

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6469000号
(P6469000)

(45) 発行日 平成31年2月13日(2019.2.13)

(24) 登録日 平成31年1月25日(2019.1.25)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 Z N A

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 25/28

A 6 1 K 47/46 (2006.01)

A 6 1 K 47/46

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

請求項の数 24 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-512644 (P2015-512644)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月14日 (2013.3.14)
 (65) 公表番号 特表2015-520161 (P2015-520161A)
 (43) 公表日 平成27年7月16日 (2015.7.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/031725
 (87) 国際公開番号 W02013/172964
 (87) 国際公開日 平成25年11月21日 (2013.11.21)
 審査請求日 平成28年3月11日 (2016.3.11)
 (31) 優先権主張番号 61/648,801
 (32) 優先日 平成24年5月18日 (2012.5.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 511293663
 ユニバーシティー オブ アイオワ リサ
 ーチ ファウンデーション
 アメリカ合衆国 アイオワ 52242,
 アイオワ シティ, ギルモア ホール, エ
 ス, キャピトル ストリート 2112
 (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 55
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドの沈着を処置するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非齧歯類哺乳動物におけるアルツハイマー病を処置するための組成物であって、該組成物は、A A V 2 カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、防御 A p o E アイソフォームタンパク質をコードする核酸であって、一対の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを含み、該組成物が、該哺乳動物における上皮細胞に感染するのに有効な様式で該哺乳動物の脳脊髄液 (C S F) に投与されることを特徴とし、該上皮細胞が、該アルツハイマー病を処置するように該 A p o E を分泌し、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 9 0 % の相同性を有する変異体である、組成物。

【請求項 2】

防御 A p o E アイソフォームを非齧歯類哺乳動物の中枢神経系に送達するための組成物であって、該組成物は、A A V 2 カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、該防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一対の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを含み、上皮細胞が該 A p o E を該哺乳動物の脳脊髄液 (C S F) に分泌するように、該組成物が、該哺乳動物における該上皮細胞に感染するのに有効な様式で該哺乳動物の C S F に投与されることを特徴とし、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 9 0 % の相同性を有する変異体である、組成物。

【請求項 3】

非齧歯類哺乳動物における疾患を処置するための組成物であって、該組成物は、 A A V 2 カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、防御 A p o E アイソフォームタンパク質をコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを含み、該組成物が、該哺乳動物の上衣細胞に投与され、該核酸が該上衣細胞に送達されることを特徴とし、該上衣細胞が、該疾患を処置するように該 A p o E タンパク質を分泌し、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 90 % の相同性を有する変異体である、組成物。

【請求項 4】

防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸を非齧歯類哺乳動物の上衣細胞に送達するための組成物であって、該組成物は、 A A V 2 カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された該核酸を含むベクターとを含み、該組成物が、該上衣細胞に投与され、該核酸が該上衣細胞に送達されることを特徴とし、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 90 % の相同性を有する変異体である、組成物。

10

【請求項 5】

防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸を非齧歯類哺乳動物に送達するための組成物であって、該組成物は、 A A V 2 カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された該核酸を含むベクターとを含み、該組成物が、該哺乳動物由来の上衣細胞に投与され、該上衣細胞が該哺乳動物に戻され、該核酸が該哺乳動物に送達されることを特徴し、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 90 % の相同性を有する変異体である、組成物。

20

【請求項 6】

防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸を非齧歯類哺乳動物における上衣細胞に送達するための組成物であって、該組成物は、 A A V 2 カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された該核酸を含むベクターとを含み、該核酸が該哺乳動物における上衣細胞に送達され、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 90 % の相同性を有する変異体である、組成物。

【請求項 7】

非齧歯類哺乳動物脳の上衣細胞をトランスフェクトするための組成物であって、該組成物は、 A A V 2 カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを含み、該上衣細胞が該 A p o E タンパク質を該哺乳動物の脳脊髄液 (C S F) に分泌するように、該組成物が、該哺乳動物における上衣細胞に感染するのに有効な様式で該哺乳動物の C S F に投与されることを特徴とし、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 90 % の相同性を有する変異体である、組成物。

30

【請求項 8】

前記非齧歯類哺乳動物が霊長類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタまたはイヌである、請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 9】

前記非齧歯類哺乳動物がイヌである、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記非齧歯類哺乳動物が霊長類である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記霊長類がヒトである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記防御 A p o E アイソフォームが A p o E 2 と 100 % の相同性を有する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

50

非齧歯類哺乳動物における上衣細胞をトランスフェクトして治療結果をもたらすのに使用するための r A A V 粒子を含む組成物であって、該組成物は、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有し、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 90 % の同一性を有する変異体であり、該ベクターが A A V 2 ベクターである、組成物。

【請求項 14】

前記非齧歯類哺乳動物が霊長類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタまたはイヌである、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記非齧歯類哺乳動物がイヌである、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記非齧歯類哺乳動物が霊長類である、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記霊長類がヒトである、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記タンパク質が A p o E 2 と 100 % の同一性を有する、請求項 13 ~ 17 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

ヒトなどの非齧歯類動物におけるアルツハイマー病の処置または予防に有用な医薬を製造するための r A A V 粒子の使用であって、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有する r A A V 粒子の使用であって、該核酸が該動物における上衣細胞に送達され、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 90 % の同一性を有する変異体であり、該ベクターが A A V 2 ベクターである、使用。

【請求項 20】

非齧歯類動物におけるアルツハイマー病を処置するためのキットであって、該キットは、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有する r A A V 粒子の化合物と、容器と、C S F への該 A A V 粒子の投与を指示する添付文書またはラベルとを含み、該核酸が該動物における上衣細胞に送達され、該防御 A p o E アイソフォームが、A p o E 2 または A p o E 2 と少なくとも 90 % の同一性を有する変異体であり、該ベクターが A A V 2 ベクターである、キット。

【請求項 21】

前記 r A A V 粒子が r A A V 2 粒子である、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

前記 r A A V 粒子が r A A V 2 粒子である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 23】

前記防御 A p o E アイソフォームタンパク質が、A p o E 2 と 100 % の同一性を有する、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 24】

前記防御 A p o E アイソフォームタンパク質が、A p o E 2 と 100 % の同一性を有する、請求項 20 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2012年5月18日に出願された米国特許出願第 61 / 648 , 801 号の優先権の利益を請求し、その出願は、本開示に参照によって組み込まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

連邦政府の補助金援助

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金 R C 1 A G 0 3 6 2 6 5 による国庫補助によってなされた。政府は本発明における特定の権利を有する。

【 0 0 0 3 】

配列表

本出願は、E F S - W e b を介して A S C I I フォーマットで提出された配列表（これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を含有する。2013年3月12日に作成された前記 A S C I I コピーは 1 7 0 2 3 . 1 2 2 W O 1 . t x t という名称であり、サイズが 2 0 , 2 3 4 バイトである。

10

【背景技術】

【 0 0 0 4 】

背景

遺伝子導入は、細胞および分子レベル両方で生物学的現象および疾患過程を分析するための強力なツールとして現在広く認識されている。より最近では、遺伝性（例えば、A D A 欠損症）または後天性（例えば、癌または感染性疾患）のヒト疾患の処置のための遺伝子療法の適用がかなり注目されている。改良された遺伝子導入技術の出現および絶えず拡大する欠陥遺伝子関連疾患ライブラリーの識別により、遺伝子療法は処置理論から実際の現実のものへと急速に発展している。

【 0 0 0 5 】

伝統的に、遺伝子療法は、先天性遺伝子エラーを訂正するために患者の細胞に外因性遺伝子を患者の細胞に導入する手段と定義されている。より最近では、遺伝子療法は、罹患生物への新規遺伝情報の導入による疾患表現型の訂正と広く定義されている。インビボ遺伝子療法では、導入遺伝子をインサイチュで（すなわち、レシピエント内で）レシピエント生物の細胞に導入する。インビボ遺伝子療法は動物モデルで実験されている。臓器および組織、例えば、筋肉、造血幹細胞、動脈壁、神経系および肺へのインサイチュでの直接遺伝子導入の実行可能性が報告されている。D N A の骨格筋、心筋への直接注射および D N A - 脂質複合体の血管系への注射もまた、検出可能な発現レベルの挿入遺伝子産物をインビボで生成すると報告されている。

20

【 0 0 0 6 】

中枢神経系（C N S）疾患、例えば、アルツハイマー病などの遺伝性脳疾患の処置は、依然として解決困難な問題である。脳疾患の処置の主な問題は、治療用タンパク質が、静脈内送達の場合には血液脳関門を通過せず、または脳への直接送達の場合には広く分布しないことである。したがって、アルツハイマー病を処置するための治療法を開発する必要がある。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

概要

ある特定の実施形態では、本発明は、哺乳動物におけるアルツハイマー病を処置する方法であって、A A V カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、防御 A p o E アイソフォームタンパク質をコードする核酸であって、前記非齧歯類哺乳動物における上皮細胞に感染するのに有効な様式で一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを前記哺乳動物の脳脊髄液（C S F）に投与することを含み、前記上皮細胞が、前記疾患を処置するように前記 A p o E を分泌する方法を提供する。本明細書で使用される場合、用語「防御 A p o E アイソフォーム」は、アルツハイマー病のリスクを少なくとも 5 %、例えば 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 % またはそれ以上低減する A p o E アイソフォームを識別するのに使用される。

40

【 0 0 0 8 】

50

ある特定の実施形態では、本発明は、防御A p o Eアイソフォームを非齧歯類哺乳動物の中樞神経系に送達する方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸であって、前記非齧歯類哺乳動物における上皮細胞に感染するのに有効な様式で一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを、前記上皮細胞が前記A p o Eを前記哺乳動物のC S Fに分泌するように、前記非齧歯類哺乳動物の脳脊髄液(C S F)に投与することを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、r A A V粒子は、A A V 4の感染率よりも20%超高い比率、例えば、A A V 4の感染率よりも50%超または100%、1000%または2000%高い比率で、非齧歯類上皮細胞に感染するr A A V 2粒子である。

【0009】

10

ある特定の実施形態では、本発明は、非齧歯類哺乳動物における疾患を処置する方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、防御A p o Eアイソフォームタンパク質をコードする核酸であって、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを前記哺乳動物の上皮細胞に投与し、それにより、前記核酸を前記上皮細胞に送達することを含み、前記上皮細胞が、前記疾患を処置するように前記A p o Eタンパク質を分泌する方法を提供する。本発明は、核酸を哺乳動物における上皮細胞に送達する方法であって、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むA A V粒子を前記哺乳動物に投与し、それにより、前記核酸を前記哺乳動物における上皮細胞に送達することを含む方法を提供する。

