

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7235676号

(P7235676)

(45)発行日 令和5年3月8日(2023.3.8)

(24)登録日 令和5年2月28日(2023.2.28)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 14/47

Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 45 (全36頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-558745(P2019-558745)

(86)(22)出願日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(65)公表番号 特表2020-519251(P2020-519251  
A)

(43)公表日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/033247

(87)国際公開番号 WO2018/213618

(87)国際公開日 平成30年11月22日(2018.11.22)

審査請求日 令和3年5月12日(2021.5.12)

(31)優先権主張番号 62/507,358

(32)優先日 平成29年5月17日(2017.5.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 592017633

ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ  
ション  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
ストン フルーツ ストリート 5 5

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 結節性硬化症の遺伝子治療

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

N末端にハマルチン結合領域およびC末端にGTPase活性化タンパク質(GAP)領域を含み、Aktリン酸化部位Thr 1462を含めて、ヒトツペリン(SEQ ID NO:10)のアミノ酸451~1514を欠失している、凝縮ツペリン(cツペリン)。

## 【請求項 2】

前記ハマルチン結合領域が、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項1記載のcツペリン。

## 【請求項 3】

前記ハマルチン結合領域がSEQ ID NO:2である、請求項2記載のcツペリン。

10

## 【請求項 4】

前記GAP領域が、SEQ ID NO:3に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項1~3のいずれか一項記載のcツペリン。

## 【請求項 5】

前記GAP領域がSEQ ID NO:3である、請求項4記載のcツペリン。

## 【請求項 6】

前記ハマルチン結合領域とGAP領域との間にスペーサーを含む、請求項1~5のいずれか一項記載のcツペリン。

## 【請求項 7】

前記スペーサーが少なくともSGGGを含む、請求項6記載のcツペリン。

20

## 【請求項 8】

前記スパーサーがSEQ ID NO:4である、請求項7記載のcツペリン。

## 【請求項 9】

SEQ ID NO:1に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項1～8のいずれか一項記載のcツペリン。

## 【請求項 10】

SEQ ID NO:1である、請求項1記載のcツペリン。

## 【請求項 11】

請求項1～10のいずれか一項記載のcツペリンをコードする核酸分子。

## 【請求項 12】

ヒト細胞での発現用にコドン最適化されている、請求項11記載の核酸分子。

## 【請求項 13】

調節制御配列に機能的に連結されている、請求項12記載の核酸分子。

## 【請求項 14】

前記調節制御配列が、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ニワトリ - アクチン（CBA）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、またはグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーターを含む、請求項13記載の核酸分子。

## 【請求項 15】

前記調節制御配列が、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーターおよびウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む、請求項14記載の核酸分子。

## 【請求項 16】

前記細胞が、脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞である、請求項12～15のいずれか一項記載の核酸分子。

## 【請求項 17】

SEQ ID NO:5に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項11～16のいずれか一項記載の核酸分子。

## 【請求項 18】

SEQ ID NO:5である、請求項17記載の核酸分子。

## 【請求項 19】

発現カセットに機能的に連結されている、請求項11～18のいずれか一項記載の核酸分子。

## 【請求項 20】

請求項11～19のいずれか一項記載の核酸分子を含む、細胞またはウイルス。

## 【請求項 21】

請求項11～19のいずれか一項記載の核酸分子を含む、組成物。

## 【請求項 22】

組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）であって、  
前記rAAVが、AAVカプシドおよびその中にパッケージングされたAAVゲノムを含み、  
前記AAVゲノムが、  
N末端にハマルチン結合領域およびC末端にGAP領域を含み、Aktリン酸化部位Thr 1462を含めて、ヒトツペリン（SEQ ID NO:10）のアミノ酸451～1514を欠失している、cツペリンを発現可能である、核酸分子  
を含む、前記rAAV。

## 【請求項 23】

前記AAVカプシドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12カプシド、またはこれらのAAVカプシドの

10

20

30

40

50

いずれか1つの変異体である、請求項22記載のrAAV。

【請求項24】

前記核酸が調節制御配列に機能的に連結されている、請求項22～23のいずれか一項記載のrAAV。

【請求項25】

前記調節制御配列が、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ニワトリ - アクチン（CBA）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、またはグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーターを含む、請求項22～24のいずれか一項記載のrAAV。

10

【請求項26】

前記核酸分子がITRを含む、請求項22～25のいずれか一項記載のrAAV。

【請求項27】

前記核酸分子がポリAを含む、請求項22～26のいずれか一項記載のrAAV。

【請求項28】

前記核酸分子がSEQ ID NO:5である、請求項22記載のrAAV。

【請求項29】

請求項22～28のいずれか一項記載のrAAVおよび薬学的に許容される担体を含む、組成物。

20

【請求項30】

請求項1～10のいずれか一項記載のcツペリンを含む、結節性硬化症（TSC）を有する患者を治療するための医薬。

【請求項31】

請求項11～19のいずれか一項記載の核酸分子を含む、結節性硬化症（TSC）を有する患者を治療するための医薬。

【請求項32】

請求項22～26のいずれか一項記載のrAAVを含む、結節性硬化症（TSC）を有する患者を治療するための医薬。

【請求項33】

請求項11～19のいずれか一項記載の核酸分子を含む細胞外小胞（EV）を含む、結節性硬化症（TSC）を有する患者を治療するための医薬。

30

【請求項34】

血管内に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項30～33のいずれか一項記載の医薬。

【請求項35】

腎動脈または腎静脈に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項34記載の医薬。

【請求項36】

肺に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項30～33のいずれか一項記載の医薬。

40

【請求項37】

脳内に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項30～33のいずれか一項記載の医薬。

【請求項38】

髄腔内に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項30～33のいずれか一項記載の医薬。

【請求項39】

前記患者が腎血管筋脂肪腫を有する、請求項30～38のいずれか一項記載の医薬。

【請求項40】

50

前記患者がリンパ脈管筋腫症（LAM）を有する、請求項30～38のいずれか一項記載の医薬。

【請求項41】

前記患者が脳機能障害を有する、請求項30～38のいずれか一項記載の医薬。

【請求項42】

腎血管筋脂肪腫、LAM、または脳に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項30～33のいずれか一項記載の医薬。

【請求項43】

脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項32記載の医薬。

【請求項44】

血管内、静脈内、脳内、脳室内、髄腔内、または皮膚に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項32記載の医薬。

【請求項45】

ラパマイシンと組み合わせて用いられることを特徴とする、請求項30～44のいずれか一項記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する声明

本発明は、国防総省により授与された助成金番号TS120038に基づく政府支援を受けて実施された。政府は本発明において、ある一定の権利を有する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年5月17日出願の米国仮出願第62/507,358号に対する優先権を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0003】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に組み入れられる配列表を含む。2018年5月15日に作成された上記ASCIIコピーは、51317-002WO2\_Sequence\_Listing\_5.15.18\_ST25という名称であり、サイズは55,672バイトである。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

結節性硬化症（TSC）は、5,500人に約1人の率で発生する、常染色体優性遺伝である腫瘍抑制症候群である。患者は、（ハマルチンをコードする）TSC1遺伝子または（ツペリンをコードする）TSC2遺伝子のいずれか1つの対立遺伝子の変異を継承する。これらのタンパク質は協働して、哺乳動物ラパマイシン標的タンパク質複合体1（mTORC1）活性を抑制する。発生期に、または一部の体細胞において、対応する正常な対立遺伝子に変異が発生すると、細胞の拡大および増殖増加を引き起こし、良性腫瘍（例えば過誤腫）が形成される。脳、心臓、腎臓、皮膚、および肺などの様々な組織が、このような腫瘍に罹患する可能性がある。脳の場合、発達遅延、自閉症、てんかん、および水頭症を引き起こす可能性がある。命にかかわるTSCの病態としては、内出血を引き起こす可能性のある腎血管筋脂肪腫、および呼吸障害のおそれのあるリンパ脈管筋腫症（LAM）が含まれる。ラパマイシンおよび関連薬は数種の腫瘍の病変の大きさを縮小するのに効果的であったが、これらは継続的に投与する必要がある、かつ脳の発達障害および免疫抑制を含む、副作用がある。加えて、患者によってはこれらの薬剤に反応しないか、または当初は反応するが、その後は抵抗性になる。したがって、TSCの治療改善が当技術分野において必要とされている。

【発明の概要】

## 【 0 0 0 5 】

本発明は、TSC2遺伝子の変異によって引き起こされる結節性硬化症（TSC）を治療するための組成物および方法を提供する。本明細書に記載の組成物および方法は、凝縮ツペリン（cツペリン）、およびcツペリンをコードする核酸分子に関する。

## 【 0 0 0 6 】

第1の局面では、本発明は、ハマルチン結合領域およびGTPase活性化タンパク質（GAP）領域を含むがAktリン酸化部位Thr 1462を欠失している、cツペリンを特徴とする。

## 【 0 0 0 7 】

いくつかの態様では、cツペリンは、SEQ ID NO:1に対して、少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有する。特定の態様では、cツペリンはSEQ ID NO:1である。

10

## 【 0 0 0 8 】

いくつかの態様では、ハマルチン結合領域は、SEQ ID NO:2に対して、少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有する。特定の態様では、ハマルチン結合領域はSEQ ID NO:2である。

## 【 0 0 0 9 】

いくつかの態様では、GAP領域は、SEQ ID NO:3に対して、少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有する。特定の態様では、GAP領域はSEQ ID NO:3である。

20

## 【 0 0 1 0 】

操作されたcツペリンはさらに、ヒトツペリン（SEQ ID NO:10）のAktリン酸化部位を欠失している。特定の態様では、cツペリンは、ヒトツペリンのThr 1462のAktリン酸化部位を含む、ヒトツペリン（SEQ ID NO:10）のアミノ酸451～1514を欠失している。

## 【 0 0 1 1 】

さらに他の態様では、cツペリンは、ハマルチン結合領域とGAP領域との間にスペーサーを含む。いくつかの態様では、スペーサーは少なくともSGGGを含む。例示的なスペーサーは、SGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 4)

30

である。

## 【 0 0 1 2 】

さらに他の態様では、cツペリンは、本明細書に開示されるようなヒトツペリンアイソフォームを使用して作製される。

## 【 0 0 1 3 】

第2の局面では、本発明は、前述の態様のいずれかのcツペリンをコードする核酸分子を特徴とする。

## 【 0 0 1 4 】

他の態様では、核酸分子は、ヒト細胞（例えば、脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞）での発現用にコドン最適化されている。

40

## 【 0 0 1 5 】

いくつかの態様では、核酸分子は調節制御配列に機能的に連結される。例示的な調節制御配列としては、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ニワトリ - アクチン（CBA）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター / エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー / CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、またはグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーターが挙げられるが、それに限定されるわけではない。一実施例において、調節制御配列は、CMV最初期遺伝子エンハンサー / CBAプロモーターおよびウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む。

50

## 【 0 0 1 6 】

他の態様では、核酸分子は、SEQ ID NO:5に対して、少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有する。特定の態様では、核酸分子はSEQ ID NO:5である。

## 【 0 0 1 7 】

いくつかの態様では、核酸分子は発現カセットに機能的に連結される。

## 【 0 0 1 8 】

第3の局面では、本発明は、前述の態様のいずれかの核酸分子を含む細胞またはウイルスを特徴とする。

## 【 0 0 1 9 】

第4の局面では、本発明は、前述の態様のいずれかの核酸分子を含む組成物を特徴とする。

## 【 0 0 2 0 】

第5の局面では、本発明は組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）を特徴とする。そのようなrAAVは、AAVカプシドおよびその中にパッケージングされたAAVゲノムを含み、AAVゲノムは、cツペリンを発現可能な核酸分子を含む。例えば、rAAVは、AAVカプシドおよびその中にパッケージングされたAAVゲノムを含み、AAVゲノムは、（a）AAV 5' 逆方向末端反復（ITR）配列；（b）調節制御配列；（c）cツペリンをコードする核酸分子；および（d）AAV 3' ITR配列を含む。別の例では、cツペリンはハマルチン結合領域およびGAP領域を含むが、Aktリン酸化部位Thr 1462を欠失している。

## 【 0 0 2 1 】

いくつかの態様では、AAVカプシドは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12カプシド、またはこれらのAAVカプシドのいずれか1つの変異体である。

## 【 0 0 2 2 】

他の態様では、核酸分子は、ヒト細胞での発現用にコドン最適化されている。さらなる態様では、核酸分子は、SEQ ID NO:5に対して少なくとも90%の配列同一性を有する。特定の態様では、核酸分子はSEQ ID NO:5である。

## 【 0 0 2 3 】

他の態様では、核酸は調節制御配列に機能的に連結される。例示的な調節制御配列としては、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ニワトリ  $\beta$ -アクチン（CBA）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、またはグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーターが挙げられるが、それに限定されるわけではない。

## 【 0 0 2 4 】

いくつかの態様では、核酸分子は逆方向末端反復（ITR）を含む。いくつかの態様では、核酸分子は、ポリA領域などのポリアデニル化シグナルを含む。

## 【 0 0 2 5 】

第6の局面では、本発明は、前述の態様のいずれか1つのrAAVと、薬学的に許容される担体とを含む組成物を特徴とする。

## 【 0 0 2 6 】

第7の局面では、本発明は、結節性硬化症（TSC）を有する患者を治療する方法を特徴とし、この方法は、ハマルチン結合領域およびGAP領域を含むがAktリン酸化部位Thr 1462を欠失しているcツペリンを患者に投与することを含む。

