかまたは発症しやすい対象において障害または状態を発症する可能性を低減することを指す。

20

【0131】

本明細書で使用される「疾患」という用語は、全てがヒトもしくは動物の体または体の部位の1つが正常に機能することを妨げる異常な状態を反映し、典型的には、徴候と症状を区別することによって明らかにされ、ヒトまたは動物の生存期間または生活の質を低下させるという点において、用語「障害」および「状態」(病状の場合のように)と一般的に同義であることが意図され、それらと互換的に使用される。

【0132】

「減少」、「低下した」、「低下」、「減少させる」、または「阻害する」という用語は全て、本明細書では一般に、統計的に有意な量の減少を意味するために使用される。しかしながら、誤解を避けるために、「低下した」、「低下」もしくは「減少させる」または「阻害する」は、参照レベルと比較して少なくとも10%の減少、例えば、少なくとも約20%の減少、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%の減少、または100%を含むそれ以下の減少(参照試料と比較した場合のレベルの欠如)、または参照レベルと比較して10~100%の任意の減少を意味する。

30

【0133】

本明細書で使用される場合、「調節する」という用語は、生物学的状態の任意の変化、すなわち、増加、減少等を指すことを意味する。

40

【0134】

「増加した」、「増加」または「増強」または「活性化」という用語は全て、本明細書では、一般に、静的に有意な量の増加を意味するために使用される。誤解を避けるために、「増加した」、「増加」または「増強」または「活性化」という用語は、参照レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば、少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%の増加、または100%を含むそれ以下の増加、または参照レベルと比較して10~100%の任意の増加、あるいは、少なくとも約2倍、または少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍の増加、または参照

50

レベルと比較して2倍～10倍もしくはそれ以上の任意の増加を意味する。

#### 【0135】

「有効量」、「有効用量」、または「有効投与量」という用語は、所望の効果を達成する、または少なくとも部分的に達成するのに十分な量として定義される。薬物または治療薬の「治療有効量」または「治療有効投与量」は、単独でまたは別の治療薬と組み合わせて使用された場合に、疾患症状の重症度の低下、疾患症状のない期間の頻度および持続期間の増加、または疾患の苦痛による機能障害もしくは能力障害の予防によって証明される疾患の退行を促進する薬物の任意の量である。薬物の「予防有効量」または「予防有効投与量」は、疾患を発症するリスクまたは疾患を再発するリスクのある対象に単独でまたは他の治療薬と組み合わせて投与された場合に、疾患の発症または再発を抑制する薬物の量である。疾患の退行を促進する、または疾患の発症もしくは再発を抑制する治療薬または予防薬の能力は、熟練した開業医に既知の様々な方法を使用して、例えば、臨床試験中のヒト対象において、ヒトにおける有効性を予測する動物モデル系において、またはインビトロアッセイで薬剤の活性をアッセイすることによって、評価することができる。

10

#### 【0136】

用量は、しばしば体重との関連で表される。したがって、[g、mg、または他の単位]/kg(またはg、mg等)として表される用量は、たとえ「体重」という用語が明示的に言及されていない場合でも、通常、「kg(またはg、mg等)体重当たり」の[g、mg、または他の単位]を指す。

20

#### 【0137】

「薬剤」という用語は、本明細書では、化合物、化合物の混合物、生物学的高分子(核酸、抗体、タンパク質またはその一部、例えばペプチド等)、または細菌、植物、真菌、もしくは動物(特に哺乳類)の細胞もしくは組織等の生物学的材料から作製される抽出物を示すために使用される。そのような薬剤の活性は、対象において局所的または全身的に作用する生物学的、生理学的、または薬理学的に活性な物質(または複数の物質)である「治療薬」として薬剤を適切にし得る。

#### 【0138】

「治療薬」、「治療可能薬」、または「治療薬」という用語は互換的に使用され、対象に投与されると何らかの有益な効果を付与する分子または化合物を指す。有益な効果は、診断決定の実施可能性；疾患、症状、障害、または病的状態の改善；疾患、症状、障害または状態の発症の軽減または予防；および疾患、症状、障害または病的状態を全体的に相殺することを含む。

30

#### 【0139】

本明細書で使用される「併用」療法は、文脈から別段に明白でない限り、協調的な様式での2つ以上の治療薬の投与を包含することを意味し、同時投与を含むが、これに限定されない。具体的には、併用療法は、ある治療薬の投与が別の治療薬の投与を何らかの方法で条件付けられているという条件で、同時投与(例えば、合剤の投与または別個の治療組成物の同時投与)および連続または逐次投与の両方を包含する。例えば、ある治療薬は、異なる治療薬が投与され、所定の期間作用させた後にのみ投与され得る。例えば、Kohrt et al. (2011) Blood 117: 2423を参照されたい。

40

#### 【0140】

「試料」、「試験試料」、および「患者試料」は、本明細書で互換的に使用され得る試料は、血清、尿血漿、羊水、脳脊髄液、細胞(例えば、抗体産生細胞)または組織の試料であり得る。そのような試料は、患者から得られたままで直接使用することができるか、または濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、干渉成分の不活性化、試薬の添加等によって前処理し、本明細書で論じられるような何らかの様式で、または当該技術分野で既知の別の様式で試料の特性を変更することができる。本明細書で使用される「試料」および「生物学的試料」という用語は、一般に、抗体等の目的の分析物を含むかどうかについて試験されるおよび/または含むことが疑われる生物学的材料を指す。試料は、対象からの任意の組織試料であり得る。試料は、対象からのタンパク質を含み得る。