【0010】

20

ある特定の実施形態では、本発明は、防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸を哺乳動物の上皮細胞に送達する方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むベクターとを前記上皮細胞に投与し、それにより、前記核酸を前記上皮細胞に送達することを含む方法を提供する。

【0011】

ある特定の実施形態では、本発明は、防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸を哺乳動物に送達する方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むベクターとを前記哺乳動物由来の上皮細胞に投与すること、および前記上皮細胞を前記哺乳動物に戻し、それにより、前記核酸を前記哺乳動物に送達することを含む方法を提供する。

30

【0012】

ある特定の実施形態では、本発明は、防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸を哺乳動物における上皮細胞に送達する方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むベクターとを前記哺乳動物に投与し、それにより、前記核酸を前記哺乳動物における上皮細胞に送達することを含む方法を提供する。

【0013】

ある特定の実施形態では、本発明は、哺乳動物脳の上皮細胞をトランスフェクトする方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸であって、前記哺乳動物における上皮細胞に感染するのに有効な様式で一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを、前記上皮細胞が前記薬剤を前記哺乳動物のC S Fに分泌するように、前記哺乳動物の脳脊髄液(C S F)に投与することを含む方法を提供する。

40

【0014】

ある特定の実施形態では、哺乳動物は非齧歯類哺乳動物である。ある特定の実施形態では、非齧歯類哺乳動物は、霊長類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタまたはイヌである。ある特定の実施形態では、霊長類はヒトである。

【0015】

ある特定の実施形態では、防御A p o Eアイソフォームは、A p o E 2と少なくとも

50

約 80 % の相同性を有する。ある特定の実施形態では、防御 A p o E アイソフォームは、A p o E 2 と 100 % の相同性を有する。

【 0 0 1 6 】

ある特定の実施形態では、A A V 粒子は r A A V 4 粒子である。ある特定の実施形態では、A A V 粒子は r A A V 2 粒子である。ある特定の実施形態では、r A A V 2 カプシドは、A A V 2 カプシドタンパク質 V P 1、V P 2 および / または V P 3 と少なくとも 80 % の相同性を有する。ある特定の実施形態では、r A A V 2 カプシドは、A A V 2 カプシド V P 1、V P 2 および / または V P 3 と 100 % の相同性を有する。

【 0 0 1 7 】

ある特定の実施形態では、本発明は、哺乳動物における上衣細胞をトランスフェクトして治療結果をもたらすのに使用するための r A A V 粒子であって、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有する r A A V 粒子を提供する。

10

【 0 0 1 8 】

ある特定の実施形態では、本発明は、ヒトなどの動物におけるアルツハイマー病の処置または予防に有用な医薬を製造するための r A A V 粒子の使用であって、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有する r A A V 粒子の使用を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明は、医学的な処置または診断に使用するための上記細胞を提供する。

20

【 0 0 2 0 】

本発明は、哺乳動物におけるアルツハイマー病を処置するのに有用な医薬を調製するための上記細胞を提供する。

【 0 0 2 1 】

ある特定の実施形態では、本発明は、動物におけるアルツハイマー病を処置するためのキットであって、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有する r A A V 粒子の化合物と、容器と、C S F への前記 A A V 粒子の投与を指示する添付文書またはラベルとを含むキットを提供する。

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

30

(項目 1)

哺乳動物におけるアルツハイマー病を処置する方法であって、A A V カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、防御 A p o E アイソフォームタンパク質をコードする核酸であって、該哺乳動物における上衣細胞に感染するのに有効な様式で一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを該哺乳動物の脳脊髄液 (C S F) に投与することを含み、該上衣細胞が、該アルツハイマー病を処置するように該 A p o E を分泌する、方法。

(項目 2)

防御 A p o E アイソフォームを哺乳動物の中枢神経系に送達する方法であって、A A V カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、該防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、該哺乳動物における上衣細胞に感染するのに有効な様式で一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを、該上衣細胞が該 A p o E を該哺乳動物の脳脊髄液 (C S F) に分泌するように、該哺乳動物の C S F に投与することを含む、方法。

40

(項目 3)

哺乳動物における疾患を処置する方法であって、A A V カプシドタンパク質を含む r A A V 粒子と、防御 A p o E アイソフォームタンパク質をコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを該哺乳動物の上衣細胞に投与し、それにより、該核酸を該上衣細胞に送達することを含み、該上衣細胞が、該疾患を処置するように該 A p o E タンパク質を分泌する、方法。

50

(項目4)

防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸を哺乳動物の上衣細胞に送達する方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された該核酸を含むベクターとを該上衣細胞に投与し、それにより、該核酸を該上衣細胞に送達することを含む、方法。

(項目5)

防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸を哺乳動物に送達する方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された該核酸を含むベクターとを該哺乳動物由来の上衣細胞に投与すること、および該上衣細胞を該哺乳動物に戻し、それにより、該核酸を該哺乳動物に送達することを含む、方法。

10

(項目6)

防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸を哺乳動物における上衣細胞に送達する方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された該核酸を含むベクターとを該哺乳動物に投与し、それにより、該核酸を該哺乳動物における上衣細胞に送達することを含む、方法。

(項目7)

哺乳動物脳の上衣細胞をトランスフェクトする方法であって、A A Vカプシドタンパク質を含むr A A V粒子と、防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸であって、該哺乳動物における上衣細胞に感染するのに有効な様式で一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターとを、該上衣細胞が該薬剤を該哺乳動物の脳脊髄液(C S F)に分泌するように、該哺乳動物のC S Fに投与することを含む、方法。

20

(項目8)

前記哺乳動物が非齧歯類哺乳動物である、項目1～7のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記非齧歯類哺乳動物が霊長類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタまたはイヌである、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記非齧歯類哺乳動物がイヌである、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記非齧歯類哺乳動物が霊長類である、項目9に記載の方法。

30

(項目12)

前記霊長類がヒトである、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記防御A p o EアイソフォームがA p o E 2と80%の同一性を有する、項目1～12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記防御A p o EアイソフォームがA p o E 2と100%の同一性を有する、項目1～12のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

哺乳動物における上衣細胞をトランスフェクトして治療結果をもたらすのに使用するためのr A A V粒子であって、防御A p o Eアイソフォームをコードする核酸であって、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有する、r A A V粒子。

40

(項目16)

前記哺乳動物が非齧歯類哺乳動物である、項目15に記載のr A A V粒子。

(項目17)

前記非齧歯類哺乳動物が霊長類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタまたはイヌである、項目16に記載のr A A V粒子。

(項目18)

50

前記非齧歯類哺乳動物がイヌである、項目 17 に記載の r A A V 粒子。

(項目 19)

前記非齧歯類哺乳動物が霊長類である、項目 17 に記載の r A A V 粒子。

(項目 20)

前記霊長類がヒトである、項目 19 に記載の r A A V 粒子。

(項目 21)

前記防御 A p o E アイソフォームが A p o E 2 と 80 % の相同性を有する、項目 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の r A A V 粒子。

(項目 22)

前記タンパク質が A p o E 2 と 100 % の相同性を有する、項目 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の r A A V 粒子。

10

(項目 23)

ヒトなどの動物におけるアルツハイマー病の処置または予防に有用な医薬を製造するための r A A V 粒子の使用であって、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有する r A A V 粒子の使用。

(請求項 24)

動物におけるアルツハイマー病を処置するためのキットであって、防御 A p o E アイソフォームをコードする核酸であって、一对の A A V 逆方向末端リピート間に挿入された核酸を含むベクターを含有する r A A V 粒子の化合物と、容器と、C S F への該 A A V 粒子の投与を指示する添付文書またはラベルとを含む、キット。

20

【図面の簡単な説明】

【 0022 】

【図 1】A A V 4 - A p o E を脳室内注射すると、脳で h u A P O E が安定的に発現し、組換え h u A p o E タンパク質が持続的に検出される。

【 0023 】

【図 2】各 A p o E アイソフォームの、過剰発現は、アミロイドーシスの進行に差次的に影響を与える。

【 0024 】

【図 3】アミロイドプラークのサイズは、各 A p o E アイソフォームによって異なる。

30

【 0025 】

【図 4】アミロイド負荷の死後評価により、アミロイド沈着に対する A p o E 2 および A p o E 4 の効果を確認する。

【 0026 】

【図 5】各 A p o E アイソフォーム (i s f o r m) は、アミロイド沈着周囲のシナプス密度に差次的に影響を与える。

【 0027 】

【図 6 A - 6 B】図 6 A は、A A V 2 (配列番号 1) および A A V 4 (配列番号 2) タンパク質のアライメントであり、図 6 B は、A A V 2 (配列番号 3) および A A V 4 (配列番号 4) ヌクレオチドのアライメントであり、これらは A A V 2 (N C _ 0 0 1 4 0 1) および A A V 4 (N C _ 0 0 1 8 2 9) の配列に基づくものである。

40

【 0028 】

【図 7】図 7 は、様々な脳領域における T P P 1 活性の上昇を示す。

【 0029 】

【図 8】図 8 は、対照および処置イヌの T 迷路行動の結果を示す。白丸は、罹患イヌのものである；黒四角は、正常なイヌのものであり、黒丸は、A A V 2 - C L N 2 で処置した T P P - / - イヌのものである。

【 0030 】

【図 9】図 9 A ~ 9 B。A A V 血清型 4 の脳室内注射による A P O E 遺伝子導入法の検証。G F P または A p o E の免疫組織標識により、上衣および脈絡叢における G F P または

50

ヒト A p o E タンパク質の存在が明らかになった。(A) 種特異的 E L I S A アッセイを使用して、注射マウスの脳ホモジネート内の組換えヒト A p o E タンパク質濃度を定量した。(B) マウス 1 匹当たりの内因性 a p o E と比較した、ヒト A p o E タンパク質の割合の評価。ヒト A p o E とマウス内因性 a p o E との比を、各動物について計算した。特異的抗ヒト A p o E 抗体 3 H 1 を使用して、組換えタンパク質の存在がいくつかのアミロイド沈着周囲で検出することができたところ、それは、A P P / P S 1 注射マウスの皮質実質内に蓄積する傾向がある。A A V 4 - A P O E 4 ベクターを注射した a p o E ノックアウト (K O) マウスの I S F 試料におけるウエスタンブロットによる A p o E の検出。M i l l i p o r e 製の高感度 (しかし、非種特異的) ヤギ抗 a p o E 抗体 (A B 9 4 7) を検出抗体として使用した。アルブミンを対照として使用した。n = 動物 4 ~ 6 匹 / 群。* p < 0 . 0 5。