## 【 0 0 2 7 】

いくつかの態様では、cツペリンをコードする核酸分子を患者に投与する。

## 【 0 0 2 8 】

いくつかの態様では、前述の局面のいずれかのrAAVを患者に投与する。

10

20

30

40

50

## 【0029】

いくつかの態様では、前述の局面のいずれかの核酸分子を含む細胞外小胞（EV）を患者に投与する。

## 【0030】

いくつかの態様では、患者は腎血管筋脂肪腫を有する。いくつかの態様では、cツペリンは血管内に投与されるか、または腎動脈もしくは腎静脈に投与される。

## 【0031】

他の態様では、患者はリンパ脈管筋腫症（LAM）を有する。いくつかの態様では、cツペリンは血管内に投与されるか、または肺に投与される。

## 【0032】

さらに他の態様では、患者は脳機能障害を有する。いくつかの態様では、cツペリンは血管内、脳内、または髄腔内に投与される。

## 【0033】

いくつかの態様では、cツペリンは腎血管筋脂肪腫、LAM、または脳に投与される。

## 【0034】

いくつかの態様では、rAAVは、脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞に投与される。さらに他の態様では、rAAVは、血管内、静脈内、脳内、脳室内、髄腔内、または皮膚に投与される。

## 【0035】

いくつかの態様では、TSCの治療に使用される薬物をさらに患者に投与する。そのような薬物は、ラパマイシンまたはラパマイシン類似体であり得る。

## 【0036】

定義

本明細書で使用される場合、「投与すること」またはその文法的派生語は、少なくとも部分的に剤を所望の部位に局在化させる方法または経路により、本明細書で開示する剤を対象へ配置することを指す。

## 【0037】

本明細書で使用される場合、「コドン最適化」とは、コードされるアミノ酸に何らかの変化を生じさせずに、個々の核酸を変化させるように核酸配列を改変することを指す。このように改変される配列を、本明細書で「コドン最適化される」と称する。本明細書に記載する配列のいずれに対しても、このプロセスを行って、発現または安定性を高めることができる。コドン最適化は、例えば、米国特許第7,561,972号、同第7,561,973号、および同第7,888,112号に記載されているような方法で行うことができ、それぞれの全体が参照により本明細書に組み入れられる。翻訳開始部位の周辺配列を、公知の方法に従ってコンセンサスコザック配列に変換することができる。例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Kozak et al, Nucleic Acids Res. 15(20): 8125-8148 (1987)を参照のこと。

## 【0038】

本明細書で使用される場合、特定のタンパク質を「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に置かれたときに、インビトロまたはインビボで転写（DNAの場合）および翻訳（mRNAの場合）されてポリペプチドになる核酸分子であるが、当業者であれば、種々のポリヌクレオチド（例えば、RNA転写物が産物である場合、アンチセンスRNA、siRNA、リボザイム）がこの方式で機能しないことを容易に理解されよう。タンパク質産物（すなわち、RNA産物ではない）に関して、コード配列の境界は、5'（すなわちアミノ）末端の開始コドンと3'（すなわちカルボキシ）末端の翻訳終止コドンとによって決まる。遺伝子は、原核生物または真核生物のmRNA由来のcDNA、原核生物または真核生物のDNA由来のゲノムDNA配列、さらには合成DNA配列を含み得るが、それに限定されるわけではない。転写終結配列は通常、遺伝子配列の3'に位置する。さらに、「遺伝子」とは、（i）コード領域配列の転写を誘導するための、おそらくはエンハンサーを含む複数の調節エレメントを含むプロモーター領域で始まり；（ii）翻訳開始部位の上流に位置する転写開始部

10

20

30

40

50

位で始まって、終止コドンのかなり下流であり得る転写終結部位で終わる（通常、ポリ阿德ニル化シグナルが転写終結部位と結合し、転写終結部の上流に位置する）コード配列を含み；かつ（iii）発現を調節し、RNA転写物の安定性を改善するイントロンおよび他の調節配列を含み得る。さらに本発明によれば、「遺伝子」は、タンパク質をコードする配列を指す場合がある。

【0039】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、構造遺伝子がポリペプチドを産生する過程を指す。この過程は、mRNAへの遺伝子の転写、およびそのようなmRNAのポリペプチドへの翻訳を伴う。

【0040】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」とは、クローニングベクターと類似しているが、宿主に形質転換した後、クローニングされている遺伝子を発現することができるベクターまたは媒体である。クローニングされた遺伝子は、通常、プロモーター配列などの、ある特定の制御配列の制御下に置かれている（すなわち、機能的に連結されている）。発現制御配列は、ベクターが、機能的に連結された遺伝子を原核生物または真核生物の宿主で発現するように設計されているか否か、エンハンサーエレメント、終結配列、組織特異的エレメント、ならびに／または翻訳開始部位および終結部位などの転写エレメントをさらに含み得るかに応じて異なる。

【0041】

本明細書で使用される場合、本明細書で一般的に理解され使用される「核酸」または「核酸分子」とは、ホスホジエステル結合によって一つに結合され、核酸ヘテロポリマーを形成するヌクレオチド鎖を指す。核酸分子は、二本鎖であっても一本鎖であってもよく、cDNAもしくはゲノムDNAなどのデオキシリボヌクレオチド（DNA）分子であっても、リボヌクレオチド（RNA）分子であってもよい。したがって、核酸分子は、1つまたは複数のエクソンを含み得、必要に応じてイントロンを含む場合もあれば含まない場合もある。

【0042】

本明細書で使用される場合、「機能的に連結される」とは、第1分子が第2分子と結合されており、ここで第1分子が第2分子の機能に影響を及ぼすように分子が配置されていることを意味する。2つの分子は、単一の連続した分子の一部であってもなくてもよく、隣接していてもいなくてもよい。例えば、プロモーターが細胞内の対象となる転写可能なポリヌクレオチド分子の転写を調節する場合、プロモーターは転写可能なポリヌクレオチド分子に機能的に連結されている。加えて、一方の部分の転写活性化機能が他方の部分の存在によって悪影響を受けないように転写調節エレメントの2つの部分が結合されている場合、それらは互いに機能的に連結されている。2つの転写調節エレメントは、リンカー核酸（例えば、介在するノンコーディング核酸）によって互いに機能的に連結されていてもよく、介在するヌクレオチドなしに、互いが機能的に連結されていてもよい。

【0043】

本明細書で使用される場合、2つの配列間の「同一性パーセント」は、Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されているBLAST 2.0アルゴリズムによって決定する。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationにより公開されている。

【0044】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」とは、このような化合物、材料、組成物、および／または剤形が、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、および他の問題となる合併症を伴うことなく、哺乳動物（例えばヒト）などの対象の組織に接触させるのに適しており、妥当なベネフィット／リスク比に見合うことを意味する。

【0045】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本明細書で同義に使用され、アミノ酸のポリマーを意味する。ペプチドは比較的短いポリペプチドであり、典型的には約2～60アミノ酸長である。本明細書で使用される「ポリペプチド配列」

10

20

30

40

50



または「アミノ酸配列」という用語は、ポリペプチド材料自体、および／またはあるポリペプチドを生化学的に特徴づける配列情報（すなわち、アミノ酸名の略号として使用される一連の文字または3文字コード）を意味し得る。本明細書に示すポリペプチド配列は、特に指示がない限り、N末端からC末端方向に示される。

【0046】

本明細書で使用される場合、「調節制御エレメント」または「調節制御配列」とは、レシピエント細胞内でのコード配列の複製、転写、および翻訳を協働して供給する、プロモーター領域、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流制御ドメイン、複製起点、配列内リボソーム進入部位（「IRES」）、エンハンサー、および同様のものを総称する。選択したコード配列を適切な宿主細胞において複製、転写、および翻訳できる限り、これらの制御エレメントが必ずしも存在している必要はない。

10

【0047】

本明細書で使用される場合、「組換えウイルス」とは、（例えば、粒子への異種核酸構築物の付加または挿入によって）遺伝的に改変されたウイルスを意味する。

【0048】

本明細書で使用される場合、用語「対象」および「患者」は同義に使用され、本明細書に記載の特定の疾患または病態の治療を受ける生物を指す。

【0049】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」、「治療すること」、または「改善」は、疾患、障害、または医学的病態に関して使用され、病態に対する治療的処置を意味し、症状または病態の進行または重度を後退、緩和、改善、阻害、緩徐化、または停止することを目的とするものである。用語「治療すること」は、病態の少なくとも1つの有害作用または症状を軽減または緩和することを含む。治療は一般に、1つまたは複数の症状または臨床マーカーが減る場合に「有効」である。あるいは、治療は疾患状態の進行が減速するまたは停止する場合に「有効」である。すなわち、「治療」は、単に症状またはマーカーの改善にとどまらず、治療しない場合に予測される症状の進行もしくは悪化を停止するか、または少なくとも緩徐化することを含む。例えば、腎血管筋脂肪腫の場合、腫瘍サイズをMRIで監視でき、ツベルリン機能の置き換えによる細胞サイズの縮小を、標準手順（例えば、ラパマイシンを使用したTSC治療の監視に使用されるものなど）に従って明らかにすることができる。

20

30

【0050】

有益なまたは望ましい臨床結果として、1つまたは複数の症状の緩和、欠損範囲の減少、結節性硬化症の進行状態の安定化（すなわち、悪化させない）、腫瘍または過誤腫の侵襲性または成長の遅延化または緩徐化、およびそのような腫瘍または過誤腫に伴う症状の改善または緩和が挙げられるが、それに限定されるわけではない。治療には、治療を受けていないものと比較した、対象の死亡率減少または寿命延長も含まれる。

【0051】

本明細書で使用される場合、「ベクター」とは、適切な制御エレメントと結合したときに複製が可能でありかつ細胞間で遺伝子配列を転移することができる任意の遺伝要素、例えばプラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどを指す。したがって、この用語は、クローニング媒体および発現媒体、ならびにウイルスベクターを含む。

40

【0052】

本明細書で特に規定がない限り、本出願に関連して使用される科学用語および技術用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般に理解されている意味を有するものとする。本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、および試薬などに限定されず、それに応じて異なる可能性がある。本明細書で使用される用語は特定の態様の記載のみを目的としており、特許請求の範囲によってのみ規定される本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0053】

50

本明細書に記載される本発明は、多数の利点をもたらす。例えば、本明細書には、組換えアデノ随伴ウイルスを使用する遺伝子治療により結節性硬化症を治療するのに有用な組成物および方法が記載される。従来、5.4kbであるヒトツペリンのcDNAと比較して、AAVベクターは4.7kbと挿入容量が比較的小さいため、TSC2の変異を原因とするTSCは、遺伝子治療では治せなかった。本明細書に記載するように、TSC2の変異を修復するための本開示方法は、ヒトツペリンの凝縮形態であるcツペリンを利用する。本明細書に記載のcツペリンのcDNAは約2.3kbであり、AAVベクターで容易に発現する。実際に、AAVベクターは遺伝子治療において安全かつ有益であることが証明されている。このベクターを、例えば血管内に送達すると、1回の注射で多くの組織に到達でき、血清型によっては血液脳関門を通過することができる。通常、1回の注射で長期間にわたり有益な結果が得られる。本発明者らの組成物および方法により、TSC2に変異を有する患者における結節性硬化症の徴候の治療に、cツペリンを発現するAAVベクターを使用することが可能になる。このようなベクターは、腎血管筋脂肪腫の治療のみならず、TSC2に起因するLAMおよび脳機能障害にも有用である。

10

【0054】

さらに、本発明は、mTORC1の過剰抑制に関連する毒性および有害事象を引き起こす可能性があるラパマイシンまたはその類似薬を必ずしも必要とせずにTSCを治療する代替方法を提供する。その代わりに、開示される組成物および方法は、ハマルチンと複合体化された場合にのみ活性であるというツペリンの機能を利用している。TSC2患者のハマルチン濃度は正常であるため、ベクターの送達を介してcツペリンが過剰発現されることによる毒性は、ほとんどないか低いことが想定される。さらに、ラパマイシンおよび関連薬はmTORC1活性を阻害する可能性があるが、cツペリンは、mTORC1の病理学的作用と、mTORC1に依存しないRheb依存性の病理学的作用の両方を阻害できるため、結節性硬化症に対する以前の治療法よりも有効性が高い可能性がある。

20

【0055】

[本発明1001]

ハマルチン結合領域およびGTPase活性化タンパク質（GAP）領域を含むが、Aktリン酸化部位Thr 1462を欠失している、凝縮ツペリン（cツペリン）。

[本発明1002]

前記ハマルチン結合領域が、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、本発明1001のcツペリン。

30

[本発明1003]

前記ハマルチン結合領域がSEQ ID NO:2である、本発明1002のcツペリン。

[本発明1004]

前記GAP領域が、SEQ ID NO:3に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、本発明1001のcツペリン。

[本発明1005]

前記GAP領域がSEQ ID NO:3である、本発明1004のcツペリン。

[本発明1006]

ヒトツペリン（SEQ ID NO:10）のアミノ酸451～1514を欠失している、本発明1001のcツペリン。

40

[本発明1007]

前記ハマルチン結合領域とGAP領域との間にスペーサーを含む、本発明1001のcツペリン。

[本発明1008]

前記スペーサーが少なくともSGGGを含む、本発明1001のcツペリン。

[本発明1009]

前記スペーサーがSEQ ID NO:4である、本発明1008のcツペリン。

[本発明1010]

SEQ ID NO:1に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、本発明1001のcツペリン。

50

[本発明1011]

SEQ ID NO:1である、本発明1001のcツベリン。

[本発明1012]

本発明1001～1011のいずれかのcツベリンをコードする核酸分子。

[本発明1013]

ヒト細胞での発現用にコドン最適化されている、本発明1012の核酸分子。

[本発明1014]

調節制御配列に機能的に連結されている、本発明1013の核酸分子。

[本発明1015]

前記調節制御配列が、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ニワトリ -ア  
クチン（CBA）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター/エンハン  
サー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロー  
ルキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーター、シナプシ  
ンプロモーター、またはグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーターを含む、本  
発明1014の核酸分子。

10

[本発明1016]

前記調節制御配列が、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーターおよびウッド  
チャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む、本発明1015の核酸分子。

[本発明1017]

前記細胞が、脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞である、本発明10  
13～1016のいずれかの核酸分子。

20

[本発明1018]

