(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-521111
(P2025-521111A)
(43)公表日　令和7年7月8日(2025.7.8)

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ* | *7/01 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 7/01 | | ４Ｂ０６５ |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/28 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/28 | ＺＮＡ | ４Ｃ０８４ |
| *Ａ６１Ｋ* | *35/76 (2015.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/76 | | ４Ｃ０８７ |
| *Ａ６１Ｋ* | *48/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 48/00 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *43/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １１１ | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全80頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-568194(P2024-568194)
(86)(22)出願日　令和5年5月15日(2023.5.15)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月12日(2024.12.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/067013
(87)国際公開番号　WO2023/225481
(87)国際公開日　令和5年11月23日(2023.11.23)
(31)優先権主張番号　63/342,590
(32)優先日　令和4年5月16日(2022.5.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/459,564
(32)優先日　令和5年4月14日(2023.4.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　500034653
ジェンザイム・コーポレーション
アメリカ合衆国０２１４１マサチューセッツ州ケンブリッジ．ウォーター・ストリート４５０
(74)代理人　100127926
弁理士　結田 純次
(74)代理人　100216105
弁理士　守安 智
(72)発明者　シィアム・ラマチャンドラン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４１．ケンブリッジ．ウォーター・ストリート４５０．サノフィ．パテント・デパートメント

Ｆターム（参考）　4B065　AA93Y AA95X AB01 AC
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　異染性白質ジストロフィーを治療する方法

(57)【要約】
肝細胞において導入遺伝子を発現するための発現カセットが本明細書において提供され、導入遺伝子は、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする。また、異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）を治療する方法が提供される。さらに、ＡＲＳＡポリペプチドを必要とする個体においてそのＡＲＳＡポリペプチドを発現するための、ベクター（例えば、ｒＡＡＶベクター）、ウイルス粒子、医薬組成物、及びキットが本明細書において提供される。

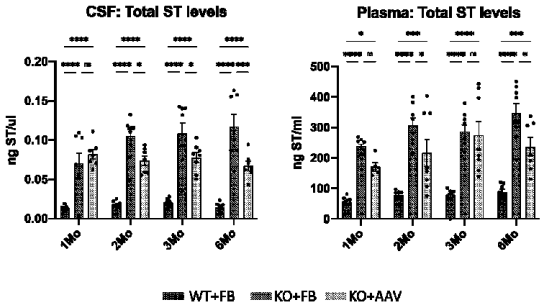



FIG. 27

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（１）アリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）ポリペプチドを発現するための発現カセットを含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターであって、前記発現カセットは、プロモーター及び任意選択的にエンハンサーに作動可能に連結された前記ＡＲＳＡポリペプチドをコードする遺伝子を含むベクター；及び（２）配列番号１０を有するターゲティングペプチドを含む改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質を含む、ｒＡＡＶ粒子。
【請求項２】
前記ＡＲＳＡポリペプチドは、配列番号１を含む、請求項１に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項３】
前記ターゲティングペプチドは、そのＮ末端及びＣ末端にリンカー配列が隣接している、請求項１又は２に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４】
前記組み合わされたターゲティングペプチド及びリンカー配列は、配列番号１１を含む、請求項３に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項５】
改変カプシドタンパク質は、配列番号１２と少なくとも９８．５％同一である配列を有する、請求項１～４のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項６】
前記改変カプシドタンパク質は、配列番号１２を含む配列を含む、請求項５に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項７】
前記発現カセットは、配列番号２のコドン最適化ＡＲＳＡ遺伝子を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項８】
前記ｒＡＡＶベクターは、配列番号４の５’ＡＡＶ２　ＩＴＲ及び配列番号５の３’ＡＡＶ２　ＩＴＲを含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項９】
前記発現カセットは、配列番号６を含むＣＭＶエンハンサーエレメントを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項１０】
前記発現カセットは、配列番号７を含むニワトリβアクチンプロモーターを含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項１１】
前記ｒＡＡＶベクターは、ＷＰＲＥエレメントをさらに含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項１２】
前記ＷＰＲＥエレメントは、配列番号８の配列を含む、請求項１１に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項１３】
前記ｒＡＡＶベクターは、配列番号１６の配列を含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項１４】
異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）の治療を必要とするヒト患者の異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）を治療する方法であって、前記患者の脳脊髄液（ＣＳＦ）に、有効量の請求項１～１３のいずれか一項に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）のウイルス粒子を含む組成物を投与することを含む、方法。
【請求項１５】
前記組成物は、脳室内（ＩＣＶ）投与によって前記患者のＣＳＦに直接投与される、請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】
前記組成物が、直接システルナマグナ（ｄＣＭ）投与によって前記患者のＣＳＦに直接投与される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
前記組成物は、髄腔内マイクロカテーテル（ＩＴ－ＣＭ）で前記患者のＣＳＦに直接投与される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１８】
前記組成物は、前記患者の生涯を通じて１回だけ投与される、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記組成物は、前記患者に１年に１回だけ投与される、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記投与により、前記患者のＡＲＳＡ活性が少なくとも５％増加する、請求項１４～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記投与により、前記患者のＡＲＳＡ活性が少なくとも１０％増加する、請求項１４～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記投与により、前記患者のＡＲＳＡ活性が少なくとも２０％増加する、請求項１４～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記投与により、前記患者のＡＲＳＡ活性が少なくとも３０％増加する、請求項１４～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記投与により、前記患者のＡＲＳＡ活性が少なくとも５０％増加する、請求項１４～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
ＡＲＳＡの発現及び／又は活性を増加させる必要がある個体の、ＡＲＳＡの発現及び／又は活性を増加させる方法であって、有効量の請求項１～１３のいずれか一項に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）のウイルス粒子を含む組成物を前記患者の脳脊髄液（ＣＳＦ）に投与することを含む、方法。
【請求項２６】
配列番号３を含む、プラスミド。
【請求項２７】
配列番号２を含む、コドン最適化ヒトＡＲＳＡ配列。
【請求項２８】
配列番号２を含むコドン最適化ヒトＡＲＳＡ配列を含む、発現カセット。
【請求項２９】
配列番号７を含むニワトリβアクチンプロモーターをさらに含む、請求項２８に記載の発現カセット。
【請求項３０】
配列番号６を含むＣＭＶエンハンサーエレメントをさらに含む、請求項２８又は２９に記載の発現カセット。
【請求項３１】
請求項２７～３０のいずれか一項に記載の発現カセットを含む、ベクター。
【請求項３２】
配列番号８を含むＷＰＲＥエレメントをさらに含む、請求項３１に記載のベクター。
【請求項３３】
請求項１～１３のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子を含む、医薬組成物。

【請求項３４】
請求項３３に記載の医薬組成物を含む、キット。
【請求項３５】
（１）アリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）ポリペプチドを発現するための発現カセットを含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターであって、前記発現カセットは、プロモーター及び任意選択的にエンハンサーに作動可能に連結された前記ＡＲＳＡポリペプチドをコードする遺伝子を含むベクター；及び（２）配列番号１０を有するターゲティングペプチドを含む改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質を含む、ＭＬＤの治療に使用するためのｒＡＡＶ粒子。
【請求項３６】
前記ＡＲＳＡポリペプチドは、配列番号１を含む、請求項３５に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項３７】
前記ターゲティングペプチドは、そのＮ末端及びＣ末端にリンカー配列が隣接している、請求項３５又は３６に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項３８】
前記組み合わされたターゲティングペプチド及びリンカー配列は、配列番号１１を含む、請求項３７に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項３９】
前記改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質は、改変ＶＰ３カプシドタンパク質である、請求項３５～３８のいずれか一項に記載のｒａＡＶ粒子。
【請求項４０】
改変ＶＰ３カプシドタンパク質は、配列番号１２と少なくとも９８．５％同一である配列を有する、請求項３５～３８のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４１】
改変ＶＰ３カプシドタンパク質は、配列番号１２を含む配列を含む、請求項４０に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４２】
ＶＰ１、ＶＰ２及びＶＰ３カプシドタンパク質は、非改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質である、請求項３５～３８のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４３】
前記発現カセットは、配列番号２のコドン最適化ＡＲＳＡ遺伝子を含む、請求項３５～４２のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４４】
前記ｒＡＡＶベクターは、配列番号４の５’ＡＡＶ２　ＩＴＲ及び配列番号５の３’ＡＡＶ２　ＩＴＲを含む、請求項３５～４３のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４５】
前記発現カセットは、配列番号６を含むＣＭＶエンハンサーエレメントを含む、請求項３５～４４のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４６】
前記発現カセットは、配列番号７を含むニワトリβアクチンプロモーターを含む、請求項３５～４５のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４７】
前記ｒＡＡＶベクターは、ＷＰＲＥエレメントをさらに含む、請求項３５～４６のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４８】
前記ＷＰＲＥエレメントは、配列番号８を含む配列を有する、請求項４７に記載のｒＡＡＶ粒子。
【請求項４９】
前記ｒＡＡＶベクターは、配列番号１６を含むｈ愛列を有する、請求項３５～４８のいずれか一項に記載のｒＡＡＶ粒子。

【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、２０２２年５月１６日に出願された米国仮特許出願第６３／３４２，５９０号及び２０２３年４月１４日に出願された米国仮特許出願第６３／４５９，５６４号の優先権利益を主張し、それぞれの内容は参照により全体が組み込まれる。
【０００２】
電子配列表の参照
電子配列表の内容（１５９７９２０１８４４０ｓｅｑｌｉｓｔ．ｘｍｌ；サイズ：３６，３１４バイト；作成日：２０２３年５月８日）は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
本開示は、異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）の治療を必要とする患者の異染性白質ジストロフィーを治療する方法であって、患者の脳脊髄液（ＣＳＦ）に、アリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）をコードするベクターを含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）のウイルス粒子を投与することを含む方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）は、酵素アリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）の変異によって引き起こされる常染色体劣性神経変性障害である。ＡＲＳＡ活性レベルの低下は、中枢神経系及び末梢神経系にミエリン形成細胞（オリゴデンドロサイト及びシュワン細胞）の変性を特徴とするスルファチドの毒性蓄積をもたらす。これにより、脱髄、機能不全、ニューロンの変性及び神経炎症（アストロサイトーシス、ミクログリア活性化）が生じる。臨床症状は主に神経系にあり、知的障害、感情的及び行動的問題、運動能力（移動、発話、嚥下）の喪失、筋肉機能の低下及び麻痺、失明、難聴及び発作をもたらす。
【０００５】
ＭＬＤの現在の治療には、同種骨髄移植を含む自家造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）が含まれる。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００６】
いくつかの態様では、本発明は、異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）の治療を必要とする患者の異染性白質ジストロフィーを治療する方法であって、患者の脳脊髄液（ＣＳＦ）に、アリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）（本明細書では、ＡＲＳＡポリペプチドとも称する）をコードするベクターを含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）のウイルス粒子を投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、脳室内（ＩＣＶ）投与、直接システルナマグナ（ｄＣＭ）投与又は髄腔内マイクロカテーテル（ＩＴ－ＣＭ）によって、ＣＳＦに直接投与される。
【０００７】
本発明は、少なくとも部分的には、（ａ）アリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）ポリペプチドをコードする発現カセットを含むｒＡＡＶベクターと、（ｂ）中枢神経系（ＣＮＳ）の細胞を形質導入することができるカプシドとを含むｒＡＡＶウイルス粒子の開発に基づく。ウイルス粒子のＣＳＦへの投与は、脳におけるＡＲＳＡタンパク質の高レベルの発現を提供する。特定の実施形態では、ウイルス粒子の発現カセットは、中枢神経系及び末梢神経系において、ＭＬＤを治療する導入遺伝子発現を促進することができる。いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号２のＡＲＳＡ遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡ遺伝子は、配列番号１を有するＡＲＳＡポリペプチドを発現する。
【０００８】

いくつかの態様では、本発明は、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターを含むｒＡＡＶ粒子であって、ｒＡＡＶベクターは、中枢神経系及び末梢神経系においてＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセットを含み、発現カセットは、プロモーター及び任意選択的にエンハンサーに作動可能に連結された導入遺伝子を含み、導入遺伝子は、ＡＲＳＡポリペプチドをコードし、ＡＡＶウイルス粒子は、中枢神経系（ＣＮＳ）の細胞に形質導入することが可能なカプシドタンパク質を含むｒＡＡＶ粒子を提供する。いくつかの実施形態では、ＡＡＶカプシドタンパク質は、ＡＡＶ９カプシドタンパク質（配列番号９）である。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶのカプシドは、改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質である。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶのカプシドは、ＡＡＶ．ｒｈ１０カプシドタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡ遺伝子は、配列番号１を有するＡＲＳＡポリペプチドを発現する。

【０００９】

いくつかの実施形態では、本開示は、脳をｒＡＡＶ粒子の標的とするターゲティングペプチドを含む改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質を含む、ＡＲＳＡポリペプチドのＣＳＦ内投与のためのｒＡＡＶ粒子を提供する。そのような改変ＡＡＶ９カプシドは、国際公開第２０２１／１０２２３４Ａ１号パンフレットに記載されており、この文献はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、改変ＡＡＶ９カプシドのターゲティングペプチドは、ＡＡＶ９構造タンパク質の残基５８８の後に挿入される。いくつかの実施形態では、ターゲティングペプチドは、配列番号１０を有する。いくつかの実施形態では、ターゲティングペプチドは、ターゲティングペプチドのＮ末端及びＣ末端にリンカー配列が隣接している。いくつかの実施形態では、Ｎ末端側のリンカー配列は、配列ＡＡＡを有する。いくつかの実施形態では、Ｃ末端側のリンカー配列は、ＡＳである。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ９カプシド構造タンパク質の残基５８８の後に挿入された完全配列は、配列番号１１を有する。いくつかの実施形態では、完全改変ＡＡＶ９カプシド構造タンパク質（ＶＰ１）は、配列番号１２を有する。配列番号１２を有するカプシドタンパク質は、本明細書ではＡＡＶ１９９９と称される。いくつかの実施形態では、完全改変ＡＡＶ９カプシド構造タンパク質は、配列番号１２と少なくとも９０％（例えば、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９８．５％、少なくとも９９％、少なくとも９９．２％、少なくとも９９．５％、又は少なくとも９９．８％）同一であり、ここで、改変ＡＡＶ９構造カプシドは、配列番号１０のターゲティングペプチドを含む。

【００１０】

本明細書に開示される改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質を含むｒＡＡＶ粒子は、３つの構造カプシドタンパク質、ＶＰ１、ＶＰ２及びＶＰ３を含む。３つのカプシドタンパク質は、選択的スプライスバリアントである。完全長ＶＰ１タンパク質は、配列番号９の配列を有する。ＶＰ２タンパク質は、配列番号９のアミノ酸１３８～７３６を含む。ＶＰ３タンパク質は、配列番号９のアミノ酸２０３～７３６を含む。いくつかの実施形態では、ターゲティングペプチド（配列番号１０）は、ｒＡＡＶ粒子中のＡＡＶ９　ＶＰ３カプシドタンパク質に挿入される。いくつかの実施形態では、ターゲティングペプチド（配列番号１０）は、ｒＡＡＶ粒子中のＡＡＶ９　ＶＰ２カプシドタンパク質に挿入される。いくつかの実施形態では、ターゲティングペプチド（配列番号１０）は、ｒＡＡＶ粒子中のＡＡＶ９　ＶＰ１カプシドタンパク質に挿入される。いくつかの実施形態では、ターゲティングペプチド（配列番号１０）は、ｒＡＡＶ粒子内のＶＰ１、ＶＰ２及びＶＰ３カプシドタンパク質に挿入される。いくつかの実施形態では、改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質中のターゲティングペプチドは、ターゲティングペプチドのＮ末端及びＣ末端にリンカー配列が隣接している。いくつかの実施形態では、Ｎ末端側のリンカー配列は、配列ＡＡＡを有する。いくつかの実施形態では、Ｃ末端側のリンカー配列は、ＡＳである。

【００１１】

配列番号１０のターゲティングペプチドを含む改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質を含むｒＡＡＶ粒子は、対象の脳への投与（例えば、ＣＳＦ内投与）後に非常に高いレベルの導

入遺伝子発現を示すことが発見された。例えば、配列番号１２を有する改変ＶＰ１カプシドタンパク質（及び／又は配列番号１３を有する改変ＶＰ２カプシドタンパク質及び／又は配列番号１４を有する改変ＶＰ２カプシドタンパク質）を含むｒＡＡＶ粒子は、ｒＡＡＶ粒子のＣＳＦ内投与後、ＣＮＳの細胞に形質導入することができる他のカプシド、例えばＡＡＶ９及びＡＡＶ．ｒｈ１０を含むｒＡＡＶ粒子よりも、脳及び脊髄において、より高いレベルの導入遺伝子発現を示す。逆に、配列番号１０のターゲティングペプチドを含む改変ＡＡＶ９カプシドを含むｒＡＡＶ粒子のＣＳＦ内投与後、心臓及び肝臓などの他の臓器で発現される導入遺伝子のレベルは、実質的により低い。さらに、配列番号１０のターゲティングペプチドを含む改変ＡＡＶ９カプシドを含むｒＡＡＶ粒子は、ＣＮＳの細胞に形質導入することができる他のカプシド、例えばＡＡＶ９及びＡＡＶ．ｒｈ１０を含むｒＡＡＶ粒子と比較してより低い用量で、高レベルの発現を達成することができる。したがって、配列番号１０のターゲティングペプチドを含む改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質を含むｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ９カプシド又はＡＡＶ．ｒｈ１０カプシドを含むｒＡＡＶ粒子と比較して、治療指数が改善されている。

【００１２】

したがって、一態様では、本発明は、ＭＬＤの治療を必要とする患者のＭＬＤを治療する方法であって、（１）ＡＲＳＡポリペプチドをコードするベクター及び（２）改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）のウイルス粒子を患者の脳脊髄液（ＣＳＦ）に投与することを含み、前記改変ｒＡＡＶカプシドタンパク質は、配列番号１０のターゲティングペプチドを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号１０を含む改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質は、配列番号１２を有するカプシドタンパク質と少なくとも９０％（例えば、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９８．５％、少なくとも９９％、少なくとも９９．２％、少なくとも９９．５％、又は少なくとも９９．８％）同一である。いくつかの実施形態では、カプシドタンパク質は、配列番号１２を有する。

【００１３】

上記態様のいくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、１つ以上のＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列が隣接している発現カセットを含むベクターを含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、２つのＡＡＶ　ＩＴＲが隣接している。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ＩＴＲは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５であり、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ８Ｒ、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ．ｒｈ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ２Ｒ４７１Ａ、ＡＡＶ　ＤＪ、ヤギＡＡＶ、ウシＡＡＶ、又はマウスＡＡＶのセロタイプのＩＴＲである。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ＩＴＲは、ＡＡＶ２　ＩＴＲである。いくつかの実施形態では、ベクターは、自己相補性ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする第１の核酸配列と、ＡＲＳＡポリペプチドの補体をコードする第２の核酸配列を含み、第１の核酸配列は、その長さのほとんど又は全体にわたって第２の核酸配列と鎖内塩基対を形成し得る。いくつかの実施形態では、第１の核酸配列と第２の核酸配列とは、変異ＡＡＶ　ＩＴＲによって連結され、変異ＡＡＶ　ＩＴＲは、Ｄ領域の欠失を含み、末端分解配列の変異を含む。

【００１４】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子のいずれかを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【００１５】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子のいずれかを含む細胞を提供する。いくつかの態様では、本発明は、ＡＲＳＡポリペプチドを生成する方法であって、ＡＲＳＡポリペプチドを産生する条件下で本明細書に記載の細胞を培養することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、ＡＲＳＡポリペプチドを精製する工程をさらに含む。

【００１６】
いくつかの態様では、本発明は、ＭＬＤの治療を必要とする個体のＭＬＤを治療する方法であって、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、ＭＬＤの治療を必要とする個体のＭＬＤを治療する方法であって、本明細書に記載の組成物を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ＭＬＤの治療を必要とする個体のＭＬＤを治療する方法であって、本明細書に記載の細胞を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、個体は、ＡＲＳＡ活性を欠いている。
【００１７】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＡＲＳＡ活性の増加を必要とする個体のＡＲＳＡ活性を少なくとも約５％増加させる方法であって、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子を個体に投与することを含む方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、ＡＲＳＡ活性の増加を必要とする個体のＡＲＳＡ活性を少なくとも約１０％増加させる方法であって、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子を個体に投与することを含む方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、ＡＲＳＡ活性の増加を必要とする個体のＡＲＳＡ活性を少なくとも約２０％増加させる方法であって、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子を個体に投与することを含む方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、ＡＲＳＡ活性の増加を必要とする個体のＡＲＳＡ活性を少なくとも約３０％増加させる方法であって、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子を個体に投与することを含む方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、ＡＲＳＡ活性の増加を必要とする個体のＡＲＳＡ活性を少なくとも約５０％増加させる方法であって、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子を個体に投与することを含む方法を提供する。
【００１８】
ｒＡＡＶ粒子の投与は、様々な経路を介して行われ得る。いくつかの実施形態では、投与は、直接脊髄注入及び／又は脳内投与を含む。いくつかの実施形態では、投与は、大脳、髄質、橋、小脳、頭蓋内腔、脳を囲む髄膜、硬膜、くも膜、軟膜、脳を囲むくも膜下腔の脳脊髄液（ＣＳＦ）、小脳の深部小脳核、大脳の脳室系、くも膜下腔、線条体、皮質、隔膜、視床、視床下部、及び脳の実質から選択される部位になされる。いくつかの実施形態では、投与は、少なくとも１つの側脳室への脳室内注入を含む。いくつかの実施形態では、投与は、頸部、胸部及び／又は腰部における髄腔内注入を含む。いくつかの実施形態では、投与は、線条体内注入を含む。いくつかの実施形態では、投与は、視床内注入を含む。
【００１９】
上記態様のいくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、脊髄への直接注入によって、髄腔内注入によって、及び／又は大槽内注入によって投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、脊髄又はシステルナマグナの複数の位置に投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、脊髄の複数の位置に投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、脊髄の腰部くも膜下腔、胸部くも膜下腔及び頸部くも膜下腔の１つ以上に投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、システルナマグナに投与される。
【００２０】
上記態様のいくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、それを必要とする患者に１回のみ投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、それを必要とする患者に複数回投与される（例えば、１か月以上又は１年以上にわたって）。他の実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、それを必要とする患者に毎年１回投与される。他の実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、それを必要とする患者に年２回投与される。
【００２１】
いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載のｒＡＡＶ粒子、組成物、又は細胞のいずれかを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、使用説明書；緩衝液及び／若しくは薬学的に許容される賦形剤；並びに／又はボトル、バイアル及び／若しくはシリンジをさらに含む。

【図面の簡単な説明】
【００２２】
【図１Ａ－１Ｃ】図１Ａ～Ｃは、２つの異なる発現カセットを含むウイルス粒子によりインビボでＡＲＳＡの発現が増加し、ＭＬＤマウスモデル（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）における毒性スルファチド沈着物（Ｃ２４－ＳＴ）のクリアランスをより促進することを示す。図１Ａは、ウイルス粒子に使用される発現カセット、１つはＷＰＲＥ要素を有するもの、１つはＷＰＲＥ要素を含まないものを示す。図１Ｂは、マウスへのウイルス粒子の両側眼窩後静脈注射後のＡＲＳＡの発現レベルを示す。図１Ｃは、マウスへのウイルス粒子の両側眼窩後静脈注射後のＣ２４－ＳＴレベルを示す。
【図２】図２は、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置した後期ＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスで、脳、脊髄及び肝臓のＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性が増加したことを示す。
【図３】図３は、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置した後期ＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスで、投与の３か月後に脳及び脊髄のスルファチドレベルが有意に低下したことを示す。
【図４】図４は、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置した後期ＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスの脳における測定で、脳梁におけるミエリン形成が改善されたことを示す。
【図５】図５は、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置した後期ＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスの脳で、ミエリン形成及び成熟オリゴデンドロサイト細胞数の増加が観察されたことを示す。
【図６Ａ－６Ｂ】図６Ａ～Ｂは、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処理された後期ＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスの脳におけるＡＲＳＡタンパク質交差補正の程度を示す。図６Ａは、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥ投与から３か月後の対応するサジタル脳半切片のシグナルオーバーレイを示す。図６Ｂは、交差補正係数のヒートマップを示す。
【図７Ａ－７Ｂ】図７Ａ～Ｂは、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置された早期のＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスが、脳、脊髄、後根神経節（ＤＲＧ）及び肝臓において、広範なＣＮＳヒトＡＲＳＡ（ｈＡＲＳＡ）発現、及びＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性の増加を示すことを示す。図７Ａは、投与の４か月後に、ヒトＡＲＳＡに対するＩＨＣによって、サジタル脳切片において広範なＡＲＳＡ発現が観察されたことを示す。図７Ｂは、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置された動物では、脳、脊髄、ＤＲＧ及び肝臓において、ＡＲＳＡ活性が有意に増加することを示す。
【図８Ａ－８Ｄ】図８Ａ～Ｄは、早期（６か月）ＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにＡＡＶ．ＲＨ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与した後の、脳（図８Ａ）、肝臓（図８Ｂ）、血漿（図８Ｃ）及びＣＳＦ（図８Ｄ）におけるスルファチドレベルを示す。スルファチドレベルは、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥの投与後、脳、脊髄、肝臓、血漿及びＣＳＦにおいて有意に増加した。
【図９Ａ－９Ｃ】図９Ａ～Ｃは、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＡＲＳＡ－ＦＬＡＧ－ＷＰＲＥ投与による処置が、低用量及び高用量のウイルス粒子で、非ヒト霊長類（ＮＨＰ）の脳及び脊髄におけるスルファターゼ活性を有意に増加させることを示す。図９Ａは、脳におけるスルファターゼ活性を示す。図９Ｂは、脊髄におけるスルファターゼ活性を示す。図９Ｃは、ウイルス粒子の投与後の代表的な脳切片を示す。
【図１０Ａ－１０Ｂ】図１０Ａ及び１０Ｂは、カプシドＡＡＶ１９９９がＡＡＶｒｈ．１０と比較して、ＮＨＰの脳及び脊髄においてより高い導入遺伝子発現を示すことを示している。図１０Ａは、ｒＡＡＶ粒子の投与後の緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の発現レベルを示す。図１０Ｂは、全ての試料で、ＡＡＶ１９９９処置ＮＨＰの脳におけるＧＦＰ発現が、ＡＡＶｒｈ．１０処置ＮＨＰと比較して９３％～１２３％高かったことを示す。
【図１１】図１１は、ＮＨＰへのＡＡＶ１９９９又はＡＡＶｒｈ．１０の投与後の脳におけるＧＦＰ発現のヒートマップを示す。

