

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-132774

(P2017-132774A)

(43) 公開日 平成29年8月3日(2017.8.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-32174 (P2017-32174)	(71) 出願人	500034653 ジェンザイム・コーポレーション
(22) 出願日	平成29年2月23日 (2017.2.23)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(62) 分割の表示	特願2015-63153 (P2015-63153) の分割		1 4 2, ケンブリッジ, ケンダル ストリート 5 0 0
原出願日	平成18年5月2日 (2006.5.2)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	60/677, 213	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成17年5月2日 (2005.5.2)	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ジェイムズ・ダッジ
(31) 優先権主張番号	60/790, 217		アメリカ合衆国 O 1 6 0 3 マサチューセツ州ウースター、ゲーツ・サークル1番
(32) 優先日	平成18年4月8日 (2006.4.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脊髄疾患の遺伝子療法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】運動機能および制御に影響を及ぼす障害または損傷を処置するため、脊髄および／または脳幹へのトランスジーン産物を送達する方法の提供。

【解決手段】インスリン成長因子-1、エリスロポエチンやパルブアルブミン等の蛋白質を治療用量で発現するトランスジーンを含むアデノ随伴ウイルスベクター等の神経向性ウイルスベクターを、脳の運動皮質領域へ投与し、該トランスジーンを該投与部位に対して遠位の運動ニューロンで発現させるか、又は該運動ニューロンへ送達する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脊髄および／または脳幹へのトランスジーン産物の送達を助ける条件下で、トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを脳の深部小脳核領域の少なくとも 1 つの領域へ投与することを含む方法。

【請求項 2】

脊髄へのトランスジーン産物の送達を助ける条件下で、トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを脳の運動皮質領域へ投与することを含む方法。

【請求項 3】

対象の運動ニューロンへトランスジーンを送達させる方法であって、該トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを脳の深部小脳核領域の少なくとも 1 つの領域へ投与することを含み、該トランスジーンが該投与部位に対して遠位の運動ニューロンで発現されるか、または該運動ニューロンへ送達されるものである、方法。

10

【請求項 4】

対象の運動ニューロンへトランスジーンを送達させる方法であって、該トランスジーンを含む神経向性ウイルスベクターを脳の運動皮質領域へ投与することを含み、該トランスジーンが該投与部位に対して遠位の運動ニューロンで発現されるか、または該運動ニューロンへ送達されるものである、方法。

【請求項 5】

対象における運動ニューロン障害の処置方法であって、治療用トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを脳の深部小脳核領域の少なくとも 1 つの領域へ投与することを含み、トランスジーン産物が脊髄の少なくとも 1 つの小区分および／または脳幹の少なくとも 1 つの区分へ治療上有効量で送達されるものである、方法。

20

【請求項 6】

対象における運動ニューロン障害の徴候の改善方法であって、治療用トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを脳の運動皮質領域へ投与することを含み、ここで、トランスジーン産物が脊髄の少なくとも 1 つの小区分へ治療上有効量で送達されるものである、方法。

【請求項 7】

神経向性ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）である、請求項 1～6 いずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 8】

神経向性ウイルスベクターが、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7 および AAV 8 からなる群より選択されるアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項 1～6 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

脳の深部小脳核領域の領域が、内側領域、中間領域および外側領域からなる群より選択される、請求項 1、3 または 5 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

送達が両側性である、請求項 1～6 いずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

脊髄小区分が頸部小区分、胸部小区分、腰部小区分および尾部小区分からなる群より選択される、請求項 5 または 6 記載の方法。

【請求項 12】

トランスジーンが脊髄の全小区分へ送達される、請求項 5 または 6 記載の方法。

【請求項 13】

複数回投与の少なくとも 1 回が両側性である、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

トランスジーンが、インスリン成長因子-1（IGF-1）、カルビンジン D 28、パルブアルブミン、HIF1-アルファ、SIRT-2、VEGF、SMN-1、SMN-

50

2 および CNTF（繊維様神経栄養因子）からなる群より選択される、請求項 1～6 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

トランスジーンの発現が、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、原発性側索硬化症（PLS）、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症および外傷性脊髄損傷からなる群より選択される運動ニューロン障害の徴候を改善する、請求項 6 記載の方法。

【請求項 16】

対象がヒト患者である、請求項 1～6 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

トランスジーンが、インスリン成長因子-1（IGF-1）、EPO（エリスロポエチン）、CBP（cAMP 応答要素結合蛋白質 [CREB] 結合蛋白質）、カルビンジン D 28、パルプアルブミン、HIF1-α、SIRT-2、VEGF、SMN-1、SMN-2 および CNTF（繊維様神経栄養因子）からなる群より選択される蛋白質を治療用量で発現する、請求項 1～6 いずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、35 U. S. C. § 119 (e) の下、2005 年 5 月 2 日出願の米国仮出願番号第 60/677, 213 号および 2006 年 4 月 8 日出願の米国仮出願番号第 60/790, 217 号に基づく優先権を主張する。該出願の開示内容は出典明示により本明細書の一部となる。

【0002】

技術分野

本発明は、対象の運動機能、特に、脳および／または脊髄に対する疾患または損傷に侵された運動機能に影響を及ぼす障害を処置するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

遺伝子療法は、中枢神経系（CNS）に影響を及ぼす障害のための新たな治療法である。CNS 遺伝子療法は、有糸分裂後ニューロンへの効率的な感染能を有するウイルスベクターの開発により促進された。中枢神経系は脊髄および脳から構成される。脊髄は末梢神経系から脳へ知覚情報を伝え、さらに、脳から様々なエフェクターへ運動情報を伝える。中枢神経系への遺伝子送達用ウイルスベクターの総説については、Davidson ら（2003）Nature Rev. 4: 353-364 を参照のこと。

【0004】

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、好都合な毒性および免疫原性特性を有し、神経細胞に形質導入することができ、CNS において長期にわたる発現を媒介することができるので、CNS 遺伝子療法に有用であると考えられている（Kaplit ら（1994）Nat. Genet. 8: 148-154; Bartlett ら（1998）Hum. Gene Ther. 9: 1181-1186; および Passini ら（2002）J. Neurosci. 22: 6437-6446）。

【0005】

AAV ベクターの 1 つの有用な特性は、幾つかの AAV ベクターの神経細胞において逆行性および／または順行性輸送される能力にある。ある脳領域のニューロンは、軸索により遠位脳領域に相互連結されており、それ故に、ベクター送達のための輸送系を提供する。例えば、AAV ベクターは、ニューロンの軸索末端またはその付近に投与されてもよい。ニューロンは AAV ベクターを取り込み、軸索に沿って細胞体まで逆行性様式で該ベクターを輸送する。アデノウイルス、HSV および偽性狂犬病ウイルスの、脳内の遠位構造へ遺伝子を送達する同様の特性が示されている（Soudas ら（2001）FASEB J. 15: 2283-2285; Breakefield ら（1991）New Bi

10

20

30

40

50

ol. 3: 203-218; および de Falco ら (2001) Science, 291: 2608-2613)。

【0006】

幾つかのグループは、AAV血清型2 (AAV2) による脳の形質導入が頭蓋内注入部位に限定されていることを報告した (Kaplit ら (1994) Nat. Genet. 8: 148-154; Passini ら (2002) J. Neurosci. 22: 6437-6446; および Chamberlin ら (1998) Brain Res. 793: 169-175)。最近の報告では、神経向性ウイルスベクターの逆行性軸索輸送が正常ラット脳の選択回路においても生じ得ることが示唆されている (Kaspar ら (2002) Mol. Ther. 5: 50-56 (AAV vector); Kasper ら (2003) Science 301: 839-842 (lentiviral vector) および Azzouz ら (2004) Nature 429: 413-417 (lentiviral vector))。Roaul ら (2005) Nat. Med. 11 (4): 423-428 および Ralph ら (2005) Nat. Med. 11 (4): 429-433 は、サイレンシングヒト Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 干渉 RNA を発現するレンチウイルスの筋内注入が、ALS の治療関連遺伝子モデルにおいて筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発病開始を遅延することを報告している。

10

【0007】

AAVベクターにより形質導入された細胞は、治療用トランスジーン産物、例えば、酵素または神経栄養因子を発現し、有益な効果を細胞内で媒介してもよい。これらの細胞は治療用トランスジーン産物を分泌してもよく、その後、該産物は遠位の細胞により取り込まれてもよく、そこで、その有益な効果を媒介してもよい。この過程は相互補正 (cross-correction) として記載されている (Neufeld ら (1970) Science 169: 141-146)。

20

【0008】

しかし、ヒト患者において運動機能の喪失をもたらす脊髄の機能障害を処置するための組成物および方法がなお必要とされている。本発明はこの必要性を満たし、関連する利点もさらに提供する。

【発明の概要】

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概要

本発明は、トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを対象の脳の深部小脳核 (DCN) 領域の少なくとも1つの領域へ投与することによる、対象の脊髄および／または脳幹領域へトランスジーンを送達するための方法および組成物を提供する。ウイルス送達は、脊髄および／または脳幹領域でのトランスジーンを発現を助ける条件下でのものである。

【0010】

別の態様において、本発明は、トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを対象の脳の運動皮質領域へ投与することによる、対象の脊髄へトランスジーンを送達するための方法および組成物を提供する。ウイルスベクターの送達は、脊髄でのトランスジーンを発現を助ける条件下で実施される。運動皮質領域へ投与されたウイルスベクターは、運動ニューロンによりそれらの細胞体領域を介して取り込まれて、トランスジーンが発現される。次いで、発現されたトランスジーンは、脊髄に存在する運動ニューロンの軸索終末部へ順行性輸送される。運動皮質の性質に起因して、脳のこの領域へ投与されたウイルスベクターも、運動ニューロンの軸索末端により取り込まれてもよい。ウイルスベクターもまた、運動ニューロンの軸索に沿って逆行性輸送されて、運動ニューロンの細胞体にて発現されてもよい。

40

【0011】

50

さらに、対象の脳の深部小脳核領域の少なくとも1つの領域へトランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを投与することによる、対象の運動ニューロンへトランスジーンを送達するための組成物および方法が提供される。ベクターの送達は、投与部位に対して遠位の運動ニューロンにおけるトランスジーンを発現を助ける条件下で実施される。

【0012】

投与部位に対して遠位の運動ニューロンにおけるトランスジーンを発現を助ける条件下で、対象の脳の運動皮質領域へトランスジーンを含む神経向性ウイルスベクターを投与することによる、対象の運動ニューロンへトランスジーンを送達するための方法および組成物も提供される。

【0013】

別の一の態様において、本発明は、対象の脳の深部小脳核領域の少なくとも1つの領域へ治療用トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを投与することによる、対象における運動ニューロン障害を処置するための組成物および方法を提供する。該投与は、脊髄および／または脳幹領域の少なくとも1つの小区分における治療上有効量のトランスジーンを発現を助ける条件下で実施される。

【0014】

さらなる一層の一の態様において、本発明は、脊髄および／または脳幹領域の少なくとも1つの小区分における治療上有効量のトランスジーンを発現を助ける条件下で、対象の脳の運動皮質領域へ治療用トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを投与することによる、対象における運動ニューロン障害の徴候を改善するための組成物および方法を提供する。

【0015】

上記の一般的説明および下記の詳細な説明は単なる例示および説明であって、特許請求の範囲に定めた本発明を何ら制限するものではないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、脊髄へ治療用ウイルスを輸送するのにDCNがどのように利用され得るかを示す図である。DCNのアウトラインを示すブラックボックスの内側から始まる線は、脊髄内に局在する細胞体（矢じり）に由来する軸索末端を示す。

【0017】

【図2】図2は、橋－延髄接合部および小脳を通る組織学的横断面の複写であり、DCNの3つの領域を示す。

【0018】

【図3】図3は、小脳虫部に沿って切断し（矢状断面）、次いで、平板化した小脳、ならびに脊髄を通る水平断面および骨格筋系の概略図である。該図は主要な求心性（入力）経路を示す。

【0019】

【図4】図4は、DCNの主要な遠心性（出力）経路を示すダイアグラムである。

【0020】

【図5】図5は、入力と出力を連結する大脳皮質における神経回路を図式的に示す。登上繊維は下オリブに由来し、それ自身が大脳皮質、脊髄および特殊感覚（視覚および聴覚）からの入力を受け取る。苔状繊維入力は、全ての他の求心性神経、例えば、前庭求心性神経、脊髄求心性神経、筋紡錘、ゴルジ腱紡錘、関節受容器、皮膚受容器および大脳皮質に由来する。内在系には、バスケット細胞、ゴルジ細胞および星状細胞を含む3つの種類の抑制性介在ニューロンも存在する。これらは、側方抑制および運動ニューロン機能の微調整に参与する。

【0021】

図2～5は、ウェブサイト上：www.vh.org/adult/provider/anatomy/BrainAnatomy/Ch3Text/Section07。

10

20

30

40

50

htmlで入手可能なWilliamsら(2005) The Human Brain : Chapter 3 : The Cerebellumからの複写である。

【0022】

【図6】図6A～6Eは、ヒトASMをコードする種々のAAV血清型ベクター[(A) 2/1、(B) 2/2、(C) 2/5、(D) 2/7および(E) 2/8]をASMKOマウスの深部小脳核へ注入した後の、小脳の矢状断面におけるヒト酸性スフィンゴミエリン(「hASM」)免疫陽性染色を示す。

【0023】

【図7】図7A～7Eは、深部小脳核から脊髄へのヒト酸性スフィンゴミエリン(「hASM」)蛋白質輸送を示す。この効果は、AAV2/2-ASM、AAV2/5-ASM、AAV2/7-ASMおよびAAV2/8-ASMで処置したマウスにおいて観察された；(A) hASM 倍率10；(B) hASM 倍率40；(C) 共焦点hASM；(D) 共焦点CHAT；ならびに(E) 共焦点hASMおよびCHAT。

10

【0024】

【図8】図8は、ヒトASMをコードする種々のAAV血清型ベクター(2/1、2/2、2/5、2/7および2/8)を深部小脳核(n=5/群)へ注入した後の、小脳組織ホモジナートレベルをグラフで示す。同じ文字で関連付けられていない群は、有意に(p<.0001)異なる。

【0025】

【図9】図9A～9Gは、ヒトASMをコードする種々のAAV血清型ベクター[(A) 2/1、(B) 2/2、(C) 2/5、(D) 2/7および(E) 2/8]をASMKOマウスの深部小脳核へ注入した後の、小脳の矢状断面におけるカルビンジン免疫陽性染色を示す。

20

【0026】

【図10】図10Aおよび10Bは、(AAV-βgalを注入した)ASMKO、WTおよびAAV-ASM処置ASMKOマウス(n=8/群)(14週齢)における、加速および等速ロータロッドパフォーマンスを示す。同じ文字で関連付けられていない群は有意に異なる。加速ロータロッド試験において、AAV2/1-ASMおよびAAV2/8-ASMを注入したマウスは、AAV2/1-βgalを注入したASMKOマウスよりも有意に(p<.0009)より長い落下までの滞在時間を示した。等速ロータロッド試験において、AAV2/1-ASMを注入したマウスは、AAV2/1-βgalを注入したマウスよりも有意に(p<.0001)より長い落下までの滞在時間を示した。

30

【0027】

【図11】図11Aおよび11Bは、ASMKO(n=8)、WT(n=8)および両側性AAV-ASM(n=5/群)処置マウス(20週齢)におけるロータロッドパフォーマンスを示す。加速および等速試験の両方において、AAV-ASM処置マウスは、ASMKO AAV2/1-βgal処置マウスよりも有意に(p<.001)より良好なパフォーマンスを示した。AAV2/1-ASMを注入したマウスのパフォーマンスは、加速および等速試験の両方において野生型マウスと区別がなかった。

【0028】

40

【図12A】図12Aは、深部小脳核領域(内側、中間および外側)と脊髄領域(頸部、胸部、腰部および尾部)との間の関連性を示す。図12Bは、深部小脳核領域(内側、中間および外側)と脳幹領域(中脳、脳橋および髄質)との間の関連性を示す。関連性は矢印で示され、該矢印は、ニューロンの細胞体領域を起点とし、ニューロンの軸索末端領域を終点とする。例えば、DCNの3つの領域の各々は、脊髄の頸部領域を終点とする軸索を送る細胞体を伴うニューロンを有し、一方で、脊髄の頸部領域はDCNの内側または中間領域のいずれかを終点とする軸索を送る細胞体を有する。

【図12B】図12Aは、深部小脳核領域(内側、中間および外側)と脊髄領域(頸部、胸部、腰部および尾部)との間の関連性を示す。図12Bは、深部小脳核領域(内側、中間および外側)と脳幹領域(中脳、脳橋および髄質)との間の関連性を示す。関連性は矢

50

印で示され、該矢印は、ニューロンの細胞体領域を起点とし、ニューロンの軸索末端領域を終点とする。例えば、DCNの3つの領域の各々は、脊髄の頸部領域を終点とする軸索を送る細胞体を伴うニューロンを有し、一方で、脊髄の頸部領域はDCNの内側または中間領域のいずれかを終点とする軸索を送る細胞体を有する。

【0029】

【図13】図13は、緑色蛍光蛋白質（GFP）をコードするAAVのDCN送達の後、脳幹または上部運動ニューロンにおける緑色蛍光蛋白質分布を示す。

【0030】

【図14】図14は、緑色蛍光蛋白質（GFP）をコードするAAVのDCN送達の後、脊髄領域における緑色蛍光蛋白質分布を示す。

10

【0031】

【図15】図15は、GFPをコードするAAVのDCN送達と比較した、IGF-1をコードするAAVのDCN送達の後、脳幹におけるグリア繊維性酸性蛋白質（GFAP）染色における減少を示す。

【0032】

【図16】図16は、GFPをコードするAAVのDCN送達と比較した、IGF-1をコードするAAVのDCN送達の後、口部運動核（oromotor nucleus）（三叉神経核、舌下神経核および顔面神経核）内のグリア繊維性酸性蛋白質（GFAP）染色における減少を示す。

【0033】

20

【図17】図17は、GFPをコードするAAVのDCN送達と比較した、IGF-1をコードするAAVのDCN送達の後、脊髄全体にわたる、グリア繊維性酸性蛋白質（GFAP）染色における減少を示す。

【0034】

【図18】図18は、GFPをコードするAAVのDCN送達と比較した、IGF-1をコードするAAVのDCN送達の後、中枢神経系（CNS）内のIGF-1 mRNAの分布を示す。ベクターアクチンは全mRNAレベルと比較するための正対照として用いる。

【0035】

【図19】図19は、AAV-IGF-1のDCN送達が運動ニューロンの生存を促進したことを示す。アスタリスクで示すように、GFPをコードするAAVのDCN送達に対する、IGF-1をコードするAAVで処置したマウスの差異は、統計的に有意（ p -値 = 0.01）である。

30

【0036】

【図20】図20は、GFPをコードするAAVのDCN送達と比較した、IGF-1をコードするAAVのDCN送達で処置したマウスにおけるロータロッドパフォーマンス、後肢握力および前肢握力における機能上の改善を示す。

【0037】

【図21】図21は、GFPをコードするAAVのDCN送達と比較した、IGF-1をコードするAAVのDCN送達に媒介される生存の増大を示す。

40

【0038】

【図22】図22は、深部小脳核（DCN）へGFP発現AAV1ベクターを両側性送達した後の、マウス脳内のGFP分布を示す。DCNに加えて、GFP陽性染色は嗅球、大脳皮質、視床、脳幹、小脳皮質および脊髄においても観察された。これらの領域の全ては、DCNからの投射を受けるか、および／またはDCNへ投射を送るかのいずれかである。

【発明を実施するための形態】

【0039】

発明の詳細な説明

本発明がより容易に理解され得るために、特定の用語をまず定義する。さらなる定義は

50

発明の詳細な説明を通して示される。

【0040】

別記しない限り、本発明の実施には、当業者の範囲内である、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組換えDNAの慣用的技法が利用され得る。例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.) : PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL AND ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987))を参照のこと。

10

【0041】

文脈上他のものが明記されない限り、本願明細書および請求の範囲で用いられる単数形は複数への言及を含む。例えば、「細胞」なる用語はその混合物を含む複数の細胞を包含する。

【0042】

本明細書で用いる「含む」なる用語は、組成物および方法が列挙した要素を含むが他のものを排除しないことを意味することが意図される。組成物および方法の定義に用いる「本質的に～からなる」は、組み合わせに本質的に重要な任意の他の要素を排除することを意味するものとする。故に、本明細書中定義した要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法由来の微量混入物質および医薬上許容される担体、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、防腐剤等を排除しない。「からなる」は、他の成分の微量要素および本発明の組成物を投与するための実質的な方法工程以外のものを排除することを意味するものとする。これらの移行語の各々により定義される実施態様は本発明の範囲内である。

20

【0043】

範囲を含む全ての数字表示、例えば、pH、温度、時間、濃度および分子量は近似値であり、0.1の量で(+)または(-)に変化する。常に明示される訳ではないが、全ての数字表示は、「約」なる用語が先行しているものとして理解されるべきである。また、常に明示される訳ではないが、本明細書中で記載した試薬は単なる例示であり、その等価物は当該分野において知られていることが理解されるべきである。

30

【0044】

「トランスジーン」なる用語は、細胞に導入され、RNAに転写され得、所望により、適切な条件下で翻訳および／または発現されるポリヌクレオチドを言う。一の態様において、それは導入された細胞へ所望の特性を付与するか、或いは、所望の治療もしくは診断結果をもたらす。別の態様において、それは、siRNAのごときRNA干渉を媒介する分子へ転写されてもよい。

【0045】

ウイルス価に関連して用いられる「ゲノム粒子(gp)」または「ゲノム等価物」なる用語は、感染性または機能性に関わらず、組換えAAV DNAゲノムを含むビリオンの数を言う。特定のベクター調製物中のゲノム粒子の数は、本明細書の実施例または例えば、Clarkら(1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijkら(2002) Mol. Ther., 6:272-278において記載されているような手段により測定され得る。

40

【0046】

ウイルス価に関連して用いられる「感染単位(iu)」「感染性粒子」または「複製単位」なる用語は、例えば、McLaughlinら(1988) J. Virol., 62:1963-1973において記載されている複製中心アッセイとしても知られている感

50

染中心アッセイにより測定されるような、感染性および複製コンピテント組換え A A V ベクター粒子の数を言う。

【0047】

ウイルス価に関連して用いられる「形質導入単位 (t u)」なる用語は、本明細書の実施例または例えば、X i a o ら (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144: 113-124; もしくは F i s h e r ら (1996) *J. Virol.*, 70: 520-532 (L F U a s s a y) において記載されているような機能アッセイで測定されるような、機能性トランスジーン産物の産生をもたらす感染性組換え A A V ベクター粒子の数を言う。

【0048】

「治療上の」「治療上有効量」なる用語およびそれらの同族語は、対象における徴候の予防もしくは開始の遅延もしくは改善、或いは神経病理、例えば、A L S のごとき運動ニューロン疾患に付随する細胞病理の補正のごとき所望の生物学的結果の獲得をもたらす R N A、D N A または D N A および／または R N A の発現産物の量を言う。「治療的補正」なる用語は、対象における徴候の予防もしくは開始の遅延もしくは改善をもたらす補正の程度を言う。有効量は既知の実験方法により測定され得る。

【0049】

「組成物」は、活性物質および他の担体の組み合わせ、例えば、化合物または組成物、不活性 (例えば、検出可能な物質もしくは標識) または活性物質、例えば、アジュバント、希釈剤、結合剤、安定化剤、バッファー、塩、親油性溶媒、防腐剤、アジュバント等を含むことも意図される。担体は、医薬賦形剤および添加剤、蛋白質、ペプチド、アミノ酸、脂質および糖質 (例えば、単糖、二糖、三糖、四糖およびオリゴ糖を含む糖; 誘導体化された糖、例えば、アルジトール、アルドン酸、エステル化された糖等; および多糖または糖ポリマー) も含み、これらは、1~99.99 重量もしくは容積での単独もしくは組み合わせを含む、単独あるいは組み合わせとして提供され得る。例示的な蛋白質賦形剤は、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン (H S A)、組換えヒトアルブミン (r H A)、ゼラチン、カゼイン等を含む。緩衝能において機能し得る代表的なアミノ酸/抗体成分は、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテム等を含む。糖質賦形剤も本発明の範囲内に含まれ、例えば、単糖、例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボース等; 二糖、例えば、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオース等; 多糖、例えば、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン等; およびアルジトール、例えば、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール (グルシトール) およびミオイノシトールを含むが、これらに限定されない。

【0050】

担体なる用語は、バッファーまたは p H 調整剤をさらに含む。典型的には、バッファーは有機酸または塩基から調製された塩である。代表的なバッファーは、有機酸塩、例えば、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸もしくはフタル酸の塩; トリス、トロメタミン塩酸塩またはリン酸バッファーを含む。さらなる担体は、ポリマー賦形剤/添加剤、例えば、ポリビニルピロリドン、フィコール (ポリマー糖)、デキストレート (例えば、シクロデキストリン、例えば、2-ヒドロキシプロピル- α -D-ガラクトースアダラチュア (q u a d r a t u r e) -シクロデキストリン)、ポリエチレングリコール、香料、抗菌剤、甘味料、抗酸化剤、静電気防止剤、界面活性剤 (例えば、ポリソルベート、例えば、「T W E E N 2 0」および「T W E E N 8 0」)、脂質 (例えば、リン脂質、脂肪酸)、ステロイド (例えば、コレステロール) およびキレート剤 (例えば、E D T A) を含む。

【0051】

本明細書で用いる「医薬上許容される担体」なる用語は、任意の標準的な医薬担体、例

10

20

30

40

50

えば、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水およびエマルジョン、例えば、油／水もしくは水／油エマルジョンおよび様々な種類の湿潤剤を包含する。組成物は、安定化剤および防腐剤および任意の上記した担体を含むが、ただし、それらはさらにインビボでの使用に許容され得るものである。担体、安定化剤およびアジュバントの例については、Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) および Williams & Williams, (1995) および "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N. J. (1998) を参照のこと。

【0052】

本明細書中、「対象」、「個人」または「患者」は同義的に用いられ、脊椎動物、好ましくは、哺乳類、より好ましくは、ヒトを言う。哺乳類は、マウス、ラット、サル、ヒト、家畜、競技用動物およびペットを含むが、これらに限定されない。

【0053】

「対照」は、比較目的のために実験において用いられる補助的な対象または試料である。対照は「正」または「負」であり得る。例えば、実験の目的が特定の型の病変（例えば、上記のALSを参照のこと）と改変された遺伝子発現レベルとの相関を測定することである場合、一般的に、陽性対照（かかる改変を有し、その疾患に特徴的な症状を呈している対象または該対象に由来する試料）および負対照（改変された発現およびその疾患の臨床症状を欠失している対象または該対象に由来する試料）を用いることが好ましい。

【0054】

遺伝子に適用される「示差的に発現される」は、遺伝子から転写されるmRNAまたは遺伝子によりコードされる蛋白質産物の示差的な産生を言う。示差的に発現された遺伝子は、正常または対照細胞の発現レベルと比較して、過剰発現または過小発現されていてもよい。一の態様において、それは、対照試料において検出される発現レベルよりも少なくとも1.5倍、または少なくとも2.5倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍高いまたは低い示差を言う。「示差的に発現される」なる用語は、対照細胞においてサイレントである場合に発現されているか、または対照細胞において発現されている場合には発現されていない、細胞または組織のヌクレオチド配列も言う。

【0055】

本明細書で用いる「調節する」なる用語は、効果または結果の量または強さを変化する、例えば、高める、増強する、弱める、または軽減することを意味する。

【0056】

本明細書で用いる「改善する」なる用語は、「緩和する」と同義であり、低下すること、または軽減することを意味する。例えば、疾患または障害の徴候をより耐えられるものにするにより改善してもよい。