SEQ ID NO:5に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、本発明1012～1017のい  
ずれかの核酸分子。

[本発明1019]

SEQ ID NO:5である、本発明1018の核酸分子。

[本発明1020]

発現カセットに機能的に連結されている、本発明1012～1019のいずれかの核酸分子。

[本発明1021]

本発明1012～1020のいずれかの核酸分子を含む、細胞またはウイルス。

30

[本発明1022]

本発明1012～1020のいずれかの核酸分子を含む、組成物。

[本発明1023]

組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）であって、

前記rAAVが、AAVカプシドおよびその中にパッケージングされたAAVゲノムを含み、

前記AAVゲノムが、

ハマルチン結合領域およびGAP領域を含むがAktリン酸化部位Thr 1462を欠失してい  
るcツベリンを発現可能である、核酸分子

を含む、前記rAAV。

[本発明1024]

前記AAVカプシドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8  
、AAV9、AAV10、AAV11、もしくはAAV12カプシド、またはこれらのAAVカプシドの  
いずれか1つの変異体である、本発明1023のrAAV。

40

[本発明1025]

前記核酸が調節制御配列に機能的に連結されている、本発明1023～1024のいずれかのr  
AAV。

[本発明1026]

前記調節制御配列が、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ニワトリ -ア  
クチン（CBA）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター/エンハン  
サー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロー

50

ルキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー / CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、またはグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーターを含む、本発明1023 ~ 1025のいずれかのrAAV。

[本発明1027]

前記核酸分子がITRを含む、本発明1023 ~ 1026のいずれかのrAAV。

[本発明1028]

前記核酸分子がポリAを含む、本発明1023 ~ 1027のいずれかのrAAV。

[本発明1029]

前記核酸分子がSEQ ID NO:5である、本発明1023のrAAV。

[本発明1030]

本発明1023 ~ 1029のいずれかのrAAVおよび薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[本発明1031]

結節性硬化症 (TSC) を有する患者を治療する方法であって、ハマルチン結合領域およびGAP領域を含むがAktリン酸化部位Thr 1462を欠失しているcツペリンを前記患者に投与することを含む、前記方法。

[本発明1032]

cツペリンをコードする核酸分子を前記患者に投与する、本発明1031の方法。

[本発明1033]

本発明1022 ~ 1027のいずれかのrAAVを前記患者に投与する、本発明1031の方法。

[本発明1034]

本発明1012 ~ 1020のいずれかの核酸分子を含む細胞外小胞 (EV) を前記患者に投与する、本発明1031の方法。

[本発明1035]

前記患者が腎血管筋脂肪腫を有する、本発明1031の方法。

[本発明1036]

前記cツペリンを血管内に投与する、本発明1035の方法。

[本発明1037]

前記cツペリンを腎動脈または腎静脈に投与する、本発明1036の方法。

[本発明1038]

前記患者がリンパ脈管筋腫症 (LAM) を有する、本発明1031の方法。

[本発明1039]

前記cツペリンを血管内に投与する、本発明1038の方法。

[本発明1040]

前記cツペリンを肺に投与する、本発明1038の方法。

[本発明1041]

前記患者が脳機能障害を有する、本発明1031の方法。

[本発明1042]

前記cツペリンを血管内に投与する、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記cツペリンを脳内に投与する、本発明1041の方法。

[本発明1044]

前記cツペリンを髄腔内に投与する、本発明1041の方法。

[本発明1045]

前記cツペリンを腎血管筋脂肪腫、LAM、または脳に投与する、本発明1031の方法。

[本発明1046]

前記rAAVを、脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞に投与する、本発明1033の方法。

[本発明1047]

前記rAAVを、血管内、静脈内、脳内、脳室内、髄腔内、または皮膚に投与する、本発明1033の方法。

10

20

30

40

50

**[本発明1048]**

前記患者にラパマイシンをさらに投与する、本発明1031の方法。

本発明の他の特徴および利点は、本発明の好ましい態様の以下の記載、および特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

**【図面の簡単な説明】**

【0056】

【図1A】cツペリンのアミノ酸配列（SEQ ID NO:1）を示す。

【図1B】cツペリンをコードする核酸配列（SEQ ID NO:5）を示す。

【図2A】TSC1およびTSC2の完全長ヒトタンパク質および凝縮ツペリン（cツペリン）タンパク質の機能的ドメインの模式図である。矢印の上の数字でアミノ酸残基を示す。T2BDはTSC2結合ドメインを指し、T1BDはTSC1結合ドメインを指し、コイルは予測されるコイルドコイルドメインを指し、GAPはGTPase活性化タンパク質を指し、これはRap1 G

10

APのそれと相同なヒトツペリンのドメインである。

【図2B】cツペリンAAVベクターの模式図である。

【図2C】AAV-CBA-cツペリンベクタープラスミド構築物の模式図である。

【図3A】AAV-CBA-cツペリンベクタープラスミド構築物をトランスフェクトしたCOS-7細胞におけるcツペリンの発現レベルを示すウェスタンブロットである。cツペリンの予測分子量である約85kDaにバンドが現れている。

【図3B】様々な構築物をトランスフェクトした細胞におけるpS6、S6、およびGAPDHの発現レベルを示すウェスタンブロットである。cツペリン活性を欠く細胞でpS6の発現が上昇した。

20

【図4A】出生時（生後0日（P0））にAAV1-CBA-Creベクターを注射したTsc2<sup>c/c</sup>マウス、P21でAAV9-CBA-cツペリンを注射したTsc2<sup>c/c</sup>マウス、および非注射マウスの生存性を示すグラフである。AAV1-CBA-Creを注射したマウスの生存期間中央値は35日であったが、生存期間中央値は、AAV9-CBA-cツペリンを注射したマウスで185日超、非注射マウスで175日超であった。

【図4B】P0でAAV1-CBA-Creベクターを注射したTsc2<sup>c/c</sup>マウス、およびP0でAAV1-CBA-Creベクターを注射した後、P21でAAV1-CBA-cツペリンベクターを注射したマウスの生存性を示すグラフである。生存期間中央値は非注射マウスで26.5日、AAV1-CBA-cツペリンを注射したマウスで35日であった。

30

【図4C】P3でAAV1-CBA-Creベクターを注射したTsc2<sup>c/c</sup>マウス、およびP3でAAV1-CBA-Creベクターを注射した後、P21でAAV1-CBA-cツペリンベクターを注射したマウスの生存性を示すグラフである。生存期間中央値は非注射マウスで36日、AAV1-CBA-cツペリンを注射したマウスで54日であった。

【図4D】P3でAAV1-CBA-Creベクターを注射したTsc2<sup>c/c</sup>マウス、およびP3でAAV1-CBA-Creベクターを注射した後、P21でAAV9-CBA-cツペリンベクターを注射したマウスの生存性を示すグラフである。生存期間中央値は非注射マウスで32日、AAV9-CBA-cツペリンを注射したマウスで45日であった。

【図4E】Tsc2<sup>c/c</sup>マウスの4つの群の生存性を示すグラフである。第1群は、P0のみAAV1-CBA-Creベクターを注射した；第2群は、P0でAAV1-CBA-Creベクターを注射した後、P3でAAV9-CBA-cツペリンを注射した；第3群のマウスは、P0のみAAV1-CBA-Creベクターを注射し、ピガバトリンで処置した；第4群は、P0でAAV1-CBA-Creベクターを注射した後、P3でAAV9-CBA-cツペリンを注射し、ピガバトリンで処置した。非注射・薬物なしマウスの生存期間中央値は23日、非注射・ピガバトリン処置マウスで27日、注射あり薬物なしマウスで35.5日、および注射あり、ピガバトリン処置マウスで40日であった。

40

【図5】図5A～5Fは、図4Bの実験計画に従って処理したマウスの脳の、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色またはpS6に対する免疫組織化学（IHC）を使用した染色を示す。図5Aは、正常な非注射マウス（対照）の染色を示す。図5B～5Eは、P0でAAV1-CBA-Creベクターを注射したマウスにおける染色を示し、図5Fは、P3でAAV1-CBA-cツペリンでさらに処置したマウスの染色を示す。

50

【図 6 A】NOD-SCID II2Rガンマ (NSG) マウスに皮下注入されたリンパ脈管筋腫症 (LAM) 腫瘍の体積を示す。

【図 6 B】非注射マウスおよび4週目および9週目にAAV9-CBA-cツペリンを注射したマウスにおけるLAM腫瘍の成長を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0057】

発明の態様の詳細な説明

本明細書に開示される全身遺伝子治療は、TSC患者において、AAVベクターにコードされるもののような凝縮ツペリン (cツペリン) の送達 (例えば血管系経由) によって達成することができ、これは罹患細胞の大きさを縮小し、中枢神経系、腎臓、および肺の全体を含む多数の組織において過誤腫を減少させるのに有用である。cツペリンは、例えばmTOR活性を抑制する機能について有用である。cツペリンの有用な形態は、任意の方法に従って、例えば、本明細書に記載されるように、ツペリンを欠失しているインビトロ細胞内でのS6リン酸化を抑制する能力を試験することにより同定することができる。以下で、TSCの治療に有用なcツペリンの設計について記載する。

【0058】

以下の実施例では、AAVベクターに適合する、cツペリンと称する凝縮型のヒトツペリンの操作について記載する。ヒトツペリンcDNAのサイズは5.4kbであり、AAVの導入遺伝子パッケージング容量を上回っている。この目的のため、本発明者らの凝縮形態のツペリンの操作を、ヒトツペリンcDNAの中央部分を除去することにより実現した。本発明者らのcツペリンは、ヒトツペリンのN末端にハマルチン結合領域、C末端にGAP領域を保有するが、Aktリン酸化部位Thr1462を欠失しており、それによりmTORC1のAkt活性化を低減または消失させる。タンパク質の中央領域は、立体配座の柔軟性を与えるグリシン-セリンリンカーで置換されている。次に、このcツペリンcDNAを、AAVベクター中、遍在性の高いニワトリベータアクチンプロモーター下にクローニングした。このAAV-CBA-cツペリン構築物をマウス胚線維芽細胞に形質導入したところ、ウェスタンブロット分析によって示されるように、mTORC1活性化と、それによるcツペリンの生物学的活性を確定するマーカーであるS6キナーゼ活性が低下する。

【0059】

1.cツペリン

本明細書に記載されるようなcツペリンは、一般に、ハマルチン結合領域、GTPase活性化タンパク質 (GAP) 領域、およびハマルチン結合領域をGAP領域に連結するスペーサーを含み、ヒトツペリンのThr 1462のAktリン酸化部位を欠失している。

【0060】

TSCの治療に有用な例示的なcツペリンは、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有する。このcツペリン (SEQ ID NO:1) において、ハマルチン結合領域のアミノ酸配列はSEQ ID NO:2である。また、このcツペリン (SEQ ID NO:1) において、GAP領域のアミノ酸配列はSEQ ID NO:3である。

【0061】

このcツペリン (SEQ ID NO:1) のハマルチン結合領域とGAP領域は、タンパク質スペーサー配列によって接続されている。一例では、スペーサー配列は、グリシン-セリン (SGG) リンカー配列、例えばSEQ ID NO:4を含む。この場合、16a.a.のリンカーが、ハマルチン結合領域とGAP領域を接続する。ヒトツペリン (SEQ ID NO:10) と比較してcツペリンタンパク質は、ツペリン活性の調節に關与するいくつかのリン酸化部位 (Huang et al., Biochem. J. 412(2):179-190 2008) のうちの1つであるヒトツペリンのAktリン酸化部位Thr 1462を欠失している。

【0062】

別の例では、cツペリンは、SEQ ID NO:1に対して少なくとも80%の配列同一性 (例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性) を有する。このcツペリンのうち、cツペリンのハマルチン結合領域は、S

10

20

30

40

50

EQ ID NO:2に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有し、cツペリンのGAP領域は、SEQ ID NO:3に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有する。いくつかのcツペリンでは、cツペリンのハマルチン結合領域とGAP領域は、タンパク質スペーサー配列によって接続されている。一例では、スペーサー配列は、グリシン - セリン（SGGG）リンカー配列、例えばSEQ ID NO:4を含む。

#### 【0063】

本明細書に記載のSEQ ID NO:1のcツペリンは、ヒトツペリンを使用して作製され、そのアミノ酸配列および核酸配列は、それぞれNCBIアクセッション番号NP\_000539.2およびGenBankアクセッション番号X75621.1で参照することができる。追加のcツペリンを作製するため、他のヒトツペリンアイソフォームを使用することもできる。そのような分子の作製に有用である例示的なヒトツペリンアイソフォームとして、ツペリンアイソフォーム4（NCBIアクセッション番号NP\_001070651.1）、ツペリンアイソフォーム5（NCBIアクセッション番号NP\_001107854.1）、ツペリンアイソフォーム6（NCBIアクセッション番号NP\_001305756.1）、ツペリンアイソフォーム7（NCBIアクセッション番号NP\_001305758.1）、ツペリンアイソフォーム8（NCBIアクセッション番号NP\_001305760.1）、ツペリンアイソフォーム9（NCBIアクセッション番号NP\_001305761.1）、ツペリンアイソフォームX7（NCBIアクセッション番号XP\_024306181.1）、ツペリンアイソフォームX8（NCBIアクセッション番号XP\_005255586.2）、ツペリンアイソフォームX9（NCBIアクセッション番号XP\_016879105.1）、ツペリンアイソフォームX10（NCBIアクセッション番号XP\_005255588.2）、ツペリンアイソフォームX11（NCBIアクセッション番号XP\_016879106.1）、ツペリンアイソフォームX12（NCBIアクセッション番号XP\_016879107.1）などが含まれるが、それに限定されるわけではない。このようなツペリンは、本明細書に記載の任意のcツペリンを操作するのに有用である。

