(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-553307
(P2022-553307A)
(43)公表日　令和4年12月22日(2022.12.22)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/12	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ　15/864　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	
Ｃ１２Ｎ　7/01　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	7/01		
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	1/15		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全70頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-523408(P2022-523408)
(86)(22)出願日　令和2年10月22日(2020.10.22)
(85)翻訳文提出日　令和4年6月17日(2022.6.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/056860
(87)国際公開番号　WO2021/081201
(87)国際公開日　令和3年4月29日(2021.4.29)
(31)優先権主張番号　62/924,340
(32)優先日　令和1年10月22日(2019.10.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　512075257
アプライド ジェネティック テクノロジーズ コーポレイション
アメリカ合衆国 ３２６１５ フロリダ州，アラチュア，スイート ナンバー１０，エヌダブリュ １１９ティーエイチ テラス １４１９３
(74)代理人　110002572
弁理士法人平木国際特許事務所
(72)発明者　リー，ジュアン
アメリカ合衆国 ３２６１５ フロリダ州，アラチューア，スイート ナンバー１０，エヌダブリュ １１９ティーエイチ テラス １４１９３
(72)発明者　ファリバー，タナズ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　プログラニュリン関連神経変性疾患または障害の治療のためのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）システム

(57)【要約】
本開示は、部分的に、家族性前頭側頭型認知症（FTD）、前頭側頭葉変性症（FTLD）、神経セロイドリポフスチン症（NCL）、またはアルツハイマー病（AD）をはじめとする、認知の乱れ、行動障害、および欠陥型リソソーム蓄積により特徴付けられる神経変性障害に対する組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）に基づく遺伝子療法での使用のための、最適に改変されたプログラニュリン（PGRN）cDNAおよび関連する遺伝的エレメントを提供する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
プログラニュリンをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド。
【請求項２】
前記核酸配列が天然に存在しない配列である、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
【請求項３】
前記核酸配列が哺乳動物プログラニュリンをコードする、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４】
前記哺乳動物プログラニュリンがヒトプログラニュリンである、請求項3に記載のポリヌクレオチド。
【請求項５】
前記核酸が、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14からなる群より選択される配列を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項６】
前記核酸が、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14からなる群より選択される核酸配列に対して少なくとも85％同一である配列を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項７】
前記核酸配列が哺乳動物発現のためにコドン最適化される、請求項1～6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項８】
前記核酸配列がヒト細胞での発現のためにコドン最適化される、請求項7に記載のポリヌクレオチド。
【請求項９】
前記核酸配列がcDNA配列である、請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１０】
前記核酸配列が、機能的に連結された機能上最適化されたN末端シグナル配列をさらに含む、請求項1～9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１１】
前記核酸配列が、機能的に連結されたヘマグルチニンC末端タグをさらに含む、請求項1～10のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１２】
前記核酸配列が、機能的に連結されたソルチリン結合性阻害（SBI）ドメインをさらに含む、請求項1～11のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１３】
前記核酸配列が、機能的に連結されたニューロン特異的ヒトシナプシン-1プロモーター（hSYN1）をさらに含む、請求項1～12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１４】
前記核酸配列が、機能的に連結された遍在的に活性なCBAプロモーターをさらに含む、請求項1～12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１５】
前記プロモーターが、高プログラニュリン発現を駆動するために最適化される、請求項13または14に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１６】
前記核酸配列が、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む機能的に連結された3'UTR調節領域をさらに含む、請求項1～15のいずれか1項に記載

のポリヌクレオチド。
【請求項１７】
前記核酸配列が、機能的に連結されたポリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項1～16のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１８】
前記ポリアデニル化シグナルがSV40ポリアデニル化シグナルである、請求項17に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１９】
前記ポリアデニル化シグナルがヒト成長ホルモン（hGH）ポリアデニル化シグナルである、請求項17に記載のポリヌクレオチド。
【請求項２０】
ポリアデニル化シグナルに機能的に連結されたウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む3'UTR調節領域に機能的に連結された、ニューロン特異的ヒトシナプシン-1プロモーターまたは遍在的に活性なCBAプロモーターに機能的に連結された、ヘマグルチニンC末端タグまたはソルチリン結合性阻害（SBI）ドメインを任意により含む、機能的に連結されたN末端シグナル配列をさらに含む、請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項２１】
請求項1～20のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。
【請求項２２】
哺乳動物細胞である、請求項21に記載の宿主細胞。
【請求項２３】
請求項1～21のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む組み換え単純ヘルペスウイルス（rHSV）。
【請求項２４】
(a) 請求項1～21のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド；および
(b) 最小調節エレメント
を含む導入遺伝子発現カセット。
【請求項２５】
請求項24に記載の発現カセットを含む核酸ベクター。
【請求項２６】
アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項25に記載のベクター。
【請求項２７】
請求項24に記載の導入遺伝子発現カセットを含む宿主細胞。
【請求項２８】
請求項1～21のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【請求項２９】
アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項28に記載のベクター。
【請求項３０】
前記AAVベクターのカプシド配列の血清型およびITRの血清型が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびAAV12からなる群より独立して選択される、請求項29に記載のベクター。
【請求項３１】
請求項1～21のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドおよびAAVゲノムカセットを含む、組み換えアデノ随伴（rAAV）発現ベクター。
【請求項３２】
前記AAVゲノムカセットに2つの配列調節型逆位末端反復が隣接している、請求項31に記載の発現ベクター。
【請求項３３】
ポリアデニル化シグナルに機能的に連結されたウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節

エレメント（ＷＰＲＥ）を含む3'ＵＴＲ調節領域に機能的に連結された、ニューロン特異的ヒトシナプシン-1プロモーターまたは遍在的に活性なＣＢＡプロモーターに機能的に連結された、ヘマグルチニンＣ末端タグまたはソルチリン結合性阻害（ＳＢＩ）ドメインを任意により含む、Ｎ末端シグナル配列に機能的に連結された、請求項１～８のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含む組み換えアデノ随伴（ｒＡＡＶ）発現ベクターであって、

２つの配列調節型逆位末端反復（ＩＴＲ）がＡＡＶゲノムカセットに隣接し、かつタンパク質カプシド変異体をさらに含む、上記発現ベクター。

【請求項３４】

ポリアデニル化シグナルがＳＶ４０またはヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）ポリアデニル化シグナルである、請求項３３に記載の発現ベクター。

【請求項３５】

前記プロモーターが、高プログラニュリン発現を駆動するために最適化される、請求項３３に記載の発現ベクター。

【請求項３６】

前記ｒＡＡＶが、ＡＡＶ-１、ＡＡＶ-２、ＡＡＶ-３、ＡＡＶ-４、ＡＡＶ-５、ＡＡＶ-６、ＡＡＶ-７、ＡＡＶ-８、ＡＡＶ-９、ｒｈ-ＡＡＶ-１０、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、およびＡＡＶ１２からなる群より選択される血清型である、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の発現ベクター。

【請求項３７】

前記ｒＡＡＶが、ＡＡＶ-１、ＡＡＶ-２、ＡＡＶ-３、ＡＡＶ-４、ＡＡＶ-５、ＡＡＶ-６、ＡＡＶ-７、ＡＡＶ-８、ＡＡＶ-９、ｒｈ-ＡＡＶ-１０、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、およびＡＡＶ１２からなる群より選択される血清型の変異体またはハイブリッドである、請求項３６に記載の発現ベクター。

【請求項３８】

前記ｒＡＡＶがＡＡＶビリオン内に含められる、請求項３３～３７のいずれか１項に記載の発現ベクター。

【請求項３９】

請求項３３～３７のいずれか１項に記載の発現ベクターを含む、組み換え単純ヘルペスウイルス（ｒＨＳＶ）。

【請求項４０】

請求項３３～３９のいずれか１項に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項４１】

哺乳動物細胞である、請求項４０に記載の宿主細胞。

【請求項４２】

(a) 請求項１～２１のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド；および

(b) 最小調節エレメント

を含む導入遺伝子発現カセット。

【請求項４３】

請求項４２に記載の発現カセットを含む核酸ベクター。

【請求項４４】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである、請求項４３に記載のベクター。

【請求項４５】

請求項１～２１のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含む組成物。

【請求項４６】

請求項２１に記載の宿主細胞を含む組成物。

【請求項４７】

請求項２３に記載の組み換え単純ヘルペスウイルス（ｒＨＳＶ）を含む組成物。

【請求項４８】

請求項２４に記載の導入遺伝子発現カセットを含む組成物。

【請求項４９】

請求項２５または２６に記載の発現ベクターを含む組成物。

【請求項５０】

医薬組成物である、請求項45～49のいずれか1項に記載の組成物。
【請求項５１】
それを必要とする被験体に請求項1～21のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを投与するステップを含む、神経変性障害を治療または予防する方法。
【請求項５２】
それを必要とする被験体に請求項24に記載の導入遺伝子発現カセットを投与するステップを含む、神経変性障害を治療または予防する方法。
【請求項５３】
それを必要とする被験体に請求項25または26に記載の発現ベクターを投与するステップを含む、神経変性障害を治療または予防する方法。
【請求項５４】
それを必要とする被験体に請求項33～37のいずれか1項に記載の組み換えアデノ随伴（rAAV）発現ベクターを投与するステップを含む、神経変性障害を治療または予防する方法。
【請求項５５】
それを必要とする被験体に請求項1～21のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む組み換えアデノ随伴（rAAV）ウイルス粒子を投与するステップを含む、神経変性障害を治療または予防する方法。
【請求項５６】
前記神経変性障害が、認知の乱れ、行動障害、欠陥型リソソーム蓄積、またはそれらの組み合わせにより特徴付けられる、請求項51～55のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５７】
前記神経変性障害が、プログラニュリン関連神経変性障害である、請求項51～55のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５８】
前記神経変性障害が、家族性前頭側頭型認知症（FTD）、前頭側頭葉変性症（FTLD）、神経セロイドリポフスチン症（NCL）、またはアルツハイマー病（AD）である、請求項51～55のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５９】
前記神経セロイドリポフスチン症（NCL）が11型神経セロイドリポフスチン症（CLN11）である、請求項58に記載の方法。
【請求項６０】
前記投与が中枢神経系に対する、請求項51～55のいずれか1項に記載の方法。
【請求項６１】
前記投与が、静脈内、脳室内、髄腔内、またはそれらの組み合わせである、請求項51～55のいずれか1項に記載の方法。
【請求項６２】
それぞれがプロモーターに機能的に連結されたAAV repおよびAAV cap遺伝子をコードする核酸を含む第1の組み換えヘルペスウイルス、ならびにプログラニュリン遺伝子、および該遺伝子に機能的に連結されたプロモーターを含む第2の組み換えヘルペスウイルスを用いて、細胞の懸濁物を共感染させるステップ；ならびに細胞に組み換えAAVウイルス粒子を産生させて、それにより組み換えAAVウイルス粒子を生成するステップを含む、組み換えAAVウイルス粒子を生成するための方法。
【請求項６３】
前記cap遺伝子が、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、rh-AAV-10、AAV11、およびAAV12からなる群より選択される血清型を有するAAVから選択される、請求項62に記載の方法。
【請求項６４】
前記第1のヘルペスウイルスおよび前記第2のヘルペスウイルスが、サイトメガロウイルス（CMV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）ならびに水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）

およびエプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）からなる群より選択されるウイルスである、請求項６２に記載の方法。

【請求項６５】

前記ヘルペスウイルスが複製欠損型である、請求項６２に記載の方法。

【請求項６６】

前記共感染が同時である、請求項６２に記載の方法。

【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、２０１９年１０月２２日出願の米国特許仮出願第６２/９２４,３４０号の合衆国法典第３５巻第１１９条(ｅ)に基づく利益を主張し、該出願の内容はその全体で参照により本明細書中に組み入れられる。

【０００２】

発明の分野

本発明は、単離されたポリヌクレオチドを被験体または細胞中で発現するためのＡＡＶベクターを含む、遺伝子療法の分野に関する。本開示はまた、該ポリヌクレオチドを含む核酸構築物、プロモーター、ベクター、および宿主細胞、ならびに標的細胞、組織、器官または生物へと外因性ＤＮＡ配列を送達する方法、ならびにプログラニュリン関連神経変性疾患もしくは障害の治療または予防での使用のための方法にも関する。

【背景技術】

【０００３】

遺伝子療法は、遺伝子突然変異または遺伝子発現プロフィールでの異常により引き起こされる後天性疾患のいずれかに罹患した患者に対する臨床的帰結を改善することを目的とする。遺伝子療法は、障害、疾患、悪性腫瘍等をもたらし得る欠陥遺伝子または異常な調節もしくは発現（例えば、過小発現または過剰発現）から生じる医学的状態の治療または予防を含む。例えば、欠陥遺伝子により引き起こされる疾患または障害は、患者への修正的遺伝物質の送達により治療、予防もしくは改善することができるか、または、例えば、患者体内での遺伝物質の治療的発現を生じる患者への修正的遺伝物質を用いて、欠陥遺伝子を変化させるかもしくはサイレンシングすることにより、治療、予防もしくは改善することができるであろう。

【０００４】

遺伝子療法の基礎は、例えば、正の機能獲得作用、負の機能喪失作用、または別の帰結を生じ得る、活性遺伝子産物（一部の場合には、導入遺伝子または治療的核酸と称される）を含む転写カセットを供給することである。そのような帰結は、抗体、機能的酵素、または融合タンパク質などの治療的タンパク質の発現に起因し得る。遺伝子療法はまた、他の因子により引き起こされる疾患または悪性腫瘍を治療するために用いることもできる。ヒトの単一遺伝子障害は、標的細胞への正常遺伝子の送達および発現により治療することができる。患者の標的細胞での修正的遺伝子の送達および発現は、遺伝子操作型ウイルスおよびウイルス遺伝子送達ベクターの使用を含む、多数の方法を介して行なうことができる。

【０００５】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、パルボウイルス科に属し、より具体的にはディペンドパルボウイルス属を構成する。ＡＡＶから誘導されるベクター（すなわち、組み換えＡＡＶ（ｒＡＶＶ）またはＡＡＶベクター）は、遺伝物質を送達するために魅力的であり、その理由は以下の通りである：(ｉ) それらは、筋細胞およびニューロンをはじめとする広範囲の非分裂性および分裂性細胞タイプに感染（形質導入）することができ；(ｉｉ) ウイルス構造遺伝子を欠き、それによりウイルス感染に対する宿主細胞応答（例えば、インターフェロン媒介応答）が軽減され；(ｉｉｉ) 野生型ウイルスはヒトで非病原性であると考えられ；(ｉｖ) 宿主細胞ゲノムへとインテグレーションすることが可能である野生型ＡＡＶと比較し

て、複製欠損型AAVベクターはrep遺伝子を欠損し、かつ一般的にエピソームとして存在し、このことは挿入突然変異または遺伝毒性のリスクを限定し；および(v) 他のベクター系と比較して、AAVベクターは、一般的には比較的弱い免疫源であると考えられ、したがって、顕著な免疫応答を惹起せず（iiを参照されたい）、つまりベクターDNAの存続および、おそらくは、治療的導入遺伝子の長期的発現が得られる。

【０００６】

プログラニュリン（PGRN）は、広範囲に発現される分泌型糖タンパク質であり、神経細胞をはじめとする多数の細胞タイプに対する栄養因子として作用し、炎症を調節し、かつ創傷修復を促進する。PGRNは、発生、創傷治癒、血管新生、神経細胞の増殖および維持、ならびに炎症をはじめとする複数のプロセスの調節に関与する。PGRNは、ニューロンおよびミクログリアで発現され（Petkau et al., Neurol. 2010. 518, 3931-3947）、炎症（Yin et al., J. Exp. Med. 2010. 207, 117-12；Tang et al., Science. 2010; 332, 478-484）、創傷修復（He et al., Nat. Med. 2003. 9, 225-229）、および神経突起伸長（Van Damme et al., J. Cell Biol. 181, 37-41）に関連付けられてきた。ミクログリアでは、プログラニュリンは、構成的に発現され、かつ分泌される。ニューロンでのプログラニュリンは、β-グルコセレブロシダーゼおよびカテプシンDなどのリソソーム酵素の適正な輸送および機能にとって重要である。

【０００７】

ソルチリンは、PGRNに結合し、かつこれをリソソーム分解へと向かわせ、したがってPGRNの細胞外レベルを負に調節する（Hu, F et al. 2010. Neuron 68, 654-667）。このことに合致して、ソルチリンの欠損は、in vivoでのマウスモデルおよびin vitroでのヒト細胞中の両方で、血漿PGRNレベルを顕著に増加させる（Carrasquillo. M. M et al., 2010. Am J Hum Genet 87, 890-897；Lee, W. C et al., 2010. 23, 1467-1478）。ソルチリンの多型は、ヒトでのPGRN血清レベルと強く関連することが示された（Carrasquillo M. et al., 2010. Am J Hum Genet. 10; 87(6):890-7）。（Tanaka et al., Hum Mol Genet. 2017 Mar 1;26(5):969-988；Paushter et al., Acta Neuropathol. 2018 Jul;136(1):1-1；Hu et al., Neuron. 2010 Nov 18;68(4):654-67；Zheng et al., PLoS One. 2011. 6(6):e21023；Nicholson et al., Nat Commun. 2016 Jun 30;7:11992；Zhou et al., J Neurochem. 2017 Oct;143(2):236-243）。

【０００８】

変化したPGRN発現が、複数の神経変性障害で示されており、神経変性疾患の遺伝的病因に対する近年の研究により、PGRN遺伝子中の遺伝性突然変異が、神経生存の低下に起因する成人発症型神経変性障害をもたらし得ることが示されている。完全なPGRN欠損（すなわち、ホモ接合性PGRN突然変異体）および機能喪失突然変異は、限定するものではないが、家族性前頭側頭型認知症（FTD）、および神経変性性リソソーム蓄積症である神経セロイドリポフスチン症（NCL）（11型神経セロイドリポフスチン症（CLN11）を含む）をはじめとする神経変性疾患または障害につながる。前頭側頭型認知症（FTD）は、認知障害および行動障害により特徴付けられる神経変性障害の群を包含する。プログラニュリン（PGRN）のヘテロ接合性突然変異は、家族性FTDを引き起こし、かつ減少したPGRN発現を生じるが、ホモ接合性突然変異は、PGRN発現の完全な欠失を生じ、かつNCLをもたらす。成人発症型CLNとも称されるCLN11は、認知機能低下および最終的な致死など、FTDといくつかの臨床的特徴を共有するが、網膜ジストロフィーを介する進行性の視力低下、発作、小脳性運動失調、および小脳萎縮によっても特徴付けられる。低PGRNは神経炎症を促進し、かつ関節炎およびアテローム性動脈硬化などの末梢炎症状態を強化し、つまり、神経炎症または末梢炎症を特徴とするいかなる障害も、PGRNに対する標的である可能性がある。特に、低PGRNは、統合失調症、双極性障害および精神障害のリスク因子である（Chitramuthu et al., Brain. 2017 Dec 1;140(12):3081-3104）。

【０００９】

FTDは、60歳未満の人々での認知症の一般的な原因である、致死的な変性性脳疾患である。しばしば全盛期にある人々を侵すFTDは、言語および行動を担う領域である脳の前頭部分の進行性変性により特徴付けられる。疾患の経過に従って、FTD患者は、適切に行動し、判断し、コミュニケーションし、かつ日常の活動をこなす能力を失う場合がある。前頭側頭葉変性症（FTLD）とは、FTD症候群を引き起こし得る病理学的診断の集合を意味する。プログラニュリン補充は、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）およびパーキンソン様疾患などの神経変性疾患（Capell et al., 2011；Cenik et al., 2011；Van Kampen et al., 2014；Minami et al., 2015）、急性脳傷害（Tao et al., 2012；Egashira et al., 2013；Jackman et al., 2013；Kanazawa et al., 2015；Zhao and Bateman, 2015；Altmann et al., 2016b；Xie et al., 2016）をはじめとする、複数の疾患状態を治療するために用いることができる。さらに、プログラニュリンは、多数の末梢状態、特に、重要な炎症性成分を有するものに対する治療標的として示唆されてきた（He et al., 2003；Sfikakis and Tsokos, 2011；Guo et al., 2012；Jian et al., 2013；Choi et al., 2014；Huang et al., 2015；Zhou et al., 2015a）。ハプロ不全につながるPGRNでのヘテロ接合性突然変異は、家族性FTDの約20％の原因である（The Association for Frontotemporal Degenerationウェブサイト(2019)；Petkau & Leavitt Trends in Neurosci. 2014 37(7): 388-98）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Petkau et al., Neurol. 2010. 518, 3931-3947
【非特許文献２】Yin et al., J. Exp. Med. 2010. 207, 117-12
【非特許文献３】Tang et al., Science. 2010; 332, 478-484
【非特許文献４】He et al., Nat. Med. 2003. 9, 225-229
【非特許文献５】Van Damme et al., J. Cell Biol. 181, 37-41
【非特許文献６】Hu, F et al. 2010. Neuron 68, 654-667
【非特許文献７】Carrasquillo. M. M et al., 2010. Am J Hum Genet 87, 890-897
【非特許文献８】Lee, W. C et al., 2010. 23, 1467-1478
【非特許文献９】Tanaka et al., Hum Mol Genet. 2017 Mar 1;26(5):969-988
【非特許文献１０】Paushter et al., Acta Neuropathol. 2018 Jul;136(1):1-1
【非特許文献１１】Zheng et al., PLoS One. 2011. 6(6):e21023
【非特許文献１２】Nicholson et al., Nat Commun. 2016 Jun 30;7:11992
【非特許文献１３】Zhou et al., J Neurochem. 2017 Oct;143(2):236-243
【非特許文献１４】Chitramuthu et al., Brain. 2017 Dec 1;140(12):3081-3104
【非特許文献１５】Capell et al., 2011
【非特許文献１６】Cenik et al., 2011
【非特許文献１７】Van Kampen et al., 2014
【非特許文献１８】Minami et al., 2015
【非特許文献１９】Tao et al., 2012
【非特許文献２０】Egashira et al., 2013
【非特許文献２１】Jackman et al., 2013
【非特許文献２２】Kanazawa et al., 2015
【非特許文献２３】Zhao and Bateman, 2015
【非特許文献２４】Altmann et al., 2016b
【非特許文献２５】Xie et al., 2016
【非特許文献２６】Sfikakis and Tsokos, 2011
【非特許文献２７】Guo et al., 2012
【非特許文献２８】Jian et al., 2013
【非特許文献２９】Choi et al., 2014

【非特許文献３０】Huang et al., 2015
【非特許文献３１】Zhou et al., 2015a
【非特許文献３２】The Association for Frontotemporal Degenerationウェブサイト(2019)
【非特許文献３３】Petkau & Leavitt Trends in Neurosci. 2014 37(7): 388-98
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１１】
神経変性障害は、高齢化社会での重大な社会的および経済的課題を代表する。認知症スペクトラムに対する有病率および発生率に関して、FTDはアルツハイマー病に次いで第2位であるにもかかわらず、現在、FTDに対して承認された治療または治療法はない。神経変性障害の現行の治療は、一般的に、症状の進行を遅らせ、かつ患者をより快適にするための医師による努力を含み、かつ大多数の治療は、神経学的機能低下の進行を隠すだけである。現在、神経変性疾患または障害に対する臨床的開発中であるプログラニュリン遺伝子療法はない。つまり、神経変性疾患または障害の治療のための方法および組成物に対する必要性が残っている。
【課題を解決するための手段】
【００１２】
本開示は、それを通じてプログラニュリン（PGRN）突然変異に関連する神経変性障害に罹患した患者へのCNS標的化送達のためにプログラニュリン発現カセットをパッケージングすることができる、組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターに関する。
【００１３】
一態様に従えば、本開示は、プログラニュリンをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、天然に存在しない配列である。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、哺乳動物プログラニュリンをコードする。一部の実施形態に従えば、哺乳動物プログラニュリンは、ヒトプログラニュリンである。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14からなる群より選択される配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14からなる群より選択される核酸配列に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも90％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも95％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも96％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも97％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも98％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも99％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号5からなる。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも90％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも95％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも96％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも97％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも98％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも99％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号6からなる。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも9

0％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも95％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも96％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも97％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも98％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも99％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号7からなる。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対して少なくとも90％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対して少なくとも95％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対して少なくとも96％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対して少なくとも97％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対して少なくとも98％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対して少なくとも99％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号8からなる。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号9に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号9に対して少なくとも90％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号9に対して少なくとも95％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号9に対して少なくとも96％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号9に対して少なくとも97％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号9に対して少なくとも98％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号9に対して少なくとも99％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号9からなる。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号10に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号10に対して少なくとも90％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号10に対して少なくとも95％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号10に対して少なくとも96％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号10に対して少なくとも97％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号10に対して少なくとも98％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号10に対して少なくとも99％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号10からなる。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号11に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号11に対して少なくとも90％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号11に対して少なくとも95％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号11に対して少なくとも96％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号11に対して少なくとも97％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号11に対して少なくとも98％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号11に対して少なくとも99％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号11からなる。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号12に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号12に対して少なくとも90％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号12に対して少なくとも95％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号12に対して少なくとも96％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号12に対して少なくとも97％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号12に対して少なくとも98％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号12に対して少なくとも99％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号12からなる。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号13に対して少なくとも85％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号13に

対して少なくとも９０％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３に対して少なくとも９５％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３に対して少なくとも９６％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３に対して少なくとも９７％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３に対して少なくとも９８％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３に対して少なくとも９９％同一である配列を含む。一部の実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３からなる。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、哺乳動物発現のためのコドン最適化される。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、ヒト細胞での発現のためにコドン最適化される。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、ｃＤＮＡ配列である。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、機能的に連結された、機能上最適化されたＮ末端シグナル配列をさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、機能的に連結されたヘマグルチニンＣ末端タグをさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、機能的に連結されたソルチリン結合性阻害（ＳＢＩ）ドメインをさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、機能的に連結されたニューロン特異的ヒトシナプシン１プロモーター（ｈＳＹＮ１）をさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、機能的に連結された遍在的に活性なＣＢＡプロモーターをさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、マウスカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII（ＣａＭＫII）プロモーターをさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、ラットチューブリンα１（Ｔａ１）プロモーターをさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、ラットニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモーターをさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、ヒト血小板由来増殖因子β鎖（ＰＤＧＦ）プロモーターをさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、ＥＦ１αプロモーターをさらに含む。一部の実施形態に従えば、本明細書中の態様および実施形態に記載されるプロモーターのうちのいずれかは、プロモーター配列の５'（上流）に位置する追加のＣＡＧ/ＣＭＶエンハンサーエレメントをさらに含むことができる。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、高プログラニュリン発現を駆動するために最適化される。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、機能的に連結された、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を含む３'ＵＴＲ調節領域をさらに含む。一部の実施形態に従えば、核酸配列は、機能的に連結されたポリアデニル化シグナルをさらに含む。一部の実施形態に従えば、ポリアデニル化シグナルは、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルである。一部の実施形態に従えば、ポリアデニル化シグナルは、ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）ポリアデニル化シグナルである。一部の実施形態に従えば、ポリヌクレオチドは、ポリアデニル化シグナルに機能的に連結された、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を含む３'ＵＴＲ調節領域に機能的に連結された、追加の５'ＣＡＧ/ＣＭＶエンハンサーエレメントをさらに含む、ニューロン特異的ヒトシナプシン-１プロモーター、マウスカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII（ＣａＭＫII）プロモーター、ラットチューブリンα１（Ｔａ１）プロモーター、ラットニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモーター、ヒト血小板由来増殖因子β鎖（ＰＤＧＦ）プロモーター、もしくは遍在的に活性なＣＢＡプロモーター、遍在的に活性なＥＦ１αプロモーター、または本明細書中の態様もしくは実施形態のうちのいずれかに示されるプロモーターのうちのいずれかに機能的に連結された、任意によりヘマグルチニンＣ末端タグまたはソルチリン結合性阻害（ＳＢＩ）ドメインを含む、機能的に連結されたＮ末端シグナル配列をさらに含む。

【００１４】

一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。一部の実施形態に従えば、宿主細胞は哺乳動物細胞である。