10

【 0 0 3 1 】

【図 1 0 - 1】A ペプチドのレベルおよびアミロイド沈着密度は、異なる A P O E 対立遺伝子の過剰発現によって調節される。(A) 注射トランスジェニックマウスの皮質 (左のパネル) および海馬 (右のパネル) におけるアミロイド沈着密度の分析。両脳領域間で同様の傾向を観察することができたが、データは皮質においてのみ統計的に有意に達した。(B) ギ酸 (F A) 画分における A₄₀ および A₄₂ ペプチド濃度の E L I S A による決定。(C) 各 A A V を脳室内注射した 5 カ月後の T B S 可溶性画分における A₄₀ および A₄₂ ペプチドレベルの E L I S A による定量。(D) A A V - G F P および A A V - A P O E 2 / 3 / 4 ベクターを A P P / P S 1 マウスに脳室内注射した 5 カ月後の血漿 A₄₀ ペプチドレベルの定量。n = 動物 4 ~ 7 匹 / 群。* p < 0 . 0 5

20

【図 1 0 - 2】A ペプチドのレベルおよびアミロイド沈着密度は、異なる A P O E 対立遺伝子の過剰発現によって調節される。(A) 注射トランスジェニックマウスの皮質 (左のパネル) および海馬 (右のパネル) におけるアミロイド沈着密度の分析。両脳領域間で同様の傾向を観察することができたが、データは皮質においてのみ統計的に有意に達した。(B) ギ酸 (F A) 画分における A₄₀ および A₄₂ ペプチド濃度の E L I S A による決定。(C) 各 A A V を脳室内注射した 5 カ月後の T B S 可溶性画分における A₄₀ および A₄₂ ペプチドレベルの E L I S A による定量。(D) A A V - G F P および A A V - A P O E 2 / 3 / 4 ベクターを A P P / P S 1 マウスに脳室内注射した 5 カ月後の血漿 A₄₀ ペプチドレベルの定量。n = 動物 4 ~ 7 匹 / 群。* p < 0 . 0 5

30

【 0 0 3 2 】

【図 1 1】各 A P O E 変異体の過剰発現は、インビボにおけるアミロイドーシスの進行を調節する。A A V - G F P、- A P O E 2、- 3 または - 4 ベクターを脳室内注射した 1 週間 (T 0)、1 カ月 (T 1) および 2 カ月 (T 2) 後の A P P / P S 1 マウスにおけるアミロイド沈着のインビボ二光子画像を現像した。同じ視野を経時的に追跡することができるよう、デキストラン、T e x a s r e d (7 0 , 0 0 0 D a) の静脈内注射をイメージング前に実施した。2 カ月の期間内では、いくつかの新たなアミロイドプラークを検出することができたのに対して、当初目に見えた偶発的な沈着は、1 または 2 カ月後にはもはや検出不可能であった。(A) A A V - G F P、- A P O E 2、- A P O E 3 または A P O E 4 を 7 カ月齢の A P P / P S 1 マウスに脳室内注射した後 2 カ月間にわたるアミロイド沈着の体積皮質密度の評価。各動物について 6 ~ 8 つの視野を縦方向にイメージングし、皮質体積当たりのプラーク密度を計算し、ベースライン (T 0) における各動物の初期値に対して報告した。アミロイド沈着密度 0 . 2 3 の全体的な進行が経時的に観察された (T 2 / T 1、p < 0 . 0 1 1)。加えて、A p o E 2 は密度を有意に、G F P との比較では 0 . 6 6 (s e = 0 . 2 1、p = 0 . 0 0 2)、A p o E 3 との比較では 0 . 6 7 (s e = 0 . 1 7、p < 0 . 0 0 0 1) および A p o E 4 との比較では 0 . 7 4 (s e = 0 . 1 7、p < 0 . 0 0 0 1) 減少させる。(B) A P P / P S 1 マウスにおける遺伝子導入後 2 カ月間にわたるアミロイドーシス進行の線形回帰フィットは、A A V - A P O E 4 のみがこの期間中に有意な正の斜線をもたらすことを示している。n = 動物 4 ~ 6 匹 / 群。* p < 0 . 0 5。

40

50

【0033】

【図12】ApoE2、-3および-4を注入した1または2カ月後のアミロイド沈着サイズの変遷。T1とT0との間のプラークサイズの比を表す散布ドットプロットにより、1カ月後において、ApoE4は、ApoE2およびApoE3の両方と比較して増加したプラーク成長に関連していたことが示された。2カ月後において、この効果は持続していない。n>測定したプラーク50個/群(動物3~4匹以内)。*p<0.05。

【0034】

【図13-1】アミロイド沈着に関連する神経病理学的変化は、各APOE変異体によって差次的に影響を受ける。AAV-GFP、-APOE2、-APOE3および-APOE4を脳室内注射した2カ月後のAPP/PS1マウスにおけるPSD95(シナプス後要素)およびアミロイド沈着について免疫染色したアレイトモグラフィ切片の画像を作成した。毒性Aオリゴマー種を選択的に標識することを先に示した抗体NAB61を使用して、アミロイド沈着を標識した。(A)APOE3およびAPOE4の両方を発現させた場合のアミロイドプラーク周辺では、GFPまたはAPOE2と比較して有意に多くのシナプシン1マーカの消失が観察された。(B)シナプス後要素を定量したところ同様の効果が観察され、AAV4-APOE4を脳室内注射した2カ月後において、沈着周囲のPSD95密度が減少していた。ThioSおよび軸索マーカーSMI312について免疫染色した後に、注射APP/PS1マウスの脳において、神経病理学的変化のさらなるパラメータとして、アミロイドプラーク当たりの神経突起ジストロフィーの数を評価した。(C)ApoE4をマウスに注入した場合、ApoE3およびApoE2群と比較して、ジストロフィーの数がより多くなる有意な傾向が観察されたが、これは、ApoE4がアミロイドプラーク形成の他にも有害効果を有し、より小さなオリゴマーアミロイド凝集体の神経毒性潜在能力を調節し得ることを示唆している。n=動物4~6匹/群。*p<0.05。

【図13-2】アミロイド沈着に関連する神経病理学的変化は、各APOE変異体によって差次的に影響を受ける。AAV-GFP、-APOE2、-APOE3および-APOE4を脳室内注射した2カ月後のAPP/PS1マウスにおけるPSD95(シナプス後要素)およびアミロイド沈着について免疫染色したアレイトモグラフィ切片の画像を作成した。毒性Aオリゴマー種を選択的に標識することを先に示した抗体NAB61を使用して、アミロイド沈着を標識した。(A)APOE3およびAPOE4の両方を発現させた場合のアミロイドプラーク周辺では、GFPまたはAPOE2と比較して有意に多くのシナプシン1マーカの消失が観察された。(B)シナプス後要素を定量したところ同様の効果が観察され、AAV4-APOE4を脳室内注射した2カ月後において、沈着周囲のPSD95密度が減少していた。ThioSおよび軸索マーカーSMI312について免疫染色した後に、注射APP/PS1マウスの脳において、神経病理学的変化のさらなるパラメータとして、アミロイドプラーク当たりの神経突起ジストロフィーの数を評価した。(C)ApoE4をマウスに注入した場合、ApoE3およびApoE2群と比較して、ジストロフィーの数がより多くなる有意な傾向が観察されたが、これは、ApoE4がアミロイドプラーク形成の他にも有害効果を有し、より小さなオリゴマーアミロイド凝集体の神経毒性潜在能力を調節し得ることを示唆している。n=動物4~6匹/群。*p<0.05。

【0035】

【図14】Tg2576マウスでAAV4-APOE2、-3、-4を脳室内注射した後のISFでは、オリゴマーA種の含有量の初期変化が観察される。82E1/82E1ELISAアッセイを使用したISFのoA含有量の定量は、AAV4-APOE4注射後において、オリゴマーアミロイド種の濃度がAAV4-APOE2および-GFPと比較して高いのに対して、AAV4-APOE3注射マウスは中間レベルに達したことを示している。n=動物3~6匹/群。*p<0.05。

【0036】

【図15-1】APP/PS1マウスでAAV4を脳室内注射した後のヒトおよび内因性

10

20

30

40

50

マウス A P O E m R N A およびタンパク質の検出。(A) 注射マウスの脳における内因性マウス a p o E タンパク質の量を表すボックスプロットグラフ。(B) A P P / P S 1 マウスで A A V 4 を脳室内注射した 2 および 5 カ月後の A p o E タンパク質レベルの比較 (A P O E 変異体を区別せずに、2 および 5 カ月の時点において、すべての A p o E 注射マウス由来の試料を共にプールした)。n = 動物 4 ~ 6 匹 / 群。* p < 0 . 0 5。

【図 1 5 - 2】A P P / P S 1 マウスで A A V 4 を脳室内注射した後のヒトおよび内因性マウス A P O E m R N A およびタンパク質の検出。(A) 注射マウスの脳における内因性マウス a p o E タンパク質の量を表すボックスプロットグラフ。(B) A P P / P S 1 マウスで A A V 4 を脳室内注射した 2 および 5 カ月後の A p o E タンパク質レベルの比較 (A P O E 変異体を区別せずに、2 および 5 カ月の時点において、すべての A p o E 注射マウス由来の試料を共にプールした)。n = 動物 4 ~ 6 匹 / 群。* p < 0 . 0 5。

10

【0 0 3 7】

【図 1 6 - 1】短期 (2 カ月間) 曝露後において、A に対する効果は、各 A p o E アイソフォームに関連している。注射 2 カ月後の A P P / P S 1 マウスにおけるアミロイド沈着の画像を作成した。B a m 1 0 抗体および T h i o S の両方を使用した免疫染色を使用して、それぞれすべてのアミロイド沈着または高密度コアブランクを染色した。(A) 皮質におけるアミロイド沈着密度の立体分析により、A P O E 4 を過剰発現させると早ければ注射 2 カ月後にブランク数が増加したのに対して、他の実験群間では差異が観察されなかったことが明らかになった。(B) 他方、B a m 1 0 と T h i o S 染色との間の比は、すべての異なる群間で依然として不変であった。(C) 異なる A p o E 変異体を短期曝露した後の不溶性ギ酸抽出物中の A₄₀ (左のパネル) および A₄₂ (右のパネル) ペプチド濃度の決定。n = 動物 3 ~ 5 匹 / 群。* p < 0 . 0 5。