#### 【0064】

例えば、cツペリンは、ヒトツペリンアイソフォーム4（NCBIアクセッション番号NP\_001070651.1）を使用して操作することができる。ヒトツペリンアイソフォーム4を使用して、cツペリン（SEQ ID NO:1）について記載したように、SEQ ID NO:2に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有するハマルチン結合領域のアミノ酸配列、およびSEQ ID NO:3に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有するGAP領域のアミノ酸配列を作製する。さらに、ハマルチン結合領域とGAP領域を、タンパク質スペーサー配列によって接続することができる。一例では、スペーサー配列は、グリシン - セリン（SGGG）リンカー配列、例えばSEQ ID NO:4を含む。ヒトツペリンアイソフォーム4から操作されたcツペリンは、さらにAktリン酸化部位を欠失している。

#### 【0065】

#### II.cツペリン核酸分子

さらに、SEQ ID NO:1の例示的なcツペリンは、SEQ ID NO:5の配列を有する核酸分子によってコードされる。このcツペリン核酸分子（SEQ ID NO:5）では、ハマルチン結合領域はSEQ ID NO: 6によってコードされる。また、このcツペリン核酸分子（SEQ ID NO:5）では、GAP領域はSEQ ID NO:7によってコードされる。

#### 【0066】

SEQ ID NO:5の核酸分子によってコードされる、SEQ ID NO:1のこの例示的なcツペリンでは、ハマルチン結合領域とGAP領域が、タンパク質スペーサー配列、すなわちSEQ ID NO:4のグリシン - セリンリンカーにより連結されている。グリシン - セリンリンカーはSEQ ID NO:8によってコードされる。

#### 【0067】

10

20

30

40

50

さらなる態様では、cツペリンをコードする核酸は、SEQ ID NO:5に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有する。このcツペリンのうち、ハマルチン結合領域は、SEQ ID NO:6に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有する核酸によってコードされ、GAP領域は、SEQ ID NO:7に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有する核酸によってコードされる。さらに、cツペリンをコードする核酸は、タンパク質スパーサーをコードする配列、例えばSEQ ID NO:8を含んでもよい。

10

#### 【0068】

cツペリン核酸分子は、ヒト細胞での発現用にコドン最適化されてもよい。さらに、cツペリン核酸分子は、例えば、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーターおよびウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）、または、非限定的に、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ニワトリ  $\beta$ -アクチン（CBA）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、またはグリアル線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーターなどの調節制御配列に機能的に連結されてもよい。核酸分子はまた、発現カセットに機能的に連結されてもよい。

20

#### 【0069】

例えば、cツペリン核酸分子（SEQ ID NO:5）は、CBAプロモーター下に、コザック配列とともに挿入でき、その後ろにウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）、さらにSV40およびウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルが続く。ベクターはAAV2-LTR骨格に挿入され、AAV2 ITR配列に挟まれている。

#### 【0070】

さらに、cツペリン核酸分子（SEQ ID NO:5）は、ベクタープラスミドゲノムに組み込まれていてもよい。cツペリン核酸分子（SEQ ID NO:5）を含む例示的なベクタープラスミドゲノムは、SEQ ID NO:11の配列を有する。

#### 【0071】

30

### III. 組換えAAV分子

任意の好適な核酸ベクターを本発明の組成物および方法と組み合わせて使用し、cツペリンをコードする核酸分子および組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）の構成要素を設計してアセンブリすることができる。本明細書に記載の組成物および方法に有用なrAAVベクターは、（1）発現させる異種配列（例えば、cツペリンをコードする核酸分子）および（2）異種遺伝子の組み込みおよび発現を促進するウイルス配列を含む、組換え核酸構築物である。ウイルス配列には、DNAを複製してビリオンにパッケージングするためにシスで必要とされるAAVの配列（例えば機能的ITR）が含まれていてもよい。そのようなrAAVベクターはまた、マーカーまたはレポーター遺伝子を含んでもよい。有用なrAAVベクターは、1つまたは複数のAAV WT遺伝子の全部または一部を欠失しているが、機能的な隣接ITR配列を保有する。AAV ITRは、特定の用途に適した任意の血清型のものであり得る。rAAVベクターを使用するための方法は、例えば、Tal et al., J. Biomed. Sci. 7:279-291 (2000)およびMonahan et al., Gene Therapy. 7:24-30 (2000)に記載されており、遺伝子送達のためのAAVベクターと関連する場合、それぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

40

#### 【0072】

一態様では、ベクターは、cツペリン核酸分子を運搬し、対象の選択細胞でcツペリン分子を発現するプロモーターによって駆動される組換えAAVである。組換えベクターのアセンブリ方法は、当技術分野において公知である。例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989; Kay, M. A. et

50



al., Nat. Med. 7(1):33-40 (2001) ; および Walther W. and Stein U., Drugs 2000, 60(2):249-71 を参照のこと。

【 0 0 7 3 】

本明細書に記載のある特定の態様では、cツペリン核酸分子は、当技術分野において公知である標準方法に従ったAAVベクターを用いる治療を必要とする選択細胞、例えば脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞に送達される。30超の天然のAAVの血清型が利用可能である。AAVカプシドには多くの天然変異体が存在し、選択細胞に特に適した特性をもつAAVを特定して使用することが可能である。従来の分子生物学技術によってAAVウイルスを操作することで、cツペリン核酸分子配列の細胞特異的送達、免疫原性の最小化、安定性および粒子寿命の調整、効率的な分解、正確な細胞内送達（例えば、核内へ）のために、これらの粒子を最適化することができる。

10

【 0 0 7 4 】

所望のcツペリン核酸分子をコードする配列を含む組換え操作AAVまたは人工AAVによる送達を介して、選択細胞において本明細書に記載のcツペリン核酸分子の発現を達成することができる。比較的非毒性であり、効率的な遺伝子導入を提供し、特定の目的に合わせて容易に最適化できるため、AAVの使用はDNAの外因性送達の一般的な方式である。ヒトまたは非ヒト霊長類から単離されたAAVの明確に特性決定された血清型のうち、ヒト血清型2は、さまざまな標的組織および動物モデルでの効率的な遺伝子導入実験に広く使用されている。他のAAV血清型として、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはそのハイブリッド血清型が挙げられるが、それに限定されるわけではない。特に指定のない限り、AAV ITR、および本明細書に記載の他の選択されるAAV構成要素は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、そのハイブリッド血清型、または他の公知および未知のAAV血清型を含むがそれに限定されるわけではない任意のAAV血清型の中から容易に選択することができる。一態様では、ITRはAAV2由来である。このようなITRまたは他のAAV構成要素は、当業者が利用可能な技術を使用して、AAV血清型から容易に単離することができる。そのようなAAVは、学術、商用、または公共の起源（例えば、American Type Culture Collection, Manassas, VA）から単離するかまたは入手することができる。あるいは、AAV配列は、文献またはデータベース、例えばGenBank、PubMedなどで提供されているような公開配列を参照することにより、合成手段によってまたは他の好適な手段によって入手することができる。

20

30

【 0 0 7 5 】

ベクターへのアセンブリに望ましいAAV断片は、vp1、vp2、vp3、および超可変領域を含むcapタンパク質、rep 78、rep 68、rep 52、およびrep 40を含むrepタンパク質、ならびにこれらのタンパク質をコードする配列を含む。これらの断片は、多様なベクター系および宿主細胞で容易に利用することができる。そのような断片は、単独で、他のAAV血清型配列もしくは断片と組み合わせて、または他のAAVもしくは非AAVウイルス配列からの要素と組み合わせて使用することができる。本明細書で使用される場合、人工AAV血清型は、非天然カプシドタンパク質を含むAAVを含むが、それに限定されるわけではない。選択したAAV配列（例えば、vp1カプシドタンパク質の断片）を、選択した異なるAAV血清型、同じAAV血清型の隣接しない部分、非AAVウイルス源、または非ウイルス源から得ることができる異種配列と組み合わせて使用し、任意の好適な技術によってこのような人工カプシドを作製することができる。人工AAV血清型は、偽型AAV、キメラAAVカプシド、組換えAAVカプシド、または「ヒト化」AAVカプシドであり得るが、それに限定されるわけではない。あるAAVのカプシドを、異なるカプシドタンパク質を有するAAVからのITRとともに利用する偽型ベクターは、本明細書に記載の組成物および方法に有用である。

40

【 0 0 7 6 】

一例では、AAVは、AAV1に由来するカプシド配列を含む。別の態様では、AAVは、AAV9に由来するカプシド配列を含む。AAV1およびAAV9の使用は、Broekman et al., Ne

50

uroscience. 138:501-510, 2006に既に記載されており、参照により本明細書に組み入れられる。

【0077】

別の例では、本明細書に記載の組成物および方法に有用なベクターには、選択されたAAV血清型カプシド、例えばAAV1もしくはAAV9カプシド、またはその断片をコードする配列が含まれている。他の有用なベクターには、選択したAAV血清型repタンパク質、例えばAAV1もしくはAAV9 repタンパク質、またはその断片をコードする配列が含まれている。そのようなベクターには、任意で、AAVのcapタンパク質とrepタンパク質の両方が含まれていてもよい。AAVのrepおよびcapの両方を提供するベクターにおいて、AAV rep配列およびAAV cap配列はいずれも1つの血清型源、例えばAAV1またはAAV9起源のものであり得る。

10

【0078】

あるいは、rep配列が、cap配列を提供するものとは異なるAAV血清型に由来しているベクターを使用してもよい。一態様では、rep配列およびcap配列は、別々の起源（例えば、別々のベクター、または宿主細胞とベクター）から発現される。別の態様では、これらのrep配列を、異なるAAV血清型のcap配列にインフレームで融合し、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,282,199号に記載のキメラAAVベクターを形成する。

【0079】

好適な組換えAAV (rAAV) は、本明細書で規定されるAAV血清型カプシドタンパク質またはその断片をコードする核酸配列；機能的なrep遺伝子；例えばAAV ITRおよびcツペリン核酸配列で構成されるミニ遺伝子；ならびにミニ遺伝子のAAVカプシドタンパク質へのパッケージングを可能にする十分なヘルパー機能が含まれる宿主細胞を培養することにより産生される。AAVカプシドにAAVミニ遺伝子をパッケージングするために宿主細胞で培養する必要のある成分は、トランスで宿主細胞に提供されてもよい。あるいは、当業者に公知である方法を使用して、1つまたは複数の必要な構成要素を含むように操作された安定な宿主細胞によって、1つまたは複数の必要な構成要素（例えば、ミニ遺伝子、rep配列、cap配列、および/またはヘルパー機能）を提供してもよい。

20

【0080】

一実施例では、AAVはプロモーター（またはプロモーターの機能的断片）を含む。選択した導入遺伝子を所望の標的細胞で発現することができ、当技術分野において公知である多数の構成的または誘導性プロモーターの中から、rAAVに使用するプロモーターの選択を行うことができる。一態様では、プロモーターは細胞特異的である。用語「細胞特異的」とは、組換えベクター用に選択した特定のプロモーターが、選択した導入遺伝子の特定の細胞型での発現を誘導できることを意味する。一態様では、プロモーターは、脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞での導入遺伝子の発現に特異的である。

30

【0081】

別の態様では、プロモーターは、発現させる標的遺伝子に応じた天然のプロモーターである。有用なプロモーターとしては、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ニワトリ  $\gamma$ -アクチン (CBA) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTRプロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、CMV最初期 (IE) エンハンサー/CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、およびグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーターが挙げられるが、それに限定されるわけではない。

40

【0082】

ミニ遺伝子またはrAAVに含まれる他の従来の調節配列は、当技術分野において公知である。当業者は、本明細書に記載の範囲から逸脱することなく、上記および他の発現制御配列の中から選択を行うことができる。

【0083】

AAVミニ遺伝子は、本明細書に記載のcツペリン核酸分子およびその調節配列、ならびに5' および3' AAV ITRを含み得る。一態様では、AAV血清型2のITRが使用される。ただ

50

し、他の好適な血清型からのITRを選択してもよい。いくつかの態様では、ミニ遺伝子はカプシドタンパク質にパッケージングされ、選択した宿主細胞に送達される。

【0084】

rAAVの作製に必要なミニ遺伝子、rep配列、cap配列、およびヘルパー機能は、rAAVで運搬される配列を導入する任意の遺伝要素の形態でパッケージング宿主細胞に送達することができる。選択した遺伝要素は、本明細書に記載されるものを含む任意の好適な方法で送達することができる。本明細書に記載の任意の態様の構築に使用される方法は核酸操作の当業者に公知であり、これには遺伝子工学技術、組換え工学技術、および合成技術が含まれる。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと。同様に、rAAVピリオンの作製方法は周知であり、好適な方法の選択によって本発明が限定されるわけではない。例えば、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、K. Fisher et al., J. Virol., 1993 70: 520-532および米国特許第5,478,745号を参照のこと。

10

【0085】

別の実施例では、cツベリンミニ遺伝子は、参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報第2012/158757号に開示されているものなどのプロウイルスプラスミド中に調製される。そのようなプロウイルスプラスミドには、機能的な結合を含むモジュラー組換えAAVゲノムが含まれ、このゲノムには、当該ITRの容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれた野生型の5' AAV2 ITR配列；サイトメガロウイルス（CMV）-ニワトリベータアクチン配列上流のサイトメガロウイルス配列を含むプロモーター、または細胞特異的プロモーター/エンハンサーが含まれ、当該プロモーターは、プロモーター配列全体の容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれ、かつ当該上流配列は、プロモーター配列からの、上流のCMVまたはエンハンサー配列のみの容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれている。本明細書に記載のcツベリン核酸分子は、マルチクローニングポリリンカーの部位に挿入することができ、その場合、cツベリン核酸分子は、プロモーターに機能的に連結され、プロモーターの調節制御下にある。当該ポリA配列の容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれたウシ成長ホルモンポリアデニル化配列；および3' ITRの容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれた野生型3' AAV2 ITR配列も、このプラスミドの一部である。プラスミド骨格は、細菌細胞での複製に必要なエレメントを含み、それ自体が転写ターミネーター/インシュレーター配列に挟まれている。