【図１２】図１２は、ｅＧＦＰの抗体で染色された代表的な一致した脳切片が、ＡＡＶ１９９９処置ＮＨＰにおいて強力な発現を示し、ＡＡＶｒｈ１０と比較して優れた生体分布を示すことを示す（図１２）。
【図１３】図１３は、ＡＡＶ１９９９－ＧＦＰを含む粒子の投与後のＮＨＰの脊髄及びＤＲＧにおけるＧＦＰ発現を示す。
【図１４】図１４は、心臓及び肝臓におけるＡＡＶ１９９９－ＧＦＰ発現が、処置されたＮＨＰにおけるＡＡＶｒｈ１０－ＧＦＰと比較して低かったことを示す。
【図１５Ａ－１５Ｂ】図１５Ａ～Ｂは、ＡＡＶｒｈ１０－ＧＦＰ粒子又はＡＡＶ１９９９－ＧＦＰ粒子を投与後の様々な組織におけるＡＡＶｒｈ１０及びＡＡＶ１９９９ベクターゲノムロードを示す。図１５Ａは、脳、脊髄及びＤＲＧにおけるベクターゲノムロードを示す。脳、脊髄及びＤＲＧにおけるベクターゲノムロードは、ＡＡＶ１９９９でＡＡＶｒｈ１０より低い。図１５Ｂは、ＡＡＶｒｈ１０－ＧＦＰ又はＡＡＶ１９９９－ＧＦＰを投与後の肝臓、心臓、肺、腎臓及び脾臓におけるベクターゲノムロードを示す。
【図１６】図１６は、ＧＦＰ発現（ｙ軸）と組織ベクターゲノム（ｘ軸）の相関関係が左にシフトしていることを示し、ＡＡＶ１９９９（赤色）の相関関係は左にシフトしており、左シフトは、ＡＡＶｒｈ．１０と比較して、タンパク質発現がより高く、ベクター組織用量がより低い（約１０倍）ことを示している。
【図１７】図１７は、ｒＡＡＶ粒子を産生するための特定のプラスミドのベクターマップを示す。
【図１８】図１８は、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡｒｓａ　ＫＯマウスがｈＡＲＳＡ　ｍＲＮＡを持続的に発現することを示す。投与の１３か月後、Ａｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、脳及び脊髄の試料を収集した。ＲＴｄＰＣＲを実施して、ｈＡＲＳＡｍＲＮＡ発現を定量し、マウスＨｐｒｔ遺伝子に対して正規化した。各データポイントは、１匹の動物を表す。ＦＢ＝製剤緩衝液。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。ＷＴ＋ＦＢ：製剤緩衝液を投与した野生型マウス；ＫＯ＋ＦＢ：製剤緩衝液を投与したＡｒｓａ　ＫＯマウス；ＫＯ＋ＡＡＶ：ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡを投与したＡｒｓａ　ＫＯマウス。
【図１９】図１９は、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡｒｓａ　ＫＯマウスが、ＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性を持続的に示すことを示している。投与の１３か月後、Ａｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、脳、脊髄、ＤＲＧ、坐骨神経、肝臓及び血漿試料を収集した。ＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性を、スルファターゼ活性アッセイを使用して測定し、データを、ＢＣＡアッセイによって測定した総タンパク質に対して正規化した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。
【図２０】図２０は、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡｒｓａ　ＫＯマウスにおいて、脳及び脊髄におけるリソスルファチドレベルが有意に改善されることを示している。投与の１３か月後、Ａｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、脳、脊髄、ＤＲＧ、坐骨神経、肝臓、血漿及びＣＳＦ試料を収集した。スルファチドレベルを、ＬＣ－ＭＳを使用して測定した。データを組織重量に対して正規化し、ｎｇ／ｍＬ（５０μＬ）からμｇ／ｇに変換した。データを（３０μｌ）ｎｇ／ｍｌからｎｇ／ｍｌ（血漿）に、またｎｇ／ｍｌ（５μＬ）からｎｇ／μｌ（ＣＳＦ）に変換した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。
【図２１】図２１は、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡｒｓａ　ＫＯマウスにおいて、主要な炎症マーカーの発現が有意に改善されることを示している。投与の１３か月後、Ａｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、脳及び脊髄の試料を収集した。ＲＴｄＰＣＲを実施して、ＧＦＡＰ、Ａｉｆ１（Ｉｂａ１の遺伝子）及びＬａｍｐ１レベルを定量し、マウ

スＨｐｒｔ遺伝子に対して正規化した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。

【図２２】図２２は、ＡＡＶ１９９９－ｈＡＲＳＡによるＡｒｓａ　ＫＯマウスの処置によって、長期間（投与後１３か月）、血漿Ｎｆ－Ｌレベルが有意に低下することを示している。投与の１３か月後、Ａｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、血漿試料を採取した。Ｎｆ－ＬレベルをＱｕａｎｔｅｒｉｘプラットフォームによって測定した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。

【図２３】図２３は、ＡＲＳＡ　ＫＯマウスが時間と共に聴力低下が進行し、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡによる処置により、聴覚表現型の進行が防止されることを示している：投与の４、７、１０及び１３か月後、麻酔した動物の頭皮に配置した電極によって、ＡＢＲを測定し記録した。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。アスタリスクは、ＫＯ＋ＦＢ対ＫＯ＋ＡＡＶ群を表す。＊＝ＫＯ＋ＦＢ対ＫＯ＋ＡＡＶ；＊＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。

【図２４Ａ－２４Ｃ】図２４Ａ～Ｃは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置Ａｒｓａ　ＫＯマウスが、脳及び脊髄におけるＭＬＤ関連病理の有意な逆転を示すことを示している：投与の１３か月後に、Ａｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、脳（図２４Ａ）、脊髄（図２４Ｂ）及びＤＲＧ（図２４Ｃ）試料を、組織病理学的評価のために収集した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。

【図２５Ａ－２５Ｃ】図２５Ａ～Ｃは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置Ａｒｓａ　ＫＯマウスが、ＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性を持続的に示すことを示している。投与の１、２、３及び６か月後にＡｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、脳試料を収集した（図２５Ａ）。デジタルＰＣＲ（ｄＰＣＲ）を実施して、各組織におけるＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡベクターレベルを定量し、Ｒａｂ１ａ遺伝子に対して正規化した。（図２５Ｂ及び図２５Ｃ）ＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性を、スルファターゼ活性アッセイキット（ａｂ２０４７３１）を使用して測定した；データをＢＣＡアッセイによって測定した総タンパク質に対して正規化した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。

【図２６Ａ－２６Ｆ】図２６Ａ～Ｆは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置Ａｒｓａ　ＫＯマウスでは、時間の経過とともにスルファチドアイソフォームのクリアランスが徐々に進行することを示す。投与の１、２、３及び６か月後にＡｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、脳試料を収集した。（図２６Ａ）リソスルファチド、（図２６Ｂ）Ｃ１６スルファチドアイソフォーム及び（図２６Ｃ）Ｃ１８－スルファチドアイソフォームを、ＬＣ－ＭＳを使用して測定した。データを組織重量に対して正規化し、ｎｇ／ｍＬ（５０μＬ）からμｇ／ｇに変換した。（図２６Ｄ～Ｆ）スルファチドクリアランスの進行を明らかにするために、（図２６Ｄ）リソスルファチド、（図２６Ｅ）Ｃ１６スルファチドアイソフォーム及び（図２６Ｆ）Ｃ１８スルファチドアイソフォームについて、ＫＯ＋ＦＢ動物における平均ＳＴ残留率と比較した、ＫＯ＋ＡＡＶ動物におけるＳＴ残留率のデータを提示する。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。

【図２７】図２７は、Ａｒｓａ　ＫＯマウスのＣＳＦ及び血漿中の総スルファチドレベルが、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡによる処置で有意な低下を示すことを示す。投与の１、２、３及び６か月後、Ａｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、ＣＳＦ及び血漿試料を採取した

。スルファチドレベルを、ＬＣ－ＭＳを使用して測定した。データを（３０μｌ）ｎｇ／ｍｌからｎｇ／ｍｌ（血漿）に、またｎｇ／ｍｌ（５μＬ）からｎｇ／μｌ（ＣＳＦ）に変換した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。

【図２８】図２８は、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡを投与後６か月で、血漿Ｎｆ－Ｌレベルの初期増加が、ＫＯ＋ＦＢ群と比較して減少したことを示す。投与の１、２、３及び６か月後、Ａｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、血漿試料を採取した。Ｎｆ－ＬレベルをＱｕａｎｔｅｒｉｘプラットフォームによって測定した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。＜０．０５；＊＊＜０．０１；＊＊＊＜０．００１；＊＊＊＊＜０．０００１。

【図２９Ａ－２９Ｄ】図２９Ａ～Ｄは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置Ａｒｓａ　ＫＯマウスの脳で、軽微な重症度の顕微鏡所見が見られたことを示している。投与の１、２、３及び６か月後にＡｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、組織病理学的分析のために脳試料を収集した。各データポイントは、１匹の動物を表し；所見は、（図２９Ａ）脳幹及び小脳の変性、（図２９Ｂ）空胞形成、（図２９Ｃ）浸潤、及び（図２９Ｄ）海馬の変性の、発生率及び重症度で分類する。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。

【図３０Ａ－３０Ｅ】図３０Ａ～Ｅは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置ＡＲＳＡ　ＫＯマウスが、ＤＲＧ及び末梢神経において軽微～軽度の所見を示すことを示している。投与の１、２、３及び６か月後にＡｒｓａ　ＫＯマウスを安楽死させ、ＤＲＧ（図３０Ａ～Ｃ）、脊髄（図３０Ｄ）及び坐骨神経（図３０Ｅ）を組織病理学的分析のために収集した。各データポイントは、１匹の動物を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。

【図３１】図３１は、ＮＨＰ脳におけるＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡベクターの広範な用量依存性生体分布を示す。ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡの投与から５週間後にＮＨＰを安楽死させ、試料を収集した。脳半球を急速凍結させて半切断し、各半球から灰白質（４７パンチ）及び白質（１７パンチ）を表す６４の組織パンチを収集した。デジタルＰＣＲ（ｄＰＣＲ）を実施して、各組織パンチにおけるＡＡＶ１９９９ベクター濃度を定量し、ＴＵＢＢ１遺伝子イントロンに対して正規化した。各データポイントは、その組織パンチのＶＧ／細胞露出を表し、（左）その群内の全ＮＨＰを平均するか、又は（右）個々の脳領域別に示す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。ＮＨＰ１匹当たりの用量。

【図３２】図３２は、ＮＨＰ中の１９の灰白質脳領域にわたる広範な用量依存性ｈＡＲＳＡ　ｍＲＮＡ発現を示す。投与の５週間後のＮＨＰを安楽死させ、試料を収集した。脳半球を急速凍結させて半切断し、各半球から１９の灰白質領域を表す４７の組織パンチを収集した。逆転写デジタルＰＣＲ（ＲＴｄＰＣＲ）を実施して、ｈＡＲＳＡ　ｍＲＮＡ発現を定量し、カニクイザル（Ｍａｃａｃａ　ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ１（ＨＰＲＴ）遺伝子に対して正規化した。　各データポイントは、その組織パンチの正規化されたｈＡＲＳＡ発現を表し、（左）その群内の全ＮＨＰを平均するか、又は（右）個々の脳領域別に示す。左：中央値を表す散布図；右：エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。

【図３３Ａ－３３Ｃ】図３３Ａ～Ｃは、ＮＨＰ中の１９の灰白質脳領域にわたる広範な用量依存性ｈＡＲＳＡタンパク質発現を示す。ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡの投与から５週間後にＮＨＰを安楽死させ、試料を収集した。脳半球を急速凍結させて半切断し、各半球から灰白質領域を表す３０の組織パンチを収集した。ＬＣ－ＭＳを実施して、ヒトＡＲＳＡタンパク質レベルを定量した。各データポイントは、その組織パンチにおけるヒトＡＲＳＡの量（その群の３匹の動物の平均）を表し、その群の全ＮＨＰの平均（図３３Ａ）として示すか、（図３３Ｂ）個々の脳領域別に示すか、又は（図３３Ｃ）それらのパンチにお

けるベクターゲノムとの相関関係として示す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す。１ｅ１０ＶＧ／ｇｍ（７．５ｅ１１ＶＧ）及び３．３ｅ１０ＶＧ／ｇｍ（２．５ｅ１２ＶＧ）からのデータは、検出限界を下回っており、除外されている。左：中央値を表す散布図；右：エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。

【図３４Ａ－３４Ｂ】図３４Ａ～Ｂは、脊髄前後軸に沿った、均一で用量依存的なＡＡＶ１９９９ベクター生体分布及びｈＡＲＳＡ　ｍＲＮＡ発現を示す。ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡの投与から５週間後にＮＨＰを安楽死させ、試料を収集した。隣接するＤＲＧを有する８つの脊髄切片（頸部、胸部上部、胸部下部及び腰部からそれぞれ２つ）を急速凍結し、ＤＮＡ／ＲＮＡを単離した。（図３４Ａ）デジタルＰＣＲ（ｄＰＣＲ）を実施して、ＡＡＶ１９９９ベクター濃度を定量し、ＴＵＢＢ１遺伝子イントロンに対して正規化した。（図３４Ｂ）ＲＴｄＰＣＲを実施して、ｈＡＲＳＡ　ｍＲＮＡ発現を定量し、内因性のＨＰＲＴ遺伝子に対して正規化した各データポイントは、その群の全ＮＨＰを平均した、その試料のバックグラウンドを差し引いたＶＧ／細胞露出又は正規化したｈＡＲＳＡ発現を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す。

【図３５】図３５は、内臓及び末梢神経へのＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡベクターの生体分布を示す。投与の５週間後、ＮＨＰを安楽死させ、内臓から試料を収集した。デジタルＰＣＲ（ｄＰＣＲ）を実施して、各組織パンチにおけるＡＡＶ１９９９ベクター濃度を定量し、ＴＵＢＢ１遺伝子イントロンに対して正規化した。各データポイントは、その組織パンチのＶＧ／細胞露出を表し、その群の全ＮＨＰを平均する。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す。

【図３６】図３６は、１ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量及び３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量の用量で治療閾値を満たす可能性が高いＮＨＰ脳におけるヒトＡＲＳＡタンパク質発現を示す。ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡの投与から５週間後にＮＨＰを安楽死させ、試料を収集した。脳半球を急速凍結させて半切断し、各半球から灰白質領域を表す３０の組織パンチを収集した。ＬＣ－ＭＳを実施して、ヒト及び内因性カニクイザル（Ｍａｃａｃａ　ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）ｃｙＡＲＳＡタンパク質レベルを定量し、パーセンテージ（ｈｕＡＲＳＡ／ｃｙＡＲＳＡ）として示した。各データポイントは、その組織パンチにおけるｈＡＲＳＡ対カニクイザルｃｙＡＲＳＡタンパク質の比（その群の３匹の動物の平均）として表し、（左）その群の全ＮＨＰの平均として示すか、（右）個々の脳領域別に示す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す。

【図３７Ａ－３７Ｂ】図３７Ａ～Ｂは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ有効用量が治療的に意味があることを示す。図３７Ａは、ＬＣ－ＭＳを実施して、７人の健康３～８歳の臓器ドナーからの１２の脳領域におけるヒトＡＲＳＡタンパク質レベルを定量したことを示す。組織は、ＮＩＨ脳バンクから調達した。図３７Ｂは、投与から５週間後にＮＨＰを安楽死させ、試料を採取したことを示す。脳半球を急速凍結させて半切断し、各半球から灰白質領域を表す３０の組織パンチを収集した。ＬＣ－ＭＳを実施して、ヒトＡＲＳＡタンパク質レベルを定量した。各群における平均ＡＲＳＡタンパク質を示す。試験依頼者は、健康な臓器ドナーの脳のヒトＡＲＳＡに関連する、ＮＨＰ中のヒトＡＲＳＡの割合を提示する。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す。

【図３８】図３８は、いずれの投与群においても、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡの投与後１週目又は５週目（剖検）にＮＨＰにおいて臨床的徴候（機能的又は行動的欠陥）が観察されなかったことを示す。投与前、投与後７日目及び剖検前（投与後５週目）に３５の機能及び行動パラメータについてＮＨＰを試験した。所見を、「正常範囲内」又は「異常な臨床所見」として採点した。以下のグラフは、剖検時の所見である。機能及び行動評価はＣＲＬ獣医によって実施された。

【図３９Ａ－３９Ｃ】図３９Ａ～Ｃは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡのＣＭ内注入が忍容性が高く、予想されるＮｆ－Ｌ上昇をもたらし、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡは、自然免疫反応も細胞性免疫反応も誘発しなかったことを示す。図３９Ａに示すように、投与前及び剖検時に、ＣＳＦを収集し、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘプラットフォームによって Ｎｆ－Ｌレベル

を分析した。各データポイントは、その試料中のＮｆ－Ｌレベルを表し、その群の全てのＮＨＰを平均した。図３９Ｂに示すように、血漿を、投与前及び投与後２、－４、７、１４日目及び剖検時に単離した。Ｌｕｍｉｎｅｘアッセイを使用して、ＩＬ－１ｂ、ＩＬ－１ＲＡ、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２／２３（ｐ４０）、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＦＮ－ｇ、ＴＮＦ－ａ、Ｇ－ＣＳＦ、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１ｂ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－８、ＩＬ－１３及びＩＬ－１７Ａの濃度を決定した。各データポイントは、その試料中のサイトカイン濃度を表し、その群の全てのＮＨＰを平均した。図３９Ｃに示すように、１ｅ１１及び３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量投与群の動物から単離したＰＢＭＣを、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔに供した。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す；統計：＊テューキー及び#ダネットの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。

【図４０】図４０は、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置ＮＨＰが、４回の投与で脳に軽度の顕微鏡所見認められたことを示す。投与の５週間後、ＮＨＰを安楽死させ、試料を収集した。組織病理学的評価のために脳半球を固定し半切断した。各データポイントは、単核浸潤、神経又は神経線維変性、及び神経膠症のカテゴリーで測定された、その投与群の全ての動物にわたって平均した顕微鏡所見の発生率及び重症度を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す。

【図４１Ａ－４１Ｂ】図４１Ａ～Ｂは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置ＮＨＰが、ＮＨＰの脊髄、橈骨神経及び大腿神経において中等度の顕微鏡所見を示し、坐骨神経において顕著な所見を示すことを示している。投与の５週間後、ＮＨＰを安楽死させ、組織病理学的評価のために試料を収集した。各データポイントは、単核浸潤、神経又は神経線維変性、及び神経膠症のカテゴリーで測定された、その投与群の全ての動物にわたって平均した顕微鏡所見の発生率及び重症度を表す。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す。

【図４２Ａ－４２Ｂ】図４２Ａ～Ｂは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置ＮＨＰが、脊髄前後軸に沿う８切片を平均した場合、ＤＲＧにおいて軽度の所見を示すことを示す。投与の５週間後、ＮＨＰを安楽死させ、組織病理学的評価のために試料を収集した。左のパネルでは、各データポイントは、その投与群の全ての動物にわたる８つの脊髄切片からのＤＲＧ全体にわたる平均された顕微鏡所見の平均発生率及び重症度を表す。右のパネルでは、各データポイントは、１ＤＲＧ当たりの顕微鏡所見の発生率及び重症度を表し、その投与群の全ての動物を平均したものである。測定されるカテゴリーは、（図４２Ａ）変性及び壊死と（図４２Ｂ）単核浸潤である。エラーバーは、標準誤差を含む平均を表す。

【発明を実施するための形態】

【００２３】

いくつかの態様では、本発明は、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする導入遺伝子を含む発現カセット、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクター、並びにウイルス粒子及び医薬組成物を提供する。さらなる態様では、本発明は、例えば、ＡＲＳＡ活性を増加させ、脳、脊髄、肝臓、血漿及びＣＳＦにおけるスルファチド蓄積を減少させ、脳梁における髄鞘形成を増加及び正常化させ、脳内のオリゴデンドロサイト集団を増加させ、脳領域におけるスルファチドクリアランスに起因するＣＮＳ病理を改善することによって、異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）を治療する方法を提供する。さらに別の態様では、本発明は、本開示の発現カセットで個体のＭＬＤを治療するためのキットを提供する。

【００２４】

定義

「ベクター」は、本明細書で使用される場合、インビトロ又はインビボで宿主細胞に送達される核酸を含む組換えプラスミド又はウイルスを指す。

【００２５】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用され、最小の長さに制限はない。このようなアミノ酸残基のポリマーは、天然又は非天然のアミノ酸残基を含有し得、アミノ酸残基のペプチド、オリゴペプチド、二量体、三量体及び多量体が挙げられるがこれらに限定されない。この定義には、全長

タンパク質及びその断片の両方が包含される。この用語にはまた、ポリペプチドの発現後の修飾、例えばグリコシル化、シアル化、アセチル化、リン酸化などが含まれる。さらに、本開示の目的において、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列に対する、欠失、付加及び置換（一般に保存的）などの改変を含むタンパク質を指す。これらの改変は、部位特異的変異誘発によるように意図的でありか、又はタンパク質を産生する宿主の変異、若しくはＰＣＲ増幅に起因するエラーによるなどの偶発的であり得る。

【００２６】

「組換えウイルスベクター」は、１つ以上の異種配列（すなわち、ウイルス起源ではない核酸配列）を含む組換えポリヌクレオチドベクターを指す。組換えＡＡＶベクターの場合、組換え核酸には、少なくとも１つの、実施形態では、２つの、逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）が隣接している。

【００２７】

「組換えＡＡＶベクター（ｒＡＡＶベクター）」は、少なくとも１つの、実施形態では、２つの、逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）が隣接している１つ以上の異種配列（すなわち、ＡＡＶ起源ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。このようなｒＡＡＶベクターは、好適なヘルパーウイルスに感染した（又は好適なヘルパー機能を発現している）宿主細胞に存在し、且つＡＡＶ　Ｒｅｐ及びＣａｐ遺伝子産物（すなわち、ＡＡＶ　Ｒｅｐ及びＣａｐタンパク質を発現している場合に、複製して、感染性ウイルス粒子にパッケージ化することができる。ｒＡＡＶベクターが、より大きなポリヌクレオチド（例えば、染色体中、又はクローニング若しくはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター中）に組み込まれる場合、ｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶパッケージング機能及び好適なヘルパー機能の存在下で複製及びカプシド形成によって「救出」され得る「プロベクター」と称され得る。ｒＡＡＶベクターは、さまざまな形態、例えば、以下に限定されないが、プラスミド、線状人工染色体、脂質と複合化したもの、リポソーム内に封入されたもの、及びウイルス粒子、特にＡＡＶ粒子内に封入されたものなどのいずれかの形態をとることができる。ｒＡＡＶベクターをＡＡＶウイルスカプシドにパッケージングして、「組換えアデノ随伴ウイルス粒子（ｒＡＡＶ粒子）」を生成することができる。

【００２８】

「異種」とは、それが比較されるか、又はそれが導入されるか若しくは組み込まれるその実体の残りの部分とは遺伝子型が異なる実体から派生したものであることを意味する。例えば、遺伝子工学技術によって異なる細胞型に導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（発現すると、異種ポリペプチドをコードすることができる）。同様に、ウイルスベクターに組み込まれる細胞配列（例えば、遺伝子又はその一部）は、ベクターに対する異種ヌクレオチド配列である。

【００２９】

「導入遺伝子」という用語は、細胞に導入され、ＲＮＡに転写され、任意選択的に、適切な条件下で翻訳及び／又は発現することができるポリヌクレオチドを指す。態様では、それは、それが導入された細胞に所望の特性を付与するか、さもなければ所望の治療的又は診断的結果をもたらす。

【００３０】

「ニワトリβアクチン（ＣＢＡ）プロモーター」は、ニワトリβアクチン遺伝子（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ３９６５２６によって表されるＧａｌｌｕｓベータアクチン）に由来するポリヌクレオチド配列を指す。本明細書で使用される場合、「ニワトリβアクチンプロモーター」は、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）初期エンハンサーエレメント、ニワトリβアクチン遺伝子のプロモーターと第１のエクソン及びイントロン、並びにウサギベーターグロビン遺伝子のスプライスアクセプター、例えば、Ｍｉｙａｚａｋｉ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅ７９（２）：２６９－７７に記載されている配列を指し得る。本明細書で使用される場合、「ＣＡＧプロモーター」という

用語は、互換的に使用され得る。本明細書で使用される場合、「ＣＭＶ初期エンハンサー／ニワトリベータアクチン（ＣＡＧ）プロモーター」という用語は、互換的に使用され得る。

【００３１】

ウイルス力価に関して使用される「ゲノム粒子（ｇｐ）」、「ゲノム等価物」又は「ゲノムコピー」という用語は、感染性又は機能性にかかわらず、組換えＡＡＶ　ＤＮＡゲノムを含有するビリオンの数を指す。特定のベクター調製におけるゲノム粒子の数は、本明細書の実施例に記載されるような手順、又は例えばＣｌａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，１０：１０３１－１０３９；Ｖｅｌｄｗｉｊｋ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，６：２７２－２７８に記載されるような手順によって測定することができる。

【００３２】

本明細書で使用される「ベクターゲノム（ｖｇ）」という用語は、ベクター、例えばウイルスベクターのポリヌクレオチド配列のセットを含む１つ以上のポリヌクレオチドを指し得る。ベクターゲノムは、ウイルス粒子に封入され得る。特定のウイルスベクターに応じて、ベクターゲノムは、一本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、又は一本鎖ＲＮＡ、又は二本鎖ＲＮＡを含み得る。ベクターゲノムには、特定のウイルスベクターに関連した内因性配列、及び／又は組換え技術によって特定のウイルスベクターに挿入された任意の異種配列を含み得る。例えば、組換えＡＡＶベクターゲノムは、プロモーター、スタッファー、目的の配列（例えば、ＲＮＡｉ）及びポリアデニル化配列に隣接する少なくとも１つのＩＴＲ配列を含み得る。完全なベクターゲノムは、ベクターのポリヌクレオチド配列の完全なセットを含み得る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの核酸力価は、ｖｇ／ｍＬで測定され得る。この力価の測定に好適な方法は、当該技術分野で知られている（例えば、定量ＰＣＲ）。

【００３３】

「感染単位（ｉｕ）」、「感染性粒子」又は「複製単位」という用語は、ウイルス力価に関して使用される場合、例えばＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６２：１９６３－１９７３に記載されているように、複製中心アッセイとしても知られる感染中心アッセイ測定される感染性及び複製能力のある組換えＡＡＶベクター粒子の数を指す。

【００３４】

ウイルス力価に関して使用される「形質導入単位（ｔｕ）」という用語は、本明細書の実施例に、又は、例えばＸｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．，１４４：１１３－１２４；若しくはＦｉｓｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７０：５２０－５３２（ＬＦＵアッセイ）に記載されるような機能的アッセイで測定される機能的導入遺伝子産物の生成をもたらす感染性組換えＡＡＶベクター粒子の数を指す。

【００３５】

「逆末端反復」又は「ＩＴＲ」配列は、当技術分野で十分に理解されている用語であり、反対の向きにあるウイルスゲノムの末端で見出される比較的短い配列を指す。

【００３６】

当該技術分野でよく理解されている用語である「ＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）」配列は、天然の一本鎖ＡＡＶゲノムの両末端に存在する約１４５個のヌクレオチドの配列である。ＩＴＲの最も外側の１２５個のヌクレオチドは、２つの代替的な配向のいずれかで存在することができ、異なるＡＡＶゲノム間及び単一のＡＡＶゲノムの両末端間に異質性をもたらす。最も外側の１２５個のヌクレオチドにはまた、自己相補性のいくつかの短い領域（Ａ、Ａ’、Ｂ、Ｂ’、Ｃ、Ｃ’及びＤ領域と指定）が含まれており、これによりＩＴＲのこの部分内での鎖内塩基対形成が可能である。

【００３７】

「末端分解配列」又は「ｔｒｓ」は、ウイルスＤＮＡ複製中にＡＡＶ　ｒｅｐタンパク

質によって切断されるＡＡＶ　ＩＴＲのＤ領域にある配列である。変異末端分解配列は、ＡＡＶ　ｒｅｐタンパク質による切断に対して耐性がある。

【００３８】

「ＡＡＶヘルパー機能」は、ＡＡＶを宿主細胞によって複製されパッケージングされるのを可能にする機能を指す。ＡＡＶヘルパー機能は、ＡＡＶの複製及びパッケージングを助けるさまざまな形態、例えば、以下に限定されないが、ヘルパーウイルス又はヘルパーウイルス遺伝子のいずれかの形態で提供することができる。遺伝毒性物質などの他のＡＡＶヘルパー機能は、当該技術分野で知られている。