【0057】

遺伝子導入がDNAウイルスベクター、例えば、アデノウイルス(Ad)またはアデノ随伴ウイルス(AAV)により媒介される態様において、ベクターコンストラクトは、ウイルスゲノムまたはその部分およびトランスジーンを含むポリヌクレオチドを言う。アデノウイルス(Ads)は、50を超える血清型を含む、比較的よく特徴付けられたウイルスの同種群である。例えば、国際PCT出願番号WO95/27071を参照のこと。Adsは成長しやすく、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。組換えAd由来ベクター、特に、野生型ウイルスの組み換えおよび産生の可能性を軽減するものも構築されている。国際PCT出願番号WO95/00655およびWO95/11984を参照のこと。野生型AAVは宿主細胞のゲノムへの組み込みの高い感染性および特異性を有する。Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 および Lebkowski, et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996 を参照のこと。

【0058】

本発明は、トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを脳の深部小脳核領域の少なくとも1つの領域へ投与することによる、トランスジーンを対象の脊髄および／または脳幹へ送達する方法を提供し、該送達は、投与部位に対して遠位の部位におけるトランスジーンを発現を助ける条件下で実施される。該送達は、投与部位においてトランスジーンを発現をもたらしてもよい。

【0059】

特に反対の指示がない限り、トランスジーンを発現は、ポリペプチドまたは蛋白質の翻訳に限定されず、トランスジーンポリヌクレオチドの複製および／または転写も含む。

【0060】

別の態様において、本発明は、運動ニューロン障害、例えば、ALSまたは外傷性脊髄損傷に苦しむ哺乳類における、CNSの標的細胞、すなわち、ニューロンまたはグリア細胞へ治療用トランスジーン産物を送達する方法を提供する。トランスジーンはIGF-1をコードしていてもよい。

【0061】

別の態様において、本発明は、トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを脳の運動皮質領域へ投与することによる、対象においてトランスジーンを脊髄へ送達する方法であり、該送達は、投与部位に対して遠位の部位での該トランスジーンを発現を助ける条件下で実施される。

【0062】

さらなる一層の一の態様において、本発明のウイルスベクターは、脳の深部小脳核領域の少なくとも1つの領域へ投与され、ここで、トランスジーン産物は発現され、対象の脊髄および／または脳幹領域に送達される。

【0063】

別の実施態様において、ウイルスベクターは、脳幹および脊髄運動ニューロンに相互連結した脳の深部小脳核領域の少なくとも1つの領域に投与される。これらの標的領域は、運動ニューロンの細胞環境を構成する細胞（例えば、介在ニューロンおよび星状膠細胞）と直接連結する。該投与により、トランスジーン産物は運動ニューロンの細胞環境へ送達され、ここで、該産物が、細胞環境を構成する細胞に対して有益な効果を媒介する。

【0064】

一の実施態様において、本発明は、トランスジーンを含む神経向性ウイルスベクターを対象の脳の運動皮質領域へ投与することによる、対象の運動ニューロンへのトランスジーンを送達または該運動ニューロンにおけるその発現の調節方法であり、該トランスジーンは投与部位に対して遠位の運動ニューロンの領域で発現される。

【0065】

別の一の実施態様において、本発明は、治療用トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを対象の脳の深部小脳核領域の少なくとも1つの領域へ投与することによる、対象における運動ニューロン障害の処置方法であり、該トランスジーンは対象の脊髄の少なくとも1つの小区分で、治療上有効量で、発現される。これらの小区分は、頸部、胸部、腰部または尾部の1または複数を含む（図1、図12Aを参照のこと）。トランスジーンは、脳幹、例えば、中脳、脳橋または髄質の少なくとも1つの領域で、治療上有効量で、発現されてもよい（図12Bを参照のこと）。トランスジーンは、対象の脳幹の少なくとも1つの領域および脊髄の少なくとも1つの小区分の両方で、治療上有効量で、発現されてもよい。

【0066】

本発明はまた、治療用トランスジーンを含む組換え神経向性ウイルスベクターを脳の運動皮質領域へ投与することによる、対象における運動ニューロン障害の徴候の改善方法であり、該トランスジーンは、対象の脊髄の少なくとも1つの小区分で、治療上有効量で発現される。これらの小区分は、頸部、胸部、腰部または尾部の1または複数を含む（図1、図12Aを参照のこと）。

【0067】

10

20

30

40

50

本発明の実施に適する神経向性ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）、単純ヘルペスウイルスベクター（米国特許第5,672,344号）およびレンチウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。

【0068】

本発明の方法において、任意の血清型のAAVが用いられ得る。特定の実施態様において、ベクターが疾患一易感染性の脳において逆行性軸索輸送され得るか、または易感染性でない脳において軸索輸送され得る限り、任意の血清型のAAVが用いられ得る。本発明の特定の実施態様において用いられるウイルスベクターの血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7およびAAV8（例えば、Gaoら（2002）PNAS, 99:11854-11859; およびViral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003を参照のこと）からなる群より選択される。本明細書にて記載したものに加えて、他の血清型が用いられ得る。さらに、偽型AAVベクターが本明細書に記載の方法において用いられてもよい。偽型AAVベクターは、第2のAAV血清型のカプシド中に1つのAAV血清型のゲノムを含むもの; 例えば、AAV2カプシドおよびAAV1ゲノムを含むAAVベクター、またはAAV5カプシドおよびAAV2ゲノムを含むAAVベクターである（Auricchi

10

【0069】

AAVベクターは、哺乳類に対して非病原性である1本鎖（ss）DNAパルボウイルスに由来する（Muzyscka（1992）Curr. Top. Microb. Immunol., 158:97-129で概説されている）。簡単に言うと、AAVに基づくベクターは、ウイルスゲノムの96%を占めるrepおよびcapウイルス遺伝子を除去し、ウイルスDNAの複製、パッケージングおよび組み込みを開始するために用いられる2つの隣接した145塩基対（bp）の逆方向末端反復（ITR）を残したものである。ヘルパーウイルスの不在下で、野生型AAVは、ヒト宿主細胞ゲノムの染色体19q13.3に優先的な部位特異性で組み込まれるか、またはそれはエピソームとして発現されたままでもよい。単一のAAV粒子は、最高5kbまでのssDNAを収容可能であり、故に、トランスジーンおよび調節要素のために約4.5kbを残しており、これは典型的には十分である。しかし、例えば、米国特許第6,544,785号において記載されているようなトランススプライシング系では、この制限をほぼ2倍にしてよい。

20

30

【0070】

一の例示的实施態様において、AAVはAAV2またはAAV1である。多くの血清型のアデノ随伴ウイルス、特に、AAV2が広く研究されており、遺伝子療法用ベクターとして特徴付けられている。当業者は、機能性AAVに基づく遺伝子療法用ベクターの調製に精通しているであろう。ヒト対象へ投与するためのAAVの産生、精製および調製の様々な方法に関する多数の参考文献が多種多様な刊行物で見出され得る（例えば、Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003を参照のこと）。さらに、CNSの細胞を標的するAAVに基づく遺伝子療法は米国特許第6,180,613号および第6,503,888号に記載されている。さらなる例示的なAAVベクターは、ヒト蛋白質をコードする組換えAAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/7およびAAV2/8血清型ベクターである。

40

【0071】

本発明の特定の方法において、ベクターは、プロモーターに作動可能に連結されたトランスジーンを含む。トランスジーンは、生物活性のある分子をコードし、CNSにおけるその発現は、神経病変の少なくとも部分的な補正をもたらす。ヒトASMのゲノムおよび機能性cDNA配列は公開されている（例えば、米国特許第5,773,278号および第6,541,218号を参照のこと）。インスリン様成長因子（IGF-1）遺伝子は複雑な構造を有し、当該分野においてよく知られている。それは、遺伝子転写物から生じ

50

る少なくとも2つの選択的スプライシングによるmRNA産物を有する。IGF-1AまたはIGF-1Eaを含む幾つかの名称で知られている153個のアミノ酸ペプチド、およびIGF-1BまたはIGF-1Ebを含む幾つかの名称で知られている195個のアミノ酸ペプチドが存在する。IGF-1の成熟形態は70個のアミノ酸ポリペプチドである。IGF-1EaおよびIGF-1Ebの両方が70個のアミノ酸成熟型ペプチドを含むが、それらのカルボキシ末端伸長の配列および長さは異なる。IGF-1EaおよびIGF-1Ebのペプチド配列をそれぞれ配列番号：1および2で示す。ヒトIGF-1のゲノムおよび機能性cDNAならびにIGF-1遺伝子およびその産物に関するさらなる情報はUniGene Accession No. NM_00618で入手可能である。

10

【0072】

真核細胞におけるトランスジーン発現のレベルは、概して、トランスジーン発現カセット内の転写プロモーターにより決定される。長期間の活性を示し、組織—およびさらには細胞—特異的なプロモーターが幾つかの実施態様において使用される。プロモーターの非限定的な例は、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（Kaplittrら（1994）Nat. Genet. 8：148-154）、CMV／ヒトβ3-グロビンプロモーター（Mandelら（1998）J. Neurosci. 18：4271-4284）、GFAPプロモーター（Xuら（2001）Gene Ther. 8：1323-1332）、1.8-kbのニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター（Kleinら（1998）Exp. Neurol. 150：183-194）、ニワトリベータアクチン（CBA）プロモーター（Miyazaki（1989）Gene 79：269-277）、β-グルクロニダーゼ（GUSB）プロモーター（Shipleyら（1991）Genetics 10：1009-1018）およびユビキチンプロモーター、例えば、米国特許第6,667,174号に記載されたようなヒトユビキチンA、ヒトユビキチンBおよびヒトユビキチンCから単離されたものを含むが、これらに限定されない。発現を長引かせるために、他の調節要素、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素（WPRE）（Donelloら（1998）J. Virol. 72：5085-5092）またはウシ成長ホルモン（BGH）ポリアデニル化部位がさらにトランスジーンに作動可能に連結されてもよい。

20

【0073】

幾つかのCNS遺伝子療法に適用する場合、転写活性を制御する必要があるかもしれない。この目的のために、ウイルスベクターを用いる遺伝子発現の薬理的調節は、例えば、Habermat et al.（1998）Gene Ther. 5：1604-16011；およびYeら（1995）Science 283：88-91に記載されているような様々な調節要素および薬剤応答性プロモーターを含めることにより、獲得され得る。

30

【0074】

本発明の方法において、ウイルスベクターは、ニューロンの末端にある軸索末端とトランスジーンを有するウイルスベクターを含有する組成物とを接触させ、ウイルス粒子を取り込ませ、軸索に沿ってニューロンの細胞体まで細胞内を（逆行性）輸送させ；治療用トランスジーン産物を発現させることにより投与され得、それにより、治療用トランスジーン産物は対象における病変を改善する。運動ニューロン、運動ニューロン環境を構成する細胞（例えば、介在ニューロンおよび星状膠細胞）、またはその両方に対して作用してもよい。特定の実施態様において、組成物中のベクターの濃度は、少なくとも：（a）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50（ $\times 10^{12}$ gp/ml）；（b）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50（ $\times 10^9$ tu/ml）；或いは（c）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50（ $\times 10^{10}$ iu/ml）である。

40

【0075】

本発明のさらなる方法において、ウイルスベクターは、ニューロンの細胞体とトランス

50

ジーンを有するウイルスベクターを含有する組成物とを接触させ、ウイルス粒子を取り込ませ、治療用トランスジーン産物を発現させ、軸索に沿ってニューロンの軸索末端まで細胞内を順行性輸送させることにより投与され、それにより、治療用トランスジーン産物は対象における病変を改善する。運動ニューロン、運動ニューロン環境を構成する細胞（例えば、介在ニューロンおよび星状膠細胞）、またはその両方に対して作用してもよい。特定の実施態様において、組成物中のベクターの濃度は、少なくとも：（a）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50（ $\times 10^{12}$ gp/ml）；（b）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50（ $\times 10^9$ tu/ml）；或いは（c）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50（ $\times 10^{10}$ iu/ml）である。

10

【0076】

一の態様において、トランスジーンは生物活性のある分子をコードし、CNSにおけるその発現は神経病変の少なくとも部分的な補正をもたらす。幾つかの実施態様において、治療用トランスジーン産物は、対象におけるSODの発現を阻害し、それによりALSの徴候を改善または予防するRNA分子である。Roaulら（2005）Nat. Med. 11（4）：423-428およびRalphら（2005）Nat. Med. 11（4）：429-433を参照のこと。

【0077】

これらの方法を実施する一の態様において、トランスジーンは、インスリン成長因子-1（IGF-1）、カルビンジンD28、パルプアルブミン、HIF1-アルファ、SIRT-2、VEGF、EPO（エリスロポエチン）、CBP（cAMP応答要素結合蛋白質〔CREB〕結合蛋白質）、SMN-1、SMN-2およびCNTF（繊毛様神経栄養因子）からなる群より選択される蛋白質を治療用量で発現する。

20

【0078】

或いは、トランスジーンは、突然変異型の蛋白質、例えば、ALSをもたらす突然変異SODの発現を阻害する。上記のRoaulら（2005）およびRalphら（2005）。

【0079】

ヒト脳内の構造の同定については、例えば、The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply, 2nd ed., eds. Deuteronら, Springer Vela, 1999; Atlas of the Human Brain, eds. Maiら, Academic Press; 1997; およびCo-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging, eds. Tamarackら, Thyme Medical Pub., 1988を参照のこと。マウス脳内の構造の同定については、例えば、The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed., Academic Press, 2000を参照のこと。図1は、脊髄ならびにその4つの小区分：頸部、胸部、腰部および尾部を図式的に示す。

30

40

【0080】

本発明は、運動ニューロン損傷に苦しむ対象における運動機能の調節、補正または増強方法を提供する。単なる例示ではあるが、対象は、筋萎縮側索硬化症（ALS）、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症、原発性側索硬化症（PLS）または外傷性脊髄損傷の1つまたは複数患っている。よい。

【0081】

理論に限定されないが、運動ニューロン損傷に付随する病変は、運動ニューロン変性、グリオーシス、ニューロフィラメント異常、皮質脊髄路および前根における有髄繊維の欠損を含む。例えば、2つの発症型：上部運動ニューロン（皮質および脳幹運動ニューロン

50

）に影響を及ぼし、顔面筋、スピーチおよび嚥下に影響を及ぼす延髄での発症；および下部運動ニューロン（脊髄運動ニューロン）に影響を及ぼし、痙攣、全身衰弱、筋萎縮症、麻痺および呼吸不全に反映される肢での発症が認識されている。ALSでは、対象は延髄および肢での発症の両方を有する。PLSでは、対象は延髄での発症を有する。

【0082】

理論に限定されないが、本発明の一の実施態様は、治療用分子（例えば、蛋白質またはペプチド）を脊髄の各区分へ提供できることにある。これは、AAVベクターをDCNへ注入することにより成し遂げられてもよい。さらに、各脊髄区分内の個々の薄膜を標的することが重要であってもよい。薄膜は脳および脊髄の領域内の特異的な小領域である。特定の実施態様では、特定の脊髄区分内の特定の薄膜を標的することが所望されてもよい。運動ニューロン損傷は上部運動ニューロン内にも生じてもよいので、治療用分子（例えば、蛋白質またはペプチド）を脳幹の区分へ提供することが所望されてもよい。一の実施態様において、幾つかのまたは全ての小区分を含む脊髄、ならびに幾つかのまたは全ての小区分を含む脳幹の両方に治療用分子を提供することが所望されてもよい。本発明は、AAVベクターのDCNへの導入を用いて、上記した治療用分子の脊髄領域（複数可）および／または脳幹への送達を成し遂げる。図12Aは深部小脳核領域と脊髄の間の関連性を示し、一方で、図12Bは深部小脳核領域と脳幹との間の関連性を示す。

【0083】

複雑な運動行為を編成し、実行する能力は、大脳皮質の運動野、すなわち、運動皮質からのシグナルに依存する。運動皮質の指令は2つの経路で伝わる。皮質延髄繊維は、顔面筋を動かす脳幹の運動核を制御し、皮質脊髄繊維は、体幹および肢の筋肉を刺激する脊髄運動ニューロンを制御する。大脳皮質はまた、下行性脳幹経路に作用することにより、脊髄運動活動に間接的に影響を及ぼす。

【0084】

一次運動皮質は、ブロードマン領野の中心前回に沿って局在する（4）。脊髄に投射する皮質ニューロンの軸索は、約100万個の軸索を含む大きな繊維束である皮質延髄路内を共に走行する。これらの約3分の1は前頭葉の中心前回に由来する。別の3分の1は領域6に由来する。残りは体性感覚皮質内の領域3、2および1に由来し、後角を介する求心性入力 of 伝達を調節する。

【0085】

皮質脊髄繊維は、皮質延髄繊維と共に走行し、内包後脚を経て、中脳の腹側部に到達する。それらは脳橋において小さな繊維束に分かれ、橋核の間を走行する。それらは髄質において再編成され、延髄錐体を形成する。皮質脊髄繊維の約4分の3が、髄質および脊髄の接合部にある錐体交叉の正中線で交差する。交差した繊維は、外側皮質脊髄路を形成する脊髄の側柱の背側部（背外側柱）に下行する。交差しなかった繊維は、腹側皮質脊髄路として前柱を下行する。

【0086】

皮質脊髄路の背側および腹側区分は、脳幹の外側および内側系として脊髄灰白質のほぼ同じ領域で終結する。背側皮質脊髄路は主に、前角の外側部分の運動核および中間帯の介在ニューロンに投射する。腹側皮質脊髄路は、腹側正中細胞柱および体軸筋を刺激する運動ニューロンを含む中間帯の隣接部分の両側に投射する。図3は主要な求心性（入力）経路を図式的に示す。

【0087】

小脳内の深部は、内側（室頂）核、中間（中位）核および外側（歯状）核と称される、深部小脳核と称される灰白質である。本明細書で用いる「深部小脳核」なる用語はこれらの3領域を集合的に言う。図2は、DCNの3つの領域を図式的に示す。図4は、DCNからの主要な遠心性（出力）経路を図式的に示す。図5は、大脳皮質における神経回路を図式的に示す。図12Aおよび12Bは、DCNと脊髄または脳幹との間の各関連性を図式的に示す。

【0088】

所望により、ヒト脳構造は、別の哺乳類の脳の類似構造に関連付けられ得る。例えば、ヒトおよび齧歯類を含む大部分の哺乳類は、内嗅－海馬投射の同様の組織分布の編成を示し、外側および内側内嗅皮質の両方の外側部分にあるニューロンは海馬の背側部または中隔柱に投射し、一方で、腹側海馬への投射は、内嗅皮質の内側部分にあるニューロンから主に生じる（Principles of Neural Science, 4th ed., eds Kandelら, McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2nd ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995）。さらに、内嗅皮質のII層細胞は歯状回に投射し、それらは歯状回の分子層の外側3分の2で終結する。III層細胞からの軸索は海馬のアモン角領域CA1およびCA3の両側に投射し、網状層分子層で終結する。

10

【0089】

一の態様において、開示した方法は、罹患した対象のCNSへ治療用産物をコードするトランスジーンを有する神経向性ウイルスベクターを投与し、投与部位から遠位のCNS内で治療レベルのトランスジーンを発現させることを含む。加えて、ベクターは、CNS障害の処置に有効な生物活性のある分子をコードするポリヌクレオチドを含んでもよい。かかる生物活性のある分子は、天然または突然変異型の全長蛋白質、天然または突然変異型の蛋白質フラグメント、合成ポリペプチド、抗体および抗体フラグメント、例えば、Fab'分子を含むがこれらに限定されないペプチドを含んでもよい。生物活性のある分子は、1本鎖または2本鎖DNAポリヌクレオチドおよび1本鎖または2本鎖RNAポリヌクレオチドを含むヌクレオチドを含んでもよい。本明細書で開示した方法の実施にお

20

【0090】

一の例示的实施態様において、投与は、高力価ベクター溶液を対象または患者のDCNへ直接注入することにより成し遂げられる。例えば、投与は、内側（室頂）領域、中間（中位）領域および外側（歯状）領域からなる群より選択される脳の1または複数の深部小脳核領域へ直接注入することによる。DCNは、脳幹および脊髄との広範な遠心性および求心性の関連性を有するために、魅力的な注入部位である。これらの細胞は、ウイルスベクターおよび発現されたトランスジーンを脊髄領域および脳幹領域へ送達するための効果的かつ低侵襲的な手段を提供する。理論に限定されないが、ウイルスベクターは、軸索末端により取り込まれて、脊髄領域および／または脳幹全体にわたって投射しているこれらのニューロンの細胞体まで軸索に沿って逆行性輸送されてもよい。ニューロンの細胞体は、例えば、脊髄の頸部領域で終結する軸索末端終結部を有するDCNにも存在する。これらの細胞体により取り込まれたウイルスベクター、またはウイルスベクターに由来する発現されたトランスジーン、またはその両方は、脊髄頸部領域内の軸索末端終結部に順行性輸送されてもよい。故に、注入部位としてDCNを用いることにより、少量のウイルスベクターのみが注入されるが、これが、脊髄および／または脳幹の1または複数の領域にわたって有意なトランスジーン発現を媒介する。

30

40

【0091】

幾つかの実施態様において、方法は、治療レベルのトランスジーン産物が第1の部位に対して遠位のCNSの第2の部位で発現されるように、治療用トランスジーンを有する高力価神経向性ベクターの投与を含む。幾つかの実施態様において、組成物のウイルス価は少なくとも：(a) 5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50 ($\times 10^{12}$ gp/ml)；(b) 5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50 ($\times 10^9$ tu/ml)；或いは(c) 5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25または50 ($\times 10^{10}$ iu/ml)である

50

。さらなる実施態様において、投与は、高力価神経向性ベクター溶液を罹患した脳へ直接実質内注入することにより成し遂げられ、その後、治療レベルのトランスジーンを投与部位から少なくとも2、3、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45または50mmで、投与部位に対して遠位、対側性または同側性で発現させる。

【0092】

第1と第2の部位の間の距離は、当該分野において知られているか実施例に記載されている手段、例えば、インサイツハイブリダイゼーションを用いて測定されるような、投与部位（第1の部位）と、検出可能な形質導入の境界である遠位部位（第2の部位）との間の最小距離領域として定義される。大型哺乳類のCNS内の幾つかのニューロンは、それらの軸索投射のために、遠距離に及んでもよい。例えば、ヒトでは、幾つかの軸索は1000mm以上の距離に及んでもよい。故に、本発明の様々な方法において、ベクターは、かかる距離の軸索の全長に沿って軸索を輸送され、親細胞体に到達して、形質導入し得る。

10

【0093】

CNS内のベクター投与部位は、投与部位および標的領域が軸索との連結を有する限り、神経病変の所望の標的領域および関与する脳回路のトポロジーに基づいて選択される。標的領域は、例えば、3-D定位固定座標を用いて定義され得る。幾つかの実施態様において、投与部位は、注入されるベクターの総量の少なくとも0.1、0.5、1、5または10%が、少なくとも1、200、500または1000mm³の標的領域に遠位で送達されるように選択される。投与部位は、脳の遠位領域に連結する投射ニューロンにより刺激された領域に局在してもよい。例えば、実質黒質および腹側分節領域は、尾状核および被殻（合わせて線条体としても知られている）に高密度の投射を送る。実質黒質および腹側被蓋内のニューロンは、線条体への注入後の、AAVの逆行性輸送による形質導入のために標的され得る。別の例として、海馬は、脳の他の領域から、十分に定義された予測可能な軸索投射を受ける。他の投与部位は、例えば、脊髄、脳幹（髄質、中脳および脳橋）、中脳、小脳（深部小脳核を含む）、間脳（視床、視床下部）、終脳（線条体、大脳皮質、または皮質、後頭葉、側頭葉、頭頂葉もしくは前頭葉内）またはそれらの組み合わせ中に局在してもよい。

20

【0094】

第2の（標的）部位は、第1の（投与）部位に投射するニューロンを含む、脳および脊髄を含むCNSの任意の領域に局在し得る。幾つかの実施態様において、第2の部位は、黒質、延髄、脳幹または脊髄から選択されるCNSの領域内にある。

30

【0095】

ベクターを特に中枢神経系の特定の領域に、特に、脳の特定の領域に送達するために、定位固定微量注入により投与されてもよい。例えば、手術日に、患者の適当な位置に定位固定フレームベースを固定する（頭蓋内にねじ込む）。定位固定フレームベース（基準点マークと適合するMRI）を固定された脳は、高分解能MRIを用いて画像化できる。次いで、MRI画像を、定位固定ソフトウェアを実行するコンピューターに転送する。一連の冠状方向、矢状方向および軸方向の画像を用いて、ベクター注入の標的部位および軌道を決定できる。ソフトウェアは、その軌道を定位固定フレームに適する3次元座標に直接翻訳する。侵入部位および所定の深さで埋め込んだニードルの付いた定位固定装置の上にドリルで穴（Burr hole）を開ける。次いで、医薬上許容される担体中のベクターが注入され得る。次いで、ベクターは、主要な標的部位に直接注入することにより投与され、軸索を介して遠位の標的部位に逆行性輸送される。さらなる投与経路、例えば、直接可視化の下での表面皮質への適用または他の非一定位固定の適用を用いてもよい。

40

【0096】

加えて、DCNの各領域はCNSの特定領域を標的するので（図1および図12Aおよび12Bを参照のこと）、投与のためのDCNの領域を予め選択することにより、トランスジーンが送達されるCNSの領域を特に標的化できる。当業者には明かであろうが、トランスジーン投与の位置、順序および回数を変化させることにより、多数の投与および標

50

的化送達が成し遂げられ得る。投与されるべき材料の全量および投与されるべきベクター粒子の総数は、遺伝子療法の既知の態様に基づいて、当業者により決定されるだろう。治療有効性および安全性は適切な動物モデルで試験され得る。例えば、様々な十分に特徴付けられた動物モデルがLSD用に存在し、例えば、本明細書またはWatsonら(2001) *Methods Mol. Med.* 76:383-403; またはJeyakumarら(2002) *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 28:343-357 and ALS (see Tuら(1996) *P. N. A. S.* 93:3155-3160; Roaulら(2005) *Nat. Med.* 11(4):423-428およびRalphら(2005) *Nat. Med.* 11(4):429-433)に記載されている。

10

【0097】

実験用マウスでは、注入されたAAV溶液の全量は、例えば、1~5 μ lである。ヒト脳を含む他の哺乳類では、量および送達速度は適宜調整される。例えば、霊長類の脳では150 μ lの量が安全に注入され得ることが示されている(Jansonら(2002) *Hum. Gene Ther.* 13:1391-1412)。処置は、標的部位あたり一回の注入で構成されてもよく、または、必要な場合には、注入路に沿って繰り返されてもよい。複数の注入部位が用いられ得る。例えば、幾つかの実施態様において、第1の投与部位に加えて、トランスジーンを有するウイルスベクターを含有する組成物が、第1の投与部位に対して対側または同側であり得る別の部位へ投与される。注入は一回または複数回、片側性または両側性であってもよい。

20

【0098】

高力価AAV調製物は、当該分野において知られている技法、例えば、米国特許第5,658,776号およびViral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Human a Press, 2003に記載されている技法を用いて調製され得る。

【0099】

以下の実施例は本発明の実施態様の説明を提供する。当業者であれば、本発明の精神または範囲を変更することなく、様々な修飾および改変がなされてもよいことを理解するであろう。かかる修飾および改変は本発明の範囲内に包含される。実施例は本発明を限定するものでは決してない。

30

【実施例】

【0100】

組換えベクターの力価測定

AAVベクター力価を、ゲノムコピー数(1ミリリットルあたりのゲノム粒子)により測定した。ゲノム粒子濃度は、以前に報告されたように(Clarkら(1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijkら(2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278)、ベクターDNAのTaqman(登録商標)PCRに基づいた。簡単に言うと、精製AAV-ASMを、カプシド消化バッファー(50mMのトリス-HCl, pH8.0, 1.0mMのEDTA, 0.5% SDS, 1.0mg/mlプロテイナーゼK)で50℃、1時間処理し、ベクターDNAを放出させた。DNA試料を、プロモーター領域、トランスジーンまたはポリA配列のごときベクターDNA中の特異的配列にアニールするプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に供した。次いで、PCR結果を、Perkin Elmer-Applied Biosystems(Foster City, CA) Prism 7700 Sequence Detector Systemにより提供されるようなReal-time Taqman(登録商標)ソフトウェアにより定量した。