20

30

【0086】

さらに別の実施例では、プロウイルスプラスミドには、機能的な結合を含むモジュラー組換えAAVゲノムが含まれ、このゲノムには、(i) 当該ITRの容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれた野生型の5' AAV2 ITR配列；(ii) (A) CMV - ニワトリベータアクチン配列上流のCMV最初期エンハンサー配列；または、(B) 例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ニワトリ - アクチン（CBA）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー/CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、もしくはグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーターなどを含む、細胞特異的プロモーター/エンハンサーを含むプロモーター、が含まれる。このプロモーターは、プロモーター配列全体の容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれ、かつ当該上流配列は、プロモーター配列からの、上流のCMVまたはエンハンサー配列のみの容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれている。また、このプロウイルスプラスミドの一部は、本明細書に記載のもののいずれかを含むcツベリン核酸配列（cツベリン核酸分子は、プロモーターに機能的に連結され、プロモーターの調節制御下にある）の挿入を可能にするマルチクローニングポリリンカー配列；当該ポリA配列の容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれたウシ成長ホルモンポリアデニル化配列；および3' ITRの容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に挟まれた野生型3' AAV2 IT

40

50

R配列である。プロウイルスプラスミドには、細菌細胞での複製に必要なエレメントを含みさらにカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド骨格も含まれ、当該プラスミド骨格は転写ターミネーター/インシュレーター配列に挟まれている。本明細書に記載のプロウイルスプラスミドはまた、骨格長を増加させ、非機能性AAVゲノムの逆パッケージングを防止するため、ノンコーディングラムダファージの5.1kbスタッファ配列をプラスミド骨格に含んでいてもよい。

#### 【0087】

いくつかの態様では、プロウイルスプラスミドは、cツベリン核酸分子の複数のコピーを含む。したがって、例えば、AAVのパッケージング上限の半分未満であるcツベリン核酸分子が、単一のプロウイルスプラスミド上に、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、15回、16回、17回、18回、19回、20回、またはそれ以上反復されていてもよい。

#### 【0088】

さらに別の局面では、プロウイルスプラスミドのプロモーターを改変してプロモーターのサイズを小さくし、より大きなcツベリン核酸分子配列をrAAVに挿入できるようにする。一態様では、通常は合計で約1,000塩基対のノンコーディングエクソンおよびイントロンを含むCMV/CBAハイブリッドプロモーターを、当技術分野で公知のように130塩基対のキメライントロンで置換する。

#### 【0089】

次いで、これらのプロウイルスプラスミドを、現存する従来のパッケージング手法に使用し、プロウイルスプラスミドによって運搬されるcツベリン分子導入遺伝子を発現する組換えウイルスを作製する。好適な産生細胞株は、当業者によって容易に選択される。例えば、原核生物（例えば細菌）細胞、ならびに昆虫細胞、酵母細胞、および哺乳動物細胞を含む真核細胞を含めた任意の生物学的有機体から、好適な宿主細胞を選択することができる。簡潔には、選択したパッケージング細胞にプロウイルスプラスミドをトランスフェクトして、一過性に存在させることができる。あるいは、隣接するITRを有するミニ遺伝子または遺伝子発現カセットを、染色体により、またはエピソームとして、宿主細胞のゲノムに安定的に組み込む。組換えAAVゲノムを宿主細胞に送達するための好適なトランスフェクション技術は公知であり、容易に利用することができる。典型的には、プロウイルスプラスミドを、capおよび/またはrepタンパク質を発現する宿主細胞で培養する。宿主細胞において、隣接するAAV ITRを有するcツベリン核酸分子からなるミニ遺伝子をレスキューし、カプシドタンパク質またはエンベロープタンパク質にパッケージングして感染性ウイルス粒子を形成する。このように、遺伝子発現カセットのウイルスゲノムの、感染性AAVエンベロープまたはカプシドへのパッケージングを可能にするのに十分なウイルス配列の存在下で、プロウイルスプラスミドを運搬するパッケージング細胞を培養することにより、組換えAAV感染性粒子が作製される。

#### 【0090】

#### IV.細胞外小胞

細胞外小胞（EV）は、本明細書に記載の方法および組成物に有用である。例えば、本明細書に記載の任意のcツベリンを含むEVを、標準方法に従って対象に投与することができる。さらに一例として、cツベリンをコードする任意の核酸分子を含むEVを対象に投与することもできる。

#### 【0091】

細胞外小胞は、エクソソーム、微小胞、微粒子、循環微小胞、放出微小胞、ナノ小胞、ナノ粒子、アポトーシス小体、および膜小胞を含むがそれに限定されるわけではなく、ほぼすべての細胞型から放出される、例えば20nm~10μmの範囲の原形質膜の断片である。微小胞は細胞間の情報伝達役を果たし、mRNA、miRNA、およびタンパク質を細胞間で輸送することができる。当業者には明らかであるように、濾過、分画遠心分離法、超遠心分離法、密度勾配での小胞浮選法（ショ糖、OptiPrep（商標））、および膜タンパク質に対する抗体を利用した免疫アフィニティー捕捉法に基づいた、様々なEV単離および精製プ

ロトコルがある。細胞外小胞を単離するための例示的な情報は、Simpson R J, Mathivanan S (2012) Extracellular Microvesicles: The Need for Internationally Recognised Nomenclature and Stringent Purification Criteria. J Proteomics Bioinform 5: ii- ii ; van der Pol et al., Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles, Pharmacol Rev. 2012 July ; 64(3):676-705 ; Raposo and Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends, J Cell Biol. 2013 Feb. 18 ; 200(4):373-83 ; およびWitwer et al., Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research, J Extracell Vesicles. 2013 May 27 ; 2で参照することができ、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。また、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Sarkar et al., 2009, Taylor and Gerceel-Taylor, 2008およびBalaj et al., 2011を参照のこと。

10

#### 【0092】

典型的には、本明細書に記載のcツペリンのいずれかが標準手順に従ってEVに充填される。例えば、EVには、SEQ ID NO:1のcツペリンが充填され得る。

#### 【0093】

同様に、EVには、本明細書に記載のcツペリンをコードする核酸分子のいずれかが充填される。核酸分子はAAVゲノムに組み込まれていてもよい。さらに、例えば、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ニワトリ  $\beta$ -アクチン (CBA) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTRプロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、CMV最初期遺伝子エンハンサー / CBAプロモーター、シナプシンプロモーター、またはグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーターを含む、調節制御配列に、核酸分子を機能的に連結することができる。一例では、調節制御配列は、CMV最初期遺伝子エンハンサー / CBAプロモーターおよびウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) を含む。さらに一例として、核酸分子はITRを含み得る。別の例では、核酸分子はポリAを含む。

20

#### 【0094】

本明細書に記載の任意のEVはまた、薬学的に許容される担体を含む組成物に含まれていてもよい。

30

#### 【0095】

#### V. 薬学的組成物およびキット

本明細書では、cツペリン核酸分子、本明細書に記載のcツペリン核酸分子 (例えばrAAV) を含むEV、または本明細書に記載のようなcツペリン核酸分子を含むrAAVを含む、薬学的組成物を提供する。そのような薬学的組成物は、本明細書に記載のcツペリン核酸分子またはcツペリンのいずれかを含む。

#### 【0096】

本明細書に記載の薬学的組成物は、従来の方法によって汚染を評価した後、好適な投与経路を意図した薬学的組成物に製剤化することができる。cツペリン核酸分子、cツペリン核酸分子を含むEV、またはcツペリン核酸分子を含むrAAVを含有する、さらに別の組成物を、好適な担体とともに、同様に製剤化してもよい。そのような製剤化は、特に標的細胞への投与を対象とする、薬学的および/または生理学的に許容されるビヒクルまたは担体の使用を含む。一態様では、標的細胞への投与に適した担体として、緩衝生理食塩水、等張塩化ナトリウム溶液、または適切な生理学的レベルにpHを維持するための他の緩衝液、例えばHEPESのほか、任意で他の薬剤、医薬品、安定剤、緩衝液、担体、アジュバント、希釈剤などが挙げられる。

40

#### 【0097】

典型的には担体は注射用液である。例示的な生理学的に許容される担体は、無菌のピロジェンフリー水および無菌のピロジェンフリーリン酸緩衝生理食塩水を含む。一態様では、担体は等張塩化ナトリウム溶液である。他の例では、担体は平衡塩溶液である。他

50

の担体として、Tweenが挙げられる。ウイルスを長期間保存する場合、グリセロールまたはTween20の存在下で凍結される場合がある。

【0098】

本明細書に記載のcツペリン核酸分子を含有する組成物は、界面活性剤も含み得る。Pluronic F68 (Poloxamer 188、別名LUTROL (登録商標) F68) などの有用な界面活性剤が含まれていると、不活性表面にAAVが付着することを防止し、それにより望ましい用量を確実に送達することができる。例として、本明細書に記載のTSC2の変異によって引き起こされる疾患または障害、例えば結節性硬化症の治療に合わせて設計された例示的な組成物の一つは、哺乳動物対象の脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞でcツペリン核酸分子を発現する調節配列の制御下で、本明細書に記載のcツペリンをコードする核酸配列を運搬する組換えアデノ随伴ベクターと、薬学的に許容される担体とを含む。担体は等張塩化ナトリウム溶液であり、界面活性剤Pluronic F68が含まれる。一態様では、cツペリン核酸分子は、本明細書に記載されるもののいずれかである。

10

【0099】

さらに別の例示的な態様では、組成物は、代替りのcツペリン核酸分子を運搬する組換えAAV1またはAAV9偽型アデノ随伴ウイルスを含み、核酸配列が脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞でのcツペリン核酸分子の発現を誘導するプロモーターの制御下にあり、ここでの組成物は、皮膚投与または血管内、脳室内、頭蓋内、もしくは髄腔内注射に適した担体および追加成分とともに製剤化される。さらに別の態様では、担体、rAAV粒子、界面活性剤、および/またはrAAVを産生するための成分を含む、この組成物を作製またはアセンブリするための組成物または成分、ならびに組成物の調製に適した実験用ハードウェアをキットに組み込むことができる。

20

【0100】

さらに、本明細書では、cツペリン核酸分子を含む第1の薬学的組成物と、例えばラパマイシンおよびその類似薬を含む結節性硬化症の治療に使用される薬物を含む第2の薬学的組成物とを含むキットを提供する。いくつかの態様では、キットは、投与前に2つの薬学的組成物を混合するための説明書を含む。

【0101】

VI. 方法

上記の組成物は、TSC2の正常な対立遺伝子と置き換えることにより、TSC2の変異によって引き起こされる疾患または障害を治療する方法に有用である。そのような方法は、ある選択細胞にcツペリン核酸分子を送達しその標的細胞におけるTSC2の発現を修正するという条件下で、本明細書に記載のcツペリン核酸分子と標的TSC2遺伝子を接触させることを含む。したがって、方法および組成物は、特異的な変異および/または遺伝子発現に関連するTSC2の変異によって引き起こされる疾患または障害の治療に使用される。

30

【0102】

いくつかの態様では、cツペリン核酸分子、cツペリン核酸分子を含むEV、またはcツペリン核酸分子を含むrAAVは、脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞に投与される。いくつかの態様では、cツペリン核酸分子、cツペリン核酸分子を含むEV、またはcツペリン核酸分子を含むrAAVは、経皮的に、または血管内、脳室内、頭蓋内、もしくは髄腔内注射によって罹患対象に投与される。

40

【0103】

いくつかの態様では、方法は、TSC2の変異に関連する障害、例えば結節性硬化症を有する対象を治療するための、cツペリン核酸分子、cツペリン核酸分子を含むEV、またはcツペリン核酸分子を含むrAAVの投与を含む。対象の遺伝子型に基づいて、このような選択を行うことができる。いくつかの態様では、TSC2に関連する障害は常染色体優性障害であり得る。場合によって、対象は、TSC2の変異についてホモ接合体または複合ヘテロ接合体である。TSC2の特定の変異をスクリーニングおよび同定する方法は、当技術分野において公知である。

【0104】

50

## 投与および併用療法

本明細書では、標準的な投与方法を使用する。さらに、腎血管筋脂肪腫、リンパ脈管筋腫症（LAM）、および脳機能障害の治療のための投与、ならびに脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、または肺細胞への投与を以下に記載する。経皮、血管内、脳内、脳室内、または髄腔内注射による投与のための投与方法も記載する。

### 【0105】

本明細書に記載のcツペリン核酸分子を運搬する組換えアデノ随伴ウイルスの有効濃度は、約 $10^9 \sim 10^{15}$ ゲノムコピー（gc）/対象のkg体重（gc/kg）の範囲である。例えば、有効濃度は、 $10^9 \sim 10^{15}$ gc/kgの範囲、例えば $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、および $10^{15}$ gc/kgである。別の例では、有効濃度は、 $10^{10} \sim 10^{13}$ gc/kgの範囲、例えば $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、および $10^{13}$ gc/kgである。対象の年齢を含む、治療される対象の身体的状態；投与される組成物、および特定の障害；進行性の場合には障害が発症する標的細胞および程度を考慮して、上記の範囲内または他の単位の、さらに別の投与量が担当医によって選択されてもよい。

10

### 【0106】

#### 腎血管筋脂肪腫

例えば、cツペリン核酸分子を運搬するrAAVを使用して、腎血管筋脂肪腫を有する患者を治療することができる。任意の方法（例えば腎動脈または腎静脈への血管内注射などによる）に従って、rAAVを患者に投与することができる。血管内注射による腎血管筋脂肪腫の治療のためのrAAVの有効投与量は、 $10^9 \sim 10^{15}$ gc/kgである。一態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^9$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{10}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{11}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{12}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{13}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{14}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{15}$ gc/kgである。