【００３９】

ＡＡＶの「ヘルパーウイルス」は、ＡＡＶ（これは、欠陥のあるパルボウイルスである）が宿主細胞によって複製されパッケージングされるのを可能にするウイルスを指す。ヘルパーウイルスは、ＡＡＶの複製を可能にする「ヘルパー機能」を提供する。アデノウイルス、ヘルペスウイルス、及びワクシニアウイルスやバキュロウイルスなどのポックスウイルスを含む、多くのそのようなヘルパーウイルスが特定されている。アデノウイルスには、いくつかの異なるサブグループが包含されるが、サブグループＣのアデノウイルス５型（Ａｄ５）が最も一般的に使用される。ヒト、非ヒト哺乳動物及び鳥類起源の多くのアデノウイルスが知られており、ＡＴＣＣなどの保管機関から入手可能である。ＡＴＣＣなどの保管機関からも入手可能であるヘルペスファミリーのウイルスとしては、例えば、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、エプスタイン－バールウイルス（ＥＢＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）及び仮性狂犬病ウイルス（ＰＲＶ）が挙げられる。ＡＡＶの複製のためのアデノウイルスヘルパー機能の例としては、Ｅ１Ａ機能、Ｅ１Ｂ機能、Ｅ２Ａ機能、ＶＡ機能及びＥ４ｏｒｆ６機能が挙げられる。保管機関から入手可能なバキュロウイルスとしては、オートグラファ・カルフォルニカ（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）核多角体病ウイルスが挙げられる。

【００４０】

ｒＡＡＶの調製物は、感染性ＡＡＶ粒子と感染性ヘルパーウイルス粒子との比が少なくとも約$10^{2}$：ｌ；少なくとも約$10^{4:l}$、少なくとも約$10^{6}$：ｌ；又は少なくとも約$10^{8:l}$以上である場合、ヘルパーウイルスを「実質的に含まない」と言われる。いくつかの実施形態では、調製物はまた、同等量のヘルパーウイルスタンパク質（すなわち、上記のヘルパーウイルス粒子不純物が破壊された形態で存在した場合、そのようなレベルのヘルパーウイルスの結果として存在するであろうタンパク質）を含まない。ウイルス及び／又は細胞タンパク質の汚染は、一般に、ＳＤＳゲル上のクーマシー染色バンドの存在（例えば、ＡＡＶカプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２及びＶＰ３に対応するもの以外のバンドの出現）として観察することができる。

【００４１】

「有効量」とは、臨床結果（例えば、症状の改善、臨床評価項目の達成など）を含む、有益な又は所望の結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、１回以上の投与で投与することができる。疾患状態に関して、有効量は、疾患の改善、安定化、又は疾患の進行を遅延させるのに十分な量である。

【００４２】

「個体」又は「対象」は哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施態様では、個体又は対象はヒトである。

【００４３】

本明細書で使用される場合、「治療」は、有益な又は所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本開示の目的において、有益な又は所望の臨床結果としては、検出可能であるか否かにかかわらず、症状の軽減、疾患の程度の軽減、疾患状態の安定化（例えば、悪化しない）、疾患の拡大（例えば、転移）の予防、疾患進行の遅延又は減速、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解（部分的か全体的かにかかわらない）が挙げられるが、これら

に限定されない。「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較して、生存期間が長くなることを意味し得る。

【００４４】

本明細書で使用される場合、「予防的治療」という用語は、個体が障害を有するか又はそのリスクがあることを知られているか又は疑われているが、障害の症状がないか又は軽微な症状しか示さない治療を指す。予防的治療を受けている個体は、症状が生ずる前に治療され得る。

【００４５】

本明細書での「約」値又はパラメータへの言及は、この値又はパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（及び説明する）。例えば、「約Ｘ」に言及する説明は、「Ｘ」の説明を含む。

【００４６】

本明細書で使用される場合、冠詞「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」及び「その（ｔｈｅ）」の単数形は、別段の指示がない限り複数の言及を含む。

【００４７】

)

本明細書に記載される本開示の態様及び実施形態には、「～を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」、「～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ）」及び／又は「～から実質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」態様及び実施形態が含まれることが理解される。

【００４８】

発現カセット

いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする導入遺伝子は、コドンが最適化されている。いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする導入遺伝子は、真核細胞などの特定の細胞での発現にコドンが最適化されている。真核細胞は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、又は非ヒト霊長類を含むがこれらに限定されない哺乳動物などの特定の生物の細胞又はそれに由来する細胞であり得る。一般に、コドンの最適化は、天然アミノ酸配列を維持しながら、その宿主細胞の遺伝子においてより頻繁に又は最も頻繁に使用されるコドンで天然配列の少なくとも１つのコドンを置換することによって、目的の宿主細胞における発現を増強するために核酸配列を改変するプロセスを指す。様々な種が、特定のアミノ酸の特定のコドンについて特定のバイアスを示す。コドン使用表は、例えば「コドン使用データベース」で容易に入手可能であり、これらの表は様々な方法で適合させることができる（例えば、Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８：２９２を参照されたい）。特定の宿主細胞における発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズム、例えば、Ｇｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ，Ｐａ．）、ＤＮＡ２．０、ＧｅｎｅＡｒｔ（ＧＡ）又はＧｅｎｓｃｒｉｐｔ（ＧＳ）及びＣｐＧ含有量の減少と組み合わせたＧＳアルゴリズムも利用可能である。いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする導入遺伝子は、ＧＡアルゴリズムを使用してコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする導入遺伝子は、配列番号１の配列を有する。

【００４９】

いくつかの実施形態では、発現カセットはイントロンをさらに含む。本発明で使用するための様々なイントロンは、当業者に知られており、ＭＶＭイントロン、Ｆ　ＩＸトランケートイントロン１、βグロビンＳＤ／免疫グロビン重鎖ＳＡ、アデノウイルスＳＤ／免疫グロビンＳＡ、ＳＶ４０後期ＳＤ／ＳＡ（１９Ｓ／１６Ｓ）、及びハイブリッドアデノウイルスＳＤ／ＩｇＧ　ＳＡが挙げられる。（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．２００８，Ｋｕｒａｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５，Ｃｈｏｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１４，Ｗｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９８５，Ｙｅｗ　ｅｔ　ａｌ．１９９７，Ｈｕａｎｇ　ａｎｄ　Ｇｏｒｍａｎ（１９９０）。いくつかの実施形態では、イントロンは、ニワトリβアクチン（ＣＢＡ）／

ウサギβグロビンハイブリッドイントロンである。いくつかの実施形態では、イントロンは、全てのＡＴＧ部位が除去されて、誤った翻訳開始部位が最小化されている、ニワトリβワクチン（ＣＢＡ）／ウサギβグロビンハイブリッドプロモーター及びイントロンである。いくつかの実施形態では、イントロンは、ＭＶＭイントロン、Ｆ　ＩＸトランケートイントロン１、βグロビンＳＤ／免疫グロビン重鎖ＳＡ、アデノウイルスＳＤ／免疫グロビンＳＡ、ＳＶ４０後期ＳＤ／ＳＡ（１９ｓ／１６Ｓ）、又はハイブリッドアデノウイルスＳＤ／ＩｇＧ　ＳＡである。いくつかの実施形態では、イントロンは、ニワトリβアクチン（ＣＢＡ）／ウサギβグロビンハイブリッドイントロンである。

【００５０】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、ポリアデニル化シグナルをさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル、又はＨＳＶ　ＴＫ　ｐＡである。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、Ｌｅｖｉｔｔ，Ｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９），Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖｅｌｏｐ．３：１０１９－１０２５に記載されているような合成ポリアデニル化シグナルである。

【００５１】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、スタッファー核酸を含む。いくつかの実施形態では、スタッファー核酸は、レポーターポリペプチドをコードする配列を含み得る。当業者に理解されるように、スタッファー核酸は、核酸内の様々な領域に配置され得、核酸内の、連続配列（例えば、単一の位置における単一のスタッファー核酸）又は複数の配列（例えば、複数の位置（例えば、２つの位置、３つの位置など）の位置における複数のスタッファー核酸）から構成され得る。いくつかの実施形態では、スタッファー核酸は、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする導入遺伝子の下流に位置し得る。実施形態では、スタッファー核酸は、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする導入遺伝子の上流（例えば、プロモーターと導入遺伝子の間）に位置し得る。また当業者に理解されるように、様々な核酸が、スタッファー核酸として使用され得る。いくつかの実施形態では、スタッファー核酸は、ヒトアルファ－１－アンチトリプシン（ＡＡＴ）スタッファー配列又はＣ１６　Ｐ１染色体１６　Ｐ１クローン（ヒトＣ１６）スタッファー配列の全部又は一部を含む。いくつかの実施形態では、スタッファー配列は、遺伝子の全部又は一部を含む。例えば、スタッファー配列は、ヒトＡＡＴ配列の一部を含む。当業者は、遺伝子の様々な部分（例えば、ヒトＡＡＴ配列）をスタッファー断片として使用することができることを認識するであろう。例えば、スタッファー断片は、遺伝子の５’末端、遺伝子の３’末端、遺伝子の中央、遺伝子の非コード部分（例えば、イントロン）、遺伝子のコード領域（例えば、エクソン）、又は遺伝子の非コード部分とコード部分の混合物由来であり得る。当業者はまた、スタッファー配列の全部又は一部がスタッファー配列として使用され得ることを認識するであろう。いくつかの実施形態では、スタッファー配列は、内部ＡＴＧコドンを除去するように改変される。

【００５２】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、ベクターに組み込まれる。いくつかの実施形態では、発現カセットは、ウイルスベクターに組み込まれる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、本明細書に記載のｒＡＡＶベクターである。

【００５３】

ベクター及びウイルス粒子

特定の態様では、ＡＲＳＡポリペプチド（例えば、野生型ヒトＡＲＳＡポリペプチド）を発現するための発現カセットは、ベクターに含まれる。いくつかの実施形態では、本発明は、ウイルス粒子、例えば以下に記載のウイルス粒子、例えばウイルス粒子にパッケージングするための、ＡＲＳＡポリペプチドをコードする核酸配列を導入するための組換えウイルスゲノムの使用を企図する。組換えウイルスゲノムは、ＡＲＳＡポリペプチドの発現を確立するための任意の要素、例えばプロモーター、ＩＴＲ、リボソーム結合エレメント、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、イントロン、ポリＡシグナル、及び

／又は複製起点を含み得る。例示的なウイルスゲノムエレメント、及びウイルス粒子の送達方法を以下でより詳細に説明する。

【００５４】

非ウイルス送達システム

従来の非ウイルス遺伝子導入方法もまた、細胞又は標的組織に核酸を導入するために使用され得る。非ウイルスベクター送達システムには、ＤＮＡプラスミド、ネイキッド核酸、及び送達システムに複合化された核酸が含まれる。例えば、ベクターは、脂質（例えば、カチオン性又は中性脂質）、リポソーム、ポリカチオン、ナノ粒子、又は核酸の細胞取り込みを増強する薬剤と複合化され得る。ベクターは、本明細書に記載の送達方法のいずれかに好適な薬剤と複合化され得る。いくつかの実施形態では、核酸は、１つ以上のウイルスＩＴＲ（例えば、ＡＡＶ　ＩＴＲ）を含む。

【００５５】

ウイルス粒子

いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡポリペプチド（例えば、野生型ヒトＡＲＳＡポリペプチド）を発現するための発現カセットを含むベクターは、組換えウイルスベクターである。組換えウイルスベクターのいくつかの例としては、ＡＡＶ、レンチウイルス及びアデノウイルスが挙げられる。一態様では、ウイルスベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターである。いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡポリペプチド（例えば、野生型ヒトＡＲＳＡポリペプチド）を発現するための発現カセットには、１つ以上のＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列が隣接している。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、１つ又は２つのＩＴＲが隣接するＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセットを含む組換えＡＡＶ粒子である。いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセットには、２つのＡＡＶ　ＩＴＲが隣接している。

【００５６】

いくつかの実施形態では、本開示のＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセットは、転写の方向に作動可能に連結された成分、転写開始配列及び転写終結配列を含み、それにより発現カセットを形成する制御配列を含む。発現カセットは、５’末端及び３’末端に、少なくとも１つの機能的ＡＡＶ　ＩＴＲ配列が隣接している。「機能的ＡＡＶ　ＩＴＲ配列」は、ＩＴＲ配列がＡＡＶビリオンの救出、複製及びパッケージングを目的として機能することを意味する。Ｄａｖｉｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，２０００，９７（７）３４２８－３２；Ｐａｓｓｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，２００３，７７（１２）：７０３４－４０；及びＰｅｃｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，２００９，１６：１０－１６を参照されたい（これらの文献は全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。本発明のいくつかの態様を実施するために、組換えベクターは、少なくとも、カプシド形成に必須のＡＡＶ配列とｒＡＡＶによる感染のための物理的構造を全て含んでいる。本発明のベクターで使用するためのＡＡＶ　ＩＴＲは、（例えば、Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，１９９４，５：７９３－８０１に記載されているような）野生型ヌクレオチド配列を有する必要はなく、ヌクレオチドの挿入、欠失又は置換によって改変されていても、いくつかのＡＡＶセロタイプのいずれかに由来するものであってもよい。４０以上のＡＡＶセロタイプが現在知られており、新しいセロタイプや既存のセロタイプのバリアントが確認され続けている。Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，２００２，９９（１８）：１１８５４－６；Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，２００３，１００（１０）：６０８１－６；及びＢｏｓｓｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，２００３，７７（１２）：６７９９－８１０を参照されたい。

【００５７】

任意のＡＡＶセロタイプの使用は、本発明の範囲内であると考えられる。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶセロタイプ、例えば、限定されないが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ８Ｒ、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ．ｒｈ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ヤギＡＡＶ、ウシＡＡＶ、又はマウスＡＡＶなどに由来するベクターである。い

くつかの実施形態では、ＡＡＶ中の核酸は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ８Ｒ、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ヤギＡＡＶ、ウシＡＡＶ、又はマウスＡＡＶなどのＩＴＲを含む。特定の実施形態では、ＡＡＶ　ＩＴＲは、ＡＡＶ２　ＩＴＲである。

【００５８】

いくつかの実施形態では、ベクターは、スタッファー核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、スタッファー核酸は、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードし得る。いくつかの実施形態では、スタッファー核酸は、本開示のＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセットの３’に位置し得る。

【００５９】

いくつかの態様では、本発明は、組換え自己相補性ゲノムを含むウイルス粒子を提供する。いくつかの実施形態では、ベクターは、自己相補性ベクターである。自己相補性ゲノムを有するＡＡＶウイルス粒子、及び自己相補性ＡＡＶゲノムの使用方法は、米国特許第６，５９６，５３５号明細書；同第７，１２５，７１７号明細書；同第７，７６５，５８３号明細書；同第７，７８５，８８８号明細書；同第７，７９０，１５４号明細書；同第７，８４６，７２９号明細書；同第８，０９３，０５４号明細書；及び同第８，３６１，４５７号明細書；並びにＷａｎｇ　Ｚ．，ｅｔ　ａｌ．，（２００３）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　１０：２１０５－２１１１に記載されており、これらの各文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。自己相補性ゲノムを含むｒＡＡＶは、その部分的に相補的な配列（例えば、導入遺伝子の相補的なコード鎖及び非コード鎖）によって、二本鎖ＤＮＡ分子を迅速に形成する。いくつかの実施形態では、本発明は、ＡＡＶゲノムを含むＡＡＶウイルス粒子であって、ｒＡＡＶゲノムは、第１の異種ポリヌクレオチド配列（例えば、本発明のＡＲＳＡポリペプチドのコード鎖）及び第２の異種ポリヌクレオチド配列（例えば、本開示のＡＲＳＡポリペプチドの非コード鎖又はアンチセンス鎖）を含み、第１の異種ポリヌクレオチド配列は、その長さのほとんど又は全てに沿って、第２のポリヌクレオチド配列と鎖内塩基対を形成し得る、ＡＡＶウイルス粒子を提供する。

【００６０】

いくつかの実施形態では、第１の異種ポリヌクレオチド配列及び第２の異種ポリヌクレオチド配列は、鎖内塩基対形成を促進する配列、例えばヘアピンＤＮＡ構造によって連結されている。ヘアピン構造は、当該技術分野、例えばｓｉＲＮＡ分子において知られている。いくつかの実施形態では、第１の異種ポリヌクレオチド配列及び第２の異種ポリヌクレオチド配列は、変異ＩＴＲ（例えば、右ＩＴＲ）によって連結されている。変異ＩＴＲは、末端分解配列を含むＤ領域の欠失を含む。結果として、ＡＡＶウイルスゲノムを複製する際、ｒｅｐタンパク質は、変異ＩＴＲでウイルスゲノムを切断せず、そのため、５’から３’の順に以下を含む組換えウイルスゲノムがウイルスカプシドにパッケージングされる：ＡＡＶ　ＩＴＲ、調節配列を含む第１の異種ポリヌクレオチド配列、変異ＡＡＶ　ＩＴＲ、第１の異種ポリヌクレオチドと逆向きの第２の異種ポリヌクレオチド、及び第３のＡＡＶ　ＩＴＲ。

【００６１】

いくつかの実施形態では、第１の異種核酸配列及び第２の異種核酸配列は、変異ＩＴＲ（例えば、右ＩＴＲ）によって連結されている。いくつかの実施形態では、ＩＴＲは、ポリヌクレオチド配列５’－ＣＡＣＴＣＣＣＴＣＴＣＴＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣＡＣＴＧＡＧＧＣＣＧＧＧＣＧＡＣＣＡＡＡＧＧＴＣＧＣＣＣＡＣＧＣＣＣＧＧＧＣＴＴＴＧＣＣＣＧＧＧＣＧ－３’（配列番号１５）を含む。この変異ＩＴＲは、末端分解配列を含むＤ領域の欠失を含む。結果として、ＡＡＶウイルスゲノムを複製する際、ｒｅｐタンパク質は、変異ＩＴＲでウイルスゲノムを切断せず、そのため、５’から３’の順に以下を含む組換えウイルスゲノムがウイルスカプシドにパッケージングされる：ＡＡＶ　ＩＴＲ、調節配列を含む第１の異種ポリヌクレオチド配列、変異ＡＡＶ　ＩＴＲ、第１の異種ポリヌクレオチドと逆向きの第２の異種ポリヌクレオチド、及び第３のＡＡＶ　ＩＴＲ。

【００６２】
いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルス粒子に封入されている。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えＡＡＶベクターを含む組換えＡＡＶウイルス粒子である。様々なＡＡＶセロタイプを使用して、特定の標的細胞の形質導入を最適化するか、又は特定の標的組織（例えば、脳又は脊髄）内の特定の細胞型を標的とする。ｒＡＡＶ粒子は、同じセロタイプ又は混合セロタイプのウイルスタンパク質及びウイルス核酸を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、改変ＡＡＶ１９９９カプシドタンパク質、及び少なくとも１つのＡＡＶ２　ＩＴＲを含むか、又は改変ＡＡＶ１９９９カプシドタンパク質及び少なくとも１つのＡＡＶ１　ＩＴＲを含み得る。ｒＡＡＶ粒子を生成するためのＡＡＶセロタイプの組み合わせはいずれも、各組み合わせが本明細書に明示的に記載されているかのように本明細書で提供される。
【００６３】
ＡＡＶのカプシド（例えば、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１９９９など）には、３つのカプシドタンパク質：ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３が含まれることが知られている。これらのタンパク質は、相当量の重複アミノ酸配列及び固有のＮ末端配列を含有する。ＡＡＶ９カプシドは、正二十面体対称によって配置された６０のサブユニットを含む。ＡＡＶ９は、約５：５：５０の比でＶＰ１、ＶＰ２及びＶＰ３カプシドタンパク質を含む。ＡＡＶ９のＶＰタンパク質は、ゲノムの構造タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（ｃａｐと呼称）の産物、マイナーなカプシドタンパク質であるＶＰ１（約８２ｋＤａ）及びＶＰ２（約７３ｋＤａ）、並びに主要なカプシドタンパク質であるＶＰ３（約６１ｋＤａ）である。発現の際、選択的スプライシングと読み漏らしの両方の利用に起因して、個々のＶＰはＶＰ３全体を包含するＣ末端を共有し、ＶＰ１及びＶＰ２はＮ末端ＶＰ３を伸長する。ＶＰ１及びＶＰ２は、約７３個のアミノ酸の領域を共有し、ＶＰ１ではこれから伸長して、ＶＰ１固有領域（ＶＰ１ｕ）と呼ばれる約１３７個のアミノ酸が追加されている。Ｐｅｎｚｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，（２０２１），Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　９５（１９）ｅ００８４３２１を参照されたい。本明細書に開示される改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質のいくつかの実施形態では、ターゲティングペプチド（例えば、配列番号１０）は、ＶＰ１に組み込まれる。本明細書に開示される改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質のいくつかの実施形態では、ターゲティングペプチド（例えば、配列番号１０）は、ＶＰ２に組み込まれる。本明細書に開示される改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質のいくつかの実施形態では、ターゲティングペプチド（例えば、配列番号１０）は、ＶＰ３に組み込まれる。本明細書に開示される改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質のいくつかの実施形態では、ターゲティングペプチド（例えば、配列番号１０）は、ＶＰ１、ＶＰ２及びＶＰ３に組み込まれる。
【００６４】
いくつかの実施形態では、本開示は、脳をｒＡＡＶ粒子の標的とするターゲティングペプチドを含む改変ＡＡＶ９カプシドタンパク質を含む、ＡＲＳＡポリペプチドのＣＳＦ内投与のためのｒＡＡＶ粒子を提供する。特定の実施形態では、改変ＡＡＶ９カプシドのターゲティングペプチドは、ＡＡＶ９構造タンパク質の残基５８８の後に挿入される。いくつかの実施形態では、ターゲティングペプチドは、配列番号１０を有する。いくつかの実施形態では、ターゲティングペプチドは、ターゲティングペプチドのＮ末端及びＣ末端にリンカー配列が隣接している。いくつかの実施形態では、Ｎ末端側のリンカー配列は、配列ＡＡＡを有する。いくつかの実施形態では、Ｃ末端側のリンカー配列は、ＡＳである。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ９カプシド構造タンパク質の残基５８８の後に挿入された完全配列は、配列番号１１を有する。
【００６５】
いくつかの実施形態では、完全改変ＡＡＶ９カプシド構造タンパク質（ＶＰ１）は、配列番号１２の配列を有する。いくつかの実施形態では、完全改変ＡＡＶ９カプシド構造タンパク質（ＶＰ１）は、配列番号１２と少なくとも９０％（例えば、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９８．５％、少なくとも９９％、少な

くとも９９．２％、少なくとも９９．５％、又は少なくとも９９．８％）同一であり、ここで、改変ＡＡＶ９構造カプシドは、配列番号１０のターゲティングペプチドを含む。

【００６６】

いくつかの実施形態では、ＡＡＶ９カプシドの改変ＶＰ２カプシドは、配列番号１３の配列を有する。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ９の改変ＶＰ２カプシドは、配列番号１３と少なくとも９０％（例えば、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９８．５％、少なくとも９９％、少なくとも９９．２％、少なくとも９９．５％、又は少なくとも９９．８％）同一である配列を有し、ここで、改変ＡＡＶ９構造カプシドは、配列番号１０のターゲティングペプチドを含む。

【００６７】

いくつかの実施形態では、ＡＡＶ９カプシドの改変ＶＰ３カプシドは、配列番号１４の配列を有する。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ９の改変ＶＰ３カプシドは、配列番号１４と少なくとも９０％（例えば、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９８．５％、少なくとも９９％、少なくとも９９．２％、少なくとも９９．５％、又は少なくとも９９．８％）同一である配列を有し、ここで、改変ＡＡＶ９構造カプシドは、配列番号１０のターゲティングペプチドを含む。

【００６８】

ＡＡＶ粒子の生産

当該技術分野において、ｒＡＡＶベクターの作製には、トランスフェクション、安定した細胞株の作製、並びに、アデノウイルス－ＡＡＶハイブリッド、ヘルペスウイルス－ＡＡＶハイブリッド（Ｃｏｎｗａｙ，ＪＥ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ７１（１１）：８７８０－８７８９）、及びバクロウイルス－ＡＡＶハイブリッド（Ｕｒａｂｅ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ１３（１６）：１９３５－１９４３；Ｋｏｔｉｎ，Ｒ．（２０１１）Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ．２０（Ｒ１）：Ｒ２－Ｒ６）を含む感染性ハイブリッドウイルス生産システムを含む数多くの方法が知られている。ｒＡＡＶウイルス粒子を生産するためのｒＡＡＶ作製培養物は全て、１）好適な宿主細胞、２）好適なヘルパーウイルス機能、３）ＡＡＶ ｒｅｐ及びＣＡＰ遺伝子及び遺伝子産物、４）少なくとも１つのＡＡＶ ＩＴＲ配列が隣接する核酸（例えば、ＡＲＳＡポリペプチドをコードするＡＡＶゲノム）、並びに５）ｒＡＡＶ作製をサポートする好適な培地及び培地成分を必要とする。いくつかの実施形態では、好適な宿主細胞は、霊長類宿主細胞である。いくつかの実施形態では、好適な宿主細胞は、ＨｅＬａ細胞、Ａ５４９細胞、２９３細胞又はＰｅｒｃ．６細胞などのヒト由来細胞株である。いくつかの実施形態では、好適なヘルパーウイルス機能は、野生型又は変異型アデノウイルス（例えば、温度感受性アデノウイルス）、ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、バキュロウイルス、又はヘルパー機能を提供するプラスミド構築物によって提供される。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子産物は、任意のＡＡＶセロタイプに由来し得る。一般に、必須ではないが、ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子産物は、ｒｅｐ遺伝子産物がｒＡＡＶゲノムを複製してパッケージングするように機能し得る限り、ｒＡＡＶベクターゲノムのＩＴＲＳと同じセロタイプである。当該技術分野で知られる好適な培地は、ｒＡＡＶベクターの作製に使用され得る。これらの培地としては、限定はされないが、改変イーグル培地（ＭＥＭ）、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、米国特許第６，５６６，１１８号明細書に記載されているようなカスタム製剤、及び米国特許第６，７２３，５５１号明細書に記載されているようなＳｆ－９００ ＩＩＳＦＭ培地を含むＨｙＣｌｏｎｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ及びＪＲＨによって製造される培地が挙げられ、これらのそれぞれは、特に、組換えＡＡＶベクターの作製に使用するカスタム培地配合に関して、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＡＡＶヘルパー機能は、アデノウイルス又はＨＳＶによって提供される。いくつかの実施形態では、ＡＡＶヘルパー機能は、バキュロウイルスによって提供され、宿主細胞は、昆虫細胞（例えば、スポドプテラ・フルギペルダ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）（Ｓｆ９）細胞）である。

【００６９】
ｒＡＡＶ粒子を生産するための１つの方法は、トリプルトランスフェクション法である。簡潔に記載すると、ｒｅｐ遺伝子及びカプシド遺伝子を含有するプラスミドは、ヘルパーアデノウイルスプラスミドと共に、（例えば、リン酸カルシウム法を使用して）細胞株（例えば、ＨＥＫ－２９３細胞）にトランスフェクトされ得、ウイルスが収集され、任意選択的に精製され得る。したがって、いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、ｒＡＡＶベクターをコードする核酸、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐをコードする核酸、及びＡＡＶヘルパーウイルス機能をコードする核酸の宿主細胞へのトリプルトランスフェクションによって作製され、この核酸の宿主細胞へのトランスフェクションにより、ｒＡＡＶ粒子を産生することができる宿主細胞が生成される。