20

【図 1 6 - 2】短期 (2 カ月間) 曝露後において、A に対する効果は、各 A p o E アイソフォームに関連している。注射 2 カ月後の A P P / P S 1 マウスにおけるアミロイド沈着の画像を作成した。B a m 1 0 抗体および T h i o S の両方を使用した免疫染色を使用して、それぞれすべてのアミロイド沈着または高密度コアブランクを染色した。(A) 皮質におけるアミロイド沈着密度の立体分析により、A P O E 4 を過剰発現させると早ければ注射 2 カ月後にブランク数が増加したのに対して、他の実験群間では差異が観察されなかったことが明らかになった。(B) 他方、B a m 1 0 と T h i o S 染色との間の比は、すべての異なる群間で依然として不変であった。(C) 異なる A p o E 変異体を短期曝露した後の不溶性ギ酸抽出物中の A₄₀ (左のパネル) および A₄₂ (右のパネル) ペプチド濃度の決定。n = 動物 3 ~ 5 匹 / 群。* p < 0 . 0 5。

30

【0 0 3 8】

【図 1 7】T g 2 5 7 6 マウスにおける注射 3 カ月後に検出された可溶性および不溶性 A 種の変化。(A) E L I S A による I S F の A₄₀ および A₄₂ (B) 含有量の定量は、A A V 4 - A P O E 4 注射後の可溶性アミロイド ペプチド濃度が、A A V 4 - A P O E 2、- A P O E 3 および - G F P と比較して高い傾向があることを示している。(B) A P P / P S 1 マウスで先に観察されたように、A p o E 4 でより強い効果が観察され、これが、T g 2 5 7 6 マウスのギ酸画分における A₄₂ の量が有意に高い原因である。n = 動物 3 ~ 5 匹 / 群。* p < 0 . 0 5。

40

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 9】

詳細な説明

いくつかの異なるヒトアポリポタンパク質 E (A p o E) アイソフォームがあり、これらのアイソフォームのいくつかは脳に存在することはアルツハイマー病 (A D) のリスクを増加させるのに対して、他のアイソフォームの存在は A D のリスクを減少させる。A p o E 4 アイソフォームの存在は、遅発性散発性 A D の強力な遺伝的リスク因子である。(C a s e l l a n o ら、S c i T r a n s l M e d , 3 (8 9) : 8 9 r a 5 7 (2 9 J u n e 2 0 1 1) .)。A p o E 4 対立遺伝子は A D のリスクを強く増加させ、発症年齢を低下させる。他方、A p o E 2 対立遺伝子の存在は、A D のリスクを減

50

小させると思われる。ヒト A p o E アイソフォームは、インビボでアミロイド (A) のクリアランスまたは合成に差次的に影響を与えることが示唆されている。

【 0 0 4 0 】

アデノ随伴ウイルス (A A V) は、パルボウイルス科の小型の非病原性ウイルスである。A A V は、複製をヘルパーウイルスに依存する点でこの科の他のメンバーと区別可能である。ヘルパーウイルスの非存在下では、A A V は、第 1 9 染色体の q 腕に遺伝子座特異的に組み込まれ得る。A A V の約 5 k b のゲノムは、+ または - いずれかの極性の一本鎖 DNA の 1 つのセグメントからなる。ゲノム末端は短い逆方向末端リピートであり、ヘアピン構造にフォールディングしてウイルス DNA の複製起点として機能し得る。物理的には、パルボウイルスピリオンは、エンベロープで包まれておらず、その正二十面体カプシドは、直径約 2 0 n m である。

10

【 0 0 4 1 】

今日までに、血清学的に区別可能な 8 つの A A V が同定されており、5 つがヒトまたは霊長類から単離されたものであり、A A V 1 ~ 5 型と称される。Govindasamy ら、" Structurally Mapping the Diverse Phenotype of Adeno - Associated Virus Serotype 4 , " J . Vir . , 8 0 (2 3) : 1 1 5 5 6 - 1 1 5 7 0 (2 0 0 6) 。 A A V 2 のゲノムは長さが 4 6 8 0 ヌクレオチドであり、2 つのオープンリーディングフレーム (O R F) を含有する。左側の O R F は、非構造的 R e p タンパク質 R e p 4 0 、 R e p 5 2 、 R e p 6 8 および R e p 7 8 をコードし、これらは、一本鎖子孫ゲノムの産生に加えて複製および転写の調節に関与する。さらに、R e p タンパク質の 2 つが、ヒト第 1 9 染色体の q 腕領域への A A V ゲノムの選択的な組み込みに関連している。R e p 6 8 / 7 8 もまた、N T P 結合活性ならびに DNA および RNA ヘリカーゼ活性を有することが示されている。R e p タンパク質は、核局在化シグナルおよびいくつかの潜在的リン酸化部位を有する。これらのキナーゼ部位の 1 つの突然変異は、複製活性の喪失をもたらした。

20

【 0 0 4 2 】

ゲノム末端は短い逆方向末端リピート (I T R) であり、ウイルス DNA の複製起点として機能する T 型ヘアピン構造にフォールディングする可能性がある。I T R 領域内において、2 つの要素 (G A G C 反復モチーフおよび末端解離部位 (t r s)) が I T R の機能の中心であると言われている。この反復モチーフは、I T R が直線またはヘアピン構造のいずれかである場合に、R e p に結合することが示されている。この結合は、部位および鎖特異的に起こる t r s における切断のために R e p 6 8 / 7 8 を配置するのに役立つ。複製におけるその役割に加えて、これら 2 つの要素は、ウイルス組み込みの中心であると思われる。隣接する t r s を含む R e p 結合部位が、第 1 9 染色体組み込み遺伝子座内に含まれている。これらの要素は、遺伝子座特異的組み込みに機能的および必要であることが示されている。

30

【 0 0 4 3 】

A A V 2 ピリオンは、エンベロープで包まれていない直径約 2 5 n m の正二十面体粒子であり、V P 1 、V P 2 および V P 3 と称される 3 つの関連タンパク質からなる。右側の O R F は、カプシドタンパク質 V P 1 、V P 2 および V P 3 をコードする。これらのタンパク質はそれぞれ 1 : 1 : 1 0 の比で見られ、すべてが右側の O R F にすべて由来する。このカプシドタンパク質は、選択的スプライシングおよび珍しい開始コドンの使用によって互いに異なる。欠失分析により、選択的スプライシングされたメッセージから翻訳された V P 1 の除去または変化は、感染生粒子の産生量の減少をもたらすことが示されている。V P 3 コード領域内の突然変異は、いかなる一本鎖子孫 DNA および感染性粒子も生産することができなくする。A A V 2 粒子は、A A V 2 カプシドタンパク質を含むウイルス粒子である。A A V 2 カプシドポリペプチドは、V P 1 、V P 2 および V P 3 のポリペプチド全体をコードし得る。粒子は、A A V 2 および他の A A V カプシドタンパク質を含む粒子 (すなわち、A A V 4 および A A V 2 などのキメラタンパク質) であり得る。A A V 2 カプシドを含む得られたウイルス粒子が、標準的な方法によってルーチンに決定した場

40

50

合に A A V 4 と抗原的または免疫学的に依然として区別可能である限り、本明細書では、A A V 2 カプシドタンパク質のアミノ酸配列の変化が企図される。具体的には、例えば、E L I S A およびウエスタンブロットを使用して、ウイルス粒子が A A V 4 と抗原的または免疫学的に区別可能であるかを決定することができる。さらに、A A V 2 ウイルス粒子は、好ましくは、A A V 4 と区別可能な組織親和性を保持する。

【 0 0 4 4 】

A A V 2 粒子は、A A V 2 カプシドタンパク質を含むウイルス粒子である。V P 1、V P 2 および V P 3 ポリペプチド全体をコードする A A V 2 カプシドポリペプチドは全体的に、配列番号 1 に記載されているヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド (A A V 2 カプシドタンパク質) と少なくとも約 6 3 % の相同性 (または同一性) を有し得る。カプシドタンパク質は、配列番号 1 に記載されているタンパク質と約 7 0 % の相同性、約 7 5 % の相同性、8 0 % の相同性、8 5 % の相同性、9 0 % の相同性、9 5 % の相同性、9 8 % の相同性、9 9 % の相同性またはさらに 1 0 0 % の相同性を有し得る。カプシドタンパク質は、配列番号 1 に記載されているタンパク質と約 7 0 % の同一性、約 7 5 % の同一性、8 0 % の同一性、8 5 % の同一性、9 0 % の同一性、9 5 % の同一性、9 8 % の同一性、9 9 % の同一性またはさらに 1 0 0 % の同一性を有し得る。粒子は、A A V 4 および A A V 2 カプシドタンパク質の両方を含む粒子 (すなわち、キメラタンパク質) であり得る。A A V 2 カプシドを含む得られたウイルス粒子が、標準的な方法によってルーチンに決定した場合に A A V 4 と抗原的または免疫学的に依然として区別可能である限り、本明細書では、A A V 2 カプシドタンパク質のアミノ酸配列の変化が企図される。具体的には、例えば、E L I S A およびウエスタンブロットを使用して、ウイルス粒子が A A V 4 と抗原的または免疫学的に区別可能であるかを決定することができる。さらに、A A V 2 ウイルス粒子は、好ましくは、A A V 4 と区別可能な組織親和性 (例えば、本明細書の実施例に例示されているもの) を保持するが、少なくとも 1 つの A A V 2 コートタンパク質を含む A A V 2 キメラ粒子は、A A V 2 コートタンパク質のみからなる A A V 2 粒子のものと異なる組織親和性を有し得る。

【 0 0 4 5 】

図 6 A および 6 B に示されているように、A A V 2 カプシド配列および A A V 4 カプシド配列は、約 6 0 % 相同である。ある特定の実施形態では、A A V 2 カプシドは、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 6 5 % 相同の配列を含む (または、からなる)。