20

### 【0107】

#### LAM

cツペリン核酸分子を運搬するrAAVは、リンパ脈管筋腫症（LAM）を有する患者の治療にも使用することができる。任意の方法（例えば血管内注射による）に従って、rAAVを患者に投与することができる。血管内注射によるLAMの治療のためのrAAVの有効投与量は、 $10^9 \sim 10^{15}$ gc/kgである。一態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^9$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{10}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{11}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{12}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{13}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{14}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{15}$ gc/kgである。さらに、鼻経路または他の医学的に承認された肺への経路を介して、LAMを有する患者にrAAVを投与することができる。

30

### 【0108】

#### 脳機能障害

別の例では、cツペリン核酸分子を運搬するrAAVを、脳機能障害を有する患者に使用することができる。任意の方法（例えば、血管内、脳室内、頭蓋内、または髄腔内注射による）に従って、rAAVを患者に投与することができる。

40

### 【0109】

血管内注射による脳機能障害の治療のためには、rAAVの有効投与量は、 $10^9 \sim 10^{15}$ gc/kgである。一態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^9$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{10}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{11}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{12}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{13}$

50

gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{14}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{15}$ gc/kgである。

#### 【0110】

さらに、脳室内注射による脳機能障害の治療のためには、rAAVの有効投与量は、 $10^{10}$ ～ $10^{13}$ gc/kgである。一態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{10}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{11}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{12}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{13}$ gc/kgである。

#### 【0111】

さらに、頭蓋内注射による脳機能障害の治療のためには、rAAVの有効投与量は、 $10^{10}$ ～ $10^{13}$ gc/kgである。一態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{10}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{11}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{12}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{13}$ gc/kgである。

#### 【0112】

さらに、髄腔内注射による脳機能障害の治療のためには、rAAVの有効投与量は、 $10^{10}$ ～ $10^{13}$ gc/kgである。一態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{10}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{11}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{12}$ gc/kgである。さらなる態様では、患者に投与されるrAAVの量は約 $10^{13}$ gc/kgである。

#### 【0113】

送達

治療する領域の大きさ、使用するウイルス力価、投与経路、および方法の望ましい効果に応じて、範囲内のすべての数を含む約50 $\mu$ L～約1mLの体積の組成物を送達することができる。一態様では、体積は約50 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約70 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約100 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約125 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約150 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約175 $\mu$ Lである。さらに別の態様では、体積は約200 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約250 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約300 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約350 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約400 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約450 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約500 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約600 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約750 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約850 $\mu$ Lである。別の態様では、体積は約1,000 $\mu$ Lである。

#### 【0114】

一態様では、標的細胞を有する特定の解剖学的領域のみが影響を受けるように、rAAV組成物の体積および濃度を選択する。別の態様では、標的器官、例えば脳、心臓、腎臓、皮膚、または肺のより広い部分に到達するように、rAAV組成物の体積および/または濃度の量を増加させる。同様に、他の器官に投与する場合は、それに合わせて投与量を調整する。

#### 【0115】

本明細書では、患者の結節性硬化症を治療する方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、腎血管筋脂肪腫、LAM、または脳機能障害を治療する方法を、対象に提供する。記載する方法のそれぞれについて、さらなる損傷の発生を予防する、または軽度もしくは進行性の疾患を有する組織を回復させるために、この治療を使用することができる。本明細書で使用される場合、用語「回復」とは、疾患の進行を予防すること、非損傷細胞への損傷の広がりを予防すること、または損傷細胞の損傷を改善することを意味する。

#### 【0116】

したがって、一態様では、組成物は疾患の発症前に投与される。別の態様では、組成物は症状の発症前に投与される。別の態様では、組成物は症状の発症後に投与される。さらに別の態様では、例えば参照組織と比較して、標的細胞の90%未満が機能しているか残存している場合に組成物が投与される。さらに別の態様では、例えば参照組織と比較して、



標的細胞の10%超が機能しているか残存している場合に組成物が投与される。さらに別の態様では、標的細胞の20%超が機能しているか残存している場合に組成物が投与される。さらに別の態様では、標的細胞の30%超が機能しているか残存している場合に組成物が投与される。

#### 【0117】

さらに別の態様では、上記の方法のいずれかを、別の治療、すなわち二次的な治療と組み合わせて実施する。治療は、このような変異もしくは欠損、またはそれに関連するいずれかの作用を予防、阻止、または改善するのに役立つ、何らかの現在公知の治療または今のところ未知の治療であり得る。二次治療は、cツペリン核酸分子または上記のようなcツペリン核酸分子を運搬するrAAVの投与前、投与と同時に、または投与後に投与することができる。一態様では、二次治療は、例えば抗痙攣発作薬の投与を含む、対象における痙攣発作の治療を含む。さらなる態様では、二次治療はラパマイシンの投与を含む。さらなる態様では、二次治療はラパマイシンの共投与を含む。ラパマイシンの投与または共投与は、結節性硬化症を有する対象に対するものであり得る。さらに、ラパマイシンの投与または共投与は、腎血管筋脂肪腫、LAM、または脳機能障害を有する対象に対するものであり得る。いくつかの態様では、ラパマイシンの投与または共投与は、幼児期の乳幼児痙攣発作時であり得る。さらなる態様では、ラパマイシンの投与または共投与は、例えばMRIによる、上衣下の過成長の検出後であり得る。さらなる態様では、体細胞性のツペリン機能の消失による過成長によって引き起こされる症状を理由に、それ以降の任意の時点でラパマイシンの投与または共投与が行われ得る。

#### 【0118】

これらの方法に使用する場合、各注射の量およびウイルス力価は個別に決定される。投与量、投与、およびレジメンは、本開示の教示を考慮して、担当医が決定することができる。

#### 【実施例】

#### 【0119】

以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。上記に示した一般的な説明を考慮して、様々な他の態様を実施できると理解される。

#### 【0120】

#### 実施例1.細胞培養

Tsc2ヌルマウス胚線維芽細胞 (MEF) (Huang et al., Biochem. J. 412(2):179-190 2008) および不死化TRI102ヒト血管筋脂肪腫細胞 (Hong et al., Mol. Cell. 30:701-711, 2008; Yu et al., Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 286:L694-L700, 2004) を、10%ウシ胎児血清 (FBS) (Sigma-Aldrich (登録商標), St. Louis, MO) および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Cellgro (登録商標)) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Cellgro (登録商標), Manassas, VA) 増殖培地中で増殖させ、5%CO<sub>2</sub>および95%空気の加湿雰囲気下、37℃に細胞を維持した。IRESエレメントによって隔てられた導入遺伝子とGFP cDNA両方の発現を制御するCMVプロモーターを有する自己不活性化レンチウイルスベクターであるCSCW-IG (Sena-Esteves et al., J. Virol. Methods. 122(2):131-139, 2004) を使用して、レンチウイルスベクターを作製した。Fluc (pGL3-basic; Promega (登録商標), Madison, WI) および単量体赤色蛍光タンパク質 (mCherry) (Rizzo et al., 2004) をコードするcDNAをPCRで増幅した。Fluc配列をCMVプロモーター下流のNhe I部位に直接挿入し、mCherry配列をGFP cDNAの代わりにBsa I部位およびSal I部位に挿入し、pCSCW-Fluc-IRES-mCherryを作製した。レンチウイルスベクターは1mlあたり10<sup>8</sup>~10<sup>10</sup>形質導入単位 (tu) の通常力価で記載のように作製した (Sena-Esteves et al., J. Virol. Methods. 122(2):131-139, 2004)。リンパ脈管筋腫症 (LAM) 細胞でFlucおよびmCherryの安定発現を得るため、感染多重度 (M.O.I) 100でCSCW-Fluc-IRES-mCherryレンチウイルスに感染させ、90%超の易感染性を得た (TSC2-LAM-FCと称する細胞株)。10%FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEMでCOS-7細胞を培養し、Lipofectamine (

商標) 3000 (Thermo Fisher Scientific (登録商標), Waltham, MA) を使用して、cツペリンのcDNAを含むプラスミドベクター (pAAV-CBA-cツペリン) をトランスフェクトした。

#### 【0121】

#### 実施例2.AAVベクターの設計およびパッケージング

AAVベクタープラスミドAAV-CBA-Cre-BGHpAをPrabhakar et al., PLoS One. 8(5):e64224, 2013に記載のように誘導した。これらのAAVベクターはAAV2 ITRエレメントを保有し、 $\alpha$ -アクチンプロモーターに融合されたCMV最初期遺伝子エンハンサーで構成されるハイブリッドプロモーター (ニワトリ  $\alpha$ -アクチン (CBA)) によって遺伝子発現が制御される (Gray et al., Hum. Gene Ther. 22:1143-1153 2011)。プラスミドpAAV-CBA-W (CSCW-IG) (Sena-Esteves et al., J. Virol. Methods. 122(2):131-139, 2004) からAAVベクタープラスミドAAV-CBA-cツペリンを誘導した。このベクターには、cツペリンを駆動するCBAプロモーターの後ろに、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) ならびにSV40およびウシ成長ホルモン (BGH) のポリアデニル化 (ポリA) シグナル配列が含まれる (図2C)。凝縮ツペリン (cツペリン) 構築物は、ACC (コザック配列) : : ヒトツペリンのアミノ酸1~450 : : gly / serリンカー : : ヒトツペリンのアミノ酸1515~1807 : : cmcタグを含む。2,307bpのcDNA配列は85 kDaのタンパク質をコードする (図1A)。

#### 【0122】

Broekman et al., Neuroscience. 138:501-510, 2006に以前に記載されているように、ベクタープラスミド (AAV-CBA-cツペリン-cmyc)、アデノウイルスヘルパープラスミドpF6、およびAAV9 (pXR9) またはAAV1 (pXR1) カプシド遺伝子をコードするプラスミドのリン酸カルシウム沈殿による、293T細胞の一過性同時トランスフェクションによって、AAV1およびAAV9血清型ベクターを作製した。シーケンスにより、すべてのPCR増幅配列の同一性を確認した。簡潔には、イオジキサノール密度勾配遠心分離によりAAVベクターを精製した。Amicon (登録商標) Ultra 100 kDa MWCO遠心装置 (EMD Millipore (登録商標), Billerica, MA) を使用してウイルスを含む画分を濃縮し、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルに特異的なプライマーおよびプローブを用いたリアルタイムPCR増幅により、力価 (ゲノムコピー (gc) / ml) を決定した。

#### 【0123】

#### 実施例3.ウェスタンブロット

簡潔には、溶解緩衝液 (50mM HEPES pH 8.0、150mM NaCl、2mM EDTA、2.5% ドデシル硫酸ナトリウム、2% CHAPS、2.5mMスクロース、10%グリセロール、10mM フッ化ナトリウム、2mMパナジン酸ナトリウム、1mM PMSF、10mMピロリン酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤カクテル) 中で培養細胞を溶解した。超音波処理と、8 で10分間のインキュベーションの後、試料を14,000gにて8 で30分間遠心分離した。界面活性剤対応プロテインアッセイキット (Bio-Rad (登録商標), Hercules, CA) で測定した等量のタンパク質を、Laemmli試料緩衝液中で5分間煮沸し、SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad (登録商標)) に転写した。タンパク質負荷量が等しいことをボンソーS染色により確認した。2%ブロッッキング試薬 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) で室温にて1時間、膜をブロッッキングし、一次抗体と4 で一晩インキュベートした。一次抗体として、抗ツペリン / TSC2 (#3612)、抗ホスホS6 (#2211)、抗S6 (#2212) (Cell Signaling Technology (登録商標))、および抗グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (#2275-PC) (Trevigen (登録商標), Gaithersburg, MD) 抗体を使用した。二次抗体として、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗ウサギまたは抗マウスIgG抗体を使用した。増強型化学発光試薬、Lumigen (登録商標) ECL Ultra (TMA-6) (Lumigen (登録商標), Southfield, MI) を使用して抗原抗体複合体を検出した。

#### 【0124】

#### 実施例4.動物および脳室内 (ICV) 注射

実験研究プロトコルは、実験動物の管理と使用に関する米国国立衛生研究所のガイドラインに従って、マサチューセッツ総合病院（MGH）のInstitutional Animal Care and Use Committee（IACUC）によって承認された。実験は、Tsc2<sup>c/c</sup> floxedマウス（Onda et al., J. Clin. Invest. 104(6):687-695, 1999）で実施した。Creレコンピナーゼに反応して、Tsc2<sup>c/c</sup>対立遺伝子はヌル対立遺伝子に変換され、lacZ対立遺伝子は -ガラクトシダーゼを発現する。これらのマウスは生存中、正常で健康である。

#### 【0125】

ベクターを注射する際は、出生日（生後0日（P0））またはP3で、新生仔に低温麻酔をかけ、速度2.4psi/秒でNarishige（登録商標）IM300マイクロインジェクター（Narishige International, East Meadow, NY）を使用して、ガラスマイクロピペット（先端の直径70～100μm）により、1μlまたは2μlのウイルスベクターAAV1-CBA-Creを各側脳室に注入した。その後、マウスを保温パッドの上に置き、新生仔マウスに特有の正常色と完全な活動状態を回復した後、母親の元に戻した。

10

#### 【0126】

##### 実施例5.後眼窩（RO）注射

3週齢（P21）のマウスをイソフルラン吸入により麻酔した（誘導室内で3.5%イソフルラン、その後、実験期間中、2～3%イソフルランおよび1～2リットル/分の酸素で麻酔を継続）。0.3mlのインスリンシリンジを使用して2分未満にわたり、片方の眼球の真後ろの血管系に70μl体積の溶液（10μlのAAV1-またはAAV9-CBA-cツベリン + 60μlの生理食塩水）でAAVベクターを後眼窩注射するか、または注射しなかった（Yardeni et al., Lab. Anim. (NY).40(5):155-160, 2011）。