【００７０】
いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、産生細胞株法（Ｍａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１３）Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　Ｍｅｔｈｏｄｓ２４：２５３－２６９；米国特許出願公開第２００４／０２２４４１１号明細書；及びＬｉｕ，Ｘ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．６：２９３－２９９を参照）によって生産され得る。簡潔に記載すると、細胞株（例えば、ＨｅＬａ、２９３、Ａ５４９、又はＰｅｒｃ．６細胞株）は、ｒｅｐ遺伝子、カプシド遺伝子、及びプロモーター異種核酸配列（例えば、ＡＲＳＡポリペプチド）を含むベクターゲノムを含むプラスミドで安定的にトランスフェクトされ得る。細胞株をスクリーニングして、ｒＡＡＶ生産のためのリードクローンを選択し、次いで、これを産生バイオリアクタに拡大し、ヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス又はＨＳＶ）に感染させてｒＡＡＶ生産を開始し得る。その後、ウイルスを回収し、アデノウイルスを（例えば、熱によって）不活化及び／又は除去し、ｒＡＡＶ粒子を精製し得る。したがって、いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、ｒＡＡＶベクターをコードする１つ以上の核酸、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐをコードする核酸、並びにＡＡＶヘルパーウイルス機能をコードする核酸を含む産生細胞株によって産生された。本明細書に記載されるように、産生細胞株法は、トリプルトランスフェクション法と比較して、大きいゲノムを有するｒＡＡＶ粒子の生産に有利であり得る。

【００７１】
いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をコードする核酸、並びに／又はｒＡＡＶゲノムは、産生細胞株中で安定的に維持される。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をコードする核酸、並びに／又はｒＡＡＶゲノムは、１つ以上のプラスミドで細胞株に導入されて、産生細胞株を生成する。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ｒｅｐ、ＡＡＶ　ｃａｐ及びｒＡＡＶゲノムは、同じプラスミドで細胞に導入される。他の実施形態では、ＡＡＶ　ｒｅｐ、ＡＡＶ　ｃａｐ及びｒＡＡＶゲノムは、異なるプラスミドで細胞に導入される。いくつかの実施形態では、プラスミドで安定にトランスフェクトされた細胞株は、細胞株の複数の継代（例えば、細胞の５、１０、２０、３０、４０、５０又は５０超の継代）にわたってプラスミドを維持する。例えば、プラスミドは細胞の複製に伴って複製し得る、又はプラスミドは細胞ゲノムに組み込まれ得る。細胞（例えば、ヒト細胞）においてプラスミドが自律的に複製することを可能にする様々な配列が確認されている（例えば、Ｋｒｙｓａｎ，Ｐ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．９：１０２６－１０３３を参照）。いくつかの実施形態では、プラスミドは、プラスミドを維持する細胞の選択を可能にする選択マーカー（例えば、抗生物質耐性マーカー）を含み得る。哺乳動物細胞で一般的に使用される選択マーカーとしては、限定はされないが、ブラスチシジン、Ｇ４１８、ハイグロマイシンＢ、ゼオシン、ピューロマイシン、及びこれらの誘導体が挙げられる。細胞に核酸を導入する方法は、当該技術分野で知られており、限定はされないが、ウイルス導入、カチオン性トランスフェクション（例えば、ＤＥＡＥ－デキストランなどのカチオン性ポリマー又はリポフェクタミンなどのカチオン性脂質を使用する）、リン酸カルシウムトランスフェクション、マイクロインジェクション、パーティクルボンバードメント、エレクトロポレーション、及びナノ粒子トランスフェクション（詳細については、例えば、Ｋｉｍ，Ｔ．Ｋ．及び

Ｅｂｅｒｗｉｎｅ，Ｊ．Ｈ．（２０１０）Ａｎａｌ．Ｂｉｏａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．３９７：３１７３－３１７８を参照）が挙げられる。

【００７２】

いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をコードする核酸、並びに／又はｒＡＡＶゲノムは、産生細胞株のゲノムに安定的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をコードする核酸、並びに／又はｒＡＡＶゲノムは、１つ以上のプラスミドで細胞株に導入されて、産生細胞株を生成する。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ｒｅｐ、ＡＡＶ　ｃａｐ及びｒＡＡＶゲノムは、同じプラスミドで細胞に導入される。他の実施形態では、ＡＡＶ　ｒｅｐ、ＡＡＶ　ｃａｐ及びｒＡＡＶゲノムは、異なるプラスミドで細胞に導入される。いくつかの実施形態では、プラスミドは、プラスミドを維持する細胞の選択を可能にする選択マーカー（例えば、抗生物質耐性マーカー）を含み得る。様々な宿主細胞株へ核酸を安定的に組み込む方法は、当該技術分野で知られている。例えば、反復選択（例えば、選択マーカーの使用による）を使用して、選択マーカー（並びにＡＡＶ　ｃａｐ及びｒｅｐ遺伝子、並びに／又はｒＡＡＶゲノム）を含有する核酸を組み込んだ細胞を選択し得る。他の実施形態では、核酸は、産生細胞株を生成するために、細胞株に部位特異的に組み込まれ得る。いくつかの部位特異的組換えシステムは、ＦＬＰ／ＦＲＴ（例えば、Ｏ’Ｇｏｒｍａｎ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５１：１３５１－１３５５を参照）、Ｃｒｅ／ｌｏｘＰ（例えば、Ｓａｕｅｒ，Ｂ．ａｎｄ　Ｈｅｎｄｅｒｓｏｎ，Ｎ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８５：５１６６－５１７０を参照）、及びｐｈｉ　Ｃ３１－ａｔｔ（例えば、Ｇｒｏｔｈ，Ａ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９７：５９９５－６０００を参照）など、当該技術分野において知られている。

【００７３】

いくつかの実施形態では、産生細胞株は、霊長類細胞株（例えば、Ｖｅｒｏ又はＦＲｈＬ－２細胞株などの非ヒト霊長類細胞株）に由来する。いくつかの実施形態では、細胞株は、ヒト細胞株に由来する。いくつかの実施形態では、産生細胞株は、ＨｅＬａ、２９３、Ａ５４９又はＰＥＲＣ．６（登録商標）（Ｃｒｕｃｅｌｌ）細胞に由来する。例えば、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をコードする核酸、並びに／又は特大のｒＡＡＶゲノムを細胞株に導入し且つ／又は安定的に維持／統合しての産生細胞株を生成する前、細胞株は、ＨｅＬａ、２９３、Ａ５４９、又はＰＥＲＣ．６（登録商標）（Ｃｒｕｃｅｌｌ）細胞株、又はその派生株である。

【００７４】

いくつかの実施形態では、産生細胞株は、懸濁液中での増殖に適合されている。当該技術分野で知られているように、足場依存性細胞は、典型的には、マイクロキャリアビーズなどの基質なしで懸濁液中で増殖することができない。懸濁液中で増殖するように細胞株を適合させることには、例えば、撹拌パドルを用いて撹拌培養で細胞株を増殖させること、凝集を防ぐためにカルシウムイオン及びマグネシウムイオンを欠く培養培地（及び任意選択的に消泡剤）を使用すること、シリコーン化化合物でコーティングした培養容器を使用すること、並びに各継代で培養中の細胞（大きな塊や容器の側面ではなく）を選択することが含まれ得る。さらなる説明には、例えば、ＡＴＣＣ　Ｆｒｅｑｕｅｎｔｌｙ　Ａｓｋｅｄ　Ｑｕｅｓｔｉｏｎｓ　ｄｏｃｕｍｅｎｔ（ｗｗｗ．ａｔｃｃ．ｏｒｇ／Ｇｌｏｂａｌ／ＦＡＱｓ／９／１／Ａｄａｐｔｉｎｇ％２０ａ％２０ｍｏｎｏｌａｙｅｒ％２０ｃｅｌｌ％２０ｌｉｎｅ％２０ｔｏ％２０ｓｕｓｐｅｎｓｉｏｎ－４０．ａｓｐｘで入手可能）及びその中で引用されている参考文献を参照されたい。

【００７５】

いくつかの態様では、（ａ）ｒＡＡＶ粒子が産生される条件下で宿主細胞を培養すること（ここで、宿主細胞は（ｉ）１つ以上のＡＡＶパッケージ遺伝子（ここで、前記各ＡＡＶパッケージング遺伝子は、ＡＡＶ複製及び／又はカプシド形成タンパク質をコードする）と、（ｉｉ）少なくとも１つのＡＡＶ　ＩＴＲが隣接している本明細書に記載の異種核

酸をコードする核酸を含むｒＡＡＶプロベクターと、（ｉｉｉ）ＡＡＶヘルパー機能とを含む）；並びに（ｂ）宿主細胞によって産生されるｒＡＡＶ粒子を回収することを含む、本明細書に開示されるｒＡＡＶ粒子を生産する方法が提供される。いくつかの実施形態では、前記少なくとも１つのＡＡＶ　ＩＴＲは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ８Ｒ、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ヤギＡＡＶ、ウシＡＡＶ、又はマウスＡＡＶセロタイプＩＴＲなどからなる群から選択される。例えば、いくつかの実施形態では、ＡＡＶセロタイプは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ８Ｒ、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、又はＡＡＶｒｈ１０である。特定の実施形態では、ＡＡＶ中の核酸は、ＡＡＶ２　ＩＴＲを含む。いくつかの実施形態では、前記カプシド形成タンパク質は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ８Ｒ、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１９９９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ２Ｒ４７１Ａ、ＡＡＶ２／２－７ｍ８、ＡＡＶ　ＤＪ、ＡＡＶ２　Ｎ５８７Ａ、ＡＡＶ２Ｅ５４８Ａ、ＡＡＶ２　Ｎ７０８Ａ、ＡＡＶ　Ｖ７０８Ｋ、ヤギＡＡＶ、ＡＡＶ１／ＡＡＶ２キメラ、ウシＡＡＶ、マウスＡＡＶカプシド、ｒＡＡＶ２／ＨＢｏＶ１セロタイプ、ＡＡＶ－ＸＬ３２、又はＡＡＶ－ＸＬ３２．１カプシドタンパク質、又はこれらの変異体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、カプシド形成タンパク質は、ＡＡＶ８カプシドタンパク質である。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ９カプシド及びＡＡＶ２　ＩＴＲを含む組換えゲノム、並びに治療用導入遺伝子／核酸をコードする核酸（例えば、ＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセット）を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ１９９９カプシド及びＡＡＶ２　ＩＴＲを含む組換えゲノム、並びに治療用導入遺伝子／核酸をコードする核酸（例えば、ＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセット）を含む。

【００７６】

本発明の好適なｒＡＡＶ産生培地には、０．５％～２０％（ｖ／ｖ又はｗ／ｖ）のレベルの血清又は血清由来の組換えタンパク質が補充され得る。或いは、当該技術分野で知られているように、ｒＡＡＶベクターは、動物由来産物を含まない培地とも呼ばれ得る血清を含まない条件で産生され得る。当業者であれば、ｒＡＡＶベクターの産生を支援するように設計された市販又はカスタム培地にはまた、産生培養におけるｒＡＡＶの力価を高めるために、当技術分野で既知の１つ以上の細胞培養成分（例えば、グルコース、ビタミン、アミノ酸、及び又は増殖因子を含むがこれらに限定されない）が補充され得ることを理解し得る。

【００７７】

ｒＡＡＶ産生培養物は、利用される特定の宿主細胞に適した様々な条件下（広範な温度範囲、様々な時間の長さなど）で増殖させることができる。当該技術分野で知られているように、ｒＡＡＶ産生培養物には、例えばローラーボトル、中空糸フィルタ、マイクロキャリア、及び充填層又は流動層バイオリアクタなどの好適な接着依存性容器で培養することができる接着依存性培養物が含まれる。ｒＡＡＶベクター産生培養物にはまた、例えばスピナーフラスコ、撹拌タンクバイオリアクタ、及びＷａｖｅバッグシステムなどのディスポーザブルシステムを含む様々な方法で培養することができる、ＨｅＬａ、２９３及びＳＦ－９細胞などの懸濁適合宿主細胞が含まれ得る。

【００７８】

本発明のｒＡＡＶベクター粒子は、産生培養物の宿主細胞の溶解、又は製造培養物からの使用済み培地の回収によって、ｒＡＡＶ産生培養物から回収され得る。但し、細胞は、米国特許第６，５６６，１１８号明細書にさらに十分に説明されているように、当該技術分野で知られる条件下で培養され、インタクトな細胞から培地中にｒＡＡＶ粒子が放出されることを条件とする。細胞溶解の好適な方法はまた、当該技術分野において知られており、例えば、複数回の凍結／解凍サイクル、超音波処理、顕微溶液化、及び洗剤及び／又はプロテアーゼなどの化学物質による処理が挙げられる。

【００７９】
さらなる実施形態では、ｒＡＡＶ粒子が精製される。本明細書で使用される「精製」という用語には、ｒＡＡＶ粒子が天然に存在するか又は最初に調製された所でも存在し得る他の成分の少なくともいくつかを欠くｒＡＡＶ粒子の調製が含まれる。したがって、例えば、単離されたｒＡＡＶ粒子は、培養溶解物又は産生培養上清などのソース混合物を濃縮し得る精製技術を使用して調製し得る。濃縮は、様々な方法で測定することができ、例えば、溶液中に存在するＤＮａｓｅ耐性粒子（ＤＲＰ）若しくはゲノムコピー（ｇｃ）の割合によって、又は感染性によって測定することができ、また或いは、再生培養物の汚染物質又はプロセス中の汚染物質、例えばヘルパーウイルス、培地成分などを含む、汚染物質などのソース混合物中に存在する第２の潜在的に干渉する物質に関して測定することができる。

【００８０】
いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ産生培養回収物を清澄化して、宿主細胞の残屑を除去する。いくつかの実施形態では、産生培養回収物は、例えば、グレードＤＯＨＣ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｍｉｌｌｉｓｔａｋ＋ＨＣポッドフィルタ、グレードＡ１ＨＣ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｍｉｌｌｉｓｔａｋ＋ＨＣポッドフィルタ、及び０．２μｍフィルタＯｐｔｉｃａｐ ＸＬ１０ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｅｘｐｒｅｓｓ ＳＨＣ親水性メンブレンフィルタを含む一連のデプスフィルタで濾過することによって清澄化される。清澄化はまた、当該技術分野で知られる様々な他の標準的な技術、例えば、遠心分離、又は当該技術分野で知られる０．２μｍ以上の孔径の任意の酢酸セルロースフィルタによる濾過によって達成することができる。

【００８１】
いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ産生培養回収者をＢｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標）でさらに処理して、産生培養物中に存在する高分子量ＤＮＡを消化する。いくつかの実施形態では、Ｂｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標）消化は、当該技術分野で知られる標準的な条件下、例えば、周囲～３７℃の範囲の温度にて、３０分～数時間、１～２．５単位／ｍｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標）の最終濃度で、実施される。

【００８２】
ｒＡＡＶ粒子は、以下の精製工程の１つ以上を使用して単離又は精製され得る：平衡遠心分離；フロースルーアニオン交換濾過；ｒＡＡＶ粒子を濃縮するためのタンデンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）；アパタイトクロマトグラフィによるｒＡＡＶ捕捉；ヘルパーウイルスの熱不活化；疎水性相互作用クロマトグラフィーによるｒＡＡＶ捕捉；サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）による緩衝液交換；ナノ濾過；及びアニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、又はアフィニティークロマトグラフィーによるｒＡＡＶ捕捉。これらの工程は、単独で、様々な組み合わせで、又は異なる順序で使用され得る。いくつかの実施形態では、本方法は、以下に記載される順序で全ての工程を含む。ｒＡＡＶ粒子を精製する方法は、例えば、Ｘｉａｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ７２：２２２４－２２３２；米国特許第６，９８９，２６４号明細書及び同第８，１３７，９４８号明細書；並びに国際公開第２０１０／１４８１４３号パンフレットに記載されている。

【００８３】
治療方法
本開示の特定の態様は、ＭＬＤの治療及び／又はＡＲＳＡポリペプチドのレベルの増加を必要とする個体におけるＭＬＤを治療する方法及び／又はＡＲＳＡポリペプチドのレベルを増加させる方法に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、本開示のＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセット（例えば、ｒＡＡＶ粒子で送達される発現カセット）を有効量投与することによってＭＬＤを治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＡＲＳＡポリペプチドは、野生型ＡＲＳＡポリペプチドである。ＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセット（例えば、ｒＡＡＶ粒子で送達される発現カセット）は、様々な経路を介して投与され得る。いくつかの実施形態では、投与は、直接脊髄

注入及び／又は脳内投与を含む。いくつかの実施形態では、投与は、大脳、髄質、橋、小脳、頭蓋内腔、脳を囲む髄膜、硬膜、くも膜、軟膜、脳を囲むくも膜下腔の脳脊髄液（ＣＳＦ）、小脳の深部小脳核、大脳の脳室系、くも膜下腔、線条体、皮質、隔膜、視床、視床下部、及び脳の実質から選択される部位になされる。いくつかの実施形態では、投与は、少なくとも１つの側脳室への脳室内注入を含む。いくつかの実施形態では、投与は、頸部、胸部及び／又は腰部における髄腔内注入を含む。いくつかの実施形態では、投与は、線条体内注入を含む。いくつかの実施形態では、投与は、視床内注入を含む。

【００８４】

治療の目的に応じて、有効量の（いくつかの実施形態では、粒子の形態の）ｒＡＡＶが投与される。例えば、低い割合の導入で所望の治療効果を達成できる場合、治療の目的は一般に、このレベルの導入を満たすか又はそれを超えることである。いくつかの例では、このレベルの導入は、所望の組織タイプの標的細胞のわずか約１～５％の導入によって達成することができ、いくつかの実施形態では所望の組織タイプの細胞の少なくとも約２０％、いくつかの実施形態では少なくとも約５０％、いくつかの実施形態では少なくとも約８０％、いくつかの実施形態では少なくとも約９５％、いくつかの実施形態では所望の組織タイプの細胞の少なくとも約９９％の導入によって達成することができる。ｒＡＡＶ組成物は、同じ手順中に、又は数日、数週間、数か月若しくは数年の間隔を空けて、１回以上の投与によって投与され得る。本明細書に記載の投与経路のいずれか１つ以上が使用され得る。いくつかの実施形態では、複数のベクターを使用してヒトを治療し得る。

【００８５】

上記態様のいくつかの実施形態では、ｒＡＡＶは、脊髄への直接注入によって、髄腔内注入によって、又は大槽内注入によって投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶは、脊髄又はシステルナマグナの複数の位置に投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶは、脊髄の複数の位置に投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶは、脊髄の腰部くも膜下腔、胸部くも膜下腔及び頸部くも膜下腔の１つ以上に投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶは、システルナマグナに投与される。

【００８６】

ＡＡＶウイルス粒子によって導入された細胞を識別する方法は、当該技術分野において知られており、例えば、免疫組織化学的に、又は高感度緑色蛍光タンパク質などのマーカーを使用して、ウイルス粒子、例えばアミノ酸の１つ以上の置換を有するｒＡＡＶカプシドを含むウイルス粒子の導入を検出することができる。

【００８７】

いくつかの実施形態では、有効量のｒＡＡＶ粒子は、複数の位置に同時に又は連続的に投与される。他の実施形態では、有効量のｒＡＡＶ粒子は、１つの位置に複数回（例えば、繰り返し）投与される。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶウイルス粒子の複数回の注入は、１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、９時間、１２時間又は２４時間以下の間隔で行われる。

【００８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、本開示のＡＲＳＡポリペプチドをコードする組換えウイルスベクターを含む有効量の医薬組成物を投与することによって、ＭＬＤに罹患のヒトを治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、１種以上の薬学的に許容される賦形剤を含む。

【００８９】

いくつかの実施形態では、方法は、有効量の、本開示のＡＲＳＡポリペプチドをコードする組換えウイルスベクターを含む医薬組成物を、それを必要とする個体のＭＬＤを治療するために投与することを含む。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は、少なくとも約５×１０$^{12}$、６×１０$^{12}$、７×１０$^{12}$、８×１０$^{12}$、９×１０$^{12}$、１０×１０$^{12}$、１１×１０$^{12}$、１５×１０$^{12}$、２０×１０$^{12}$、２５×１０$^{12}$、３０×１０$^{12}$、又は５０×１０$^{12}$ゲノムコピー／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は

、約５×１０$^{12}$～６×１０$^{12}$、６×１０$^{12}$～７×１０$^{12}$、７×１０$^{12}$～８×１０$^{12}$、８×１０$^{12}$～９×１０$^{12}$、９×１０$^{12}$～１０×１０$^{12}$、１０×１０$^{12}$～１１×１０$^{12}$、１１×１０$^{12}$～１５×１０$^{12}$、１５×１０$^{12}$～２０×１０$^{12}$、２０×１０$^{12}$～２５×１０$^{12}$、２５×１０$^{12}$～３０×１０$^{12}$、３０×１０$^{12}$～５０×１０$^{12}$、又は５０×１０$^{12}$～１００×１０$^{12}$ゲノムコピー／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は、約５×１０$^{12}$～１０×１０$^{12}$、１０×１０$^{12}$～２５×１０$^{12}$、又は２５×１０$^{12}$～５０×１０$^{12}$ゲノムコピー／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は、少なくとも約５×１０$^{9}$、６×１０$^{9}$、７×１０$^{9}$、８×１０$^{9}$、９×１０$^{9}$、１０×１０$^{9}$、１１×１０$^{9}$、１５×１０$^{9}$、２０×１０$^{9}$、２５×１０$^{9}$、３０×１０$^{9}$、又は５０×１０$^{9}$トランスダクションユニット／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は、約５×１０$^{9}$～６×１０$^{9}$、６×１０$^{9}$～７×１０$^{9}$、７×１０$^{9}$～８×１０$^{9}$、８×１０$^{9}$～９×１０$^{9}$、９×１０$^{9}$～１０×１０$^{9}$、１０×１０$^{9}$～１１×１０$^{9}$、１１×１０$^{9}$～１５×１０$^{9}$、１５×１０$^{9}$～２０×１０$^{9}$、２０×１０$^{9}$～２５×１０$^{9}$、２５×１０$^{9}$～３０×１０$^{9}$、３０×１０$^{9}$～５０×１０$^{9}$又は５０×１０$^{9}$～１００×１０$^{9}$トランスダクションユニット／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は、約５×１０$^{9}$～１０×１０$^{9}$、１０×１０$^{9}$～１５×１０$^{9}$、１５×１０$^{9}$～２５×１０$^{9}$、又は２５×１０$^{9}$～５０×１０$^{9}$トランスダクションユニット／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は、少なくとも約５×１０$^{10}$、６×１０$^{10}$、７×１０$^{10}$、８×１０$^{10}$、９×１０$^{10}$、１０×１０$^{10}$、１１×１０$^{10}$、１５×１０$^{10}$、２０×１０$^{10}$、２５×１０$^{10}$、３０×１０$^{10}$、４０×１０$^{10}$、又は５０×１０$^{10}$感染ユニット／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は、少なくとも、約５×１０$^{10}$～６×１０$^{10}$、６×１０$^{10}$～７×１０$^{10}$、７×１０$^{10}$～８×１０$^{10}$、８×１０$^{10}$～９×１０$^{10}$、９×１０$^{10}$～１０×１０$^{10}$、１０×１０$^{10}$～１１×１０$^{10}$、１１×１０$^{10}$～１５×１０$^{10}$、１５×１０$^{10}$～２０×１０$^{10}$、２０×１０$^{10}$～２５×１０$^{10}$、２５×１０$^{10}$～３０×１０$^{10}$、３０×１０$^{10}$～４０×１０$^{10}$、４０×１０$^{10}$～５０×１０$^{10}$、又は５０×１０$^{10}$～１００×１０$^{10}$感染ユニット／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、ｒＡＡＶ粒子）のウイルス力価は、少なくとも、約５×１０$^{10}$～１０×１０$^{10}$、１０×１０$^{10}$～１５×１０$^{10}$、１５×１０$^{10}$～２５×１０$^{10}$、又は２５×１０$^{10}$～５０×１０$^{10}$感染ユニット／ｍＬのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、ｒＡＡＶ粒子である。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ１９９９カプシドタンパク質を含む。

【００９０】

いくつかの実施形態では、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、少なくとも、体重１ｋｇ当たり約１×１０$^{8}$～約６×１０$^{13}$ゲノムコピーのいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、体重１ｋｇ当たり約１×１０$^{8}$～約６×１０$^{13}$ゲノムコピーのいずれかである。。いくつかの実施形態では、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、体重１ｋｇ当たり約１×１０$^{10}$、２×１０$^{10}$、３×１０$^{10}$、４×１０$^{10}$、５×１０$^{10}$、６×１０$^{10}$、７×１０$^{10}$、８×１０$^{10}$、９×１０$^{10}$、１×１０$^{11}$、２×１０$^{11}$、３×１０$^{11}$、４×１０$^{11}$、５×１０$^{11}$、６×１０$^{11}$、７×１０$^{11}$、８×１０$^{11}$、９×１０$^{11}$、１×１０$^{12}$、２×１０$^{12}$、１３×１０$^{12}$、４×１０$^{12}$、５×１０$^{12}$、６×１０$^{12}$、７×１０$^{12}$、８×１０$^{12}$、９×１０$^{12}$、又は１×１０$^{13}$ゲノムコピーのいずれかである。

【００９１】

いくつかの実施形態では、個体に投与されるウイルス粒子の総量は、少なくとも約１×１０$^{9}$～約１×１０$^{14}$ゲノムコピーのいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与されるウイルス粒子の総量は、約１×１０$^{9}$～約１×１０$^{14}$ゲノムコピーのいずれか

である。いくつかの実施形態では、個体に投与されるウイルス粒子の総量は、約１×１０$^{11}$、２×１０$^{11}$、３×１０$^{11}$、４×１０$^{11}$、５×１０$^{11}$、６×１０$^{11}$、７×１０$^{11}$、８×１０$^{11}$、９×１０$^{11}$、１×１０$^{12}$、２×１０$^{12}$、３×１０$^{12}$、４×１０$^{12}$、５×１０$^{12}$、６×１０$^{12}$、７×１０$^{12}$、８×１０$^{12}$、９×１０$^{12}$、１×１０$^{13}$、２×１０$^{13}$、１３×１０$^{13}$、４×１０$^{13}$、５×１０$^{13}$、６×１０$^{13}$、７×１０$^{13}$、８×１０$^{13}$、９×１０$^{13}$、又は１×１０$^{14}$ゲノムコピーのいずれかである。

【００９２】

本発明の組成物（例えば、本開示のＡＲＳＡポリペプチドをコードするベクターを含む組換えウイルス粒子）は、単独で、又はＭＬＤを治療するための１つ以上の追加の治療剤と組み合わせて使用することができる。逐次投与の間隔は、少なくとも（或いは、未満）分、時間又は日数単位とすることができる。