【 0 0 4 6 】

ある特定の実施形態では、本発明はさらに、一対の A A V 2 逆方向末端リピートを含むベクターを含有する (すなわち、カプシド化する) A A V 2 粒子を提供する。A A V 2 I T R のヌクレオチド配列は、当技術分野で公知である。さらに、粒子は、A A V 4 および A A V 2 カプシドタンパク質の両方を含む粒子 (すなわち、キメラタンパク質) であり得る。また、粒子は、他の A A V (例えば、A A V 1 ~ A A V 8) 由来の一対の A A V 逆方向末端リピートを含むベクターをカプシド化する粒子であり得る。粒子中にカプシド化されたベクターは、逆方向末端リピート間に挿入された外因性核酸をさらに含み得る。

【 0 0 4 7 】

A A V の以下の特徴によって、A A V は、魅力的な遺伝子導入用ベクターとなっている。A A V ベクターは、インピトロで細胞のゲノムに安定に組み込まれ; 広い宿主域を有し; インピトロおよびインピボで、分裂細胞および非分裂細胞の両方に形質導入して高レベルの形質導入遺伝子の発現を維持することが示されている。ウイルス粒子は熱安定性であり、溶媒、界面活性剤、p H 変化、温度に耐性であり、C s C l 勾配で濃縮され得る。A A V プロウイルスの組み込みは、細胞の成長または分化に対するいかなる長期の負の効果にも関連しない。I T R は、複製、パッケージングおよび組み込みに必要とされる唯一のシス要素であり、いくつかのプロモーター活性を含有し得ることが示されている。

【 0 0 4 8 】

本発明は、A A V 粒子、組換え A A V ベクターおよび組換え A A V ビリオンを投与する

方法を提供する。例えば、A A V 2 粒子は、A A V 2 カプシドタンパク質を含むウイルス粒子であり、またはA A V 4 粒子は、A A V 4 カプシドタンパク質を含むウイルス粒子である。組換えA A V 2 ベクターは、A A V 2 の少なくとも1つのユニークな核酸を含む核酸構築物である。組換えA A V 2 ビリオンは、組換えA A V 2 ベクターを含有する粒子である。用語「A A V 2 I T R」の範囲内であるとみなされるためには、ヌクレオチド配列は、A A V 2 I T RをA A V 4 I T Rと区別する本明細書に記載される特徴：(1)(A A V 4 のように4つではなく)3つの「G A G C」リピート、および(2)A A V 2 I T R R e p 結合部位において、最初の2つの「G A G C」リピートの4番目のヌクレオチドがTではなくCであること、の一方または両方を保持しなければならない。

【0049】

プロモーターは、そのプロモーターに機能的に連結された核酸の発現レベル、およびベクターを使用すべき細胞型などの公知の検討事項によって選択される任意の所望のプロモーターであり得る。プロモーターは、外因性または内因性プロモーターであり得る。プロモーターとしては、例えば、公知の強力なプロモーター、例えばS V 4 0 または誘導性メタロチオネインプロモーター、またはA A V プロモーター、例えばA A V p 5 プロモーターが挙げられ得る。プロモーターのさらなる例としては、アクチン遺伝子、免疫グロブリン遺伝子由来のプロモーター、サイトメガロウイルス(C M V)、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、アデノウイルスプロモーター、例えばアデノウイルス主要後期プロモーター、誘導性熱ショックプロモーター、呼吸器合胞体ウイルス、ラウス肉腫ウイルス(R S V)などが挙げられる。具体的には、プロモーターは、A A V 2 p 5 プロモーターまたはA A V 4 p 5 プロモーターであり得る。さらに、プロモーター活性を保持するより小さなp 5 プロモーター断片は、例えば、一連の欠失をp 5 プロモーターに構築すること、前記欠失をレポーター遺伝子に関連付けること、および前記レポーター遺伝子が発現(すなわち、転写および/または翻訳)されるかを決定することを含む標準的な手順によって容易に決定することができる。

【0050】

A A V ベクターは、プロモーターに機能的に連結された外因性(異種)核酸をさらに含む得る。「異種核酸」は、任意の異種または外来性核酸が、細胞、組織または生物への導入用のベクターに挿入され得ることを意味する。例えば、ある特定の実施形態では、異種核酸は、防御A p o E アイソフォームをコードする。「機能的に連結された」は、プロモーターが、当技術分野で公知のように異種核酸の発現を促進し得るようなこと、例えば、異種核酸に対するプロモーターの適切な方向を意味する。さらに、異種核酸は、好ましくは、機能的にコードする(すなわち、核酸の発現を可能にする)ために当技術分野で公知の核酸の発現に適切なすべての配列を有する。核酸は、例えば、発現制御配列、例えばエンハンサーおよび必要な情報処理部位、例えばリボソーム結合部位、R N A スプライス部位、ポリアデニル化部位および転写ターミネーター配列を含み得る。核酸は、パッケージングされ得る核酸のサイズによってのみ制限される複数の遺伝子産物をコードし得る。

【0051】

A A V 2 粒子は、A A V 2 カプシドタンパク質を含むウイルス粒子である。A A V 2 カプシドを含む得られたウイルス粒子が、標準的な方法によってルーチンに決定した場合にA A V 4 と抗原的または免疫学的に依然として区別可能である限り、本明細書では、A A V 2 カプシドタンパク質のアミノ酸配列の変化が企図される。具体的には、例えば、E L I S A およびウエスタンブロットを使用して、ウイルス粒子が他のA A V 血清型と抗原的または免疫学的に区別可能であるかを決定することができる。

【0052】

A A V 4 は、A A V ファミリーのユニークなメンバーである。A A V 4 についての議論は、米国特許第6,468,524号(これは、参照により本明細書に組み込まれる)に示されている。D N A ハイブリダイゼーションデータにより、A A V 1 ~ 4 について類似レベルの相同性が示された。しかしながら、他のA A V とは対照的に、A A V 4 では、カプシドタンパク質に対応するO R F が1つしか同定されず、R e p タンパク質については

10

20

30

40

50

ORFが検出されなかった。本発明は、AAV4ウイルスおよびAAV4ウイルス粒子を含むベクターを提供する。AAV4はAAV2に類似するが、この2つのウイルスは、物理的および遺伝的に区別可能であることが本明細書で見出されている。これらの差異は、それを遺伝子療法用ベクターとしてより適したものにすいくつかのユニークな利点をAAV4に与える。例えば、野生型AAV4ゲノムはAAV2よりも大きく、より大きな組換えゲノムの効率的なカプシド化を可能にする。さらに、野生型AAV4粒子はAAV2粒子よりも大きい浮遊密度を有するので、混入したヘルパーウイルスおよび空のAAV粒子から、AAV2ベースの粒子よりも容易に分離される。加えて、AAV1、2および3とは対照的に、AAV4は、ヒト、モルモットおよびヒツジ赤血球を凝集させることができる。

10

【0053】

ある特定の実施形態では、本発明は、AAV5ウイルスを含むベクター、またはこのウイルスのサブパート(subpart)を含むベクター、ならびにAAV5ウイルス粒子を提供する。米国特許第6,855,314号(これは、参照により本明細書に組み込まれる)には、AAV5についての議論が示されている。AAV5はAAV2に類似するが、この2つのウイルスは、物理的および遺伝的に区別可能であることが本明細書で見出されている。これらの差異は、それを遺伝子療法用ベクターとしてより適したものにすいくつかのユニークな利点および特性をAAV5に与える。例えば、AAV2を遺伝子療法用ベクターとして使用することの限定的特徴の1つは、大量のウイルスの生産である。標準的な生産技術を使用して、AAV5は、AAV2と比較して10~50倍高いレベルで生産される。そのユニークなTRS部位およびrepタンパク質により、AAV5はまた、AAV2と比較して区別可能な組み込み遺伝子座を有するはずである。

20

【0054】

さらに、AAV5カプシドタンパク質は、また驚くべきことに、AAV2カプシドタンパク質と区別可能であり異なる組織親和性を示すので、AAV5カプシドを含有する粒子は、AAV2が不適切であるかまたは十分に適切ではない細胞型に形質導入するのに適切である。AAV2およびAAV5は血清学的に区別可能であることが示されているので、遺伝子療法適用において、AAV5およびAAV5由来のベクターは、天然の免疫学的防御の結果として、または過去にAAV2ベクターに曝露されたことによりAAV2に対する中和抗体を既に保有する患者の形質導入を可能にする。AAV5の別の利点は、AAV5が他の血清型によってレスキューされ得ないことである。AAV5のみが、組み込まれたAAV5ゲノムをレスキューして複製をもたらし、それにより他のAAV血清型によって引き起こされる非意図的なAAV5複製を回避することができる。

30

【0055】

本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、アミノ酸のポリマーを指し、全長タンパク質およびその断片を含む。したがって、「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、本明細書では互換的に使用されることが多い。置換は、中立であるように公知のパラメータによって選択され得る。当業者であれば理解するように、本発明はまた、アミノ酸配列または他の特性にわずかな変化を有するポリペプチドを含む。このような変化は、(例えば、遺伝的多型に起因する)対立遺伝子の変化として天然に生じ得るか、または誘導点突然変異体、欠失突然変異体、挿入突然変異体および置換突然変異体の誘導などの人為的介入によって(例えば、クローニングされたDNA配列の突然変異誘発によって)生成され得る。アミノ酸配列の軽微な変化(例えば、保存的アミノ酸置換、小さな内部欠失または挿入、および分子末端における付加または欠失)が一般に好ましい。これらの改変は、アミノ酸配列の変化をもたらし得るか、サイレント突然変異を提供し得るか、制限部位を改変し得るか、または他の特定の突然変異を提供し得る。

40

【0056】

本方法は、核酸を細胞に送達する方法であって、一对のAAV逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むベクターを含有するAAV粒子を前記細胞に投与し、それにより、前記核酸を前記細胞に送達することを含む方法を提供する。場合により所望の液体(

50

例えば、組織培養培地または緩衝生理食塩水溶液)に含まれる粒子と細胞とを単に接触させることを含む任意の手段によって、細胞への投与を達成することができる。任意の所望の長さの時間にわたって粒子を細胞と接触した状態にすることができ、典型的には粒子を投与して無期限に放置することができる。このようなインピトロ方法の場合、ウイルスは、当技術分野で公知の、および本明細書に例示される標準的なウイルス形質導入法によって細胞に投与することができる。投与するウイルスの力価は、特に細胞型に応じて変化し得るが、A A V形質導入に一般に使用されるものに典型的なものであろう。加えて、本実施例で特定の細胞に形質導入するのに使用した力価を利用することができる。細胞としては、ヒトならびに他の大型(非齧歯類)哺乳動物、例えば霊長類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタおよびイヌにおける任意の所望の細胞が挙げられ得る。