20

#### 【0127】

##### 実施例6.皮下リンパ脈管筋腫症（LAM）モデル

Flucを発現する300万個のヒトTSC2ヌル不死化血管筋脂肪腫細胞を50μlの還元血清培地（Opti-MEM（登録商標）、Gibco（登録商標））に懸濁し、50μlのMatrigel（登録商標）（BD Matrigel（商標）Matrix HC）（BD Biosciences, Bedford, MA）と混合し、NOD-SCID II2Rガンマ（NSG（商標））マウスの背中に皮下移植した。4週間後、マウスにFluc基質D-ルシフェリン（LUCNA-1G）（Gold Biotechnology（登録商標）、St. Louis, MO）を腹腔内注射し、5分後に、XGI-8ガス麻酔システム（Caliper Life Sciences）を備える高効率のIVIS（登録商標）Spectrum（Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA）を用いてシグナルを取得した。

30

#### 【0128】

##### 実施例7.組織学および免疫組織化学（IHC）

Prabhakar et al., PLoS One. 8(5):e64224, 2013に記載されているように、マウス脳の標準組織学を実施した。5μmの切片をヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色するか、pS6（#2211, Cell Signaling）に対する抗体を、記載されている（同上）二次抗体とともに使用して、記載のように（同上）IHCに使用した。

#### 【0129】

##### 実施例8.統計解析

生存曲線の解析（カイ二乗検定）はすべて、GraphPad Prismソフトウェア（GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA）を使用して実施した。示されたP値は統計的有意である。

40

#### 【0130】

##### 実施例9.AAV-CBA-cツベリンベクタープラスミドをトランスフェクトしたCOS-7細胞におけるcツベリンの発現

実施例1の手順に従って、実施例2のAAV-CBA-cツベリンベクタープラスミドをCOS-7細胞にトランスフェクトした。24時間後、抗ツベリン/TSC2抗体を用いた前述の実施例に記載のウェスタンブロッティングにより、cツベリンの発現を検出した。図3Aに示すように、予想分子量（MW）85kDaにcツベリンの発現が認められた。

#### 【0131】

##### 実施例10.様々なAAV構築物をトランスフェクトしたCOS-7細胞におけるpS6キナーゼ活性

50

cツペリンの活性を試験するため、COS-7細胞に、GFP、pAAV-CBA-cTSC2、TSC2-FLAG、pAAV-CBA-cTSC2+TSC1-FLAG、TSC1-FLAG+TSC2-FLAG、およびTSC1-FLAGベクターをトランスフェクトした。リン酸化S6 (pS6)、S6、およびGAPDHの発現レベルを、ウェスタンブロッティングにより検出した。pS6キナーゼレベルは通常、ツペリン活性の非存在下では上昇するが、AAV-CBA-cツペリンプラスミドをトランスフェクトした細胞は、pS6キナーゼ活性の低下を示す、より低いpS6レベルを示した。これは図3Bに示されているが、それによると、他の細胞と比較して1列目 (GFP (対照)) および7列目 (対照、プラスミドなし) ではpS6レベルが上昇している。

#### 【0132】

実施例11.P0でAAV1-CBA-Creベクターを注射したマウス、P21でAAV9-CBA-cツペリンベクターを注射したマウス、および非注射マウスの生存性

10

AAV-CBA-cツペリンベクターの有効性をTsc2<sup>c/c</sup>マウスで試験した。脳室内 (ICV) および後眼窩 (RO) 注射は、前述の実施例に記載のように実施した。AAV1-CBA-CreベクターおよびAAV9-CBA-cツペリンベクターを上記のように作製した。P0でAAV1-CBA-CreをマウスにICV注射するか (N=16)、P21でAAV9-CBA-cツペリンをRO注射するか (N=7)、または注射しなかった (N=6)。AAV1-CBA-CreおよびAAV9-CBA-cツペリン注射の力価は、それぞれ $9.1 \times 10^{12}$  g.c./mlおよび $4.5 \times 10^{12}$  g.c./mlであった。生存期間中央値は、AAV1-CBA-Creマウスで35日、非注射マウスで175日超、AAV9-CBA-cツペリンマウスで185日超であった。群間の差は、P = 0.0001 (ログランク) またはP = 0.0001 (Gehan-Breslow-Wilcoxon) であり、いずれも統計的に有意であった。生存曲線を図4Aに示す。

20

#### 【0133】

実施例12.P0でAAV1-CBA-Creベクター、加えてP21でAAV1-CBA-cツペリンベクターを注射したマウスの生存性および組織学

AAV1-CBA-cツペリンベクターを用いた遺伝子治療の有効性を、ツペリンを欠失しているマウスで試験した。AAV1-CBA-cツペリンベクターは、前述の実施例に記載のように作製した。P0でAAV1-CBA-CreをすべてのマウスにICV注射した。P21では、マウスの1つの群にAAV1-CBA-cツペリンをRO注射し (N=7)、第2の群には注射しなかった (N=10)。AAV1-CBA-CreおよびAAV1-CBA-cツペリン注射の力価は、それぞれ $5.1 \times 10^{13}$  g.c./mlおよび $3 \times 10^{11}$  g.c./mlであった。非注射マウスの生存期間中央値は26.5日であったが、AAV1-CBA-cツペリンを注射したマウスは中央値で35日間生存した。2群間の差は、P=0.0001 (ログランク) またはP=0.0004 (Gehan-Breslow-Wilcoxon) であり、いずれも統計的に有意であった。生存曲線を図4Bに示す。

30

#### 【0134】

加えて、ツペリンを欠失しているマウスおよびAAV-CBA-cツペリンで処置したマウスの脳を、実施例7に記載のように実施したH&E染色またはpS6に対するIHCを使用して試験した。前述の実験と同じ設計に従って、P0でAAV1-CBA-Creを、P21でAAV1-CBA-cツペリンをTsc2<sup>c/c</sup>マウスに注射し、P27で殺した。結果を図5A~5Fに示す。図5Aは、注射していない正常な脳 (対照) の染色を示す。図5B~5Eは、P0でAAV1-CBA-Creのみを注射したマウスの染色を示し、上衣細胞の増殖 (図5B)、海馬の錐体細胞の拡大 (図5C)、上衣下結節 (図5D)、および多数の上衣下結節および増殖 (図5E) を示している。最後に、図5Fは、P21にAAV1-CBA-cツペリンで処置したマウスにおける、上衣下領域の極小の結節、炎症、浮腫を示している。

40

#### 【0135】

実施例13.P3でAAV1-CBA-Creベクター、加えてP21でAAV1-またはAAV9-CBA-cツペリンベクターを注射したマウスの生存性

AAV1-CBA-cツペリンベクターまたはAAV9-CBA-cツペリンベクターを用いた遺伝子治療の有効性を、以下の2つの実験でさらに試験した。P0ではなく、脳脊髄液 (CSF) 関門の通過性がP0よりもやや低いP3で最初にAAV1-CBA-Creをマウスに注射すると、脳内でのツペリンの消失が少なくなるはずである。

50

## 【 0 1 3 6 】

## AAV1-CBA-cツベリン

P3でAAV1-CBA-CreをすべてのTsc2<sup>c/c</sup>マウスにICV注射した。P21では、マウスの1つの群にAAV1-CBA-cツベリンをRO注射し(N=9)、第2の群には注射しなかった(N=7)。AAV1-CBA-CreおよびAAV1-CBA-cツベリン注射の力価は、それぞれ $5.1 \times 10^{13}$ g.c./mlおよび $3 \times 10^{11}$ g.c./mlであった。非注射マウスの生存期間中央値は36日であったが、AAV1-CBA-cツベリンを注射したマウスは中央値で54日間生存した。2群間の差は、P 0.0001 (ログランク) またはP=0.0004 (Gehan-Breslow-Wilcoxon) であり、いずれも統計的に有意であった。生存曲線を図4Cに示す。

## 【 0 1 3 7 】

## AAV9-CBA-cツベリン

P3でAAV1-CBA-CreをすべてのTsc2<sup>c/c</sup>マウスにICV注射した。P21では、マウスの1つの群にAAV9-CBA-cツベリンをRO注射し(N=11)、第2の群には注射しなかった(N=9)。AAV1-CBA-CreおよびAAV9-CBA-cツベリン注射の力価は、それぞれ $5.1 \times 10^{13}$ g.c./mlおよび $4.5 \times 10^{12}$ g.c./mlであった。非注射マウスの生存期間中央値は32日であったが、AAV9-CBA-cツベリンを注射したマウスは中央値で45日間生存した。2群間の差は、P 0.0006 (ログランク) またはP=0.0014 (Gehan-Breslow-Wilcoxon) であり、いずれも統計的に有意であった。生存曲線を図4Dに示す。

## 【 0 1 3 8 】

実施例14.AAV9-CBA-cツベリンベクターおよびピガバトリンを注射したマウスの生存性

治療用ベクターは痙攣発作を減少させる可能性もある。減少しない場合には、痙攣発作が、早期死、すなわち上衣下結節 (SEN) によって生じる水頭症に先立つ死の原因となり得る。Tsc1-floxed/GFAP-Creマウスにおいて、痙攣発作の阻止に有効であるピガバトリンと組み合わせたAAV9-CBA-cツベリンの有効性をさらに試験した (Zhang et al., PLoS One. 8(2):e57445, 2013)。

## 【 0 1 3 9 】

P0でAAV1-CBA-CreをすべてのマウスにICV注射した。P3では、マウスの1つの群にAAV9-CBA-cツベリンをRO注射し、第2の群には注射しなかった。注射したマウスのうち、1つの群をピガバトリン (50mg/kg) (N=7) で処置し、第2の群は処置しなかった (N=10)。注射していないマウスのうち、1つの群をピガバトリン (200mg/kg) (N=7) で処置し、第2の群は処置しなかった (N=8)。AAV1-CBA-CreおよびAAV9-CBA-cツベリンの力価は、それぞれ $5.1 \times 10^{13}$ g.c./mlおよび $4.5 \times 10^{12}$ g.c./mlであった。送達されたピガバトリンの用量は、AAV9-CBA-cツベリンを注射したマウスでは50mg/kg、非注射マウスでは200mg/kgであった。生存期間中央値は、非注射・薬物なしマウスで23日、非注射・ピガバトリン処置マウスで27日、注射あり薬物なしマウスで35.5日、および注射ありピガバトリン処置マウスで40日であった。AAV9-CBA-cツベリンを注射した2群間の差は、P 0.0001 (ログランク) またはP 0.0001 (Gehan-Breslow-Wilcoxon) であり、いずれも統計的に有意であった。

## 【 0 1 4 0 】

実施例15.インビボでのLAM腫瘍に対するAAV9-CBA-cツベリンの有効性

実施例4に記載のように作製した免疫不全NSGマウスに皮下注入されたリンパ脈管筋腫症 (LAM) 腫瘍に対するAAV9-CBA-cツベリンの有効性もインビボで試験した。Flucを発現するLAM腫瘍を図6Aに示す。1、4、6、9、および14週目に生物発光により腫瘍体積をモニターした。4週目および9週目にAAV9-CBA-cツベリンベクターを腫瘍に注射するか (N=7)、または注射しなかった (N=5)。AAV9-CBA-cツベリンベクターの力価は $4.3 \times 10^{10}$ g.c./mlであった。図6Bに示すように、cツベリンベクターを注射した腫瘍のサイズは14週目まで増加しなかったが、注射していない腫瘍の体積は拡張し続けた。

## 【 0 1 4 1 】

他の態様

理解を明確にする目的で、例示および実施例によって上述の発明をある程度詳細に説明

10

20

30

40

50

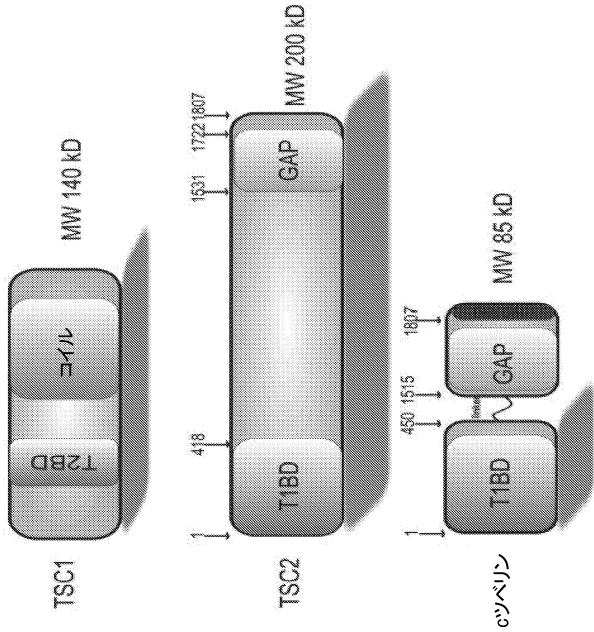
【 図 1 A 】

【 ㊦ 1 B 】

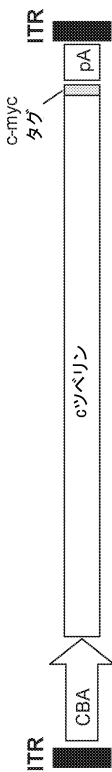
[illegible]

50

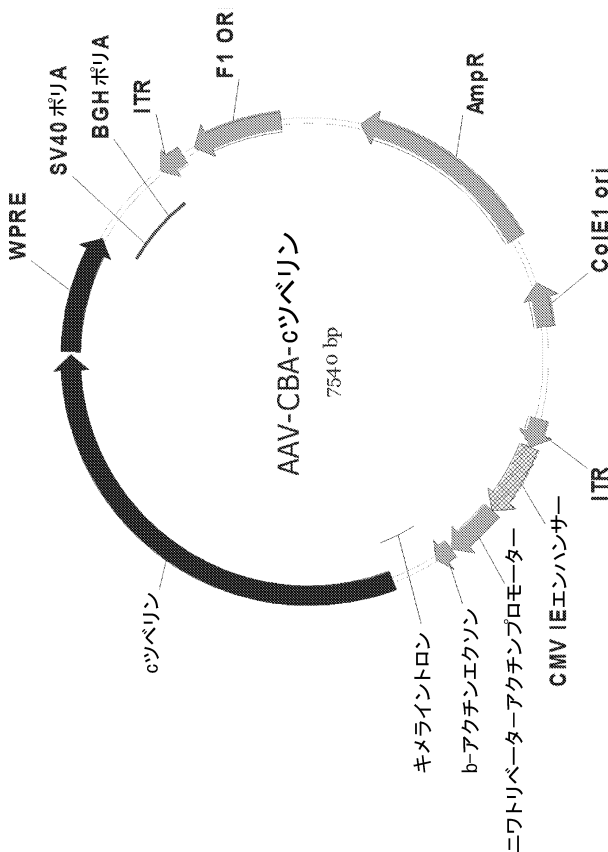
【図 2 A】



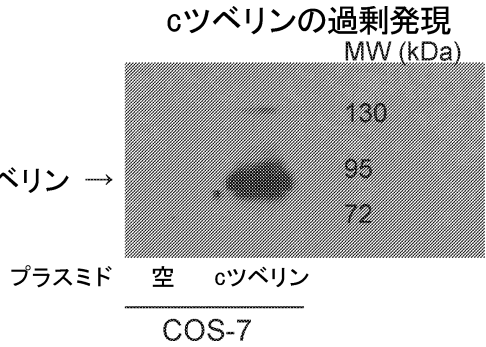
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 3 A】