【００９３】

治療の目的に応じて、有効量の（いくつかの実施形態では、粒子の形態の）ｒＡＡＶが投与される。例えば、低い割合の導入で所望の治療効果を達成できる場合、治療の目的は一般に、このレベルの導入を満たすか又はそれを超えることである。いくつかの例では、このレベルの導入は、わずか約１～５％の導入によって達成することができ、いくつかの実施形態では所望の組織タイプの細胞の少なくとも約２０％、いくつかの実施形態では少なくとも約５０％、いくつかの実施形態では少なくとも約８０％、いくつかの実施形態では少なくとも約９５％、いくつかの実施形態では所望の組織タイプの細胞の少なくとも約９９％の導入によって達成することができる。ｒＡＡＶ組成物は、同じ手順中に、又は数日、数週間、数か月若しくは数年の間隔を空けて、１回以上の投与によって投与され得る。いくつかの実施形態では、複数のベクターを使用して哺乳動物（例えば、ヒト）を治療し得る。

【００９４】

いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶ組成物をヒトへの投与に使用し得る。いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶ組成物を小児への投与に使用し得る。いくつかの実施形態では、有効量の（いくつかの実施形態では、粒子の形態の）ｒＡＡＶは、１か月未満、２か月未満、３か月未満、４か月未満、５か月未満、６か月未満、７か月未満、８か月未満、９か月未満、１０か月未満、１１か月未満、１年未満、１３か月未満、１４か月未満、１５か月未満、１６か月未満、１７か月未満、１８か月未満、１９か月未満、２０か月未満、２１か月未満、２２か月未満、２年未満、３歳未満、５歳未満又は７歳未満の患者に投与される。

【００９５】

いくつかの実施形態では、本開示のｒＡＡＶ組成物を若年成人への投与に使用し得る。いくつかの実施形態では、有効量の（いくつかの実施形態では、粒子の形態の）ｒＡＡＶは、１２歳未満、１３歳未満、１４歳未満、１５歳未満、１６歳未満、１７歳未満、１８歳未満、１９歳未満、２０歳未満、２１歳未満、２２歳未満、２３歳未満、２４歳未満、又は２５歳未満の患者に投与される。

【００９６】

キット及び製品

本明細書に記載の発現カセット（例えば、野生型ヒトＡＲＳＡポリペプチドなどのＡＲＳＡポリペプチドを発現するための発現カセット）、ｒＡＡＶベクター、粒子、及び／又は医薬組成物は、例えば本明細書に記載の本発明の方法の１つで使用するために設計されたキット又は製品（例えば、製品）に含まれ得る。

【００９７】

一般に、システムは、本発明の方法での使用に好適な、カニューレ、１つ以上のシリンジ（例えば、１、２、３、４本又はそれ以上）、及び１つ以上の流体（例えば、１、２、３、４又はそれ以上）を含む。

【００９８】

シリンジは、流体を送達するためのカニューレに接続されることができれば、任意の好

適なシリンジであり得る。いくつかの実施形態では、システムは、１本のシリンジを有する。いくつかの実施形態では、システムは、２本のシリンジを有する。いくつかの実施形態では、システムは、３本のシリンジを有する。いくつかの実施形態では、システムは、４本以上のシリンジを有する。本発明の方法での使用に好適な流体としては、本明細書に記載のもの、例えば、それぞれが本明細書に記載の１つ以上のベクターの有効量を含む１つ以上の流体、及び１つ以上の治療剤を含む１つ以上の流体が挙げられる。

【００９９】

いくつかの実施形態では、キットは、単一の流体（例えば、有効量のベクターを含む薬学的に許容される流体）を含む。いくつかの実施形態では、キットは、２つの流体を含む。いくつかの実施形態では、キットは、３つの流体を含む。いくつかの実施形態では、キットは、４つ以上の流体を含む。流体は、本開示のＡＲＳＡポリペプチド又はｒＡＡＶベクター組成物を発現するための発現カセットを送達、希釈、安定化、緩衝、又は輸送するのに適した、本明細書に記載されている、又は当該技術分野で知られる希釈剤、緩衝液、賦形剤、又は任意の他の液体を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、１つ以上の緩衝液、例えば水性ｐＨ緩衝液を含む。緩衝液の例としては、リン酸塩、クエン酸塩、トリス、ＨＥＰＥＳ、及び他の有機酸の緩衝液を挙げ得るが、これらに限定されない。

【０１００】

いくつかの実施形態では、キットは、容器を含む。好適な容器としては、例えば、バイアル、バッグ、シリンジ、及びボトルを挙げ得る。容器は、ガラス、金属、又はプラスチックなどの材料の１種以上から作られ得る。いくつかの実施形態では、容器は、本開示のｒＡＡＶ組成物を保持するために使用される。いくつかの実施形態では、容器はまた、流体及び／又は他の治療剤を保持し得る。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、キットは、本開示のｒＡＡＶ組成物と共に、追加の治療剤を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ組成物及び追加の治療剤は混合され得る。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ組成物及び追加の治療剤は、別々に保管され得る。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ組成物及び追加の治療剤は、同じ容器内に存在し得る。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ組成物及び追加の治療剤は、異なる容器内に存在し得る。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ組成物及び追加の治療剤は、同時に投与され得る。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ組成物及び追加の治療剤は、同じ日に投与され得る。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶ組成物は、追加の治療剤の投与後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、２週間、３週間、４週間、２か月、３か月、４か月、５か月又は６か月以内に投与され得る。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、キットは、ＡＡＶ投与前に免疫系を一時的に抑制するための治療剤を含む。いくつかの実施形態では、患者は、ＡＡＶ粒子に対するＴ細胞の応答を阻害するために、ウイルス注入の直前及び直後に一時的に免疫抑制される（例えば、Ｆｅｒｒｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２５：１８０－１８８，２０１４を参照されたい）。いくつかの実施形態では、キットは、シクロスポリン、ミコフェノール酸モフェチル及び／又はメチルプレドニゾロンをさらに提供する。

【０１０３】

本発明のｒＡＡＶ粒子及び／又は組成物は、さらに使用説明書を含むキットにパッケージングされ得る。いくつかの実施形態では、キットは、ｒＡＡＶ粒子の組成物の送達（例えば、本明細書に記載のあらゆるタイプの非経口投与）のためのデバイスをさらに含む。いくつかの実施形態では、使用説明書には、本明細書に記載の方法の１つによる説明書が含まれる。いくつかの実施形態では、説明書は、容器に設けられた（例えば、貼り付けられた）ラベルに印刷される。いくつかの実施形態では、使用説明書には、個体（例えば、ヒト）に、例えば、個体のＭＬＤを治療するための有効量のｒＡＡＶ粒子を投与するための説明書が含まれる。

【実施例】

【０１０４】
本開示は、以下の実施例を参照することにより、より深く理解されるであろう。しかしながら、以下の実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に記載される実施例及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改変又は変更が当業者に示唆され、本出願の精神及び範囲並びに添付の実施形態の範囲内に含まれることが理解される。
【０１０５】
一般的方法
組織の均質化
冷却したＯｍｎｉ　ｂｅａｄ　ｒｕｐｔｏｒ内の１．４ｍｍセラミックビーズ均質化チューブに加えた冷１０ｍＭトリス１ｍ　ＭＥＤＴＡ緩衝液で組織を均質化した－２０秒サイクル４．７振動／秒。均質化後、後続のアッセイ用にアリコートを作製した。
【０１０６】
スルファターゼ活性のための組織の可溶化
均質化した組織に、Ｎｏｎｉｄｅｔ　Ｐ－４０を最終濃度が０．１％となるように添加し、オービタルシェーカーにより、４Ｃで１．５時間可溶化し、次いで、１８，０００×ｇで２０分間遠心分離した。上清を取り出し、氷上のエッペンドルフチューブに移した。
【０１０７】
ＢＣＡアッセイ
水に希釈した１０μＬの上清を使用して、ＢＣＡ（ビシンコニン酸）アッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　２３２２７）により、総タンパク質濃度を決定した。５６２ｎｍでの吸光度によるビシンコニン酸（ＢＣＡ）による第１銅カチオン（$Cu^{1+}$）の比色検出。ＳｏｆｔＭａｘ　Ｐｒｏバージョン５．４．４ソフトウェアを搭載したＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　３４０ＰＣ－３８４を使用して、９６ウェルマイクロタイタープレートを読み取った。
【０１０８】
スルファターゼ活性
１０マイクロリットルの清澄上清の総スルファターゼ活性を、４－ニトロカテコール硫酸（ＰＮＣＳ）基質からの加水分解４－ニトロカテコール（ＰＮＣ）に対するスルファターゼ活性アッセイを使用してアッセイした。（Ａｂｃａｍ　Ａｂ２０４７３１）。活性を、ＰＮＣ標準曲線に対する試料の加水分解４－ニトロカテコール（ＰＮＣ）により測定し、５１５ｎｍでの吸光度を読み取った。スルファターゼ活性を、ｍＵ／ｍｇ（ｎｍｏｌ／分／ｍｇ）として報告した。ＳｏｆｔＭａｘ　Ｐｒｏバージョン５．４．４ソフトウェアを搭載したＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　３４０ＰＣ－３８４を使用して、９６ウェルマイクロタイタープレートを読み取った。
【０１０９】
脂質抽出
組織ホモジネート（又は流体）のアリコートを、２０～１００×抽出溶液（５ｍＭギ酸アンモニウム、１０ｎｇ／ｍｌ　Ｃ１７－スルファチドを補充したアセトニトリル：メタノール（７０：３０）中０．２％ギ酸）で抽出した。１０分間激しく混合した後、試料を５分間静置し、再び素早くボルテックスした（３０秒）。全ての試料を、４℃にて１０分間、８，４００ｒｐｍで遠心分離した。上清のアリコート（２００ｕＬ）を、ＬＣ－ＭＳ分析のために、不活性化Ｑ－Ｓｅｒｔバイアルに移した。
【０１１０】
Ｃ１６、Ｃ１８、Ｃ２４及びＣ２４：１鎖長のスルファチド（Ｍａｔｒｅｙａ）及びＣ１８　２Ｒ－ＯＨスルファチド及びリソスルファチド（Ａｖａｎｔｉ）を有するスルファチドを使用して、同じ抽出溶液で、標準曲線（直線性範囲０．０３～１０００ｎｇ／ｍＬ、２倍連続希釈）を作成した。
【０１１１】
スルファチドのＬＣ－ＭＳ分析

Ｗａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣシステム（Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）を、以下のパラメータで負のイオンモードで動作するＥＳＩ源を備えたＱｔｒａｐ ６５００質量分析計システム（Ｆｒａｍｉｎｇｈａｍ、ＭＡ）に結合した：カーテンガス２５．０；イオンスプレー電圧－４．５ｋＶ；温度５００℃；イオン源ガス：５０及び７０；デクラスタリング電位－８０Ｖ；入口電位－１０Ｖ；衝突エネルギー－１５５Ｖ；及び衝突セル出口電位－１５Ｖ。

【０１１２】

スルファチド種を、Ｗａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣ ＢＥＨアミド（１．７μ、２．１×１００ｍＭ、Ｐ／Ｎ：１８６００４８０１）で分離した。オートサンプラー及びカラムオーブンをそれぞれ１０℃及び２０℃に維持した。移動相は、溶媒Ａ：アセトニトリル：水（９５：５）中５ｍＭギ酸アンモニウム：水、及び溶媒Ｂ：メタノール：水（９０：１０）中５ｍＭギ酸アンモニウムから構成された。

【０１１３】

勾配プログラムは、０％Ｂで開始され、２分間保持し、０％Ｂから１００％Ｂまで線形曲線が続いた。１００％Ｂでさらに１分間保持した後、０％Ｂで再平衡化した。全てのスルファチド種を、Ｃ１７－スルファチドの内部標準に対し正規化し、対応する標準スルファチドの標準曲線によって計算する。

【０１１４】

ニトロブルーミエリン染色

切片を１２ウェルプレートに移し、フリーフローティング切片で全てのステップを実行する。シェーカーを用いＴＢＡ中で切片を洗浄する（２回、１分）。ニトロブルー溶液（Ｓｉｇｍａカタログ番号Ｎ５３７４）で１時間インキュベートし、シェーカーを用いＴＢＡ中ですすぐ（２回、５分）。切片をＤＡＢ染色液（Ｓｉｇｍａキット カタログ番号Ｄ４２９３）中で１時間インキュベートし、ＲＯ水ですすぐ（２回、１）。ＰＢＳで切片を１分間洗浄し、ＰＢＳ及び空気乾燥スライドに取り付け載置する。ニュートラルレッド溶液で対向染色を２分間行い、ＲＯ水ですすぐ（２回、２）。スライドを９５％試薬アルコールで１分間、１００％試薬アルコールで２回、２分間、キシレンで２回、２分間すすぎ、Ａｃｒｙｔｏｌ封入剤を使用してカバースリップする。

【０１１５】

ＧＦＰ ＥＬＩＳＡ

ＡｂｃａｍのＧＦＰ ＳｉｍｐｌｅＳｔｅｐ ＥＬＩＳＡ（登録商標）キット（ａｂ１７１５８１）を使用して、ＧＦＰタンパク質の測定を完了した。一部の試薬濃度は、異なるロット、特に標準で変化するため、各キットロットに付属のプロトコルインサートを読み取ることが不可欠である。

【０１１６】

開始前に、全てのキット構成要素を室温（１８～２５Ｃ）に少なくとも３０分間平衡化した。タンパク質処理組織ホモジネートのアリコートを氷上で解凍した。キットの説明書に従って、試薬及び作業標準を新しく調製した。試料を、以下のように完全細胞抽出緩衝液で希釈した：灰白質１：５、脊髄１：５、心臓：１：５、肝臓１：２０。希釈した試料及び標準を適切なウェルに加え、続いて各ウェルに抗体カクテルを添加した。プレートを密封し、室温で１時間、４００ＲＰＭで振盪しながら、インキュベートした。ウェルを洗浄緩衝液で３回洗浄し、液体が完全に除去されたことを確認した。ＴＭＢ溶液を各ウェルに添加し、暗所にて室温で１０分間、４００ＲＰＭで振盪しながら、インキュベートした。ＴＭＢインキュベーション後、速やかに、停止液を各ウェルに加え、プレートシェーカーで１分間混合した。プレートを、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ）でＳｏｆｔｍａｘソフトウェアを使用して、４５０ｎｍで読み取った。

【０１１７】

ＦＬＡＧ ＩＨＣ

ＮＨＰ脳ＦＦＰＥスライドを、抗原回収のために、９０℃で２０分間ＥＤＴＡ溶液（ｐ

Ｈ．９．０）中で処理し、続いて３％過酸化水素で５分間ブロッキングした。次いで、スライドを、抗体希釈剤（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ カタログ番号８１１２）で１：２００希釈したＦｌａｇ ＤＤＫ抗体（Ａｂｃａｍ ａｂ２０５６０６）と共に室温で１時間インキュベートし、続いて、抗ウサギＨＲＰ（Ａｂｃａｍ ａｂ６７２１）二次抗体とインキュベートした。スライドをＤＡＢ溶液中、室温で３分間インキュベートすることによって、Ｆｌａｇ ＤＤＫシグナルを発色させ、その後、スライドを核染色用のヘマトキシリンで対比染色した。

【０１１８】

ＧＦＰ ＩＨＣ

ＮＨＰ脳ＦＦＰＥスライドを、抗原回収のために、９０℃で２０分間ＥＤＴＡ溶液（ｐＨ．９．０）中で処理し、その後、室温にて３％過酸化水素で１０分間、続いて５％ウマ血清で４５分間ブロックした。次いで、スライドを、抗体希釈剤（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ カタログ番号８１１２）で１：５００希釈したＧＦＰ抗体（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ａ－１１１２２）とともに室温で１時間インキュベートし、続いて、抗ウサギＨＲＰ（Ａｂｃａｍ ａｂ６７２１）二次抗体とインキュベートした。スライドをＤＡＢ溶液中、室温で３分間インキュベートすることによって、ＧＦＰシグナルを発色させ、スライドを核染色用のヘマトキシリンで対比染色した。

【０１１９】

交差補正解析

隣接する５μｍ ＦＦＰＥ切片を、ＡＲＳＡ ＩＨＣ及びＤＡＰＩ又はＷＰＲＥ ＩＳＨ及びＤＡＰＩのいずれかのために処理した。次いで、個々のタイルを繋ぎ合わせて、ＩＨＣ画像とＩＳＨ画像の両方のサジタル切片を得た。次いで、これらの画像を変換マトリクス（回転及び並進パラメータ）でグローバルに登録して、ＩＨＣ画像及びＩＳＨ画像をアラインした。次いで、サジタル切片内の個々のタイルをＤＡＰＩを使用してローカルに登録し、個々のＩＨＣタイルとＩＳＨタイルとの間の良好なアラインメントを確保した。各タイルにおいて、ＩＨＣ陽性細胞及びＩＳＨ陽性細胞を、サジタル切片全体にわたって経験的に決定された閾値パラメータによって推定した。ＩＳＨの場合、ＩＨＣ陽性細胞は、真正なＩＳＨシグナルとしてカウントされるためには、核と少なくとも２０％の重なりがなければならなかった。ＩＨＣ画像については、ＡＲＳＡ染色を伴わない陰性対照を使用して、閾値パラメータを決定した。ＩＨＣ陽性細胞とＩＳＨ陽性細胞の比である交差補正因子を各タイルについて推定し、ヒートマップとして表した。

【０１２０】

単一核シークエンシング

核単離：核単離のために、解剖した脳を微小遠心管に移し、ドライアイス及びエタノールのスラリー中で瞬間凍結させ、使用時まで－８００Ｃで保管した。核を単離するために、凍結マウス脳を、１ｍｌのダウンス型ホモジナイザー（Ｗｈｅａｔｏｎ）中の０．１％のＴｒｉｔｏｎ－１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１ｍＭのＤＴＴ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（、及び０．２Ｕ／μｌのＲＮａｓｅ阻害剤（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を含有する核溶解緩衝液に入れた。ルーズなダウンス乳棒で１０回、続いてタイトな乳棒で１０回叩いて組織を均質化し、氷上で１５分間インキュベートした。得られたホモジネートを、３０μｍ細胞ストレーナー（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を通過させ、５００×ｇで５分間遠心分離して、核をペレット化した。核を、１×ＰＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）、１％のヌクレアーゼフリーＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１ｍＭのＤＴＴ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）及び０．２Ｕ／μｌのＲＮａｓｅ阻害剤（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を含む緩衝液に再懸濁した。ＰＥ（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にコンジュゲートしたマウス抗ＮｅｕＮを１：５００の希釈で調製物に添加し、試料を４０Ｃで３０分間インキュベートした。次いで、試料を５００×ｇで５分間遠心分離して、核をペレット化し、ペレットを１×ＰＢＳ、１％ＢＳＡ、１ｍＭ ＤＴＴ、及び０．２Ｕ／μｌ ＲＮａｓｅ阻害剤に再懸濁した。ＤＡＰＩを０．１μｇ／ｍｌの濃度で添加した。Ｉｎｆｌｕｘ－８３（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で１００μ

mノズルを使用して、単一核の選別を実施した。核をＤＡＰＩ及びＮｅｕＮシグナル（ＰＥ）に基づいてゲートした。

【０１２１】

ライブラリー調製とＮｏｖａＳｅｑシーケンシング

ライブラリーを、Ｃｈｒｏｍｉｕｍシングルセル３’遺伝子発現Ｖ３．１キット用の１０ｘＧｅｎｏｍｉｃｓプロトコルに従って調製した。簡潔に記載すると、選別直後に、核を９０％ＮｅｕＮ－及び１０％Ｎｅｕｎ＋核と混合した。１０ＸＧｅｎｏｍｉｃｓ遺伝子発現キット（１０ｘＧｅｎｏｍｉｃｓ）におけるＧＥＭ生成工程を実施した。ＧＥＭ生成後、試料を－２０$^{0}$Ｃに保持して、さらなるステップを行った。ｃＤＮＡ増幅、ライブラリー構築、ライブラリーシークエンシングまで、全てのサンプルを一緒に処理した。ｃＤＮＡ及びライブラリーの定量は、全ての試料で固体であった。ライブラリーを、ｉｌｌｕｍｉｎｅ Ｎｏｖａｓｅｑ ６０００で配列決定した。ライブラリーを、約５０Ｋリード／核の中央真度で配列決定した。Ｃｅｌｌ Ｒａｎｇｅｒ Ｖ５によってＵＭＩカウントマトリックスを生成した。

【０１２２】

データの前処理：生成されたカウントマトリックスを、核バーコード及び遺伝子ラベルと共にＰａｒｔｅｋ Ｆｌｏｗにロードした。品質管理（ＱＣ）のために、バイオリン図の検査に基づいて標準的なプロトコルに従って核をフィルタ処理した。詳細なカットオフは、２５０＜ｎＦｅａｔｕｒｅ＿ＲＮＡ＜６０００及びｎＣｏｕｎｔ＿ＲＮＡ＜３０００であった。ミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子は、２％未満であった。品質フィルタリング後、合計１４７３１３個の核がさらなる分析のために残った。

【０１２３】

ベクターゲノム評価

ＨＴ ｇＤＮＡ単離：ＱＩＡｍｐ ９６ ＤＮＡ ＱＩＡｃｕｂｅ ＨＴキット（カタログ番号５１３３１）を製造業者のプロトコル「ＱＩＡａｍｐ（登録商標）９６ ＤＮＡ ＱＩＡｃｕｂｅ（登録商標）ＨＴハンドブック」に従って使用して、ｇＤＮＡを５０μｌのＮＨＰ組織ホモジネートから単離した。組織ホモジネートを、まず５６ＣにてプロテイナーゼＫで一晩処理し、次いで、Ｓブロックに移し、試料をＱＩＡｃｕｂ ＨＴ装置に置き、ＱＩＡｃｕｂ ＨＴ Ｐｒｅｐ Ｍａｎｇｅソフトウェアを用いてｇＤＮＡを単離した。次いで、ｇＤＮＡ濃度をＮＡＮＯＤＲＯＰ ８０００（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で測定した。

【０１２４】

ｄＰＣＲ ｖｉａ ＱＩＡｃｕｔｙ：ベクターゲノムを、ＱＩＡＧＥＮによって製造されたｄＰＣＲ ｖｉａ ＱＩＡｃｕｔｙで決定した。ＮＨＰ組織から単離された７μｇのｇＤＮＡｇと、１×プローブＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（カタログ番号２５０１０３）；１×プライマー－プローブミックス１（ＢＧＨ）及びミックス２（ハウスキープ遺伝子）；０．２５ＵのＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素を含有する５μｌのマスター反応ミックスとを、標準ＰＣＲプレートで混合し、次いで、ナノプレートに移した。総反応体積は、１ウェル当たり１２μｌである。次いで、ナノプレートをＱＩＡｃｕｉｔｙ装置に置き、製造推奨サイクルを使用してｄＰＣＲを実施する。各試料及び各遺伝子のＤＮＡコピーを、ソフトウェアによって自動的に分析した。次いで、１細胞当たりのベクターゲノムを計算した。２×ＢＧＨコピーは、ハウスキープ遺伝子コピーを分割する。

【０１２５】

実施例１．２つの異なる発現カセットを用いたインビボでのＡＲＳＡ発現

ベクターペイロードを、構成的キメラＣＭＶ－ニワトリβアクチン（ＣＢＡ）プロモーターによって促進されるヒトコドン最適化アリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）遺伝子（配列番号２）を発現するように設計した。導入遺伝子発現は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素（ＷＰＲＥ）の添加によりさらに増強される。配列番号３は、５’ＡＡＶ２ ＩＴＲ（配列番号４）及び３’ＡＡＶ２ ＩＴＲ（配列番号５）、ＣＭＶエンハンサーエレメント（配列番号６）、ニワトリβ－アクチンプロモーター（配列番号７）並

びにＷＰＲＥエレメント（配列番号８）を含む、ｒＡＡＶパッケージング用プラスミドの代表的な完全ＤＮＡ配列を示す。ｒＡＡＶ粒子産生のための特定のプラスミドのマップの概略図を図１７に示す。プラスミドの特定のエレメントを表１に列挙する。

【０１２６】

【表１】

表 1. 5'ITR から 3'ITR までの配列注記

| 配列<br>番号 | 注記 |
|---|---|
| 1 - 145 | AAV2 5' ITR |
| 173-553 | CMVエンハンサーエレメント |
| 554-873 | ニワトリ b-アクチンプロモーター |
| 874-924 | エクソン 1 ニワトリ b-アクチン |
| 925-1799 | イントロン 1 ニワトリ b-アクチン |
| 1808-1848 | イントロン 2ウサギベータグロビン |
| 1849-1902 | エクソン 3ウサギベータグロビン |
| 1914-3443 | コドン最適化ヒト ARSA |
| 3446-4030 | WPREエレメント |
| 4043-4245 | ポリAシグナル配列; 牛成長ホルモン遺伝子<br>ポリアデニル化配列 |
| 4253-4397 | 反転方向のAAV2 3 ITRエレメント |

【０１２７】

生後２日目に、ＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスに、ＷＰＲＥエレメントの有無にかかわらず、ヒトＡＲＳＡを発現するＰＢＳ又はＡＡＶ９（２ｅ１１ＶＧ；２ｅ１４ＶＧ／ｋｇ）ｒＡＡＶウイルス粒子をＩＶ（両側眼窩後静脈注射）投与した。２つの発現カセットを、図１Ａに図解する。図１Ｂは、ウイルス粒子投与後の前脳、中脳及び後脳におけるｈＡＲＳＡ発現のウエスタンブロット分析を示す。発現レベルを、ＡＲＳＡ$^{-/-}$マウス及び正常レベルのＡＲＳＡを発現するマウス（すなわち、ＷＴマウス）における発現レベルと比較する。

【０１２８】

図１Ｂに示すように、発現レベルは、２つの発現カセットを含むウイルス粒子の投与後に増加する。発現カセットにおけるＷＰＲＥエレメントの包含は、ＷＰＲＥエレメントを含まない発現カセットと比較してＡＲＳＡの発現レベルを増加させる。

【０１２９】

次に、ＬＣ－ＭＳを使用してＣ２４－ＳＴレベルを測定した。ＳＴレベルを組織重量に対して正規化した。図１Ｃは、２つの発現カセットを含むウイルス粒子の投与後の前脳、中脳及び後脳におけるＣＳＴレベルを示す。エラーバーは標準偏差を含む平均を表す。テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０１；＊＊＊ｐ＜０．００１；＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。ＥＬＮ：２０２００２０５－１８８、２０２００３０５－１５２、２０２００２０５－００６。ＷＰＲＥエレメントを含まない発現カセットを含むＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスへのＡＡＶ９粒子の投与後のＣ２４－ＳＴレベルは、ＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスのＣ２４－ＳＴレベルと比較して有意に低下した。ＷＰＲＥエレメントを有する発現カセットを含むＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスへのＡＡＶ９粒子の投与後には、Ｃ２４－ＳＴレベルのさらなる低下が観察された。