【００１５】

一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチドを含む組み換え単純ヘルペスウイルス（ｒＨＳＶ）を提供する。

【００１６】

一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれか1つのポリヌクレオチド、および最小調節エレメントを含む、導入遺伝子発現カセットを提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、請求項24に記載の発現カセットを含む核酸ベクターを提供する。一部の実施形態に従えば、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの導入遺伝子発現カセットを含む宿主細胞を提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様および実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。一部の実施形態に従えば、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。一部の実施形態に従えば、該AAVベクターのカプシド配列の血清型およびITRの血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびAAV12からなる群より独立して選択される。

【００１７】

一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様および実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチド、およびAAVゲノムカセットを含む、組み換えアデノ随伴（rAAV）発現ベクターを提供する。一部の実施形態に従えば、AAVゲノムカセットには、2つの配列調節型逆位末端反復が隣接する。

【００１８】

一部の実施形態に従えば、本開示は、ポリアデニル化シグナルに機能的に連結された、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む3'UTR調節領域に機能的に連結された、追加の5'CAG/CMVエンハンサーエレメントをさらに含む、ニューロン特異的ヒトシナプシン-1（hSYN）プロモーター、マウスカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII（CaMKII）プロモーター、ラットチューブリンα1（Ta1）プロモーター、ラットニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター、ヒト血小板由来増殖因子β鎖（PDGF）プロモーター、もしくは遍在的に活性なCBAプロモーター、遍在的に活性なEF1αプロモーター、または本明細書中の態様もしくは実施形態のうちのいずれかに示されるプロモーターのうちのいずれかに機能的に連結された、任意によりヘマグルチニンC末端タグまたはソルチリン結合性阻害（SBI）ドメインを含む、N末端シグナル配列に機能的に連結された、本明細書中の態様および実施形態のうちのいずれか1つのポリヌクレオチドを含む組み換えアデノ随伴（rAAV）発現ベクターを提供し、このとき、2つの配列調節型逆位末端反復（ITR）がAAVゲノムカセットに隣接し、タンパク質カプシド変異体をさらに含む。一部の実施形態に従えば、ポリアデニル化シグナルは、SV40またはヒト成長ホルモン（hGH）ポリアデニル化シグナルである。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、高プログラニュリン発現を駆動するために最適化される。一部の実施形態に従えば、rAAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AA-9、rhAAV10（AAVrh10とも称される）、AAV10、AAV11、およびAAV12からなる群より選択される血清型である。一部の実施形態に従えば、rAAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、rh-AAV10、AAV10、AAV11、およびAAV12からなる群より選択される血清型の変異体またはハイブリッドである。一部の実施形態に従えば、rAAVは、AAVビリオン内に含まれる。

【００１９】

一部の態様に従えば、本開示は、AAVrh10-hSYN-PGRNwtを含む発現ベクターを含む。

【００２０】

一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの発現ベクターを含む組み換え単純ヘルペスウイルス（rHSV）を提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様および実施形態のうちのいずれかの発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。一部の実施形態に従えば、宿主細胞は哺乳動物細胞である。

【００２１】
一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様および実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチド、および最小調節エレメントを含む、導入遺伝子発現カセットを提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの発現カセットを含む核酸ベクターを提供する。一部の実施形態に従えば、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである。
【００２２】
一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの宿主細胞を含む組成物を提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの組み換え単純ヘルペスウイルス（ｒＨＳＶ）を含む組成物を提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの導入遺伝子発現カセットを含む組成物を提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの発現ベクターを含む組成物を提供する。一部の実施形態に従えば、組成物は医薬組成物である。
【００２３】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチドを投与するステップを含む、神経変性障害を治療する方法を提供する。
【００２４】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの導入遺伝子発現カセットを投与するステップを含む、神経変性障害を治療する方法を提供する。
【００２５】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの発現ベクターを投与するステップを含む、神経変性障害を治療する方法を提供する。
【００２６】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの組み換えアデノ随伴（ｒＡＡＶ）発現ベクターを投与するステップを含む、神経変性障害を治療する方法を提供する。
【００２７】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチドを投与するステップを含む、神経変性障害を予防する方法を提供する。
【００２８】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの導入遺伝子発現カセットを投与するステップを含む、神経変性障害を予防する方法を提供する。
【００２９】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの発現ベクターを投与するステップを含む、神経変性障害を予防する方法を提供する。
【００３０】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかの組み換えアデノ随伴（ｒＡＡＶ）発現ベクターを投与するステップを含む、神経変性障害を予防する方法を提供する。
【００３１】
一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様また

は実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチドを含む組み換えアデノ随伴（rAAV）ウイルス粒子を投与するステップを含む、神経変性障害を治療する方法を提供する。一部の実施形態に従えば、本開示は、それを必要とする被験体に本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかのポリヌクレオチドを含む組み換えアデノ随伴（rAAV）ウイルス粒子を投与するステップを含む、神経変性障害を予防する方法を提供する。一部の実施形態に従えば、神経変性障害は、認知の乱れ、行動障害、欠陥型リソソーム蓄積、またはそれらの組み合わせにより特徴付けられる。一部の実施形態に従えば、神経変性障害は、プログラニュリン関連神経変性障害である。一部の実施形態に従えば、神経変性障害は、家族性前頭側頭型認知症（FTD）、前頭側頭葉変性症（FTLD）、神経セロイドリポフスチン症（NCL）、またはアルツハイマー病（AD）である。一部の実施形態に従えば、神経セロイドリポフスチン症（NCL）は、11型神経セロイドリポフスチン症（CLN11）である。一部の実施形態に従えば、投与は、中枢神経系に対する。一部の実施形態に従えば、投与は、静脈内、脳室内、髄腔内、またはそれらの組み合わせである。

【００３２】

一態様に従えば、本開示は、それぞれがプロモーターに機能的に連結されたAAV repおよびAAV cap遺伝子をコードする核酸を含む第1の組み換えヘルペスウイルス、ならびにプログラニュリン遺伝子、および該遺伝子に機能的に連結されたプロモーターを含む第2の組み換えヘルペスウイルスを用いて、細胞の懸濁物を共感染させるステップ；ならびに細胞に組み換えAAVウイルス粒子を産生させて、それにより組み換えAAVウイルス粒子を生成するステップを含む、組み換えAAVウイルス粒子を生成するための方法を提供する。一部の実施形態に従えば、cap遺伝子は、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、rh-AAV-10、AAV11、およびAAV12からなる群より選択される血清型を有するAAVから選択される。一部の実施形態に従えば、第1のヘルペスウイルスおよび第2のヘルペスウイルスは、サイトメガロウイルス（CMV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）ならびに水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）およびエプスタイン・バーウイルス（EBV）からなる群より選択されるウイルスである。一部の実施形態に従えば、ヘルペスウイルスは、複製欠損型である。一部の実施形態に従えば、共感染は、同時である。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

【図１】両端の逆位末端反復（ITR）、ヒトシナプシン1（hSYN1）またはニワトリβアクチン（CBA）プロモーター、任意によりC末端HAタグまたはC末端の3～16個の核酸の欠失を含むPGRN、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHP）転写後調節エレメント（WPRE）、SV40初期ポリアデニル化シグナル（SV40pA）および任意によりスタッファーDNAを含むPGRN構築物の模式図を示す図である。下側パネルは、自己相補的AAVゲノムの模式図を示す。

【図２】ニワトリβアクチン（CBA）プロモーターの核酸配列（配列番号1）を示す図である。

【図３】ヒトシナプシン1（hSYN1）プロモーターの核酸配列（配列番号2）を示す図である。

【図４】一本鎖（ss）および自己相補的（self-complimentary）（sc）AAVゲノムのための5'-3'逆位末端反復（ITR）（配列番号3）を示す図である。

【図５】図5Aは、一本鎖（ss）AAVゲノムのみのための3'-5'ITR（配列番号4）を示す図である。図5Bは、自己相補的（sc）AAVゲノムのみのための3'-5'TRS（配列番号26）を示す図である。TRSとは、短縮型ITRを意味する。

【図６】野生型ヒトプログラニュリン（hPGRNwt）の核酸配列（配列番号5）を示す図である。

【図７】野生型マウスプログラニュリン（mPGRNwt）の核酸配列（配列番号6）を示す図である。mPGRNwtは、hPGRNに対して78％類似である。

【図８】マカク（アカゲザル（Macaca mulatta））の核酸配列（配列番号7）を示す

図である。マカクPGRNは、hPGRNに対して96％類似である。
【図９】hPGRNcoAの核酸配列（配列番号8）を示す図である。
【図１０】hPGRNcoBの核酸配列（配列番号9）を示す図である。
【図１１】hPGRNcoCの核酸配列（配列番号10）を示す図である。
【図１２】hPGRNcoDの核酸配列（配列番号11）を示す図である。
【図１３】hPGRNcoEの核酸配列（配列番号12）を示す図である。
【図１４】hPGRNcoFの核酸配列（配列番号13）を示す図である。
【図１５】hPGRNソルチリン結合性欠損型変異体の核酸配列（配列番号14）を示す図である。
【図１６】ヘマグルチニン（HA）タグの核酸配列（配列番号15）を示す図である。
【図１７】WPREの核酸配列（配列番号16）を示す図である。
【図１８】SV40 pAの核酸配列（配列番号17）を示す図である。
【図１９】GenBank AJ222796、nuc 7625-7988からの配列に対応する、CaMKIIプロモーター（364bp）の核酸配列（配列番号18）を示す図である。
【図２０】ラットチューブリンα1（Ta1）プロモーター（1034bp）の核酸配列（配列番号19）を示す図である。
【図２１】ラットニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター（1801bp）の核酸配列（配列番号20）を示す図である。
【図２２】ヒト血小板由来増殖因子β鎖（PDGF-B）プロモーターの核酸配列（配列番号21（PDGFB_1）、配列番号24（PDG-B_2）および配列番号25（PDGFB_3））を示す図である。ヒトゲノム中には、染色体NC_000022.11の[-]鎖の39244982位～39244621位にわたる3種類の規定されたPDGF-Bプロモーターがある。PDGF-Bプロモーターの配列は、提供される3つのコアプロモーター配列のうち、最小で1つまたはそれらのいずれかの固有の組み合わせを含む。散在配列は、まったく配列ではない場合を含む、いずれかの非コード非調節機能性配列であり得る。
【図２３】EF1αプロモーター（806bp）の核酸配列（配列番号22）を示す図である。
【図２４】CAG/CMVエンハンサーの核酸配列（配列番号23）を示す図である。
【図２５】髄腔内注入後に非ヒト霊長類でGFPレポーターの発現について試験された、rAAVrh10、AAV9、ΔHSmaxおよびAAV2tyfカプシドの結果を要約する図である。脳の様々な領域でのGFP陽性細胞率（％）およびGFP強度が示される。
【図２６】大槽内注入（ICM）による非ヒト霊長類でのrAAVrh10生体内分布の結果を要約する図である。
【図２７】HEK293細胞およびSH-SY5Y細胞でのGFP発現に対するCBAプロモーターまたはhSYNプロモーターの作用を試験する実験の結果を表わすグラフを示す図である。
【図２８】AD5ベクターを用いる場合および用いない場合の、HEK293細胞およびSHSY-5Y細胞でのrAAVRh10-CBA-hGFP形質導入後のGFP発現を表わすグラフを示す図である。
【図２９】野生型と比較した、6種類のPGRNコドン最適化型変異体（coA～coFと指定される）のタンパク質発現を測定するためのELISA実験の結果を示す図である。
【図３０】野生型と比較した、6種類のPGRNコドン最適化型変異体（coA～coFと指定される）のタンパク質発現を測定するためのウエスタンブロット実験の結果を示す図である。
【図３１】HEK293細胞でのプログラニュリン発現に対するhSYNプロモーターの制御下でのコドン最適化型変異体coE（PGRNcoE）およびcoF（PGRNcoF）の作用の試験結果を表わすグラフを示す図である。
【図３２】プログラニュリン発現を確認するためのウエスタンブロット実験の結果を示す図である。
【図３３】野生型と比較した、6種類のPGRNコドン最適化型変異体（coA～coFと指定される）のタンパク質発現を測定するためのELISA実験の結果を示す図である。
【図３４】rAAVRh10-hSYN-PGRNwtを用いたNHPでのin vivo研究での8週間およ

び10週間後に測定されたプログラニュリン発現を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００３４】
定義
そうでないと定義されない限り、本明細書中で用いられるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解される意味を有する。以下の参考文献は、本発明中で用いられる用語のうちの多数の一般的定義を、当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994)；The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988)；The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)；およびHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書中で用いる場合、以下の用語は、特に明記しない限り、下記でそれらのものとされる意味を有する。
【００３５】
冠詞「a」および「an」は、該冠詞の文法的目的語のうちの1つまたは2つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を意味するために本明細書中で用いられる。例えば、「an element」とは、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。
【００３６】
用語「が挙げられる」（including）は、語句「限定するものではないが～が挙げられる」を意味するために本明細書中で用いられ、かつこの語句と相互に交換可能に用いられる。
【００３７】
用語「または」は、文脈がそうでないことを明らかに示さない限り、用語「および/または」を意味するために用いられ、かつこの用語と相互に交換可能に用いられる。
【００３８】
用語「など」（such as）は、語句「限定するものではないが、～など」を意味するために本明細書中で用いられ、かつこの語句と相互に交換可能に用いられる。
【００３９】
本明細書中で用いる場合、「投与する」、「投与すること」、「投与」等は、生物学的作用が望まれる部位への治療剤または医薬組成物の送達を可能にするために用いられる方法を意味することが意図される。
【００４０】
本明細書中で用いる場合、用語「AAVビリオン」とは、例えば、AAVカプシドタンパク質へとパッケージングされた一本鎖ゲノムDNAを含む野生型AAVビリオン粒子などの、完全ウイルス粒子を広く意味することが意図される。一本鎖核酸分子は、両方の鎖が等しく感染性である場合、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかである。用語「rAAVウイルス粒子」とは、組み換えAAVウイルス粒子、すなわち、感染性であるが複製欠損型である粒子を意味する。rAAVウイルス粒子は、AAVカプシドタンパク質へとパッケージングされた一本鎖ゲノムDNAを含む。
【００４１】
本明細書中で用いる場合、用語「バイオリアクター」とは、細胞を培養する目的のために用いることができるいずれかの装置を広く意味することが意図される。
【００４２】
本明細書中で用いる場合、用語「担体」とは、いずれかおよびすべての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング剤、希釈剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁液、コロイドなどを含むことを意味する。製薬上活性な物質に対するそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。補助的有効成分もまた、組成物中に組み込むことができる。語句「製薬上許容される」とは、宿主に投与される際に、毒性、アレルギー性、または同様の有害な反応を生じない、分子実体および組成物を意味する。

【００４３】
本明細書中で用いる場合、用語「隣接する」（flanking）とは、別の核酸配列に対する、ある核酸配列の相対的位置を意味する。一般的に、配列ABCの中では、BにはAおよびCが隣接している。配置AxBxCについても同じことが言える。つまり、隣接配列は、隣接される配列に先立つかまたはその後に続くが、隣接される配列に連続的である必要、またはすぐに隣り合っている必要はない。
【００４４】
本明細書中で用いる場合、用語「遺伝子送達」とは、外来性DNAが、遺伝子療法の適用のために宿主細胞に移入されるプロセスを意味する。
【００４５】
本明細書中で用いる場合、用語「遺伝子」または「コード配列」とは、タンパク質をコードするDNA領域（転写される領域）を広く意味することが意図される。コード配列は、プロモーターなどの適切な調節領域の制御下に置かれる場合に、転写（DNA）およびポリペプチドへと翻訳（RNA）される。遺伝子は、プロモーター、5'リーダー配列、コード配列およびポリアデニル化部位を含む3'非翻訳配列などの、数個の機能的に連結された断片を含むことができる。語句「遺伝子の発現」とは、遺伝子がRNAへと転写され、かつ/または活性タンパク質へと翻訳されるプロセスを意味する。
【００４６】
本明細書中で用いる場合、用語「対象となる遺伝子（GOI）」とは、本明細書中で用いる場合、AAV発現ベクターへと導入される異種配列を広く意味し、かつ典型的には、ヒトまたは動物での治療的用途のタンパク質をコードする核酸配列を意味する。
【００４７】
本明細書中で用いる場合、用語「ヘルペスウイルス」または「ヘルペスウイルス科」とは、比較的大きなゲノムを有するエンベロープ型二本鎖DNAウイルスの一般的な科を広く意味することが意図される。この科は、広範囲の脊椎動物および無脊椎動物宿主の、好ましい実施形態では哺乳動物宿主の、例えば、ヒト、ウマ、畜牛、マウス、およびブタの核で、複製する。ヘルペスウイルス科の例示的メンバーとしては、サイトメガロウイルス（CMV）、1型および2型単純ヘルペスウイルス（HSV1およびHSV2）ならびに水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）およびエプスタイン・バーウイルス（EBV）が挙げられる。
【００４８】
本明細書中で用いる場合、用語「異種」とは、比較される対象であるかまたは誘導されるかもしくは組み込まれる対象である実体の残りの部分とは遺伝子型が異なる実体に由来することを意味する。例えば、異なる細胞タイプへと遺伝子操作技術により導入されるポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（かつ、発現される場合には、異種ポリペプチドをコードし得る）。同様に、ウイルスベクターへと組み込まれる細胞性配列（例えば、遺伝子またはその一部分）は、ベクターに対しては異種ヌクレオチド配列である。
【００４９】
本明細書中で用いる場合、用語「増加する」、「強化する」、「上昇する」（および類似の用語）とは、一般的に、天然の、予測された、もしくは平均に対する、または対照状態に対する、濃度、レベル、機能、活性、または挙動の、直接的または間接的な、増加の作用を意味する。
【００５０】
本明細書中で用いる場合、用語「感染」とは、ウイルスによる細胞への異種DNAの送達を広く意味することが意図される。用語「共感染」とは、本明細書中で用いる場合、2種類以上のウイルスを用いる「同時感染」、「二重感染」「多重感染」または「連続感染」を意味する。2種類（以上）のウイルスを用いるプロデューサー細胞の感染は、「共感染」と称されるであろう。用語「トランスフェクション」とは、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、または当技術分野で周知の他の方法によって細胞へと移入される、物理的または化学的方法によって細胞へと異種DNA（プラスミドDNAなど）を送達するプロセスを意味する。

【００５１】
本明細書中で用いる場合、「逆位末端反復」または「ITR」配列とは、反対向きである、ウイルスゲノムの末端に見出される比較的短い配列を意味することが意図される。「AAV逆位末端反復（ITR）」配列は、当技術分野で十分に理解される用語であり、生来型一本鎖AAVゲノムの両端に存在する約145ヌクレオチドの配列である。ITRの最も外側のヌクレオチドは、2つの選択的な向きのうちのいずれかで存在することができ、これにより、異なるAAVゲノム間、および単一のAAVゲノムの2つの末端の間での、不均一性がもたらされる。
【００５２】
「野生型ITR」、「WT-ITR」または「ITR」とは、AAVまたは、例えば、Rep結合活性およびRepニック化能力を保持する他のディペンドウイルス（dependovirus）中に天然に存在するITR配列の配列を意味する。いずれかのAAV血清型に由来するWT-ITRのヌクレオチド配列は、遺伝的コードの縮重またはドリフトに起因して、カノニカルな天然に存在する配列とは若干異なる場合があり、したがって、本明細書中での使用のために包含されるWT-ITR配列は、生成プロセス中に生じる天然に存在する変化（例えば、複製エラー）の結果としてのWT-ITR配列を含む。
【００５３】
本明細書中で用いる場合、用語「末端反復」または「TR」は、いずれかのウイルス末端反復または少なくとも1箇所の最小必須複製起点および回文ヘアピン構造を含む領域を含む合成配列を含む。Rep結合性配列（「RBS」）（RBE（Rep結合性エレメント）とも称される）および末端分離部位（「TRS」）は一緒になって、「最小必須複製起点」を構成し、つまり、TRは少なくとも1箇所のRBSおよび少なくとも1箇所のTRSを含む。ポリヌクレオチド配列の所与のストレッチ内での互いに逆向きの相補体であるTRは、典型的には、それぞれ「逆位末端反復」または「ITR」と称される。ウイルスの文脈では、ITRは、複製、ウイルスパッケージング、インテグレーションおよびプロウイルスレスキューを媒介する。
【００５４】
用語「in vivo」とは、多細胞動物などの生物中または生物内で起きるアッセイまたはプロセスを意味する。本明細書中に記載される態様のうちの一部では、細菌などの単細胞生物が用いられる場合、方法または使用が「in vivo」で起こると言われ得る。用語「ex vivo」とは、多細胞動物または植物の身体の外側である無傷の膜を有する生存細胞、例えば、外植片、初代細胞および細胞株、形質転換された細胞株をはじめとする培養細胞、ならびに抽出された組織または細胞（とりわけ、血液細胞を含む）を用いて行なわれる方法および使用を意味する。用語「in vitro」とは、細胞抽出物などの、無傷の膜を有する細胞の存在を必要としないアッセイおよび方法を意味し、かつ細胞または細胞系を含まない媒体（細胞抽出物など）などの非細胞系中のプログラム可能な合成的な生物学的回路の導入を指すことができる。
【００５５】
本明細書中で用いる場合、用語「単離された」分子（例えば、単離された核酸またはタンパク質または細胞）とは、それが特定されており、かつその天然の環境の構成要素から分離および/または回収されていることを意味する。
【００５６】
本明細書中で用いる場合、「最小調節エレメント」とは、標的細胞中の遺伝子の有効な発現のために必要であり、かつ、したがって、導入遺伝子発現カセット中に含めるべき調節エレメントを意味することが意図される。そのような配列としては、例えば、プロモーターまたはエンハンサー配列、プラスミドベクター内でのDNA断片の挿入を促進するポリリンカー配列、ならびにmRNA転写産物のイントロンスプライシングおよびポリアデニル化を担う配列が挙げられる。
【００５７】
本明細書中で用いる場合、用語「最小化する」、「低減させる」、「減少させる」、お

よび/または「阻害する」（および類似の用語）とは、一般的に、天然の、予測された、もしくは平均に対する、または対照状態に対する、濃度、レベル、機能、活性、または挙動の、直接的または間接的な、減少の作用を意味する。

【００５８】

本明細書中で用いる場合、用語「神経系」は、中枢神経系および末梢神経系の両方を含む。用語「中枢神経系」または「CNS」は、脊椎動物の脳および脊髄のすべての細胞および組織を含む。用語「末梢神経系」とは、脳および脊髄の外側の神経系の一部分のすべての細胞および組織を意味する。つまり、用語「神経系」としては、限定するものではないが、神経細胞、グリア細胞、星状膠細胞、脳脊髄液（CSF）中の細胞、間質腔中の細胞、脊髄の保護被覆部中の細胞、硬膜外細胞（すなわち、硬膜の外側の細胞）、神経組織に隣接するかまたは接触するかまたはそれにより神経支配されている非神経組織中の細胞、神経上膜、神経周膜、神経内膜、神経索、神経束などが挙げられる。

【００５９】

本明細書中で用いる場合、用語「天然に存在しない」とは、天然には存在しないタンパク質、核酸、リボ核酸、またはウイルスを広く意味することが意図される。例えば、遺伝子改変された変異体、例えば、cDNAまたはコドン最適化型核酸であり得る。

【００６０】

本明細書中で用いる場合、「核酸」または「核酸分子」とは、例えば、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）などの、単量体ヌクレオチドの鎖から構成される分子を意味することが意図される。核酸は、例えば、プロモーター、PGRN遺伝子もしくはその一部分、または調節エレメントをコードすることができる。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得る。「PGRN核酸」とは、PGRN遺伝子もしくはその一部分、またはPGRN遺伝子の機能的変異体もしくはその一部分を含む核酸を意味する。遺伝子の機能的変異体としては、例えば、サイレント突然変異、単一ヌクレオチド多型、ミスセンス突然変異、および遺伝子機能を顕著に変化させない他の突然変異または欠失などの、重大でない変異を有する遺伝子の変異体が挙げられる。

【００６１】

DNA鎖およびRNA鎖の非対称的な末端は5'（ファイブプライム）末端および3'（スリープライム）末端と称され、5'末端は末端リン酸基を有し、かつ3'末端は末端ヒドロキシル基を有する。ファイブプライム（5'）末端は、その末端に、デオキシリボースまたはリボースの糖環中の5番目の炭素を有する。核酸は、5'から3'方向にin vivoで合成され、なぜなら、新たな鎖を組み立てるために用いられるポリメラーゼは、ホスホジエステル結合を介して、3'-ヒドロキシル（-OH）基へとそれぞれの新たなヌクレオチドを連結させるからである。

【００６２】

本明細書中で用いる場合、用語「核酸構築物」とは、天然に存在する遺伝子から単離されているか、またはそうでなければ天然に存在しないであろう様式で核酸のセグメントを含むために改変されているか、または合成である、一本鎖または二本鎖のいずれかである核酸分子を指す。核酸構築物との用語は、核酸構築物が本開示のコード配列の発現のために必要である制御配列を含む場合、用語「発現カセット」と同義である。

【００６３】

特定のPGRNタンパク質（その断片および一部分を含む）を「コードする」DNA配列は、特定のRNAおよび/またはタンパク質へと転写される核酸配列である。DNAポリヌクレオチドは、タンパク質へと翻訳されるRNA（mRNA）をコードすることができるか、またはDNAポリヌクレオチドは、タンパク質へと翻訳されないRNA（例えば、tRNA、rRNA、またはDNA標的化RNA；「非コード」RNAまたは「ncRNA」とも称される）をコードすることができる。

【００６４】

本明細書中で用いる場合、用語「作動可能に連結された」または「機能的に連結された」または「カップリングされた」とは、遺伝的エレメントの並置を意味することができ、

このとき、エレメント同士は、予測される様式でそれらが作動することを許容する関係にある。例えば、プロモーターがコード配列の転写の開始を助ける場合、プロモーターは、コード領域に作動可能に連結されていることができる。この機能的関係が維持される限り、プロモーターとコード領域との間に挟まれた残基があり得る。

【００６５】

本明細書中で用いる場合、参照ポリペプチドまたは核酸配列に対する「配列同一性パーセント（％）」は、配列をアライメントするステップ、および、必要な場合に、最大の配列同一性パーセントを達成するためにギャップを導入するステップの後での、かついかなる保存的置換も配列同一性の一部分と見なさない、参照ポリペプチドまたは核酸配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドと同一である、候補配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドの割合（％）として定義される。アミノ酸または核酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、例えば、公衆に利用可能なコンピューターソフトウェアプログラム（例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Ausubel et al., eds., 1987）の補遺30、7.7.18節、Table 7.7.1に記載されるもの、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアを含む）を用いて、当技術分野での技能の範囲内である様々な様式で達成できる。アライメントプログラムの例は、ALIGN Plus（Scientific and Educational Software, Pennsylvania）である。当業者は、比較対象の配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するために必要ないずれかのアルゴリズムをはじめとする、アライメントを測定するための適切なパラメーターを決定することができる。本明細書中の目的のために、所与のアミノ酸配列Bに対する、配列Bとの、または配列Bに対抗した、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性％（所与のアミノ酸配列Bに対する、配列Bとの、または配列Bに対抗した、ある値のアミノ酸配列同一性％を有するかまたは含む所与のアミノ酸配列Aと代替的に表現することができる）は、以下の通りに算出される：分数X/Yの100倍であって、Xは、AおよびBのプログラムによるアライメント中での配列アライメントプログラムによって同一マッチとスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bのアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性％は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性％とは等しくないであろうことが理解されるで
あろう。本明細書中の目的のために、所与の核酸配列Dに対する、配列Dとの、または配列Dに対抗した、所与の核酸配列Cの核酸配列同一性％（所与の核酸配列Dに対する、配列Dとの、または配列Dに対抗した、ある値の核酸配列同一性％を有するかまたは含む所与の核酸配列Cと代替的に表現することができる）は、以下の通りに算出される：分数W/Zの100倍であって、Wは、CおよびDのプログラムによるアライメント中での配列アライメントプログラムによって同一マッチとスコア付けされたヌクレオチドの数であり、Zは、Dのヌクレオチドの総数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さと等しくない場合、Dに対するCの核酸配列同一性％は、Cに対するDの核酸配列同一性％とは等しくないであろうことが理解されるであろう。