50

**【 0 1 4 1 】**

本明細書で使用される「相同」は、2つのポリマー分子間、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子等の2つの核酸分子間、または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットによって占められている場合、例えば、2つのDNA分子の各々における位置がアデニンによって占められている場合、それらはその位置で相同である。2つの配列間の相同性は、一致する位置または相同な位置の数の直接的な関数であり、例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、10サブユニット長のポリマーでは5つの位置）が相同である場合、その2つの配列は50%相同である。位置の90%（たとえば、10のうち9）が一致または相同である場合、その2つの配列は90%相同である。例として、  
DNA配列5' - A T T G C C - 3' および5' - T A T G G C - 3' は50%の相同性を共有する。  
10

**【 0 1 4 2 】**

「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするまたは特定するポリヌクレオチドと作動可能に連結された場合に、その遺伝子産物が、実質的にそのプロモーターに対応する誘導因子が細胞内に存在する場合にのみ、細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列である。

**【 0 1 4 3 】**

本明細書で使用される「阻害する」および「拮抗する」という用語は、分子、反応、相互作用、遺伝子、mRNA、および／またはタンパク質の発現、安定性、機能もしくは活性を測定可能な量だけ減少させることまたは完全に防止することを意味する。阻害剤は、例えば、タンパク質、遺伝子、およびmRNAに結合して、部分的または完全に、刺激を遮断し、活性化を減少させ、防止し、遅延させ、不活性化し、脱感作し、または安定性、発現、機能および活性を下方制御する化合物、例えば、アンタゴニストである。  
20

**【 0 1 4 4 】**

「説明資料」は、その用語が本明細書で使用される場合、刊行物、記録、図、またはキット内の本発明の任意の組成物および／もしくは化合物の有用性を伝えるために使用され得る任意の他の表現媒体を含む。キットの説明資料は、例えば、本発明の任意の組成物を含む容器に貼付され得るか、または任意の組成物を含む容器と一緒に出荷され得る。あるいは、説明資料は、受領者が説明資料と任意の組成物を協調的に使用することを意図して、容器とは別に出荷することもできる。説明資料の送達は、例えば、刊行物もしくはキットの有用性を伝える他の表現媒体の物理的送達によるものであり得るか、または、例えば、電子メール等のコンピュータによる電子送信、もしくはウェブサイトからのダウンロードによって代替的に達成され得る。  
30

**【 0 1 4 5 】**

「単離された」は、自然の状態から変更されるまたは除去されることを意味する。例えば、生きている動物に自然に存在する核酸またはペプチドは「単離」されていないが、その自然の状態の共存物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離」されている。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在し得るか、または例えば宿主細胞等の非天然環境に存在し得る。  
40

**【 0 1 4 6 】**

「単離された核酸」は、天然に存在する状態でそれに隣接する配列から分離された核酸セグメントまたは断片、すなわち、通常は断片に隣接する配列から除去されたDNA断片、すなわち、それが自然に発生するゲノム内の断片に隣接する配列を指す。この用語はまた、核酸に自然に付随する他の成分、すなわち、細胞内で自然にそれに付随するRNAまたはDNAまたはタンパク質から実質的に精製された核酸にも適用される。したがって、この用語は、例えば、ベクター、自律的に複製するプラスミドもしくはウイルス、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれる、あるいは他の配列とは独立して別個の分子として（すなわち、PCRまたは制限酵素消化によって生成されたcDNAまたはゲノムもしくはcDNA断片として）存在する組換えDNAを含む。また、追加の  
50

ポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含まれる。

**【0147】**

別段の指定がない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いに縮重した種類であり、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という句は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列がいくつかの種類でイントロンを含み得る程度までイントロンを含み得る。

**【0148】**

組成物の「非経口」投与は、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、または胸骨内注射、髄腔内、または注入技術を含む。

10

**【0149】**

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、本発明内で有用な少なくとも1つの化合物と、担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、および/または賦形剤等の他の化学成分との混合物を指す。医薬組成物は、生物への化合物の投与を容易にする。

**【0150】**

静脈内、経口、エアロゾル、非経口、点眼、経肺および局所投与を含むがこれらに限定されない、化合物を投与する複数の技術が当該技術分野に存在する。

**【0151】**

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、組成物の生物学的活性または特性を無効にせず、比較的非毒性である担体または希釈剤等の材料を指し、すなわち、材料は、望ましくない生物学的效果を引き起こしたり、またはそれが含まれる組成物の成分のいずれかと有害な様式で相互作用したりすることなく、個体に投与され得る。

20

**【0152】**

「薬学的に許容される担体」という文言は、本発明の化合物(複数可)を、その意図される機能を果たし得るように対象内でまたは対象に運搬または輸送することに関与する、薬学的に許容される塩、薬学的に許容される材料、組成物、または担体、例えば、液体または固体の增量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、またはカプセル化材料を含む。典型的には、そのような化合物は、ある器官または体の一部から別の器官または体の一部に運搬または輸送される。各塩または担体は、製剤の他の成分と適合性があり、かつ対象に有害ではないという意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として機能し得る材料のいくつかの例として以下が挙げられる：ラクトース、グルコース、およびスクロース等の糖；コーンスタークリンジヤガイモデンブン等のデンブン；セルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロース等のその誘導体；粉末トライガカルト；麦芽；ゼラチン；タルク；カカオバターおよび坐剤ワックス等の賦形剤；ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、およびダイズ油等の油；プロピレングリコール等のグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール等のポリオール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル等のエステル；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム等の緩衝剤；アルギン酸；バイロジエンフリー水；等張生理食塩水；リングル液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；希釈剤；造粒剤；潤滑剤；結合剤；崩壊剤；湿潤剤；乳化剤；着色剤；離型剤；コーティング剤；甘味剤；着香剤；芳香剤；防腐剤；抗酸化剤；可塑剤；ゲル化剤；増粘剤；硬化剤(hardener)；硬化剤(setting agent)；懸濁剤；界面活性剤；保湿剤；担体；安定剤；および医薬製剤に使用される他の非毒性適合性物質、またはそれらの任意の組み合わせ。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」はまた、化合物の活性と適合性があり、かつ対象に生理学的に許容される、ありとあらゆるコーティング、抗菌剤および抗真菌剤、ならびに吸収遮延剤等も含む。補足的な活性化合物もまた、組成物に組み込まれ得る。