【０１３０】
実施例２．ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与したＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにおけるスルファターゼ活性の評価
後期（１３か月）ＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与した（動物１匹当たり１．９７ｅ１１ＶＧ）。対照として、年齢をマッチさせたＷＴマウス及びＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスに製剤緩衝液を注入した。投与の３か月後、マウスを安楽死させ、脳、脊髄及び肝臓を収集した。ＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性を、スルファターゼ活性アッセイキット（ａｂ２０４７３１）を使用して測定し、ＢＣＡアッセイによって測定した総タンパク質に対してデータを正規化した。エラーバーは標準偏差を含む平均を表す。テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０１；＊＊＊ｐ＜０．００１；＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。ＥＬＮ：２０２０１２０５－００１、２０２１０２２５－１０７、２０２１０２１１－１１７。図２に示すように、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置した後期ＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスは、脳、脊髄及び肝臓において、ＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性の増加を示す。
【０１３１】
実施例３．ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与したＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにおけるスルファチドの評価
ＭＬＤ患者におけるスルファチドの沈着は、毒性及び神経死を促進する主要な因子である。短鎖脂肪酸（Ｃ１６、Ｃ１８）は主にニューロン及びアストロサイトに蓄積し、一方、長鎖脂肪酸スルファチド（Ｃ２４：１、Ｃ２４）はミエリン形成細胞に蓄積する。脱アシル化されたスルファチドであるリソスルファチドは、ＭＬＤ患者の全ての組織に蓄積する。
【０１３２】
後期（１３か月）ＡＲＳＡ$^{-/-}$（ＡＲＳＡ　ＫＯ）マウスにＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与した。対照として、年齢をマッチさせたＷＴマウス及びＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスに製剤緩衝液を注入した。投与の３か月後、マウスを安楽死させ、脳及び脊髄を収集した。スルファチドレベルを、ＬＣ－ＭＳを使用して測定した。データを組織重量に対して正規化し、ｎｇ／ｍＬ（５０μＬ）からμｇ／ｇに変換した。エラーバーは標準偏差を含む平均を表す。テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。
【０１３３】
ＬＣ－ＭＳと、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与したＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスの脳及び脊髄の両試料を使用して測定したスルファチドレベルは、全てのスルファチドアイソフォームレベルで有意な低下を示した（図３）。
【０１３４】
実施例４．ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与したＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにおけるミエリン形成の評価
ＭＬＤ患者は、白質路におけるミエリン形成の有意な喪失を示す。後期（１３か月）ＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスに対する遺伝子治療の影響に対処するために、マウスにＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与した。対照として、年齢をマッチさせたＷＴマウス及びＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスに製剤緩衝液を注入した。投与３か月後に適合するサジタル脳半切片をニトロブルーで染色し、特に脳梁におけるシグナル強度を定量した。エラーバーは標準偏差を含む平均を表す。テューキーの多重比較検定を用いた一元配置分散分析。ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置した後期ＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスは、対照と比較して、脳梁におけるミエリン形成の改善を示す（図４）。
【０１３５】
実施例５．ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与したＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにおけるミエリン形成及び成熟オリゴデンドロサイト細胞数の評価
後期（１３か月）ＭＬＤ　ＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与した。対照として、年齢をマッチさせたＷＴマウス及びＡＲＳＡ$^{-/-}$マ

ウスに製剤緩衝液を注入した。脳半球を収集して急速凍結し、小脳、脳幹及び嗅球を解剖した。脳の残りの部分を単一核ＲＮＡｓｅｑ用に処理して、異なる細胞型の相対存在量を測定した。エラーバーは標準偏差を含む平均を表す。テューキーの多重比較による二元配置分散分析。図５は、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置したＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスで、未処置のＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスと比較して、オリゴデンドロサイト細胞数の正常化が見られたことを示す。

【０１３６】

実施例６．ＡＲＳＡタンパク質交差補正試験

後期（１３か月）ＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与した。投与の３か月後、ＡＲＳＡ－ｍＲＮＡインサイチュハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）及びＡＲＳＡ－タンパク質免疫組織化学（ＩＨＣ）を、対応するサジタル脳半切片で実施した。切片を画像化し、シグナルオーバーレイを解析した。（図６Ａ）マウスの脳からの隣接するサジタル切片を、核のＤＡＰＩ染色によるＷＰＲＥ　ＩＳＨ又はＡＲＳＡ　ＩＨＣ用に処置した。次いで、サジタル切片を、個々の１０２４×１０２４ピクセルタイルとして分析した。各タイルにおいて、ＩＳＨ陽性細胞及びＩＨＣ陽性細胞を、サジタル像全体にわたって経験的に決定された閾値パラメータによって決定した。ＩＨＣ＋細胞とＩＳＨ＋細胞との比である交差補正係数を、赤の色合いで示す高度に交差補正されたタイルを有するヒートマップとして表す（６Ｂ）。各タイルのＩＳＨ＋細胞数対ＩＨＣ＋細胞数を散布図としてプロットし、ｙ＝ｘの線を赤で示す。ｙ＝ｘ線の上のタイルは、交差補正された細胞を示す。後期神経障害マウスでは、感染細胞と比較して１０倍多くの細胞が交差補正され、この戦略で広範な交差補正が達成されたことが強調された。

【０１３７】

実施例７．早期（６か月）神経病理学的段階のＭＬＤマウス（Ａｒｓａ$^{-/-}$）におけるＡＡＶ．ｒｈ１０－ｈＡＲＳＡ－ＷＰＲＥ媒介遺伝子置換の評価は、ＭＬＤ関連病理の好転をもたらした

早期（６か月）のＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与した。対照として、年齢をマッチさせたＷＴマウス及びＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスに製剤緩衝液を注入した。投与の４か月後、ヒトＡＲＳＡに対するＩＨＣによって、サジタル脳切片における広範なＡＲＳＡ発現が観察された（図７Ａ）。同じ動物で、脳、脊髄、ＤＲＧ及び肝臓は、ＡＲＳＡ活性の有意な増加を示した（７Ｂ）。したがって、ＡＡＶ．ＲＨ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥで処置された早期のＭＬＤ（ＡＲＳＡ$^{-/-}$）マウスは、脳、脊髄、ＤＲＧ及び肝臓において広範なＣＮＳヒトＡＲＳＡ発現及びＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性の増加を示す。

【０１３８】

実施例８．早期（６か月）の神経病理学的段階でのＭＬＤマウス（Ａｒｓａ$^{-/-}$）のＡＡＶ．ｒｈ１０－ｈＡＲＳＡ－ＷＰＲＥ媒介遺伝子置換（ＡＲＳＡ－／－）におけるスルファチドレベルの評価

早期（６か月）のＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスにＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを投与した。対照として、年齢をマッチさせたＷＴマウス及びＡＲＳＡ$^{-/-}$マウスに製剤緩衝液を注入した。投与の４か月後、動物を安楽死させ、（Ａ）脳及び脊髄、（Ｂ）肝臓、（Ｃ）血漿及び（Ｄ）ＣＳＦを収集した。スルファチドレベルを、ＬＣ－ＭＳを使用して測定した。データを組織重量に対して正規化し、ｎｇ／ｍＬ（５０μＬ）からμｇ／ｇに変換した。流体：データを（３０μＬ）ｎｇ／ｍＬからｎｇ／ｍＬに、またｎｇ／ｍＬ（５μＬ）からｎｇ／ＵＬに変換した。図８Ａ～Ｄは、脳（図８Ａ）、肝臓（図８Ｂ）、血漿（図８Ｃ）及びＣＳＦ（図８Ｄ）におけるスルファチドレベルを示す。スルファチドレベルは、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥの投与後、脳、脊髄、肝臓、血漿及びＣＳＦにおいて有意に増加した。

【０１３９】

実施例９：非ヒト霊長類（ＮＨＰ）を用いた研究－スルファターゼ活性

ＡＡＶｒｈ．１０に対し血清反応陰性のカニクイザル（雄、モーリシャス２歳、２～３

ｋｇ）に、腰部に挿入したポート付き髄腔内カテーテルを使用して、頸部レベル１～２接合部で、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥを髄腔内投与した。トレンデレンブルグ体位の動物に、２．５ｍＬを０．１２５ｍＬ／分で２回、約６時間の間隔で、注入投与した。以下の２用量を投与した：７．５ｅ１２ＶＧ／ＮＨＰ（＠１ｅ１１ＶＧ／脳グラム）及び２．７５ｅ１３ＶＧ／ＮＨＰ（＠３．３ｅ１１ＶＧ／脳グラム）。投与の２９日後、動物を安楽死させ、以下の試料のＡＲＳＡ活性を評価した：脳からパンチした５９個の組織、及び脊髄からの７個の組織パンチ。脳及び脊髄においてスルファターゼ活性の有意な増加が観察され、低用量及び高用量でそれぞれ、脳全体のパンチの５９％及び８６％が、バックグラウンドに対し少なくとも１０％の活性の増加を示した（図９Ａ）。これは、＞１０％の活性増加を示すパンチが５０％という本発明者らの目標基準を上回った。同様に、低用量及び高用量で処理したＮＨＰの脊髄において、それぞれ２５％及び３２％のスルファターゼ活性の増加が観察された（図９Ｂ）。広範なＡＲＳＡ生体分布が、ＦＬＡＧ抗体に対するＩＨＣによって、処置したＮＨＰの脳において観察された（図９Ｃ）。これらの結果は、ＡＡＶ．ｒｈ１０－ＣＢＡ－ＡＲＳＡ－ＷＰＲＥ媒介遺伝子置換が、中枢神経系（ＣＮＳ）及び末梢神経系（ＰＮＳ）において幅広い治療レベルのＡＲＳＡを達成するための実行可能なアプローチであることを示している。

【０１４０】

実施例１０：非ヒト霊長類（ＮＨＰ）を用いた研究－ＡＡＶ１９９９又はＡＡＶ．ｒｈ１０を含む粒子の投与後の導入遺伝子発現レベルの比較

ＡＡＶｒｈ１０及びＡＡＶ１９９９（配列番号１２を有するＶＰ１、配列番号１３を有するＶＰ２；及び配列番号１４を有するＶＰ３）の血清反応陰性のカニクイザル（オス、モーリシャス２歳、２～３ｋｇ）に、腰部に挿入したポート付き髄腔内カテーテルを使用して、頸部レベル１～２接合部で髄腔内投与した。トレンデレンブルグ体位の動物に、２．５ｍＬを０．１２５ｍＬ／分で２回、約６時間の間隔で、注入投与した。ＡＡＶ１９９９／ｒｈ１０／Ｍｙｏ－ＣＢＡ－ＥＧＦＰの１用量を２．７５ｅ１３ＶＧ／ＮＨＰ（脳１グラム当たり３．３ｅ１１ＶＧ）で投与した。投与の２週間後、動物を安楽死させ、試料における緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の発現をＥＬＩＳＡにより評価した。

【０１４１】

１６の異なる脳領域を表す合計４１の脳パンチ（灰白質）は、ＡＡＶｒｈ．１０と比較してＡＡＶ１９９９から有意に高いＧＦＰ発現を示した（図１０Ａ）。全ての試料で、ＡＡＶ１９９９処置ＮＨＰの脳におけるＧＦＰ発現は、ＡＡＶｒｈ．１０処置ＮＨＰと比較して９３％～１２３％高かった（図１０Ｂ）。これは、ヒートマップによって示され、ＡＡＶ１９９９処置ＮＨＰにおける４１のパンチのうち３８のパンチ（３匹のＮＨＰの平均）で、ＡＡＶｒｈ１０処置ＮＨＰと比較して、ＧＦＰ発現の最小１０％の増加を示す（図１１）。ｅＧＦＰの抗体で染色された代表的な一致した脳切片は、ＡＡＶ１９９９処置ＮＨＰで強力な発現を示し、ＡＡＶｒｈ１０と比較して優れた生体分布を示す（図１２）。さらに、ＡＡＶ１９９９処置ＮＨＰの脊髄及びＤＲＧにおけるＧＦＰ発現は、ＡＡＶｒｈ．１０処置ＮＨＰと比較してそれぞれ７９％及び２２％高かった。図１３は、ＮＨＰの脊髄及びＤＲＧにおけるＧＦＰ発現を示す。心臓及び肝臓におけるＡＡＶ１９９９－ＧＦＰ発現は、ＡＡＶｒｈ１０－ＧＦＰ処置ＮＨＰと比較して低かった（図１４）。

【０１４２】

ＡＡＶ１９９９ベクターゲノムロードは、ＡＡＶｒｈ．１０と比較して、脳では１０倍、脊髄では３倍低かった（図１５ａ）。これは、ＧＦＰ発現（ｙ軸）と組織ベクターゲノム（ｘ軸）との間の相関における「左シフト」において顕著であり、ＡＡＶ１９９９（赤色）の相関において左シフトは、ベクターのより高いタンパク質発現及びより低い（約１０倍）組織用量を示す（図１６）。さらに、ＤＲＧ、肝臓、心臓、肺及び腎臓はまた、ＡＡＶｒｈ．１０と比較して低いＡＡＶ１９９９ベクターゲノムを示す（図１５Ｂ）。脾臓は、ＡＡＶｒｈ．１０と比較してより高いＡＡＶ１９９９ベクターゲノムを示す、試験された唯一の組織である（図１５Ｂ）。これらの結果は、ＡＡＶ１９９９がＡＡＶｒｈ．１０より優れており、より低い用量でより広範な生体分布及びより高い導入遺伝子の発現を

もたらすことを示している。

【０１４３】

実施例１１：ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡを使用した神経障害前Ａｒｓａ　ＫＯマウスモデルにおける長期の薬理、有効性及び耐久性試験

この試験は、Ａｒｓａ　ＫＯマウスモデルにおけるＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡの長期の薬理及び有効性を評価するように設計された。試験デザインを表２にまとめる。生後２か月のＡｒｓａ　ＫＯマウスに、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ（ロット番号ＶＰ０９１３２１）を、１マウス当たり１．６ｅ１１ＶＧ（脳重量１ｇｍ当たり３．３ｅ１１ＶＧ）で投与した（両側ＩＣＶ注射；半球当たり４μＬ）。対照として、年齢をマッチさせたＷＴマウス及びＡｒｓａ　ＫＯマウスに製剤緩衝液を注入した。投与後１３か月でマウスを安楽死させ、試料を収集した。

【０１４４】

【表２】

表 2 - *Arsa* KO マウス(2 か月-15 か月)における長期の薬理、有効性及び耐久性試験

| 群 | 数/性別 | 遺伝子型 | 被験物質 | 用量 | 投与レジメン | 時点、試料の収集、分析 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 12 (6M、6F) | WT | 製剤緩衝液 | N/A | 両側 ICV、4ul 各側 | ・ 投与年齢: 2 か月<br>・ 剖検年齢: 15 か月 (13 か月生存)<br>・ 脳、脊髄、DRG、坐骨神経、肝臓、CSF 及び血漿 |
| 2 | 12 (6M、6F) | ARSA$^{-/-}$ | 製剤緩衝液 | N/A | | |
| 3 | 12 (6M、6F) | ARSA$^{-/-}$ | AAV1999-ARSA (ロット番号 VP091321) | 1.6e11VG (3.3e11VG/グラム脳重量) | | |

【０１４５】

ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡＲＳＡ　ＫＯマウスの脳及び脊髄において、強力なｈＡＲＳＡ　ｍＲＮＡ発現が観察された（図１８）。スルファターゼ活性アッセイキット（Ａｂｃａｍ、ａｂ２０４７３１）を使用して、スルファターゼ活性を測定した。ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡを投与したＡｒｓａ　ＫＯマウスは、脳、脊髄、ＤＲＧ及び坐骨神経において、正常（ＷＴに相当）レベルのスルファターゼ活性を示した（図１９）。処置したマウスの肝臓において、ＷＴスルファターゼ活性レベルを超える測定可能な増加が観察された（図１９）。ＭＬＤ患者におけるスルファチドの沈着は、毒性及び神経死を促進する主要な因子である。脱アシル化されたスルファチドであるリソスルファチド（リソＳＴ）は、全ての組織で蓄積し、患者におけるＭＬＤ関連病理の顕著な特徴である。ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡｒｓａ　ＫＯマウスにおいて、脳及び脊髄のリソＳＴレベルは、正常（ＷＴと同様）に戻った（図２０）。リソＳＴレベルの有意な低下は、ＤＲＧ、坐骨神経及び肝臓においても観察されたが、総スルファチドレベルは、処置した動物の血漿及びＣＳＦで有意に減少した（図２０）。脳及び脊髄におけるスルファチドクリアランスの結果、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡｒｓａ　ＫＯマウスは、脳及び脊髄における神経炎症マーカー（Ｇｆａｐ及びＡｉｆ１）及びＬａｍｐ１発現（リソソーム健康マーカー）の有意な改善を示した（図２１）。さらに、緩衝液で処置したＡｒｓａ　ＫＯマウスと比較して、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡｒｓａ　ＫＯにおいては、血漿ＮＦ－Ｌレベルの有意な低下が観察された（図２２）。

【０１４６】

ＭＬＤ患者は、聴覚障害を呈することが多い。聴性脳幹反応（ＡＢＲ）検査は、内耳（蝸牛）及び聴覚の中枢経路に関する機能情報を提供する。ＡＢＲは、蝸牛神経節ニューロ

ンと音刺激に対する中枢聴覚伝導路の核の両方の電気的反応を反映する（Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００６；Ｂｕｒｋａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。　ＡＢＲは、麻酔した動物の頭皮に配置した電極によって記録される。ＡＢＲ閾値は、識別可能な電気反応波を生成し得る最低音圧レベル（ＳＰＬ）を指す。Ａｒｓａ　ＫＯは、時間と共に聴力低下が進行し、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡによる処置で逆転する（図２３）。表現型の部分的な逆転は、投与後４か月の早い時期（投与後試験された最も早い時期）に観察される（図２３）。

【０１４７】

全てのＡｒｓａ　ＫＯマウスの脳（通常、脳幹及び／又は小脳）で、空胞形成及び神経変性が観察された。処置されたマウスでは、１０匹のマウスのうち４匹でのみ組織学的変化が検出され、その重症度は、Ａｒｓａ　ＫＯマウスよりも低かった（図２４Ａ）。全てのＡｒｓａ　ＫＯマウスが、脊髄において軽微な重症度の空胞形成を示したが、ＷＴマウス、又はＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置ＡＲＳＡ　ＫＯマウスでは、変化は検出されなかった（図２４Ｂ）。最後に、いずれの群においても、ＤＲＧで病理学的変化は検出されなかった（ＫＯ＋ＡＡＶ群の１０匹の動物のうちの１匹を除く）（図２４Ｃ）。したがって、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡでＡｒｓａ　ＫＯマウスを処置することにより、脳におけるＭＬＤ関連病理が有意に最小化及び／又は予防され、脊髄におけるＭＬＤ関連病理が予防された。

【０１４８】

実施例１２：ＡＡＶ１９９９を使用した早期神経障害性ＡＲＳＡ　ＫＯマウスモデルにおける長期の薬理、有効性及び耐久性試験

この試験は、Ａｒｓａ　ＫＯモデルにおけるＭＬＤ関連の病理学的及び生化学的表現型のターゲットエンゲージメント及び反転を６か月間にわたって評価するように設計された。早期神経障害（投与時、６か月）が、標的となる患者集団に最も関連するものとして選択された。試験デザインを表３にまとめる。生後６か月のＡｒｓａ　ＫＯマウスに、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ（ロット番号ＶＰ０９１３２１）を、１マウス当たり５ｅ１０ＶＧ（脳重量１ｇｍ当たり１ｅ１１ＶＧ）で投与した（両側ＩＣＶ注射；半球当たり４μＬ）。対照の年齢をマッチさせたＷＴマウス及びＡｒｓａ　ＫＯマウスに製剤緩衝液を注入した。マウスを投与後１、２、３及び６か月で安楽死させ、試料を収集した。

【０１４９】

【表３】

表 3- *Arsa* KO マウスにおける長期の薬理、有効性及び耐久性試験

| 群 | 数/性別 | 遺伝子型 | 被験物質 | 用量 | 投与レジメン | 時点、試料の収集、分析 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 32 (16M、16F) | WT | 製剤緩衝液 | N/A | 両側 ICV、4ul 各側 | ・ 投与年齢: 6 か月<br>・ 剖検年齢: 7 か月 (1 か月生存) 、8 か月 (2 か月生存) 、9 か月(3 か月生存) 、12 か月(6 か月生存)<br>・ 脳、脊髄、DRG, 坐骨神経、肝臓、CSF 及び血漿 |
| 2 | 32 (16M、16F) | *Arsa*$^{-/-}$ | 製剤緩衝液 | N/A | | |
| 3 | 32 (16M、16F) | *Arsa*$^{-/-}$ | AAV1999-ARSA (ロット番号 VP091321) | 5e10VG (1e11VG/グラム 脳重量) | | |

【０１５０】

脳におけるＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡベクターゲノム曝露は、投与後６か月間にわたり一貫した状態を維持した（図２５Ａ）。これは、ＡＲＳＡ媒介スルファターゼ活性の持続

につながり（図２５Ｂ）、投与後１か月でスルファターゼ活性がピークに達した（図２５Ｃ）。各時点で、処置されたマウスは、リソ－、Ｃ１６－及びＣ１８－スルファチドの有意な減少を示した。（図２６Ａ～Ｃ）。重要なことに、クリアランスは進行し、スルファチドレベル（特に、リソＳＴ）は、投与後６か月で正常に戻った（図２６Ｄ～Ｆ）。さらに、ＣＳＦ及び血漿中の総スルファチドレベルは、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置ＡＲＳＡ　ＫＯマウスで有意に低下した（図２７）。最後に、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡを投与後６か月で、血漿Ｎｆ－Ｌレベルの初期増加が、ＫＯ＋ＦＢ群と比較して減少した（図２８）。

【０１５１】

Ａｒｓａ　ＫＯマウスの脳における神経及び好中球の変化を、脳幹及び／又は小脳核で観察した。注目すべきことに、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＡｒｓａ　ＫＯマウスでは、投与後２か月で、これらの変化の発生率及び重症度の低下が観察された（図２９Ａ－Ｂ）。一部のＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置マウスの脳（通常、海馬近傍）で、軽微な重症度の単核細胞の局所的又は多巣性の血管周囲の浸潤が認められた（図２９Ｃ）。また、１群当たり１～２匹の動物で、主に海馬のＣＡ３領域のニューロンの軽微な変性／壊死があった（図２９Ｄ）。

【０１５２】

一部のＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置マウスの後根神経節には、通常軽微な重症度のグリア細胞及び／又は単核細胞の細胞密度の増加が認められ（図３０Ａ）、一部の処置Ａｒｓａ　ＫＯマウスは、神経軸索のわずかな変性を示した（図３０Ｂ－Ｃ）。顕微鏡所見は、全ての群の動物の脊髄において観察され、無作為又は偶発的とみなされた（図３０Ｄ）。大半のＡｒｓａ　ＫＯマウスは、坐骨神経において組織学的変化（非常に軽微な又は軽微な軸索変性）を示し、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置Ａｒｓａ　ＫＯマウスでは、時に、発生率及び重症度が、軽微／軽度、又は軽度、増加した（図３０Ｅ）。ＷＴマウスの坐骨神経もまた、偶発的な軸索変性の稀で非常に軽微なバックグラウンドを有していた（図３０Ｅ）。肝臓では、試験物質の特異的所見は認められなかった。

【０１５３】

まとめると、これらのデータは、ＡＲＳＡ　ＫＯマウスにおけるＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ媒介遺伝子置換が、雄マウス及び雌マウスの両方で同じ程度に忍容性が高く、ＭＬＤ関連表現型が逆転することを示している。

【０１５４】

実施例１３：ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡを評価するＮＨＰ薬理及び用量範囲探索試験

簡潔に記すと、ＡＡＶ１９９９中和抗体に対し血清反応陰性の目的繁殖されたナイーブな雄／雌カニクイザル（カンボジア２～３歳、２．６～３．１ｋｇ）ＮＨＰに、単回直接システルナマグナ（ＩＣＭ）注入によって投与した。投与中、動物をトレンデレンブルグ体位に置いた。投与パラダイムは、０．１２５ｍｌ／分でのＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ（ロット番号ＶＰ０５０３２２）の単回２．５ｍＬ注入、続く、製剤緩衝液２５０μＬによるフラッシュを含む。投与の５週間後、動物を安楽死させ、安全性評価と共に、ベクター生体分布（ｄＰＣＲ）及びｈＡＲＳＡ　ｍＲＮＡ（ＲＴｄＰＣＲ）について試料を評価した。試料は、１９の異なる灰白質領域及び７つの別個の白質領域を表す脳からの６４のパンチ、隣接するＤＲＧを有する脊髄の８切片、末梢神経及び内臓を表す。試験デザインを表４にまとめる。

【０１５５】

【表４】

**表 4 - 試験 CRL.2021-5613: NHP 用量範囲探索試験**

| 群 | 被験物質 | 用量/gm 脳重量 | 用量/動物 | 投与レジメン | 動物数 | 時点、試料の収集、分析 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | AAV1999-ARSA | 1e10 VG | 7.5e11 VG | 投与経路:トレンデレンブルグ体位に置かれた動物で ICM<br><br>投与パラメーター: 2.5ml @0.125mL/分 及び 250ul フラッシュ | 5 (M/F) | 生存: 35 日<br>脳、脊髄、DRG、末梢神経、内臓(剖検時)<br><br>CSF (試験前及び剖検時)<br><br>血漿: 試験前、投与後: 2 日、4 日、7 日、14 日、及び剖検時<br><br>神経学的/行動評価 (投与前、投与 7 日後及び 5 週間後) |
| 2 | | 3.3e10 VG | 2.5e12 VG | | 5 (M/F) | |
| 3 | | 1e11 VG | 7.5e12 VG | | 5 (M/F) | |
| 4 | | 3.3e11 VG | 2.5e13 VG | | 5 (M/F) | |
| 5 | 製剤緩衝液 | n/a | n/a | | 3 (M/F) | |

【０１５６】

ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡベクターの生体分布の用量依存的な増加を、ＩＣＭ投与を用いてＮＨＰ脳において観察し、灰白質領域（１９の固有の脳領域）及び白質領域（７つの固有の脳領域）の両方で観察した（図３１）。ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置はまた、ｈＡＲＳＡ　ｍＲＮＡ（図３２）、並びに２つのトップ用量：７．５ｅ１２ＶＧ（１ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳体重）及び２．５ｅ１３ＶＧ（３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳体重）でのタンパク質（図３３）レベルの広範な用量依存的増加をもたらした７．５ｅ１２ＶＧ（１ｅ１１ＶＧ／ｇｍの脳体重）及び２．５ｅ１３ＶＧ（３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍの脳体重）。脊髄前後軸に沿って、ＤＲＧ及び脊髄において、均一で用量依存的なベクター生体分布及びｈＡＲＳＡ発現が観察された（図３４）。内臓の中で、肝臓、脾臓、及び子宮頸部リンパ節は、用量依存的に増加するベクター生体分布を示す（図３５）。

【０１５７】

ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡの投与がＮＨＰ脳において意味のあるヒトＡＲＳＡ発現をもたらしたかどうかを調べるために、ＡＡＶ由来ヒトＡＲＳＡタンパク質のレベルを評価し、１）内因性カニクイザルｃｙＡＲＳＡタンパク質（同じ試料内で測定された１９の脳領域のｈＡＲＳＡ／ｃｙＡＲＳＡ）、及び２）３歳から８歳の間の７人の健康なヒト臓器ドナーの脳（１２の脳領域）で測定されたヒトＡＲＳＡタンパク質と比較した。１ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳体重及び３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳体重の用量では、脳全体の平均ヒトＡＲＳ

Ａタンパク質レベルは、天然のｃｙＡＲＳＡの約６３％及び約５４６％であった（図３６）。さらに、１ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳体重及び３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳体重の用量では、脳全体の平均ヒトＡＲＳＡタンパク質レベルは、健康な対照臓器ドナー由来のヒトＡＲＳＡタンパク質レベルの約５１％及び約４１６％であった（図３７）。したがって、ＮＨＰにおけるＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置は、１ｅ１１ＶＧ／ｇｍの脳重量及び３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量で、ＣＮＳにおける治療に意味のあるＡＲＳＡタンパク質の発現をもたらす。