【００６６】

本明細書中で用いる場合、用語「医薬組成物」または「組成物」とは、限定するものではないが、担体、安定化剤、希釈剤、分散化剤、懸濁化剤、増粘剤、賦形剤等などの、少なくとも1種の製薬上許容される化学的成分と任意により混合された、本明細書中に記載される組成物または薬剤（例えば、組み換えアデノ随伴（rAAV）発現ベクター）を意味することが意図される。

【００６７】

本明細書中で用いる場合、用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基の多量体を意味するために相互に交換可能に用いられ、かつ最小限の長さに限定されない。そのようなアミノ酸残基の多量体は、天然または非天然アミノ酸残基を含むことができ、かつ、限定するものではないが、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量体、三量体、およびマルチマーを含む。全長タンパク質およびその断片の両方が、定義に包

含される。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアル化、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本開示の目的のために、「ポリペプチド」とは、タンパク質が所望の活性を維持する限り、生来型配列に対する、欠失、付加、および置換（一般的には保存的な性質の）などの改変を含むタンパク質を意味する。これらの改変は、部位特異的突然変異誘発を介するなどの意図的であり得るか、またはタンパク質を産生する宿主の突然変異もしくはPCR増幅に起因するエラーを介するなどの偶発的であり得る。

【００６８】

本明細書中で用いる場合、用語「プログラニュリン」、「PGRN」、「グラニュリン-エピセリン前駆体」、「GEP」、「PC細胞由来増殖因子」、「PCDGF」、「プロエピセリン」、「アクログラニン」および「GP80」は、本明細書において相互に交換可能に用いられる。本明細書中で用いる場合、「プログラニュリン（PGRN）」又は「プログラニュリン（PGRN）核酸」は、配列番号5を含む核酸、配列番号5と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号5からなる核酸；配列番号6を含む核酸、配列番号6と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号6からなる核酸；配列番号7を含む核酸、配列番号7と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号7からなる核酸；配列番号8を含む核酸、配列番号8と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号8からなる核酸；配列番号9を含む核酸、配列番号9と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号9からなる核酸；配列番号10を含む核酸、配列番号10と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号10からなる核酸；配列番号11を含む核酸、配列番号11と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号11からなる核酸；配列番号12を含む核酸、配列番号12と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号12からなる核酸；配列番号13を含む核酸、配列番号13と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号13からなる核酸；または配列番号14を含む核酸、配列番号14と約95％の相同性、約96％、約97％、約98％、約99％の相同性を有する核酸、配列番号14からなる核酸、から選択される核酸を意味する。

【００６９】

本明細書中で用いる場合、「プロモーター」とは、DNA調節配列を含むヌクレオチド領域を意味することが意図され、このとき、調節配列は、遺伝子から誘導され、RNAポリメラーゼに結合し、かつ下流（3'方向）コード配列の転写を開始することが可能である。転写プロセスの一部として、RNAポリメラーゼとして知られるRNAを合成する酵素は、遺伝子付近のDNAに結合する。プロモーターは、特定のDNA配列ならびにRNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼを集合させる転写因子に対する初期結合部位を提供する応答エレメントを含む。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、CNSの細胞での導入遺伝子発現に対して高度に特異的である。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、ニューロン特異的導入遺伝子発現に対して高度に特異的である。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、内因的PGRNプロモーターである。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、ニワトリβ-アクチン（CBA）プロモーターである。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、ヒトシナプシン-1遺伝子プロモーター（hSyn1）プロモーターである。図3は、ヒトシナプシン1（hSyn1）プロモーターの核酸配列（配列番号2）を示す。一部の実施形態に従えば、hSyn1プロモーターは、配列番号2を含む。一部の実施形態に従えば、hSyn1プロモーターは、配列番号2からなる。CBAプロモーターとは、ニワトリβ-アクチン遺伝子（例えば、GenBank Entrez Gene ID 396526により表わされる、セキショクヤケイ（Gallus gallus）βアクチン）から誘導されるポリヌクレオチド配列を意味する。図2は、ニワトリβアクチン（CBA）プロモーターの核酸配列（配列番号1）を示す。一部の実施形態に従えば、CBAプロモーターは、配列番号1を含む

。一部の実施形態に従えば、CBAプロモーターは、配列番号1からなる。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、マウスカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII（CaMKII）プロモーターである。マウスカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼIIプロモーターは、適度な（moderate）強度のニューロン特異的プロモーターである。図19は、CaMKIIプロモーターの核酸配列（配列番号18）を示す。一部の実施形態に従えば、CaMKIIプロモーターは、配列番号18を含む。一部の実施形態に従えば、CaMKIIプロモーターは、配列番号18からなる。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、ラットチューブリンα1（Ta1）プロモーターである。ラットチューブリンα1プロモーターは、形態学的成長の機能としてニューロン遺伝子発現の調節を担う、適度な強度のプロモーターである。ラットTa1プロモーターは、Gloster et al. 1994 J of Neuroscience（その全体で参照により本明細書中に組み入れられる）に記載される。図20は、ラットチューブリンα1（Ta1）プロモーターの核酸配列（配列番号19）を示す。一部の実施形態に従えば、Ta1プロモーターは、配列番号19を含む。一部の実施形態に従えば、Ta1プロモーターは、配列番号19からなる。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、ラットニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーターである。ラットニューロン特異的エノラーゼプロモーターは、適度な強度の発生的に調節されるプロモーターである。図21は、ラットニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーターの核酸配列（配列番号20）を示す。一部の実施形態に従えば、NSEプロモーターは、配列番号20を含む。一部の実施形態に従えば、NSEプロモーターは、配列番号20からなる。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、ヒト血小板由来増殖因子β鎖（PDGF）プロモーターである。ヒト血小板由来増殖因子β鎖プロモーターは、ニューロンおよび（ニューロンに伴う）グリア細胞に特異的な適度な強度のプロモーターである。ヒトゲノム中には、染色体NC_000022.11の[-]鎖の39244982位～39244621位にわたる（362ヌクレオチドにわたる）3種類の規定されたプロモーターがある。図22は、ヒト血小板由来増殖因子β鎖（PDGF）プロモーターの核酸配列（配列番号21、配列番号24および配列番号25）を示す。一部の実施形態に従えば、PDGF-β鎖プロモーターは、配列番号21を含む。一部の実施形態に従えば、PDGF-β鎖プロモーターは、配列番号21からなる。一部の実施形態に従えば、プロモーターは、遍在的に活性なEF1αプロモーターである。EF1aプロモーターは、CNSの細胞をはじめとする大多数の細胞タイプで発現する哺乳動物起源の強力な遍在性プロモーターである。図23は、EF1αプロモーターの核酸配列（配列番号22）を示す。一部の実施形態に従えば、EF1αプロモーターは、配列番号22を含む。一部の実施形態に従えば、EF1αプロモーターは、配列番号22からなる。一部の実施形態に従えば、本明細書中の態様および実施形態で示されるプロモーターのうちのいずれかは、追加の5'CAG/CMVエンハンサーエレメントをさらに含む。CAG/CMVエンハンサーは、両方ともコアプロモーターの転写活性を強化するために一般的に用いられる、強力な遍在性CAGプロモーターおよびそのCMV親プロモーターに影響を及ぼすエンハンサーから誘導される強力なエンハンサーエレメントである。図24は、CAG/CMVエンハンサーの核酸配列（配列番号23）を示す。

【００７０】

プロモーターは、それが調節する核酸配列の発現を駆動するかまたはその転写を駆動すると言うことができる。語句「機能的に連結された」、「作動可能に配置された」、「作動可能に連結された」、「制御下に」および「転写制御下に」は、プロモーターが、それが該配列の転写開始および/または発現を制御するために調節する核酸配列との関係で、正しい機能的位置および/または向きにあることを示す。本明細書中で用いる場合、「逆位プロモーター」とは、核酸配列が逆向きであり、それにより、コード鎖であったものが非コード鎖となり、逆もまた同じである、プロモーターを意味する。逆位プロモーター配列は、スイッチの状態を調節するために様々な実施形態で用いることができる。加えて、様々な実施形態では、プロモーターは、エンハンサーと組み合わせて用いることができる。

【００７１】

プロモーターは、所与の遺伝子もしくは配列のコードセグメントおよび/またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することにより取得できる通りの、遺伝子または配列に天然に伴うものであり得る。そのようなプロモーターは、「内因性」であると称されることができる。同様に、一部の実施形態では、エンハンサーは、配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列に天然に伴うものであり得る。

【００７２】

一部の実施形態では、コード核酸セグメントは、「組み換えプロモーター」または「異種プロモーター」の制御下に配置され、その両方が、その天然環境中で機能的に連結されるコード核酸配列に通常伴わないプロモーターを意味する。組み換えまたは異種エンハンサーとは、その天然の環境中で所与の核酸配列に通常伴わないエンハンサーを意味する。そのようなプロモーターまたはエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー；いずれかの他の原核細胞、ウイルス、または真核細胞から単離されるプロモーターまたはエンハンサー；および「天然に存在」しない、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および/または当技術分野で公知の遺伝子操作法を通じて発現を変化させる突然変異を含む、合成プロモーターまたはエンハンサーを含むことができる。

【００７３】

本明細書中で用いる場合、用語「エンハンサー」は、核酸配列の転写活性化を増大するために、1種以上のタンパク質（例えば、活性化因子タンパク質、または転写因子）に結合する、シス作用性調節配列（例えば、50～1,500塩基対）を意味する。エンハンサーは、それらが調節する遺伝子開始部位の上流または遺伝子開始部位の下流の1,000,000塩基対までに位置することができる。

【００７４】

本明細書中で用いる場合、「組み換え」とは、(1) その天然に存在する環境から除去されているか、(2) 遺伝子がその中に天然に見出されるポリヌクレオチドの全部もしくは一部を伴っていないか、(3) 天然では連結されていないポリヌクレオチドに作動可能に連結されているか、または(4) 天然には存在しない、生体分子（例えば、遺伝子またはタンパク質）を意味することができる。用語「組み換え」は、クローニングされたDNA単離体、化学合成されたポリヌクレオチドアナログ、または異種系により生物学的に合成されるポリヌクレオチドアナログ、ならびにそのような核酸によりコードされるタンパク質および/またはmRNAに関連して用いることができる。

【００７５】

本明細書中で用いる場合、用語「組み換えHSV」、「rHSV」、および「rHSVベクター」とは、ウイルスゲノムに組み込まれた異種遺伝子を含む、1型単純ヘルペスウイルス（HSV）の、単離され遺伝子改変された形態を広く意味することが意図される。用語「rHSV-rep2cap2」または「rHSV-rep2cap1」とは、AAV血清型1または2のいずれかに由来するAAV repおよびcap遺伝子がrHSVゲノムへと組み込まれているrHSVを意味し、特定の実施形態では、対象となる治療的遺伝子をコードするDNA配列が、ウイルスゲノムへと組み込まれている。

【００７６】

本明細書中で用いる場合、本発明の方法により治療される対象である「被験体」または「患者」または「個体」とは、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを意味することが意図される。「非ヒト動物」としては、いずれかの脊椎動物または無脊椎動物生物が挙げられる。ヒト被験体は、いずれかの年齢、性別、人種または民族（例えば、白人、アジア人、アフリカ人、黒人、アフリカ系アメリカ人、アフリカ系欧州人、ヒスパニック系、中東系等）であり得る。一部の実施形態では、被験体は、患者または臨床環境での他の被験体であり得る。一部の実施形態では、被験体は、既に治療を受けている。一部の実施形態では、被験体は、新生児、幼児、小児、青年期、または成人である。

【００７７】

本明細書中で用いる場合、用語「治療効果」とは、その結果が望ましくかつ有益であると判断される治療の結果を意味する。治療効果としては、直接的または間接的な、疾患の

兆候の停止、減少、または除去が挙げられる。治療効果としてはまた、直接的または間接的な、疾患の兆候の進行の停止、減少、または除去も挙げられる。

【００７８】

本明細書中に記載されるいずれかの治療剤に関して、治療上有効量は、予備的in vitro研究および/または動物モデルから最初に決定することができる。治療上有効用量はまた、ヒトデータから決定することもできる。適用される用量は、投与される化合物の相対的バイオアベイラビリティおよび効能に基づいて調整できる。上記の方法および他の周知の方法に基づいて最大効力を達成するために用量を調整するステップは、当業者の能力の範囲内である。参照により本明細書中に組み入れられるGoodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Edition, McGraw-Hill (New York) (2001)の第1章に見出すことができる、治療有効性を決定するための一般的原理が、下記に概説される。

【００７９】

本明細書中で用いる場合、用語「置換突然変異プロフィール」とは、その5箇所のエラスターゼ切断部位および/または2箇所の他のタンパク質分解性切断部位のうちの1箇所以上を除去する、プログラニュリンのドメイン間領域中での保存的アミノ酸置換のパネルを意味することが意図される（例えば、Cenik et al., JBC 2012；Zhu et al., Cell 2002を参照されたい。その両方がそれらの全体で参照により本明細書中に組み入れられる）。一部の実施形態に従えば、置換突然変異は、グラニュリンへとプロセシングされることからPGRNを減少または防止するであろう。

【００８０】

本明細書中で用いる場合、「導入遺伝子」とは、細胞に導入され、かつRNAへと転写されることならびに任意により適切な条件下で翻訳および/または発現されることが可能であるポリヌクレオチドを意味することが意図される。態様では、導入遺伝子は、導入された細胞に対して所望の特性を賦与するか、またはそうでなければ所望の治療的もしくは診断的帰結をもたらす。

【００８１】

本明細書中で用いる場合、「導入遺伝子発現カセット」または「発現カセット」とは、相互に交換可能に用いられ、かつ導入遺伝子の転写に向かわせるために十分な1種以上のプロモーターまたは他の調節配列に機能的に連結された導入遺伝子を含むが、カプシドコード配列、他のベクター配列または逆位末端反復領域を含まない、核酸の線形ストレッチを意味する。発現カセットは、1つ以上のシス作用性配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、またはリプレッサー）、1つ以上のイントロン、および1つ以上の転写後調節エレメントを追加的に含むことができる。導入遺伝子発現カセットは、核酸ベクターが標的細胞へと送達する対象である遺伝子配列を含む。これらの配列としては、対象となる遺伝子（例えば、PGRN核酸またはその変異体）、1種以上のプロモーター、および最小調節エレメントが挙げられる。

【００８２】

本明細書中で用いる場合、疾患もしくは障害を「治療」または「治療すること」なる用語は、検出可能であるか検出不可能であるかにかかわらず、疾患もしくは障害の1種以上の徴候または症状の軽減、疾患または障害の程度の減少、疾患または障害の安定した（例えば、悪化していない）状態、疾患または障害の拡大を防止すること、疾患もしくは障害進行の遅延または減速、疾患もしくは障害状態の改善または緩和、および退行（部分的または全体的にかかわらず）を意味することが意図される。例えば、PGRNでは、有効な量（または用量）での発現は、異常な生理的応答を予防、是正、および/または正常化するのに十分である場合、例えば、疾患または障害の臨床的に重要な特徴を、少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、最も好ましくは少なくとも90%低下させるのに十分な治療効果である場合である。「治療」とはまた、治療を受けていない場合に予測される生存期間と比較して、延長した生存期間を意味することもできる。

【００８３】

本明細書中で用いる場合、用語「ベクター」とは、in vitroまたはin vivoのいずれかで、宿主細胞へと送達される対象である核酸を含む組み換えプラスミドまたはウイルスを意味することが意図される。

【００８４】

本明細書中で用いる場合、用語「発現ベクター」とは、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からのRNAまたはポリペプチドの発現に向かわせるベクターを意味する。発現される配列は、必ずしもではないがしばしば、細胞に対して異種であろう。発現ベクターは、追加のエレメントを含むことができ、例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有し、したがって、2種類の生物中で（例えば、発現のためにはヒト細胞中で、ならびにクローニングおよび増幅のためには原核生物宿主中で）維持されることを可能にすることができる。用語「発現」とは、RNAおよびタンパク質の産生ならびに必要に応じたタンパク質の分泌に関与する細胞プロセスを意味し、適用可能な場合、限定するものではないが、例えば、転写、転写産物プロセシング、翻訳およびタンパク質フォールディング、修飾およびプロセシングを含む。「発現産物」は、遺伝子から転写されるRNA、および遺伝子から転写されるmRNAの翻訳により取得されるポリペプチドを含む。用語「遺伝子」とは、適切な調節配列に機能的に連結された場合に、in vitroまたはin vivoでRNAへと転写（DNA）される核酸配列を意味する。遺伝子は、コード領域に先立つかまたはその後に続く領域（例えば、5'非翻訳（5'UTR）配列または「リーダー」配列および3'UTR配列または「トレーラー」配列）、ならびに個々のコードセグメント（エクソン）の間の介在配列（イントロン）を含むかまたは含まないことができる。

【００８５】

本明細書中で用いる場合、用語「組み換えウイルスベクター」とは、1種以上の異種配列（すなわち、ウイルス起源でない核酸配列）を含む組み換えポリヌクレオチドベクターを意味することが意図される。組み換えAAVベクターの場合、組み換え核酸には、少なくとも1つの逆位末端反復配列（ITR）が隣接している。一部の実施形態に従えば、組み換え核酸には、2つのITRが隣接している。

【００８６】

本明細書中で用いる場合、用語「組み換えAAVベクター」（rAAVベクター）とは、少なくとも1つのAAV逆位末端反復配列（ITR）に隣接された、1種以上の異種配列（すなわち、AAV起源でない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを意味することが意図される。そのようなrAAVベクターは、好適なヘルパーウイルスに感染しており（または好適なヘルパー機能を発現し）、かつAAV repおよびcap遺伝子産物（すなわち、AAV Repタンパク質およびCapタンパク質）を発現している宿主細胞中に存在する場合、複製され、かつ感染性ウイルス粒子へとパッケージングされることができる。rAAVベクターが、より大きなポリヌクレオチドへと（例えば、染色体中に、またはクローニングもしくはトランスフェクションのために用いら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および好適なヘルパー機能の存在下で、複製およびカプシド化により「レスキュー」することができる「プロベクター」と称される場合がある。rAAVベクターは、限定するものではないが、プラスミド、線形人工染色体、脂質と複合体化した形態、リポソーム内にカプセル封入された形態、およびウイルス粒子（例えば、AAV粒子）中にカプシド化された形態をはじめとする、多数の形態のうちのいずれかであり得る。rAAVベクターは、AAVウイルスカプシドへとパッケージングされて、「組み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。

【００８７】

本明細書中で用いる場合、用語「rAAVウイルス」または「rAAVウイルス粒子」とは、少なくとも1種のAAVカプシドタンパク質およびカプシド化されたrAAVベクターゲノムから構成されるウイルス粒子を意味する。

【００８８】

本明細書中で用いる場合、「レポーター」とは、検出可能な読み出し値を提供するため

に用いることができるタンパク質を意味する。レポーターは、一般的に、蛍光、着色、または発光などの測定可能なシグナルを生成する。レポータータンパク質コード配列は、細胞または生物中でのその存在が容易に観察されるタンパク質をコードする。例えば、蛍光タンパク質は、特定の波長の光を用いて励起される場合に、細胞に蛍光を生じさせ、ルシフェラーゼは、細胞に光を生成する反応を触媒させ、β-ガラクトシダーゼなどの酵素は、基質を着色生成物へと変換する。実験または診断目的のために有用な例示的なレポーターポリペプチドとしては、限定するものではないが、β-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ（LacZ）、アルカリホスファターゼ（AP）、チミジンキナーゼ（TK）、緑色蛍光タンパク質（GFP）および他の蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ルシフェラーゼ、および当技術分野で周知の他のものが挙げられる。

【００８９】

転写調節因子とは、PGRNなどの対象となる遺伝子の転写を活性化または抑制する転写活性化因子および抑制因子を意味する。プロモーターは、特定の遺伝子の転写を開始させる核酸の領域である。転写活性化因子は、典型的に、転写プロモーターの近傍に結合し、かつ転写を直接的に開始させるためにRNAポリメラーゼを集合させる。抑制因子は転写プロモーターに結合し、かつRNAポリメラーゼによる転写開始を立体的に妨害する。他の転写調節因子は、それらが結合する位置ならびに細胞および環境的条件に応じて、活性化因子または抑制因子のいずれかとして機能することができる。転写調節因子クラスの非限定的な例としては、限定するものではないが、ホメオドメインタンパク質、zincフィンガータンパク質、ウィングドヘリックス（フォークヘッド）タンパク質、およびロイシンジッパータンパク質が挙げられる。

【００９０】

本明細書中で用いる場合、「抑制因子タンパク質」または「誘導因子タンパク質」は、調節配列エレメントに結合し、かつ、該調節配列エレメントに作動可能に連結された配列の転写を、それぞれ抑制または活性化するタンパク質である。本明細書中に記載される通りの好ましい抑制因子および誘導因子タンパク質は、少なくとも1種の入力物質または環境的入力の存在または非存在に感受性である。本明細書中に記載される通りの好ましいタンパク質は、例えば、分離可能なDNA結合性かつ入力物質結合性もしくは応答性のエレメントまたはドメインを含む、モジュール状である。

【００９１】

本明細書中で用いる場合、用語「含むこと」（comprising）または「含む」（comprise）は、組成物、方法、および該方法または組成物に対して必須であるそのそれぞれの構成要素に関連して用いられるが、必須であるか否かにかかわらず、明記されない要素を包含する可能性がある。

【００９２】

本明細書中で用いる場合、用語「本質的に～からなる」とは、所与の実施形態に対して必要なそれらの要素を意味する。この用語は、実施形態の基本的および新規または機能的特徴に物質的に影響しない要素の存在を許容する。「含むこと」（comprising）の使用は、限定ではなく包含を示す。

【００９３】

用語「からなる」とは、実施形態のその記述中に明記されないいかなる要素も除外して、本明細書中に記載される通りの組成物、方法、およびそのそれぞれの構成要素を意味する。

【００９４】

本明細書中で用いる場合、用語「本質的に～からなる」とは、所与の実施形態に対して必要なそれらの要素を意味する。この用語は、本発明のその実施形態の基本的および新規または機能的特徴に物質的に影響しない追加の要素の存在を許容する。

【００９５】

用語「～が挙げられる」（including）は、語句「限定するものではないが～が挙げ

られる」を意味するために本明細書中で用いられ、かつこの語句と相互に交換可能に用いられる。

【００９６】

用語「など」（ｓｕｃｈ ａｓ）は、語句「限定するものではないが、～など」を意味するために本明細書中で用いられ、かつこの語句と相互に交換可能に用いられる。

【００９７】

本明細書および添付の特許請求の範囲の中で用いる場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈がそうでないことを明らかに指示しない限り、複数形の参照を含む。つまり、例えば、「方法」（単数形）への参照は、１種以上の方法、および/または本明細書中に記載され、かつ/もしくは本開示を読んだときなどに当業者に明らかになるであろうタイプのステップを含む。同様に、単語「または」は、文脈がそうでないことを明らかに示さない限り、「および」を含むことが意図される。本明細書中に記載されるものに類似または等価である方法および材料を、本開示の実践または試験で用いることができるが、好適な方法および材料が、以下に記載される。略語「ｅ.ｇ.」は、ラテン語の「ｅｘｅｍｐｌｉ ｇｒａｔｉａ」に由来し、かつ非限定的な例を示すために本明細書中で用いられる。つまり、略語「ｅ.ｇ.」は、用語「例えば」と同義である。

【００９８】

本明細書中に開示される本発明の代替的な要素または実施形態のグループ化は、限定と解釈されるべきではない。各グループのメンバーが、個別に、またはグループの他のメンバーもしくは本明細書中に見出される他の要素とのいずれかの組み合わせで、参照および特許請求されることができる。グループの１つ以上のメンバーが、簡便性および/または特許可能性の理由のために、グループに含められ、またはグループから削除されることができる。いずれかのそのような包含または削除が生じる場合、本明細書は、改変された通りのグループを含むとここでは見なされ、つまり添付の特許請求の範囲で用いられるすべてのマーカッシュグループの記載された説明を満たす。

【００９９】

態様のうちのいずれかの一部の実施形態では、本明細書中に記載される本開示は、ヒトのクローニングのためのプロセス、ヒトの生殖系列の遺伝的同一性を改変するためのプロセス、産業もしくは商業目的のためのヒト胎児の使用、またはヒトもしくは動物に対する実質的な医学的利益を有さずにそれらを侵す可能性がある、動物の遺伝的同一性を改変するためのプロセス、およびそのようなプロセスから得られる動物にも、関与しない。

【０１００】

他の用語は、本発明の種々の態様の説明の中で、本明細書中で定義される。

【０１０１】

本出願全体を通して引用される、参考文献、発行された特許、公開特許出願、および同時継続特許出願をはじめとする、すべての特許および他の刊行物は、例えば、本明細書中に記載される技術との関連で用いることができるであろうそのような刊行物中に記載される方法論を、説明および開示する目的のために、参照により本明細書中に明白に組み入れられる。これらの刊行物は、本出願の出願日に先立つそれらの開示に関してのみ提供される。これに関して、何であっても、先行する発明を理由として、またはいずれかの他の理由のために、本発明者らがそのような開示を先行させる資格があるという了解として解釈されるべきではない。日付に関するすべての記述またはそれらの文献の内容に関する表明は、本出願人らに利用可能な情報に基づいており、かつそれらの文献の日付または内容の正しさに関するいかなる了解も構成しない。

【０１０２】

本開示の実施形態の説明は、網羅的であることまたは開示される精密な形態に対して本開示を限定することを意図しない。本開示の具体的実施形態、または本開示のための実施例は、例示的目的のために本明細書中に記載され、様々な等価な改変が、関連する技術分野の当業者が認識するであろう通り、本開示の範囲内で可能である。例えば、方法ステップまたは機能が所定の順序で提示されていても、代替的な実施形態は、異なる順序で機能

を実行でき、または機能は実質的に同時に実行されることができる。本明細書中に提供される本開示の教示は、必要に応じて、他の手順または方法に適用することができる。本明細書中に記載される様々な実施形態は、さらなる実施形態を提供するために組み合わせることができる。本開示の態様は、必要であれば、上記の参考文献および出願の組成、機能および概念を用いるために改変して、本開示のまたさらなる実施形態を提供することができる。さらに、生物学的機能の等価性を考慮することにより、種類もしくは量について生物学的または化学的作用に影響を及ぼすことなく、タンパク質構造に幾分かの変更を加えることができる。これらおよび他の変更は、詳細な説明に鑑みて本開示に加えることができる。すべてのそのような改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含められることが意図される。

【０１０３】

上述の実施形態のうちのいずれかの具体的要素は、組み合わせるか、または他の実施形態の要素と置き換えることができる。さらに、本開示の特定の実施形態に伴う利点がこれらの実施形態の文脈で記載されているが、他の実施形態もまた、そのような利点を示す場合があり、かつすべての実施形態が、本開示の範囲内に入るためにそのような利点を必ず示さなければならないわけではない。

【０１０４】

本明細書中に記載される技術が、以下の実施例によりさらに例示されるが、以下の実施例は、さらなる限定として少しも解釈されるべきではない。本発明は、本明細書中に記載される特定の方法論、プロトコール、および試薬等に限定されず、したがって変更することができることが理解されるべきである。本明細書中で用いられる用語は、特定の実施形態を説明する目的のみのためであり、本発明の範囲を限定することは意図されず、本発明の範囲は、特許請求の範囲のみによって規定される。

【０１０５】

II. 核酸

考えられる治療的使用のための核酸分子の特性決定および開発が、本明細書中に提供される。本開示は、神経変性疾患または障害の治療で用いることができる、プロモーター、発現カセット、ベクター、キット、および方法を提供する。本開示の特定の態様は、組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターを投与するステップを含む、被験体へと異種核酸を送達することに関する。一部の態様に従えば、本開示は、被験体への本明細書中に記載されるrAAVベクターを含む組成物の送達を含む、神経変性疾患または障害を治療または予防する方法を提供し、このとき、rAAVベクターは、異種核酸（例えば、PGRNをコードする核酸）を含む。本開示の目的は、CNSでの成功裏の発現を伴って、中枢神経系（CNS）へとPGRNをコードする核酸を送達すること、および神経変性疾患の治療である。