40

【0101】

感染性アッセイを用いて、 β -ガラクトシダーゼまたは緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)のごときアッセイ可能なマーカー遺伝子を有するベクターの力価を測定することができる。AAVを用いて感受性細胞(例えば、HeLaまたはCOS細胞)に形質導入し

50

、 β -ガラクトシダーゼベクターで形質導入した細胞のX-gal (5-ブロモ-4クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)での染色またはGFP形質導入細胞の蛍光顕微鏡検査法のごときアッセイを実施して、遺伝子発現を測定する。例えば、アッセイを以下のように行う： 4×10^4 個のHeLa細胞を、通常の成長培地を用いる24穴培養プレートの各ウェルに蒔く。接着後、すなわち、約24時間後、細胞を感染多重度(MOI)10でAd型5に感染させ、段階希釈したパッケージ化ベクターで形質導入し、37℃でインキュベートする。1～3日後、広範な細胞変性効果が観察される前に、適切なアッセイ(例えば、X-gal染色または蛍光顕微鏡検査法)を細胞上で行う。 β -ガラクトシダーゼのごときレポーター遺伝子を用いる場合、細胞を2%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド中で固定し、X-galを用いて β -ガラクトシダーゼ活性について染色する。十分に分離した細胞を生じるベクター希釈液をカウントする。各陽性細胞はベクターの形質導入単位(tu)が1であることを表す。

10

【0102】

機能性蛋白質の発現は治療関連マウスモデルにおける運動不全を抑止する

ASMKOマウスは、ニーマン・ピック病AおよびB型の一般に認められたモデルである(Horinouchiら(1995)Nat. Genetics 10:288-293; Jinら(2002)J. Clin. Invest. 109:1183-1191; およびOtterbach(1995)Cell 81:1053-1061)。ニーマン・ピック病(NPD)はリソソーム蓄積症として分類され、酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM; スフィンゴミエリンコリンホスホヒドロラーゼ, EC3.1.3.12)の遺伝的欠損により特徴付けられる遺伝性神経代謝障害である。機能性ASM蛋白質の欠如は、脳全体にわたるニューロンおよびグリアのリソソーム内にスフィンゴミエリン基質の蓄積をもたらす。これにより、周核体において多数の膨張したリソソームが形成され、これは、NPD A型の顕著な特徴であり、主要な細胞表現型である。膨張したリソソームの存在は、正常な細胞機能の喪失および罹患した個人に幼児期での死をもたらす進行性の神経変性過程に相関する(The Metabolic and Molecular bases of Inherited Diseases, eds. Scriverら, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3589-3610)。第2の細胞表現型(例えば、さらなる代謝異常)も、リソソームコンパートメント内の高レベルのコレステロール蓄積が顕著である、この疾患に関連する。スフィンゴミエリンはコレステロールに対して強い親和性を有し、ASMKOマウスおよびヒト患者のリソソーム内に多量のコレステロールの隔離をもたらす(Leventhalら(2001)J. Biol. Chem. 276:44976-44983; Slotte(1997)Subcell. Biochem. 28:277-293; およびViana et al.(1990)J. Med. Genet. 27:499-504)。

20

30

【0103】

以下の実験により、深部小脳核内への片側性注入後のASMKOマウスにおいて、ヒトASM(hASM)をコードする組換えAAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/7およびAAV2/8血清型ベクターのhASM蛋白質を発現し、コレステロール貯蔵病変を補正し、輸送を受け、プルキンエ細胞をレスキューし、および機能的回復を開始する相対能力を評価した。さらなる群のASMKOマウスのDCNへ両側性注入を行い、増大したトランスジーン蛋白質の広がり/発現が行動上の機能回復を改善し得るかを評価した。

40

【0104】

66匹の雄ホモ接合性(-/-)酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト(ASMKO)マウスおよび16匹の雄野生型同腹子対照を異種交配(+/-)により繁殖させた。Galら(1975)N Engl J Med:293:632-636に記載の手段に従うPCRにより、マウスの遺伝子型を同定した。元々の群体からのマウスをC57/B16系統と戻し交配した。動物を12:12時間の明:暗サイクルの下で飼育し、自由に食餌および水を摂取させた。全手段は、the Institutional Ani

50

mal Care and Use Committeeにより認可されたプロトコルに基づいて行った。

【0105】

イソフルランで麻酔した後、以下のAAV血清型ベクター（ $n=8$ ／ベクター）：AAV1-CMV- β gal、AAV1-CMV-ASM、AAV2-CMV-ASM、AAV5-CMV-ASM、AAV7-CMV-ASMおよびAAV8-CMV-ASMの1つをマウス（約7週齢）の深部小脳核（A-P：ブレグマから-5.75、M-L：ブレグマから-1.8、D-V：硬膜から-2.6、切歯棒（incisor bar）：0.0）へ片側性注入した。シリンジポンプに取り付けた10 μ l Hamiltonシリンジを用いて、1つの脳あたり全部で 1.86×10^{10} 個のゲノム粒子について0.5 μ l／分の速度で、ベクターを送達した。各ベクターの最終注入量は4 μ lだった。手術の1時間および24時間後、鎮痛のために、マウスにケトプロフェン（5mg/kg；SC）を投与した。

【0106】

マウスを注入から7週間後に屠殺した（14週齢）。屠殺時、マウスにユサゾール（euthasol）（150mg/kg；IP）を過剰投与し、直ちに断頭するか（ $n=5$ ／群）、または経心的に灌流した（ $n=3$ ／群）。断頭したマウスから直ちに脳を取り出し、液体窒素で急速凍結（snap frozen）し、3切片（右大脳半球、左大脳半球および小脳）に解体し、ホモジナイズし、ELISAによりhASMについて分析した。灌流マウスからの脳および脊髄を、ヒトASM蛋白質発現、フィリピン染色により検出されるコレステロール蓄積、および50 μ mビブラトーム切片のカルビンジン染色を用いるプルキンエ細胞生存のために処理した。AAV2／1- β gal（ $n=8$ ）、AAV2／1-ASM（ $n=5$ ）およびAAV2／2-ASM（ $n=5$ ）の両側性注入を受けたASMKOマウス（約7週齢）を、ロータロッド試験の後、20週齢で屠殺した。当該分野において知られている方法を用いて、Smart rod（AccuScan）上の運動機能用の加速および等速ロータロッドにより、マウスを試験した。例示的な方法はSleatら（2004）J. Neurosci. 24：9117-9126に記載されている。図10および11は、運動機能回復の測定としてのロータロッド試験の結果を図式的に示す。

【0107】

SV40ポリアデニル化配列およびハイブリッドイントロンを有する、ヒトサイトメガロウイルス前初期（CMV）プロモーターの制御下にある全長ヒトASM cDNAを、AAV血清型2（AAV2 ITR）に由来するITRを含むプラスミドへクローニングした（Jinら（2002）J. Clin. Invest. 109：1183-1191）。AAV型2複製遺伝子に加えて血清型特異的カプシドコーディングドメインを含む一連のヘルパープラスミドを用いて、三重トランスフェクションにより、ハイブリッドベクターを作製した。この戦略により、各血清型-特異的ビリオンへのAAV2 ITRベクターのパッケージ化が可能となる（Rabinowitz, et al.（2002）J. Virol. 76：791-801）。このアプローチと共に、hASM組換えゲノムを用いて、AAV2／1、AAV2／2、AAV2／5、AAV2／7およびAAV2／8を含む様々な血清型の一連のrAAV-hASMベクターを作製した。組換えAAVベクターを、イオン交換クロマトグラフィー（血清型2／1、2／2および2／5）（O'Riordanら（2000）J. Gene Med. 2：444-54）、またはCsCl遠心分離（血清型2／8および2／7）（Rabinowitzら（2002）J. Virol. 76：791-801）により精製した。CMV配列のTaqMan PCRにより、AAV-ASMビリオン粒子（DNAse-耐性粒子）の最終力価を測定した（Clarkら（1999）Hum. Gene Therapy 10：1031-1039）。

【0108】

ヒトASM抗体はヒト特異的であり、マウスASMと交差反応しない。50mMの炭酸

ナトリウムバッファー (pH 9.6) 中で希釈したモノクローナル組換えヒトASM (rhASM) 抗体 (2 µg/ml) でコーティングしたCoster (Corning, NY) 9018プレート (100 µl/ウェル) を2~8℃で一晩インキュベートした。過剰なコーティング抗体を除去し、ブロッキング希釈液 (KPL, Inc., MD) を37℃で1時間加えておいた。マイクロプレートウォッシャー (Molecular Devices, CA) を2サイクルで用いてプレートを洗浄した。標準的な希釈バッファー (PBS, 0.05% Tween, 1% HP-BSA) 中に希釈した標準、対照および試料をデュプリケートでピペティングし、37℃で1時間インキュベートさせておいた。プレートを上記のように洗浄した。100マイクロリットルのビオチン化組換えヒトASM (rhASM) 抗体 (標準的な希釈バッファー中、1:20Kで希釈) を各ウェルへ加え、37℃で1時間インキュベートさせておき、次いで、マイクロプレートウォッシャーで洗浄した。次いで、1:10Kで希釈したストレプトアビジン-HRP (Pierce Biotechnology, Inc., IL) を加え (100 µl/ウェル)、室温で30分間インキュベートさせておいた。プレートを上記のように洗浄し、次いで、SureBlue TMB (KPL, Inc., MD) と共に15分間36~38℃でインキュベートした。停止液 (KPL, Inc., MD) で反応を停止させ、次いで、Spectra Max 340 プレートリーダー (Molecular Devices, CA) を用いて450nmでの吸光度を読み取った。Softmax Pro 4.3ソフトウェア (Molecular Devices, CA) を用いてデータ分析を完了した。

10

20

【0109】

標準としてウシ血清アルブミンを用いるBCA蛋白質アッセイキット (Pierce Biotechnology, Inc., IL) を用いて、各試料の蛋白質濃度を測定した。

【0110】

0.1M酢酸ナトリウムバッファー中に2%パラホルムアルデヒド、0.03%グルタルアルデヒド、0.002%CaCl₂を含有するpH6.5の固定剤を用いてマウスを経心的に灌流し、次いで、pH8.5の同じ固定剤を用いて灌流した。マウスの脳および脊髄を切断し、その後、グルタルアルデヒド不含のpH8.5の固定剤中、4℃で一晩固定した。組織をpH7.4の0.1Mリン酸カリウムバッファー中で洗浄し、3.5%寒

30

【0111】

脳および脊髄は50 µmの間隔で矢状方向にビブラトームにより切断した。切片は、ヒトASMに対する一次抗体 (1:200) を用いて免疫蛍光用に処理した。切片を、PBS中の10%ロバ血清、0.3%Triton X-100中で1時間インキュベートし、次いで、PBS中の2%ロバ血清、0.2%Triton X-100中でビオチン化マウス抗-ヒトASMと共に72時間インキュベートした。洗浄した後、Tyramide Signal Amplificationキット (PerkinElmer, Boston MA) を用いてシグナルを増幅した。Nikon蛍光顕微鏡を用いてヒトASM蛋白質を可視化し、SPOTカメラおよびAdobe Photoshopソフトウェアを用いて画像を獲得した。

40

【0112】

初めに、フィリピン複合体 (Filipin Complex) (Sigma, St. Louis, MO) を100%メタノール中で希釈し、1mg/mlのストック濃度とした。ストック溶液は-20℃で4週間安定である。PBSで洗浄した後、切片を、用事調製した10 µg/mlフィリピンのPBS中溶液中、暗所で3時間インキュベートした。次いで、切片をPBSで3回洗浄した。蛍光顕微鏡上、紫外フィルター下でコレステロール蓄積を可視化した。

【0113】

カルシウム結合蛋白質、カルビンジンに対する一次抗体を用いて免疫蛍光用に脳を処理

50

した。切片をリン酸カリウムバッファー (K P B) で洗浄し、次いで、リン酸カリウム緩衝生理食塩水 (K P B S) でリンスした。次いで、切片を K P B S 中の 5 % ロバ血清、0.25 % T r i t o n X-100 で最高 3 時間までブロックし、次いで、K P B S 中の 5 % ロバ血清、0.2 % T r i t o n X-100 およびマウス抗-カルビンジン (1:2500, S i g m a, S t. L o u i s, M O) 中でインキュベートした。4℃で 72 時間後、切片を K P B S および 0.1 % T r i t o n X-100 で 3 回リンスした。2 次抗体、ロバ-抗マウス C Y 3 (1:333, J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h L a b o r a t o r i e s, W e s t G r o v e, P A) を K P B S + 0.1 % T r i t o n X-100 中に室温で 90 分間加えておいた。切片を K P B で洗浄し、次いで、ゲルコーティングしたスライドにマウントした。カルビンジン-陽性細胞を落射蛍光下で可視化した。小脳のプルキンエ細胞を定量化するために、4 つの全断面の (f u l l - f a c e d) 内側小脳切片を各動物から選択した。カルビンジン-免疫陽性プルキンエ細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、細胞体を 20× の倍率でカウントした。各葉を別々にカウントした。葉ごとに、2 つの別個の焦点面をカウントした。細胞が 2 回カウントされないように、焦点の合った細胞のみをカウントした。

10

【0114】

初めに、上記したように、ヒト A S M に対する抗体を用いて、免疫蛍光用に 50 μm のビブラトーム切片を処理した。次いで、カルビンジンについて上記したプロトコルを用いて、切片を P B S 中で洗浄し、コリンアセチルトランスフェラーゼ (C h A T; ウサギポリクローナル, 1:500, C h e m i c o n I n t e r n a t i o n a l, T e m e c u l a, C A) で染色した。しかし、C Y 3 2 次抗体ではなく、ロバ-抗-ウサギ F I T C (1:200, J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h L a b o r a t o r i e s, W e s t G r o v e, P A) を用いた。初めに、染色を落射蛍光下で可視化し、その後、共焦点顕微鏡を用いて画像を獲得した。

20

【0115】

フィリピン染色を以下のように定量化した。S P O T デジタルカメラ装着の N i k o n E 600 広視野正立型落射蛍光顕微鏡を用いて露光補正した画像を獲得した。初めに、A A V 2 / 1 - β - g a l 群の画像を獲得し、その露光を用いて全てのさらなる画像を獲得した。分析した各画像は、各半分の脳の長さまでの正中矢状面を示す。M e t a m o r p h ソフトウェア (U n i v e r s a l I m a g i n g C o r p o r a t i o n) を用いて形態学的分析を行った。A A V 2 / 1 - β - g a l 画像を閾値設定し；確立したら、同じ閾値を全ての画像に用いた。以下の領域：小脳、脳橋、髄質、中脳、大脳皮質、海馬、視床、視床下部および線条体を使用者が手動で選択し、別々に分析した。積分強度を各領域で測定し、特定群の動物の全ての測定値 (n = 3 / 群) を用いて平均値を得た。次いで、処置動物におけるコレステロールの減少を、ノックアウト β - g a l 注入マウスと比較した積分強度の減少パーセントとして算出した。深部小脳核内への A A V - A S M の片側性注入の後に、小脳 (表 1)、脳橋、髄質および脊髄の全体にわたって、陽性 h A S M 免疫染色が観察された。

30

【0116】

表 1

40

A A V 血清型の関数としての陽性 h A S M 染色された領域。* は、陽性 h A S M が検出限界より低いにも関わらず、コレステロール病変の補正が生じたことを示す。

【表 1】

構造	AAV1	AAV2	AAV5	AAV7	AAV8
深部小脳核	++++	++	+++	+++	++++
小脳葉	++++	++	+++	+++	++++
脳橋	++	++	++	++	+
髄質	+	++	++	+++	+
脊髄		+++	+++	++	+
視床	*	*	*	*	*
視床下部	*	*	*	*	*
海馬	*	*	*	*	*
線条体	*	*	*	*	*
大脳皮質	*	*	*	*	*

10

【0117】

小脳において、AAV2/1-ASMで処置したマウスは最も広範な（すなわち、同じ矢状断面内の小葉間に広がる）レベルのhASM発現を有し、一方で、AAV2/2-ASMで処置したマウスは最も限局的なレベルのヒトASM蛋白質発現を有した。AAV2/5-ASM、AAV2/7-ASMおよびAAV2/8-ASMで処置したマウスにおけるヒトASM蛋白質発現はこれらの2群の間であった。矢状断面間の内側-外側の広がり、血清型1および8で処置したマウスで最大であり、血清型2を注入したマウスで最小であった。血清型5および7は、血清型1および2の中間の内側-外側の広がりを示した。小脳の各層（すなわち、分子、プルキンエおよび顆粒）は各AAV血清型により形質導入された。しかし、分子層に対する親和性の増大は全血清型について明かであった。プルキンエ細胞形質導入は、血清型1および5で処置したマウスで最大であった。血清型7を注入したマウスは、形質導入されたプルキンエ細胞の数が最も少なかった。血清型8で処置したマウスも形質導入されたプルキンエ細胞の数が少なかったが、血清型1、2、5および7と比較すると、顆粒層内のASM発現がより少なかった。ASMで形質導入されたプルキンエ細胞は、正常な細胞構造を有しているようだった。小脳組織ホモジナート中のELISAによるAAV媒介hASM蛋白質発現の定量分析はこれらの免疫組織学的知見を支持する。血清型1および8を注入されたマウスは、他の全てのマウスと比較した場合に、有意（ $p < .0001$ ）に高い小脳hASM蛋白質レベルを示した。血清型2、5および7を注入したマウスに由来する小脳hASMレベルはWTレベル（すなわちバックグラウンド）を超えなかった。予想通り、ヒトASMは野生型マウスにおいて検出されず-ELISAで使用したhASM抗体はヒト特異的である。

20

30

【0118】

機能性ASM蛋白質の不在は、スフィンゴリエリンのリソソーム蓄積、その後の2次代謝欠陥、例えば、異常なコレステロール輸送をもたらす（Sarnaら、Eur. J. Neurosci. 13:1873-1880およびLeventhalら（2001）J. Biol. Chem. 276:44976-4498）。ストレプトミセス・フィリピンシス（*streptomyces filipinensis*）から単離した自家蛍光分子であるフィリピンを用いて、ASMKOマウス脳における遊離コレステロールの蓄積を可視化する。野生型マウス脳はフィリピンで陽性染色されない。全てのAAV処置マウス（AAV2/1- β galを除く）において、フィリピン染色のクリアランス（表2）はhASM免疫染色陽性の領域と重複し、これは、各血清型ベクターが機能性トランスジェン産物の産生能を有することを示す。

40

【0119】

表 2

ヒトASMをコードする種々のAAV血清型（ $n = 3$ / 血清型；2/1、2/2、2/

50

5、2／7および2／8）をA S M K Oマウスの深部小脳核へ小脳内注入した後の選択した脳領域における、A A V- β g a lで処置したA S M K Oマウスと比較した、フィリピン（すなわち、コレステロール）クリアランスにおける減少パーセント。

【表2】

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8
小脳	96.54±2.14	93.85±1.257	86.75±9.58	96.47±1.93	99.12±.66
中脳	96.72±1.73	53.08±22.89	65.88±24.53	73.39±22.39	91.10±.105
脳橋	91.31± 5.80	50.07±21.26	70.96±25.60	93.15±31.20	96.72±1.20
髄質	93.29±6.22	88.46±3.04	81.55±17.31	80.73±14.99	97.40±1.60
視床	48.88±25.25	41.21±27.35	34.86±16.67	48.44±28.65	77.03±12.08
視床下部	82.81±10.14	86.96±12.93	88.46±5.90	82.95±11.46	99.68±.31
皮質	27.60±24.75	73.62±14.9	55.65±28.89	76.97±14.27	98.30±.34

10

【0120】

（P a s s i n i ら（2003），“S o c i e t y f o r N e u r o s c i e n c e” N e w O r l e a n s , L A）により既に報告されているように、フィリピンクリアランスは、注入部位に解剖学的に連結した領域においても生じるが、該領域はh A S Mについて陽性染色されない。M e t a M o r p h分析は、フィリピン染色における減少が、吻側－尾側の軸全体にわたって生じたことを示した。小脳および脳幹において、フィリピンは、A A V 2／1－A S MおよびA A V 2／8－A S Mで処置したマウスにおいて最大限に減少し、一方で、間脳および大脳皮質では、A A V 2／8－A S Mを注入したマウスは、最大合計レベルのフィリピンクリアランスを有した（表2）。それにも関わらず、これらの結果は、A S M K OマウスC N Sにおけるコレステロール貯蔵病変の補正に必要とされるh A S Mのレベルが最小である（すなわち、h A S M免疫蛍光の検出限界未満である）ことを示す。

20

【0121】

組織学的研究は、A S M K Oマウス小脳が急激に劣化することを示す。より具体的には、プルキンエ細胞は8～20週齢で徐々に死滅する（S a r n a ら（2001）E u r . J . N e u r o s c i . 13：1813－1880およびS t e w a r t ら（2002）“S o c i e t y f o r N e u r o s c i e n c e” O r l a n d , F L）。カルビンジンは広く認められているプルキンエ細胞マーカーである。A A V－A S M処置マウスにおける陽性カルビンジン染色は、h A S MのA A V媒介発現が治療的であることを示唆し得る。本発明者らの全結果は、小脳におけるA A V媒介h A S M発現がA S M K Oマウスにおけるプルキンエ細胞死を抑制することを示す（表3）。予想通り、プルキンエ細胞生存は小葉I－I I Iにおいて存在しなかった；マウスは7週齢で注入され、8週までに、これらの細胞の大部分は既に死滅した。小葉I V／Vにおけるプルキンエ細胞生存は血清型1で処置したマウスで最大であった。小葉V Iにおいて、有意なプルキンエ細胞生存はA A V処置マウスにおいて観察されなかった。小葉V I Iにおいて、血清型5で処置したマウスのみが有意なプルキンエ細胞生存を示した。小葉V I I Iでは、血清型5および血清型2で処置したマウスがまた有意なプルキンエ細胞生存を示した。小葉I XおよびXでは、プルキンエ細胞数においてW TとK Oマウス（またはA A V処置マウス）との間に有意な差異はなかった。これは予期されたものであり、というのも、14週齢（すなわち、屠殺時）のこれらの小葉内のプルキンエ細胞はA S M K Oマウスにおいてなお生存しているからである。全小葉にわたって、プルキンエ細胞生存は血清型1、2および5で処置したマウスにおいて最大であり、血清型7および8で処置したマウスにおいて最小だった。

30

40

【0122】

表3

ヒトA S Mをコードする種々のA A V血清型（n＝3／血清型；2／1、2／2、2／

50

5、2／7および2／8）をASMKOマウスの深部小脳核へ小脳内注入した後の、WTおよびASMKOマウスの小脳葉I－Xにおけるプルキンエ細胞数。太字のイタリックで示す数字は、KOマウス（すなわち、AAV2／1－βgalで処置したマウス）と有意に異なる。 $p \leq .01$.

【表3】

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8	KO	WT
I/II	7.42±9.80	4.5±10.58	9.40±11.59	12.33±10.58	1±9.16	5.8±11.59	113±10.58
III	12.42±10.32	11.33±11.14	26.80±12.21	15.33±11.14	9.8±12.21	2±9.65	147.50±11.14
IV/V	60.57±17.28	36.5±18.67	27.80±20.45	29.66±18.67	6.8±20.45	8±16.16	220.66±18.67
VI	61.14±11.21	27.5±12.11	72.20±13.26	31.16±12.11	3.8±13.26	68.5±10.48	121.16±12.11
VII	17.42±4.15	37.66±4.49	40.60±4.91	5.33±4.49	.2±4.95	17.37±3.88	37.16±4.49
VIII	44.14±10.75	48.66±11.62	82.80±12.73	11.33±11.62	18.40±12.73	35.12±10.06	103.33±11.62
IX	126.28±19.17	102.66±20.71	136.40±22.68	60.16±20.71	84.40±22.68	108.0±17.93	144±20.71
X	89.85±12.54	76.83±13.55	93.80±14.84	48.16±13.55	64.80±14.84	87±11.73	86.66±13.55

10

20

【0123】

加速ロータロッド試験において、AAV2／1－ASMおよびAAV2／8－ASMを片側注入したマウスは、AAV2／1－βgalを注入したASMKOマウスよりも、有意に（ $p < .0009$ ）より長い落下までの滞在時間を示した。血清型AA2／1－ASMを注入したマウスは野生型マウスと有意に異ならなかった。AAV2／2－ASMおよびAAV2／5－ASMを注入したマウスは、AAV2／1－βgalを注入したASMKOマウスよりも、より長い落下までの滞在時間を示す傾向があり；一方で、AAV2／7－ASMを注入したマウスはその傾向がなかった。等速ロータロッド試験では、AA2／1－ASMを注入したマウスのみが、AA2／1－βgalを注入したマウスより、有意に（ $p < .0001$ ）より長い落下までの滞在時間を示した。この場合、野生型マウスは、AA2／1－ASMを注入したマウスよりも有意に良好なパフォーマンスを示した。AAV2／1－ASMまたはAAV2／2－ASMのいずれかを両側性注入されたASMKOマウスは、加速および等速の両試験について、ASMKO AAV2／1－βgal処置マウスよりも有意に（ $p < .001$ ）良好なパフォーマンスを示した。AAV2／1－ASM両側注入マウスは両試験において野生型マウスと同等のパフォーマンスを示した。

30

40

【0124】

AAV産生hASMがASMKO CNS内で機能的に有効であるか否かを決定するための1つの方法は、コレステロール貯蔵病変－NPA疾患の2次代謝欠陥に対するその影響を評価することである。全AAV処置マウス（AAV2／1－βgalを除く）において、コレステロール貯蔵病変の補正はhASM免疫染色陽性の領域と重複し、これは、各血清型ベクターが機能性トランスジーン産物の産生能を有することを示す。既に示されているように、異常なコレステロール代謝の補正は、注入部位に解剖学的に連結する領域においても生じるが、hASMについて陽性染色されなかった領域においても生じ、これは、コレステロール貯蔵病変の補正に必要とされるhASMレベルが最小限であることを示す。これらのhASM組織学的および生化学的結果と一致して、血清型1および8で処置

50

したマウスは、コレステロール貯蔵病変において顕著な減少を示した。血清型 2、5 および 7 で処置したマウスも、コレステロール貯蔵病変において減少を示したが、血清型 1 および 8 で処置したマウスと同程度ではなかった。

【0125】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療関連モデル

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、皮質、脳幹および脊髄にある運動ニューロンの選択的損失により特徴付けられる致命的な神経変性疾患である。疾患の進行は、四肢筋、体軸筋および呼吸筋の萎縮に至り得る。運動ニューロン細胞死は、反応性神経膠症、ニューロフィラメント異常、ならびに皮質脊髄路および前根における大きな有髄繊維の有意な欠損に付随する¹⁻⁶。ALS の病因は不明なところが多いが、蓄積の証拠は、特発性 (SALS) および家族性 (FALS) ALS が多くの類似する病理学的特徴を共有することを示し、故に、いずれかの形態の研究が共通の処置をもたらし得ることが期待される⁷。FALS は、診断症状の約 10% を占め、その 20% は Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) における優性遺伝性突然変異に関連する⁸。突然変異ヒト SOD1 蛋白質を発現するトランスジェニックマウス (例えば、SOD1^{G93A} マウス) は、ALS の多くの病理学的特徴を再現し、ALS を研究するために利用可能な動物モデルである⁹。SALS では、興奮性毒、毒物暴露、プロテアソーム機能障害、ミトコンドリア損傷、ニューロフィラメント崩壊および神経栄養支持の欠損を含む無数の病理学的機序が根底にある原因に関係があるとされる^{10, 11}。