10

【0057】

より具体的には、本発明は、核酸を上衣細胞に送達する方法であって、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むベクターを含有するA A V粒子を前記上衣細胞に投与し、それにより、前記核酸を前記上衣細胞に送達することを含む方法を提供する。

【0058】

本発明はまた、核酸を被験体に送達する方法であって、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むA A V粒子を前記被験体由来の細胞に投与すること、および前記細胞を前記被験体に戻し、それにより、前記核酸を前記被験体に送達することを含む方法を含む。ある特定の実施形態では、A A V I T Rは、A A V 2 I T Rであり得る。例えば、このようなエキスピボ投与では、細胞型にしたがって標準的な手段によって細胞を被験体から単離し、再び細胞型にしたがって適切な培養培地に配置する。次いで、上記のようにウイルス粒子を細胞と接触させ、ウイルスを細胞にトランスフェクトさせる。次いで、再び細胞型および組織について標準的な手段によって、細胞を被験体の身体に再移植し得る。所望であれば、移植前に、公知の検出手段によって、本明細書に記載されるように、ウイルスによるトランスフェクションの程度について細胞を研究し得る。

20

【0059】

本発明はさらに、核酸を被験体における細胞に送達する方法であって、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むA A V粒子を前記被験体に投与し、それにより、前記核酸を前記被験体における細胞に送達することを含む方法を提供する。投与は、被験体から取り出した細胞(例えば、上記で列挙した細胞のいずれか)への直接的なエキスピボ投与であり得、続いて細胞を被験体に戻して交換し得るか、または投与は、被験体における細胞へのインピボ投与であり得る。エキスピボ投与の場合、細胞型にしたがって標準的な手段によって細胞を被験体から単離し、再び細胞型にしたがって適切な培養培地に配置する。次いで、上記のようにウイルス粒子を細胞と接触させ、ウイルスを細胞にトランスフェクトさせる。次いで、再び細胞型および組織について標準的な手段によって、細胞を被験体の身体に再移植し得る。所望であれば、移植前に、公知の検出手段によって、本明細書に記載されるように、ウイルスによるトランスフェクションの程度について細胞を研究し得る。

30

【0060】

また、核酸を被験体における上衣細胞に送達する方法であって、一对のA A V逆方向末端リピート間に挿入された前記核酸を含むA A V粒子を前記被験体に投与し、それにより、前記核酸を前記被験体における上衣細胞に送達することを含む方法提供される。

40

【0061】

ある特定の実施形態では、脳血管内皮を標的とするアミノ酸配列は、疾患、例えばアルツハイマー病を有する被験体における脳血管内皮を標的とする。

【0062】

ある特定の実施形態では、脳血管内皮を標的とするアミノ酸配列は、アルツハイマー病を有しない被験体における脳血管内皮を標的とする。

【0063】

50

ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、治療剤をコードする核酸配列を含む。
ある特定の実施形態では、治療剤は、防御 A p o E アイソフォームである。

【 0 0 6 4 】

本開示のある特定の実施形態は、本明細書に記載されるウイルスベクターを含む細胞を提供する。

【 0 0 6 5 】

ある特定の実施形態では、細胞は、非齧歯類哺乳動物の哺乳動物細胞である。ある特定の
実施形態では、細胞は霊長類細胞である。ある特定の実施形態では、細胞はヒト細胞で
ある。ある特定の実施形態では、細胞は非ヒト細胞である。ある特定の実施形態では、細胞
はインビトロである。ある特定の実施形態では、細胞はインビボである。ある特定の実
施形態では、細胞は上皮細胞である。

10

【 0 0 6 6 】

本開示のある特定の実施形態は、哺乳動物における疾患を処置する方法であって、本明
細書に記載されるウイルスベクターまたは細胞を前記哺乳動物に投与することを含む方法
を提供する。

【 0 0 6 7 】

ある特定の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【 0 0 6 8 】

本開示のある特定の実施形態は、薬剤を被験体の中枢神経系に送達する方法であって、
形質導入上皮細胞が前記治療剤を発現し、前記薬剤を前記被験体の前記中枢神経系に送達
するように、本明細書に記載されるウイルスベクターを C S F に投与することを含む方法
を提供する。ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、上皮細胞に形質導入する。

20

【 0 0 6 9 】

本開示のある特定の実施形態は、医学的処置に使用するための本明細書に記載されるウ
イルスベクターまたは細胞を提供する。

【 0 0 7 0 】

本開示のある特定の実施形態は、哺乳動物における疾患、例えばアルツハイマー病を処
置するのに有用な医薬を調製するための本明細書に記載されるウイルスベクターまたは細
胞の使用を提供する。

【 0 0 7 1 】

ベクターは、防御 A p o E アイソフォームタンパク質をさらに含み得る。本明細書で使
用される場合、用語「分泌タンパク質」は、天然に分泌されるか、またはそれが分泌され
得るようなシグナル配列を含有するように改変されるかにかかわらず、任意の分泌タンパ
ク質を含む。

30

【 0 0 7 2 】

核酸は、それが別の核酸配列と機能的関係におかれた場合に「作動可能に連結されてい
る」。一般に、「作動可能に連結された」は、連結された D N A 配列が連続的であることを
意味する。しかしながら、エンハンサーは、連続的である必要はない。連結は、便利な
制限部位におけるライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合
、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを従来のプラクティスにしたがって
使用する。加えて、酵素をコードする核酸の複数コピーを発現ベクター内で共に連結する
ことができる。このような複数の核酸は、リンカーによって分離され得る。

40

【 0 0 7 3 】

本開示はまた、本明細書に記載されるベクターを含有する哺乳動物細胞を提供する。細
胞はヒトのものであり得るか、または脳に由来し得る。細胞型は、幹細胞または前駆細胞
集団であり得る。

【 0 0 7 4 】

本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ポリペプチド、発現ベクターまた
は細胞を投与することによって、哺乳動物における疾患、例えば遺伝性疾患または癌を処
置する方法を提供する。遺伝性疾患は、アルツハイマー病などの神経変性疾患であり得る

50

。

【 0 0 7 5 】

本開示のある特定の態様は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクターおよび（インビボで改変された）遺伝子操作細胞、ならびにそれらの使用に関する。特に、本開示は、治療有効用量の治療剤を全身送達することができる遺伝子またはタンパク質治療法に関する。

【 0 0 7 6 】

一態様によれば、哺乳動物レシピエントにおいて治療剤を発現させるための細胞発現系が提供される。発現系（本明細書では「遺伝子改変細胞」とも称される）は、細胞と、治療剤を発現させるための発現ベクターとを含む。発現ベクターとしては、限定されないが、ウイルス、プラスミド、および異種遺伝物質を細胞に送達するための他のビヒクルが挙げられる。したがって、本明細書で使用される場合、用語「発現ベクター」は、異種遺伝物質を細胞に送達するためのビヒクルを指す。特に、発現ベクターは、組換えアデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはレンチウイルスまたはレトロウイルスベクターである。

【 0 0 7 7 】

発現ベクターとしてはさらに、異種遺伝子の転写を制御するためのプロモーターが挙げられる。プロモーターは、（下記）誘導性プロモーターであり得る。発現系は、哺乳動物レシピエントへの投与に適切である。発現系は、それぞれが、少なくとも1つの治療剤をコードする少なくとも1つの組換え遺伝子を含む複数の遺伝子改変非不死化細胞を含み得る。

【 0 0 7 8 】

細胞発現系は、インビボで形成され得る。さらに別の態様によれば、インビボで哺乳動物レシピエントを処置するための方法が提供される。この方法は、例えば、静脈内投与によって、異種遺伝子産物を発現させるための発現ベクターをインサイチューで患者の細胞に導入することを含む。発現系をインビボで形成するためには、治療剤を発現させるための発現ベクターを、インビボで哺乳動物レシピエントの静脈（ここで、ベクターは血管系を通過して脳に移動する）に導入する。

【 0 0 7 9 】

さらに別の態様によれば、インビボで哺乳動物レシピエントを処置するための方法が提供される。この方法は、インビボで標的タンパク質を患者に導入することを含む。

【 0 0 8 0 】

異種遺伝子を発現させるための発現ベクターとしては、異種遺伝子産物の転写を制御するための誘導性プロモーターが挙げられ得る。したがって、インサイチューにおける治療剤の送達、異種遺伝子の転写を誘導する条件に対して細胞をインサイチューで曝露することによって制御される。

【 0 0 8 1 】

哺乳動物レシピエントは、遺伝子置換療法に適した症状を有し得る。本明細書で 사용되는場合、「遺伝子置換療法」は、治療剤をコードする外因性遺伝物質をレシピエントに投与し、続いて、投与した遺伝物質をインサイチューで発現させることを指す。したがって、語句「遺伝子置換療法に適した症状」は、遺伝性疾患などの症状（すなわち、1つまたは複数の遺伝子欠陥に起因する疾患症状）、後天性病状（すなわち、先天的欠陥に起因しない病理学的症状）、癌および予防的プロセス（すなわち、疾患または望ましくない医学的症状の予防）を包含する。したがって、本明細書で使用される場合、用語「治療剤」は、哺乳動物レシピエントに対して有益な効果を有する任意の薬剤または物質を指す。したがって、「治療剤」は、核酸またはタンパク質成分を有する治療および予防分子の両方を包含する。

【 0 0 8 2 】

一実施形態によれば、哺乳動物レシピエントは遺伝性疾患を有し、外因性遺伝物質は、前記疾患を処置するための治療剤をコードする異種遺伝子を含む。さらに別の実施形態では、哺乳動物レシピエントは後天性病状を有し、外因性遺伝物質は、前記病状を処置する

10

20

30

40

50

ための治療剤をコードする異種遺伝子を含む。別の実施形態によれば、患者は癌を有し、外因性遺伝物質は、抗新生物剤をコードする異種遺伝子を含む。さらに別の実施形態では、患者は望ましくない医学的症状を有し、外因性遺伝物質は、前記症状を処置するための治療剤をコードする異種遺伝子を含む。