30

**【0153】**

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という文言は、無機酸、有機酸

40

50

、溶媒和物、水和物、またはそれらのクラスレートを含む、薬学的に許容される非毒性酸から調製される投与化合物の塩を指す。

**【 0 1 5 4 】**

「ポリペプチド」は、アミノ酸残基、関連する天然に存在する構バリアント、およびペプチド結合を介して連結されたそれらの合成の天然に存在しない類似体から構成されるポリマーを指す。合成ポリペプチドは、例えば、自動化されたポリペプチドシンセサイザーを使用して合成することができる。「タンパク質」という用語は、典型的には、大きなポリペプチドを指す。「ペプチド」という用語は、典型的には、短いポリペプチドを指す。

**【 0 1 5 5 】**

本明細書では、ポリペプチド配列を描写するために従来の表記法が使用されており、ポリペプチド配列の左端はアミノ末端であり、ポリペプチド配列の右端はカルボキシル末端である。本明細書で使用される場合、「ペプチド模倣物」は、親ペプチドの生物学的作用を模倣することができる非ペプチド構造のエレメントを含む化合物である。ペプチド模倣物は、ペプチド結合を含んでも含まなくてもよい。

10

**【 0 1 5 6 】**

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、細胞の合成機構、または導入された合成機構によって認識され、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始するために必要とされるDNA配列として定義される。

**【 0 1 5 7 】**

本明細書で使用される場合、「プロモーター／調節配列」という用語は、プロモーター／調節配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に必要とされる核酸配列を意味する。場合によっては、この配列はコアプロモーター配列であり得、他の場合には、この配列はまた、遺伝子産物の発現に必要とされるエンハンサー配列および他の調節エレメントを含み得る。プロモーター／調節配列は、例えば、組織特異的な様式で遺伝子産物を発現するものであり得る。

20

**【 0 1 5 8 】**

本明細書で使用される「組換えポリペプチド」という用語は、組換えDNA法を使用することによって生成されるポリペプチドとして定義される。本明細書で使用される「組換えDNA」という用語は、異なる供給源からのDNAの小片を結合することによって生成されるDNAとして定義される。

30

**【 0 1 5 9 】**

本明細書で使用される「RNA」という用語は、リボ核酸として定義される。「特異的に結合する」または「特異的に結合する」という用語は、本明細書で使用される場合、第1の分子（例えば、抗体）が第2の分子（例えば、特定の抗原性エピトープ）に優先的に結合するが、必ずしもその第2の分子にのみ結合する必要はないことを意味する。

**【 0 1 6 0 】**

本明細書で使用される場合、「対象」は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物を指す。非ヒト哺乳動物は、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、およびマウス哺乳動物等の家畜およびペットを含む。特定の実施形態において、対象はヒトである。「組織特異的」プロモーターは、遺伝子をコードするまたは遺伝子によって特定されるポリヌクレオチドと作動可能に連結された場合、実質的には細胞がそのプロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で生成されるようにするヌクレオチド配列である。

40

**【 0 1 6 1 】**

本明細書で使用される「トランسفェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。「トランسفェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸でトランسفェクト、形質転換、または形質導入されている。細胞は、主要な対象細胞およびその子孫を含む。

**【 0 1 6 2 】**

本明細書で使用される「転写制御下」または「作動可能に連結された」という句は、ブ

50

口モーターが、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するために、ポリヌクレオチドに対して正しい位置および配向にあることを意味する。「バリアント」は、その用語が本明細書で使用される場合、参照核酸配列またはペプチド配列とはそれぞれ配列が異なるが、参照分子の本質的な特性を保持する核酸配列またはペプチド配列である。核酸バリアントの配列における変化は、参照核酸によってコードされるペプチドのアミノ酸配列を変更しない場合があるか、またはアミノ酸の置換、付加、欠失、融合、および短縮をもたらす場合がある。ペプチドバリアントの配列における変化は、典型的には限定的または保存的であるため、参照ペプチドおよびバリアントの配列は全体的に非常に類似しており、多くの領域において同一である。

## 【0163】

10

バリアントおよび参照ペプチドは、任意の組み合わせの1つ以上の置換、付加、または欠失によってアミノ酸配列が異なる場合がある。核酸またはペプチドのバリアントは、対立遺伝子変異体等の天然に存在するバリアントであり得るか、または天然に存在することが知られていないバリアントであり得る。天然に存在しない核酸およびペプチドのバリアントは、突然変異誘発技術または直接合成によって作製することができる。

## 【0164】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、単離された核酸を細胞の内部に送達するために使用され得る物質の組成物である。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物に関連するポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスを含むがこれらに限定されない多数のベクターが当該技術分野で既知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。この用語はまた、例えば、ポリリジン化合物、リボソーム等の、細胞への核酸の移動を容易にする非プラスミドおよび非ウイルス化合物も含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例として、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等が挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0165】

本明細書で使用される場合、「ウイルス」という用語は、細胞をその核酸でトランスフェクトすることができる、外部脂質エンベロープを有するまたは有しない、タンパク質コートに封入された核酸（RNAまたはDNA）からなる粒子として定義される。

## 【0166】

30

本開示全体を通して、本発明の様々な態様を、ある範囲の形式で示すことができる。範囲の形式での記載は、便宜および簡潔性のためであるに過ぎず、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の記載は、全ての可能な部分範囲だけでなく、その範囲内の個々の数値も具体的に開示しているとみなされるべきである。例えば、1～6等の範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6等の部分範囲だけでなく、その範囲内の個々の数字、例えば1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6も具体的に開示しているとみなされるべきである。これは、範囲の広さに關係なく適用される。