【0126】

現在のところ、ALS の効果的な治療法は存在していない。インスリン成長因子 I (IGF-1) のごとき神経栄養因子は、ALS の処置における潜在的有用性について広く研究されてきた。脳幹および脊髄運動ニューロンに相互連結する CNS の領域へ (軸索輸送可能な) ウイルスベクターを頭蓋内送達させることにより、IGF-1 のごとき潜在的治療剤を先行技術の手段では標的化が困難であった領域へ投与する手段が提供される。

【0127】

理論に限定されないが、これらの標的領域は必ずしも運動ニューロンと直接的なつながりを有さなくてもよい。すなわち、これらの標的領域が運動ニューロンの細胞環境を単に構成する細胞 (例えば、介在ニューロンおよび星状膠細胞) と直接的なつながりを有すれば十分であり得る。この想定は、正常および SOD1 突然変異-発現細胞の混合体であるキメラマウスでの研究により支持される。これらの実験は、突然変異 SOD1 を発現しない非-神経細胞が変性を遅延し、突然変異を発現する運動ニューロンの生存を有意に長引かせることを示した¹³。さらに、さらなる実験は、運動ニューロンの細胞環境を構成する細胞 (例えば、星状膠細胞およびミクログリア) は神経栄養因子の重要な源であることを示し、これらの細胞の損傷 (ALS において病理学上生じるような) が運動ニューロン変性の一因となる根本的な因子の 1 つであることが示唆される¹¹。

【0128】

治療用ウイルスベクターおよび/または発現蛋白質の運動ニューロンの細胞環境への輸送を支持する可能性のある CNS の領域は、小脳の深部小脳核 (DCN) である。DCN は脳幹および脊髄の両方と広範な求心性および遠心性のつながりを有する (図 1 を参照のこと)¹⁴⁻¹⁹。軸索輸送能を有するウイルスベクターを用いて神経代謝疾患のマウスモデルにおいて DCN を標的化することにより、脳幹および脊髄の両方においてトランスジェン蛋白質の検出がもたらされる²⁰。興味深いことに、トランスジェン蛋白質は、運動ニューロンのマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) について陽性および陰性の両細胞において検出された。

【0129】

マウスおよびラットにおけるスーパーオキシドジスムターゼ-1 (SOD1) 遺伝子突然変異の過剰発現は、ヒトにおける ALS の臨床的および病理学的特徴を再現する。このモデルにおいて徴候の遅延に有効な化合物は、ALS を患う患者における臨床効果を予測するものであることが示され、故に、この疾患の治療関連モデルとなる。かかるマウスモ

デルは、Tuら（1996）P. N. A. S. 93:3155-3160; Kasparら（2003）Science 301:839-842; Roaulら（2005）Nat. Med. 11（4）:423-428およびRalphら（2005）Nat. Med. 11（4）:429-433に既に記載されている。

【0130】

故に、現在の実験により、症状のある（すなわち、90日齢）SOD1^{G93A}マウスにおける疾患の進行に対するAAV-I GF-1の両側性DCN送達の影響を調べることに努めた。特に、第一の目標は、AAV-I GF-1の送達が（1）脳幹および脊髄へのベクターおよび／または蛋白質の送達；（2）脳幹および脊髄における神経病変の減少；（3）運動行動機能における改善；ならびに（4）寿命の有意な延長をもたらしたか否かを決定することであった。結果は、脳幹および脊髄に相互連結したCNSの領域へのウイルスベクターの注入が、脳幹および脊髄へ可能性のある治療用トランスジーンを送達するための実行可能なアプローチであることを示す。さらに、本発明者らの結果は、その細胞環境の修正を介して運動ニューロン変性を処置するよう設計される治療薬の開発を支持する。

10

【0131】

2つの研究をG93A SOD1（本明細書中、SOD1マウスにおいて言及される、SOD1^{G93A}突然変異マウス）において行った。このモデルはヒトALSを綿密に模倣する。後肢運動障害を伴う進行性運動ニューロン変性が存在し、約90日齢のマウスで出現する。約120～122日で死亡する。各研究は、4つの処置群：1）I GF-1をコードするAAV血清型1を投与されたマウス（AAV1-I GF-1）；2）緑色蛍光蛋白質をコードするAAV血清型1を投与されたマウス（AAV1-GFP）；3）I GF-1をコードするAAV血清型2を投与されたマウス（AAV2-I GF-1）；ならびに4）緑色蛍光蛋白質をコードするAAV血清型2を投与されたマウス（AAV2-GFP）を有した。

20

【0132】

理論に限定されないが、I GF-1は、種々のレベルの中枢神経軸におけるその多数の作用に起因して、ALSを処置するための治療用蛋白質である（Doreら, Trends Neurosci, 1997, 20:326-331を参照のこと）。脳では：それは、ニューロンおよびグリアのアポトーシスの両方を軽減し、鉄、コルヒチン、カルシウム不安定性、過氧化物およびサイトカインにより誘導される毒性に対してニューロンを保護すると考えられる。それは、神経伝達物質アセチルコリンおよびグルタミン酸の放出も調節すると考えられる。それは、また、ニューロフィラメント、チューブリンおよびミエリン塩基性蛋白質の発現も誘導すると考えられる。脊髄では：I GF-1は、ChAT活性を調節し、コリン作用性表現型の喪失を軽減し、運動ニューロンの発芽を強化し、髄鞘形成を増大し、脱髄を阻害し、運動ニューロンの増殖および前駆細胞からの分化を刺激し、シュワン細胞分化、成熟および成長を促進すると考えられる。筋肉では：I GF-1は、神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体クラスター形成を誘導し、神経筋機能および筋力を増大すると考えられる。この実験では、該蛋白質のI GF-1 E a形態を利用した。

30

40

【0133】

緑色蛍光蛋白質は対照蛋白質として利用され、AAVベクターの注入を媒介する発現の可視化も可能である。

【0134】

生後90日で、SOD1マウスに、AAV組換えベクターを用いて両側性注入した。1つの研究において、注入した用量は1部位あたり約2.0 $\times 10^8$ gc/mlだった。特定のマウスを生後約110日で屠殺し、その脳および脊髄を、GFP染色、免疫組織化学によるI GF-1発現、ELISAによるI GF-1発現、RT-PCRによるI GF-1発現、免疫組織化学によるChAT局所性、グリア繊維性酸性蛋白質（GFAP）発現、運動ニューロン数、上記したロータロッドでの機能性試験（等速および加速）、握力

50

メーターを用いる前肢および後肢の握力、ならびに生存について分析した。

【0135】

「死亡事象」は、仰向けに置かれた状態から30秒以内に動物が自力で「元に戻る」ことができない場合か、または動物飼育の専門家により死亡したと判断された場合を言う。「死亡事象」の分類は、評価時に、動物群ごとに（GFP対IGF-1、盲式）2人で実施された。

【0136】

GFPは、深部小脳核（DCN）へのGFP発現AAVベクターの両側性送達後に、脳幹および脊髄の各区分にわたって検出された（図13および14を参照のこと）。図22は、マウス脳内のGFP分布を示す。DCNに加えて、GFP陽性染色は、嗅球、大脳皮質、視床、脳幹、小脳皮質および脊髄においても観察された。これらの領域の全ては、DCNからの投射を受けるか、および／またはDCNへ投射を送るかのいずれかである。加えて、GFP陽性繊維および／または細胞は、ChAT陽性細胞に対して近位で観察された。

【0137】

IGF-1 mRNAは、AAV1-IGF-1またはAAV2-IGF-1で処置したマウスの脳幹および脊髄の各区分において検出され、これは、ベクターが逆行性輸送されたことを示す（図18を参照のこと）。IGF-1蛋白質は、AAV1-IGF-1またはAAV2-IGF-1で処置したマウスの脳幹および脊髄で検出された。口部運動核（oromotor nuclei）（例えば、三叉神経運動核、顔面神経核および舌下神経核）および脊髄の各区分におけるGFAP染色の減少は、AAV1-IGF-1またはAAV2-IGF-1で処置したマウスにおいて観察された（図15-17を参照のこと）。GFAPは、ALSの病理学的特徴であるグリオシスのマーカーである。AAV1-IGF-1またはAAV2-IGF-1の送達は、ロータロッドおよび握力タスクにおいて有意な機能上の改善をもたらした（図20を参照のこと）。AAV-IGF-1、AAV2-IGF-1の送達はまた、SOD1マウスの寿命を有意に延長した（図21を参照のこと。該図では、AAV-GFP処置マウスでの121または120日に対して、AAV-IGF-1処置マウスでは133、5または134日に生存の中央値が増大している）。図19は、AAV-IGF-1のDCN送達が運動ニューロンの生存を促進したことを示す。アスタリスクで示すように、GFPをコードするAAVをDCN送達したマウスに対する、IGF-1をコードするAAVで処置したマウスの差異は、統計的に有意（p値=0.01）である。

【0138】

血清型に関わらず、AAV-IGF-1処置は運動ニューロン生存を有意に高め、ロータロッドおよび握力試験の両方において運動能力を改善し、寿命を有意に延長した。PCRおよびELISAを用いて、IGF-1発現を脳幹および脊髄にわたって検出した。

【0139】

本明細書は、本明細書中で引用した参考文献の教示を照らすことで、十分に理解される。本明細書中の実施態様は本発明の実施態様の説明を提供しており、本発明の範囲を限定するものと見なされるべきではない。当業者であれば、他の多くの実施態様が本発明に包含されることが容易に理解できよう。本明細書中に引用した全ての文献、特許および生物学的配列は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。出典明示により本明細書に組み込まれた材料が本明細書に矛盾するか、または一致しない範囲内においては、本明細書が任意のかかる材料に優先し得る。本明細書中、任意の参考文献の引用は、かかる参考文献が本発明の先行技術であることを認めるものではない。

【0140】

別記しない限り、特許請求の範囲を含む本明細書中で用いた成分量、細胞培養、処置条件等を表す全ての数字は、全ての場合において、「約」なる用語で修飾されているものとして理解されるべきである。従って、反対の指示がない限り、数字パラメーターは近似値であり、本発明により獲得が探求されている所望の特性に非常に依存するものであっても

よい。別記しない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」なる用語は、列挙した各要素に対して言うことが理解されるべきである。当業者は、単なる慣用的実験を用いることで、本明細書中に記載した本発明の特定の実施態様に対する多くの均等物を認識または解明することができよう。かかる均等物は添付の特許請求の範囲により包含されるべきことが意図される。

【 0 1 4 1 】

参考文献

1. Leigh, P.N. & Swash, M. Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neuro* 1 56, 115-24 (1991).
2. Carpenter, S. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease, *Neurology* 18 841-51 (1968). 10
3. Gonatas, N.K. et al. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neuron in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 140, 731-7 (1992).
4. Hirano, A. et al. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43, 471-80 (1984).
5. Leigh, P.N. et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution and specificity. *Brain* 114(Pt 2), 75-88 (1991).
6. Delisle, M.B. & Carpenter, S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 63, 241-50 (1984). 20
7. Hirano, A. Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology* 47, S63-6 (1996).
8. Rosen, D.R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62 (1993).
9. Gurney, M.E. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-5 (1994).
10. Rowland, L.P. & Schneider, N.A. amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344, 1688-700 (2001).
11. Bruijn, L.I., Miller, T.M. & Cleveland, D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27, 723-49 (2004).
12. Cleveland, D.W. & Rothstein, J.D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2, 806-19 (2001). 30
13. Lindsay, R.M. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 15, 249-51 (1994).
14. Kaspar, B.K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J.D. & Gage, F.H. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301, 839-42 (2003).
15. Clement, A.M. et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113-7 (2003).
16. Matsushita, M. Projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 404, 21-32 (1999). 40
17. Matsushita, M. & Gao, X. Projections from the thoracic cord to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 386, 409-21 (1997).
18. Matsushita, M. & Xiong, G. Projections from the cervical enlargement to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 377, 251-61 (1997).
19. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Afferents to the cerebellar nuclei from the cervical enlargement in the rat, as demonstrated with the Phaseolus vulgaris leucoagglutinin method. *Neurosci Lett* 113, 253-9 (1990). 50

20. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Projections from the central cervical nucleus to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 353, 234-46 (1995); Voogd, J. The cerebellar nuclei and their efferent pathways. in *The rat nervous system* (ed. Paxinos, G.) 208-215 (Elsevier Academic Press, San Diego, 2004).

【図 1】

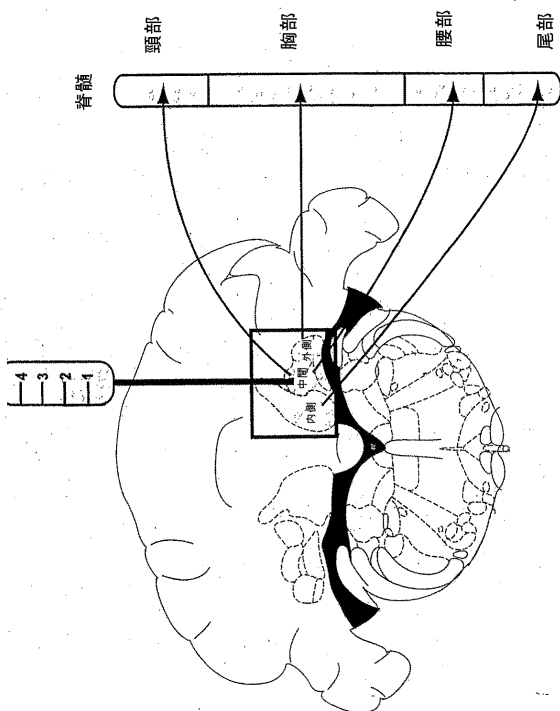


FIGURE 1

【図 2】

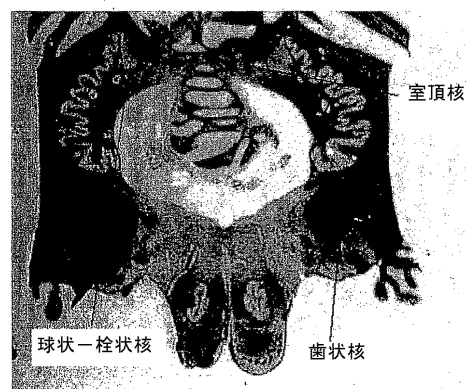


FIGURE 2

【図 3】

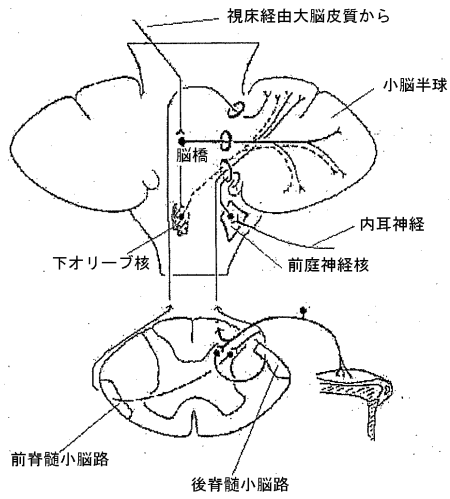


FIGURE 3

【図 4】

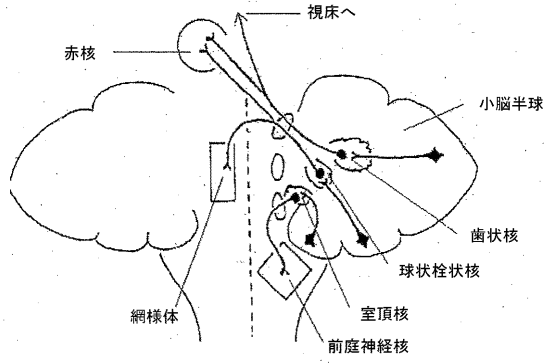


FIGURE 4

【図 5】

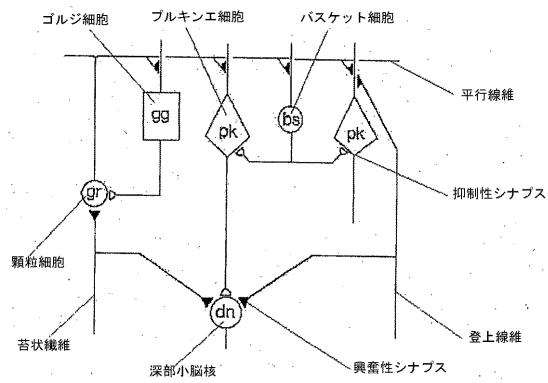


FIGURE 5

【図 6】

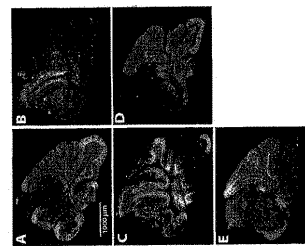
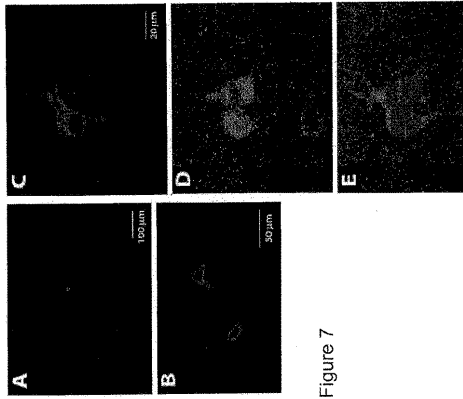


Figure 6

【図 7】



【図 8】

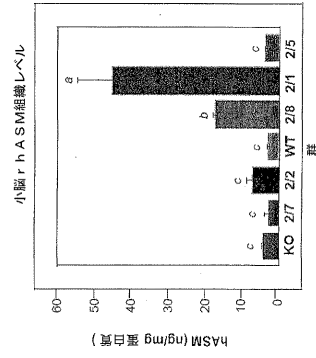
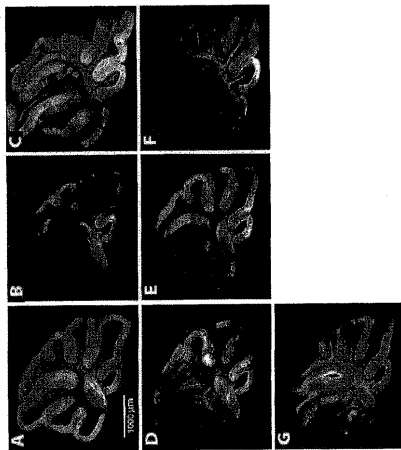


FIGURE 8

【図 9】



【図 10】

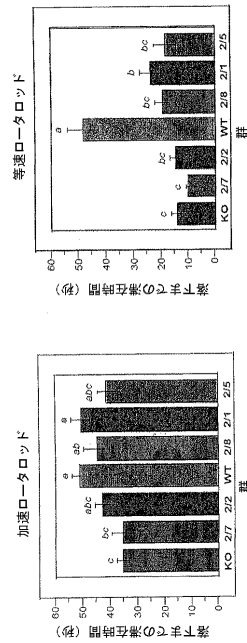


FIGURE 10

【図 1 1】

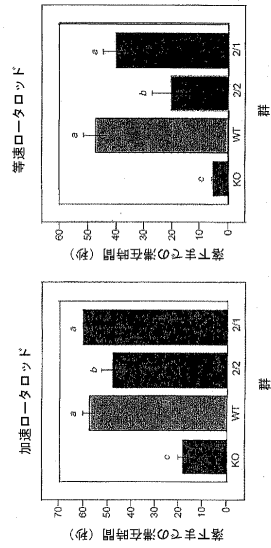
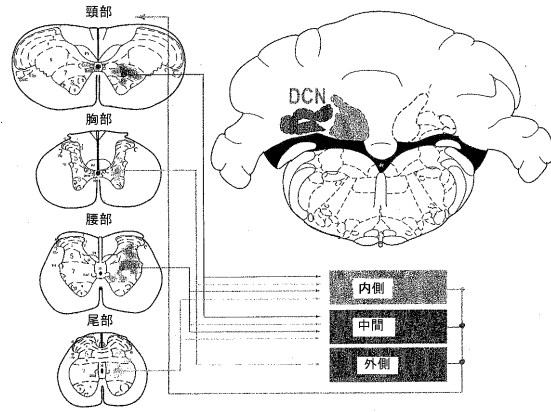