【0083】

本明細書で使用される場合、用語「防御ApoEアイソフォーム」は、このポリペプチドの変異体または生物学的に活性もしくは不活性な断片を含む。ポリペプチドの1つの「変異体」は、天然タンパク質と完全に同一ではないポリペプチドである。このような変異体タンパク質は、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失または置換によってアミノ酸配列を変化させることによって得ることができる。天然ポリペプチドと比較して実質的に同じかまたは改善された性質を有するポリペプチドを作るために、例えば、置換によってタンパク質のアミノ酸配列を改変する。置換は、保存的置換であり得る。「保存的置換」は、類似側鎖を有する別のアミノ酸でアミノ酸を置換することである。保存的置換は、ペプチド全体がその空間的立体構造を保持するが、変化した生物学的活性を有するように、アミノ酸の電荷またはアミノ酸側鎖のサイズ（あるいは、側鎖内の化学基のサイズ、電荷または種類）についての可能な最小変化を作るアミノ酸で置換することである。例えば、一般的な保存的变化は、AspからGlu、AsnまたはGln；HisからLys、ArgまたはPhe；AsnからGln、AspまたはGluおよびSerからCys、ThrまたはGlyであり得る。アラニンは、他のアミノ酸に置換するのに一般に使用される。20種の必須アミノ酸は、以下のように分類することができる：非極性側鎖を有するアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニン；非荷電極性側鎖を有するグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミン；酸性側鎖を有するアスパラギン酸およびグルタミン酸；ならびに塩基性側鎖を有するリジン、アルギニンおよびヒスチジン。

【0084】

アミノ酸の変化は、対応する核酸配列のコドンを変化させることによって達成される。このようなポリペプチドは、生物学的活性を改変または改善するために、ポリペプチド構造中の他のアミノ酸をある特定のアミノ酸で置換することに基づいて得られ得ることが公知である。例えば、代替アミノ酸の置換によって、活性の増加をもたらすポリペプチドに小さな立体構造変化を与えることができる。あるいは、ある特定のポリペプチドにおけるアミノ酸置換を使用して残基を提供し、次いでこれを他の分子に連結して、他の目的のために十分に有用な出発ポリペプチドの特性を保持するペプチド-分子コンジュゲートを提供することができる。

【0085】

相互作用生物学的機能をポリペプチドに付与する際に、アミノ酸の疎水性(hydrophobic)指標を使用することができ、ここで、ある特定のアミノ酸は、類似の疎水性指標を有する他のアミノ酸で置換することができ、類似の生物学的活性を依然として保持することができるが見出されている。あるいは、特に、生成されるべきポリペプチドにおける所望の生物学的機能が免疫学的実施形態で使用するためのものである場合、親水性に基づいて同様のアミノ酸の置換を行うことができる。その隣接するアミノ酸の親水性によって決定される「タンパク質」の最大の局所的な平均親水性は、その免疫原性と関連する。したがって、各アミノ酸に割り当てられる親水性に基づいて置換を行うことができることに留意する。

【0086】

値を各アミノ酸に割り当てる親水性指標もしくは疎水性指標のいずれかを使用する際に、これらの値が ± 2 であるアミノ酸置換を行うことが好ましい(± 1 が特に好ましく、 ± 0.5 以内のものが最も好ましい置換である)。

【0087】

変異体タンパク質は、対応する天然タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも50%、少なくとも約80%またはさらに少なくとも約90%だが100%未満の連続的なアミノ酸

10

20

30

40

50

配列相同性または同一性を有する。

【 0 0 8 8 】

変異体ポリペプチドのアミノ酸配列は、天然ポリペプチドのアミノ酸配列に本質的に対応する。本明細書で使用される場合、「本質的に対応する」は、天然タンパク質によって生成される反応と実質的に同じ生物学的反応を引き起こすであろうポリペプチド配列を指す。このような反応は、天然タンパク質によって生成されるレベルの少なくとも 60 % であり得、さらには、天然タンパク質によって生成されるレベルの少なくとも 80 % であり得る。

【 0 0 8 9 】

変異体は、対応する天然タンパク質に存在しないアミノ酸残基または対応する天然タンパク質に対する欠失を含み得る。変異体はまた、対応する天然タンパク質と比較して短縮型「断片」（すなわち、全長タンパク質の一部のみ）であり得る。タンパク質変異体はまた、少なくとも 1 つの D - アミノ酸を有するペプチドを含む。

10

【 0 0 9 0 】

変異体タンパク質は、変異体タンパク質をコードする単離された DNA 配列から発現させることができる。「組換え体」は、遺伝子工学の方法によって生産されたペプチドまたは核酸と定義される。遺伝コードの重複により、個々のヌクレオチドのコドン簡単に交換しても、同一のアミノ酸配列が依然として得られ得ることが当技術分野で周知であることに留意すべきである。用語「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」は、本明細書では互換的に使用される。

20

【 0 0 9 1 】

本開示は、発現ベクターを細胞または患者に投与することによって、哺乳動物における疾患を処置する方法を提供する。遺伝子療法について、分子生物学および遺伝子療法の分野の通常の当業者であれば、過度の実験を伴うことなく、本開示の新規方法に使用される発現ベクターの適切な投与量および投与経路を決定することができるであろう。

【 0 0 9 2 】

一実施形態によれば、細胞は形質転換されるか、または別の方法によりインビボで遺伝子改変される。治療剤をコードする異種（例えば、組換え）遺伝子を発現させるための外因性遺伝物質を含有するベクターで哺乳動物レシピエント由来の細胞をインビボで形質転換（すなわち、形質導入またはトランスフェクト）し、治療剤をインサイチューで送達する。

30

【 0 0 9 3 】

本明細書で使用される場合、「外因性遺伝物質」は、細胞に天然に見られない天然または合成の核酸またはオリゴヌクレオチドを指す；または、それが細胞に天然に見られる場合には、それは、細胞によって生物学的に有意なレベルで転写または発現されないものである。したがって、「外因性遺伝物質」としては、例えば、アンチセンス RNA に転写され得る天然に存在しない核酸、および「異種遺伝子」（すなわち、同じ種類の天然に存在する細胞において、生物学的に有意なレベルで発現されないかまたは発現されるタンパク質をコードする遺伝子）が挙げられる。

【 0 0 9 4 】

40

ある特定の実施形態では、哺乳動物レシピエントは、遺伝子置換療法に適した症状を有する。本明細書で使用される場合、「遺伝子置換療法」は、治療剤をコードする外因性遺伝物質をレシピエントに投与し、続いて、投与した遺伝物質をインサイチューで発現させることを指す。したがって、語句「遺伝子置換療法に適した症状」は、遺伝性疾患などの症状（すなわち、1 つまたは複数の遺伝子欠陥に起因する疾患症状）、後天性病状（すなわち、先天的欠陥に起因しない病理学的症状）、癌および予防的プロセス（すなわち、疾患または望ましくない医学的症状の予防）を包含する。したがって、本明細書で使用される場合、用語「治療剤」は、哺乳動物レシピエントに対して有益な効果を有する任意の薬剤または物質を指す。したがって、「治療剤」は、核酸（例えば、アンチセンス RNA）および/またはタンパク質成分を有する治療および予防分子の両方を包含する。

50

【0095】

あるいは、遺伝子置換療法に適した症状は、予防的プロセス（すなわち、疾患または望ましくない医学的症状の予防を予防するためのプロセス）である。したがって、本開示は、予防機能（すなわち、予防剤）を有する治療剤を哺乳動物レシピエントに送達するための細胞発現系を包含する。

【0096】

要約すると、用語「治療剤」は、限定されないが、上記症状に関連する薬剤およびそれらの機能的等価物を含む。本明細書で使用される場合、用語「機能的等価物」は、機能的に等価であると考えられる治療剤として、哺乳動物レシピエントに対して同じまたは改善された有益な効果を有する分子（例えば、ペプチドまたはタンパク質）を指す。

10

【0097】

上記に開示された治療剤および遺伝子置換療法に適した症状は単に例示であり、本開示の範囲を限定するためのものではない。公知の症状を処置するのに適切な治療剤の選択は、過度の実験を伴うことなく当業者の範囲内であると考えられる。

【0098】

AAVベクター

一実施形態では、本開示のウイルスベクターは、AAVベクターである。「AAV」ベクターはアデノ随伴ウイルスを指し、天然に存在する野生型ウイルス自体またはその誘導体を指すのに使用され得る。この用語は、他に必要とされる場合を除いて、すべてのサブタイプ、血清型およびシュードタイプ、ならびに天然に存在する形態および組換え形態の両方を包含する。本明細書で使用される場合、用語「血清型」は、規定の抗血清とのカプシドタンパク質反応性によって同定され、それに基づいて他のAAVと区別されるAAVを指し、例えば、霊長類AAVには8つの公知の血清型（AAV-1～AAV-8）がある。例えば、血清型AAV2は、AAV2のcap遺伝子からコードされるカプシドタンパク質と、同じAAV2血清型由来の5'および3' ITR配列を含有するゲノムとを含有するAAVを指すのに使用される。本明細書で使用される場合、例えば、rAAVは、同じ血清型由来のカプシドタンパク質および5' - 3' ITRの両方を有するAAVを指すのに使用され得るか、またはそれは、ある血清型由来のカプシドタンパク質および異なるAAV血清型由来の5' - 3' ITR（例えば、AAV血清型2由来のカプシドおよびAAV血清型5由来のITR）を有するAAVを指し得る。本明細書で例証される各実施例については、ベクターの設計および製造の説明には、カプシドおよび5' - 3' ITR配列の血清型が記載されている。略語「rAAV」は、組換えAAVベクター（または「rAAVベクター」）とも称される組換えアデノ随伴ウイルスを指す。

20

30

【0099】

「AAVウイルス」または「AAVウイルス粒子」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質（好ましくは、野生型AAVのカプシドタンパク質のすべてによる）およびカプシド化ポリヌクレオチドから構成されるウイルス粒子を指す。粒子が異種ポリヌクレオチド（すなわち、哺乳動物細胞に送達すべき導入遺伝子などの野生型AAVゲノム以外のポリヌクレオチド）を含む場合、それは典型的には「rAAV」と称される。

【0100】

一実施形態では、転写開始領域、目的のDNAおよび転写終結領域を含む制御要素を、転写方向に作動可能に連結された成分として少なくとも提供するように、公知の技術を使用してAAV発現ベクターを構築する。制御要素は、哺乳動物細胞において機能的であるように選択される。作動可能に連結された成分を含有する得られた構築物は、機能的AAV ITR配列に（5'および3'で）隣接している。