## 【0167】

40

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「a n」、および「t h e」は、文脈において明確に別段の指示がない限り、複数形の指示対象を含むことに留意されたい。

## 【0168】

「含む（including）」、「含む（comprising）」、「含む（containing）」、または「有する」という用語およびそれらの変形は、別段の記載のない限り、その後に列挙される項目およびその同等物、ならびに追加の主題を包含することを意味する。

## 【0169】

「一実施形態において」、「様々な実施形態において」、「いくつかの実施形態において」等の句は、繰り返し使用される。そのような句は、必ずしも同じ実施形態を指すとは

50

限らないが、文脈において別段の指示がない場合は指す場合もある。

**【0170】**

「および／または」または「／」という用語は、項目のいずれか1つ、項目の任意の組み合わせ、またはこの用語が関連する全ての項目を意味する。

**【0171】**

「実質的に」という言葉は、「完全に」を除外するものではなく、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まなくてもよい。必要に応じて、「実質的に」という語は、本発明の定義から省略され得る。

**【0172】**

本明細書で使用される場合、「およそ」または「約」という用語は、当該1つ以上の値に適用される場合、記載された参照値と同様の値を指す。いくつかの実施形態において、「およそ」または「約」という用語は、別段の記載のない限り、または文脈から明らかでない限り、記載される参照値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはそれより低い範囲内にある値の範囲を指す（そのような数が可能な値の100%を超える場合を除く）。本明細書において別段の指示がない限り、「約」という用語は、個々の成分、組成物、または実施形態の機能に関して同等である、記載された範囲に近い値、例えば、重量パーセントを含むことを意図する。

10

**【0173】**

値および範囲が本明細書で提供される場合は常に、これらの値および範囲に包含される全ての値および範囲が、本発明の範囲内に包含されることを意味することを理解されたい。さらに、これらの範囲内にある全ての値、および値の範囲の上限または下限もまた、本出願によって企図される。

20

**【0174】**

本明細書で使用される場合、「それぞれ」という用語は、項目の集合について使用される場合、集合内の個々の項目を識別することを意図しているが、必ずしも集合内の全ての項目を指すわけではない。明示的な開示または文脈が明らかにそうでないことを指示する場合は、例外が発生する可能性がある。

**【0175】**

本明細書に提供されるありとあらゆる例、または例示的な文言（例えば「等」）の使用は、単に本発明をより明確にすることを意図しており、別様に特許請求されない限り、本発明の範囲に制限を課すものではない。本明細書におけるいかなる文言も、本発明の実施に不可欠な特許請求されていない要素を示していると解釈されるべきではない。

30

**【0176】**

本明細書に記載の全ての方法は、本明細書に別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実行することができる。提供される方法のいずれかについて、方法のステップは、同時にまたは連續して行われ得る。方法のステップが連續して行われる場合、別段の記載がない限り、ステップは任意の順序で行われ得る。

**【0177】**

方法がステップの組み合わせを含む場合、本明細書に別段の記載がない限り、ステップのありとあらゆる組み合わせまたは部分的組み合わせが本開示の範囲内に含まれる。

40

**【0178】**

本明細書で引用される各刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、本開示と矛盾しない範囲で、その全体が参照により組み込まれる。本明細書に開示される刊行物は、本発明の出願日より前のそれらの開示のためにのみ提供される。本明細書に記載のいかなるものも、本発明が先行発明のためにそのような刊行物に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、提供される発行日は実際の発行日と異なる場合があり、個別に確認する必要があり得る。

**【0179】**

50

本明細書に記載の例および実施形態は、例示のみを目的としており、それに照らして様々な修正または変更が当業者に提案され、本出願および添付の特許請求の範囲の主旨および範囲に含まれることを理解されたい。

### 【実施例】

#### 【0180】

##### 実施例 1

別段の記載のない限り、全ての出発物質は商業的供給者から入手し、精製せずに使用した。本書に記載されているように、患者由来の人工多能性幹細胞（iPSC）は、NIHが資金提供するバイオリポジトリ（www.nimhgenetics.org/available\_data/ipsc/）から入手した。正常な健康な細胞と、SOD1（N139K）に変異を有し、家族性ALSと診断された個人の細胞の両方を使用した。成長因子および特殊培地の定義されたレジメンによる40日の処理後に運動ニューロンの培養をもたらす分化プロトコルが確立されている（図1）。治療（ASPA）および対照（GFP）遺伝子をAAVベクターにパッケージングし、細胞の初期コホートを処理してミトコンドリア機能に対する影響を評価した。SOD1変異運動ニューロンから単離されたミトコンドリアは、野生型細胞と比較してATP合成速度が低いことが示されたが、これらの変異細胞にAAV-ASPAで形質導入すると、発光ベースのインサイチュアッセイによって評価されるように、AAV-GFP対照と比較してミトコンドリアのATP合成速度が大幅に回復された（図2）。

10

#### 【0181】

##### 実施例 2

16週齢のSOD G93Aマウスの脊髄から単離されたミトコンドリアにおけるATP合成のASPA由来遊離アスパラギン酸による促進の分析。

機械的均質化および分画遠心分離を使用して、16週齢のSOD G93A全脊髄からミトコンドリアを単離した。ミトコンドリアは、アッセイに使用するまで氷上に維持した。市販の発光ベースのキットを使用して、30 μgの単離されたミトコンドリアでATP合成の速度を分析した。1.0 mM リンゴ酸塩、1.0 mM グルタミン酸、10 mM NADH、および0.2 mM ADPを含む反応混合物を、ルシフェラーゼおよびルシフェリンを含む溶液中で調製し、30 μgのミトコンドリアを添加した。2 U/m1のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよび3 U/m1のリンゴ酸脱水素酵素を添加するとMASが駆動され、ATP合成が開始される。本実施例では、図8のスキームに従って、遊離アスパラギン酸を、野生型ASPAまたは非機能的変異体ASPAのいずれかを過剰発現する細胞からのライセートを5 mM NAAとインキュベートすることによって生成された反応生成物の代わりに使用した。野生型ASPA反応生成物をSOD脊髄ミトコンドリアに添加すると、3分にわたる発光によって測定されるように、ATP合成速度が大幅に増加したが、非機能的E285A ASPA変異体反応生成物を添加しても増加は見られなかった（図9）。これらの反応生成物のアスパラギン酸含有量をHPLCにより評価したところ（表1）、野生型ASPA反応生成物でアスパラギン酸が800倍超増加したことが示された。