FIGURE 11

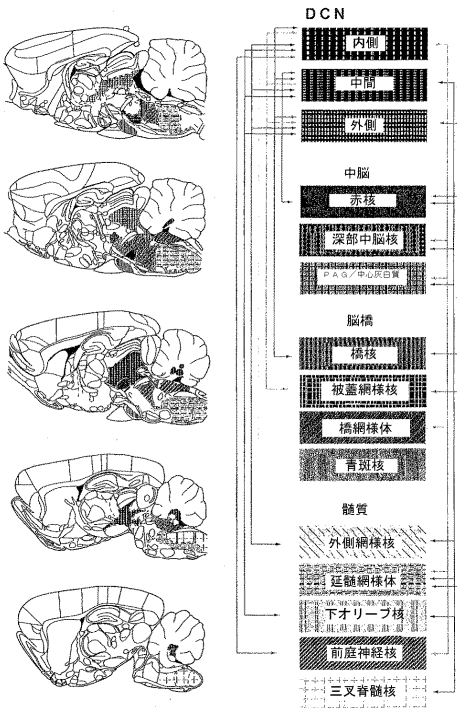
【図 1 2 A】

Figure 12A



【図 1 2 B】

Figure 12B



【図 1 3】

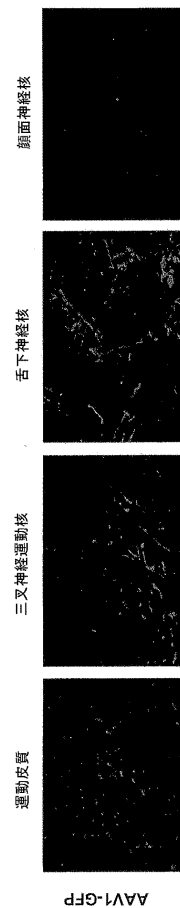


Figure 13

【図 1 4】

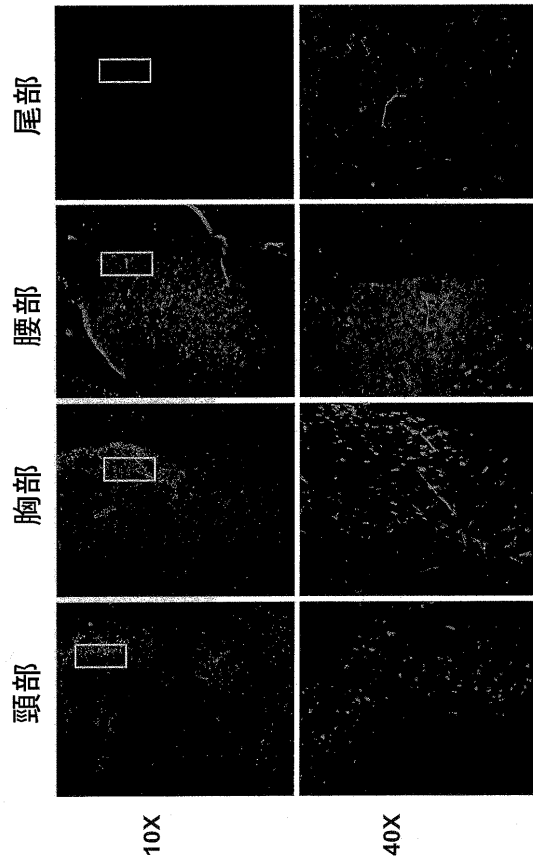


Figure 14

【図 1 5】

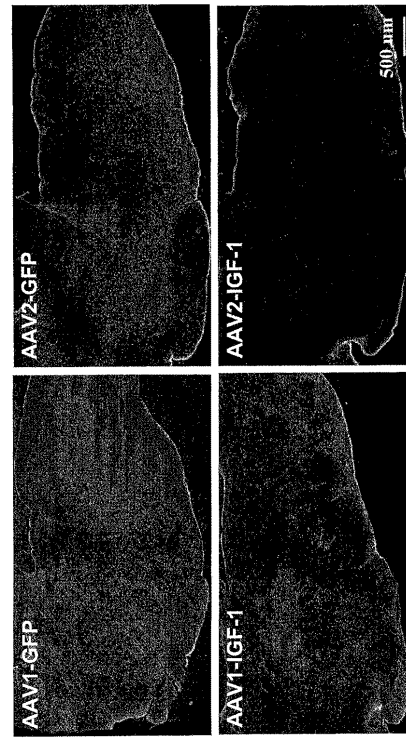


Figure 15

【図 1 6】

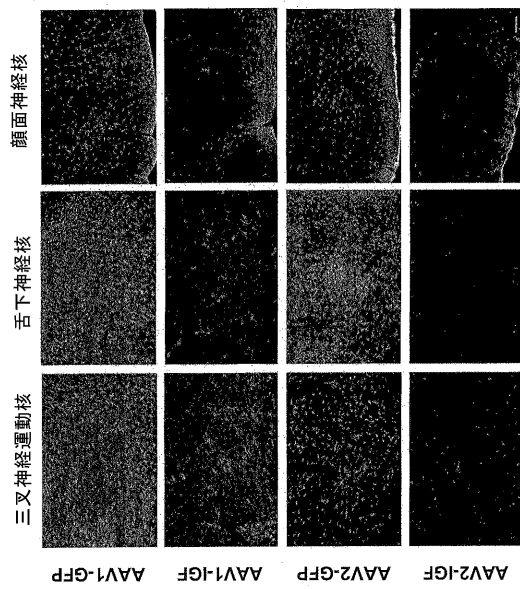


Figure 16

【図 1 7】

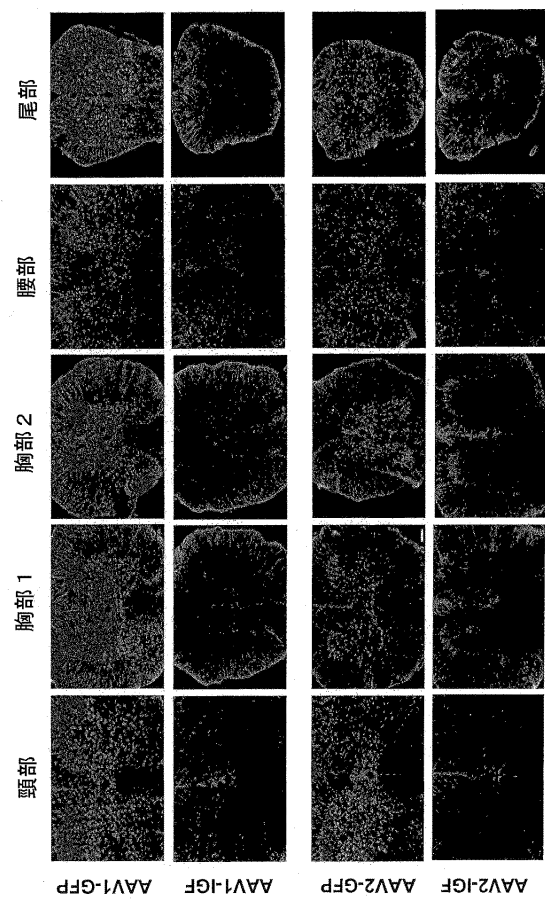


Figure 17

【図 18】

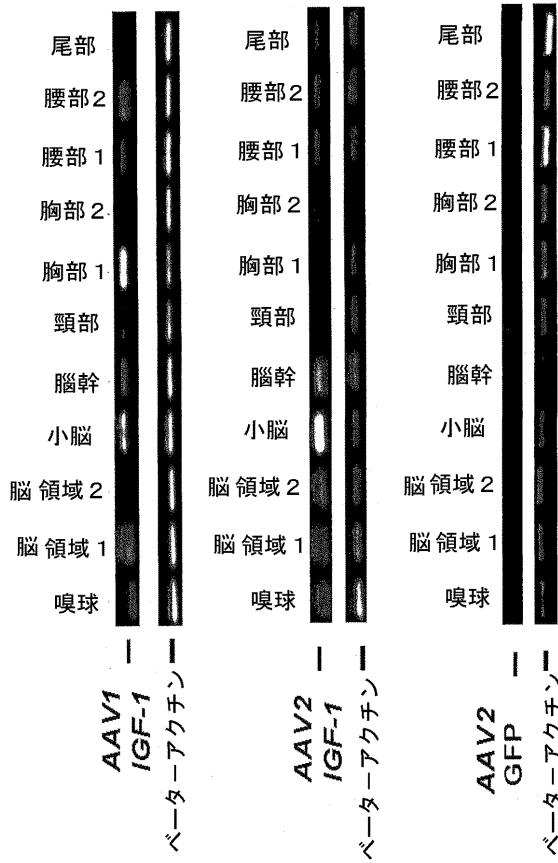


Figure 18

【図 19】

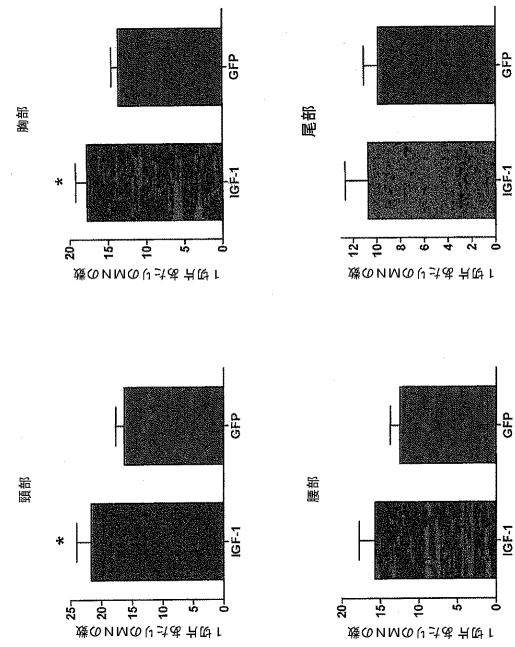


Figure 19

【図 20】

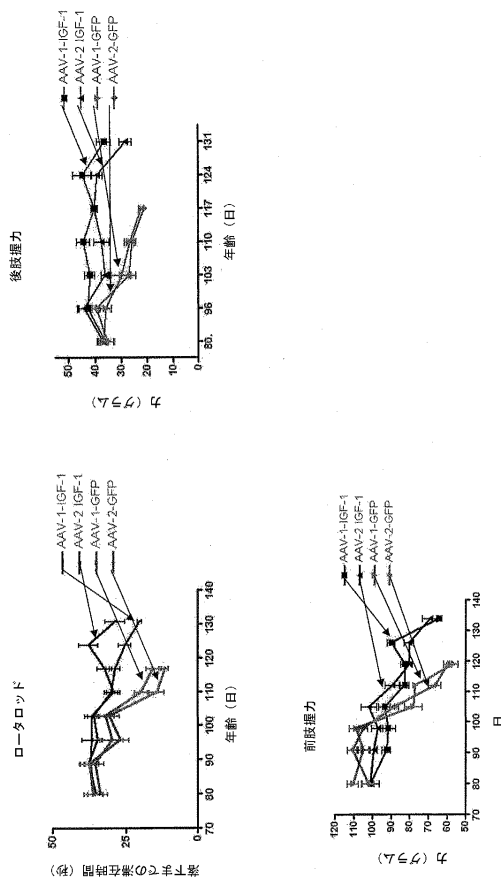


Figure 20

【図 21】

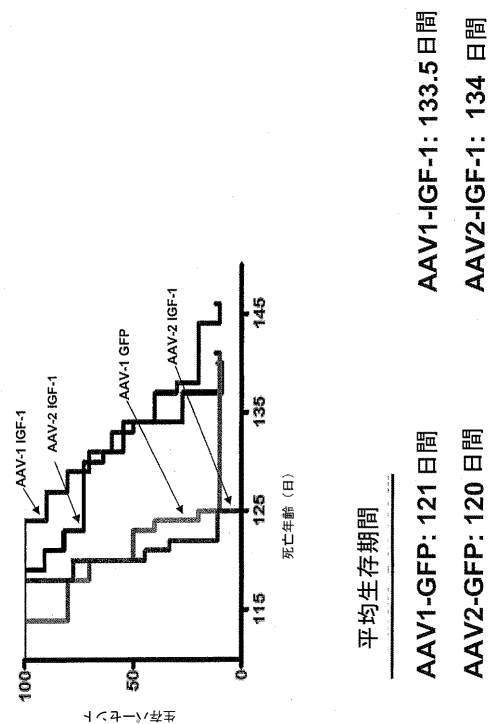


Figure 21

平均生存期間

AAV1-GFP: 121 日間
AAV1-IGF-1: 133.5 日間
AAV2-GFP: 120 日間
AAV2-IGF-1: 134 日間

【図 22】

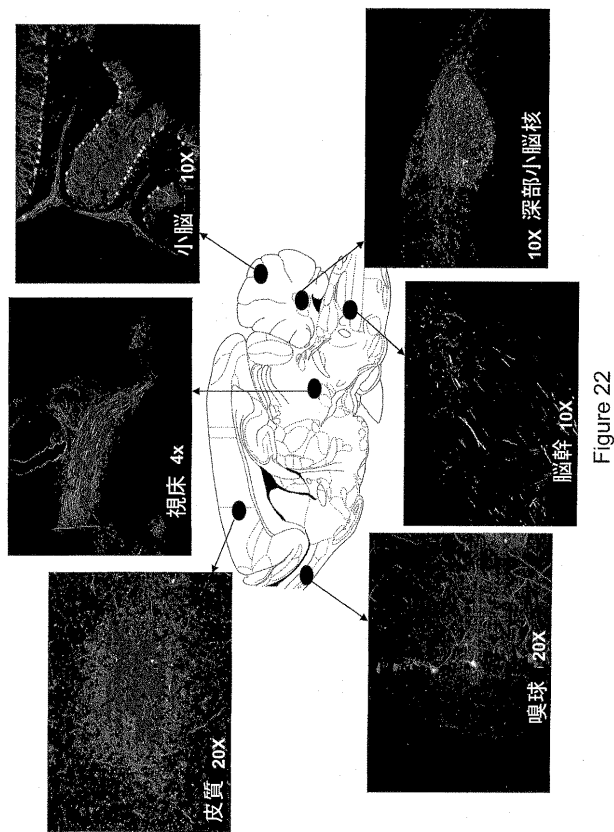


Figure 22

【配列表】

2017132774000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月24日(2017.3.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

明細書および図面に記載の発明。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 ラムヤ・シハブッディン
アメリカ合衆国 0 2 1 3 5 マサチューセッツ州 ブライトン、コモンウェルス・アベニュー 1 9 3 3 番

(72)発明者 マルコ・パッシーニ
アメリカ合衆国 0 1 5 4 5 マサチューセッツ州 シュルーズベリー、ナイチンゲール・ドライブ 1 4 番

(72)発明者 セン・チェン
アメリカ合衆国 0 1 7 6 0 マサチューセッツ州 ネイティック、ジェニソン・サークル 1 0 番

(72)発明者 キャサリン・アール・オリオルダン
アメリカ合衆国 0 2 4 6 8 マサチューセッツ州 ウェイバン、ワイルド・ロード 1 7 番

F ターム (参考) 4C084 AA13 MA65 NA13 NA14 ZA012 ZA022 ZA222 ZA942
4C087 AA01 AA02 BC83 MA65 NA13 NA14 ZA01 ZA02 ZA22 ZA94

【外国語明細書】

GENE THERAPY FOR SPINAL CORD DISORDERS

[01] This application claims priority under 35 U.S.C. § 119(e) to U.S. Provisional Application No. 60/677,213, filed May 2, 2005, and U.S. Provisional Application No. 60/790,217, filed April 8, 2006, the contents of which are herein incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

[02] The present invention relates to compositions and methods for treating disorders affecting a subject's motor function and in particular, motor function affected by disease or injury to the brain and/or spinal cord.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[03] Gene therapy is an emerging treatment modality for disorders affecting the central nervous system (CNS). CNS gene therapy has been facilitated by the development of viral vectors capable of effectively infecting post-mitotic neurons. The central nervous system is made up of the spinal cord and the brain. The spinal cord conducts sensory information from the peripheral nervous system to the brain and conducts motor information from the brain to various effectors. For a review of viral vectors for gene delivery to the central nervous system, see Davidson et al. (2003) *Nature Rev.* **4**:353-364.

[04] Adeno-associated virus (AAV) vectors are considered useful for CNS gene therapy because they have a favorable toxicity and immunogenicity profile, are able to transduce neuronal cells, and are able to mediate long-term expression in the CNS (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.* **8**:148-154; Bartlett et al. (1998) *Hum. Gene Ther.* **9**:1181-1186; and Passini et al. (2002) *J. Neurosci.* **22**:6437-6446).

[05] One useful property of AAV vectors lies in the ability of some AAV vectors to undergo retrograde and/or anterograde transport in neuronal cells. Neurons in one brain region are interconnected by axons to distal brain regions thereby providing a transport system for vector delivery. For example, an AAV vector

may be administered at or near the axon terminals of neurons. The neurons internalize the AAV vector and transport it in a retrograde manner along the axon to the cell body. Similar properties of adenovirus, HSV, and pseudo-rabies virus have been shown to deliver genes to distal structures within the brain (Soudas et al. (2001) *FASEB J.* **15**:2283-2285; Breakefield et al. (1991) *New Biol.* **3**:203-218; and deFalco et al. (2001) *Science*, 291:2608-2613).

[06] Several groups have reported that the transduction of the brain by AAV serotype 2 (AAV2) is limited to the intracranial injection site (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.* **8**:148-154; Passini et al. (2002) *J. Neurosci.* **22**:6437-6446; and Chamberlin et al. (1998) *Brain Res.* **793**:169-175). Recent reports suggest that retrograde axonal transport of neurotropic viral vectors can also occur in select circuits of the normal rat brain (Kaspar et al. (2002) *Mol. Ther.* **5**:50-56 (AAV vector); Kasper et al. (2003) *Science* **301**:839-842 (lentiviral vector) and Azzouz et al. (2004) *Nature* **429**:413-417 (lentiviral vector). Roaul et al. (2005) *Nat. Med.* **11**(4):423-428 and Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* **11**(4):429-433 report that intramuscular injection of lentivirus expressing silencing human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) interfering RNA retarded disease onset of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in a therapeutically relevant rodent model of ALS.

[07] Cells transduced by AAV vectors may express a therapeutic transgene product, such as an enzyme or a neurotrophic factor, to mediate beneficial effects intracellularly. These cells may also secrete the therapeutic transgene product, which may be subsequently taken up by distal cells where it may mediate its beneficial effects. This process has been described as cross-correction (Neufeld et al. (1970) *Science* **169**:141-146).

[08] However, a need still exists for compositions and methods to treat dysfunction of the spinal cord that result in loss of motor function in human patients. This invention satisfies this need and provides related advantages as well.

SUMMARY OF THE INVENTION

[009] This invention provides methods and compositions to deliver a transgene to the spinal cord and/ or the brainstem region of a subject by administering a recombinant neurotropic viral vector containing the transgene to at least one region of the deep cerebellar nuclei (DCN) region of the subject's brain. The viral delivery is under conditions that favor expression of the transgene in the spinal cord and/ or the brainstem region.

[010] In another aspect, the invention provides methods and compositions to deliver a transgene to a subject's spinal cord by administering a recombinant neurotropic viral vector containing the transgene to the motor cortex region of the subject's brain. The delivery of the viral vector is under conditions that favor expression of the transgene in the spinal cord. Viral vectors administered to the motor cortex region are internalized by motor neurons via their cell body region and the transgene is expressed. The expressed transgene may then undergo anterograde transport to the axon terminal portion of the motor neuron, which is present in the spinal cord. Due to the nature of the motor cortex, viral vectors administered to this region of the brain may also be internalized by axon terminals of motor neurons. The viral vector also may undergo retrograde transport along the motor neuron's axon and be expressed in the cell body of the motor neuron.

[011] Further provided are compositions and methods to deliver a transgene to a motor neuron in a subject by administering a recombinant neurotropic viral vector containing the transgene to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the subject's brain. The delivery of the vector is under conditions that favor expression of the transgene in a motor neuron distal to the site of administration.

[012] Also provided are methods and compositions to deliver a transgene to a motor neuron in a subject by administering a neurotropic viral vector containing the transgene to the motor cortex region of the subject's brain and wherein the

administration is under conditions that favor expression of the transgene in a motor neuron distal to the site of administration.

[013] In an alternate aspect, the invention provides compositions and methods to treat a motor neuron disorder in a subject by administering a recombinant neurotropic viral vector containing a therapeutic transgene to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the subject's brain. Administration is done under conditions that favor expression of a therapeutically effective amount of the transgene in at least one subdivision of the spinal cord and/ or the brainstem region.

[014] In yet a further aspect, the invention provides compositions and method to ameliorate the symptoms of a motor neuron disorder in a subject by administering a recombinant neurotropic viral vector containing the therapeutic transgene to the motor cortex region of the subject's brain and under conditions that favor expression of the transgene in a therapeutically effective amount in at least one subdivision of the spinal cord and/ or the brainstem region.

[015] It is to be understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention as claimed.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[016] **Figure 1** is a schematic of how the DCN could be used to transport therapeutic virus to the spinal cord. Lines originating within the black box outlining the DCN represent axons terminals originating from cell bodies (arrowheads) localized within the spinal cord.

[017] **Figure 2** is a reproduction of a histological transverse section through the ponto-medullary junction and cerebellum, showing the three regions of the DCN.

[018] **Figure 3** is a schematic view of the cerebellum which has been cut along the line of the vermis (sagittal section) and then flattened, as well as a horizontal section through the spinal cord and a representation of skeletal musculature. It shows the major afferent (input) pathways.

[019] **Figure 4** is a diagram showing the major efferent pathways (outputs) of the DCN.

[020] **Figure 5** schematically shows the neural circuits in the cerebral cortex, linking the inputs to the outputs. The climbing fibers originate in the inferior olive, which itself receives inputs from the cerebral cortex, spinal cord and special senses (visual and auditory). Mossy fiber inputs originate from all other afferents such as vestibular afferents, spinal afferents, muscle spindles, golgi-tendon organs, joint receptors, skin receptors and the cerebral cortex. There are also three types of inhibitor interneurons in the intrinsic system, including basket cells, golgi cells and stellate cells. These are involved in lateral inhibition and in fine tuning of motor neuron function.

[021] Figures 2 through 5 are reproduced from Williams et al. (2005) The Human Brain: Chapter 3: The Cerebellum, available at the web site: www.vh.org/adult/provider/anatomy/BrainAnatomy/Ch3Text/Section07.html.

[022] **Figures 6A through 6E** show human acid sphingomyelin ("hASM") immunopositive staining in sagittal cerebellar sections following injection of different AAV serotype vectors [(A)2/1, (B)2/2, (C)2/5, (D)2/7 and (E)2/8] encoding for human ASM into the deep cerebellar nuclei of ASMKO mice.

[023] **Figures 7A through 7E** demonstrate human acid sphingomyelin ("hASM") protein transport to the spinal cord from the deep cerebellar nuclei. This effect was observed in mice treated with AAV2/2-ASM, AAV2/5-ASM, AAV2/7-ASM & AAV2/8-ASM (A) hASM 10X magnification; (B) hASM 40X magnification; (C) confocal hASM; (D) confocal ChAT; and (E) confocal hASM & ChAT.

[024] **Figure 8** graphically shows cerebellar tissue homogenate levels following injection of different AAV serotype vectors (2/1, 2/2, 2/5, 2/7 and 2/8) encoding for human ASM into the deep cerebellar nuclei (n=5/group). Groups not connected by the same letter are significantly ($p < .0001$) different.

[025] **Figures 9A through 9G** show calbindin immunopositive staining in sagittal cerebellar sections following injection of different AAV serotype vectors [(A)2/1, (B)2/2, (C)2/5, (D)2/7 and (E)2/8] encoding for human ASM into the deep cerebellar nuclei of ASMKO mice.

[026] **Figures 10A and 10B** show accelerating and rocking rotarod performance (at 14 weeks of age) in ASMKO (injected with AAV- β gal), WT, and AAV-ASM treated ASMKO mice (n=8/group). Groups not connected by the same letter are significantly different. Mice injected with AAV2/1-ASM and AAV2/8-ASM demonstrated a significantly ($p < .0009$) longer latency to fall than ASMKO mice injected with AAV2/1- β gal in the accelerating rotarod test. For the rocking rotarod test, mice injected with AA2/1-ASM demonstrated a significantly ($p < .0001$) longer latency to fall than mice injected with AAV2/1- β gal.

[027] **Figures 11A and 11B** show rotarod performance in ASMKO (n=8), WT (n=8), and bilaterally AAV-ASM (n=5/group) treated mice (at 20 weeks of age). For both accelerating and rocking test, AAV-ASM treated mice performed significantly ($p < .001$) better than ASMKO AAV2/1- β gal treated mice. Performance of mice injected with AAV2/1-ASM was indistinguishable from wild type mice in both the accelerating and rocking tests.

[028] **Figure 12A** illustrates the connections between the deep cerebellar nuclei regions (medial, interposed, and lateral) and the spinal cord regions (cervical, thoracic, lumbar, and sacral). **Figure 12B** illustrates the connections between the deep cerebellar nuclei regions (medial, interposed, and lateral) and the brainstem regions (midbrain, pons, and medulla). The connections are represented by arrows, which start at the cell body region of a neuron and end at the axon terminal region of the neuron. For example, the three regions of the

DCN each have neurons with cell bodies that send axons that terminate in the cervical region of the spinal cord while the cervical region of the spinal cord has cell bodies that send axons that terminate in either the medial or interposed regions of the DCN.

[029] **Figure 13** illustrates green fluorescent protein distribution in the brainstem, or upper motor neurons, following DCN delivery of AAV encoding for green fluorescent protein (GFP).

[030] **Figure 14** illustrates green fluorescent protein distribution in the spinal cord regions following DCN delivery of AAV encoding for green fluorescent protein (GFP).

[031] **Figure 15** illustrates the reduction in glial fibrillary acidic protein (GFAP) staining in the brainstem following DCN delivery of AAV encoding for IGF-1 as compared to DCN delivery of AAV encoding for GFP.

[032] **Figure 16** illustrates the reduction in glial fibrillary acidic protein (GFAP) staining within the oromotor nuclei (trigeminal nucleus, hypoglossal nucleus, and facial nucleus) following DCN delivery of AAV encoding for IGF-1 as compared to DCN delivery of AAV encoding for GFP.

[033] **Figure 17** illustrates the reduction in glial fibrillary acidic protein (GFAP) staining throughout the spinal cord following DCN delivery of AAV encoding for IGF-1 as compared to DCN delivery of AAV encoding for GFP.

[034] **Figure 18** illustrates the distribution of IGF-1 mRNA within the central nervous system (CNS) following DCN delivery of AAV encoding for IGF-1 as compared to DCN delivery of AAV encoding for GFP. Beta-actin is used as a positive control to compare total mRNA levels.

[035] **Figure 19** illustrates that DCN delivery of AAV-IGF-1 promoted the survival of motor neurons. The difference between mice treated with AAV

encoding for IGF-1 as compared to DCN delivery of AAV encoding for GFP is statistically significant to a p-value = 0.01 as indicated by the asterik.

[036] **Figure 20** illustrates the functional improvements in rotarod performance, hindlimb grip strength, and forelimb grip strength in mice treated with DCN delivery of AAV encoding for IGF-1 as compared to DCN delivery of AAV encoding for GFP.

[037] **Figure 21** illustrates the increase in survival mediated by DCN delivery of AAV encoding for IGF-1 as compared to DCN delivery of AAV encoding for GFP.

[038] **Figure 22** shows GFP distribution within the mouse brain following bilateral delivery of a GFP expressing AAV1 vector to the deep cerebellar nuclei (DCN). In addition to the DCN, GFP positive staining was also observed in the olfactory bulbs, cerebral cortex, thalamus, brainstem, cerebellar cortex and spinal cord. All of these areas either receive projections from and/or send projections to the DCN.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[039] In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

[040] The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of immunology, molecular biology, microbiology, cell biology and recombinant DNA, which are within the skill of the art. See, e.g., Sambrook, Fritsch and Maniatis, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd edition (1989); *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (1987)); the series *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M.J. MacPherson, B.D.

Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

[041] As used in the specification and claims, the singular form “a”, “an” and “the” include plural references unless the context clearly dictates otherwise. For example, the term “a cell” includes a plurality of cells, including mixtures thereof.

[042] As used herein, the term “comprising” is intended to mean that the compositions and methods include the recited elements, but not excluding others. “Consisting essentially of” when used to define compositions and methods, shall mean excluding other elements of any essential significance to the combination. Thus, a composition consisting essentially of the elements as defined herein would not exclude trace contaminants from the isolation and purification method and pharmaceutically acceptable carriers, such as phosphate buffered saline, preservatives, and the like. “Consisting of” shall mean excluding more than trace elements of other ingredients and substantial method steps for administering the compositions of this invention. Embodiments defined by each of these transition terms are within the scope of this invention.

[043] All numerical designations, e.g., pH, temperature, time, concentration, and molecular weight, including ranges, are approximations which are varied (+) or (-) by increments of 0.1. It is to be understood, although not always explicitly stated that all numerical designations are preceded by the term “about”. It also is to be understood, although not always explicitly stated, that the reagents described herein are merely exemplary and that equivalents of such are known in the art.

[044] The term “transgene” refers to a polynucleotide that is introduced into a cell of and is capable of being transcribed into RNA and optionally, translated and/or expressed under appropriate conditions. In one aspect, it confers a desired property to a cell into which it was introduced, or otherwise leads to a desired therapeutic or diagnostic outcome. In another aspect, it may be transcribed into a molecule that mediates RNA interference, such as siRNA.

[045] The terms "genome particles (gp)," or "genome equivalents," as used in reference to a viral titer, refer to the number of virions containing the recombinant AAV DNA genome, regardless of infectivity or functionality. The number of genome particles in a particular vector preparation can be measured by procedures such as described in the Examples herein, or for example, in Clark et al. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

[046] The terms "infection unit (iu)," "infectious particle," or "replication unit," as used in reference to a viral titer, refer to the number of infectious and replication-competent recombinant AAV vector particles as measured by the infectious center assay, also known as replication center assay, as described, for example, in McLaughlin et al. (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

[047] The term "transducing unit (tu)" as used in reference to a viral titer, refers to the number of infectious recombinant AAV vector particles that result in the production of a functional transgene product as measured in functional assays such as described in Examples herein, or for example, in Xiao et al. (1997) *Exp. Neurol.*, 144:113-124; or in Fisher et al. (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (LFU assay).

[048] The terms "therapeutic," "therapeutically effective amount," and their cognates refer to that amount of an RNA, DNA or expression product of DNA and/or RNA that results in prevention or delay of onset or amelioration of symptoms of in a subject or an attainment of a desired biological outcome, such as correction of neuropathology, e.g., cellular pathology associated with a motor neuronal disease such as ALS. The term "therapeutic correction" refers to that degree of correction that results in prevention or delay of onset or amelioration of symptoms in a subject. The effective amount can be determined by known empirical methods.

[049] A "composition" is also intended to encompass a combination of active agent and another carrier, e.g., compound or composition, inert (for example, a

detectable agent or label) or active, such as an adjuvant, diluent, binder, stabilizer, buffers, salts, lipophilic solvents, preservative, adjuvant or the like. Carriers also include pharmaceutical excipients and additives proteins, peptides, amino acids, lipids, and carbohydrates (e.g., sugars, including monosaccharides, di-, tri-, tetra-, and oligosaccharides; derivatized sugars such as alditols, aldonic acids, esterified sugars and the like; and polysaccharides or sugar polymers), which can be present singly or in combination, comprising alone or in combination 1-99.99% by weight or volume. Exemplary protein excipients include serum albumin such as human serum albumin (HSA), recombinant human albumin (rHA), gelatin, casein, and the like. Representative amino acid/antibody components, which can also function in a buffering capacity, include alanine, glycine, arginine, betaine, histidine, glutamic acid, aspartic acid, cysteine, lysine, leucine, isoleucine, valine, methionine, phenylalanine, aspartame, and the like. Carbohydrate excipients are also intended within the scope of this invention, examples of which include but are not limited to monosaccharides such as fructose, maltose, galactose, glucose, D-mannose, sorbose, and the like; disaccharides, such as lactose, sucrose, trehalose, cellobiose, and the like; polysaccharides, such as raffinose, melezitose, maltodextrins, dextrans, starches, and the like; and alditols, such as mannitol, xylitol, maltitol, lactitol, xylitol sorbitol (glucitol) and myoinositol.

[050] The term carrier further includes a buffer or a pH adjusting agent; typically, the buffer is a salt prepared from an organic acid or base. Representative buffers include organic acid salts such as salts of citric acid, ascorbic acid, gluconic acid, carbonic acid, tartaric acid, succinic acid, acetic acid, or phthalic acid; Tris, tromethamine hydrochloride, or phosphate buffers. Additional carriers include polymeric excipients/additives such as polyvinylpyrrolidones, ficolls (a polymeric sugar), dextrates (e.g., cyclodextrins, such as 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrin), polyethylene glycols, flavoring agents, antimicrobial agents, sweeteners, antioxidants, antistatic agents, surfactants (e.g., polysorbates such as "TWEEN 20" and "TWEEN 80"), lipids (e.g., phospholipids, fatty acids), steroids (e.g., cholesterol), and chelating agents (e.g., EDTA).

[051] As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, such as a phosphate buffered saline solution, water, and emulsions, such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents. The compositions also can include stabilizers and preservatives and any of the above noted carriers with the additional provision that they be acceptable for use in vivo. For examples of carriers, stabilizers and adjuvants, see Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) and Williams & Williams, (1995), and in the "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

[052] A "subject," "individual" or "patient" is used interchangeably herein, which refers to a vertebrate, preferably a mammal, more preferably a human. Mammals include, but are not limited to, murines, rats, simians, humans, farm animals, sport animals, and pets.

[053] A "control" is an alternative subject or sample used in an experiment for comparison purpose. A control can be "positive" or "negative". For example, where the purpose of the experiment is to determine a correlation of an altered expression level of a gene with a particular type of pathology (see ALS, for example, *infra*), it is generally preferable to use a positive control (a subject or a sample from a subject, carrying such alteration and exhibiting symptoms characteristic of that disease), and a negative control (a subject or a sample from a subject lacking the altered expression and clinical symptom of that disease).

[054] "Differentially expressed" as applied to a gene, refers to the differential production of the mRNA transcribed from the gene or the protein product encoded by the gene. A differentially expressed gene may be overexpressed or underexpressed as compared to the expression level of a normal or control cell. In one aspect, it refers to a differential that is at least 1.5 times, or at least 2.5 times, or alternatively at least 5 times, or alternatively at least 10 times higher or lower than the expression level detected in a control sample. The term "differentially expressed" also refers to nucleotide sequences in a cell or tissue

which are expressed where silent in a control cell or not expressed where expressed in a control cell.

[055] As used herein, the term "modulate" means to vary the amount or intensity of an effect or outcome, e.g., to enhance, augment, diminish or reduce.

[056] As used herein the term "ameliorate" is synonymous with "alleviate" and means to reduce or lighten. For example one may ameliorate the symptoms of a disease or disorder by making them more bearable.

[057] In aspects where gene transfer is mediated by a DNA viral vector, such as an adenovirus (Ad) or adeno-associated virus (AAV), a vector construct refers to the polynucleotide comprising the viral genome or part thereof, and a transgene. Adenoviruses (Ads) are a relatively well characterized, homogenous group of viruses, including over 50 serotypes. See, e.g., International PCT Application No. WO 95/27071. Ads are easy to grow and do not require integration into the host cell genome. Recombinant Ad derived vectors, particularly those that reduce the potential for recombination and generation of wild-type virus, have also been constructed. See, International PCT Application Nos. WO 95/00655 and WO 95/11984. Wild-type AAV has high infectivity and specificity integrating into the host cell's genome. See, Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:6466-6470 and Lebkowski, *et al.* (1988) Mol. Cell. Biol. **8**:3988-3996.