【０１５８】

投与前試験と比較して、いずれの投与群においても投与後１週目又は５週目（剖検）のＮＨＰにおいて、臨床的徴候（機能的又は行動的欠陥）は観察されなかった（図３８）。ＣＭ内注入は十分に忍容され；予想されたように、ＩＣＭ処置により、ＣＳＦ　Ｎｆ－Ｌレベルは著しく増加し、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡ処置ＮＨＰでは、製剤緩衝液処置ＮＨＰと比較してさらなる増加が観察された（図３９Ａ）。しかしながら、用量依存的な増加は観察されなかった（図３９Ａ）。血漿サイトカイン濃度の有意な変化は、ＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＮＨＰでは、あらゆる用量で観察されず（図３９Ｂ）、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳｐｏｔによって２つの高用量でＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡで処置したＮＨＰにおけるＡＡＶ１９９９カプシド又はｈＡＲＳＡタンパク質には、細胞性免疫反応は認められなかった（図３９Ｃ）。さらに、剖検時の動物には、試験項目関連の総所見は認められなかった。

【０１５９】

脳脊髄液の変化は、１ｅ１０ＶＧ／ｇｍ脳重量以上のほとんどの動物において、有核細胞数（主に単核細胞）の軽微な増加からなり、用量とは無関係であった。加えて、アルブミン及び／又は総タンパク質は、ベクター投与後５週間で、３．３ｅ１０ＶＧ／ｇｍ脳重量以上のほとんどの動物で増加した。３．３ｅ１０又は３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量の少数の個々の動物は、様々な量の好塩基性～好酸性の粒状物質を有し、神経材料と形態学的に適合していた。これらの変化は、中枢神経系の様々な部分で観察された神経変性及び単核浸潤と相関していた。

【０１６０】

血液学的変化は、１ｅ１０　ＶＧ／ｇｍ脳体重以上のほとんどの雄と、７日目の１Ｅ１１　ＶＧ／ｇｍ脳体重の少数の散発的な雌における網状赤血球数の一時的な軽微な増加であり、少数の個体で同時に赤血球質量パラメータの軽微な減少が見られた。３．３ｅ１０ＶＧ／ｇｍ脳重量の雄及び雌の一部で、好中球、リンパ球及び／又は単球の数の増加に伴う白血球数の増加が見られ、これは３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量が投与された一部の動物（主に、雄）で依然として認められた。凝固又は臨床化学に対する試験物質関連の影響は認められなかった。

【０１６１】

主な試験物質の影響は、神経変性（脳、腰部脊髄及びＤＲＧに影響を及ぼす）、グリア細胞応答の増加（小脳及び脊髄）、神経繊維変性（脊髄の白質及び末梢神経の神経線維に影響を及ぼす）、並びに脳（小脳）、ＤＲＧ及び脊髄に影響を及ぼす単核細胞浸潤（血管周囲分布を含む）から構成された（図４０～４２）。試験物質に関連する所見は、内臓（心臓、肝臓、胆嚢、脾臓、膵臓、副腎、肺、骨、胸骨／骨髄、卵巣、十二指腸、精巣、精巣上体、胸腺、眼、頸部を含む子宮、腎臓）では、全用量で観察されなかった。神経変性（小脳、最高用量での腰部ＤＲＧ）、神経膠症（大脳皮質、小脳、脊髄以外）などのいくつかの場所におけるいくつかの変化、及び単核細胞浸潤（大脳皮質、最高用量での腰部ＤＲＧ）について、最低用量（１ｅ１０ＶＧ／ｇｍ脳重量）と最高用量（３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量）との間で用量反応が認められた図４０～４２）。

【０１６２】

結論として、直接システルナマグナ内（ＩＣＭ）によるＡＡＶ１９９９－ＡＲＳＡの単回投与は、カニクイザル（雄及び雌の両方）において、１ｅ１０、３．３ｅ１０、１Ｅ１１及び３．３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量の投与レベルで十分に忍容され、１Ｅ１１及び３．

３ｅ１１ＶＧ／ｇｍ脳重量は有効な用量とみなされた。

【０１６３】

配列

ＡＲＳＡポリペプチド配列

【化１】

```
         10          20          30          40          50
MGAPRSLLLA LAAGLAVARP PNIVLIFADD LGYGDLGCYG HPSSTTPNLD
         60          70          80          90         100
QLAAGGLRFT DFYVPVSLCT PSRAALLTGR LPVRMGMYPG VLVPSSRGGL
        110         120         130         140         150
PLEEVTVAEV LAARGYLTGM AGKWHLGVGP EGAFLPPHQG FHRFLGIPYS
        160         170         180         190         200
HDQGPCQNLT CFPPATPCDG GCDQGLVPIP LLANLSVEAQ PPWLPGLEAR
        210         220         230         240         250
YMAFAHDLMA DAQRQDRPFF LYYASHHTHY PQFSGQSFAE RSGRGPFGDS
        260         270         280         290         300
LMELDAAVGT LMTAIGDLGL LEETLVIFTA DNGPETMRMS RGGCSGLLRC
        310         320         330         340         350
GKGTTYEGGV REPALAFWPG HIAPGVTHEL ASSLDLLPTL AALAGAPLPN
        360         370         380         390         400
VTLDGFDLSP LLLGTGKSPR QSLFFYPSYP DEVRGVFAVR TGKYKAHFFT
        410         420         430         440         450
QGSAHSDTTA DPACHASSSL TAHEPPLLYD LSKDPGENYN LLGGVAGATP
        460         470         480         490         500
EVLQALKQLQ LLKAQLDAAV TFGPSQVARG EDPALQICCH PGCTPRPACC

HCPDPHA    (配列番号1)
```

コドン最適化ＡＲＳＡＤＮＡ配列（ヒト）

【化２】

ATGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCTCCT
AACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGC
ACCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTC
TGTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCG
TGCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCC
AGAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCT
CCTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGA
CCTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGACTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCC
AATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCAC
GACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACAC
TACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGG
AACTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTG
GTCATCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCT
GAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGAC
ATATTGCCCCTGGCGTGACACACGAACTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGC
TGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAG
AGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGG
ACAGGCAAGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTT
GTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGA
GAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCA
GCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACC
CTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATCCTCAC
GCTTGA　(配列番号2)

**ｒＡＡＶパッケージングのためのプラスミドの完全ＤＮＡ配列；ＡＲＳＡのコード配列に下線を引く**

【化３】

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG
GGGTTCCTTACGTACAATTGGGATCCCGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCA
ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGA
GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATT
TTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT
CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGG
GCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGG
CTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG
CGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGC
CCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCG
GCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTG
CGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGG
CTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC
CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGT
GGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC
GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGG
CGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA
AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGG
TGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCT
CCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGG
TTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCT
ACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCTACGTACCACCA
TGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCTCCTA

【化４】

ACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGCA
CCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTCT
GTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCGT
GCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCCA
GAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCTC
CTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGAC
CTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGACTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCC
AATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCAC
GACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACAC
TACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGG
AACTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTG
GTCATCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCT
GAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGAC
ATATTGCCCCTGGCGTGACACACGAACTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGC
TGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAG
AGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGG
ACAGGCAAGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTT
GTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGA
GAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCA
GCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACC
CTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATCCTCAC
GCTTGAGATTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTC
CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT
TCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG
CGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT
TCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTG
GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTG
GCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC
CAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAG
ACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGATCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
TTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG
AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG
GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTCGAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC
TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAATCGCGACGGCCGACGTCTTT
GTTACAACTTACTATATATATGCACACATATATATATATTTGGGTATATTGGGGGGGTTCTAATTTAAGAA
ATGCATAATTGGCTATAGACAGACAGTTGTCAGAACTTGGCAATGGGTACGTGCAGGTTCATTATACCA
AGTCTACTTGTAGTTGTTCAAAATGTATCATAATACAAGGCCGGGCGAGGTCGTCACGCCTGTAATCCCA
GCATTTTGGGAGGCTAAGGCAGGAGGATTGCTTGAGGTCAGGAGTTTGTGACCAGCCTGGGCAACAGA
GCAAGACCCTGTCTCCAAAAAGAAAAAAAATAATTTTTTACAAAATAAAAACAAAATGTATCATCAGACG
AAATTAAATAAGAGGCAATTCATTGTAATGACAACTTTTCCCAGCTTGACATTTAACAAAAAGTCTAAGT
CCTCTTAATTCATATTTAATGATCAAATATCAAATACTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTC
TCGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCCTGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTT
CACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGACATGCGCCACCACGCCCGGCTAAT

【化５】

TTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGTCTTGAATTTCCCACCTCAGGTGA
TCTGCCTGCCTCAGCCTCACAAAGCAGTAGCTGGGACTACAGGCACCCACCACCACACTTGGTTAATTCT
TTTGTATTTTTTTTGTAAAGACGGGATTTCACCATGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGATCTCATGA
TCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCCCGCCCGGCCATCAAATAC
TAATTCTTAAATGGTAAGGACCCACTATTCAGAACCTGTATCCTTATCACTAATATGCAAATATTTATTGA
ATACTTACTATGTCATGCATACTAGAGAGAGTTAGATAAATTTGATACAGCTACCCTCACAGAACTTACA
GTGTAATAGATGGCATGACATGTACATGAGTAACTGTGAACAGTGTTAAATTGCTATTTAAAAAAAAAG
ACGGCTGGGCGCTGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAAGTTGATCGCTCG
AGGTCAAGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGTAAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAAAA
AATTAGCCAGGCATGGTGGCACAGGCCTGTAATCCCAGCTACTAGGGAGGCTGAGACATGGAGAACTG
CTTGAATCCAGGAGGCAGAGGTTACAGTGAGCCGAGATCATACCACTACACTCCAGCCTGAGTGACAGA
GCGAGACTCCTGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATACAGGTTAAGTGTTATGGTAGTTGAAGAG
AGAACTCAAACTCTGTCTCAGAAGCCTCACTTGCATGTGGACCACTGATATGAAATAATATAAATAGGTA
TAATTCAATAAATAGGAACTTCAGTTTTAATCATCCCAAACACCAAAACTTCCTATCAAACAGGTCCAATA
AACTCAATCTCTATAAGAGCTAGACAGAAATCTACTTGGTGGCCTATAATCTTATTAGCCCTTACTTGTCC
CATCTGATATTAATTAACCCCATCTAATATGGATTAGTTAACAATCCAGTGGCTGCTTTGACAGGAACAG
TTGGAGAGAGTTGGGGATTGCAACATATTCAATTATACAAAAATGCATTCAGCATCTACCTTGATTAAGG
CAGTGTGCAACAGAATTTGCAGGAGAGTAAAAGAATGATTATAAATTTACAACCCTTAAAGAGCTATAG
CTGGGCGTGGTGGCTCATGCCTGTAAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATCACCTGAG
GCCAGAAGTTCAAGACCAGCCTAGCCAACATGGCGAAACCCTGTCTCTACAAAAAATACAAAAATTAGC
CGGGTGTGGTGGCACGTGCCTGTAGTCCCAGTTACTTGGGAGGCCGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACC
TAGGAGGTGGAGGCTGCAGTGAGCCGAGATTGTGCCACTGCACTCCACTTCAGCCTGGGCGACAAGAG
CAAGACTCCGTCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCTAAAATCTAGTGGGAAAGGCATATATACAT
ACAACTAACTGTATAGCATAATAAAGCTCATAATCTGTAACAAAATCTAATTCGACAAGCCCAGAAACTT
GTGATTTACCAAAAACAGTTATATATACACAAAAAGTAAACCTAGAACCCAAAGTTACCCAGCACCAATG
ATTCTCTCCCTAAGCAGTATCAAGTTTAAAGCAGTGATTACATTCTACTGCCTAGATTGTAAACTGAGTAA
AGGAGACCAGCACCTTTCTGCTACTGAACTAGCACAGCCGTGTAAACCAACAAGGCAATGGCAGTGCCC
AACTTTCTGTATGAATATAAGTTACATCTGTTTTATTATTTGTGACTTGGTGTTGCATGTGGTTATTATCAA
CACCTTCTGAAAGAACAACTACCTGCTCAGGCTGCCATAACAAAATACCACAGACTGAGTGACTTAACAG
AAACTTATTTCTCACAGTTTTGGAGGCTGGGAAGTCCAAAATTAAGCTAACTGCAAGGTAGGTTTCAATC
TCAGGCCTCTTCTTTGGCTTGAAGGTCTTCTAACTGTGTGCTCACATGACCTCTTCTAACAAGCTCTCTGG
TGTCTCTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTGAGACAGAGTCTCACTCTGTCACCCAGGCTGGAGTACAGTGGCA
CAATCTGGGCTCACTGCAACCTCCAACTCCCGGGTTCAAGTGATTCTCATGCCTCACCCTCCCGAGTAGCT
TGGATGACAGGAGCCCGCTACCACACCCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGTGTTTCACTACA
TTGGCCAGGCTGGTCTCAAACTCCTGACCTCGTGATCCACCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTA
CAGGTGTGAGCCACTGCGCCCGTCCTGGTGTCTTTTCATATAAGGGCACTAATCCAATCAGACCTGGGCC
CAACCCTCCCGACTTCTTCTAACTGTAATTACCTTCCAAAGGCCCTGTCTCCAAATACCATCACACTGGGG
GTTAGGACTTCAAAAAAGGTATGGGGGGGGTGTGGGAGGACATAAATGCTCAGTCCATAACAAGCACC
CAACATAAAAATGGCTAGAACAGATCACAAAAAAAAGGTCCTGTATGGCTTTGGGGAAGGGCTCAACC
CCAAAATATCTGAAAGCTCTGGAGGGGCCTAGAAGTGGTAAATGAATGAAAACGTGGTTACTCTCCCGA
TCTGCCTTTCCCAAATATGGCCATTCTTGGCTGAATCAGAAATCAAAGGACAGGTTATTAATTACTAGCTC
TAAGTTACTTACCATTTGCTGAGACAGTTCAGAAATCTGACTGCATCTCCTCAGGGATCTAGAACACAGT
TCTCAAATTCTAACTTACTTGTGATATACTTGTGAATGATAAAAATCGCTACAGGTACTTTTATTAATCTG
AAAGAGTATTGAGAAATTACCTTTCATTCTGACTTTTGTCTGGAATGAAAATCAATACTTTTGCTATATTC

【化６】

CATTACTGAAATAATTTTACTTTCCAGTAAAACTGGCATTATAATTTTTTTTAATTTTTAAAACTTCATAATT
TTTTGCCAGACTGACCCATGTAAACATACAAATTACTAATAATTATGCACGTCACATCTGTAATAATGGCC
TTCATGTAAACATTTTTGTGGTTTACACATAAAATCTCTAATTACAAAGCTATATTATCTAAAATTACAGTA
AGCAAGAAAATTAATCCAAGCTAAGACAATACTTGCAACATCAATTCATCATCTGTGACAAGGACTGCTT
AAGTCTCTTTGTGGTTGACGTCATTAATTAACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGT
CGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGC
TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAAGGC
CAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGAC
GAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCT
TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGT
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAG
AACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC
GGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA
GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAG
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA
ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC
TCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGA
GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCA
GCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAG
TCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCA
TTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATC
AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTC
AGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCG
ACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCT
CATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATG
TAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCC
TTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG
AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATAT
TTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAA
TCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCA
TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAA
AGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAA
CGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCT
AGGCGCGCCAACGCGT (配列番号3)

下線付き、コドン最適化 ARSA DNA 配列 (ヒト)

５’ＡＡＶ２　ＩＴＲ　ＤＮＡ配列

【化７】

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG
GGGTTCCT (配列番号4)

反転方向の３’ＡＡＶ２　ＩＴＲ　ＤＮＡ配列

【化８】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG
CAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG
AGTGGCCAA (配列番号5)

ＣＭＶエンハンサーエレメントＤＮＡ配列（ＧｅｎＢａｎｋ：Ｋ０３１０４．１）

【化９】

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
GTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACG
TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA
TGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTAC
ATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG (配列番号6)

ニワトリアクチンプロモーターＤＮＡ配列

【化１０】

TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGC
GGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG
CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGG
CGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCC (配列番号7)

ＷＰＲＥエレメントＤＮＡ配列

【化１１】

TTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACG
CTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCC
TTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT
GCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGAC
TTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGG
GCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCG
CCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGA
CCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTC
GGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG (配列番号8)

ＡＡＶ９カプシドアミノ酸配列（ＶＰ１）

【化１２】

```
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1               5                  10                  15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
            20                  25                  30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
        35                  40                  45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
        115                 120                 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
    210                 215                 220
```

【化１３】

```
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445
```

【化１４】

```
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
    610                 615                 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625                 630                 635                 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
                645                 650                 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
            660                 665                 670
```

【化１５】

```
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
        675                 680                 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
    690                 695                 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705                 710                 715                 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
                725                 730                 735
```

(配列番号9)

**ターゲティングペプチドアミノ酸配列**
**ＫＧＧＧＦＨＧ（配列番号１０）**
**リンカーが隣接したターゲティングペプチドーアミノ酸配列**
**ＡＡＡＫＧＧＧＦＨＧＡＳ（配列番号１１）**
**ＡＡＶ１９９９カプシドアミノ酸配列（ＶＰ１）**
【化１６】

```
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1               5                   10                  15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
            20                  25                  30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
        35                  40                  45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95
```

【化１７】

```
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
        115                 120                 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
    210                 215                 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320
```

【化１８】

```
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540
```

【化１９】

```
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala Lys
            580                 585                 590

Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
        595                 600                 605

Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
    610                 615                 620

Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
625                 630                 635                 640

Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
                645                 650                 655

Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
            660                 665                 670

Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
        675                 680                 685

Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
    690                 695                 700

Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
705                 710                 715                 720

Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
                725                 730                 735

Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
                740                 745
```

(配列番号12)

ＡＡＶ１９９９カプシドアミノ酸配列（ＶＰ２）

【化２０】

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala **Lys**
**Gly Gly Gly Phe His Gly** Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu (配列番号13)

**ＡＡＶ１９９９カプシドアミノ酸配列（ＶＰ３）**

【化２１】

Met Ala Ser Gly Gly Gly
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala **Lys**
**Gly Gly Gly Phe His Gly** Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu （配列番号14）

ベクターの完全ＤＮＡ配列；ＡＲＳＡのコード配列に下線を引く

【化２２】

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG
GGGTTCCTTACGTACAATTGGGATCCCGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCA
ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGA
GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATT
TTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGG
CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT
CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGG
GCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGG
CTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG
CGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGC
CCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCG
GCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTG
CGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGG
CTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC

【化２３】

CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGT
GGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC
GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGG
CGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA
AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGG
TGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCT
CCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGG
TTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCT
ACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCTACGTACCACCA
TGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCTCCTA
ACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGCA
CCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTCT
GTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCGT
GCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCCA
GAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCTC
CTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGAC
CTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGACTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCC
AATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCAC
GACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACAC
TACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGG
AACTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTG
GTCATCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCT
GAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGAC
ATATTGCCCCTGGCGTGACACACGAACTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGC
TGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAG
AGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGG
ACAGGCAAGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTT
GTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGA
GAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCA
GCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACC
CTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATCCTCAC
GCTTGAGATTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTC
CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT
TCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG
CGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT
TCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTG
GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTG
GCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC

10 20 30 40 50

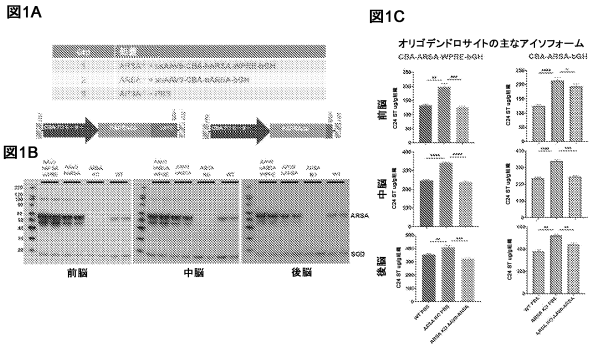
【化２４】

CAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAG
ACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGATCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
TTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG
AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG
GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTCGAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC
TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA (配列番号16)

下線付き、コドン最適化 ARSA DNA 配列 (ヒト)

【図面】

【図１Ａ－１Ｃ】




【図２】

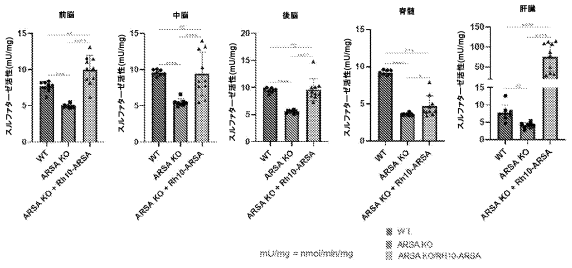



図2

【図３】

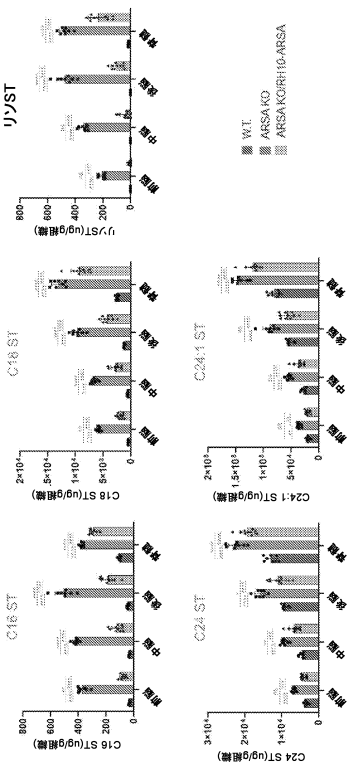



図3

【図４】

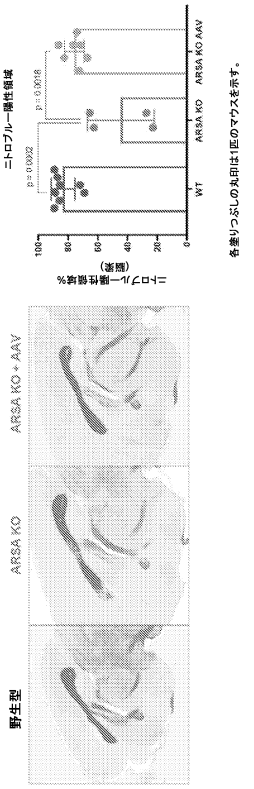



図4

【図５】

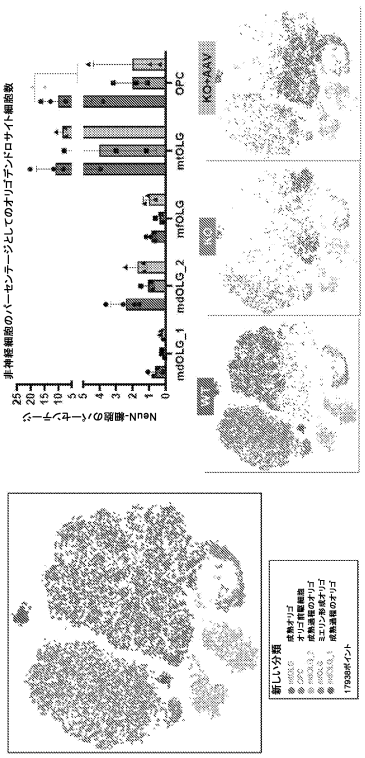



図5

【図６Ａ－６Ｂ】

図6A

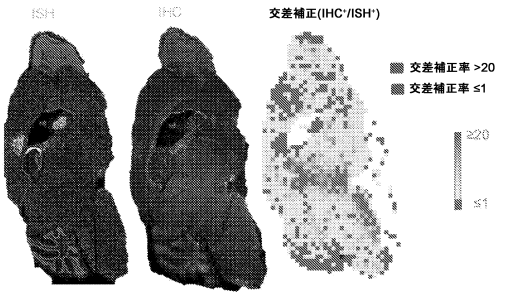
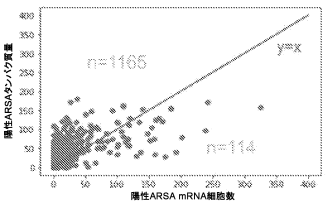



図6B

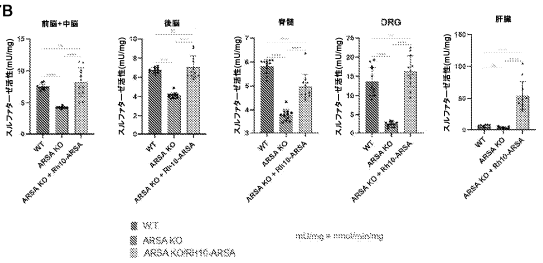


【図７Ａ－７Ｂ】

図7A




図7B




【図８Ａ－８Ｄ】

図8A

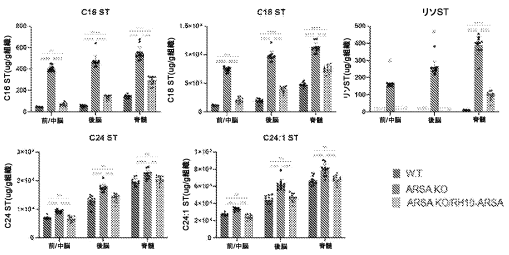



図8B

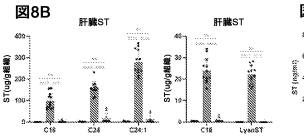



図8C

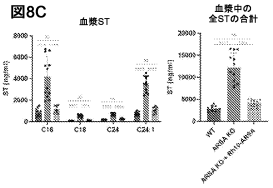
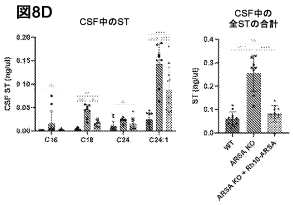



図8D




【図９Ａ－９Ｃ】

図9A

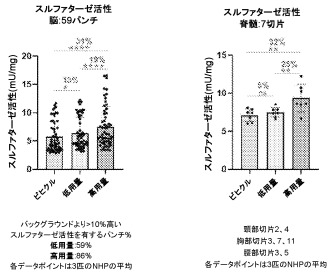
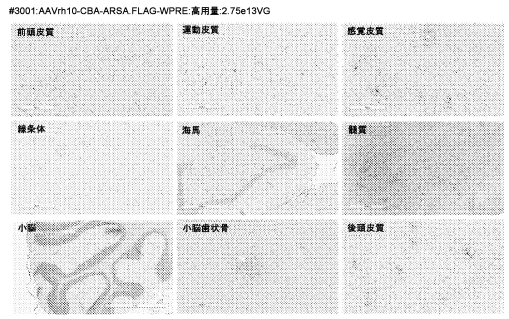



図9B




図9C




【図１０Ａ－１０Ｂ】

図10A

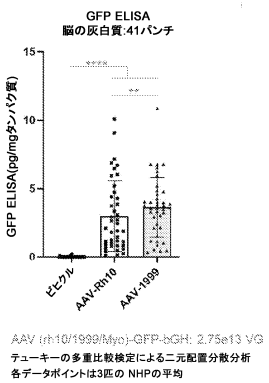
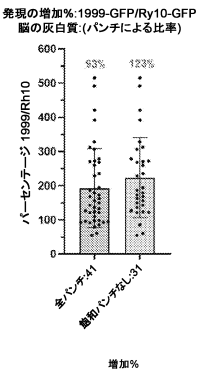