【０１０６】

一部の実施形態に従えば、発現されるPGRNタンパク質は、神経変性疾患または障害の治療の処置に対して機能的である。一部の実施形態では、発現されるPGRNタンパク質は、免疫系反応を引き起こさない。

【０１０７】

PGRNは、神経栄養、抗炎症およびリソソーム調節特性をはじめとする複数の細胞機能を有するGRN/Grn遺伝子によりコードされる糖タンパク質である。GRN遺伝子中の突然変異は、認知症の原因である前頭側頭葉変性症（FTD）、およびリソソーム蓄積症である神経セロイドリポフスチン症（NCL）をもたらし得る。両方の疾患が、他の特徴の中でもとりわけ、増強したミクログリア神経炎症およびリソソーム機能不全を生じる、PGRN機能喪失に関連する。PGRNはまた、アルツハイマー病（AD）にも関連付けられてきた（Mendsaikhan et al. Cells. 2019 8(3): 230）。

【０１０８】

一部の実施形態に従えば、対象となる遺伝子（例えば、PGRN）は、野生型PGRNよりも発現（および/または機能）が優れるように最適化され、かつ野生型PGRNから区別す

る（DNA/RNAレベルで）能力をさらに有する。

【０１０９】

一部の実施形態に従えば、対象となる遺伝子（例えば、PGRN）は、ソルチリンに対する結合性を阻害するために最適化される。PGRN C末端モチーフであるPGRN(589-593) LRQLLが、SORT1媒介エンドサイトーシスに対して必須であることが以前に示されている（Zheng et al., PLoS One. 2011;6(6):e21023）。

【０１１０】

一部の実施形態に従えば、対象となる遺伝子（例えば、PGRN）は、より少ないグラニュリン産物を生成するために最適化される。

【０１１１】

「PGRN核酸」とは、PGRN遺伝子もしくはその一部分、またはPGRN遺伝子の機能的変異体もしくはその一部分を含む核酸を意味する。遺伝子の機能的変異体としては、例えば、サイレント突然変異、単一ヌクレオチド多型、ミスセンス突然変異、および遺伝子機能を顕著に変化させない他の突然変異または欠失などの、重大でない変異を有する遺伝子の変異体が挙げられる。

【０１１２】

一実施形態に従えば、PGRNタンパク質をコードする核酸は、1779bp長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも85％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも90％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも95％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも96％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも96％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも97％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも98％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5に対して少なくとも99％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号5からなる。

【０１１３】

一実施形態に従えば、PGRNタンパク質をコードする核酸は、1767bp長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも85％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも90％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも95％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも96％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも97％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも98％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6に対して少なくとも99％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号6からなる。

【０１１４】

一実施形態に従えば、PGRNタンパク質をコードする核酸は、1779bp長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも85％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも90％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも95％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも96％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも97％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも98％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7に対して少なくとも99％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号7からなる。

【０１１５】

一実施形態に従えば、PGRNタンパク質をコードする核酸は、1779bp長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号8を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対して少なくとも85％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号8に対し

て少なくとも９０％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号８に対して少なくとも９５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号８に対して少なくとも９６％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号８に対して少なくとも９７％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号８に対して少なくとも９８％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号８に対して少なくとも９９％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号８からなる。

【０１１６】

一実施形態に従えば、ＰＧＲＮタンパク質をコードする核酸は、１７７９ｂｐ長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９に対して少なくとも８５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９に対して少なくとも９０％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９に対して少なくとも９５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９に対して少なくとも９６％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９に対して少なくとも９７％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９に対して少なくとも９８％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９に対して少なくとも９９％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号９からなる。

【０１１７】

一実施形態に従えば、ＰＧＲＮタンパク質をコードする核酸は、１７７９ｂｐ長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０に対して少なくとも８５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０に対して少なくとも９０％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０に対して少なくとも９５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０に対して少なくとも９６％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０に対して少なくとも９７％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０に対して少なくとも９８％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０に対して少なくとも９９％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１０からなる。

【０１１８】

一実施形態に従えば、ＰＧＲＮタンパク質をコードする核酸は、１７７９ｂｐ長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１１を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１１に対して少なくとも８５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１１に対して少なくとも９０％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１１に対して少なくとも９５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１１に対して少なくとも９６％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１１に対して少なくとも９７％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１１に対して少なくとも９８％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号８に対して少なくとも９９％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１１からなる。

【０１１９】

一実施形態に従えば、ＰＧＲＮタンパク質をコードする核酸は、１７７９ｂｐ長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２に対して少なくとも８５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２に対して少なくとも９０％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２に対して少なくとも９５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２に対して少なくとも９６％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２に対して少なくとも９７％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２に対して少なくとも９８％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２に対して少なくとも９９％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１２からなる。

【０１２０】

一実施形態に従えば、ＰＧＲＮタンパク質をコードする核酸は、１７７９ｂｐ長である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３を含む。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３に対して少なくとも８５％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号１３に

対して少なくとも90％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号13に対して少なくとも95％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号13に対して少なくとも96％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号13に対して少なくとも97％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号13に対して少なくとも98％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号13に対して少なくとも99％同一である。一実施形態に従えば、核酸は、配列番号13からなる。

【０１２１】

一実施形態に従えば、PGRNタンパク質をコードする核酸は、C末端からの3～16個（例えば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個）のアミノ酸の欠失を有する。一部の実施形態に従えば、PGRNのC末端での欠失は、PGRNソルチリン結合性および引き続く個別のグラニュリンへのプロセシングの阻害をもたらす。一部の実施形態に従えば、PGRNタンパク質をコードする核酸は、C末端からの3～16個（例えば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個）のアミノ酸の欠失を有する配列番号1からなる。

【０１２２】

コドン最適化

部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、対象となる標的DNAを含む細胞での発現のために、当技術分野で標準的な方法に従ってコドン最適化することができる。例えば、意図される標的核酸がヒト細胞中にある場合、PGRNをコードするヒトコドン最適化型ポリヌクレオチドが、本明細書中に記載される構築物での使用のために考慮される。

【０１２３】

一部の実施形態に従えば、核酸配列は、哺乳動物発現のためにコドン最適化される。

【０１２４】

III. 神経変性疾患に対するPGRN遺伝子療法

本開示は一般的に、PGRN遺伝子構築物を含む組み換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ウイルス粒子を生成するための方法および神経変性疾患、特に部分的または完全PGRN欠損により特徴付けられる神経変性疾患（例えば、前頭側頭型認知症（FTD））に対する遺伝子療法の方法でのそれらの使用を提供する。本明細書中に記載される通りのAAVベクターは、CNSの細胞、特に神経細胞への核酸（例えば、PGRN遺伝子構築物）の送達では特に効率的である。発現および引き続く分泌のために細胞に対してPGRNを効率的に送達することが可能である組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）治療的ベクターを作製、評価、および利用するための方法が、本明細書中に記載される。FTDの治療および/または予防をはじめとする、神経変性疾患に対する組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）に基づく遺伝子療法での使用のための、最適に改変されたPGRN cDNAおよび関連する遺伝的エレメントが、本明細書中に記載される。

【０１２５】

組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターは、PGRN標的遺伝子および関連する遺伝的エレメントの両方を効率的に収容することができる。さらに、そのようなベクターは、CNSの治療上重要な細胞でPGRNを特異的に発現するために設計することができる。本開示は、機能的PGRN遺伝子を患者に効率的に送達できるrAAV治療的ベクターを作製、評価、および利用するための方法を記載する。

【０１２６】

PGRN遺伝子構築物は、以下の配列を含み得る：(1) 27ヌクレオチドのヘマグルチニンC末端タグを含むかまたは含まずに、(a) 置換突然変異プロフィールによって、または3～16個のC末端アミノ酸欠失（ソルチリン結合性および引き続く個別のグラニュリンへのプロセシングを阻害するため）により、グラニュリンに対するタンパク質分解性切断に対する耐性を保持し得る、ヒト、マウス、またはマカクのいずれかに由来する、1.8キロベース（kb）の天然に存在しないコドン最適化型PGRN cDNA配列、(2) 0.5kbの天然に存在しないニューロン特異的ヒトシナプシン-1プロモーター（hSYN1）または0.364

kbマウスカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII（CaMKII）プロモーター、または1.034kbラットチューブリンα1（Ta1）プロモーター、または1.81kbラットニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター、または1.47kbヒト血小板由来増殖因子β鎖（PDGF）プロモーター、または遍在的に活性な1.7kb CBAプロモーター、または遍在的に活性な0.81kb EF1αプロモーター、あるいは本明細書中の態様または実施形態のうちのいずれかに従うプロモーターのうちのいずれかであって、プロモーターは、追加的な0.35kbの5'CAG/CMVエンハンサーエレメントをさらに含み、すべてが高PGRN発現を駆動するために最適化される、(3) ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）およびそれに続くSV40またはヒト成長ホルモン（hGH）ポリアデニル化シグナルを含む、0.9kbの天然に存在しない3'-UTR調節領域、(4) AAVゲノムカセットに隣接する2つの天然に存在する141塩基の配列調節型逆位末端反復（ITR）、ならびに(5) 標的化CNS送達に対して最適に好適なAAVカプシド変異体（天然または存在しないかのいずれか）。

【０１２７】

自己相補的AAVゲノム

多数の前臨床研究が、組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）遺伝子送達ベクターの有効性を実証しており、かつ近年の臨床試験が、有望な結果を示した。しかしながら、形質導入に必要とされるゲノム含有粒子数に関するこれらのベクターの効率は、一本鎖DNA（ssDNA）ゲノムを発現前に二本鎖DNA（dsDNA）へと変換する必要性により妨げられる。このステップは、DNA合成または複数ベクターゲノム間での塩基対形成に対する要求なしにdsDNAへとフォールディングすることができる逆位反復ゲノムをパッケージングする、自己相補的ベクターの使用を通して完全に回避することができる。この効率に対する重要なトレードオフは、ベクターのコード容量の半分の喪失であるが、小型のタンパク質コード遺伝子（最大55kd）、およびいずれかの現在利用可能なRNAに基づく療法が収容できる。

【０１２８】

アデノ随伴ウイルス（AAV）

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、非病原性の一本鎖DNAパルボウイルスである。AAVは、約20nmのカプシド直径を有する。一本鎖DNAゲノムの両端は、逆位末端反復（ITR）を含み、ITRは、ゲノム複製およびパッケージングに必要とされる唯一のシス作用性エレメントである。AAVゲノムは、2種類のウイルス遺伝子：repおよびcapを担持する。ウイルスは、2種類のプロモーターおよび複製に必要な4種類のタンパク質（Rep78、Rep68、Rep52およびRep40）を生成するオルタナティブスプライシングを利用する。第3のプロモーターは、選択的（alternate）スプライシングおよび選択的翻訳開始コドンの組み合わせを通して、3種類の構造的ウイルスカプシドタンパク質1、2および3（VP1、VP2およびVP3）に対する転写産物を生成する（Berns & Linden Bioessays 1995; 17:237-45）。3種類のカプシドタンパク質は、同じC末端の533個のアミノ酸を共有し、一方で、VP2およびVP1は、それぞれ65個および202個のアミノ酸の追加的N末端配列を含む。AAVビリオンは、T-1正20面体対称に配置される1：1：20の比率での合計60コピーのVP1、VP2およびVP3を含む（Rose et al. J Virol. 1971; 8:766-70）。AAVは、その溶解性生活環を完成させるために、ヘルパーウイルスとして、アデノウイルス（Ad）、単純ヘルペスウイルス（HSV）または他のウイルスを必要とする（Atchison et al. Science, 1965; 149:754-6；Hoggan et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1966; 55:1467-74）。ヘルパーウイルスの非存在下では、野生型AAVは、染色体とのITRの相互作用を介して、Repタンパク質の助けにより、インテグレーションによる潜伏を確立する（Berns & Linden (1995)）。

【０１２９】

AAV血清型

AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV2.retro、およびそれらの変異体また

はハイブリッド（例えば、HSPG突然変異を有するAAV2変異体、AAV1+9ハイブリッド）を含む、多数の異なるAAV血清型がある。in vivo研究により、様々なAAV血清型が、異なる組織または細胞指向性を示すことが示されている。例えば、AAV1およびAAV6は、骨格筋の形質導入に対して効率的な2種類の血清型である（Gao, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:11854-11859；Xiao, et al. J Virol. 1999; 73:3994-4003；Chao, et al. Mol Ther. 2000; 2:619-623）。AAV-3は、巨核球の形質導入に対して優れていることが示されている（Handa, et al. J Gen Virol. 2000; 81:2077-2084）。AAV5およびAAV6は、頂端気道細胞に効率的に感染する（Zabner, et al. J Virol. 2000; 74:3852-3858；Halbert, et al. J Virol. 2001; 75:6615-6624）。AAV2、AAV4、およびAAV5は、中枢神経系の異なるタイプの細胞を形質導入する（Davidson, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:3428-3432）。AAV8およびAAV5は、AAV-2よりもよく肝臓細胞を形質導入することができる。AAV-5に基づくベクターは、特定の細胞タイプ（培養気道上皮細胞、培養横紋筋細胞および培養ヒト臍帯静脈内皮細胞）を、AAV2よりも高い効率で形質導入したが、AAV2およびAAV5の両方が、NIH3T3、skbr3およびt-47D細胞株に対して低い形質導入効率を示した（Gao, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99:11854-11859；Mingozzi, et al. J Virol. 2002; 76:10497-10502、国際公開第99/61601号）。AAV4は、最も効率的にラット網膜を形質導入することが見出され、AAV5およびAAV1がそれに続いた（Rabinowitz, et al. J Virol. 2002; 76:791-801；Weber, et al. Mol Ther. 2003; 7:774-781）。要約すると、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV8、およびAAV9はCNS組織に対する指向性を示す。AAV1、AAV8、およびAAV9は、心臓組織に対する指向性を示す。AAV2は、腎臓組織に対する指向性を示す。AAV7、AAV8、およびAAV9は、肝臓組織に対する指向性を示す。AAV4、AAV5、AAV6、およびAAV9は、肺組織に対する指向性を示す。AAV8は、膵臓細胞に対する指向性を示す。AAV3、AAV5、およびAAV8は、光受容体細胞に対する指向性を示す。AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、およびAAV8は、網膜色素上皮（RPE）細胞に対する指向性を示す。AAV1、AAV6、AAV7、AAV8、およびAAV9は、骨格筋に対する指向性を示す。AAV2カプシド上の数個のチロシン残基を突然変異させることにより、線条体および海馬でのニューロン形質導入が顕著に増強され、かつヘパリン硫酸（HS）結合性の除去もまた、ベクターの体積拡大を増大させたことが示されている（Kanaan et al., Mol Ther Nucleic Acids. 2017 Sep 15; 8: 184-19）。ヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）突然変異を有するAAV2変異体（AAV2-HBKO、AAVT-TT、AAV44-9）は、神経および脳形質導入を増強したことが示されている。

【０１３０】

ウイルスのさらなる改変を、例えば、各血清型の指向性を改善することにより、遺伝子移入の効率を強化するために行なうことができる。1つのアプローチは、ある血清型カプシドから別の血清型へとドメインをスワップし、それにより各親に由来する所望の品質を有するハイブリッドベクターを作製することである。ウイルスカプシドは細胞受容体結合性を担うので、結合性に対して重要なウイルスカプシドドメインの理解が重要である。結晶構造が利用可能になる以前に行なわれたウイルスカプシドに対する突然変異研究（主にAAV2に対する）は、大部分が、外因性部分の吸着、ランダムな位置へのペプチドの挿入、またはアミノ酸レベルでの包括的突然変異誘発による、カプシド表面官能性に基づいていた。Choi, et al. Curr Gene Ther. 2005 June; 5(3): 299-310には、ハイブリッド血清型に関する異なるアプローチおよび考察が記載される。

【０１３１】

他のAAV血清型由来のカプシドは、AAV2カプシドに基づくrAAVベクターに対して、特定のin vivo用途での利点を提供する。第1に、特定の血清型を有するrAAVベクターの適切な使用は、AAV2に基づくベクターにより感染しにくいか、またはまったく感染しない特定の標的細胞に対するin vivoでの遺伝子送達の効率を増加させ得る。第2に、rAAVベクターの再投与が臨床的に必要になる場合に、他のAAV血清型に基づくrAAVベク

ターを用いることは有利であり得る。同じカプシドを有する同じrAAVベクターの再投与は、おそらくはベクターに対して生成される中和抗体の生成に起因して、効果がない場合がある（Xiao, et al. 1999；Halbert, et al. 1997）。この問題は、そのカプシドが異なるAAV血清型由来のタンパク質から構成され、第1のrAAVベクターに対する中和抗体の存在により影響を受けないrAAV粒子の投与により、回避することができる（Xiao, et al. 1999）。上記の理由のために、AAV2を含みかつAAV2に追加される血清型由来のcap遺伝子を用いて構築された組み換えAAVベクターが望ましい。rHSVに類似するが他のAAV血清型（例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV5～AAV9）由来のcap遺伝子をコードする組み換えHSVベクターの構築は、rHSVを生成するための本明細書中に記載される方法を用いて達成可能であることが理解されるであろう。本明細書中に記載される通りの本発明の特定の好ましい実施形態では、異なるAAV由来のcap遺伝子を用いて構築された組み換えAAVベクターが好ましい。これらの追加的rHSVベクターの構築の顕著な利点は、rAAVの大規模生成のために用いられる代替的な方法と比較しての、容易さおよび時間の節約である。特に、それぞれの異なるカプシド血清型に対して新規のrepおよびcap誘導可能細胞株を構築する困難なプロセスが回避される。

【０１３２】

IV. 組み換えAAV（rAAV）ベクターの作製

本発明のrAAVベクターの生成、精製、および特性決定は、当技術分野で公知の多数の方法のうちのいずれかを用いて行なうことができる。実験室規模の生成方法の総説に関して、例えば、Clark RK, Recent advances in recombinant adeno-associated virus vector production. Kidney Int. 61s:9-15 (2002)；Choi VW et al., Production of recombinant adeno-associated viral vectors for in vitro and in vivo use. Current Protocols in Molecular Biology 16.25.1-16.25.24 (2007)（本明細書中、以下では、Choi et al.）；Grieger JC & Samulski RJ, Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production, and clinical applications. Adv Biochem Engin/Biotechnol 99:119-145 (2005)（本明細書中、以下では、Grieger & Samulski）；Heilbronn R & Weger S, Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics, in M. Schafer-Korting (ed.), Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology, 197: 143-170 (2010)（本明細書中、以下では、Heilbronn）；Howarth JL et al., Using viral vectors as gene transfer tools. Cell Biol Toxicol 26:1-10 (2010)（本明細書中、以下では、Howarth）を参照されたい。下記の生成方法は、非限定的な例として意図される。

【０１３３】

AAVベクター生成は、パッケージングプラスミドの共トランスフェクションにより達成できる（Heilbronn）。細胞株は、欠失されたAAV遺伝子repおよびcapならびに必要とされるヘルパーウイルス機能を提供する。アデノウイルスヘルパー遺伝子であるVA-RNA、E2AおよびE4は、2種類の別個のプラスミドまたは単一のヘルパー構築物のいずれかに載せて、AAV repおよびcap遺伝子と共にトランスフェクションされる。ITRにより両側から挟まれる、導入遺伝子発現カセット（対象となる遺伝子（例えば、PGRN核酸；プロモーター；および最小調節エレメントを含む）を用いてAAVカプシド遺伝子が置き換えられている組み換えAAVベクタープラスミドも、トランスフェクションされる。これらのパッケージングプラスミドは、典型的には、残余の必要とされるAdヘルパー遺伝子E1AおよびE1Bを構成的に発現するヒト細胞株である、293細胞へとトランスフェクションされる。これにより、対象となる遺伝子を担持するAAVベクターの増幅およびパッケージングがもたらされる。

【０１３４】

12種類のヒト血清型および非ヒト霊長類由来の100種類超の血清型をはじめとする、AAVの複数の血清型が、現在特定されている（Howarth et al. Cell Biol Toxicol 26:1-10 (2010)）。本発明のAAVベクターは、いずれかの公知の血清型のAAV由来の

カプシド配列を含むことができる。本明細書中で用いる場合、「公知の血清型」とは、当技術分野で公知の方法を用いて作製できるカプシド突然変異体を包含する。そのような方法としては、例えば、ウイルスカプシド配列の遺伝子操作、異なる血清型同士のカプシド領域の露出表面のドメインスワッピング、およびマーカーレスキューなどの技術を用いるAAVキメラの作製が挙げられる。Bowles et al. Marker rescue of adeno-associated virus (AAV) capsid mutants: A novel approach for chimeric AAV production. Journal of Virology, 77(1): 423-432 (2003)、ならびにその中で引用される参考文献を参照されたい。さらに、本発明のAAVベクターは、いずれかの公知の血清型のAAV由来のITRを含むことができる。優先的には（preferentially）、ITRは、ヒト血清型AAV1～AAV12のうちの1種類に由来する。本発明の一部の実施形態に従えば、偽型化アプローチが用いられ、このとき、あるITR血清型のゲノムが、異なる血清型カプシドへとパッケージングされる。

【０１３５】

一部の実施形態に従えば、カプシド配列は、ヒト血清型AAV1～AAV12のうちの1種から誘導される。一部の実施形態に従えば、カプシド配列は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV2.retro、およびそれらの変異体またはハイブリッド（例えば、HSPG突然変異を有するAAV2変異体、（AAV2-HBKO、AAVT-TT、AAV44.9）、AAV1+9ハイブリッド）から誘導される。一部の実施形態に従えば、特定のカプシド配列は、強化された神経および脳形質導入を授ける。一部の実施形態に従えば、カプシド配列は、CNSの細胞（例えば、神経細胞、星状膠細胞）を標的化するための高い指向性を有するAAV2変異体から誘導される。一部の実施形態に従えば、AAVはAAV9である。一部の実施形態に従えば、AAVはAAVrh10である。

【０１３６】

AAV指向性は、別個の（distinct）ウイルスカプシドタンパク質とその同族の細胞受容体との具体的に相互作用により決定される。したがって、標的とされる組織に適切なカプシドを有するrAAVを選択することができる。一部の実施形態に従えば、組み換えAAVベクターは、ウイルスカプシド配列、特にAAV3次元構造のループアウト領域での遺伝子操作により、または異なる血清型同士のカプシド領域の露出表面のドメインスワッピングにより、またはマーカーレスキューなどの技術を用いるAAVキメラの作製により、直接的に標的化することができる。Bowles et al. Marker rescue of adeno-associated virus (AAV) capsid mutants: A novel approach for chimeric AAV production. Journal of Virology, 77(1): 423-432 (2003)、ならびにその中で引用される参考文献を参照されたい。

【０１３７】

組み換えAAV（rAAV）ベクターの生成、精製、および特性決定のための1つの考えられるプロトコールが、Choi et al.に提供されている。概して、以下のステップが含まれる：導入遺伝子発現カセットを設計すること、特異的受容体を標的化するためのカプシド配列を設計すること、アデノウイルス不含rAAVベクターを作製すること、精製および力価決定すること。これらのステップは、下記に概説され、かつChoi et al.に詳細に説明されている。

【０１３８】

導入遺伝子発現カセットは、一本鎖AAV（ssAAV）ベクターまたは偽二本鎖導入遺伝子としてパッケージングされる「二量体」もしくは自己相補的AAV（scAAV）ベクターであり得る（Choi et al.；Howarth et al.）。従来型のssAAVベクターの使用は、一般的に、二本鎖DNAへの一本鎖AAV DNAの必要とされる変換に起因して、遺伝子発現の遅延した開始（導入遺伝子発現のプラトーに達するまで数日間から数週間）を生じる。対照的に、scAAVベクターは、静止細胞の形質導入から数日間以内にプラトーに達する、数時間以内の遺伝子発現の開始を示す（Heilbronn）。一部の実施形態に従えばscAAVが使用されるが、このscAAVは、一本鎖AAVと比較して、迅速な形質導入の開始およ

び増加した安定性を有する。あるいは、導入遺伝子発現カセットを、2つのAAVベクターに分けることができ、これにより、より長い構築物の送達が可能になる。例えば、Daya S. and Berns, K.I., Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clinical Microbiology Reviews, 21(4): 583-593 (2008)（本明細書中、以下では、Daya et al.）を参照されたい。ssAAVベクターは、repおよびcap断片を除去するために制限エンドヌクレアーゼを用いて適切なプラスミド（例えば、PGRN遺伝子を含むプラスミドなど）を消化するステップ、およびAAVwt-ITRを含むプラスミド骨格をゲル精製するステップにより、構築することができる（Choi et al.）。続いて、所望の導入遺伝子発現カセットを、適切な制限部位の間に挿入することにより、一本鎖rAAVベクタープラスミドを構築することができる。scAAVベクターは、Choi et al.に記載される通りに構築することができる。

【０１３９】

続いて、rAAVベクターおよび好適なAAVヘルパープラスミドおよびpXX6 Adヘルパープラスミドの大規模プラスミド調製物（少なくとも1mg）を、二重CsCl勾配分画により精製することができる（Choi et al.）。好適なAAVヘルパープラスミドは、AAV血清型1～5のカプシドへのAAV2 ITRゲノムの交差パッケージングをそれぞれが可能にする、pXRシリーズのpXR1～pXR5から選択することができる。適切なカプシドは、対象となる細胞のカプシドによる標的化の効率に基づいて、選択することができる。ゲノム（すなわち、導入遺伝子発現カセット）長およびAAVカプシドを変化させる公知の方法を、発現および/または特定の細胞タイプ（例えば、網膜錐体細胞）への遺伝子移入を改善するために、利用することができる。例えば、Yang GS, Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: Effects of viral capsid and genome size. Journal of Virology, 76(15): 7651-7660を参照されたい。

【０１４０】

次に、293細胞を、pXX6ヘルパープラスミド、rAAVベクタープラスミド、およびAAVヘルパープラスミドを用いてトランスフェクションする（Choi et al.）。続いて、分画した細胞溶解物を、rAAV精製の複数ステッププロセス、およびそれに続くCsCl勾配精製またはヘパリンセファロースカラム精製のいずれかに供する。rAAVビリオンの生成および定量化は、ドットブロットアッセイを用いて測定できる。細胞培養中のrAAVのin vitro形質導入を、ウイルスの感染性および発現カセットの機能性を確認するために用いることができる。

【０１４１】

Choi et al.に記載される方法に加えて、AAVの生成のための様々な他のトランスフェクション法を、本発明の文脈で用いることができる。例えば、リン酸カルシウム沈殿プロトコールに依る方法をはじめとする、一時的トランスフェクション法が利用可能である。

【０１４２】

rAAVベクターを生成するための実験室規模の方法に加えて、本発明は、例えば、Heilbronn；Clement, N. et al. Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies. Human Gene Therapy, 20: 796-606をはじめとする、AAVベクターのバイオリアクター規模の製造に関する当技術分野で公知の技術を利用することができる。

【０１４３】

多量の臨床グレードrAAVベクターを得られる拡張性のある生成システムの望ましいゴールを達成するための大幅な進展が、細胞でのrAAV生成に必要な遺伝的エレメントを送達する手段としてトランスフェクションを利用する生成システムでなされてきた。例えば、混入アデノウイルスヘルパーの除去は、第3のプラスミドがアデノウイルスヘルパータンパク質をコードする核酸配列を含む、3種プラスミドトランスフェクション系でのプラスミドトランスフェクションを用いてアデノウイルス感染を置き換えることにより、回避されてきた（Xiao, et al. 1998）。2種プラスミドトランスフェクション系での改善

もまた、生成プロセスを簡略化し、かつrAAVベクター生成効率を増大させてきた（Grimm, et al. 1998）。

【０１４４】

培養哺乳動物細胞からのrAAVの収量を改善するための数種類の戦略は、遺伝子操作により作製される特殊なプロデューサー細胞の開発に基づく。1つのアプローチでは、大規模でのrAAVの生成は、挿入されたAAVゲノムを、ヘルパーアデノウイルスまたはHSVを細胞に感染させることにより「レスキュー」できる、遺伝子操作型「プロウイルス」細胞株を用いることにより遂行されてきた。プロウイルス細胞株は、単純なアデノウイルス感染によりレスキューすることができ、これにより、トランスフェクションプロトコールと比較して高い効率が提供される。