20

#### 【0182】

表1は、野生型ASPAプラスミド(WT)または非機能的E285 ASPA(E285A)でトランスフェクトしたHeLa細胞からの50 μlライセートを5 mM NAAと2時間インキュベートした後の反応生成物のアスパラギン酸含有量を示す。反応は、50 mM Tris-HCL(pH 8.0)、50 mM NaCl、0.5 mM DTT、0.05% IPEGAL CA630、および5 mM NAAを含む200 μlの混合物中で行った。95まで3分間加熱することにより反応を停止させた。OPA誘導体化試料のHPLC分析により、20 μlの反応混合物をアスパラギン酸濃度についてアッセイした。各トランスフェクショングループにつき、5つの個別の試料をアッセイした。

30

40

50

## 【表 2】

表1. A S P A活性アッセイのアスパラギン酸含有量

	アスパラギン酸濃度(μMOL)	50 μL 中のアスパラギン酸含有量
WT	860.67	215.1675
	978.22	244.555
	567.83	141.9575
	1063.22	265.805
	722.47	180.6175
平均	838.482	209.6205
SD	198.265903	49.5664759
SEM	88.6672075	22.1668019
E285A	1.27	0.3175
	0	0
	2.11	0.5275
	0	0
	0	0
平均	0.676	0.169
SD	0.97212653	0.24303163
SEM	0.4347482	0.10868705

## 【0183】

## 実施例 3

## S O D G 9 3 A マウスの A A V - A S P A 处理

8週齢の雄SOD G93Aマウスに、腰椎髄腔内注射により $1 \times 10^{11}$  AAV9-CBh-A SPAベクターゲノム(vg)を形質導入した。マウスを吸入麻酔(イソフルラン、4%誘導、効果を発揮するように滴定された維持量)により麻酔し、ベクターを5 μlの体積で送達した。対照動物には、同じ投与経路(ROA)を介して5 μlの生理食塩水(0.9%)を投与した。9~16週齢から週に1回、加速ロータロッド(4~40 rpm)上で動物の試験を行った。3回の連続した3分間の試行にわたる平均落下潜時を記録した(個々の試行間には30秒の休止期間)。9~11週間を訓練セッションとして指定し、12、13、14、15、および16週目の落下潜時を生理食塩水処理群とAAV9-A SPA処理群(n=15/群)とで比較した。ロータロッド分析は、処理群を知らされていない個人によって行われた。AAV9-A SPAで処理した変異マウスは、ロータロッドの成績(落下潜時)に長期的な改善を示し、15週齢および16週齢で統計的に有意であった(それぞれp=0.0218、0.0271)。

## 【0184】

AAV9-A SPAで処理したSOD G93A動物におけるNAA異化作用の増加は、ATP:AMP比の増加と関連している。

## 【0185】

NAAは、ALSを含む広範囲の神経変性疾患における病理学的エネルギー不足の増加に関連して特徴的に減少する。現在の研究の中心的な仮説は、この代謝反応は、両方の合成プロセスによる遊離アスパラギン酸に関する共通要件のために、ミトコンドリアの酸化的リン酸化およびATP合成からのNAA合成の脱共役の試みによるというものである。

10

20

30

40

50

したがって、図 9 に提示されるデータの通り、外因的に供給された A S P A による内因性 N A A からのアスパラギン酸の遊離は、ミトコンドリア電子伝達系 ( E T C ) で使用するための細胞質ゾルアスパラギン酸のミトコンドリアへの輸入を促進するシャトル機構を介して、ミトコンドリアによる A T P 合成を支持することが予想されるであろう。現在の介入は、利用可能なエネルギー通貨の増加として測定される、 E T C の燃料として作用する N A A 供給アスパラギン酸と一致するデータによりこの仮説を支持することが予想される。これに関連する主要なメトリックは、 A S P A 導入遺伝子の機能である。 A A V で送達された A S P A の機能は、 16 週目のロータロッド分析の直後に 16 週齢の S O D G 9 3 A 動物から単離された脊髄において確認した。年齢を一致させた C 5 7 B L / 6 J 野生型 ( 非 S O D ) 雄マウスを較正参照対照として使用した。 A A V 9 - A S P A および生理食塩水対照 S O D G 9 3 A マウスの脊髄の N A A 、 A M P 、および A T P 含有量を H P L C で分析した。瞬間凍結した全脊髄は、 16 週目のロータロッド分析の直後に 16 週齢の動物から得た。機械的な分散要素を使用して全脊髄を沈殿溶液中で均質化し、クロロホルムで抽出した。このように調製された試料を等分し、その後の分析のために -80 ° で保存した。標的代謝物の絶対モル濃度は、精製された参照標準から作成された標準曲線を使用して計算した。臨床および動物モデル母集団の両方においてこの代謝物で以前に報告された減少の通り、 16 週齢の生理食塩水で処理した S O D G 9 3 A マウスは、野生型参照と比較して脊髄 N A A の減少を示した ( p = 0.0015 、 n = 5 / 群、 図 11 ) 。生理食塩水で処理した変異マウスの脊髄も A T P : A M P 比の低下 ( p = 0.0134 ) を示し、 A T P の加水分解 ( すなわち使用 ) がその合成を上回っていることが示唆された。 S O D G 9 3 A A A V 9 - A S P A で処理した脊髄は、生理食塩水で処理した対照と比較してさらに 1.7 倍の N A A の減少 ( p = 0.011 、 n = 5 / 群 ) を示し、 A T P : A M P 比の有意な増加 ( p = 0.0045 ) に関する、 A A V で送達された A S P A 導入遺伝子の機能が示唆され、 A T P 産生の増加およびエネルギー状態の改善が示唆された。このことは、 A A V 9 - A S P A による形質導入に起因して増加した N A A 異化作用の産物が、運動機能に対する関連した利点を伴って、生体利用可能なエネルギー通貨を支持することを意味している ( 図 10 ) 。