10

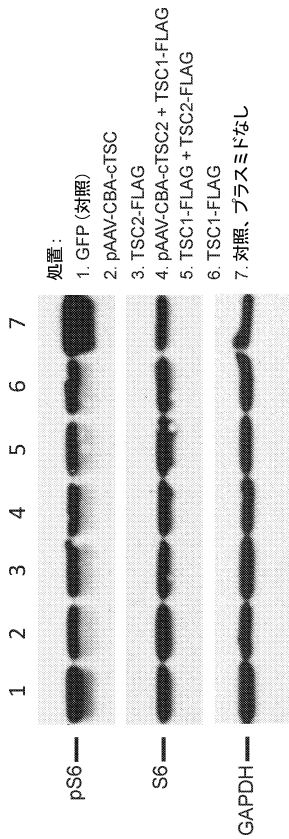
20

30

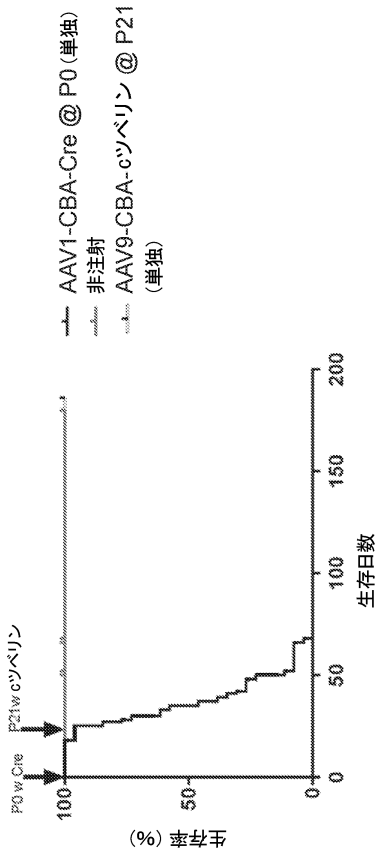
40

50

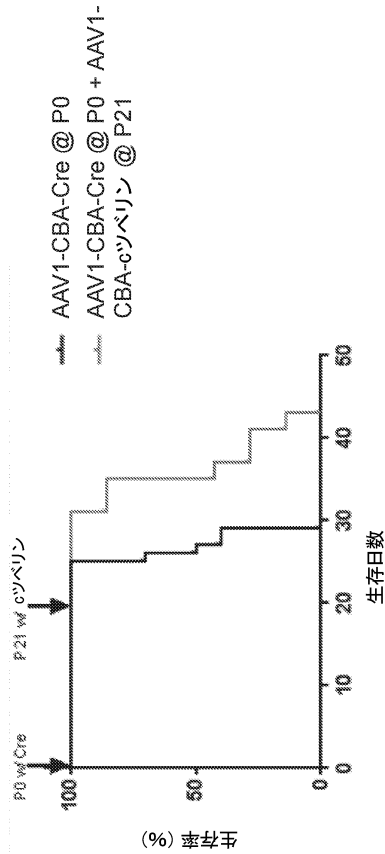
【図 3 B】



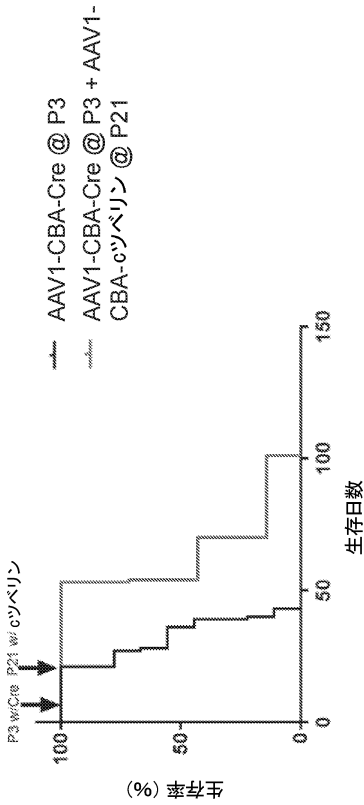
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

20

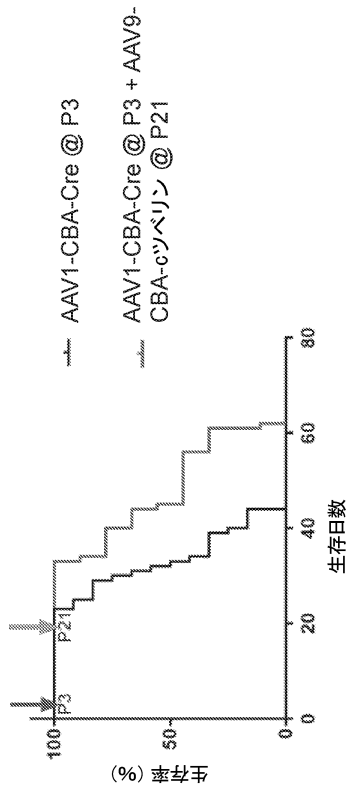
30

40

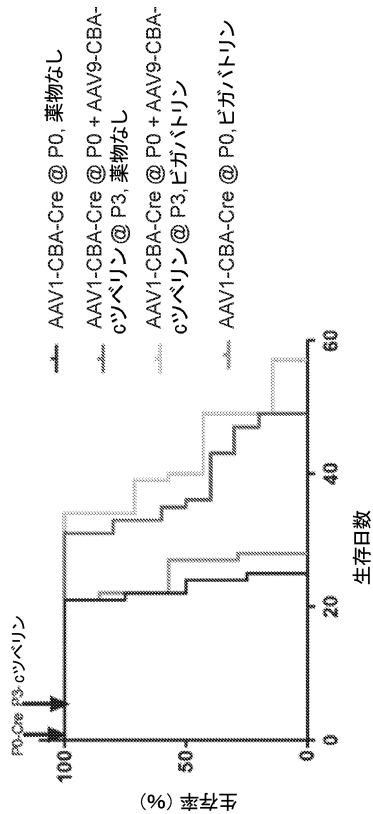
50



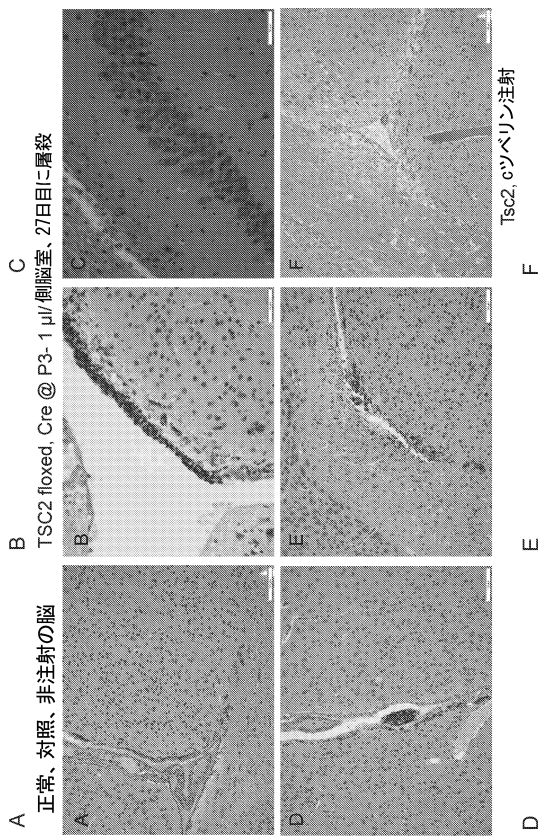
【図 4 D】



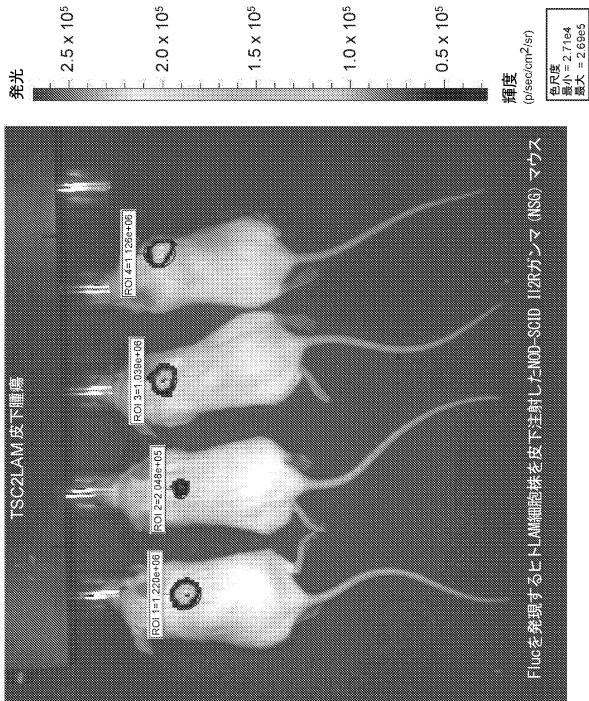
【図 4 E】



【図 5】



【図 6 A】



10

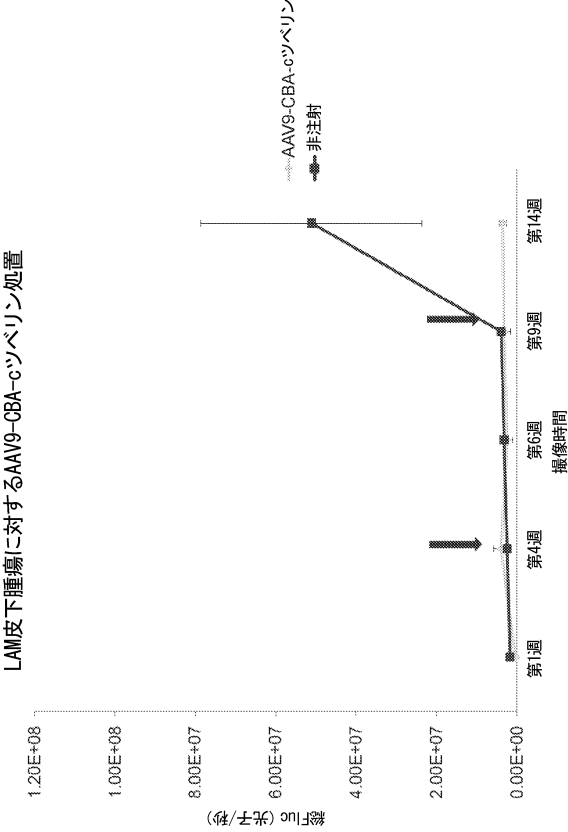
20

30

40

50

【図 6 B】



【配列表】

0007235676000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	31/436 (2006.01)	A 6 1 K	31/436	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ブリークフィールド サンドラ

アメリカ合衆国 0 2 4 5 9 マサチューセッツ州 ニュートン ホーマー ストリート 1 2 7

(72)発明者 マグワイヤ ケイシー

アメリカ合衆国 0 2 4 7 4 マサチューセッツ州 アーリントン カール ロード 3 2

(72)発明者 プラブハカー シルパ

アメリカ合衆国 0 2 1 8 4 マサチューセッツ州 ブレーンツリー オールド カントリー ウェイ  
1 0 8

(72)発明者 イエレン デイビッド

アメリカ合衆国 0 2 4 5 8 マサチューセッツ州 ニュートン クレメンツ ロード 4 7

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 0 2 0 1 1 8 ( W O , A 1 )

特表 2 0 0 5 - 5 3 5 3 3 2 ( J P , A )

Zech R et al. , Structure of the Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) N Terminus Provides I  
nsight into Complex Assembly and Tuberous Sclerosis Pathogenesis , J Biol Chem. , 2016  
年 , Vol. 291(38) , pp. 20008-20020Hudry E et al. , Exosome-associated AAV vector as a robust and convenient neuroscience to  
ol , Gene Ther. , 2016年 , Vol. 23(4) , pp. 380-392Plasmid: pcDNA3 , a d d g e n e [online] , 2015年 , URL: <https://web.archive.org/web/20150502120129/https://www.addgene.org/vector-database/2092/> , [retrieved on 3.17.2  
022]

AAV ベクター作製受託サービス , f u n a k o s h i n e w s , 2015年08月01日

Momose S et al. , Identification of the coding sequences responsible for Tsc2-mediated tum  
or suppression using a transgenic rat system , Human Molecular Genetics , 2002年 , Vol.  
11(24) , pp. 2997-3006Momose S et al. , N-terminal hamartin-binding and C-terminal GAP domain of tuberlin can s  
eparate in vivo , Biochem Biophys Res Commun. , 2007年 , Vol. 356(3) , pp. 693-698

Powell SK et al. , Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity

---

and expression in gene therapy , Discov Med. , 2015年 , Vol. 19(102) , pp. 49-57  
Inoki K et al. , TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling , Nature Cell Biology , 2002年 , Vol. 4(9) , pp. 648 -657

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d