[058] The invention provides a method to deliver a transgene to the spinal cord and/ or brainstem in a subject by administering a recombinant neurotropic viral vector containing a transgene to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the brain, wherein the delivery is under conditions that favor expression of the transgene at a site distal to the site of administration. The delivery may also result in expression of the transgene at the site of administration.

[059] Unless specifically indicated to the contrary, expression of the transgene is not limited to translation to a polypeptide or protein but also includes replication and/or transcription of the transgene polynucleotide.

[060] In another aspect, the invention provides a method of delivering a therapeutic transgene product to a target cell of the CNS, which is a neuron or a glial cell, in a mammal afflicted with a motor neuronal disorder, e.g., ALS or traumatic spinal cord injury. The transgene may encode for IGF-1.

[061] In another aspect, the invention is a method to deliver a transgene to the spinal cord in a subject by administering a recombinant neurotropic viral vector containing said transgene to the motor cortex region of the brain, wherein said delivery is under conditions that favor expression of said transgene at a site distal to said site of administration.

[062] In a yet further aspect, the invention the viral vector is administered to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the brain where the transgene product is expressed and delivered to the spinal cord and/ or the brainstem region of the subject.

[063] In another embodiment, the viral vector is administered to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the brain that is interconnected with brainstem and spinal motor neurons. These targeted regions have direct connections with cells (e.g., interneurons and astrocytes) that compose the motor neuron's cellular environment. The administration delivers the transgene product to the motor neuron's cellular environment, where the product mediates a beneficial effect on the cells that compose it.

[064] In one embodiment, the invention is a method to deliver a transgene to or modulate its expression, in a motor neuron in a subject by administering a neurotropic viral vector containing the transgene to the motor cortex region of the brain of the subject, wherein the transgene is expressed in a region of the motor neuron distal to said site of administration.

[065] In an alternate embodiment, the invention is a method to treat a motor neuron disorder in a subject by administering a recombinant neurotropic viral

vector containing a therapeutic transgene to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the brain of the subject, wherein the transgene is expressed in a therapeutically effective amount in at least one subdivision of the spinal cord of the subject. These subdivisions include one or more of cervical, thoracic, lumbar or sacral (see Figure 1, Figure 12A). The transgene may also be expressed in a therapeutically effective amount in at least one region of the brainstem, such as, for example, the midbrain, pons, or medulla (see Figure 12B). It may also be expressed in a therapeutically effective amount in both at least one region of the brainstem and in at least one subdivision of the spinal cord of the subject.

[066] This invention also is a method to ameliorate the symptoms of a motor neuron disorder in a subject by administering a recombinant neurotropic viral vector containing a therapeutic transgene to the motor cortex region of the brain, wherein said transgene is expressed in a therapeutically effective amount in at least one subdivision of the spinal cord of the subject. These subdivisions include one or more of cervical, thoracic, lumbar or sacral (see Figure 1, Figure 12A).

[067] Suitable neurotropic viral vectors for the practice of this invention include, but are not limited to adeno-associated viral vectors (AAV), herpes simplex viral vectors (U.S. Patent No. 5,672,344) and lentiviral vectors.

[068] In the methods of the invention, AAV of any serotype can be used. In certain embodiments, AAV of any serotype can be used so long as the vector is capable of undergoing retrograde axonal transport in a disease-compromised brain, or axonal transport in a non-compromised brain. The serotype of the viral vector used in certain embodiments of the invention is selected from the group consisting from AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, and AAV8 (see, e.g., Gao et al. (2002) PNAS, 99:11854-11859; and Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Other serotype besides those listed herein can be used. Furthermore, pseudotyped AAV vectors may also be utilized in the methods described herein. Pseudotyped

AAV vectors are those which contain the genome of one AAV serotype in the capsid of a second AAV serotype; for example, an AAV vector that contains the AAV2 capsid and the AAV1 genome or an AAV vector that contains the AAV5 capsid and the AAV 2 genome (Auricchio et al., (2001) *Hum. Mol. Genet.*, 10(26):3075-81).

[069] AAV vectors are derived from single-stranded (ss) DNA parvoviruses that are nonpathogenic for mammals (reviewed in Muzyscka (1992) *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 158:97-129). Briefly, AAV-based vectors have the rep and cap viral genes that account for 96% of the viral genome removed, leaving the two flanking 145-basepair (bp) inverted terminal repeats (ITRs), which are used to initiate viral DNA replication, packaging and integration. In the absence of helper virus, wild-type AAV integrates into the human host-cell genome with preferential site-specificity at chromosome 19q 13.3 or it may remain expressed episomally. A single AAV particle can accommodate up to 5 kb of ssDNA, therefore leaving about 4.5 kb for a transgene and regulatory elements, which is typically sufficient. However, trans-splicing systems as described, for example, in United States Patent No. 6,544,785, may nearly double this limit.

[070] In an illustrative embodiment, AAV is AAV2 or AAV1. Adeno-associated virus of many serotypes, especially AAV2, have been extensively studied and characterized as gene therapy vectors. Those skilled in the art will be familiar with the preparation of functional AAV-based gene therapy vectors. Numerous references to various methods of AAV production, purification and preparation for administration to human subjects can be found in the extensive body of published literature (see, e.g., *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003). Additionally, AAV-based gene therapy targeted to cells of the CNS has been described in United States Patent Nos. 6,180,613 and 6,503,888. Additional exemplary AAV vectors are recombinant AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 and AAV2/8 serotype vectors encoding human protein.

[071] In certain methods of the invention, the vector comprises a transgene operably linked to a promoter. The transgene encodes a biologically active

molecule, expression of which in the CNS results in at least partial correction of neuropathology. The genomic and functional cDNA sequences of human ASM have been published (see, e.g., United States Patent No. 5,773,278 and 6,541,218). The Insulin-like growth factor (IGF-1) gene has a complex structure, which is well-known in the art. It has at least two alternatively spliced mRNA products arising from the gene transcript. There is a 153 amino acid peptide, known by several names including IGF-1A or IGF-1Ea, and a 195 amino acid peptide, known by several names including IGF-1B or IGF-1Eb. The mature form of IGF-1 is a 70 amino acid polypeptide. Both IGF-1Ea and IGF-1Eb contain the 70 amino acid mature peptide, but differ in the sequence and length of their carboxyl-terminal extensions. The peptide sequences of IGF-1Ea and IGF-1Eb are represented by SEQ ID NOS: 1 and 2, respectively. The genomic and functional cDNAs of human IGF-1, as well as additional information regarding the IGF-1 gene and its products, are available at Unigene Accession No. NM_00618.

[072] The level of transgene expression in eukaryotic cells is largely determined by the transcriptional promoter within the transgene expression cassette. Promoters that show long-term activity and are tissue- and even cell-specific are used in some embodiments. Nonlimiting examples of promoters include, but are not limited to, the cytomegalovirus (CMV) promoter (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.* **8**:148-154), CMV/human β -globin promoter (Mandel et al. (1998) *J. Neurosci.* **18**:4271-4284), GFAP promoter (Xu et al. (2001) *Gene Ther.* **8**:1323-1332), the 1.8-kb neuron-specific enolase (NSE) promoter (Klein et al. (1998) *Exp. Neurol.* **150**:183-194), chicken beta actin (CBA) promoter (Miyazaki (1989) *Gene* **79**:269-277), the β -glucuronidase (GUSB) promoter (Shipley et al. (1991) *Genetics* **10**:1009-1018), and ubiquitin promoters such as those isolated from human ubiquitin A, human ubiquitin B, and human ubiquitin C as described in US Patent No. 6,667,174. To prolong expression, other regulatory elements may additionally be operably linked to the transgene, such as, e.g., the Woodchuck Hepatitis Virus Post-Regulatory Element (WPRE) (Donello et al. (1998) *J. Virol.* **72**:5085-5092) or the bovine growth hormone (BGH) polyadenylation site.

[073] For some CNS gene therapy applications, it may be necessary to control transcriptional activity. To this end, pharmacological regulation of gene expression with viral vectors can be obtained by including various regulatory elements and drug-responsive promoters as described, for example, in Haberman et al. (1998) *Gene Ther.* **5**:1604-16011; and Ye et al. (1995) *Science* **283**:88-91.

[074] In the methods of this invention, the viral vector can be administered by contacting an terminal axonal ending of a neuron with a composition containing a viral vector carrying the transgene, allowing the viral particle to be endocytosed and transported intracellularly (retrogradely) along the axon to the cell body of the neuron; allowing the therapeutic transgene product to be expressed, wherein the therapeutic transgene product thereby alleviates pathology in the subject. The effect may be on motor neurons, on cells that compose the motor neuron environment (such as interneurons and astrocytes), or on both. In certain embodiments, the concentration of the vector in the composition is at least: (a) 5, 6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^9$ tu/ml); or (c) 5, 6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

[075] In additional methods of this invention, the viral vector can be administered by contacting the cell body of a neuron with a composition containing a viral vector carrying the transgene, allowing the viral particle to be endocytosed, allowing the therapeutic transgene product to be expressed and transported anterogradely intracellularly along the axon to the axon terminal of the neuron, wherein the therapeutic transgene product thereby alleviates pathology in the subject. The effect may be on motor neurons, on cells that compose the motor neuron environment (such as interneurons and astrocytes), or on both. In certain embodiments, the concentration of the vector in the composition is at least: (a) 5, 6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^9$ tu/ml); or (c) 5, 6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

[076] In one aspect, the transgene encodes a biologically active molecule, expression of which in the CNS results in at least partial correction of neuropathology. In some embodiments, the therapeutic transgene product is an RNA molecule that inhibits expression of SOD in a subject thereby alleviating and preventing the symptoms of ALS. See Roaul et al. (2005) *Nat. Med.* **11**(4):423-428 and Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* **11**(4):429-433.

[077] In one aspect when performing these methods, the transgene expresses a therapeutic amount of a protein selected from the group consisting of insulin growth factor-1 (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alpha, SIRT-2, VEGF, EPO (erythropoietin), CBP (cAMP response element binding protein [CREB] binding protein), SMN-1, SMN-2, and CNTF (Ciliary neurotrophic factor).

[078] Alternatively, the transgene inhibits expression of a mutant form of a protein, e.g., mutant SOD that results in ALS. Roaul et al. (2005) *supra* and Ralph et al. (2005) *supra*.

[079] For identification of structures in the human brain, see, e.g., *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply*, 2nd ed., eds. Deuteron et al., Springer Vela, 1999; *Atlas of the Human Brain*, eds. Mai et al., Academic Press, 1997; and *Co-Planar Sterotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1988. For identification of structures in the mouse brain, see, e.g., *The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinates*, 2nd ed., Academic Press, 2000. Figure 1 schematically shows the spinal cord and its four subdivisions: cervical, thoracic, lumbar and sacral.

[080] The subject invention provides methods to modulate, correct or augment motor function in a subject afflicted with motor neuronal damage. For the purpose of illustration only, the subject may suffer from one or more of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), spinal bulbar muscular atrophy, spinal muscular atrophy, spinal cerebellar ataxia, primary lateral sclerosis (PLS), or traumatic spinal cord injury.

[081] Without being limited as to theory, the pathology associated with motor neuron damage may include motor neuron degeneration, gliosis, neurofilament abnormalities, loss of myelinated fibers in corticospinal tracts and ventral roots. For example, two types of onset have been recognized: bulbar onset, which affects the upper motor neurons (cortex and brainstem motor neurons), affects the facial muscles, speech, and swallowing; and limb onset, which affects the lower motor neurons (spinal cord motor neurons), is reflected by spasticity, generalized weakness, muscular atrophy, paralysis, and respiratory failure. In ALS, subjects have both bulbar and limb onset. In PLS, subjects have bulbar onset.

[082] Without being limited as to theory, one embodiment of the invention lies in the ability to provide a therapeutic molecule (for example, a protein or peptide) to each division of the spinal cord. This may be accomplished by injecting an AAV vector into the DCN. Furthermore, it may be important to target individual lamina within each spinal cord division. Lamina are specific sub-regions within regions of the brain and spinal cord. It may be desirable in certain embodiments to target specific lamina within a certain spinal cord division. Since motor neuron damage may occur within the upper motor neurons as well, it may also be desirable to provide a therapeutic molecule (for example, a protein or peptide) to the divisions of the brainstem. In one embodiment, it may be desirable to provide the therapeutic molecule to both the spinal cord, including some or all subdivisions as well as to the brainstem, including some or all subdivisions. The instant invention uses the introduction of an AAV vector into the DCN to accomplish the above described delivery of a therapeutic molecule to the spinal cord region(s) and/ or brainstem. Figure 12A illustrates the connections between the deep cerebellar nuclei regions and the spinal cord while Figure 12B illustrates the connections between the deep cerebellar nuclei regions and the brainstem.

[083] The ability to organize and execute complex motor acts depends on signals from the motor areas in the cerebral cortex, i.e., the motor cortex. Cortical motor commands descend in two tracts. The corticobulbar fibers control

the motor nuclei in the brain stem that move facial muscles and the corticospinal fibers control the spinal motor neurons that innervate the trunk and limb muscles. The cerebral cortex also indirectly influences spinal motor activity by acting on the descending brain stem pathways.

[084] The primary motor cortex lies along the precentral gyrus in Brodmann's area (4). The axons of the cortical neurons that project to the spinal cord run together in the corticospinal tract, a massive bundle of fibers containing about 1 million axons. About a third of these originate from the precentral gyrus of the frontal lobe. Another third originate from area 6. The remainder originates in areas 3, 2, and 1 in the somatic sensory cortex and regulate transmission of afferent input through the dorsal horn.

[085] The corticospinal fibers run together with corticobulbar fibers through the posterior limb of the internal capsule to reach the ventral portion of the midbrain. They separate in the pons into small bundles of fibers that course between the pontine nuclei. They regroup in the medulla to form the medullary pyramid. About three-quarters of the corticospinal fibers cross the midline in the pyramidal decussation at the junction of the medulla and spinal cord. The crossed fibers descend in the dorsal part of the lateral columns (dorsolateral column) of the spinal cord, forming the lateral corticospinal tract. The uncrossed fibers descend in the ventral columns as the ventral corticospinal tract.

[086] The lateral and ventral divisions of the corticospinal tract terminate in about the same regions of spinal gray matter as the lateral and medial systems of the brain stem. The lateral corticospinal tract projects primarily to motor nuclei in the lateral part of the ventral horn and to interneurons in the intermediate zone. The ventral corticospinal tract projects bilaterally to the ventromedial cell column and to adjoining portions of the intermediate zone that contain the motor neurons that innervate axial muscles. Figure 3 schematically shows the major afferent (input) pathways.

[087] Deep within the cerebellum is grey matter called the deep cerebellar nuclei termed the medial (fastigial) nucleus, the interposed (interpositus) nucleus and the lateral (dentate) nucleus. As used herein, the term "deep cerebellar nuclei" collectively refers to these three regions. Figure 2 schematically shows the three regions of the DCN. Figure 4 schematically shows the major efferent (output) pathways from the DCN. Figure 5 schematically shows the neural circuits in the cerebral cortex. Figures 12A and 12B schematically show connections between the DCN and the spinal cord or the brainstem, respectively.

[088] If desired, the human brain structure can be correlated to similar structures in the brain of another mammal. For example, most mammals, including humans and rodents, show a similar topographical organization of the entorhinal-hippocampus projections, with neurons in the lateral part of both the lateral and medial entorhinal cortex projecting to the dorsal part or septal pole of the hippocampus, whereas the projection to the ventral hippocampus originates primarily from neurons in medial parts of the entorhinal cortex (Principles of Neural Science, 4th ed., eds Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2nd ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Furthermore, layer II cells of the entorhinal cortex project to the dentate gyrus, and they terminate in the outer two-thirds of the molecular layer of the dentate gyrus. The axons from layer III cells project bilaterally to the cornu ammonis areas CA1 and CA3 of the hippocampus, terminating in the stratum lacunose molecular layer.

[089] In one aspect, the disclosed methods include administering to the CNS of an afflicted subject a neurotropic viral vector carrying a transgene encoding a therapeutic product and allowing the transgene to be expressed within the CNS distally from the administration site at a therapeutic level. In addition, the vector may comprise a polynucleotide encoding for a biologically active molecule effective to treat the CNS disorder. Such biologically active molecules may comprise peptides including but not limited to native or mutated versions of full-length proteins, native or mutated versions of protein fragments, synthetic polypeptides, antibodies, and antibody fragments such as Fab' molecules. Biologically active molecules may also comprise nucleotides including single-

stranded or double-stranded DNA polynucleotides and single-stranded or double-stranded RNA polynucleotides. For a review of exemplary nucleotide technologies that may be used in the practice of the methods disclosed herein, see Kurreck, (2003) J., Eur. J. Biochem. 270, 1628-1644 [antisense technologies]; Yu et al., (2002) PNAS 99(9), 6047-6052 [RNA interference technologies]; and Elbashir et al., (2001) Genes Dev., 15(2):188-200 [siRNA technology].

[090] In an illustrative embodiment, the administration is accomplished by direct injection of a high titer vector solution into the DCN of a subject or patient. For example, the administration is by direct injection into one or more deep cerebellar nuclei region of the brain selected from the group consisting of the medial (fastigial) region, interposed (interpositus) region and the lateral (dentate) region. The DCN is an attractive site for injection due to its extensive efferent and afferent connections with the brainstem and spinal cord. These cells provide an efficient and minimally invasive means to deliver viral vector and expressed transgene to the spinal cord regions and the brainstem regions. Without being limited as to theory, the viral vector may be taken up by the axon terminals and transported retrogradely along the axon to the cell body of these neurons, which project throughout in the spinal cord region and/or brainstem. Cell bodies of neurons are also present in the DCN that have axon terminal endings that terminate, for example, in the cervical region of the spinal cord. Viral vector taken up by these cell bodies, or expressed transgene resulting from the viral vector or both, may be anterogradely transported to the axon terminal endings in the cervical spinal region. Therefore, by using the DCN as an injection site, only a small volume of viral vector is injected but this mediates significant transgene expression throughout one or more regions in the spinal cord and/or the brainstem.

[091] In some embodiments, the methods comprise administration of a high titer neurotropic vector carrying a therapeutic transgene so that the transgene product is expressed at a therapeutic level in a second site within the CNS distal to the first site. In some embodiments, the viral titer of the composition is at least: (a) 5,

6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^9$ tu/ml); or (c) 5, 6, 7, 8, 8.4, 9, 9.3, 10, 15, 20, 25, or 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml). In further embodiments, the administration is accomplished by direct intraparenchymal injection of a high titer neurotropic vector solution into the diseased brain, thereafter the transgene is expressed distally, contralaterally or ipsilaterally, to the administration site at a therapeutic level at least 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 mm from the administration site.

[092] The distance between the first and the second sites is defined as the minimal distance region between the site of administration (first site) and the boundary of the detectable transduction of the distal site (second site) as measured using procedures known in the art or as described in the Examples, e.g., in situ hybridization. Some neurons in the CNS of larger mammals may span large distances by virtue of their axonal projections. For example, in humans, some axons may span a distance of 1000 mm or greater. Thus, in various methods of the invention, the vector can be axonally transported along the entire length of the axon at such a distance to reach and transduce the parent cell body.

[093] A site of vector administration within the CNS is chosen based on the desired target region of neuropathology and the topology of brain circuits involved so long as an administration site and the target region have axonal connections. The target region can be defined, for example, using 3-D stereotaxic coordinates. In some embodiments, the administration site is chosen so that at least 0.1, 0.5, 1, 5, or 10 % of the total amount of vector injected is delivered distally at the target region of at least 1, 200, 500, or 1000 mm³. An administration site may be localized in a region innervated by projection neurons connecting distal regions of the brain. For example, the substantial nigra and ventral segmental area send dense projections to the caudate and putamen (collectively known as the striatum). Neurons within the substantial nigra and ventral tegmentum can be targeted for transduction by retrograde transport of AAV following injection into the striatum. As another example, the hippocampus receives well-defined, predictable axonal projections from other regions of the brain. Other

administration sites may be localized, for example, in the spinal cord, brainstem (medulla, midbrain, and pons), mesencephalon, cerebellum (including the deep cerebellar nuclei), diencephalon (thalamus, hypothalamus), telencephalon (corpus striatum, cerebral cortex, or, within the cortex, the occipital, temporal, parietal or frontal lobes), or combinations thereof.

[094] The second (target) site can be located any region of the CNS, including the brain and the spinal cord, that contains a neurons that project to the first (administration) site. In some embodiments, the second site is in a region of the CNS chosen from the substantia nigra, the medulla oblongata, the brainstem, or the spinal cord.

[095] To deliver the vector specifically to a particular region of the central nervous system, especially to a particular region of the brain, it may be administered by stereotaxic microinjection. For example, on the day of surgery, patients will have the stereotaxic frame base fixed in place (screwed into the skull). The brain with stereotaxic frame base (MRI-compatible with fiducial markings) will be imaged using high resolution MRI. The MRI images will then be transferred to a computer that runs stereotaxic software. A series of coronal, sagittal and axial images will be used to determine the target site of vector injection, and trajectory. The software directly translates the trajectory into 3-dimensional coordinates appropriate for the stereotaxic frame. Burr holes are drilled above the entry site and the stereotaxic apparatus localized with the needle implanted at the given depth. The vector in a pharmaceutically acceptable carrier will then be injected. The vector is then administered by direct injection to the primary target site and retrogradely transported to distal target sites via axons. Additional routes of administration may be used, e.g., superficial cortical application under direct visualization, or other non-stereotaxic application.

[096] In addition because each region of the DCN targets specific regions of the CNS (see Figure 1 and Figures 12A and 12B), one can specifically target the region of the CNS to which the transgene is delivered by pre-selecting the region of the DCN for administration. As is apparent to those of skill in the art, a

multitude of dosing and targeted deliveries can be achieved by varying the location, sequence and number of transgene administrations. The total volume of material to be administered, and the total number of vector particles to be administered, will be determined by those skilled in the art based upon known aspects of gene therapy. Therapeutic effectiveness and safety can be tested in an appropriate animal model. For example, a variety of well-characterized animal models exist for LSDs, e.g., as described herein or in Watson et al. (2001) *Methods Mol. Med.* **76**:383-403; or Jeyakumar et al. (2002) *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, **28**:343-357 and ALS (see Tu et al. (1996) *P.N.A.S.* **93**:3155-3160; Roaul et al. (2005) *Nat. Med.* **11**(4):423-428 and Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* **11**(4):429-433).

[097] In experimental mice, the total volume of injected AAV solution is for example, between 1 to 5 μ l. For other mammals, including the human brain, volumes and delivery rates are appropriately scaled. For example, it has been demonstrated that volumes of 150 μ l can be safely injected in the primate brain (Janson et al. (2002) *Hum. Gene Ther.* **13**:1391-1412). Treatment may consist of a single injection per target site, or may be repeated along the injection tract, if necessary. Multiple injection sites can be used. For example, in some embodiments, in addition to the first administration site, a composition containing a viral vector carrying a transgene is administered to another site which can be contralateral or ipsilateral to the first administration site. Injections can be single or multiple, unilateral or bilateral.

[098] High titer AAV preparations can be produced using techniques known in the art, e.g., as described in United States Patent No. 5,658,776 and *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003.

[099] The following examples provide illustrative embodiments of the invention. One of ordinary skill in the art will recognize the numerous modifications and variations that may be performed without altering the spirit or scope of the

present invention. Such modifications and variations are encompassed within the scope of the invention. The examples do not in any way limit the invention.

EXAMPLES

Titration of Recombinant Vectors

[0100] AAV vector titers were measured according to genome copy number (genome particles per milliliter). Genome particle concentrations were based on Taqman® PCR of the vector DNA as previously reported (Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278). Briefly, purified AAV-ASM was treated with capsid digestion buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0 mM EDTA, 0.5% SDS, 1.0 mg/ml proteinase K) at 50°C for 1 hour to release vector DNA. DNA samples were put through a polymerase chain reaction (PCR) with primers that anneal to specific sequences in the vector DNA, such as the promoter region, transgene, or the poly A sequence. The PCR results were then quantified by a Real-time Taqman® software, such as that provided by the Perkin Elmer-Applied Biosystems (Foster City, CA) Prism 7700 Sequence Detector System,

[0101] Vectors carrying an assayable marker gene such as the β -galactosidase or green fluorescent protein gene (GFP) can be titrated using an infectivity assay. Susceptible cells (e.g., HeLa, or COS cells) are transduced with the AAV and an assay is performed to determine gene expression such as staining of β -galactosidase vector-transduced cells with X-gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) or fluorescence microscopy for GFP-transduced cells. For example, the assay is performed as follows: 4×10^4 HeLa cells are plated in each well of a 24-well culture plate using normal growth media. After attachment, i.e., about 24 hours later, the cells are infected with Ad type 5 at a multiplicity of infection (MOI) of 10 and transduced with serial dilutions of the packaged vector and incubated at 37°C. One to three days later, before extensive cytopathic effects are observed, the appropriate assay is performed on the cells (e.g., X-gal staining or fluorescence microscopy). If a reporter gene

such as β -galactosidase is used, the cells are fixed in 2% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde and stained for β -galactosidase activity using X-gal. Vector dilutions that give well-separated cells are counted. Each positive cell represents 1 transduction unit (tu) of vector.

Expression of Functional Protein Deters Motor Impairment in a Therapeutically Relevant Mouse Model

[0102] ASMKO mice are an accepted model of types A and B Niemann-Pick disease (Horinouchi et al. (1995) *Nat. Genetics* **10**:288-293; Jin et al. (2002) *J. Clin. Invest.* **109**:1183-1191; and Otterbach (1995) *Cell* **81**:1053-1061). Niemann-Pick disease (NPD) is classified as a lysosomal storage disease and is an inherited neurometabolic disorder characterized by a genetic deficiency in acid sphingomyelinase (ASM; sphingomyelin cholinephosphohydrolase, EC 3.1.3.12). The lack of functional ASM protein results in the accumulation of sphingomyelin substrate within the lysosomes of neurons and glia throughout the brain. This leads to the formation of large numbers of distended lysosomes in the perikaryon, which are a hallmark feature and the primary cellular phenotype of type A NPD. The presence of distended lysosomes correlates with the loss of normal cellular function and a progressive neurodegenerative course that leads to death of the affected individual in early childhood (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3589-3610). Secondary cellular phenotypes (e.g., additional metabolic abnormalities) are also associated with this disease, notably the high level accumulation of cholesterol in the lysosomal compartment. Sphingomyelin has strong affinity for cholesterol, which results in the sequestering of large amounts of cholesterol in the lysosomes of ASMKO mice and human patients (Leventhal et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:44976-44983; Slotte (1997) *Subcell. Biochem.* **28**:277-293; and Viana et al. (1990) *J. Med. Genet.* **27**:499-504.)

[0103] The following experiment, evaluated the relative ability of recombinant AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 and AAV2/8 serotype vectors encoding human ASM (hASM) to express hASM protein, correct cholesterol storage

pathology, undergo transport, rescue Purkinje cells, and initiate functional recovery in the ASMKO mouse after unilateral injection within the deep cerebellar nuclei. An additional group of ASMKO mice received bilateral injections into the DCN in order to assess whether increased transgene protein spread/expression would improve behavioral functional recovery.