#### 【 0186 】

A A V 9 - A S P A で処理した脊髄ミトコンドリアは、利用可能な N A A 由来のアスパラギン酸と比較して現れる増加した A T P 合成レベルを示す。

#### 【 0187 】

生理食塩水および A A V 9 - A S P A で処理した S O D G 9 3 A 変異マウスの脊髄から、ならびに 16 週齢の年齢を一致させた野生型対照から、無傷のミトコンドリアを単離し、発光ベースのアッセイを使用して A T P 合成速度を評価するために使用した。各コホートからのミトコンドリアに A D P を提供し、 A T P への変換率を 3 分にわたって評価し、ミトコンドリアタンパク質の平均 A T P 合成速度 ( n M / 分 / mg ) として表した ( 図 12 ) 。 16 週齢 S O D G 9 3 A の生理食塩水で処理した脊髄ミトコンドリアの A T P 合成速度は、年齢を一致させた野生型対照と比較して 1.7 倍減少し ( p = 0.00058 ) 、病理学的なエネルギー危機を示した。 A A V 9 - A S P A で処理した S O D G 9 3 A ミトコンドリアの A T P 合成速度は、 A T P : A M P 比の改善と一致して生理食塩水対照よりも有意に増加し ( p = 0.0022 ) ( 図 10 B ) 、 A S P A 異化アスパラギン酸によるミトコンドリアの酸化的代謝の促進によって、運動機能の低下を回復させることができることを示している。

#### 【 0188 】

本発明は実施形態に重点を置いて説明してきたが、組成物および方法の変形例が使用され得ること、ならびに本発明が本明細書に具体的に記載される以外の方法で実施され得ることが意図されることには明らかであろう。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によって定義される本発明の主旨および範囲内に包含される全ての修正例を含む。