【０１４５】

細胞からのrAAVの収量を改善するための第2の細胞ベースのアプローチは、そのゲノム中に、AAV repおよびcap遺伝子、またはrep-capおよびITR-対象となる遺伝子の両方のいずれかを保持する遺伝子操作型「パッケージング」細胞株の使用を含む（Qiao, et al. 2002）。前者のアプローチでは、rAAVを生成するために、パッケージング細胞株に、ヘルパー機能を、およびAAV ITR-GOIエレメントを、感染またはトランスフェクションする。後者のアプローチは、ヘルパー機能のみを用いる細胞の感染またはトランスフェクションを伴う。典型的には、パッケージング細胞株を用いるrAAV生成は、野生型アデノウイルス、または組み換えアデノウイルスを細胞に感染させることにより開始される。パッケージング細胞はrepおよびcap遺伝子を含むので、これらのエレメントを外来的に供給する必要がない。

【０１４６】

パッケージング細胞株からのrAAV収量は、プロウイルス細胞株レスキューまたはトランスフェクションプロトコールにより得られるよりも高いことが示されている。

【０１４７】

rAAVの収量の改善は、組み換えHSVアンプリコンシステムを使用する、単純ヘルペスウイルス（HSV）由来のヘルパー機能の送達に基づくアプローチを用いてなされてきた。細胞1個当たり150～500ウイルスゲノム（vg）の桁の控え目なレベルのrAAVベクター収量が当初報告されたが（Conway, et al. 1997）、rHSVアンプリコンに基づくシステムでのより最近の改善は、相当に高収量のrAAV v.g.および細胞1個当たりの感染性粒子（ip）をもたらした（Feudner, et al. 2002）。アンプリコンシステムは、元来複製欠損であるが；しかしながら、「骨抜きの」（gutted）ベクター、複製能を有する（rcHSV）、または複製欠損型のrHSVの使用は未だ、rAAV生成システムへと免疫原性HSV構成要素を導入する。したがって、これらの構成要素のための適切なアッセイおよびそれらの除去のための対応する精製プロトコールを、実行しなければならない。

【０１４８】

これらの方法に加えて、哺乳動物細胞で組み換えAAVウイルス粒子を生成するための方法が本明細書中に記載され、該方法は、それぞれがプロモーターに機能的に連結されたAAV repおよびAAV cap遺伝子をコードする核酸配列を含む第1の組み換えヘルペスウイルス、ならびに対象となる遺伝子のパッケージングを促進するためのAAV逆位末端反復に隣接された、PGRN遺伝子、および該PGRN遺伝子に機能的に連結されたプロモーターを含む第2の組み換えヘルペスウイルスを、懸濁液中での生育が可能な哺乳動物細胞に共感染させるステップ、および該哺乳動物細胞にウイルスを感染させ、それにより哺乳動物細胞中で組み換えAAVウイルス粒子を生成するステップを含む。

【０１４９】

ヘルペスウイルスの複製を支持することが可能ないずれかのタイプの哺乳動物細胞が、本明細書中に記載される通りの本発明の方法に従う使用に対して好適である。したがって、哺乳動物細胞は、本明細書中の方法中に記載される通りのヘルペスウイルスの複製のための宿主細胞と見なすことができる。細胞がヘルペスウイルスの複製を支持することが可能である限り、宿主細胞としての使用のためのいずれかの細胞タイプが、本発明により考

慮される。好適な遺伝的に改変されていない哺乳動物細胞の例としては、限定するものではないが、HEK-293（293）、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5などの細胞株が挙げられる。

【０１５０】

本発明の様々な実施形態で用いられる宿主細胞は、例えば、ヒト胎児腎臓細胞または霊長類細胞などの哺乳動物細胞から誘導することができる。他の細胞タイプとしては、限定するものではないが、BHK細胞、Vero細胞、CHO細胞または細胞がヘルペスウイルス許容性である限り、それに対して組織培養技術が確立されているいずれかの真核細胞が挙げられる。用語「ヘルペスウイルス許容性」とは、ヘルペスウイルスまたはヘルペスウイルスベクターが、細胞内環境で完全な細胞内ウイルス生活環を完結させることができることを意味する。特定の実施形態では、記載される通りの方法は、懸濁液中で生育している哺乳動物細胞株BHK中で行なわれる。宿主細胞は、既存の細胞株から（例えば、BHK細胞株から）誘導できるか、または新規に開発することができる。

【０１５１】

本明細書中に記載されるrAAV遺伝子構築物を作製するための方法は、それぞれがプロモーターに機能的に連結されたAAV repおよびAAV cap遺伝子をコードする核酸を含む第1の組み換えヘルペスウイルス、ならびに(ii) PGRN、および該PGRN遺伝子に機能的に連結されたプロモーターを含む第2の組み換えヘルペスウイルスを用いて、懸濁液中で生育可能な哺乳動物細胞に共感染させるステップ；ならびに哺乳動物細胞にウイルスを感染させ、それにより哺乳動物細胞中で組み換えAAVウイルス粒子を生成するステップを含む方法により、哺乳動物細胞中で生成される組み換えAAVウイルス粒子も含む。本明細書中に記載される場合、ヘルペスウイルスは、サイトメガロウイルス（CMV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）ならびに水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）およびエプスタイン・バーウイルス（EBV）からなる群より選択されるウイルスである。組み換えヘルペスウイルスは、複製欠損型である。一部の実施形態に従えば、AAV cap遺伝子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV2.retro、およびそれらの変異体またはハイブリッド（例えば、HSPG突然変異を有するAAV2変異体、(AAV2-HBKO、AAVT-TT、AAV44.9)、AAV1+9ハイブリッド）からなる群より選択される血清型を有する。一部の実施形態に従えば、特定のカプシド配列は、強化された神経および脳形質導入を授ける。一部の実施形態に従えば、AAVはAAV9である。一部の実施形態に従えば、AAVはAAVrh10である。

【０１５２】

米国特許出願公開第2007/0202587号（その全体で参照により本明細書中に組み入れられる）は、rAAV生成システムの必要なエレメントを記載する。組み換えAAVは、プロデューサー細胞として知られる細胞への遺伝子構築物の導入により、in vitroで生成される。rAAVの生成のための公知のシステムは、3種類の基本的なエレメントを利用する：(1) 対象となる遺伝子を含む遺伝子カセット、(2) AAV repおよびcap遺伝子を含む遺伝子カセットおよび(3) 「ヘルパー」ウイルスタンパク質の供給源。

【０１５３】

第1の遺伝子カセットは、AAV由来の逆位末端反復（ITR）に隣接された対象となる遺伝子を用いて構築される。ITRは、宿主細胞ゲノムへの対象となる遺伝子のインテグレーションに向かわせるために機能し、かつ組み換えゲノムのカプシド化に対して必須である（Hermonat and Muzyczka, 1984；Samulski et al. 1983）。第2の遺伝子カセットは、rAAVの複製およびパッケージングに必要とされるタンパク質をコードするAAV遺伝子であるrepおよびcapを含む。rep遺伝子は、DNA複製に必要とされる4種類のタンパク質（Rep78、68、52および40）をコードする。cap 遺伝子は、ウイルスカプシドを構成する3種類の構造タンパク質（VP1、VP2、およびVP3）をコードする（Muzyczka and Berns, 2001）。

【０１５４】

AAVはそれ自体では複製しないので、第3のエレメントが必要とされる。ヘルパー機能は、rAAVの効率的な複製およびパッケージングをもたらす細胞環境をつくり出す、ヘルパーDNAウイルス由来のタンパク質産物である。慣用的には、アデノウイルス（Ad）がrAAVに対するヘルパー機能を提供するために用いられてきたが、ヘルペスウイルスもまた、本明細書中で議論される通りにこれらの機能を提供することができる。

【０１５５】

遺伝子療法のためのrAAVベクターの生成は、懸濁液中で生育したBHK細胞などの好適なプロデューサー細胞株を用いて、in vitroで行なわれる。本発明での使用のために好適な他の細胞株は、HEK-293 (293)、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5を含む。

【０１５６】

細胞がヘルペスウイルスの複製を支持することが可能である限り、いずれの細胞タイプでも、宿主細胞として用いることができる。当業者は、宿主細胞からのヘルペスウイルスの生成で用いることができる広範囲の宿主細胞に精通しているであろう。好適な遺伝的に改変されていない哺乳動物宿主細胞の例としては、例えば、限定するものではないが、HEK-293（293）、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5などの細胞株が挙げられる。

【０１５７】

宿主細胞は、懸濁培養中での生育に適応させることができる。宿主細胞は、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞であり得る。懸濁液中で生育されるBHK細胞株は、接着性BHK細胞株の適応から誘導される。両方の細胞株が市販されている。

【０１５８】

rAAV生成のために必要なエレメントのうちのすべてを送達するための1つの戦略は、2種類のプラスミドおよびヘルパーウイルスを利用する。この方法は、必要な遺伝子産物をコードする遺伝子カセットを含むプラスミドを用いるプロデューサー細胞のトランスフェクション、ならびにヘルパー機能を提供するためのAdを用いる細胞の感染に依存する。このシステムは、2種類の異なる遺伝子カセットを有するプラスミドを利用する。第1のプラスミドは、rAAVとしてパッケージングされる対象である組み換えDNAをコードするプロウイルスプラスミドである。第2のプラスミドは、repおよびcap遺伝子をコードするプラスミドである。細胞へとこれらの様々なエレメントを導入するために、細胞をAdに感染させ、ならびに2種類のプラスミドを用いてトランスフェクションする。Adにより提供される遺伝子産物は、遺伝子E1a、E1b、E2a、E4orf6、およびVaによりコードされる（Samulski et al. 1998；Hauswirth et al. 2000；Muzyczka and Burns, 2001）。あるいは、より近年のプロトコールでは、Ad感染ステップは、VA、E2AおよびE4遺伝子を含むアデノウイルス「ヘルパープラスミド」を用いるトランスフェクションにより置き換えることができる（Xiao et al. 1998；Matsushita, et al. 1998）。

【０１５９】

Adは、rAAV生成のためのヘルパーウイルスとして慣用されてきたが、1型単純ヘルペスウイルス（HSV-1）などの他のDNAウイルスを同様に用いることができる。AAV2複製およびパッケージングに必要とされるHSV-1遺伝子の最小セットが特定されており、初期遺伝子UL5、UL8、UL52およびUL29を含む（Muzyczka and Burns, 2001）。これらの遺伝子は、HSV-1コア複製機構の構成要素、すなわち、ヘリカーゼ、プライマーゼ、プライマーゼ補助タンパク質、および一本鎖DNA結合性タンパク質をコードする（Knipe, 1989; Weller, 1991）。HSV-1のこのrAAVヘルパー特性は、rAAV生成のために必要とされるヘルパーウイルス遺伝子産物を提供することが可能である組み換えヘルペスウイルスベクターの設計および構築で利用されてきた（Conway et al. 1999）。

【０１６０】

遺伝子療法のためのrAAVベクターの生成は、懸濁液中で生育したBHK細胞などの好適

なプロデューサー細胞株を用いて、in vitroで行なわれる。本発明での使用のために好適な他の細胞株は、HEK-293 (293)、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5を含む。

【０１６１】

細胞がヘルペスウイルスの複製を支持することが可能である限り、いずれの細胞タイプでも、宿主細胞として用いることができる。当業者は、宿主細胞からのヘルペスウイルスの生成で用いることができる広範囲の宿主細胞に精通しているであろう。好適な遺伝的に改変されていない哺乳動物宿主細胞の例としては、例えば、限定するものではないが、HEK-293（293）、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5などの細胞株が挙げられる。

【０１６２】

宿主細胞は、懸濁培養中での生育に適応させることができる。本発明の特定の実施形態では、宿主細胞は、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞である。懸濁液中で生育されるBHK細胞株は、接着性BHK細胞株の適応から誘導される。両方の細胞株が市販されている。

【０１６３】

rHSVに基づくrAAV製造プロセス

懸濁液中で生長する細胞での組み換えAAVウイルス粒子の生成のための方法が、本明細書中に記載される。連続的な確立された細胞株に由来する懸濁培養または係留非依存的培養は、細胞および細胞生成物の大規模生成の最も広く用いられる手段である。発酵技術に基づく大規模懸濁培養は、哺乳動物細胞生成物の製造のための明らかな利点を有する。均一条件は、温度、溶存酸素、およびpHの正確なモニタリングおよび制御を可能にするバイオリアクターで提供することができ、かつ培養物の代表的サンプルを取得できることを確実にする。用いるrHSVベクターは、組織培養フラスコおよびバイオリアクターの両方で、許容性細胞株に対する高力価へと容易に増殖されて、臨床的製造および市場生産のために必要なウイルス産生レベルへのスケールアップに適した生産プロトコールが提供される。

【０１６４】

撹拌槽バイオリアクターでの細胞培養は、非常に高容量の特定の培養表面積を提供し、かつウイルスワクチン製造のために用いられてきた（Griffiths, 1986）。さらに、撹拌槽バイオリアクターは、拡張性があることが工業的に証明されている。1つの例は、マルチプレートCELL CUBE細胞培養システムである。感染性ウイルスベクターを生成する能力は、特に遺伝子療法の文脈で、製薬産業にとってますます重要になっている。

【０１６５】

本明細書中に記載される方法に従う細胞の生育は、本発明のヘルペスベクターにより感染させることが可能である完全に生物学的に活性な細胞の大規模生成を可能にするバイオリアクター中で行なうことができる。バイオリアクターは、懸濁および係留依存的動物細胞培養の両方からの生物学的生成物の製造のために広く用いられてきた。大多数の大規模懸濁培養は、それらが稼働およびスケールアップのために最も直接的であるので、バッチプロセスまたはフェドバッチプロセスとして稼働される。しかしながら、ケノスタットまたは灌流原理に基づく連続プロセスが利用可能である。バイオリアクターシステムは、培地交換を可能にするシステムを含めて設定することができる。例えば、培地交換を促進するために、使用済み培地からの細胞の分離を可能にするフィルターを、バイオリアクターシステムに組み入れることができる。ヘルペスウイルスを生成するための本方法の一部の実施形態に従えば、培地交換および灌流は、一定日数の細胞生育から始めて行なわれる。例えば、培地交換および灌流は、細胞生育の3日目に開始することができる。フィルターは、バイオリアクターに対して外部であり得、またはバイオリアクターに対して内部であり得る。

【０１６６】

組み換えAAVウイルス粒子を生成するための方法は、以下のステップを含むことがで

きる：それぞれがプロモーターに機能的に連結されたAAV repおよびAAV cap遺伝子をコードする核酸を含む第1の組み換えヘルペスウイルス、ならびにPGRN遺伝子構築物、および該対象となる遺伝子に機能的に連結されたプロモーターを含む第2の組み換えヘルペスウイルスを用いて、懸濁細胞を共感染させるステップ；ならびに組み換えAAVウイルス粒子を細胞に生成させ、それにより組み換えAAVウイルス粒子を生成するステップ。細胞は、HEK-293（293）、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5であり得る。一部の実施形態に従えば、cap遺伝子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV2.retro、およびそれらの変異体またはハイブリッド（例えば、HSPG突然変異を有するAAV2変異体、（AAV2-HBKO、AAVT-TT、AAV44.9）、AAV1+9ハイブリッド）からなる群より選択される血清型を有するAAVから選択することができる。一部の実施形態に従えば、特定のカプシド配列は、強化された神経および脳形質導入を授ける。一部の実施形態に従えば、AAVはAAV9である。一部の実施形態に従えば、AAVはAAVrh10である。細胞は、3～14の組み合わせた感染多重度（MOI）で感染させることができる。第1のヘルペスウイルスおよび第2のヘルペスウイルスは、サイトメガロウイルス（CMV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）ならびに水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）およびエプスタイン・バーウイルス（EBV）からなる群より選択されるウイルスであり得る。ヘルペスウイルスは、複製欠損型であり得る。共感染は、同時であり得る。

【０１６７】

一部の実施形態に従えば、組み換えAAVウイルス粒子は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）をさらに含む。

【０１６８】

哺乳動物細胞で組み換えAAVウイルス粒子を生成するための方法は、それぞれがプロモーターに機能的に連結されたAAV repおよびAAV cap遺伝子をコードする核酸を含む第1の組み換えヘルペスウイルス、ならびにPGRN遺伝子構築物、および該PGRN遺伝子構築物に機能的に連結されたプロモーターを含む第2の組み換えヘルペスウイルスを用いて、懸濁細胞を共感染させるステップ；ならびに細胞を増殖させ、それにより組み換えAAVウイルス粒子を生成するステップを含むことができ、それにより、生成されるウイルス粒子の数は、接着条件下で等しい数の細胞で増殖するウイルス粒子の数と等しいかまたはそれより多い。細胞は、HEK-293（293）、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5であり得る。cap遺伝子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV2.retro、およびそれらの変異体またはハイブリッド（例えば、HSPG突然変異を有するAAV2変異体、(AAV2-HBKO、AAVT-TT、AAV44.9)、AAV1+9ハイブリッド）からなる群より選択される血清型を有するAAVから選択することができる。一部の実施形態に従えば、AAVはAAVrh10である。一部の実施形態に従えば、AAVはAAV9である。一部の実施形態に従えば、特定のカプシド配列は、強化された神経および脳形質導入を授ける。細胞は、3～14の組み合わせた感染多重度（MOI）で感染させることができる。第1のヘルペスウイルスおよび第2のヘルペスウイルスは、サイトメガロウイルス（CMV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）ならびに水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）およびエプスタイン・バーウイルス（EBV）からなる群より選択されるウイルスであり得る。ヘルペスウイルスは、複製欠損型であり得る。共感染は、同時であり得る。

【０１６９】

懸濁細胞へと治療的タンパク質をコードする核酸配列を送達するための方法であって、該方法は、以下のステップを含む：それぞれがプロモーターに機能的に連結されたAAV repおよびAAV cap遺伝子をコードする核酸を含む第1の組み換えヘルペスウイルス、ならびにPGRN遺伝子構築物であって、対象となる遺伝子が治療的タンパク質コード配列を含む構築物、および該PGRN遺伝子に機能的に連結されたプロモーターを含む第2のヘル

ペスウイルスを用いて、BHK細胞を共感染させるステップであって、該細胞に3～14の組み合わせた感染多重度（MOI）で感染させるステップ；ならびにウイルスを細胞に感染させ、かつ治療的タンパク質を発現させて、それにより、細胞へと治療的タンパク質をコードする核酸配列を送達するステップ。細胞は、HEK-293（293）、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5であり得る。例えば、米国特許第9,783,826号を参照されたい。

【０１７０】

V. 治療方法

AAVおよび遺伝子療法

遺伝子療法とは、疾患の原因となる遺伝子を置き換えるか、変化させるか、または補充することによる、遺伝性または後天性疾患の治療を意味する。遺伝子療法は、一般的にはビヒクルまたはベクターによる、宿主細胞への修正的遺伝子（単数または複数）の導入により達成される。rAAVを用いる遺伝子療法は、多数の疾患の治療に対して非常に有望である。神経変性疾患の治療を支持するために、組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）を生成する方法、および特に大量の組み換えAAVを生成する方法が、本明細書中に記載される。

【０１７１】

現在までに、500種類を超える遺伝子療法の臨床試験が、全世界で行なわれてきた。遺伝子療法に対するビヒクルとしてrAAVを用いるための努力は、ヒト疾患に対する治療としてのその適用可能性のために、有望である。既に、脳、肝臓、骨格筋および肺の臨床的に重要な非分裂性細胞をはじめとする、動物体内の細胞への導入された遺伝子の送達および長期的発現のために組み換えAAV（rAAV）を用いて、いくつかの成功が前臨床的に収められている。一部の組織では、AAVベクターは、標的細胞のゲノムへとインテグレーションすることが示されている（Hirata, et al. 2000, J. of Virology 74:4612-4620）。

【０１７２】

rAAVの追加的な利点は、肝細胞、ニューロンおよび骨格筋細胞をはじめとする非分裂性細胞タイプで、この機能を実行するその能力である。rAAVは、マウスの骨格筋でのエリスロポエチン（Kessler, et al. 1996）、パーキンソン病のサルモデルでのCNS中のチロシンヒドロキシラーゼおよび芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ（Kaplitt, et al. 1994）ならびに血友病の動物モデルでの骨格筋および肝臓中の第IX因子の発現を可能にするために、遺伝子療法ビヒクルとして成功裏に用いられてきた。臨床レベルでは、rAAVベクターは、嚢胞性線維症患者に対してCFTR遺伝子を、および血友病患者に対して第IX因子遺伝子を送達するために、ヒト臨床試験で用いられてきた（Flotte, et al. 1998；Wagner, et al. 1998）。さらに、AAVは、ヒトまたは哺乳動物で疾患に関連付けられていない、ヘルパー依存性DNAパルボウイルスである（Berns and Bohensky, 1987, Advances in Virus Research, Academic Press Inc, 32:243-307）。したがって、AAVベクターの最も重要な属性のうちの1つは、第I相臨床試験でのそれらの安全性プロフィールである。

【０１７３】

AAV遺伝子療法は、多数の異なる病理学的設定で、かつ様々な疾患および障害を治療するために、行なわれてきた。例えば、第I相試験で、8名の血友病B被験体の骨格筋へのAAV2-FIXベクターの投与は、安全であることが証明され、かつ局所的な遺伝子移入およびベクター注入後から少なくとも10ヵ月間の第IX因子発現を達成し（Jiang, et al. Mol Ther. 14 (3):452-5 2006）、AAT欠損成人への組み換えアデノ随伴ウイルスα1-アンチトリプシン（rAAV2-CB-hAAT）遺伝子ベクターの筋内注入の第I相試験が以前に記載され（Flotte, et al. Hum Gene Ther. 2004 15(1):93-128）、別の臨床試験では、視床下核のAA V-GAD遺伝子療法が、安全であること、および進行型パーキンソン病を有する患者による良好な耐容性が示された（Kaplitt et al. Lancet. 200723; 369(9579):2097-105）。

【０１７４】
プログラニュリンおよび神経変性疾患
被験体での神経変性疾患を治療するために用いることができる方法が、本明細書中に提供される。一部の実施形態に従えば、神経変性疾患は、被験体での遺伝性突然変異により媒介される。一部の実施形態に従えば、神経変性疾患は、被験体に対する環境的傷害により媒介される。本明細書中で用いる場合、患者に対する環境的傷害により媒介される神経変性疾患とは、環境的傷害により引き起こされ、かつプログラニュリン発現を変化させるプログラニュリン遺伝子の遺伝性突然変異により引き起こされない疾患を意味する。遺伝性突然変異は、患者の子孫へと伝搬される可能性がある、患者のＤＮＡ中の永続的突然変異である。ＣＮＳ細胞への、特に神経細胞への、本明細書中に記載される核酸のうちの１種以上の送達は、神経変性疾患を治療するために用いることができる。
【０１７５】
一部の実施形態に従えば、限定するものではないが、家族性前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、前頭側頭葉変性症（ＦＴＬＤ）、神経セロイドリポフスチン症（ＮＣＬ）（１１型神経セロイドリポフスチン症（ＣＬＮ１１）およびバッテン病を含む）、およびアルツハイマー病（ＡＤ）をはじめとするプログラニュリン関連神経変性疾患を治療するための、ＰＧＲＮ ＡＡＶに基づく遺伝子療法を利用する方法が、本明細書中に提供される。一部の実施形態に従えば、限定するものではないが、家族性前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、前頭側頭葉変性症（ＦＴＬＤ）、神経セロイドリポフスチン症（ＮＣＬ）（１１型神経セロイドリポフスチン症（ＣＬＮ１１）およびバッテン病を含む）、およびアルツハイマー病（ＡＤ）をはじめとするプログラニュリン関連神経変性障害を予防するための、ＰＧＲＮ ＡＡＶに基づく遺伝子療法を利用する方法が、本明細書中に提供される。
【０１７６】
本明細書中に記載される方法は、哺乳動物細胞中での組み換えＡＡＶウイルス粒子の生成を可能にし、第１の組み換えヘルペスウイルス、ならびに、限定するものではないが、家族性前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）および１１型神経セロイドリポフスチン症（ＣＬＮ１１）をはじめとするプログラニュリン関連神経変性障害の治療で治療的価値を有するプログラニュリン遺伝子構築物を含む第２の組み換えヘルペスウイルスを用いて、懸濁液中で生育可能な哺乳動物細胞を共感染させるステップを含む。
【０１７７】
本明細書中に記載される遺伝子療法構築物は、プログラニュリン関連神経変性障害の治療および/または予防のための方法および組成物中で用いることができる。プログラニュリン関連神経変性障害としては、限定するものではないが、家族性前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）の発生率のうちの２０％および１１型神経セロイドリポフスチン症（ＣＬＮ１１）の全例、限定するものではないが、家族性前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、前頭側頭葉変性症（ＦＴＬＤ）、神経セロイドリポフスチン症（ＮＣＬ）（１１型神経セロイドリポフスチン症（ＣＬＮ１１）およびバッテン病を含む）、およびアルツハイマー病（ＡＤ）をはじめとする神経変性障害が挙げられる。
【０１７８】
分泌型糖タンパク質であるプログラニュリンは、単一のＧＲＮ遺伝子によりヒトではコードされる。プログラニュリン（ＰＧＲＮ）は、脳のミクログリアにより優勢的に発現される。プログラニュリン（ＰＧＲＮ）は、真核細胞からヒトまでの広範囲の生物種で、高度に保存されかつ見出される、分泌型の５９３アミノ酸多機能タンパク質である。ＰＧＲＮは、ＣＮＳ全体を通して広く分布し、ＣＮＳでは、ＰＧＲＮは主にニューロンおよびミクログリアで見出されるが、はるかに低いレベルで、星状膠細胞およびオリゴデンドロサイトでも検出されてきた。プログラニュリンは、７個半の、タンデムに反復される１２システイングラニュリンモチーフの非同一なコピーからなる。多数の細胞プロセスおよび疾患が、この固有の多面的因子に関連付けられており、そのようなプロセスとしては、限定するものではないが、胚形成、腫瘍形成、炎症、創傷修復、神経変性およびリソソーム機能が挙げられる。ＧＲＮ遺伝子内の常染色体優性突然変異により引き起こされるハプロ不全は、前頭側

頭型認知症として患者に現われる進行性の神経萎縮である、前頭側頭葉変性症をもたらす。前頭側頭型認知症は、アルツハイマー病とは異なり、早期発症型の認知症である。前頭側頭葉認知症のGRN関連形態は、ユビキチン化および断片化されたTDP-43（TARDBPによりコードされる）を含有する神経封入体の出現により特徴付けられるプロテイノパチーである（Chitramuthu et al. Brain 2017 140(12): 3081-3104；Suarez-Calvet et al. EMBO Molecular Medicine 2018 e9712）。

【０１７９】

本明細書中に記載されるプログラニュリン（PGRN）AAV構築物は、家族性前頭側頭型認知症（FTD）の発生率のうちの20％および11型神経セロイドリポフスチン症（CLN11）の全例を含む、PGRN関連神経変性障害の治療のための遺伝子療法ビヒクルを提供する。本明細書中に記載されるPGRN AAV遺伝子療法構築物および使用方法は、PGRN関連神経変性障害に罹患した患者に対して利用可能な遺伝子療法ベースの治療がないために、長年にわたって満たされていないニーズである、PGRN関連神経変性障害に対する療法を提供する。

【０１８０】

一部の実施形態に従えば、PGRN AAV遺伝子療法は、被験体が神経変性疾患を発症する前に投与される。一部の実施形態に従えば、被験体は、PGRN突然変異を特定するための分子遺伝学検査により、神経変性疾患を有すると診断される。一部の実施形態に従えば、被験体は、神経変性疾患を有する家族のメンバーを有する。