[0104] Sixty-six male homozygous (-/-) acid sphingomyelinase knockout (ASMKO) mice and sixteen male wild type littermate controls were bred from heterozygote matings (+/-). Mice were genotyped by PCR following the procedure described in Gal et al. (1975) N Engl J Med:293:632-636. Mice from the original colony were backcrossed onto the C57/Bl6 strain. Animals were housed under 12:12 hour light:dark cycle and provided with food and water *ad libitum*. All procedures were performed under a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

[0105] After being anesthetized with isoflurane, mice (~7 weeks of age) were unilaterally injected into the deep cerebellar nuclei (A-P: -5.75 from bregma, M-L: -1.8 from bregma, D-V: -2.6 from dura, incisor bar: 0.0) with one of the following AAV serotype vectors (n=8/vector): AAV1-CMV-βgal, AAV1-CMV-ASM, AAV2-CMV-ASM, AAV5-CMV-ASM, AAV7-CMV-ASM, and AAV8-CMV-ASM. Vectors were delivered with a 10 µl Hamilton syringe mounted on a syringe pump at a rate of 0.5 µl/minute for a total of 1.86×10^{10} genome particles per brain. The final injection volume for each vector was 4 µl. One hour before and twenty-four hours after surgery mice were given ketoprofen (5 mg/kg; SC) for analgesia.

[0106] Mice were killed 7 weeks post-injection (14 weeks of age). At the time of sacrifice mice were overdosed with euthasol (150 mg/kg; IP) and rapidly decapitated (n=5/group) or transcardially perfused (n=3/group). Brains from decapitated mice were rapidly removed, snap frozen in liquid nitrogen, dissected into 3 sections (right cerebral hemisphere, left cerebral hemisphere, & cerebellum) homogenized, and analyzed for hASM by ELISA. Brains and spinal cords from perfused mice were processed for human ASM protein expression, cholesterol accumulation as detected by filipin staining, and Purkinje cell survival

with calbindin staining on 50 μ m vibratome sections. ASMKO mice that received bilateral injections (~7 weeks of age) of AAV2/1- β gal (n=8), AAV2/1-ASM (n=5), and AAV2/2-ASM (n=5) were sacrificed at 20 weeks of age after undergoing rotarod testing. Mice were tested by accelerating and rocking rotarod for motor function on the Smartrod (AccuScan) using methods known in the art. Exemplary methods are reproduced in Sleat et al. (2004) *J. Neurosci.* **24**:9117-9126. Figures 10 and 11 graphically show the results of rotarod tests as a measurement of recovery of motor function.

[0107] The full-length human ASM cDNA under the control of the human cytomegalovirus immediate-early (CMV) promoter, with an SV40 polyadenylation sequence, and a hybrid intron, was cloned into a plasmid containing ITRs from AAV serotype 2 (AAV2 ITR). Jin et al. (2002) *J Clin Invest.* **109**:1183-1191. Hybrid vectors were produced by triple transfection using a series of helper plasmids containing serotype specific capsid coding domains in addition to the AAV type 2 replication genes. This strategy allows the packaging of AAV2 ITR vectors into each serotype-specific virion Rabinowitz, et al. (2002) *J Virol.* **76**:791-801. With this approach the hASM recombinant genome was used to generate a series of rAAV-hASM vectors of various serotypes including AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 and AAV2/8. Recombinant AAV vectors were purified by ion-exchange chromatography (Serotypes 2/1, 2/2 and 2/5). O'Riordan et al. (2000) *J Gene Med* **2**: 444-54 or CsCl centrifugation (serotypes 2/8 and 2/7) Rabinowitz et al. (2002) *J. Urol.* **76**:791-801. The final titer of AAV-ASM virion particles (DNase-resistant particles), was determined by TaqMan PCR of the CMV sequence. Clark et al. (1999) *Hum. Gene Therapy* **10**:1031-1039.

[0108] Human ASM antibodies are human specific and do not cross react with mouse ASM. Coster (Corning, NY) 9018 plates coated (100 μ l/well) with monoclonal recombinant human ASM (rhASM) antibody (2 μ g/ml) diluted in 50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.6) were incubated overnight @ 2-8°C. Excess coating antibody was removed and blocking diluent (KPL, Inc., MD) was added for 1h @ 37°C. Plates were washed with a microplate washer (Molecular

Devices, CA) for two cycles. Standards, controls and samples diluted in standard dilution buffer (PBS, 0.05% Tween, 1% HP-BSA) were pipetted in duplicate and allowed to incubate for 1 h @ 37°C. Plates were washed as described above. One hundred microliters of biotinylated recombinant human ASM (rhASM) antibody (diluted 1:20K in standard dilution buffer) was added to each well, allowed to incubate for 1 h @ 37°C, and then removed with a microplate washer. Streptavidin – HRP (Pierce Biotechnology, Inc., IL) diluted 1:10K was then added (100 µl/well) and allowed to incubate for 30 min at room temperature. Plates were washed as described above and then incubated with SureBlue TMB (KPL, Inc., MD) for 15 minutes @ 36-38°C. The reaction was stopped with stop solution (KPL, Inc., MD) and absorbance values were then read at 450 nm with a Spectra Max 340 plate reader (Molecular Devices, CA). Data analysis was completed using Softmax Pro 4.3 software (Molecular Devices, CA).

[0109] The protein concentration for each sample was determined with a BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Inc., IL) using bovine serum albumin as standard.

[0110] Mice were transcardially perfused with fixative containing 2% paraformaldehyde, 0.03% glutaraldehyde, 0.002% CaCl₂ in 0.1 M sodium acetate buffer at pH 6.5, followed by perfusion with the same fixative at pH 8.5. Mouse brains and spinal cords were dissected and post-fixed overnight at 4° C in pH 8.5 fixative without glutaraldehyde. The tissues were washed in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, embedded in 3.5% agar and cut into 50 µm sagittal sections with a vibratome.

[0111] Brains and spinal cords were vibratome-sectioned sagittally at 50 µm intervals. Sections were processed for immunofluorescence with primary antibodies against human ASM (1:200). Sections were incubated in 10% donkey serum, 0.3% Triton X-100 in PBS for 1 hour, followed by incubation with biotinylated mouse anti-human ASM in 2% donkey serum, 0.2% Triton X-100 in PBS for 72 hours. After washing, the signal was amplified using a Tyramide Signal Amplification kit (PerkinElmer, Boston MA). Human ASM protein was

visualized with a Nikon fluorescent microscope, and images were captured with a SPOT camera and Adobe Photoshop software.

[0112] Filipin Complex (Sigma, St. Louis, MO) was first diluted in 100% methanol for a stock concentration of 1 mg/ml. Stock solution is stable for 4 weeks at -20° C. After washing with PBS, the sections were incubated in the dark for three hours in a freshly made 10 μ g/ml filipin solution in PBS. Sections were then washed three times with PBS. Cholesterol deposits were visualized under an ultraviolet filter on a fluorescence microscope.

[0113] Brains were processed for immunofluorescence using primary antibodies directed against the calcium binding protein, calbindin. Sections were washed with potassium phosphate buffer (KPB) and then rinsed with potassium phosphate buffered saline (KPBS). Sections were then blocked in 5% donkey serum, 0.25% Triton X-100 in KPBS for up to 3 hours and then incubated in 5% donkey serum, 0.2% Triton X-100 and mouse anti-calbindin (1:2500, Sigma, St. Louis, MO) in KPBS. After 72 hours at 4° C sections were rinsed with KPBS with 0.1% Triton X-100 three times. Secondary antibody, donkey-anti mouse CY3 (1:333, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) was added in KPBS + 0.1% Triton X-100 for 90 minutes at room temperature. Sections were washed with KPB and then mounted onto gel-coated slides. Calbindin-positive cells were visualized under epifluorescence. In order to quantify Purkinje cells of the cerebellum, four full-faced, medial cerebellar sections were selected from each animal. Calbindin-immunopositive Purkinje cells were viewed under a fluorescent microscope and cell bodies were counted at a magnification of 20X. Each lobe was counted separately. Two separate focal planes were counted per lobe. Only cells in focus were counted to insure that no cell was counted twice.

[0114] Fifty (50) μ m vibratome sections were first processed for immunofluorescence with antibodies directed against human ASM, as described above. The sections were then washed in PBS and stained for choline acetyltransferase (ChAT; rabbit polyclonal, 1:500, Chemicon International, Temecula, CA) with the protocol outlined above for calbindin. Rather than using

a CY3 secondary antibody, however, donkey-anti-rabbit FITC (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) was used. The staining was first visualized under epifluorescence and later images were acquired with a confocal microscope.

[0115] Filipin staining was quantified as follows. Exposure-matched images were captured using a Nikon E600 wide field upright epifluorescence microscope equipped with a SPOT digital camera. The AAV2/1- β -gal group was imaged first, and that exposure was used to acquire all additional images. Each image analyzed represents a medial sagittal plane through the length of each half-brain. Morphometric analysis was performed with Metamorph software (Universal Imaging Corporation). The AAV2/1- β -gal images were thresholded; once established, the same threshold was used in all images. The following regions were manually selected by the user and analyzed separately: cerebellum, pons, medulla, midbrain, cerebral cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus and striatum. Integrated intensity was measured in each region, and all measurements ($n=3$ /group) from a given group of animals were used to generate averages. The reduction in cholesterol in the treated animals was then calculated as the percent decrease of the integrated intensity compared to the knockout β -gal injected mice. Positive hASM immunostaining was observed throughout the cerebellum (Table 1), pons, medulla and spinal cord following unilateral injection of AAV-ASM within the deep cerebellar nuclei.

Table 1

[0116] Areas with positive hASM staining as function of AAV serotype. * indicates positive hASM was below limit of detection, but correction of cholesterol pathology still occurred

Structure	AAV1	AAV2	AAV5	AAV7	AAV8
deep cerebellar nuclei	++++	++	+++	+++	++++
cerebellar lobules	++++	++	+++	+++	++++
pons	++	++	++	++	+
medulla	+	++	++	+++	+
spinal cord		+++	+++	++	+
thalamus	*	*	*	*	*
hypothalamus	*	*	*	*	*
hippocampus	*	*	*	*	*
striatum	*	*	*	*	*
cerebral cortex	*	*	*	*	*

[0117] Within the cerebellum mice treated with AAV2/1-ASM and had the most widespread (i.e., spread between lobules within the same sagittal section) level of hASM expression, whereas mice treated with AAV2/2-ASM had the most restricted level of Human ASM protein expression. Human ASM protein expression in mice treated with AAV2/5-ASM, AAV2/7-ASM, and AAV2/8-ASM was intermediate between these two groups. Medial – lateral spread between sagittal sections was maximal in mice treated with serotypes 1 & 8 and minimal in mice injected with serotype 2. Serotypes 5 & 7 initiated medial –lateral spread patterns intermediate between serotypes 1 and 2. Each layer of the cerebellum (i.e., molecular, Purkinje and granular) was transduced by each AAV serotype; however, an increased affinity for the molecular layer was apparent for all serotypes. Purkinje cell transduction was maximal in mice treated with serotypes 1 and 5. Mice injected with serotype 7 had the fewest number of transduced Purkinje cells. Mice treated with serotype 8 also had few transduced Purkinje cells, but had less ASM expression within the granular layer when compared to serotypes 1, 2, 5 & 7. Purkinje cells transduced with ASM appeared to have a healthy cytostructure. Quantitative analysis of AAV mediated hASM protein expression by ELISA in cerebellar tissue homogenates supports these immunohistochemical findings. Mice injected with serotypes 1 and 8

demonstrated significantly ($p < .0001$) higher cerebellum hASM protein levels when compared to all other mice. Cerebellar hASM levels from mice injected with serotypes 2, 5, & 7 were not above WT levels (i.e. background). As expected human ASM was not detected in wild type mice – the hASM antibody used in the ELISA are human specific.

[0118] An absence of functional ASM protein results in lysosomal accumulation of sphingomyelin, and subsequent secondary metabolic defects such as abnormal cholesterol trafficking. Sarna et al. *Eur. J. Neurosci.* **13**:1873-1880 and Leventhal et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:44976-4498. Free cholesterol buildup in the ASMKO mouse brain is visualized using filipin, an autofluorescent molecule isolated from *streptomyces filipinensis*. Wild-type mouse brains do not stain positively for filipin. In all AAV treated mice (with exception to AAV2/1- β gal) clearance of filipin staining (Table 2) overlapped with areas that were positive for hASM immunostaining indicating that each serotype vector is capable of generating a functional transgene product.

Table 2

[0119] Percent Reduction in Filipin (i.e., cholesterol) clearance as compared to ASMKO mice treated with AAV- β gal in selected brain regions following intracerebellar injection of different AAV serotypes (n=3/serotype; 2/1, 2/2, 2/5, 2/7, and 2/8) encoding for human ASM into the deep cerebellar nuclei of ASMKO mice.

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8
Cerebellum	96.54 $\pm$ 2.14	93.85 $\pm$ 1.257	86.75 $\pm$ 9.58	96.47 $\pm$ 1.93	99.12 $\pm$.66
Midbrain	96.72 $\pm$ 1.73	53.08 $\pm$ 22.89	65.88 $\pm$ 24.53	73.39 $\pm$ 22.39	91.10 $\pm$.105
Pons	91.31 $\pm$ 5.80	50.07 $\pm$ 21.26	70.96 $\pm$ 25.60	93.15 $\pm$ 31.20	96.72 $\pm$ 1.20
Medulla	93.29 $\pm$ 6.22	88.46 $\pm$ 3.04	81.55 $\pm$ 17.31	80.73 $\pm$ 14.99	97.40 $\pm$ 1.60
Thalamus	48.88 $\pm$ 25.25	41.21 $\pm$ 27.35	34.86 $\pm$ 16.67	48.44 $\pm$ 28.65	77.03 $\pm$ 12.08
Hypothalamus	82.81 $\pm$ 10.14	86.96 $\pm$ 12.93	88.46 $\pm$ 5.90	82.95 $\pm$ 11.46	99.68 $\pm$.31
Cortex	27.60 $\pm$ 24.75	73.62 $\pm$ 14.9	55.65 $\pm$ 28.89	76.97 $\pm$ 14.27	98.30 $\pm$.34

[0120] As previously demonstrated by (Passini et al. (2003) in "Society for Neuroscience" New Orleans, LA), filipin clearance also occurred in areas anatomically connected with the injection site, but that did not stain positively for hASM. MetaMorph analysis indicated that a reduction in filipin staining occurred throughout the entire rostral caudal axis. In the cerebellum and brainstem filipin was maximally reduced in mice treated with AAV2/1-ASM and AAV2/8-ASM, whereas in the diencephalon and cerebral cortex mice injected with AAV2/8-ASM had the best overall level of filipin clearance (Table 2). Nevertheless, these results indicate that the level of hASM required to correct cholesterol storage pathology in the ASMKO mouse CNS is minimal (i.e., below the hASM immunofluorescence limit of detection).

[0121] Histological studies indicate that the ASMKO mouse cerebellum undergoes rapid deterioration. More specifically, Purkinje cells progressively die off between 8 and 20 weeks of age (Sarna et al. (2001) Eur. J. Neurosci. 13:1813-1880 and Stewart et al. (2002) in "Society for Neuroscience" Orlando, FL). Calbindin is a widely accepted Purkinje cell marker. Positive calbindin

staining in AAV-ASM treated mice would suggest that AAV mediated expression of hASM is therapeutic. Overall our results indicate that AAV mediated hASM expression in the cerebellum prevents Purkinje cell death in the ASMKO mouse (Table 3). As expected Purkinje cell survival did not occur in lobules I-III; mice were injected at 7 weeks of age and by 8 weeks the majority of these cells have already died off. Purkinje cell survival in lobules IV/V was maximal in mice treated with serotype 1. In lobule VI no significant Purkinje cell survival was observed in AAV treated mice. In lobule VII only mice treated with serotype 5 showed significant Purkinje cell survival. In lobule VIII again mice treated with serotype 5 as well as serotype 2 showed significant Purkinje cell survival. In lobules IX and X there were no significant differences between WT and KO mice (or between AAV treated mice) in Purkinje cell counts. This was expected, because at 14 weeks of age (i.e., age at sacrifice) Purkinje cells in these lobules are still viable in ASMKO mice. Across all lobules Purkinje cell survival was maximal in mice treated with serotypes 1, 2, & 5 and minimal in mice treated with serotypes 7 & 8.

Table 3

[0122] Purkinje cell counts in cerebellar lobules I-X in WT and ASMKO mice following intracerebellar injection of different AAV serotypes (n=3/serotype; 2/1, 2/2, 2/5, 2/7, and 2/8) encoding for human ASM into the deep cerebellar nuclei of ASMKO mice. Numbers appearing bold italic are significantly different from KO mice (i.e., mice treated with AAV2/1-βgal) $p \leq .01$.

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8	KO	WT
I/II	7.42 ± 9.80	4.5 ± 10.58	9.40 ± 11.59	12.33 ± 10.58	1 ± 9.16	5.8 ± 11.59	113 ± 10.58
III	12.42 ± 10.32	11.33 ± 11.14	26.80 ± 12.21	15.33 ± 11.14	9.8 ± 12.21	2 ± 9.65	147.50 + 11.14
IV/ V	60.57 ± 17.28	36.5 ± 18.67	27.80 ± 20.45	29.66 ± 18.67	6.8 ± 20.45	8 ± 16.16	220.66 ± 18.67
VI	61.14 ± 11.21	27.5 ± 12.11	72.20 ± 13.26	31.16 ± 12.11	3.8 ± 13.26	68.5 ± 10.48	121.16 ± 12.11
VII	17.42 ± 4.15	37.66 + 4.49	40.60 ± 4.91	5.33 ± 4.49	.2 ± 4.95	17.37 ± 3.88	37.16 ± 4.49
VIII	44.14 ± 10.75	48.66 ± 11.62	82.80 ± 12.73	11.33 + 11.62	18.40 ± 12.73	35.12 ± 10.06	103.33 ± 11.62
IX	126.28 ± 19.17	102.66 ± 20.71	136.40 ± 22.68	60.16 ± 20.71	84.40 ± 22.68	108.0 ± 17.93	144 ± 20.71
X	89.85 ± 12.54	76.83 ± 13.55	93.80 ± 14.84	48.16 + 13.55	64.80 ± 14.84	87 ± 11.73	86.66 ± 13.55

[0123] On the accelerating rotarod test mice unilaterally injected with AAV2/1-ASM and AAV2/8-ASM demonstrated a significantly ($p < .0009$) longer latency to fall than ASMKO mice injected with AAV2/1-βgal. Mice injected with serotype AA2/1-ASM were not significantly different from wild type mice. Mice injected with AAV2/2-ASM and AAV2/5-ASM showed a trend for a longer latency to fall than ASMKO mice injected with AAV2/1-βgal; whereas, mice injected with AAV2/7-ASM did not. For the rocking rotarod test, only mice injected with AA2/1-ASM demonstrated a significantly ($p < .0001$) longer latency to fall than mice injected

with AAV2/1- β gal. In this case wild type mice performed significantly better than mice injected with AAV2/1-ASM. ASMKO mice that received bilateral injection of either AAV2/1-ASM or AAV2/2-ASM performed significantly ($p < .001$) better than ASMKO AAV2/1- β gal treated mice for both accelerating and rocking tests. AAV2/1-ASM bilaterally injected mice performed comparably to wild type mice for both tests.

[0124] One way to determine if AAV generated hASM is functionally active within the ASMKO CNS is to assess its influence on cholesterol storage pathology - a secondary metabolic defect of NPA disease. In all AAV treated mice (with exception to AAV2/1- β gal) correction of cholesterol storage pathology overlapped with areas that were positive for hASM immunostaining indicating that each serotype vector is capable of generating a functional transgene product. As previously demonstrated, correction of abnormal cholesterol metabolism correction also occurred in areas anatomically connected with the injection site, but also in regions that did not stain positively for hASM, suggesting that the level hASM required for correction of cholesterol storage pathology is minimal. Consistent with these hASM histochemical and biochemical results, mice treated with serotypes 1 and 8 demonstrated a marked reduction in cholesterol storage pathology. Mice treated with serotypes 2, 5, & 7 also showed a reduction in cholesterol storage pathology, but not to the same extent as mice treated with serotypes 1 & 8.

Therapeutically Relevant Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS).

[0125] Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that is characterized by a selective loss of motor neurons in the cortex, brain stem and spinal cord. Progression of the disease can lead to atrophy of limb, axial and respiratory muscles. Motor neuron cell death is accompanied by reactive gliosis, neurofilament abnormalities, and a significant loss of large myelinated fibers in the corticospinal tracts and ventral roots¹⁻⁶. Although the etiology of ALS is poorly understood, accumulating evidence indicates that sporadic (SALS) and familial (FALS) ALS share many similar pathological features; thus, providing a hope that the study of either form will lead to a

common treatment ⁷. FALS accounts for approximately 10% of diagnosed cases, of which 20% are associated with dominantly inherited mutations in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) ⁸. Transgenic mice that express the mutant human SOD1 protein (e.g., SOD1^{G93A} mice) recapitulate many pathological features of ALS and are an available animal model to study ALS ⁹. For SALS, a myriad of pathological mechanisms have been implicated as the underlying cause, including glutamate induced excitotoxicity, toxin exposure, proteasome dysfunction, mitochondrial damage, neurofilament disorganization and loss of neurotrophic support ^{10,11}.

[0126] To date there is no effective therapy for the treatment of ALS. Neurotrophic factors such as insulin growth factor I (IGF-1) have been investigated extensively for their potential usefulness in the treatment of ALS. Intracranial delivery of viral vectors (that are capable of axonal transport) to regions of the CNS that are interconnected with brainstem and spinal motor neurons provides a means of administering potential therapeutics, such as IGF-1, to areas that would otherwise be difficult to target through prior art means.

[0127] Without being limited as to theory, it is may be that these targeted regions will not necessarily need to have direct connections with motor neurons; that is, it may be sufficient for these targeted regions to have direct connections with cells (e.g., interneurons and astrocytes) that merely compose the motor neuron's cellular environment. This supposition is supported by studies in chimeric mice that are mixtures of normal and SOD1 mutant-expressing cells. These experiments showed that non-neuronal cells that did not express mutant SOD1 delayed degeneration and significantly extend survival of mutant-expressing motor neurons ¹³. Furthermore, additional experiments have demonstrated that cells that make up the cellular environment of a motor neuron (e.g., astrocytes and microglia) are important sources of neurotrophic factors, and damage to these cells (as occurs pathologically in ALS) has been suggested to be one of the underlying factors that contributes to motor neuron degeneration ¹¹.

[0128] A region of the CNS that is likely to support the transport of a therapeutic viral vector and/or expressed protein to the cellular environment of motor neurons is the deep cerebellar nuclei (DCN) of the cerebellum. The DCN has extensive afferent and efferent connections both with the brainstem and spinal cord (see figure 1) ¹⁴⁻¹⁹. Targeting the DCN in a mouse model of neurometabolic disease with viral vectors capable of axonal transport resulted in detection of transgene protein in both the brain stem and spinal cord ²⁰. Interestingly transgene protein was detected in cells that were both positive and negative for choline acetyltransferase (ChAT), a motor neuron marker.

[0129] Overexpression of superoxide dismutase-1 (SOD1) gene mutations in mice and rats recapitulates the clinical and pathological characteristics of ALS in humans. Compounds active in retarding symptoms in this model have been shown to be predictive for clinical efficacy in patients with ALS, and therefore is a therapeutically relevant model of this disease. Such mouse models have been previously described in Tu et al. (1996) P.N.A.S. **93**:3155-3160; Kaspar et al. (2003) Science **301**:839-842; Roaul et al. (2005) Nat. Med. **11**(4):423-428 and Ralph et al. (2005) Nat. Med. **11**(4):429-433.

[0130] The current experiments, therefore, sought to investigate the influence of bilateral DCN delivery of AAV-IGF-1 on disease progression in symptomatic (i.e., 90 day old) SOD1^{G93A} mice. Specifically, the primary goals were to determine if delivery of AAV-IGF-1 resulted in (1) vector and/or protein delivery to the brainstem and spinal cord; (2) a reduction in neuropathology in the brainstem and spinal cord; (3) improvement in motor behavioral function; and (4) a significant extension of lifespan. The results indicate that injection of viral vectors to regions of the CNS that are interconnected with the brainstem and spinal cord is a viable approach for delivering potential therapeutic transgenes to the brainstem and spinal cord. Moreover, our results support the development of therapies that are designed to treat motor neuron degeneration through modification of their cellular environment.

[0131] Two studies were performed in the G93A SOD1 (SOD1^{G93A} mutant mouse, referred to here as the SOD1 mouse). This model closely mimics human ALS. There is progressive motor neuron degeneration with hindlimb motor deficits appearing around 90 days of age in the mouse. Death occurs around days 120-122. Each study had four treatment groups: 1) mice received AAV serotype 1 encoding for IGF-1 (AAV1-IGF-1); 2) mice received AAV serotype 1 encoding for green fluorescent protein (AAV1-GFP); 3) mice received AAV serotype 2 encoding for IGF-1 (AAV2-IGF-1); and 4) mice received AAV serotype 2 encoding for green fluorescent protein (AAV2-GFP).

[0132] Without being limited as to theory, IGF-1 is a therapeutic protein for the treatment of ALS due to its many actions at different levels of neuraxis (see Dore et al., Trends Neurosci, 1997, 20:326-331). In the brain: It is thought to reduce both neuronal and glial apoptosis, protect neurons against toxicity induced by iron, colchicine, calcium destabilizers, peroxides, and cytokines. It also is thought to modulate the release of neurotransmitters acetylcholine and glutamate. It is also thought to induce the expression of neurofilament, tubulin, and myelin basic protein. In the spinal cord: IGF-1 is thought to modulate ChAT activity and attenuate loss of cholinergic phenotype, enhance motor neuron sprouting, increase myelination, inhibit demyelination, stimulate motor neuron proliferation and differentiation from precursor cells, and promote Schwann cell division, maturation, and growth. In the muscle: IGF-1 is thought to induce acetylcholine receptor cluster formation at the neuromuscular junction and increase neuromuscular function and muscle strength. In this experiment, the IGF-1Ea form of the protein was utilized.

[0133] Green fluorescent protein was utilized as a control protein, which also enabled the visualization of expression mediated by the injection of the AAV vectors.

[0134] Ninety days after birth, SOD1 mice were injected bilaterally into the DCN with the AAV recombinant vectors. In one study, the dose was approximately 2.0 e10 gc/ml injected per site. Certain mice were sacrificed about 110 days after

birth and their brain and spinal cord were analyzed for GFP staining, IGF-1 expression via immunohistochemistry, IGF-1 expression via ELISA, IGF-1 expression via RT-PCR, ChAT localization via immunohistochemistry, glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression, motor neuron counts, functional testing (rocking and accelerating) on the rotarod as described above, grip strength of both the forelimb and hindlimb using a grip strength meter, and survival.

[0135] A "death event" was entered when animals could no longer "right" themselves within 30 seconds after the animal was placed on its back, or animals were found dead by animal care technicians. "Death event" classification was performed by 2 individuals with the animal's group (GFP vs. IGF-1 being blinded) at time of assessment.

[0136] GFP was detected in the brainstem and throughout each division of the spinal cord following bilateral delivery of a GFP expressing AAV vector to the deep cerebellar nuclei (DCN) (see Figures 13 and 14). Figure 22 shows GFP distribution within the mouse brain. In addition to the DCN, GFP positive staining was also observed in the olfactory bulbs, cerebral cortex, thalamus, brainstem, cerebellar cortex and spinal cord. All of these areas either receive projections from and/or send projections to the DCN. In addition, GFP positive fibers and/or cells were observed in proximity to ChAT positive cells.

[0137] IGF-1 mRNA was detected in the brainstem and in each division of the spinal cord in mice treated with AAV1-IGF-1 or AAV2-IGF-1 demonstrating that the vector underwent retrograde transport (see Figure 18). IGF-1 protein was detected in the brainstem and the spinal cord in mice treated with AAV1-IGF-1 or AAV2-IGF-1. A reduction in GFAP staining in the oromotor nuclei (for example, the motor trigeminal nucleus, facial nucleus, and hypoglossal nucleus) and in each division of the spinal cord was observed in mice treated with AAV1-IGF-1 or AAV2-IGF-1 (see Figures 15-17). GFAP is a marker of gliosis, which is a pathological hallmark of ALS. Delivery of AAV1-IGF-1 or AAV2-IGF1 led to significant functional improvement on the rotarod and grip strength tasks (see

Figure 20). Delivery of AAV-IGF-1 AAV2-IGF1 also significantly extended the lifespan of the SOD1 mouse (see Figure 21 where median survival increased to 133.5 or 134 days in AAV-IGF-1 treated mice as compared to 121 or 120 days in AAV-GFP treated mice). Figure 19 illustrates that DCN delivery of AAV-IGF-1 promoted the survival of motor neurons. The difference between mice treated with AAV encoding for IGF-1 as compared to DCN delivery of AAV encoding for GFP is statistically significant to a p-value = 0.01 as indicated by the asterik.