10

20

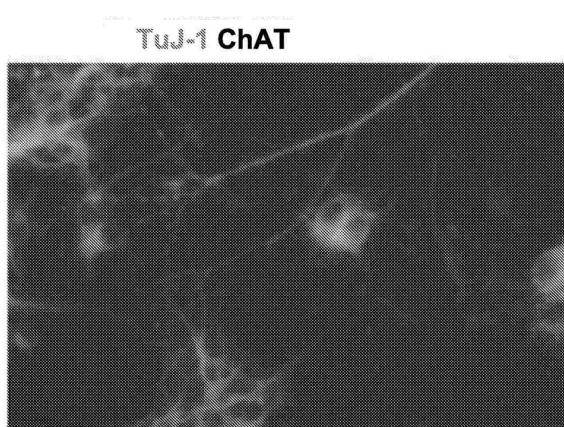
30

40

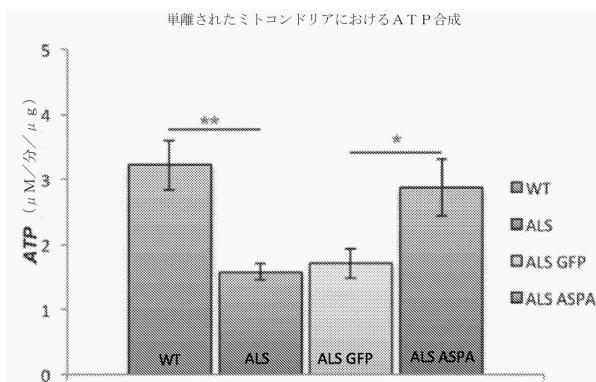
50

【図面】

【図 1】

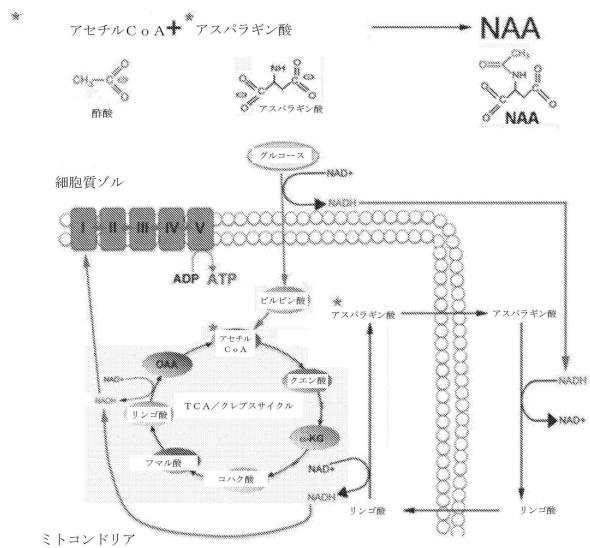


【図 2】

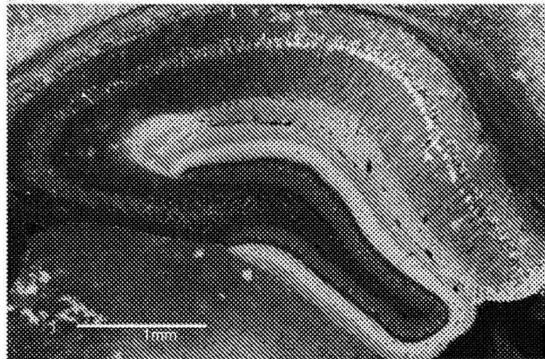


10

【図 3】



【図 4 A】



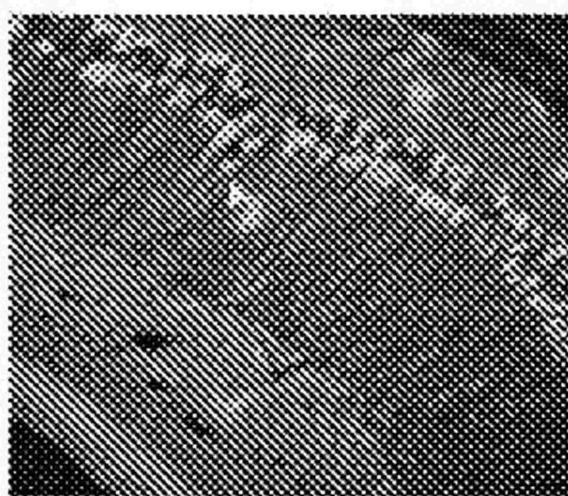
20

30

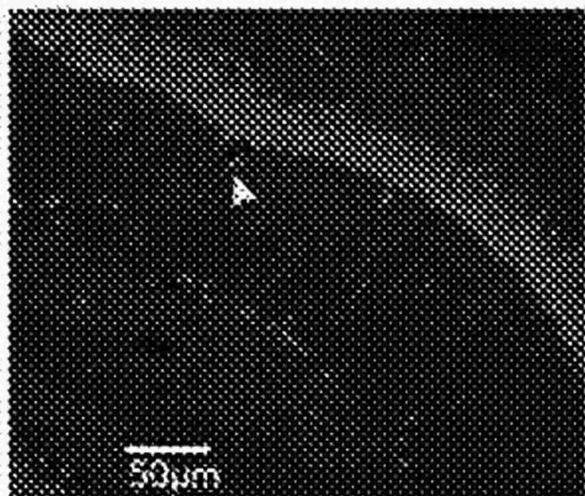
40

50

【図 4 B】

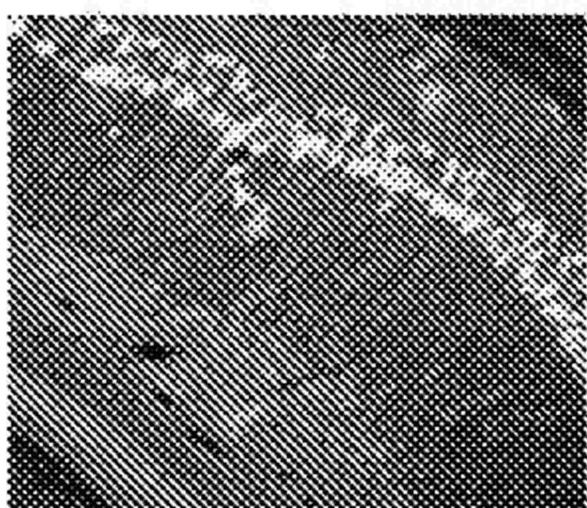


【図 4 C】

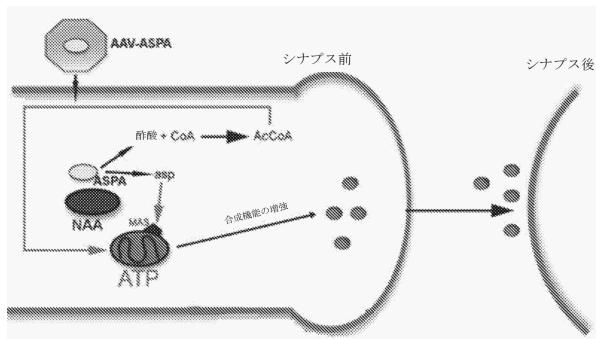


10

【図 4 D】



【図 5】



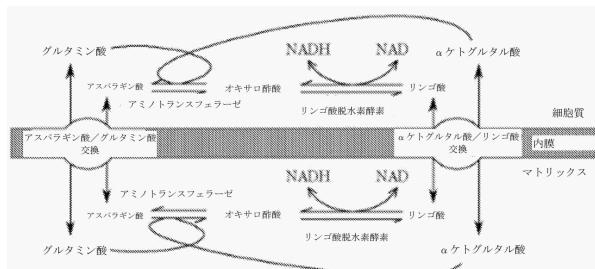
20

30

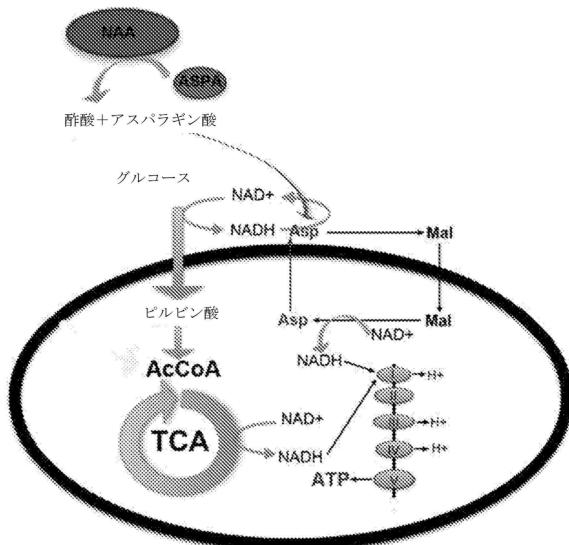
40

50

【図 6】

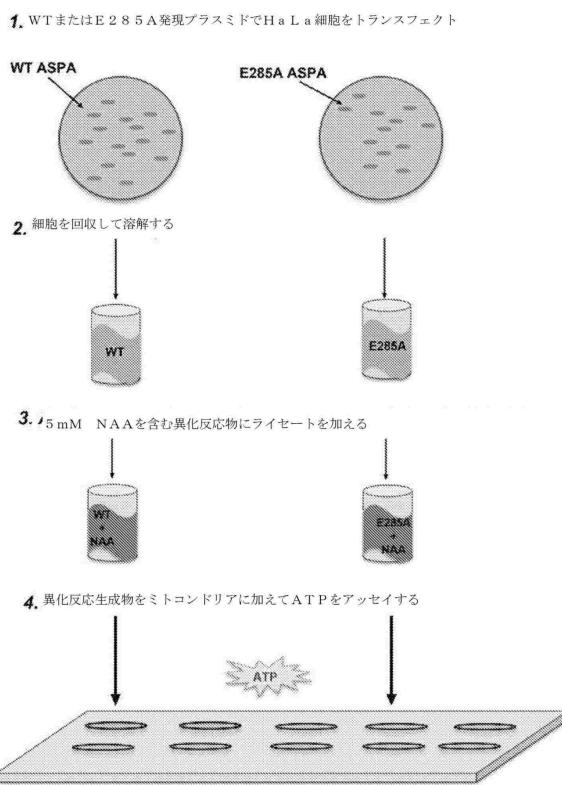


【図 7】

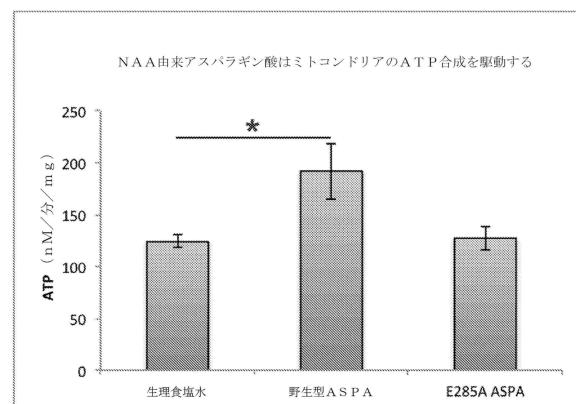


10

【図 8】



【図 9】



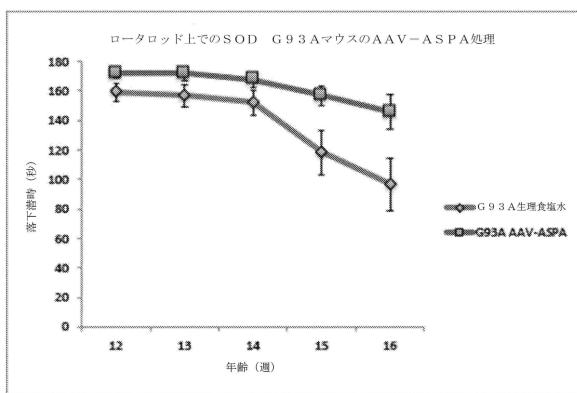
20

30

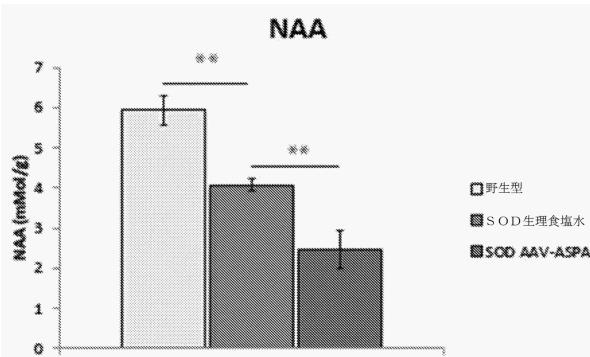
40

50

【図 10】

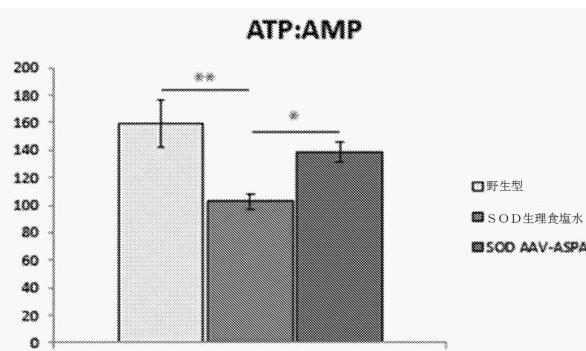


【図 11 A】

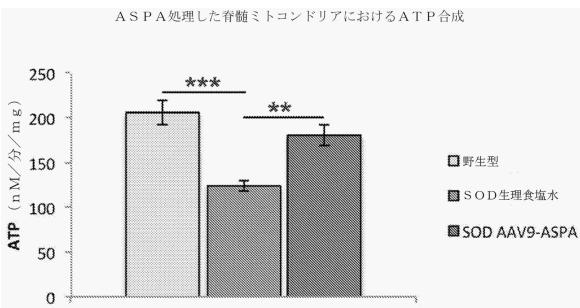


10

【図 11 B】



【図 12】



20

【配列表】

0007587275000001.app

30

40

50

---

フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K 31/428(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/4152(2006.01)	A 6 1 K 31/428
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	A 6 1 K 31/4152
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
	C 1 2 N 15/55

審査官 池上 文緒

## (56)参考文献

米国特許出願公開第2013/0323229 (U.S., A1)

特表2013-531471 (JP, A)

国際公開第2017/181105 (WO, A1)

特表2011-504088 (JP, A)

Arch Neurol., 2011年, Vol. 68, No. 10, pp. 1308-1312

Neurological Research, 2012年, Vol. 34, No. 3, pp. 297-303

J. Med. Chem., 2009年, Vol. 52, pp. 5442-5448

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 8 / 0 0  
A 6 1 K 3 5 / 7 6  
A 6 1 K 3 8 / 5 0  
A 6 1 P 2 1 / 0 0  
A 6 1 P 2 5 / 0 2  
A 6 1 P 4 3 / 0 0

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
U n i P r o t / G e n e S e q