図10B



【図１１】

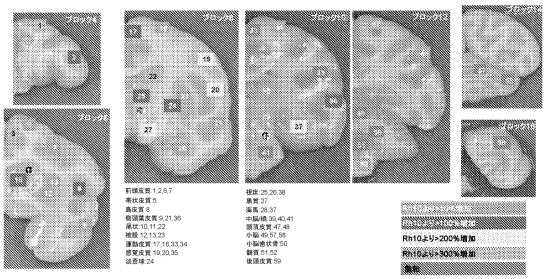



図11

【図１２】

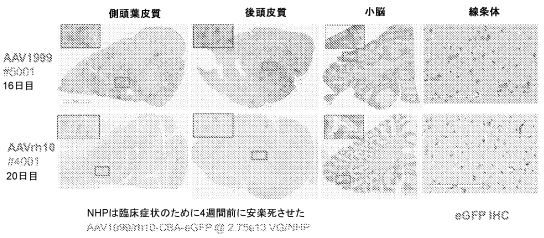



図12

【図１３】

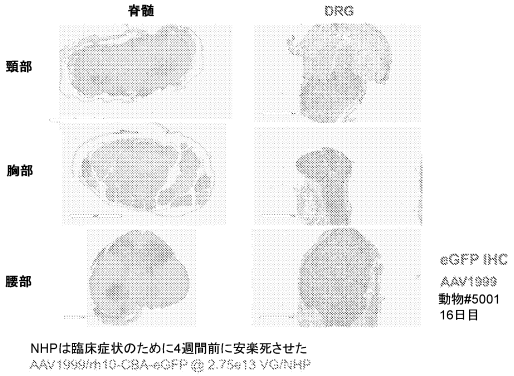



図13

【図１４】

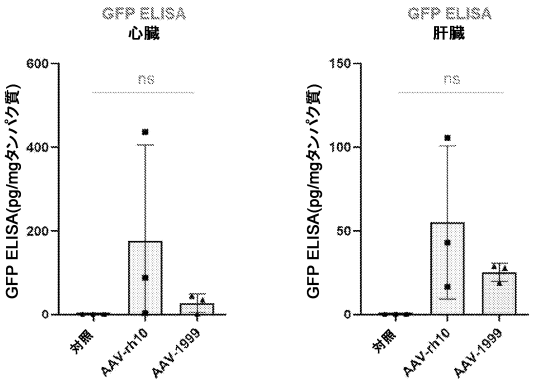



図14

【図１５Ａ－１５Ｂ】

図15A

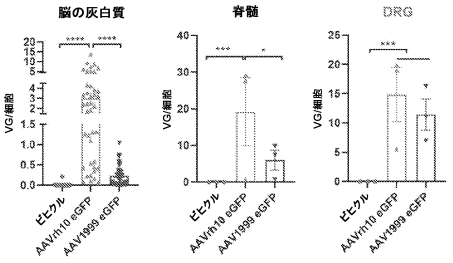
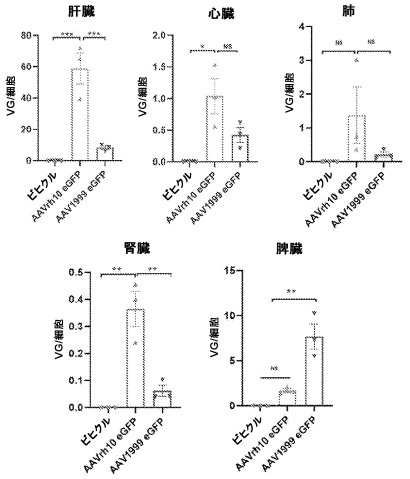



図15B




【図１６】

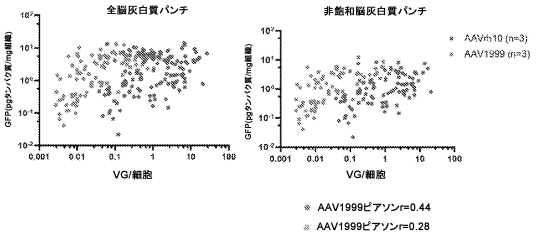



図16

【図１７】



図17

【図１８】

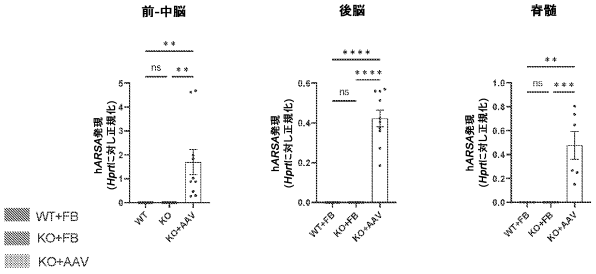



図18

【図１９】

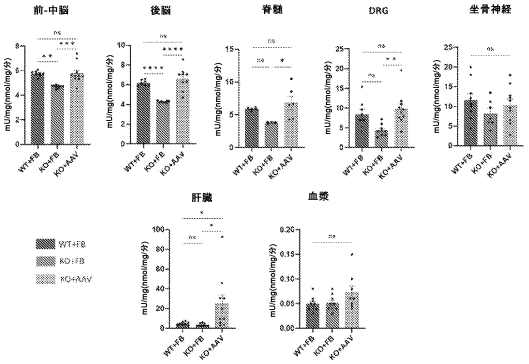



図19

【図２０】

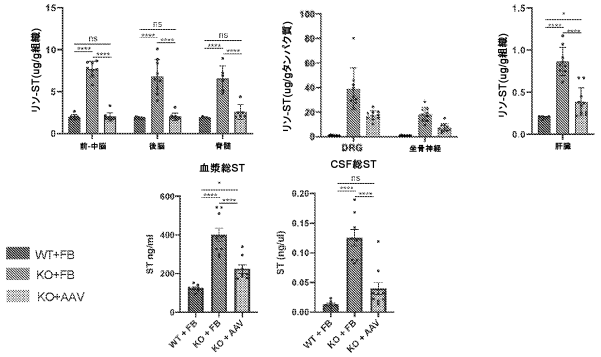



図20

【図２１】

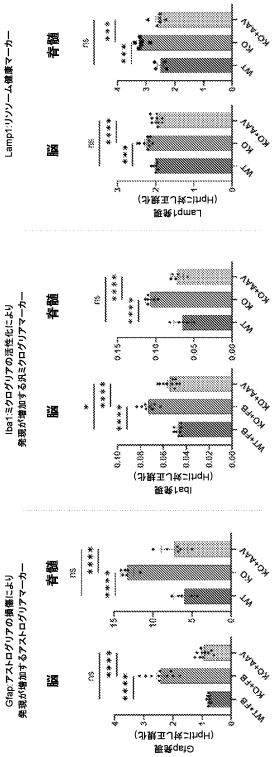



図21

【図２２】

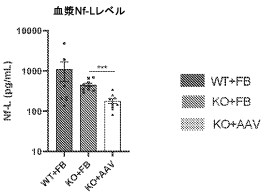



図22

【図２３】

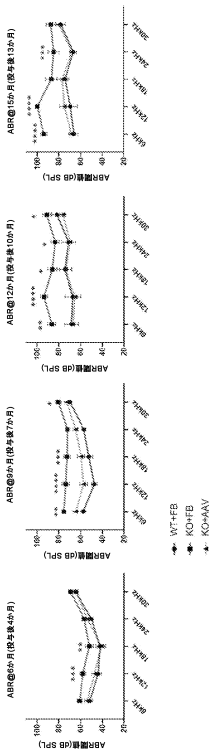
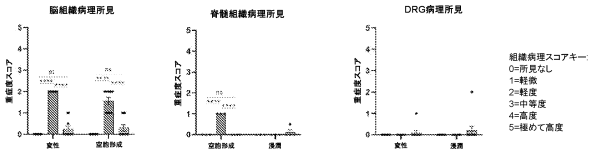



図23

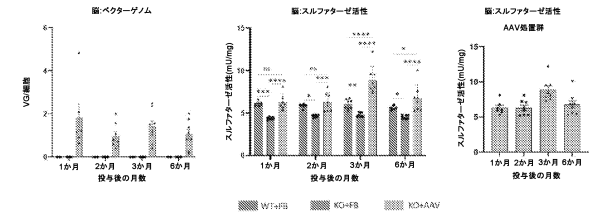
【図２４Ａ－２４Ｃ】

図24A 図24B 図24C




【図２５Ａ－２５Ｃ】

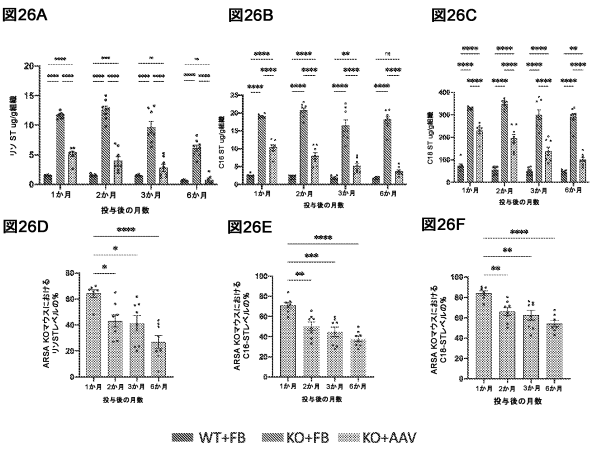
図25A 図25B 図25C




【図２６Ａ－２６Ｆ】

図26A 図26B 図26C

図26D 図26E 図26F



【図２７】

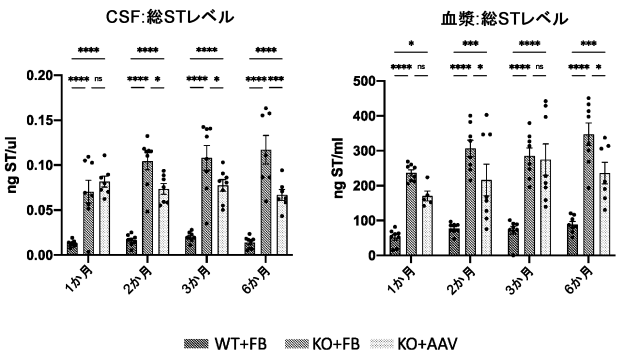



図27

【図２８】

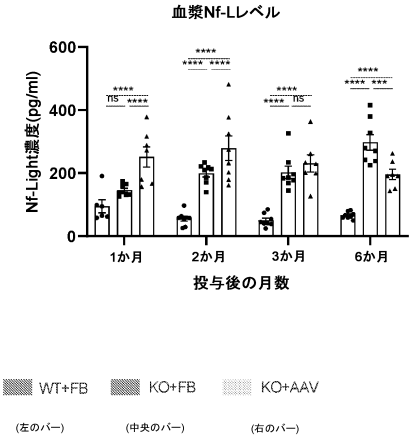
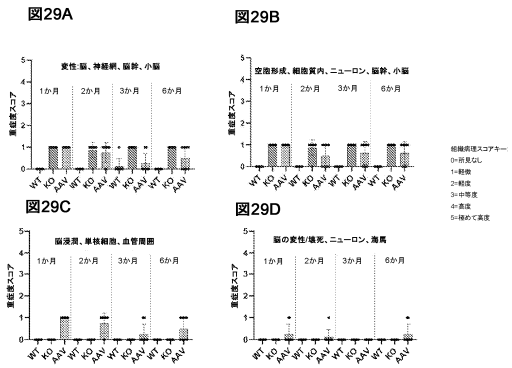
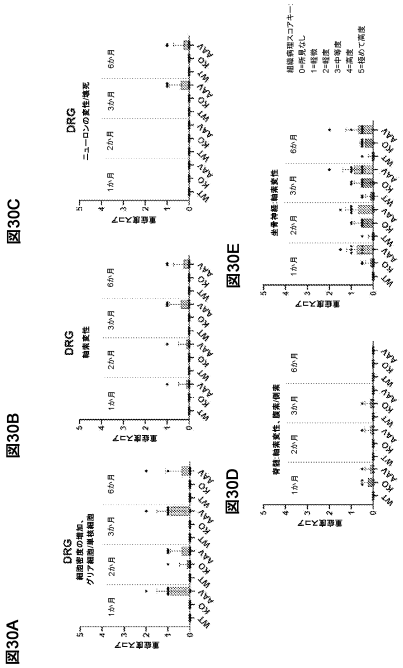



図28

【図２９Ａ－２９Ｄ】




【図３０Ａ－３０Ｅ】



【図３１】

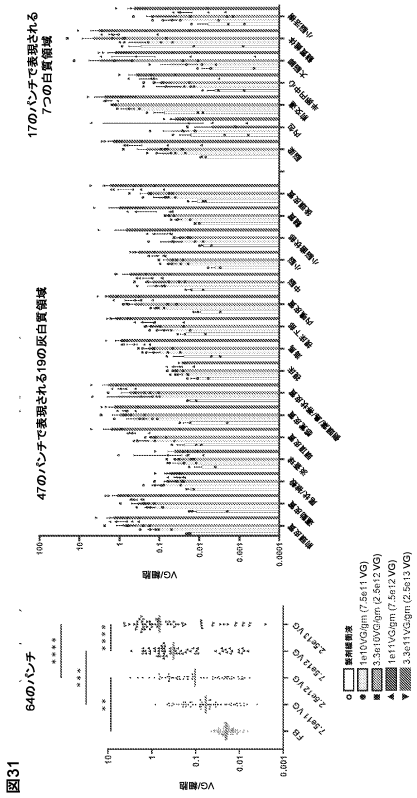



図31

【図３２】

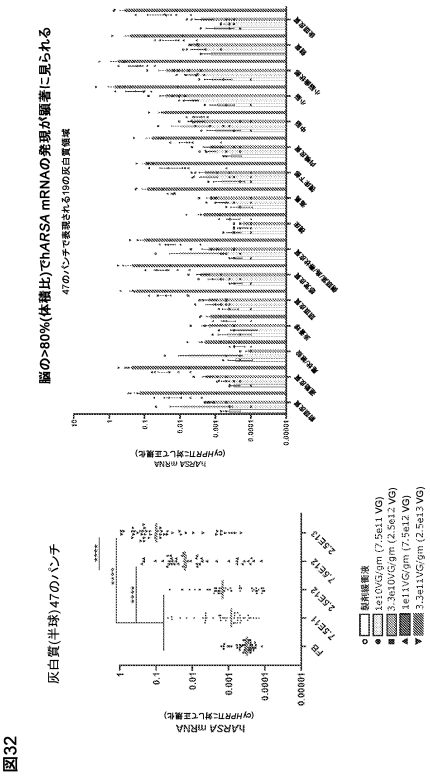
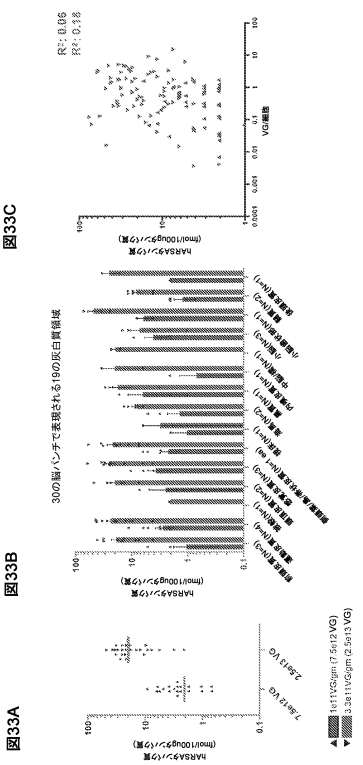
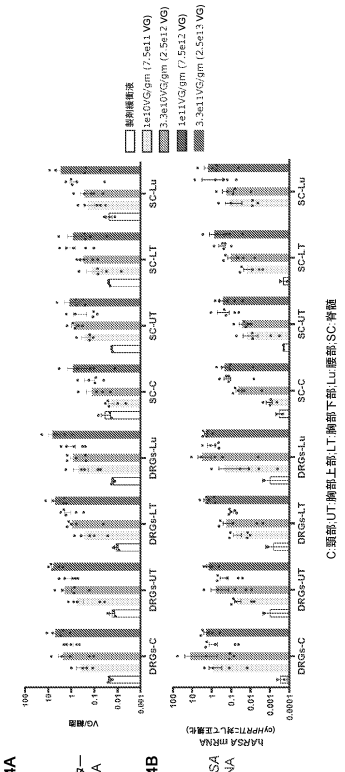



図32

【図３３Ａ－３３Ｃ】




【図３４Ａ－３４Ｂ】



【図３５】

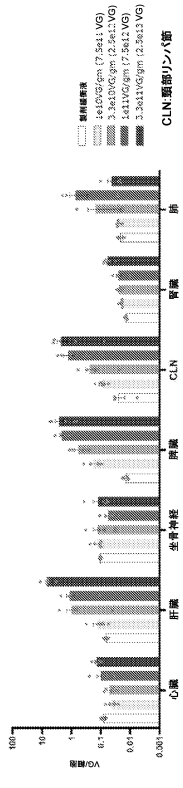



図35

【図３６】

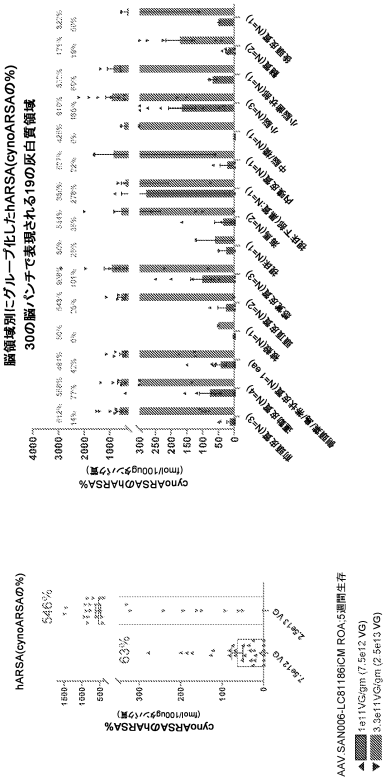
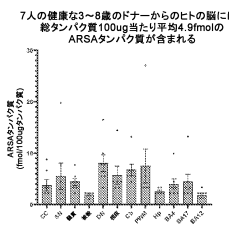



図36

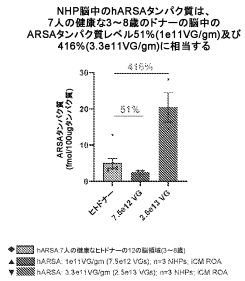
【図３７Ａ－３７Ｂ】

図37A




BA、ブロードマン領野;CC、脳梁;Cb小脳、;DN、歯状核;Hip、海馬;PWM、脳室周囲白質;SN、黒質

図37B




◆ hARSA:7人の健康なヒトドナーの12の脳領域(3～8歳)
▲ hARSA: 1e11VG/gm (7.5e12 VGs); n=3 NHPs; ICM ROA
▼ hARSA: 3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs); n=3 NHPs; ICM ROA

【図３８】

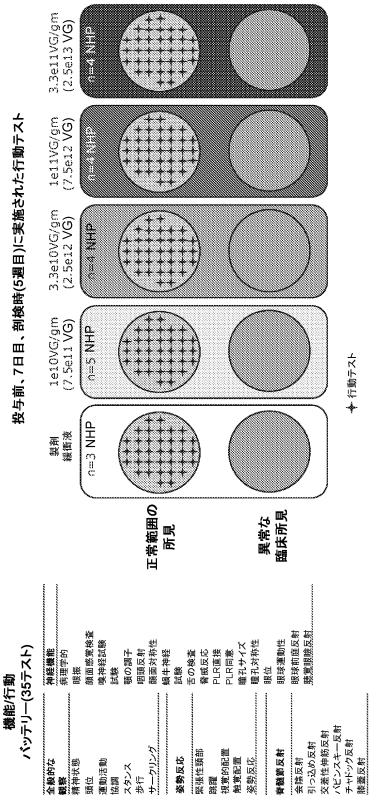
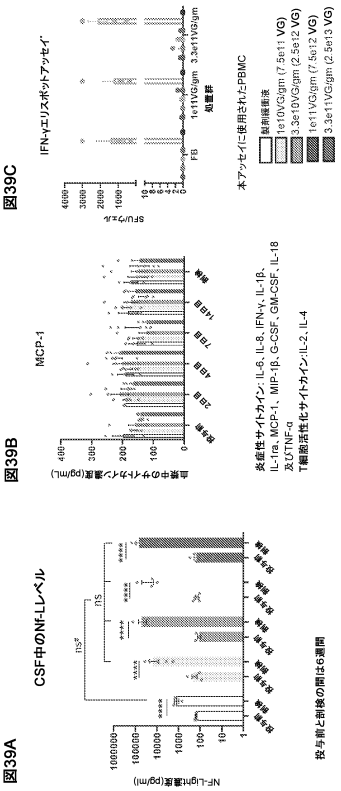
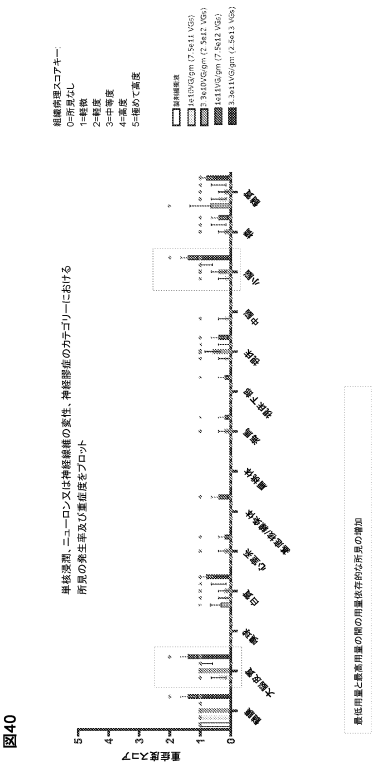



図38

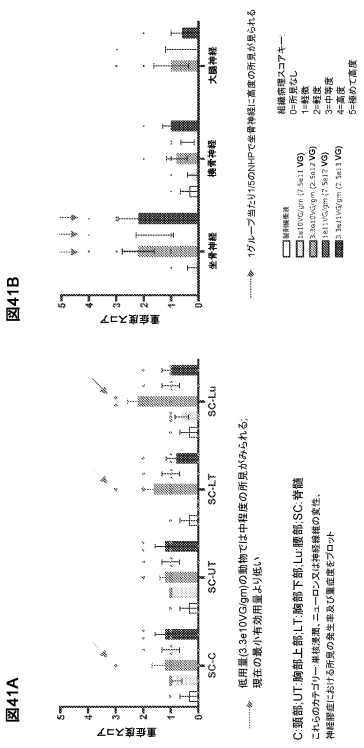
【図３９Ａ－３９Ｃ】



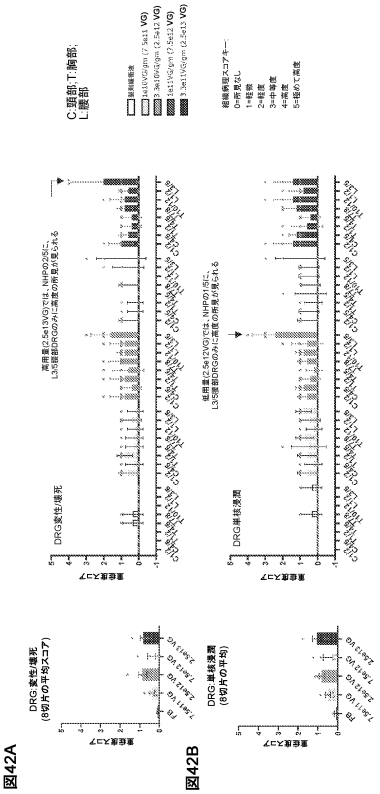

【図４０】




【図４１Ａ－４１Ｂ】




【図４２Ａ－４２Ｂ】



【配列表】
20255211110000001.xml

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US2023/067013

**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. [X] forming part of the international application as filed.

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

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

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

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/067013

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-25, 33-49

**Remark on Protest**

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/067013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/16 A61K38/00 C12N15/864
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K C07K

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | WO 2020/227166 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 12 November 2020 (2020-11-12) See opinion for details | 1-25, 33-49 |
| Y | WO 2021/102234 A1 (CHILDRENS HOSPITAL PHILADELPHIA [US]) 27 May 2021 (2021-05-27) See opinion for details | 1-25, 33-49 |
| Y | WO 2020/251954 A1 (HOMOLOGY MEDICINES INC [US]) 17 December 2020 (2020-12-17) the whole document | 1-25, 33-49 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 1 September 2023 | 02/11/2023 |

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

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/067013

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2020227166 A1 | 12-11-2020 | AR 118850 A1 | 03-11-2021 |
| | | AU 2020270421 A1 | 18-11-2021 |
| | | BR 112021021908 A2 | 01-02-2022 |
| | | CA 3135539 A1 | 12-11-2020 |
| | | CL 2021002881 A1 | 29-07-2022 |
| | | CN 114072129 A | 18-02-2022 |
| | | CO 2021016323 A2 | 10-12-2021 |
| | | EP 3962454 A1 | 09-03-2022 |
| | | IL 287715 A | 01-12-2021 |
| | | JP 2022531861 A | 12-07-2022 |
| | | KR 20220020261 A | 18-02-2022 |
| | | PE 20220930 A1 | 31-05-2022 |
| | | SG 11202111867X A | 29-11-2021 |
| | | TW 202108760 A | 01-03-2021 |
| | | US 2022228170 A1 | 21-07-2022 |
| | | WO 2020227166 A1 | 12-11-2020 |
| WO 2021102234 A1 | 27-05-2021 | AU 2020388404 A1 | 09-06-2022 |
| | | BR 112022009864 A2 | 02-08-2022 |
| | | CA 3159113 A1 | 27-05-2021 |
| | | CN 115023242 A | 06-09-2022 |
| | | CO 2022008507 A2 | 08-07-2022 |
| | | EP 4061427 A1 | 28-09-2022 |
| | | IL 293140 A | 01-07-2022 |
| | | JP 2023503455 A | 30-01-2023 |
| | | KR 20220116459 A | 23-08-2022 |
| | | WO 2021102234 A1 | 27-05-2021 |
| WO 2020251954 A1 | 17-12-2020 | AU 2020292256 A1 | 06-01-2022 |
| | | BR 112021024855 A2 | 03-05-2022 |
| | | CA 3142932 A1 | 17-12-2020 |
| | | CL 2021003295 A1 | 23-09-2022 |
| | | CN 114502575 A | 13-05-2022 |
| | | CO 2021016797 A2 | 17-01-2022 |
| | | EP 3980447 A1 | 13-04-2022 |
| | | IL 288863 A | 01-02-2022 |
| | | JP 2022536338 A | 15-08-2022 |
| | | KR 20220035107 A | 21-03-2022 |
| | | PE 20220233 A1 | 07-02-2022 |
| | | TW 202112807 A | 01-04-2021 |
| | | US 2022204991 A1 | 30-06-2022 |
| | | WO 2020251954 A1 | 17-12-2020 |

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

International Application No. PCT/US2023/067013

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-25, 33-49

AAV9 capsid comprising SEQ. ID. No. 10, vectors composition, kit and methods thereof.

---

2. claim: 26

Plasmid of SEQ. ID. No. 3

---

3. claims: 27-32

ARSA of SEQ. ID. No. 2, vectorsand methods thereof.

---

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *C12N 15/55 (2006.01)* | | C12N | 15/55 | | |
| *C12N 15/864 (2006.01)* | | C12N | 15/864 | １００Ｚ | |
| *C12N 15/62 (2006.01)* | | C12N | 15/62 | Ｚ | |
| *C12N 15/35 (2006.01)* | | C12N | 15/35 | | |
| *C12N 15/67 (2006.01)* | | C12N | 15/67 | Ｚ | |
| *C12N 15/63 (2006.01)* | | C12N | 15/63 | Ｚ | |
| *A61K 38/46 (2006.01)* | | A61K | 38/46 | | |

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＮＯＮＩＤＥＴ

Ｆターム（参考） 14 AC20 BA01 CA31 CA44

4C084 AA02 AA13 BA44 DC22 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA151 ZC191

4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA15 ZC19