[0138] Regardless of serotype, AAV-IGF-1 treatment significantly promoted motor neuron survival, improved motor performance in both rotarod and grip strength tests, and significantly extended lifespan. IGF-1 expression was detected throughout the brainstem and spinal cord using PCR and ELISA.

[0139] The specification is most thoroughly understood in light of the teachings of the references cited within the specification. The embodiments within the specification provide an illustration of embodiments of the invention and should not be construed to limit the scope of the invention. The skilled artisan readily recognizes that many other embodiments are encompassed by the invention. All publications, patents, and biological sequences cited in this disclosure are incorporated by reference in their entirety. To the extent the material incorporated by reference contradicts or is inconsistent with the present specification, the present specification will supercede any such material. The citation of any references herein is not an admission that such references are prior art to the present invention.

[0140] Unless otherwise indicated, all numbers expressing quantities of ingredients, cell culture, treatment conditions, and so forth used in the specification, including claims, are to be understood as being modified in all instances by the term "about." Accordingly, unless otherwise indicated to the contrary, the numerical parameters are approximations and may vary depending upon the desired properties sought to be obtained by the present invention. Unless otherwise indicated, the term "at least" preceding a series of elements is to be understood to refer to every element in the series. Those skilled in the art

will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

References

1. Leigh, P.N. & Swash, M. Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neurol* **56**, 115-24 (1991).
2. Carpenter, S. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease *Neurology* **18** 841-51 (1968).
3. Gonatas, N.K. et al. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* **140**, 731-7 (1992).
4. Hirano, A. et al. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**, 471-80 (1984).
5. Leigh, P.N. et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* **114** (Pt 2), 775-88 (1991).
6. Delisle, M.B. & Carpenter, S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **63**, 241-50 (1984).
7. Hirano, A. Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology* **47**, S63-6 (1996).
8. Rosen, D.R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62 (1993).
9. Gurney, M.E. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-5 (1994).
10. Rowland, L.P. & Shneider, N.A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **344**, 1688-700 (2001).
11. Bruijn, L.I., Miller, T.M. & Cleveland, D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* **27**, 723-49 (2004).
12. Cleveland, D.W. & Rothstein, J.D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* **2**, 806-19 (2001).
13. Lindsay, R.M. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* **15**, 249-51 (1994).
14. Kaspar, B.K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J.D. & Gage, F.H. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* **301**, 839-42 (2003).
15. Clement, A.M. et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* **302**, 113-7 (2003).
16. Matsushita, M. Projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* **404**, 21-32 (1999).
17. Matsushita, M. & Gao, X. Projections from the thoracic cord to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* **386**, 409-21 (1997).
18. Matsushita, M. & Xiong, G. Projections from the cervical enlargement to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* **377**, 251-61 (1997).

19. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Afferents to the cerebellar nuclei from the cervical enlargement in the rat, as demonstrated with the Phaseolus vulgaris leucoagglutinin method. *Neurosci Lett* **113**, 253-9 (1990).
20. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Projections from the central cervical nucleus to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* **353**, 234-46 (1995); Voogd, J. The cerebellar nuclei and their efferent pathways. in *The rat nervous system* (ed. Paxinos, G.) 208-215 (Elsevier Academic Press, San Diego, 2004).

CLAIMS

1. A method comprising administering a recombinant neurotropic viral vector comprising a transgene to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the brain, wherein said administration is under conditions that favor the delivery of the transgene product to the spinal cord and/or brainstem.
2. A method comprising administering a recombinant neurotropic viral vector comprising a transgene to the motor cortex region of the brain, wherein said administration is under conditions that favor the delivery of the transgene product to the spinal cord.
3. A method to deliver a transgene to a motor neuron in a subject, comprising administering a recombinant neurotropic viral vector comprising said transgene to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the brain, wherein said transgene is expressed in or delivered to a motor neuron distal to said site of administration.
4. A method to deliver a transgene to a motor neuron in a subject, comprising administering a neurotropic viral vector comprising said transgene to the motor cortex region of the brain, wherein said transgene is expressed in or delivered to a motor neuron distal to said site of administration.
5. A method to treat a motor neuron disorder in a subject, comprising administering a recombinant neurotropic viral vector comprising a therapeutic transgene to at least one region of the deep cerebellar nuclei region of the brain, wherein the transgene product is delivered in a therapeutically effective amount to at least one subdivision of the spinal cord and/or at least one division of the brainstem.
6. A method to ameliorate the symptoms of a motor neuron disorder in a subject, comprising administering a recombinant neurotropic viral vector comprising a therapeutic transgene to the motor cortex region of the brain,

wherein the transgene product is delivered in a therapeutically effective amount to at least one subdivision of the spinal cord.

7. The method of any one of claims 1 to 6, wherein said neurotropic viral vector is an adeno-associated viral vector (AAV).

8. The method of any one of claims 1 to 6, wherein said neurotropic viral vector is an adeno-associated viral vector, selected from a group consisting of AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, and AAV8.

9. The method of any one of claims 1, 3 or 5, wherein said region of the deep cerebellar nuclei region of the brain is selected from the group consisting of the medial region, interposed region and the lateral region.

10. The method of any one of claims 1 to 6, wherein said delivery is bilateral.

11. The method of claims 5 or 6, wherein said spinal cord subdivision is selected from the group consisting of the cervical subdivision, the thoracic subdivision, the lumbar subdivision, and the sacral subdivision.

12. The method of claims 5 or 6, wherein said transgene is delivered to all subdivisions of the spinal cord.

13. The method of claim 12, wherein at least one of said multiple administrations is bilateral.

14. The method of any one of claims 1 to 6, wherein said transgene is selected from the group consisting of insulin growth factor-1 (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alpha, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2 and CNTF (Ciliary neurotrophic factor).

15. The method of claim 6, wherein expression of said transgene alleviates the symptoms of a motor neuronal disorder selected from the group consisting of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), primary lateral sclerosis (PLS), spinal

bulbar muscular atrophy, spinal cerebellar ataxia, spinal muscular atrophy, and traumatic spinal cord injury.

16. The method of any one of claims 1 to 6, wherein said subject is a human patient.

17. The method of any one of claims 1 to 6, wherein said transgene expresses a therapeutic amount of a protein selected from the group consisting of insulin growth factor-1 (IGF-1), EPO (erythropoietin), CBP (cAMP response element binding protein [CREB] binding protein), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alpha, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2 and CNTF (Ciliary neurotrophic factor).

(57) Abstract: This disclosure provides methods and compositions for treating disorders or injuries that affect motor function and control in a subject. In one aspect, the invention provides a method to deliver a transgene to a subject's spinal cord by administering a recombinant neurotropic viral vector containing the transgene. The viral vector delivers the transgene to a region of the deep cerebellar nuclei region of the brain. Also provided are compositions and methods to deliver a transgene to a subject's spinal cord by administering a recombinant neurotropic viral vector containing the transgene to the motor cortex region of the subject's brain.

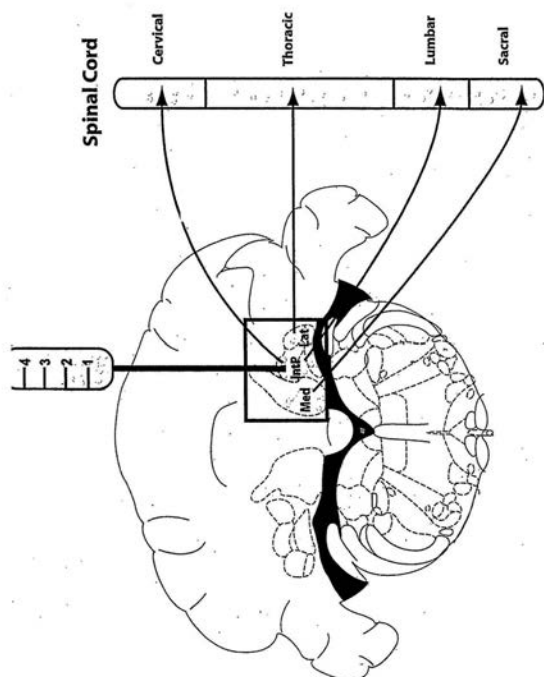


FIGURE 1

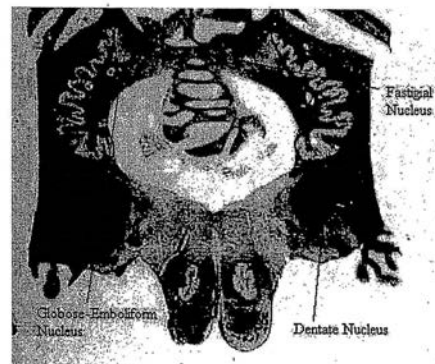


FIGURE 2

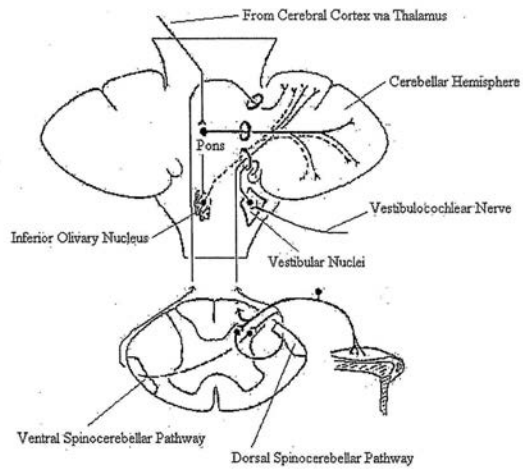


FIGURE 3

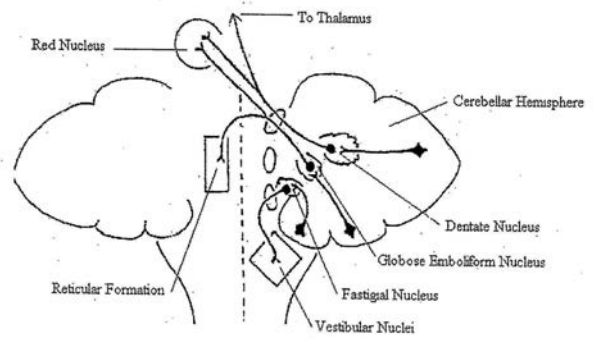


FIGURE 4

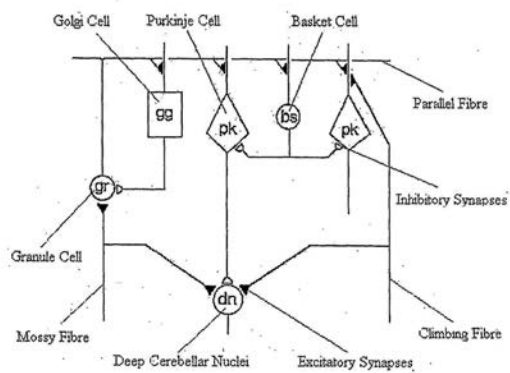


FIGURE 5

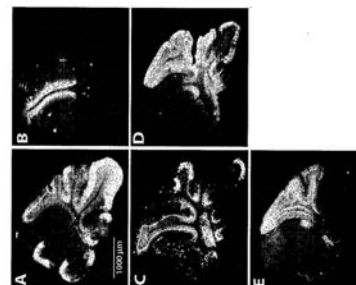


Figure 6

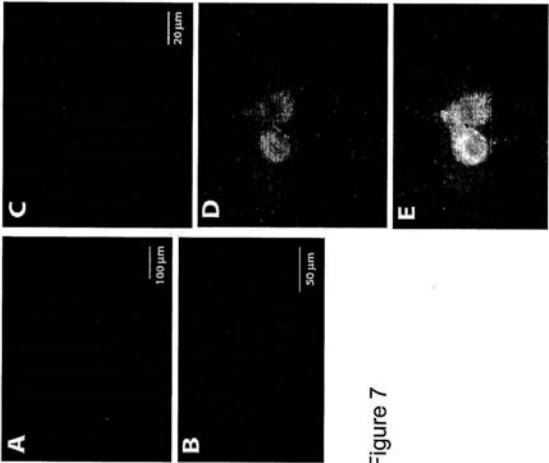


Figure 7

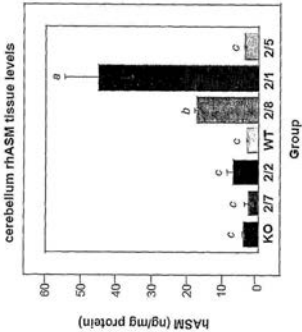


FIGURE 8

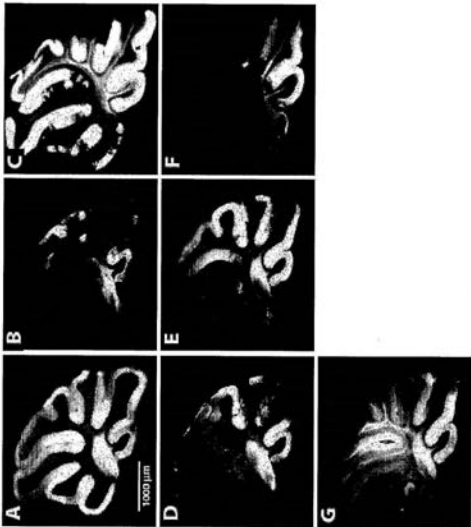


Figure 9

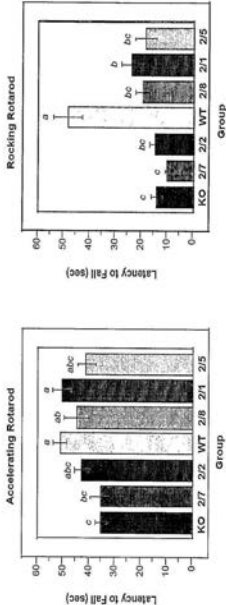


FIGURE 10

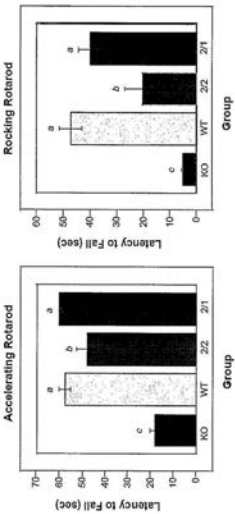


FIGURE 11

Figure 6

Figure 12A

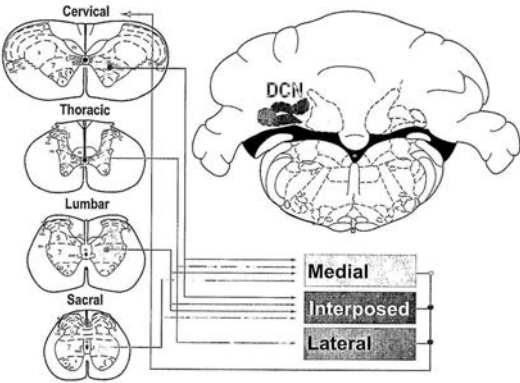


Figure 12B

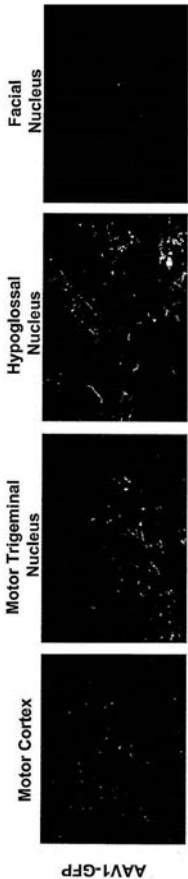
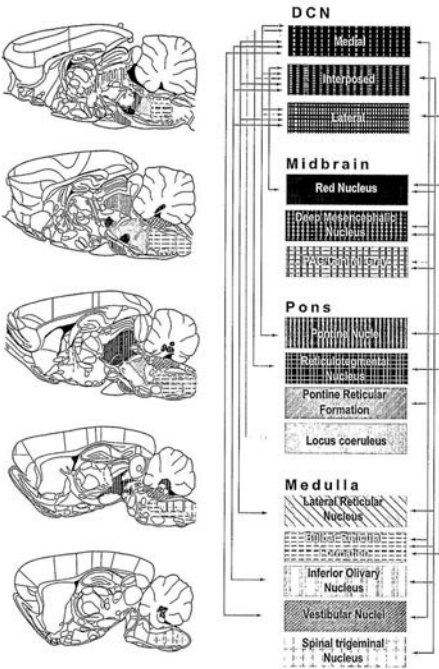


Figure 13

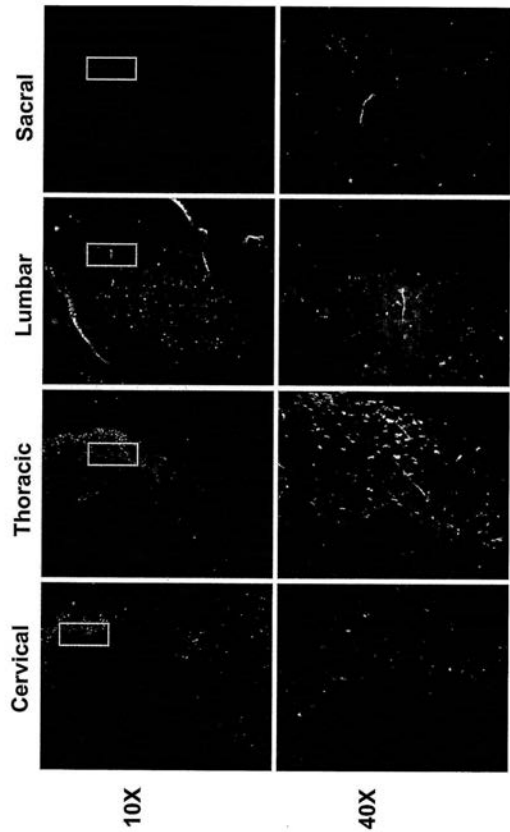


Figure 14

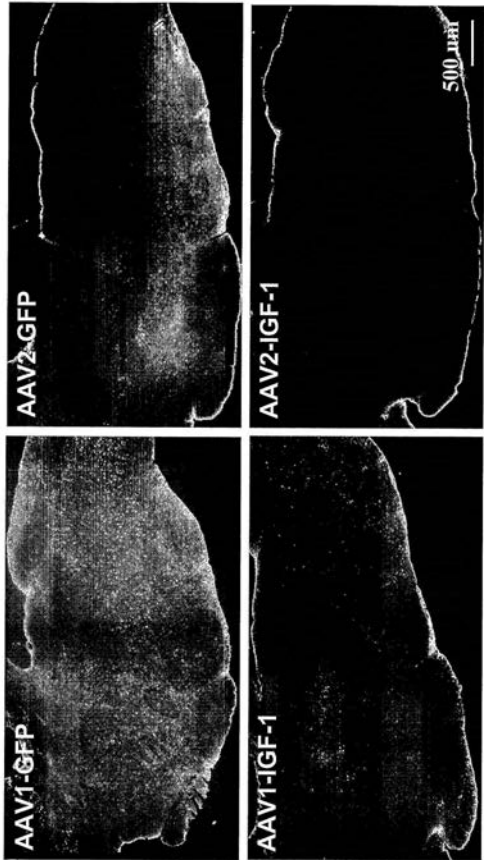


Figure 15

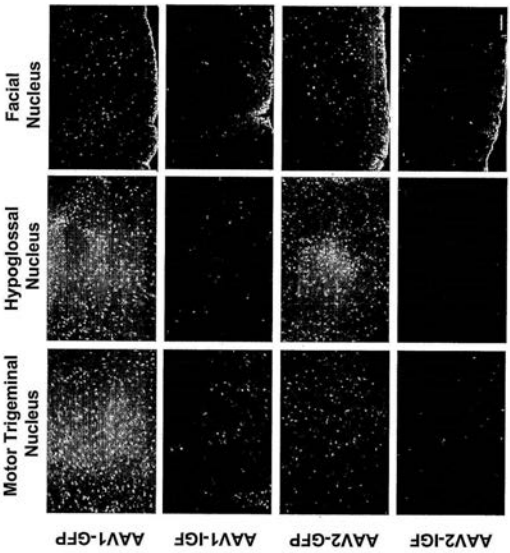


Figure 16

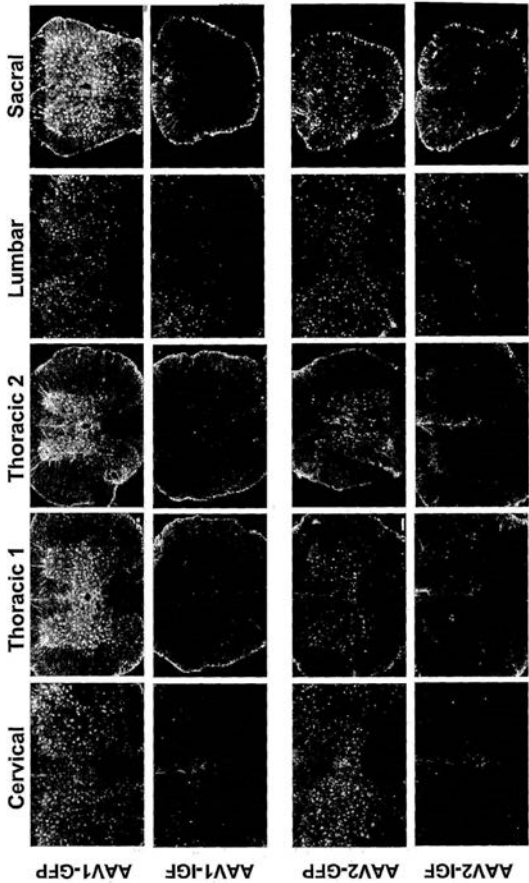


Figure 17

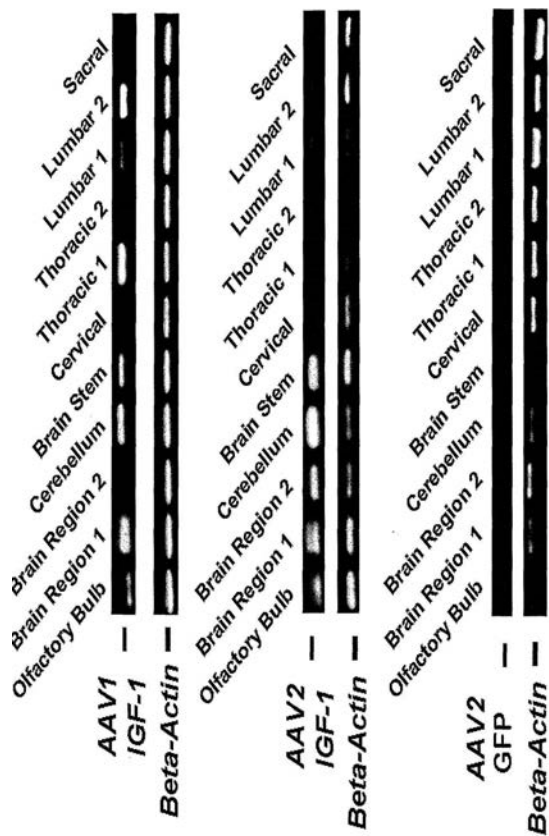


Figure 18

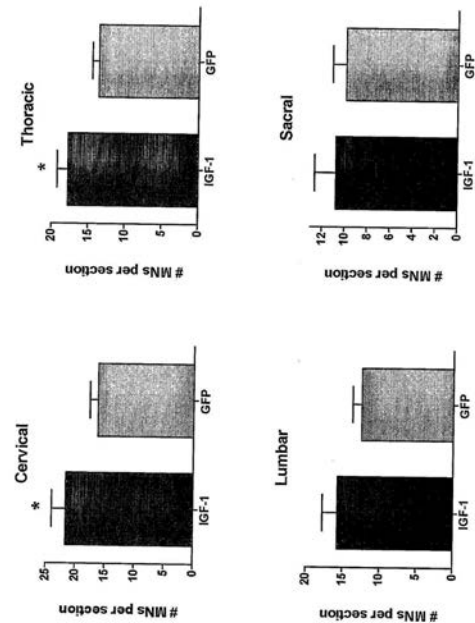


Figure 19

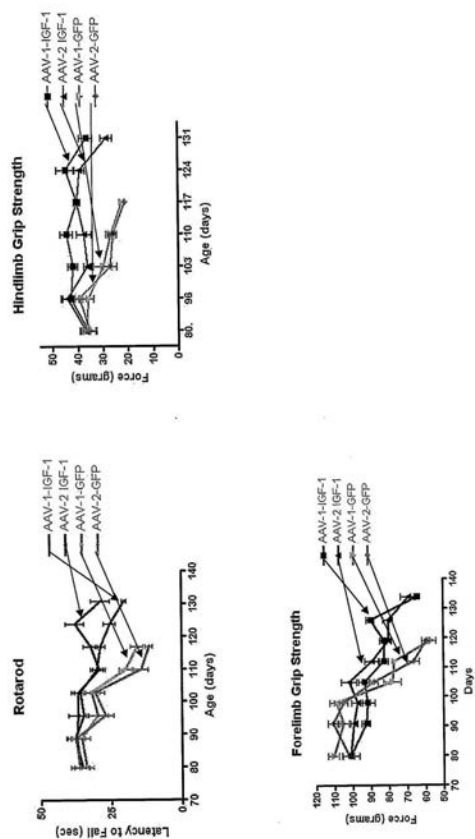


Figure 20

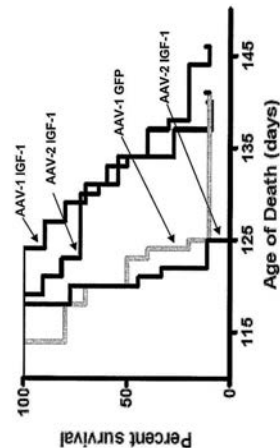


Figure 21

Median Survival
AAV1-GFP: 121 days
AAV2-GFP: 120 days
AAV1-IGF-1: 133.5 days
AAV2-IGF-1: 134 days

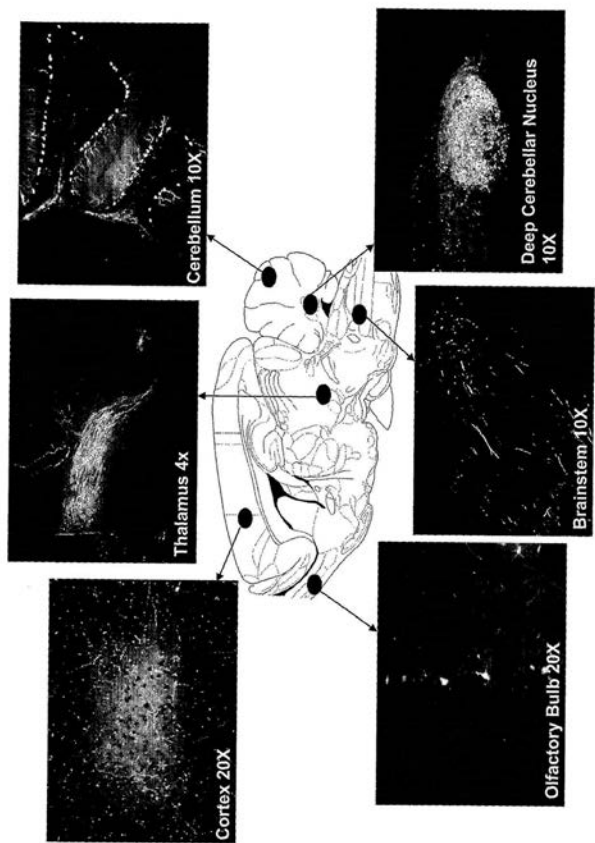


Figure 22

【配列表】

2017132774000002.app