【０１８１】

本明細書中に記載されるrAAV構築物は、慣用的なAAVベクターがするよりも高い効率を伴って、CNS細胞、特に神経細胞を形質導入する。一部の実施形態に従えば、本明細書中に記載される組成物および方法は、CNS細胞、特に神経細胞への核酸の非常に効率的な送達を可能にする。一部の実施形態に従えば、本明細書中に記載される組成物および方法は、内有毛細胞のうちの少なくとも50％（例えば、少なくとも50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％）への導入遺伝子送達、およびその中での導入遺伝子の発現、または神経細胞のうちの少なくとも50％（例えば、少なくとも50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％）への送達、およびその中での発現を可能にする。一部の実施形態に従えば、本明細書中に記載される組成物および方法は、内有毛細胞のうちの少なくとも70％（例えば、少なくとも70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％）への導入遺伝子送達、およびその中での導入遺伝子の発現、または神経細胞のうちの少なくとも70％（例えば、少なくとも70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％）への送達、およびその中での発現を可能にする。一部の実施形態に従えば、本明細書中に記載される組成物および方法は、内有毛細胞のうちの少なくとも80％（例えば、少なくとも80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％）への導入遺伝子送達、およびその中での導入遺伝子の発現、または神経細胞のうちの少なくとも80％（例えば、少なくとも80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99）への送達、およびその中での発現を可能にする。

【０１８２】

一部の実施形態に従えば、本明細書中に記載される核酸配列は、得られる組み換え細胞のin vivo投与に先立って、細胞に直接的に導入され、細胞中で核酸配列が発現されて、コードされる産物が産生される。これは、例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションなどの方法によって、当技術分野で公知の多数の方法のうちのいずれかにより達成することができる。

【０１８３】

VI. 医薬組成物

一部の態様に従えば、本開示は、任意により製薬上許容される賦形剤中に、本明細書中に記載されるベクターのうちのいずれかを含む、医薬組成物を提供する。

【０１８４】

当技術分野で周知である通り、製薬上許容される賦形剤は、薬理学的に有効な物質の投与を促進し、かつ液体溶液もしくは懸濁液として、エマルジョンとして、または使用前の液体中での溶解もしくは懸濁に好適な固体形態として供給されることができる、比較的不活性な物質である。例えば、賦形剤は、形状もしくは粘稠度を与えるか、または希釈剤として機能することができる。好適な賦形剤としては、限定するものではないが、安定化剤、湿潤化剤および乳化剤、浸透圧を変更するための塩、カプセル化剤、pH緩衝物質、および緩衝剤が挙げられる。そのような賦形剤は、過度な毒性を伴うことなく投与することができる、耳（例えば、内耳または中耳）への直接的送達のために好適ないずれかの薬剤を含む。製薬上許容される賦形剤としては、限定するものではないが、ソルビトール、様々なTWEEN(登録商標)化合物のうちのいずれか、ならびに水、生理食塩液、グリセロールおよびエタノールなどの液体が挙げられる。製薬上許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等などの鉱酸塩；ならびに酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等などの有機酸の塩を、その中に含めることができる。製薬上許容される賦形剤の詳細な議論は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES（Mack Pub. Co., N.J. 1991）の中で利用可能である。

【０１８５】

一部の実施形態に従えば、rAAV組成物は、特に高濃度のrAAVが存在する場合に、組成物中でのAAV粒子の凝集を低減するために製剤化される。rAAVの凝集を低減するための方法は当技術分野で周知であり、かつ、界面活性剤の添加、pH調整、塩濃度調整などを含む（例えば、Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178を参照されたい。その内容は参照により本明細書中に組み入れられる）。

【０１８６】

一部の実施形態に従えば、医薬組成物は、BSST、PBSまたはBSSのうちの1種以上を含む。

【０１８７】

一部の実施形態に従えば、医薬組成物は、ヒスチジン緩衝剤をさらに含む。

【０１８８】

必要ではないが、組成物は、任意により、正確な量の投与のために好適な単位投与剤型で供給されることができる。

【０１８９】

VII. 投与方法

一般的に、本明細書中に記載される組成物は、CNSへの投与のために製剤化される。一部の実施形態に従えば、組成物は、神経細胞への投与のために製剤化される。

【０１９０】

一部の実施形態に従えば、投与は、脳内（例えば、大槽内（ICM）への）、カテーテルを用いるかもしくは用いない、髄腔内（IT）、静脈内（IV）、またはIVおよびITの組み合わせである。

【０１９１】

本明細書中で用いる場合、用語「髄腔内投与」とは、脊柱管への薬剤（例えば、rAAVを含む組成物）の投与を意味する。例えば、髄腔内投与は、脊柱管の頸部領域、脊柱管の胸部領域、または脊柱管の腰部領域での注入を含むことができる。典型的には、髄腔内投与は、脊柱管のくも膜と軟膜との間の領域である、脊柱管のくも膜下腔（subarachnoid cavity（subarachnoid space））へと、薬剤（例えば、rAAVを含む組成物）を注入することにより行なわれる。くも膜下腔は、小柱（くも膜から伸び、かつ軟膜へと溶け込む、壊れやすい結合組織線維）からなる海綿状組織および脳脊髄液を含む連絡流路により占められる。一部の実施形態に従えば、髄腔内投与は、脊髄脈管系への投与ではない。

【０１９２】

本明細書中で用いる場合、用語「脳内投与」とは、脳内および/または脳周囲への薬剤の投与を意味する。脳内投与としては、限定するものではないが、大脳、延髄、橋、小脳、頭蓋内腔、および脳を取り囲む髄膜への薬剤の投与が挙げられる。脳内投与は、脳の硬膜、くも膜、および軟膜への投与を含むことができる。脳内投与は、一部の実施形態では、小脳延髄（ＣＭ）槽への薬剤の投与を含むことができる。脳内投与は、一部の実施形態では、脳を取り囲むくも膜下腔の脳脊髄液（ＣＳＦ）への薬剤の投与を含むことができる。脳内投与は、一部の実施形態では、脳の脳室（例えば、右側脳室、左側脳室、第３脳室、第４脳室）への薬剤の投与を含むことができる。一部の実施形態に従えば、脳内投与は、脳の脈管系への投与ではない。

【０１９３】

脳内投与は、脳内および/または脳周囲への直接注入を含むことができる。一部の実施形態に従えば、脳内投与は、定位固定手順を用いる注入を含む。定位固定手順は、当技術分野で周知であり、かつ、典型的には、特定の脳内領域（例えば、脳室領域）へと注入を導くために一緒に用いられるコンピューターおよび３次元スキャンデバイスの使用を含む。マイクロ注入ポンプ（例えば、World Precision Instruments社から）を用いることもできる。一部の実施形態に従えば、マイクロ注入ポンプが、rAAVを含む組成物を送達するために用いられる。

【０１９４】

一部の実施形態に従えば、組成物の点滴速度は、１ｍＬ/分以下である。一部の実施形態に従えば、組成物の点滴速度は、約１０μＬ/分～１０００μＬ/分である。当業者には理解されるであろう通り、点滴速度は、例えば、被験体の生物種、被験体の年齢、被験体の体重/サイズ、AAVの血清型、必要とされる投与量、標的とされる脳内領域などをはじめとする様々な因子に依存するであろう。つまり、他の点滴速度が、特定の状況では適切であると当業者により見なされ得る。

【０１９５】

一部の実施形態に従えば、本明細書中に記載される通りのrAAVを含む組成物は、浸透圧ポンプまたは輸液ポンプを用いて投与される。浸透圧ポンプおよび輸液ポンプの両方が、様々な供給元（例えば、Alzet Corporation、Hamilton Corporation、Alza, Inc.、Palo Alto、Calif.）から市販されている。

【０１９６】

本明細書中に記載される通りにCNS細胞を安全かつ効率的に形質導入することにより、本発明の方法は、個体（例えば、ヒト）を治療するために用いることができ、このとき、形質導入された細胞は、神経変性疾患を治療または予防するために十分な量でPGRNを産生する。

【０１９７】

本発明の治療方法に従えば、送達されるベクターの体積は、被験体の年齢などの治療を受ける被験体の特性およびベクターが送達される対象の領域の体積に基づいて決定することができる。一部の実施形態に従えば、注入される組成物の体積は、約１０μＬ～約１０００μＬ、または約１００μＬ～約１０００μＬ、または約１００μＬ～約５００μＬ、または約５００μＬ～約１０００μＬである。一部の実施形態に従えば、注入される組成物の体積は、１μＬ、２μＬ、３μＬ、４μＬ、５μＬ、６μＬ、７μＬ、８μＬ、９μＬ、１０μＬ、１５μＬ、２０μＬ、２５μＬ、５０μＬ、７５μＬ、１００μＬ、２００μＬ、３００μＬ、４００μＬ、５００μＬ、６００μＬ、７００μＬ、８００μＬ、９００μＬ、もしくは１ｍＬのうちのおおよそいずれか１つ超、またはそれらの間のいずれかの量である。

【０１９８】

本開示の治療方法に従えば、投与されるベクターの濃度は、製造方法に応じて異なる場合があり、かつ特定の投与経路に対して治療上有効であると決定された濃度に基づいて、選択または最適化することができる。一部の実施形態に従えば、１ミリリットル当たりのベクターゲノム（ｖｇ/ｍＬ）での濃度は、約10^{8}ｖｇ/ｍＬ、約10^{9}ｖｇ/ｍＬ、約10^{10}ｖｇ/ｍＬ、約10^{11}ｖｇ/ｍＬ、約10^{12}ｖｇ/ｍＬ、約10^{13}ｖｇ/ｍＬ、および約10^{14}ｖｇ/ｍＬからなる

群より選択される。一部の実施形態では、濃度は、10^{11}vg/mL～10^{14}vg/mLの範囲内で、約0.1mL、約0.2mL、約0.4mL、約0.6mL、約0.8mL、および約1.0mLの体積である。

【０１９９】

本明細書中に記載される組成物の有効性は、数種類の基準によりモニタリングすることができる。

【０２００】

一部の実施形態に従えば、組成物の有効性は、PGRN rAAVを用いて治療される被験体での改善をモニタリングすることにより決定される。一部の実施形態に従えば、本明細書中に記載される組成物の有効性は、in vivoマウスモデルでモニタリングすることができる。例えば、$PGRN^{-/-}$KOマウスモデルでは、血中、CSF中および脳組織中の増加したPGRNタンパク質レベル；血中およびCSF中のニューロフィラメント-1（Nfl-1）の減少したレベル；脳組織由来のリポフスチンおよび細胞内TDP43の減少したレベルが、組成物の有効性の指標であり得る。一部の実施形態に従えば、本明細書中に記載される組成物の有効性は、ヒト疾患被験体でモニタリングすることができる。例えば、血中およびCSF中の増加したPGRNタンパク質レベル、血中およびCSF中のNfl-1の減少したレベル、ならびに行動および認知的改善を、組成物の有効性の指標として用いることができる。

【０２０１】

本発明のさらなる実施形態が、以下の実施例を参照して説明される。本明細書中に含まれる実施例は、例示のために提供され、限定を目的としない。

【実施例】

【０２０２】

実施例1．方法

本発明は、限定するものではないが、以下の方法を用いて行なわれた。本明細書中に記載される通りの方法は、発明の名称「Recombinant AAV Production in Mammalian Cells」である2007年8月8日出願のPCT出願第PCT/US2007/017645号に説明され、この出願は、現在では2006年8月15日発行の米国特許第7,091,029号である、2002年9月23日出願の発明の名称「High Titer Recombinant AAV Production」である米国特許出願第10/252,182号の部分継続出願である、2007年8月14日出願の発明の名称「Recombinant AAV Production in Mammalian Cells」である米国特許出願第11/503,775号の利益を主張する。上記の出願すべての内容が、それらの全体で参照により本明細書中に組み入れられる。

【０２０３】

rHSV共感染方法

組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）生成のためのrHSV共感染方法は、2種類のICP27欠損組み換え1型単純ヘルペスウイルス（rHSV-1）ベクターを利用し、1つはAAV repおよびcap遺伝子を担持し（rHSV-rep2capX、「capX」はAAV血清型のうちのいずれかを意味する）、かつ第2のベクターはAAV逆位末端反復（ITR）により隣接される、対象となる遺伝子（GOI）カセットを担持する。このシステムは、AAV血清型2 rep、cap、およびITR、ならびにヒト化緑色蛍光タンパク質遺伝子（GFP）を導入遺伝子として用いて開発されたが、システムは、異なる導入遺伝子および血清型/偽型エレメントを用いて利用することができる。

【０２０４】

哺乳動物細胞が、rHSVベクターを用いて感染され、それにより、すべてのシスおよびトランス作用性rAAV構成要素ならびに増殖性rAAV感染のための必要なヘルパー機能が提供される。細胞は、rHSV-rep2capXおよびrHSV-GOIの混合物を用いて感染される。細胞を回収し、かつrAAV-GOIを放出させるために溶解させ、得られたベクターストックは、以下に記載される様々な方法により力価決定される。

【０２０５】

DOC溶解

回収時に、細胞および培地を遠心分離により分離する。培地は取り置き、細胞ペレットを、2～3回の凍結融解サイクルを用いて、0.5%(w/v)デオキシコール酸塩（DOC）を含有する溶解バッファー（20mM Tris-HCl、pH8.0、150mM NaCl）を用いて抽出し、これにより、細胞に伴うrAAVが抽出される。一部の例では、培地および細胞に伴うrAAV溶解物は、再び併せられる。

【０２０６】

in situ溶解

rAAVを回収するための代替的な方法は、in situ溶解によるものである。回収時点で、$MgCl_2$を最終濃度1mMまで添加し、10%(v/v)Triton X-100を最終濃度1%(v/v)まで添加し、かつベンゾナーゼを最終濃度50単位/mLまで添加する。この混合物を、37℃で2時間、振盪または撹拌する。

【０２０７】

DRP収量を決定するための定量的リアルタイムPCR

DNアーゼ耐性粒子（DRP）アッセイは、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）技術を用いて、増幅されたDNA配列の検出および定量化のための配列特異的オリゴヌクレオチドプライマーおよび二重標識ハイブリダイズプローブを利用する。標的配列を、DNAにハイブリダイズし、かつコピー依存性蛍光を発する、蛍光発生プローブの存在下で増幅する。DRP力価（DRP/mL）は、試験品目の相対的蛍光単位（RFU）と、同じDNA配列を担持する既知のプラスミド希釈物から生成される蛍光シグナルとの直接的比較により算出される。このアッセイから生成されるデータは、パッケージングされたウイルスDNA配列の量を反映し、かつ配列完全性または粒子感染性を示すものではない。

【０２０８】

感染性粒子収量を決定するための緑色細胞感染性アッセイ（rAA V-GFPのみ）

感染性粒子（ip）力価決定は、緑色細胞アッセイを用いて、rAA V-GFPのストックに対して行なわれる。C12細胞（AAV2 RepおよびCap遺伝子を発現したHeLa由来株、以下の参考文献を参照されたい）に、rAA V-GFPおよび飽和濃度のアデノウイルス（AAV複製のためのヘルパー機能を提供するため）の連続希釈物を用いて感染させる。2～3日間のインキュベーション後、蛍光を発する緑色細胞の数（各細胞が1回の感染イベントを表わす）がカウントされ、ウイルスサンプルのip/mL力価を算出するために用いられる。

【０２０９】

Clark KRらは、Hum. Gene Ther. 1995. 6:1329-1341およびGene Ther. 1996. 3:1124-1132（これらの両方が、それらの全体で参照により組み入れられる）に、組み換えアデノウイルス生成を説明した。

【０２１０】

rAAV感染性を測定するための$TCID_{50}$

対象となる遺伝子を保持するrAAV粒子（rAAV-GOI）の感染性を、50%組織培養感染用量（$TCID_{50}$）アッセイを用いて測定した。rAAVの8種類の複製物を、5型ヒトアデノウイルスの存在下で連続希釈し、96ウェルプレート中のHeLaRC32細胞（AAV2 repおよびcapを発現するHeLa由来細胞株、ATCCから購入）を感染させるために用いた。感染から3日間後、溶解バッファー（1mM Tris-HC1 pH8.0、1mM EDTA、0.25%(w/v)デオキシコール酸塩、0.45%(v/v)Tween(登録商標)-20、0.1%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム、0.3mg/mLプロテイナーゼKの最終濃度）を各ウェルに添加し、続いて、37℃で1時間、55℃で2時間、および95℃で30分間インキュベートした。各ウェルからの溶解物（2.5μLアリコート）を、上記のDRP qPCRアッセイでアッセイした。標準曲線のプラスミドの最低量の値よりも低いCt値を有するウェルを、陽性としてスコア付けした。1mL当たりの$TCID_{50}$感染性（$TCID_{50}$/mL）を、10倍連続希釈での陽性ウェルの比率を用いて、Karberの式に基づいて算出した。

【０２１１】

細胞株およびウイルス

遺伝子療法のためのrAAVベクターの生成は、HEK293細胞（293）などの好適なプ

ロデューサー細胞株を用いて、in vitroで行なわれる。本発明での使用のために好適な他の細胞株としては、Vero、RD、BHK-21、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19、およびMRC-5が挙げられる。

【０２１２】

哺乳動物細胞株を、特に記載されない限り、2～10%(v/v)ウシ胎児血清（FBS、Hyclone社）を含有するダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、Hyclone社）の中で維持した。細胞培養およびウイルス増殖を、示された時間間隔にわたって、37℃、5%CO_2で行なった。

【０２１３】

感染細胞密度

限定するものではないが、少なくとも約、最大約1×10^6～4×10^6細胞/mL、または約1×10^6～4×10^6細胞/mLをはじめする様々な密度まで、細胞を増殖させることができる。続いて、細胞に、所定のMOIで組み換えヘルペスウイルスを感染させることができる。

【０２１４】

実施例2．PGRN発現構築物のクローニング

神経変性障害に対するAAV-プログラニュリン療法の成功は、ベクター構成要素に重大に依存する。最適なベクターは、脳を有効に標的化する効率的なカプシド、中等度ではあるが細胞特異的なプロモーターおよびヒトプログラニュリンタンパク質を発現する安定化された導入遺伝子を提供するであろう。

【０２１５】

すべての構築物は、以下の構築物の変異体反復である：

pTR*-CBA*/hSYN1*-h/m(wt/co1,2,3,4,5,6,7)(ss*)PGRN(なし/HA/SBI)-wpre-(SV/hGH)pA

*（おそらくは（potentially））最適化型および/または配列改変型エレメント

【０２１６】

図1は、両端の逆位末端反復（ITR）、ヒトシナプシン1（hSYN1）またはニワトリβアクチン（CBA）プロモーター、任意によりC末端HAタグまたはC末端での3～16個の核酸の欠失を含むPGRN、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHP）転写後調節エレメント（WPRE）、SV40初期ポリアデニル化シグナル（SV40pA）および任意によりスタッファーDNAを含む、PGRN構築物の模式図を示す。図1Aの下側パネルは、自己相補的AAVゲノムを示す。

【０２１７】

pTR-CBA-PGRN-WPREの設計およびクローニング：ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）部位が、プラスミド骨格へと挿入された。

【０２１８】

pTR-CBA-hGFP-WPREの設計およびクローニング：CBAプロモーターを含む対照hGFPプラスミドが構築され、同時に、プラスミド骨格中のGFPとWPREとの間にマルチクローニング部位が挿入された。

【０２１９】

pTR-hSyn-hGFP-WPREの設計およびクローニング：hSynプロモーターがプラスミド骨格中に挿入され、hSynプロモーターを含む対照hGFPプラスミドが構築された。

【０２２０】

pTR-CBA-hPGRNwt-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつCBAプロモーターを含むPGRN野生型発現プラスミドが構築された。

【０２２１】

pTR-CBA-hPGRNwt-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含まずかつCBAプロモーターを含むPGRN野生型発現プラスミドが構築された。

【０２２２】

pTR-CBA-hPGRNco1-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつCB

Aプロモーターを含むコドン最適化型PGRN（ATUM、hPGRN_opt1_CpG reduced）発現プラスミドを構築するため。

【０２２３】

pTR-CBA-hPGRNco2-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつCBAプロモーターを含むコドン最適化型PGRN（ATUM、hPGRN_opt2_CpG reduced）発現プラスミドが構築された。

【０２２４】

pTR-hSyn-hPGRNwt-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつhSynプロモーターを含むPGRN野生型発現プラスミドが構築された。

【０２２５】

pTR-hSyn-hPGRNwt-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含まずかつhSynプロモーターを含むPGRN野生型発現プラスミドが構築された。

【０２２６】

pTR-hSyn-hPGRNco1-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつhSynプロモーターを含むコドン最適化型PGRN（ATUM、hPGRN_opt1_CpG reduced）発現プラスミドが構築された。

【０２２７】

pTR-hSyn-hPGRNco2-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつhSynプロモーターを含むコドン最適化型PGRN（ATUM、hPGRN_opt2_CpG reduced）発現プラスミドが構築された。

【０２２８】

pTR-CBA-hPGRNcoE-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつCBAプロモーターを含むコドン最適化型PGRN（ATUM、hPGRN_opt1_CpG reduced）発現プラスミドが構築された。

【０２２９】

pTR-CBA-hPGRNcoF-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつCBAプロモーターを含むコドン最適化型PGRN（ATUM、hPGRN_opt2_CpG reduced）発現プラスミドが構築された。

【０２３０】

pTR-hSyn-hPGRNcoE-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつhSynプロモーターを含むコドン最適化型PGRN（ATUM、hPGRN_opt1_CpG reduced）発現プラスミドが構築された。

【０２３１】

pTR-hSyn-hPGRNcoF-HA-WPREの設計およびクローニング：HAタグを含みかつhSynプロモーターを含むコドン最適化型PGRN（ATUM、hPGRN_opt2_CpG reduced）発現プラスミドが構築された。

【０２３２】

pTR-hSyn-hPGRNcoEd5-WPREおよびpTR-hSyn-hPGRNcoFd5-WPREの設計およびクローニング：hSynプロモーターを含み、C末端5アミノ酸切断の改変を有するコドン最適化型PGRN（coEd5およびcoFd5）発現プラスミドが構築された。

【０２３３】

構築物構成要素の例示的核酸配列が以下に示される：

【０２３４】

【表１】

配列番号	説明
1	ニワトリβアクチン(CBA)プロモーター
2	ヒトシナプシン１(hSYN1)プロモーター
3	AAV2 逆位末端反復(ITR) 5’→3’
4	AAV2 逆位末端反復(ITR) 3’→5’
5	野生型ヒトプログラニュリン(hPGRNwt)
6	野生型マウスプログラニュリン(mPGRNwt)
7	マカク（アカゲザル(Macaca mulatta)）プログラニュリン
8	hPGRNcoA
9	hPGRNcoB
10	hPGRNcoC
11	hPGRNcoD
12	hPGRNcoE
13	hPGRNcoF
14	hPGRN ソルチリン結合性欠損型変異体
15	ヘマグルチニン(HA)タグ
16	WPRE
17	SV40 pA
18	カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII (CAMKII)プロモーター
19	ラットチューブリンα1 (Ta1)プロモーター
20	ラットニューロン特異的エノラーゼ(NSE)プロモーター
21	ヒト血小板由来増殖因子β鎖(PDGF)プロモーターPDGFB_1
22	EF1αプロモーター
23	CAG/CMV エンハンサー
24	ヒト血小板由来増殖因子β鎖(PDGF-B)プロモーター PDGFB_2
25	ヒト血小板由来増殖因子β鎖(PDGF)プロモーターPDGFB_3

【０２３５】

プロモーターベクター設計および合成：

強力遍在性プロモーター（CBA）とニューロン特異的プロモーター（ヒトシナプシン）とのin vitro比較についての研究が、それらの特異性および得られる導入遺伝子発現レベルを比較するために行なわれた。CBAプロモーターは、pAAVプラスミド（pTR-CBA-PGRNwt-WPRE-pA）中に取得した。PGRNwtの配列は、NEBuilder(登録商標)HiFi DNAアセンブリキット（New England Biolabs社）を用いて、hGFPおよびマルチクローニング部位を含む配列と置き換えられて、プラスミドpTR-CBA-hGFP-WPRE-pAが生じた。ヒトシナプシンプロモーター配列は、商業的に合成され（Genscript社）、その後、社内でPCR増幅および抽出され、アンピシリン選択カセット、AAV ITRセグメント、hGFPレポーター遺伝子、WPREおよびSV40ポリAを含む固有のウイルスパッケージングベクター（pTR-hSyn-hGFP-WPRE-pA）への挿入のための適合性の制限部位セグメントを有するプロモーターセグメントが得られた。

【０２３６】

構築物を、増幅のために高効率大腸菌細胞（SURE2）に形質転換し、確認のためにクローンを選択した。サンガー配列決定（Genewiz社）および制限消化（プロモーター挿入およびITR完全性を調べるための適切な制限部位（SmaIおよびXmaI）を用いて）を、プロモータープラスミドを確認するために行なった。各構築物に対する陽性クローンを

後続の実験のために選択した。固有のプロモーター構築物を、HEK-293細胞（対照）またはSHSY-5Y細胞のin vitroトランスフェクションを介して、hGFP発現を駆動する有効性に関して試験した。in vitroデータは、CBAおよびヒトシナプシンプロモーターが両方の試験した細胞中で機能し、両方の細胞でCBAがシナプシンプロモーターよりも常に強力であることを示す。

【０２３７】

カプシド選択

複数の免疫組織学的分析が、AAV9およびAAVrh10の両方が療法に好ましい広範囲の神経指向性を有することを示す。中枢神経系でのAAV9およびAAVrh10の発現ならびに有効性を比較する研究に基づいて、AAV9よりもAAVrh10が選ばれた。AAVrh10は、AAV9よりも顕著に良好に形質導入することが見出された。また、AAV9およびrh10は、ヒト集団での同様に低い中和性Ab血清陽性率を有する（それぞれ18％および21％、Thwaite R et al. 2014）。

【０２３８】

一組の実験は、髄腔内投薬による非ヒト霊長類（NHP）でのカプシド選択を調べた。AAVrh10、AAV9、ΔHSmaxおよびAAV2tyfカプシドを含むGFP構築物を、脊髄および脳でのGFP発現について試験した。図25は、髄腔内注入後の脳の様々な領域でのGFP陽性細胞率（％）およびGFP強度に関する、試験したカプシドのそれぞれについての結果を要約する。この研究から、AAVrh10が最も高いGFP発現を示し、AAV9がそれに続いた。ベクターのうちのすべてが、良好な耐容性を示した。

【０２３９】

次に、大槽内（ICM）への投薬によるNHPでのAAVrh10の生体内分布を行なった。1.2E13vgのAAVRh10が、ICM投薬後に、前頭から背側までのNHP脳での優れた生体内分布を示すことが見出された。スコアを図26に示す。

【０２４０】

実施例3. プロモーター選択

プログラニュリンベクターでの使用のためのプロモーターを試験するために、実験を行なった。用いたプロモーターは、以下の通りであった：hSynプロモーター（SYNP1とも称される、ニューロン特異的）およびキメラ型CMV-ニワトリβ-アクチンプロモーター（CBA）プロモーター（遍在性）。第1組の実験は、in vitroで行なわれた。図27に示す通り、CBAプロモーターは、ヒト胎児腎臓293細胞（HEK293）およびSH-SY5Y細胞の両方で、SYNP1よりも強力な発現を駆動した（2種類の異なるトランスフェクション試薬を用いて確認された）。SH-SY5Yは、頻繁に神経変性障害に対するモデルとしての役割を果たす、SK-N-SH神経芽細胞腫細胞株から誘導される細胞株である。図28は、AD5ベクターを用いるかまたは用いない、HEK293細胞およびSHSY-5Y細胞でのrAAVRh10-CBA-hGFP形質導入後のGFP発現を示す。図28に示される通り、AD5を用いるかまたは用いずに、AAVRh10-CBA構築物を用いて形質導入されたSH-SY5Y細胞では、GFPは検出されなかった。図27に示される結果は、HEK細胞およびSH-SY5Y細胞の両方を、CBAまたはhSYNプロモーターのいずれかから駆動されるWPREにより強化された発現を紹介する（showcase）ために用いることができることを実証する。しかしながら、hSYNにより駆動される発現のレベルは、両方の細胞タイプで、CBAにより駆動される発現よりも明らかに低い。図28に示される結果は、いずれのAAV血清型（AAV2tYFまたはAAVrh10）もHEK細胞でのベクターの形質導入を紹介するために用いることができる（かつAd5によりさらに強化される）が、SH-SY5Y細胞での形質導入を紹介するためにはAAV2tYFのみを用いることができる（Ad5添加にかかわらず）ことを実証する。

【０２４１】

これらの結果は、細胞アッセイでのAAVrh10ベクターの後続の試験に対して、HEK293細胞を用いることができ、またはニューロン/ニューロン様細胞モデルが用いられるのであれば、SH-SY5Y以外の細胞タイプを用いる必要があり得るか、もしくはSH-SY5Y

細胞での条件をさらに最適化する必要があり得ることを示した。

【０２４２】

考え合わせると、プロモーター選択実験からの結果は、その細胞特異性を理由に、SYNP1プロモーターの選択を導き、SYNP1プロモーターは、過剰発現およびそれゆえに考えられる毒性を制限するために望ましい。さらに、SYNP1プロモーターはCSFのみでPGRNを増加させ、血漿中では増加させないことが示され、このことは、本発明の構築物のさらに望ましい特徴である。

【０２４３】

実施例4．コドン最適化型プログラニュリンベクター設計および合成

プログラニュリン導入遺伝子最適化は、タンパク質発現、安定性、および機能を強化するための努力からなる。プログラニュリン（PGRN）のコドン最適化型変異体が合成され、野生型と比較したタンパク質発現の変化について評価された。27bpのC末端HAタグを含むかまたは含まずに、6種類のコドン最適化型変異体が作製された。HAタグ付けされた変異体は、内因性PGRNタンパク質と区別するための手段であるタンパク質発現に関する代替的な尺度を提供し、かつPGRN-ソルチリン結合性の阻害に対するいずれかの治療的利点の評価も可能にする。

【０２４４】

各コドン最適化型変異体は、固有の最適化（すなわち、コドン使用頻度、GC含量、5'mRNA構造の安定性、RNA不安定化配列の除去等）を含み、これは、それらのDNA配列は異なるが、それらのアミノ酸配列は保存する変異体をもたらした。これらの変異体は、3種類の異なる最適化アルゴリズムのうちの1種類（またはそれらの組み合わせ）から作製された。

【０２４５】

PCR増幅および抽出が行なわれ、それにより、アンピシリン選択カセットおよびAAV ITRセグメントを含む固有のウイルスパッケージングベクターへの挿入のための適合性の制限部位（NotI、NheI）を有するPGRN導入遺伝子セグメントが得られた。完全合成に続いて、コドン最適化型構築物を、増幅のために高効率大腸菌細胞（SURE2）へと形質転換し、確認のためにクローンを選択した。サンガー配列決定（Genewiz社）および制限消化（導入遺伝子挿入およびITR完全性を調べるための適切な制限部位を用いて）を、コドン最適化型PGRNおよびPGRNwtプラスミドを確認するために行なった。各コドン最適化型構築物に対する陽性クローンを、後続の実験のために選択した。

【０２４６】

6種類のコドン最適化型変異体（coA～Fと指定される（例えば、PGRNcoA、PGRNcoB、PGRNcoC、PGRNcoD、PGRNcoE、PGRNcoF））がPGRNwtと比較してどのようにPGRNを発現するかを決定するために、導入遺伝子発現実験を行ない、上清および細胞溶解物のELISAおよびウエスタンブロッティングを介して分析した。ELISAおよびウエスタンの両方の結果により、coE変異体およびcoF変異体が、Human Progranulin Quantikine ELISAキット（R&D Systems社）を用いてアッセイされた場合、ならびに抗ヒトプログラニュリン抗体（Sigma社）および抗HAモノクローナル抗体（ThermoFisher社）を用いてプローブ付けされた場合に、WTと同等のタンパク質発現を有するが、すべての他のco変異体は比較的劣る発現を示すことが示された（図29および図30）。したがって、co-EおよびcoFが、選択導入遺伝子に対する良好な候補として選択された。図30に示される通り、co-EおよびcoFの両方が、SDS-PAGE上で約80kDの予測される分子量（すなわち、PGRNwtと同じ）に移動する。

【０２４７】

次に、hSYnプロモーターの制御下にあるコドン最適化型変異体coE（PGRNcoE）およびcoF（PGRNcoF）をHEK293細胞へとトランスフェクションし、分泌型導入遺伝子発現を、上清ELISAを介して分析した（図31）。図31に示される通り、HEK293細胞で、coEはWTと同等な分泌型プログラニュリン発現（ng/mL）を示し、coFよりも高い分泌型プログラニュリン発現（ng/mL）を示した。発現は5日目（d5）にも測定され、

変異体coEでの若干の減少および変異体coFでのより大きな減少が見られた。ウエスタンブロット結果（図32）がこの結果を確認した。

【０２４８】

同様の実験を、SH-SY5Y細胞で行なった。結果を図33に示す。hSYnプロモーターの制御下にあるコドン最適化型変異体oE（PGRNcoE）およびcoF（PGRNcoF）をSH-SY5Y細胞にトランスフェクションし、分泌型導入遺伝子発現を、上清ELISAを介して分析した。図33に示される通り、HEK293細胞で、coEはWTと同等な分泌型プログラニュリン発現（ng/mL）を示し、coFよりも高い分泌型プログラニュリン発現（ng/mL）を示した。発現は5日目（d5）にも測定され、変異体coEで分泌型プログラニュリン発現の若干の減少が見られた一方、変異体coFでの増加が見られた。

【０２４９】

最適化に向けた発現および安定性の増強に加えて、グラニュリンへのPGRN分解および/または細胞によるPGRN取り込みの回避は、PGRN利用可能性を増大させるための大きな可能性を有する。アプローチのうちの1つは、その主要な受容体であるソルチリンに対するPGRN結合性を標的化することである。したがって、選択された候補のvC末端改変型PGRNが、ソルチリン結合性に対して不可欠な5個のアミノ酸を欠失させることにより作製された。

【０２５０】

主要な受容体としてのソルチリンに対する結合性の回避を通して、PGRN発現を増強することができるかを調べるための実験が行なわれるであろう。

【０２５１】

実施例5．rAAV-Xベクターの生成

rAAV-Xベクターが生成され、ここで「X」は、以下の血清型/変異体のうちの1種類である：最上位の選択されたゲノム変異体を含むAAV-rh10、AAV-9。これらのベクターの研究グレードの調製物が、様々な方法に進むであろう。(1) 第1の方法では、ベクターは、HEK293細胞のプラスミドトランスフェクションによりパッケージングされ、ウイルスが、確立された方法に従うイオジキサノール勾配により精製される（この方法に対する言及は、Zolotukhin et al., 2002 Methodsに見出すことができる）。(2) 第2の方法では、ベクターは、懸濁培養されたベビーハムスター腎臓（sBHK）細胞中でのAGTC社所有の組み換えHSV相補性を用いて生成される（Kang et al., Gene Ther 2009；Thomas et al., Hum Gene Ther 2009）。すべての前臨床実験のためのベクターを作製するために、三重トランスフェクション法が用いられた。三重トランスフェクションは、GLP tox研究のためのベクターを作製するためにも用いられるであろう。ベクター生成は、HAVE（HSV関連）法を用いて最適化されており、該方法が、臨床試験材料の調製のためなどの、後期研究での生成のために用いられることが予測される。両方の方法により作製されたベクターの同等性を実証するための研究が行なわれるであろう。

【０２５２】

一部の実施形態に従えば、rAAVr10-SYN-PGRNwtを含むベクター構築物が、三重トランスフェクションにより調製され、この構築物は、挿入されたITR-SYN-PGRNwt-wpre-pA-ITRカセットを含むpUCベースの「pTR」プラスミドを含んだ。ITR-SYN-PGRNwt-wpre-pA-ITRカセットの核酸配列（図1）は、図4または図5Aおよび図5B（ITR配列）もしくは図5AB（両方のITRに関して）、図3（hSYN）、図6（hPGRNwt）、図17（WPREに関して）、および図18（SV40pAに関して）に提供される個別の配列から由来することできる。

【０２５３】

実施例6．in vivo研究：非ヒト霊長類でのプログラニュリン発現

カニクイザルでの遺伝子療法（rAAVr10-SYN-PGRNwtを用いる）の単回嚢内注入に続く、全身性遺伝子発現を評価するために、研究を行なった。この目的を達成するために、2頭の雄のカニクイザル（そのうちの1頭は、CSFサンプル回収のための髄腔内腰部カテーテルを以前に移植された（動物002A））をこの研究に移した。動物に、以下の研究

設計に従って、大槽穿刺により1.5mLの試験品目の単回用量を投与した。

【０２５４】

【表２】

研究設計					
群	動物数	試験品目	用量 (vg)	濃度 (vg/mL)	研究終了 57日目
1	2頭 雄	rAAVr10-SYN-PGRNwt	5.84×10^{12}	3.89×10^{12}	2頭 雄

【０２５５】

用量投与：両方の動物を、髄腔内大槽（CM）穿刺を介する用量投与のために鎮静させた。各動物にデクスメデトミジン塩酸塩IM（0.04mg/kg）を与えた。少なくとも10分間後、ケタミン塩酸塩（2.5mg/kg）のIM注入を、鎮静を誘導するために与えた。鎮静されたら、動物を挿管し、大槽領域を脊椎穿刺のために準備した。動物を、NBR SOPの通りに側臥位にした。20ゲージ針を用いて皮膚に微小切開を施し、続いて脊髄針を大槽に導入した。脊椎穿刺は、Gertie Marx(登録商標)22ゲージ針を利用して行なった。CMに対するアクセスを、針からのCSFの流れにより確認した。脊髄針の中心にCSFが観察されたら、1.5mL用量を、手動ボーラスにより約1～2分間かけて投与した。針を除去する際に、注入部位を直接圧迫し、その後、局所無菌軟膏を塗布した。動物を、10分間トレンデレンブルグ体位にし、続いて用量投与し、その後、麻酔拮抗剤を投与した。拮抗剤であるアチパメゾール塩酸塩を、0.2mg/kg IMの用量で与え、時間を記録し、動物をケージに戻した。

【０２５６】

生存中観察および測定は、本報告のどこかに記載される通りの、臨床的観察、体重、および臨床病理学評価を含んだ。血液およびCSFを分析のために回収した。57日目のサンプル回収後、両方の動物を、NBR霊長類種族コロニーへと戻した。

【０２５７】

研究の経過にわたって、異常な臨床的兆候または試験品目に関連する体重変化はなかった。

【０２５８】

研究前と比較して、評価された時間間隔（57日目）での血液学または血清化学パラメーターでの意味のある変化はなかった。

【０２５９】

試験品目の投薬後に、抗AAV中和抗体の力価は、すべての試験サンプル中で増加した。結果を図34に示す。プログラニュリン発現の変化倍率を、8週間または10週間の経過にわたって、脳脊髄液（CSF）および血漿中で測定した。図34に示される通り、プログラニュリン発現は、CSFでは増加したが、時間経過にわたって血漿中では増加しなかった。動物001Aは、特にCSF中で、動物002Aよりも早く/高い応答を生じた。10週目の時点が、CSFプログラニュリンレベルの低下を確認するために追加された。

【０２６０】

本発明を、明確な理解の目的のために例示および実施例によって幾分か詳細に説明してきたが、一定の変更および改変を、添付の特許請求の範囲の範囲内で実行できることが理解されるべきである。上記の開示に鑑みて理解されるか、または慣用の実務および本発明の遂行を用いて遺伝子療法、分子生物学、および/もしくは関連する分野の当業者に明らかになるであろう本発明を実施するための上記の態様の改変が、以下の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

【０２６１】

本明細書中で言及されるすべての刊行物（例えば、非特許文献）、特許、特許出願公報、および特許出願は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示すものである。そのよう

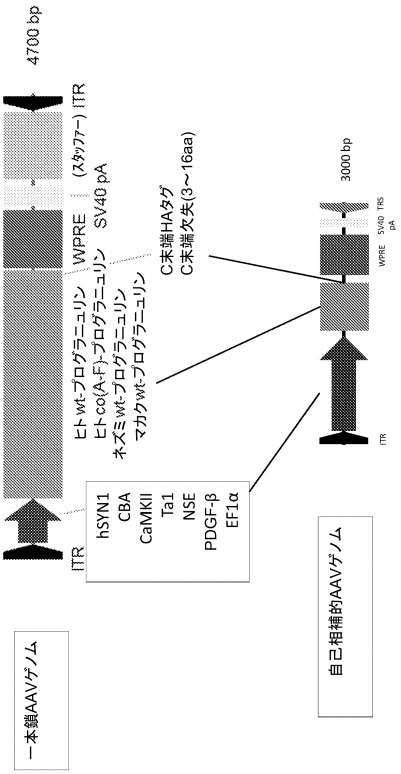
なすべての刊行物（例えば、非特許文献）、特許、特許出願公報、および特許出願は、それぞれ個別の刊行物、特許、特許出願公報、または特許出願が、参照により組み入れられることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度まで、参照により本明細書中に組み入れられる。

【０２６２】

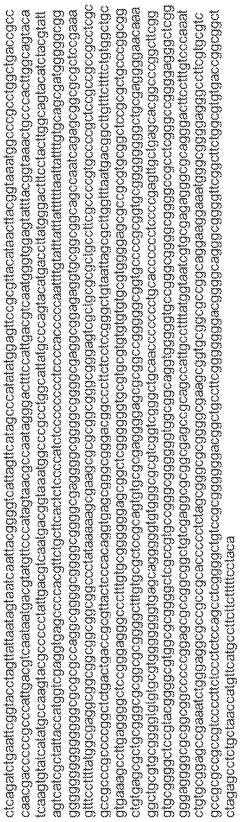
上記の本発明を好ましい実施形態との関連で説明してきたが、本発明はそれにより限定されるものではなく、後続の特許請求の範囲によってのみ限定されるべきである。

【図面】

【図１】



【図２】



【図３】

CTGCAGAGGCGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGCGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACC
GACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGAGGGGAAACAG
GATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCGCCTGGCGGCGCGCCA
CCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGC
GTCCGCGCCGCCGGCCCAGCCGACACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCG
CTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGTC
GA

【図４】

5′-3′ ITR: 一本鎖(ss)および自己相補的(sc) AAVゲノムに関する
ttggccactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcg
gcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttc

【図５】

5A

3′-5′ ITR: 一本鎖(ss) AAVゲノムのみに関する
gaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcg
accttttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagaggggagtggaa

5B

3′-5′ TRS: 自己相補的(sc) AAVゲノムのみに関する(TRS=短縮型ITR)
ccactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcgg
gtgagcgagcgagcgcgcag

【図６】

ATGTGGACCCTGGTGAGCTGGGTGGCCTTAACAGCAGGGCTGGTGGCTGGAACGCGGTGCCCAGATGGTCAGTTCTGCC
CTGTGGCCTGCTGCCTGGACCCGGAGGAGCCAGCTACAGCTGCTGCCGTCCCCTTCTGGACAAATGGCCCACAACACTG
AGCAGGCATCTGGGTGGCCCCTGCCAGGTTGATGCCCACTGCTCTGCCGGCCACTCCTGCATCTTTACCGTCTCAGGGACT
TCCAGTTGCTGCCCCTTCCCAGAGGCCGTGGCATGGCCATCACTGCTGCCCACGGGGCTTCCACTGCAGTGC
AGACGGGCGATCCTGCTTCCAAAGATCAGGTAACAACTCCGTGGGTGCCATCCAGTGCCCTGATAGTTCAGTTCGAATGCCC
GGACTTCTCCAGGTGCTGTTATGGTCGATGGCTCCTGGGGGTGCTGCCCCATGCCCCAGGCTTCCTGCTGTGAAGACA
GGGTGCACTGCTGTCCGCACGGTGCCTTCTGCGACCTGGTTCACACCCGCTGCATCACACCCAGGGCACCCACCCCCTG
GCAAAGAAGCTCCCTGCCCAGAGGACTAACAGGGCAGTGGCCTTGTCCAGCTCGGTCATGTGTCCGGACGCAACGGTCCCG
GTGCCCTGATGGTTCTACCTGCTGTGAGCTGCCCAGTGGGAAGTATGGCTGCTGCCCAATGCCCAACGCCAACCTGCTGCTC
CGATCACCTGCACTGCTGCCCCCAAGACACTGTGTGTGACCTGATCCAGAGTAAGTGCCTCTGCAAGGAGAACGCTACCAC
GGACCTCCTCACTAAGCTGCCTGCGCACACAGTGGGGGATGTGAAATGTGACATGGAGGTGAGCTGCCCAGATGGCTATAC
CTGCTGCGTCTACAGTCGGGGCCTGGGCTGCCCTTTACCCAGGCTGTGTGCTGTGAGGACCACATACACTGCT
GTCCCGCGGGGTTTACGTGTGACACGCAGAAGGGTACCTGTGAACAGGGGCCCCACCAGGTGCCTGGATGGAGAAGGC
CCCAGCTCACCTCAGCCTGCCAAGCCTTGAAGAGAGATGTCCCCTGTAATTGTCAGCAGCTGTCTCCCTCCTC
CGATACCTGCTGCCAACTCACGTCTGGGGAGTGGGGCTGCTGTCCAATCCCAGAGGCTGTCTGCTGCTGGACCACCAGC
AGTGCTGCCCCAGGGCTACACGTGTGTAGCTGAGGGCAGTGTCAGCGAGGAAGCGAGATCGTGGCTGGACTGGAGAA
GATGCCTGCCCGCCGGCGTTCCTATCCCACCCAGAGACATCGGCTGTGACCAGCACACCAGCTGCCCCGGTGGGCAGA
CCTGCTGCCCGAGCCTGGGTGGAGCTGCTGCCAGTTGCCCCATGCTGTGTGCTGCGAGGATCGCCAGCACTG
CTGCCCGGCTGCTACACCTGCAACGTGAAGGCTCGATCCTGCGAGAAGGAAGTGTGTCTGTGCCCAGCCTGCCACCTTCC
TGGCCCGTAGCCTCAGTTGGTGTGAAGGACGTGGGAAGGCACTTCTGCCATGATAACCAGACGTGCTGC
CGAGACAACCGACAGGGGTGTGGCCTGCTGTCCTACCGCCAGGGGCGTCTGTTGTGATCGGCCACTGCTGTCCTG
CTGGCTTCGGCTGCGCAGCCAGGGGTACCAAGTGTTTGCGCAGGGAGCCCCCGCGCTGGGACGCCCTTTGAGGGACCC
AGCCTTGAGACAGCTGCTG

【図７】

ATGTGGGTCCTGATGAGCTGGCTGGCCTTCGCGGCAGGGCTGGTAGCCGGAACACAGTGTCCAGATGGGCAGTTCTGCCC
TGTTGCCTGCTGCCTTGACCAGGGAGGAGCCAACTACAGCTGCTGTAACCCTCTTCTGGACACATGGCCTAGAATAACGAG
CCATCATCTAGATGGCTCCTGCCAGACCCATGGCCACTGTCCTGCTGGCTATTCTTGTCTTCTCACTGTGTCTGGGACTTCC
AGCTGCTGCCCGTTCTCTAAGGGTGTGTCTTGTGGTGATGGCTACCACTGCTGCCCCAGGGCTTCCACTGTAGTGCAGAT
GGGAAATCCTGCTTCCAGCGGTCCGGAAACAACTCCGTGGGAGCCATCCAGTGTCCGATAGCCAGTTCGAATGCCC
GCCACCTGCTGCATTATGGTTGATGGTTCGTGGGGATGTTGTCCCATGCCCCAGGCCTCTTGCTGTGAAGACAGAGTGCATT
GCTGTCCCCATGGGGCCTCCTGTGACCTGGTTCACACACGATGCGTTTCACCCACGGGCACCCACACCCTACTAAAGAAGT
TCCCTGCACAAAAGACCAACAGGCAGTGTCTTTGCCTTTTCTGTCGTGTGCCCTGATGCTAAGACCCAGTGTCCCGATGA
TTCTACCTGCTGTGAGCTACCCACTGAGGAAGTATGGCTGCTGTCCAATGCCCAATGCCATCTGCTGTTCCGACCACCTGCAC
TGCTGCCCCCAGGACACTGTATGTGACCTGATCCAGAGTAAGTGCCTATGCAAGAACTACACCACGGATCTCCTGACCAAGC
TGCCTGGATACCCAGTGAAGGAGGTGAAGTGCGACATGGAGGTGAGCCTGCCCTGAAGGATATACCTGCTGCCGCCTCAACA
CTGGGGCCTGGGGCTGCTGTCCATTTGCCAAGGCCGTGTTGTGAGGATCACATTCATTGCTGCCCGGCAGGGTTTCAGT
GTCACACAGAAGAAAGGAACCTGCGAAATGGGTATCCTCCAAGTACCCTGGATGAAGAGGTCATAGCCCCCCTCGCCTGC
CAGACCCACAGATCTTGAAGAGTGATACACCTTGTGATGACTTCACTAGGTGTCCTACAAACAATACCTGCTGCAAACTCCAAT
TCTGGGGACTGGGGCTGCTGTCCCATCCCAGAGGCTGTCTGCTCAGACAACCAGCATTGCTGCCCTCAGGGCTTCAC
ATGTCTGGCTCAGGGGTATCTGTCAGAAGGGAGACACAATGGTGGCTGCCCTGGAGAAGATACCTGCCCGCCAGACAACCC
CGCTCCAAATTGGAGATATCGGTTGTGACCAGCATTACCAGCTGCCCAGTAGGGCAAACCTGCTGCCCAAGGCTCAAGGAA
GTTGGGCCTGCTCGCCAGCTGTGAGGACCGGCAGCACTGTTGCCCGGCGGGTACCTGCTGTGAAGACA
GTGAAGGCGAGGACCTGTGAGAAGGATGTCGATTTATCCAGCCTCCGGTGCTCTGACCCTCGGCCTAAGGTTGGGAAT
GTGGAGTGTGGAGAAGGGCATTTCTGCCATGATAACCAGACCTGTTGTAAAGACAGTGCAGGAGTCTGGGCCTGCTGTCCC
TACCTAAAGGGTGTCTGCTGTAGAGATGGACGTCACTGTTGCCCCGGTGGCTTCCACTGTTCAGCCAGGGGAACCCAAGTGT
TTGCGAAAGAAGATTCCTCGCTGTGGACATGTTTTTGAGGGATCCGGTCCCAAGACCGCTACTG

【図８】

ATGTGGACCCTGGTGAGCTGGGTGGCCTTAACAGTAGGGCTGGTGGCTGGAACATGGTCCCAGATGGTCAGTTCTGCCC
TGTGGCCTGCTGCCTGGACCCCGGAGGAGCCAGCTACAGCTGCTGCAGTCCCCTTCTGGACAAATGGCCCACAACACTGA
GCAGGCATCTGGGCGGCCCCTGCCAGGCTGGTGCCGCACTGCTCTGCCCACTCCTGCATCCTCACCGTCTCAGGGACT
TCCGGTTGCTGCCCCTTCCCAGAGGCCGTGGCGTGCGGGGATGGCCATCACTGCTGCCCACGGGGCTTCCACTGCAGTG
CAGATGGGCAATCCTGCTTCCAAAGATCAGGTAACAACTCCGTGGGTGCCCGTCCAGTGCCCTGATAGTCATTTTGAATGCCC
GGACCTCTCCACGTGCTGCCATGGTCGATGGCTCCTGGGGGTGCTGCCCCATGCCCCAGGCTTCCTGCTGTGAAGACA
GGGTGCACTGCTGTCCGCATGGTGCCTTCTGCGACCTGGTTCACACCCGCTGCATCACACCACGGGCACCCACCCACTG
GCAAAGAAGATCCCTGCCCAGGAGGAGTAACAGGGCAGTGGCTTTGTCCAGCTCATGTGTCCGGATGCAGGTCCCA
GTGCCCTGATGGTTCTACCTGCTGTGAGCTGCCCAGTGGGAAGTATGGCTGCTGCCCAATGCCCAATGCCATCTGCTGCTC
CGACCACCTGCACTGCTGCCCCCAAGACACTGTGTGACCTGATCCAGAGTAAGTGCCTCTCCAAGGAGAACACTACCAT
CGACCTCCTCACTAAGCTGCCTGCACAAACAGTGGGAGCACGTGAAATGTGACATGGAGGTGAGCTGCCCAGATGGCTATAC
CTGCTGCCGTCTACAGTCGGGGGCCTGGGGCTGCTGCCCTTTACCCAGGCTGTGTGCTGTGAGGACCATATACACTGCTG
TCCCGCGGGGTTTACGTGTGACACCGCAGAAGGGTACCTGTGAACAGGGAACTTACCAGGTGTCCTGGATGGAAGAACCC
TAGCTCACCTCAGCCTGCCAGAACCCGCAAGCCTTGAAGAGATGTCCCCTGTGATAATGTCACCAGCGTGTCCCCCCTCA
ATACCTGCTGCAAACTCATGTCTGGAGAGTGGGCTGCTGTCCAGTCCCAGAGGCTGTCTGCTGCTCGGACCACCAGCAC
TGCTGCCCCCAGGGCTACACGTGTGTAGCCGAGGGGGCGGTGTCAGCGGGGAAGCGAGATCGTGGCTGGAGACTGGAGAAGA
TGCCTGCCCGCGACGGCTTCTATCCCACCCAGAGACATGGGCTGTGACCAGCACCACGTCGCCAGTGGGGCAGACC
TGCTGCCCAAGCGCTTGCTATCCCAGCCAGAGTGTGTGCTGCGAGGATCGCCAGCACTGCT
GCCCGGCTCGGCTACACTCGCAACGTGAAGGCCCATCCTCGCAGAAGGAAGTGGTCTCTGCCCACGCTGCCACCTTCCTG
AGACAACCGAGGGGGGCTGGGCCTGCTGTCCCTACCGCCAGGGCATCTGTTGTGCTGATCGGCGCCATGCTGTCCTGCTG
GCTTCCGCTGCGCAGCCAGGGGCGCCCAAGTGTTTGCGCAGGGAGGCCCTGCGCTGGGACGCCCCTTTGAGGGACCCAG
CCTTGAGACAGCTGCTG

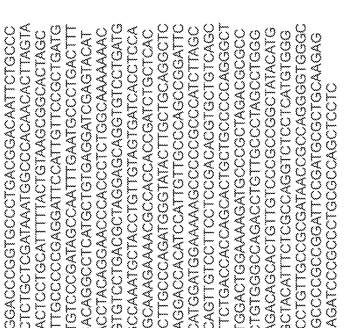
【図９】

ATGTGGACTCTCGTATCTTGGGTCGCTCTCACCGCCGGACTTGTCGCTGGAACTCGCTGTCCCGACGGACAGTTCTGCCCA
GTGGCCTGTTGCCTGGACCCCGGGGGCGCGAGCTACAGCTGCTGTGACCGAGCAAGTGCCTACCACGCTTA
GCCGGCATCTGGGCGGACCGTGCCAGGTCGATGCCCACTGCTCCGCGGGCCACTCCTGCATTTTCACTGTGTCCGGAACC
TCCTCCTGTTGCCCGTTCCCGAAGCCGTGCCTGCGGCGATGCACATCATTGCTGCCCTGCGGATTCCACTGCTCGGC
GGACGGGCGAAGCTGCTTCCAGCGGTCCGGAAACAACTCCGTGGGAGCCATCCAGTGTCCGATAGCCAGTTCGAATGCCC
CGGACTTCTCAACGTGCTGCGTCATGGTGGACGGCAGCTGGGGGTGCTGCCCCATGCCCAAGGCCTCTTGCTGTGAAGAT
CGGGTGCACTGCTGTCCACACGGCGCTTTTTGTGATCTGGTGCACACTCGGTGCATTACTCCGACCGGGACCCCACCCGCT
GGCCAAAAAGTTGCCGGCACAGCGCACCAACAGACGCGTGGCACTCAGCTCGTCGATGTGCCGGACGCCAGATCC
CGGTGCCCTGACGGTTCAACTTGCTGCGAGCTTCCGTCGGGAAAATACGGCTGTTGCCCAATGCCTAACGCCACCTGTTGC
TCGGACCATCTGCATTGCTCCGCAAGCACCCGTCTGCGCAAGTGCTGCCTGAGCAAGGAAACCGCCACC
ACCGACCTCCTGACTAAGCTGCCGCGACACACCGTGGGGGATGTGAAATGCGACATGGAGGTGTCGCCCGATGGCTAT
ACCTGTTGCCGCCTGCAATCCGGAGCCTGGGGATGCTGCCCCTTCACCCAAGCCGTGTGTTGCGAGGACCACATCCACTG
CTGCCCCGCGGGGCTTCACATGCGACACTGAGGGAACCTGTGAAGCAGGGTCCCCATCAAGTGCCGTGGATGAAAAGG
CCCCGGCCCACCTGTCCTTGCCTGACCCTCAAGCGCGACGTGCCCTGCGACAATGTGTCCAGCTGCCCATCC
TCGGACACTTGCTGTCAGCTCACCTCCGGGAATGGGTTGCTGCCGATCCCCGAGGCAGTGTGCTGCTCGGATCACCA
ACACTGTTGCCCGCAAGGGTACACTTGTGGTGGCCGAGGGCCAGTGCCAGAGAGGCTCCGAAATTGTGGCCGGACTGGAG
AAGATGCCTGCTCGGCGCGCCTCACTGTCACACCCAAGGATATCGGTTGTGACCAGCACACCTCCTGCCCCGTGGACA
GACCTGTTGTCCTTCACTGGGGTGGTTCATGGGCGTGTTGTCAGCTGCCCCACGCCGTGTGCTGCGAGGACCGGCAGCATT
GTTGCCCCGCGGGTACACCTGTAACGTGAAGGCTCGGTCTGCGAAAAGGAAGTGGTGTCGGCCCAACCAGCCACCTTC
CTGGCGCGCTCCGCCTCACGTCGAGTCAAGGACGTGCGAGTGCGCAGAGGCCACTTTTGCCACGACAACCAGACTTGCT
GCCGGAACAACCGCCAGGGATGGGCCTGCTGCCCGTACCGCAGGGCGTTTGCTGCCGCTGAACCGGAGACTGCTGCCCC
GGCTGGATTTCGCTGCGCCGCCGGGGAACCAAGTGCTTGAGGAGAAGCGCCGAGATGGGATGCACCCCTGAGGGAC
CCGGCGCTGCGCCAGCTGCTG

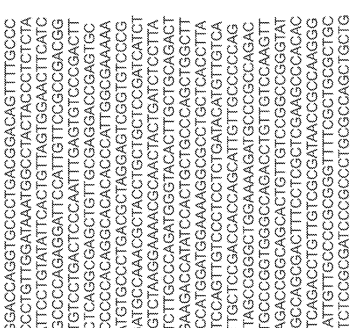
【図１０】

ATGTGGACTCTGGTCTCATGGGTCGCTCTGACAGCAGGACTGGTCGCAGGGACACGATGCCCCGATGGACAGTTTTGCCC
CGTCGCTTGCTGTCTGGACCCAGGAGGAGCCAGCTACTCCTGCTGTAGGCCACTGCTGATAAGTGGCCCACCACACTGT
CCCGCCACCTGGGAGGACATGCCAGGTGGACGCACACTGTTCCGCGGAACACTCTTGCATCTTCACAGTGTCTGGACTTCC
AGCTCCTGTCCATTTCCTGAGGCAGTGGCATGCGGCGACGGACACCACTGCTGTCCCAGGGGCTTCCACTGTAGCGC
CGATGGCCGGTCCTGCTTTCAAGAAGCGGCAACAATTCCGTGGGCGCCATCCAGTGTCCTGACAGCCAGTTCGAGTGCC
CAGATTTTTCCACCTGCTGCGTGATGGTCATTGGGCGTGTTGTCAGCTGCCCCACGCCGTGTGCTGCGAGGACCGGCAGCATT
GGGTGCACTGCTGTCCTCACGGCGCTTCTGTGATCTGGTGCACACACGCTGCATCACACCACGGGCACCCACCCACTG
GCCAAGAAGCTGCCAGCACAGAGGACCAACAGGGCAGTGATGTGCCCAGACGCACACGTCGCCAGTGGGGCAGACATT
GATGCCCTGATGGCAGCACCTGTGCTGAGCTGCCAAGCGCAAGTACGGCTGTCTATGCCAAAGCGCAACATGCTGTT
CCGACCACCTGCACTGCTGTCCTCAGGACACCGTGTGCGATCTGAAGCAAGGAGAATGCCACCA
CAGACCTGCTGATGGCTGCAGTCTGATGCCTATCAAGTCGCCTGAGCAAGCCAGTCCACTGCT
CATGCTGTAGGCTGCAGTCTGAGACATGGGGATGCTGTCCCTTCACCCAGGCCGTGTGCTGTGAGGACA
GTCCTGCCGGCTTTACATGCGATACCCAGAAGGGCACATGCGAGCAGGGCCCTCACCAGGTGCCATGGATGAAGAGGCA
CCAGCACACCTGTCCCTGCCCGACCCTCAGGCCCTGAAGAAGACGTGCCTTGTGATAACGTGTCTAGCTGCCATCCTCT
GATACATGCTGTCAGCTGACCTCTGGCGAGTGGGGCTGCTGTCCAATCCCGAGGCCGTGTGCTGCGAGGACCACCAGCA
CTGCTGTCCTCAGGGCTATACCTGCGTGGCAGAGGGACAGTGCCAGAGGGGCTCCGCAGATCGTGGCAGGCCTGGAGAAG
ATGCCAGCAAGGAGAGCCTCTGTAGCCACCCAGACATCGGCTGTGATCAGCACAAGCTGCCCAGTGGGACAGAC
CTGCTGTCCCTCCCTGGGAGGCTCTGGGCATGCTGTCAGCTGCTCACGCCGTGTGCTGTGAGGATCGGCAGCACTGCT
GTCCAGCCGGCTACACATGAGGACAATGTGAAGGCCAGTCGCTGTACCGCCAGGGCGTTTGCTGCCGCTGAACCGGAGAC
GGCTTAGGTGCGCAGCCAGAGGCACCAAGTGCCTGCGGAGAAGAAGCCCCCCGGTGGGACGCCCCCTGCGAGACCCC
GCCCTGAGACAGCTGCTG

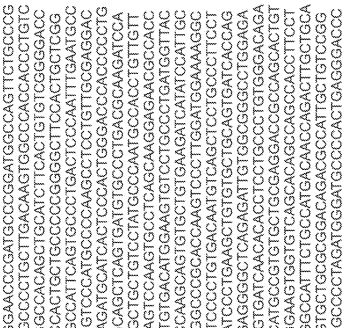
【図１１】



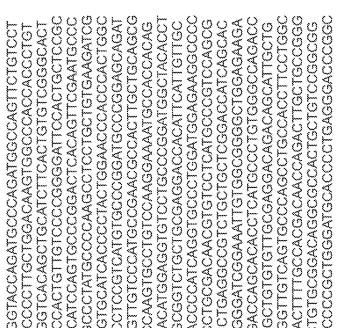
【図１２】



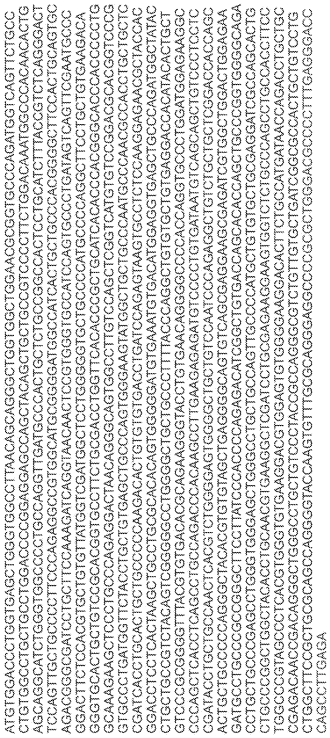
【図１３】



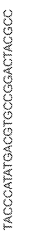
【図１４】



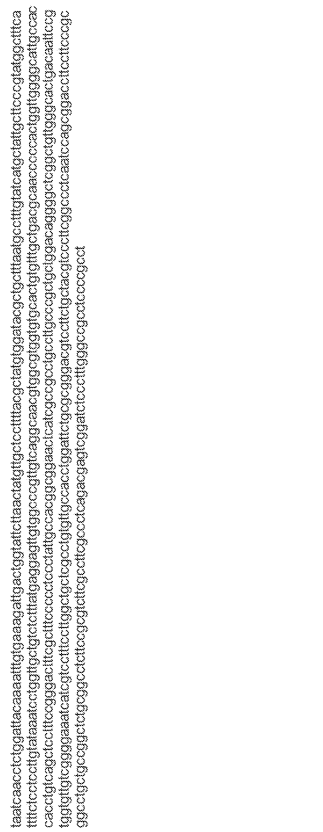
【図１５】



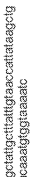
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【図１９】

acttgtggactaagttgttcgcatccccttctccaacccccctcagtacatcacctgggggaacaggatccacttgctcctgggcccacacagtcctgcagtattgtgtatataaggccagggcaaaga
ggagcaggttttaaagtgaaaagcaggcaggtgttgggggaggcagttacccgggcaacgggaacaggcgttccgaggtggttgccatgggaacctggatgctgcacgaaggctcgcgaggctgtg
agcagccacagtgccctgctcagaaggccccaagctcgtcagtcaagccggttctccgtttgcacctcaggacgcaggcgaggtggccccttagttcttgggggcagc

【図２０】

gtatccagac tcatcctttt ctccttacag tttctgaatt ccgtattaga agggatggct
catttctagg gacaaaataa cacaggctct gggtggaggt agggtcgggt aagggggcga
gcgggggaggg gtgatggaag agcactaccg cataaagaaa gcaagctctc tagtaaagcg
ttaagtacta ctttgtatat tgtttctctt ttttccttte tctctctctc tctctttgtt
tgttttttgt ttttgagaca gaatatcaca ctatatatcc aggccgggta caaaataacc
gcagtccttc gcttcccaat gctgggattt acaggcataa accactaagg gcggttatga
tgaccttgag ctgcaagtct tcctgccttt gcctccccagg tgctgttgag ggtcataggc
gtggttctatt catactgagc ttctgaattt gctcaaatat taatataata agtaataata
ataataacca caatаatаca actgtaaaac taaacattta cccacgcctt tttgaccatc
attcccatag ctcttgctac tttatttaaa gcgaacagag atgttgaatc ctgacggaac
gtatttaaat ttagtgtagt ataaatgaaa agctggaatt taccataaag aatctcaaca
caaattctgt gattaagtgt tgggaaaaac cttaaattat cctaactaca gtttaaggtt
taagctccgt ataatcaccc aaccccgttt ttctttcttc cctctctacc cctccccagc
tccacccaat aatggatgct cggctagttg ctttgcgagg gccttggtct gaaggatgca
aaatctacgg atgctagcga gggggggaag gggggagaga ttacctcata ccatgtcgct
tgcaccaatc accactcctg tcgcggcttc tctgggcaga cggagggggtc tggaccaaca
ggaaaaggcc ttggcccatc cccatggtga ccgagctgta tataaggagg cgcatccgcc
caagtgccgg caggttctct tacatcgacc gcttaagagt cgcgctgtaa gaagcaacac
ctcctcctcg ccttccgccat ccacccggca gccgcgaagc agcaaccatg gtgagcaaac
(GenBank: S76207.1)

【図２１】

TCCTTCCAACCCCCTATGGTGGTATGGCTGACACAGAAAATGTCTGCTCCTGTATGGGACATTTGCCCCTCTTCTCCAAATATAAGACAGGATGAGGCCTAG
CTTTTGCTGCTCCAAAGTTTTTAAAAGAACACATTGCACGGCATTTAGGGACTCTAAAGGGTGGAGGAGGAATGAGGGAATTGCATCATGCCAAGGCTGG
TCCTCATCCATCACTGCTTCCAGGGCCCAGAGTGGCTTCCAGGAGTATTCTTACAAAGGAAGCCCGATCTGTAGCTAACACTCAGAGCCCATTTTCCTGC
GTTAACCCCTCCGACCTCATATACAGGAGTAACATGATCAGTGACCTGGGGGAGCTGGCCAAACTGCGGGACCTGCCCAAGCTGAGGGCCTTGGTGCT
GCTGGACAACCCCTGTGCCGATGAGACTGACTACCGCCAGGAGGCCCTGGTGCAGATGGCACACCTAGAGCGCCTAGACAAAGAGTACTATGAGGACG
AGGACCGGGCAGAAGCTGAAGGAGATCCGAACAGAGGCTGAAGGAGGAACAAGAACTCGACCCGGACCAAGACATGGAACCGTACCTCCCGC
CAACTTAGTGGCACCTCTAGCCTGCAGGGACAGTAAAGGTGATGGCAGGAAGGCAGCCCCCGGAGGTCAAAGGCTGGGCACGCGGGAGGAGAGGCC
AGAGTCAGAGGCTGCGGGTATCTCAGATATGAAGGAAAGATGAGAGAGGCTCAGGAAGAGGTAAGAAAAGACACAAGAGACCAGAGAAGGGAGAA
GAATTAGAGAGGGAGGCAGAGGCACCGCTGTCTCTACAGACATAGCTGGTAGAGACTGGGAGGAAGGGATGAACCCTGAGCGCATGAAGGGAAGGAG
GTGGCTGGTGGTATATGGAGGATGTAGCTGGGCCAGGGAAAAGATCCTGCACTAAAAATCTGAAGCTAAAAATAACAGGACACGGGGTGGAGAGGCG
AAAGGAGGGCAGAGTGAGGCAGAGACTGAGAGCCTGGGGATGTGGGCATTCCGGTAGGGCACACAGTTCACTTGTCTTCTCTTTTCCAGGAGG
CCAAAGATGCTGACCTCAAGAACTCATAATACCCCAGTGGGGACCACCGCATTCATAGCCCTGTTACAAGAAGTGGGAGATGTTCCTTTTGTCCCAGACT
GGAAATCCGTTACATCCCGAGGCTCAGGTTCTGTGGTGGTCATCTCTGTGTGGCTTGTTCTGTGGCCTACCTAAAGTCCTAAGCACACAGCTCTCAAGCAGA
TCCGAGGCGACTAAGATGCTAGTAGGGGTTGTCTGGAGAAGAGCCGAGGAGGTGGGCTGTGATGGATCAGTTCAGCTTTCAAATAAAAGGCGTTT
TTATATTCTGTGTCGAGTTCGTGGTGGGCTTCTCCATCTGTCTGGGTTAGTACCTGCCACTATACTGGAATAAGGGGACGCCTGCTTCCCCTC
GAGTTGGCTGGACAAGGTTATGAGCATCCGTGTACTTATGGGGTTGCCAGCTTGGTCCTGGATCGCCCGGGCCCTTCCCCACCCGTTCGGTTCCCCACC
ACCACCCGCGTCCGTACGTGCGTCTCCGCCTGCAGCTCTTGACTCATCGGCTCCCCCGGGTCAACATGCGCTCGCTCGGCTCTATAGGCGCCCCCTGC
CCACCCCCCGCCCGCGCTGGGAGCCGCAGCCGCCCGCCACTCCTGCTCTCTCGCGCCGCCGTCACCACCGCCACCGGCTGAGTCTGCAGT
CCTCGAGGTGAGGCCCGTATCGG

【図２２】

PDGFB_1:
aaaaaaaaaaaaaaaagccccacccctccagcctcgctgcaaagagagaaaccGGAGCAGCCGC
ゲノム位置: [39244767] 60 nuc

PDGFB_2:
tctcgcactctccctttcttctttataaggccggaacacgctgaaaggggtGGCCAACTTCTC
ゲノム位置: [39244982] 60 nuc

PDGFB_3:
gccggctccacctgtcggcgggcccagccgagcgcgcagcgggcacgcCGCGCGCGCGG
ゲノム位置: [39244621] 60 nuc

【図２３】

gagtcaatgggaaaaacccattgagccaagtacactgactcaataggacttccattgggtttgcccagtacataaggtccaataggggtgagtcaacaggaaagtcccattggagccaagt
acattgagtcaatgaggacttccaatgggttttgcccagtacataaggtcaatgggaggtaagccaatgggattttcccattactgacatgtatactgagtcattaggactttccaatgggttttgcc
cagtacataaggtcaatagggggtgaatcaacaggaaagtcccattgagccaagtacactgagtcaataggacttccattgggttttgcccagtacaaaaggtcaatagggggtgagtcaatg
ggttttcccattattggcatacataaggtcaatgggggtgactagtgggaagaagcatgcttgagggctgagtgcccctcagtgggcagagacatgggcccacagtcccctgagaagttgggg
gggagggggtgggcaattgaactggtgctagaagagtgggcttgggtaaactgggaaagtgatggtgctagctcccacctttttcccccaggggtgggggagaaccatataagtgcagta
gtcctctgtgaacattcaagcttctgccttcccctgtgagtttgatgaagtcactgactgtctatgcctgggaaaagggtgggcaggagggtgggcaggaaaagtggcactgtgaaccctg
cagccctagacaattgtactaaccttcttctttcctcctcctgacag

【図２４】

tagttattaatagtaatcaattacgggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaa
taatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattg
acgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatc

【図２５】

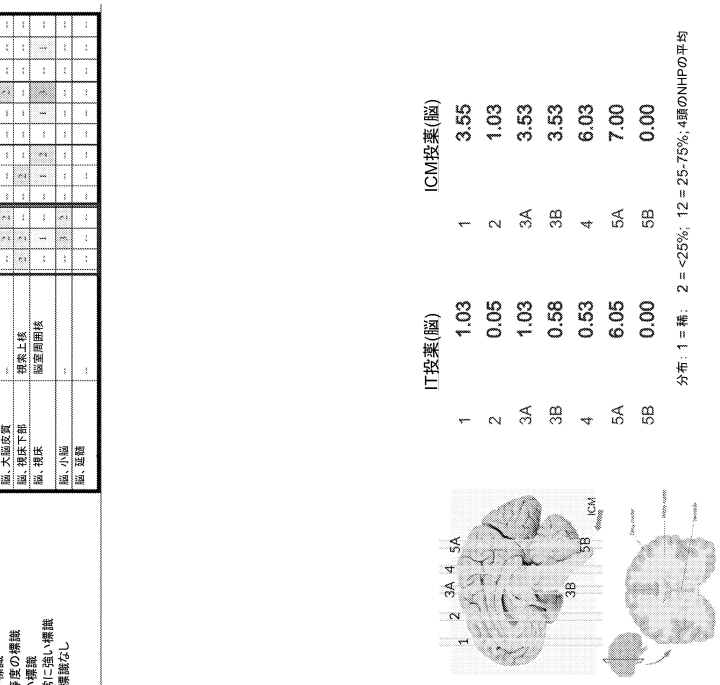
脳：GFP陽性細胞%(全細胞)
1＝最大1%
2＝2-5%
3＝6-15%
4＝16-40%
5＝>40%
"_"＝標識なし

脳：GFP強度
1＝辛うじて識別できる標識
2＝軽い標識
3＝中等度の標識
4＝強い標識
5＝非常に強い標識
"_"＝標識なし

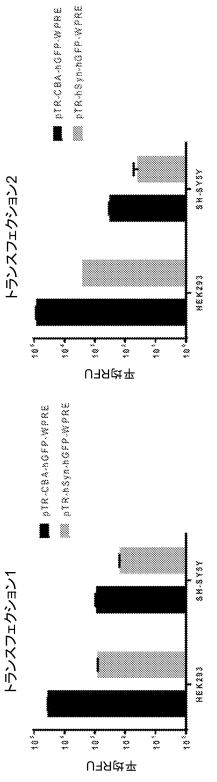
		rh10			AAV9			AHSMax			AAV2YF		
組織	部位	ベクター1			ベクター2			ベクター3			ベクター4		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
脳：大脳皮質	...		2	1									
脳：視床下部	視索上核	3	3			2				1			
脳：視床	脳室周囲核					2	1			1		2	
脳：小脳	...		2	1									
脳：延髄	...												

組織	部位	ベクター1			ベクター2			ベクター3			ベクター4		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
脳：大脳皮質	...		3	2						2			
脳：視床下部	視索上核		2			2							
脳：視床	脳室周囲核		2			1				3		1	
脳：小脳	...			2									
脳：延髄	...												

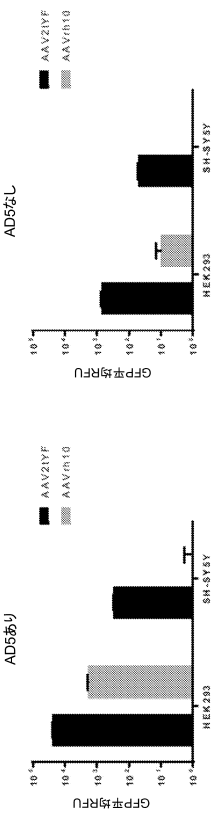
【図２６】



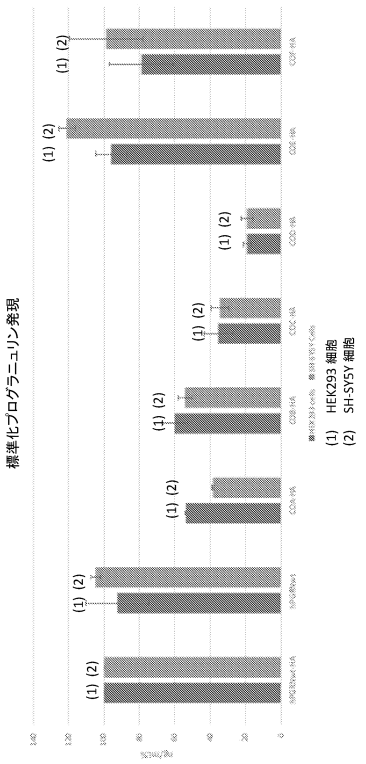
【図２７】



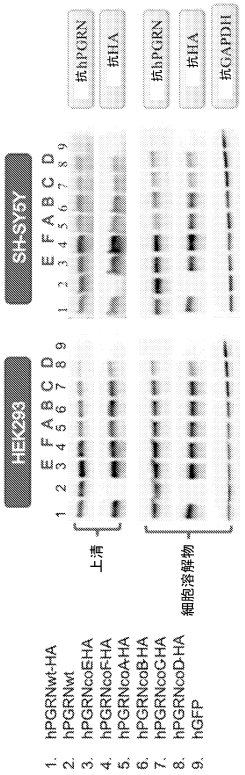
【図２８】



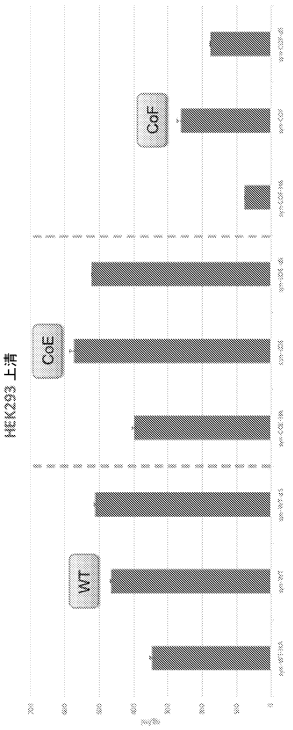
【図２９】



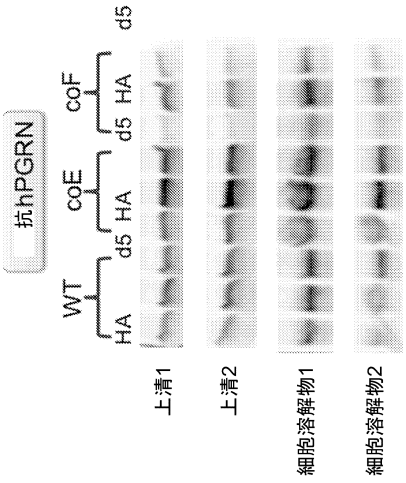
【図３０】



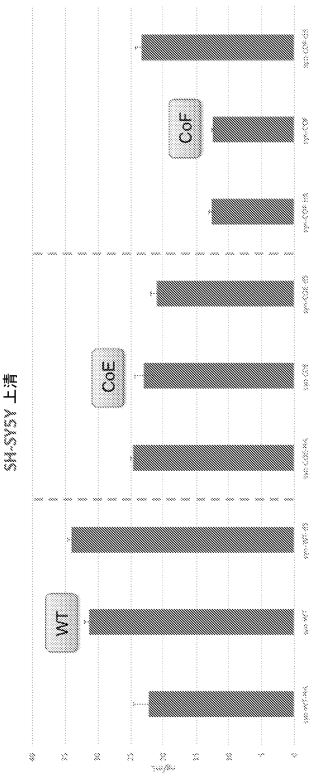
【図３１】



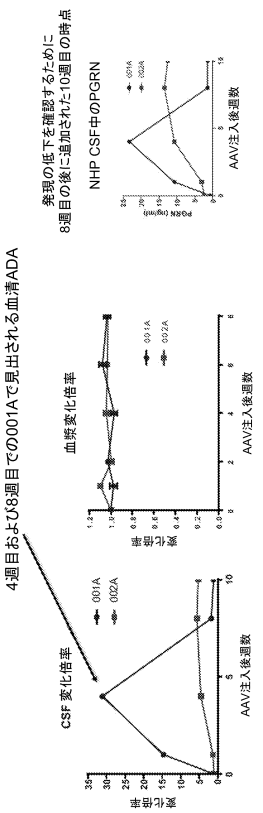
【図３２】



【図３３】



【図３４】



【配列表】
20222553307000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/56860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C07K 14/475; A61K 38/18; C07H 21/04; C12N 15/86 (2021.01)
CPC - C07K 14/475; A61K 38/18; C07H 21/04; C12N 15/86

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)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/070894 A1 (PREVAIL THERAPEUTICS, INC.) 11 April 2019 (11.04.2019). Especially pg 20 ln 12-19, SEQ ID NOs: 66, 67.	1-4
X	WO 2018/136680 A1 (NEW YORK UNIVERSITY) 26 July 2018 (26.07.2018). Especially para [0015], [0016], SEQ ID NOs: 1, 2	1-4

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
29 January 2021	MAR 31 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/56860

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

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

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

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/56860

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 5-61
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—Go to Extra Sheet for continuation—

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 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.:
Claims 1-4

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/56860

---continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-4, drawn to a composition comprising a nucleic acid sequence encoding progranulin.

Group II: Claims 62-66, drawn to a method for producing recombinant AAV viral particles.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a nucleic acid sequence encoding progranulin, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of specific method steps for producing recombinant AAV viral particles, not required by Group I.

Common Technical Feature:

Groups I and II share the common technical feature of a nucleic acid encoding a protein.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art and is disclosed by WO 2018/136680 A1 to New York University (hereinafter "NYU").

As to the common technical feature, NYU discloses a nucleic acid encoding a protein (para [0015]; "The human mRNA sequence of PGRN is shown as SEQ ID NO: 1; and the human amino acid sequence of PGRN is shown as SEQ ID NO: 2").

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued): Claims 5-61 are multiple dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

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	*1/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19	
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ａ６１Ｐ	*25/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28	
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｋ	*38/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/18	
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	

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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

アメリカ合衆国 ３２６１５ フロリダ州，アラチューア，スイート ナンバー１０，エヌダブリュ １１９ティーエイチ テラス １４１９３

(72)発明者 マンダパディ，サヴィトリ

アメリカ合衆国 ３２６１５ フロリダ州，アラチューア，スイート ナンバー１０，エヌダブリュ １１９ティーエイチ テラス １４１９３

(72)発明者 ペノック，スティーヴン

アメリカ合衆国 ０１４５３ マサチューセッツ州，レオミンスター，ペナコック ドライブ ３０

(72)発明者 シャーマン，マーク

アメリカ合衆国 ３２６１５ フロリダ州，アラチューア，スイート ナンバー１０，エヌダブリュ １１９ティーエイチ テラス １４１９３

(72)発明者 ニューマーク，ジュディス

アメリカ合衆国 ０１７５７ マサチューセッツ州，ミルフォード，ファーギュソン ストリート １８

(72)発明者 ティマース，エイドリアン

アメリカ合衆国 ０１８０３ マサチューセッツ州，バーリントン，パイン アベニュー １０

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA95X AB01 BA02 CA24 CA44

4C084 AA01 AA02 AA03 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 MA17 MA66 NA14 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162