40

【0101】

「アデノ随伴ウイルス逆方向末端リピート」または「AAV ITR」は、DNA複製起点としておよびウイルスのパッケージングシグナルとしてcisで共に機能することが当技術分野で認識されているAAVゲノムの各末端に見られる領域を意味する。AAV ITRは、AAV repコード領域と共に、2つの隣接するITR間に介在するヌクレ

50

オチド配列を効率的に切り出してそれからレスキューし、それを哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。

【0102】

AAV ITR領域のヌクレオチド配列は公知である。本明細書で使用される場合、「AAV ITR」は、示されている野生型ヌクレオチド配列を有する必要はなく、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換によって変化させることができる。加えて、AAV ITRは、限定されないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7などを含むいくつかのAAV血清型のいずれかに由来し得る。さらに、AAVベクターにおける選択されたヌクレオチド配列に隣接する5'および3' ITRは、AAV Rep遺伝子産物が細胞に存在する場合に目的通りに機能する（すなわち、宿主細胞ゲノムまたはベクターから目的の配列を切り出してそれをレスキューし、異種配列をレシピエント細胞ゲノムに組み込むことを可能にする）限り、同じAAV血清型または分離株と同一である必要はなく、これに由来する必要もない。

10

【0103】

一実施形態では、AAV ITRは、限定されないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7などを含むいくつかのAAV血清型のいずれかに由来し得る。さらに、AAV発現ベクターにおける選択されたヌクレオチド配列に隣接する5'および3' ITRは、AAV Rep遺伝子産物が細胞に存在する場合に目的通りに機能する（すなわち、宿主細胞ゲノムまたはベクターから目的の配列を切り出してそれをレスキューし、DNA分子をレシピエント細胞ゲノムに組み込むことを可能にする）限り、同じAAV血清型または分離株と同一である必要はなく、これに由来する必要もない。

20

【0104】

一実施形態では、AAVカプシドは、AAV2に由来し得る。AAVベクターに使用するのに適切なDNA分子は、サイズが約5キロベース(kb)未満、約4.5kb未満、約4kb未満、約3.5kb未満、約3kb未満、約2.5kb未満であり、当技術分野で公知のものである。

【0105】

一実施形態では、選択されたヌクレオチド配列は、被験体においてインピボでその転写または発現を指示する制御要素に作動可能に連結される。このような制御要素は、選択された配列に通常関連する制御配列を含み得る。あるいは、異種制御配列が用いられ得る。有用な異種制御配列としては、一般に、哺乳動物またはウイルスの遺伝子をコードする配列に由来するものが挙げられる。例としては、限定されないが、SV40早期プロモーター；マウス乳ガンウイルスLTRプロモーター；アデノウイルス主要後期プロモーター(Ad MLP)；単純ヘルペスウイルス(HSV)プロモーター；サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター（例えば、CMV即時初期型プロモーター領域(CMVIE)）；ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター；pol IIプロモーター、pol IIIプロモーター、合成プロモーター；ハイブリッドプロモーター；などが挙げられる。加えて、非ウイルス遺伝子（例えば、マウスメタロチオネイン遺伝子）由来の配列もまた、本明細書で使用される。このようなプロモーター配列は、例えば、Stratagene (San Diego, Calif.) から市販されている。

30

40

【0106】

一実施形態では、異種プロモーターおよび他の制御要素の両方、例えばCNS特異的誘導性プロモーター、エンハンサーなどは、特定の用途のものであろう。異種プロモーターの例としては、CMVプロモーターが挙げられる。CNS特異的プロモーターの例としては、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)の遺伝子から単離されたものが挙げられる。誘導性プロモーターの例としては、エクジソン、テトラサイクリン、低酸素症およびアウフィン(aufin)のDNA応答要素が挙げられる。

【0107】

一実施形態では、AAV ITRに結合された目的のDNA分子を有するAAV発現ベ

50

クターは、選択された配列を、そこから切り出された主要な AAV オープンリーディングフレーム (「ORF」) を有する AAV ゲノム中に直接挿入することによって構築され得る。ITR の部分が、複製およびパッケージング機能を可能にするのに依然として十分である限り、AAV ゲノムの他の部分もまた欠失させ得る。このような構築物は、当技術分野で周知の技術を使用して設計され得る。

【0108】

あるいは、ウイルスゲノムまたはこれを含有する AAV ベクターから AAV ITR を切り出して、標準的なライゲーション技術を使用して、別のベクターに存在する選択された核酸構築物の 5' および 3' に融合することができる。例えば、ライゲーションは、20 mM Tris - Cl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、33 μg/ml BSA、10 mM ~ 50 mM NaCl、および 0.40 μM ATP、0.01 ~ 0.02 (Weiss) 単位の T4 DNA リガーゼ (「粘着末端」ライゲーションの場合)、または 1.4 μM ATP、0.3 ~ 0.6 (Weiss) 単位の T4 DNA リガーゼ (「平滑末端」ライゲーションの場合) のいずれかで達成され得る。分子間「粘着末端」ライゲーションは、通常、30 ~ 100 μg/ml の総 DNA 濃度 (5 ~ 100 nM の総最終濃度) で実施される。ITR を含有する AAV ベクター

10

【0109】

加えて、キメラ遺伝子は、1 つまたは複数の選択された核酸配列の 5' および 3' に配置された AAV ITR 配列を含むように合成的に生産され得る。哺乳動物 CNS 細胞におけるキメラ遺伝子配列の発現のための好ましいコドンが使用され得る。完全なキメラ配列が、標準的な方法によって調製された重複オリゴヌクレオチドから組み立てられる。

20

【0110】

rAAV ビリオンを生産するため、AAV 発現ベクターが、トランスフェクションなどの公知の技術を使用して適切な宿主細胞に導入される。多くのトランスフェクション技術が当技術分野で一般に公知である。例えば、Sambrook ら、(1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York を参照のこと。特に適切なトランスフェクション方法としては、リン酸カルシウム共沈殿、培養細胞への直接マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リボソーム媒介遺伝子導入、脂質媒介形質導入、および高速度マイクロプロジェクティルを使用する核酸送達

30

【0111】

一実施形態では、rAAV ビリオンを生産するのに適切な宿主細胞としては、微生物、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞が挙げられ、それは、異種 DNA 分子のレシピエントとして使用され得るか、または使用されている。この用語は、トランスフェクトされた元の細胞の子孫を含む。したがって、本明細書で使用される場合、「宿主細胞」は、通常、外因性 DNA 配列でトランスフェクトされた細胞を指す。安定なヒト細胞株 293 (例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクションからアクセッション番号 ATCC CRL 1573 で容易に入手可能) に由来する細胞を本開示の実施に使用することができる。特に、ヒト細胞株 293 は、アデノウイルス 5 型の DNA 断片で形質転換したヒト胚腎細胞株であり、アデノウイルス E1a および E1b 遺伝子を発現する。293 細胞株は、容易にトランスフェクトされ、rAAV ビリオンを生産するための特に便利なプラットフォームを提供する。

40

【0112】

「AAV rep コード領域」は、複製タンパク質 Rep78、Rep68、Rep52、および Rep40 をコードする AAV ゲノムの当技術分野で認識された領域を指す。これらの Rep 発現産物は、AAV の DNA 複製起点の認識、結合およびニッキング、DNA ヘリカーゼ活性、ならびに AAV (または、他の異種の) プロモーターからの転写の調節を含む多くの機能を有することが示されている。Rep 発現産物は、AAV ゲノムを複製するのに集団として必要である。AAV rep コード領域の適切なホモログは、A

50

AV2 DNA複製を媒介することも公知のヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) rep 遺伝子を含む。

【0113】

「AAV capコード領域」は、カプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3、またはそれらの機能的ホモログをコードするAAVゲノムの当技術分野で認識された領域を指す。これらのCap発現産物は、ウイルスゲノムをパッケージングするのに集団として必要とされるパッケージング機能を提供する。

【0114】

一実施形態では、AAVヘルパー機能は、AAV発現ベクターのトランスフェクションの前、またはそれと同時に、宿主細胞をAAVヘルパー構築物でトランスフェクトすることによって宿主細胞に導入される。したがって、AAVヘルパー構築物は、AAV repおよび/またはcap遺伝子の少なくとも一過性の発現を提供して、生産的AAV感染に必要なAAV機能の誤りを補完するのに使用される。AAVヘルパー構築物は、AAV ITRを欠損しており、自身を複製することもパッケージすることもできない。これらの構築物は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルスまたはビリオンの形態であり得る。RepおよびCapの両方の発現産物をコードする多くのAAVヘルパー構築物、例えば、一般に使用されるプラスミドpAAV/AdおよびpIM29+45が記載されている。Repおよび/またはCap発現産物をコードする多くの他のベクターが記載されている。

【0115】

ウイルスベクターの送達方法は、AAVをCSFに注射することを含む。一般に、rAAVビリオンは、インピボまたはインピトロ形質導入技術のいずれかを使用してCNSの細胞に導入され得る。インピトロで形質導入する場合、所望のレシピエント細胞を被験体から取り出し、rAAVビリオンで形質導入し、被験体に再導入する。あるいは、細胞が被験体内で不適切な免疫応答を生成しない場合、同系または異系細胞が使用され得る。

【0116】

形質導入細胞の被験体への送達および導入のための適切な方法が記載されている。例えば、組換えAAVビリオンを例えば適切な培地中でCNS細胞と混ぜ合わせることによって、細胞をインピトロで形質導入することができ、サザンブロットおよび/またはPCRなどの従来の技術を使用して、または選択可能なマーカーを使用することによって、目的のDNAを有する細胞をスクリーニングすることができる。次いで、形質導入細胞を以下に詳述される医薬組成物に製剤化し、様々な技術によって、例えば、移植、筋肉内、静脈内、皮下、および腹腔内注射によって組成物を被験体に導入することができる。

【0117】

一実施形態では、医薬組成物は、治療有効量（すなわち、問題の疾患状態の徴候を低減もしくは改善するのに十分な量、または所望の利益を与えるのに十分な量）の目的の核酸を生産するために十分な遺伝物質を含む。医薬組成物はまた、薬学的に許容され得る賦形剤を含む。このような賦形剤は、組成物を受け取る個体に有害な抗体の産生をそれ自体で誘導せず、過度な毒性を伴わずに投与され得る任意の薬学的薬剤を含む。薬学的に許容され得る賦形剤としては、限定されないが、ソルビトール、Tween 80、ならびに水、生理的食塩水、グリセロール、およびエタノールなどの液体が挙げられる。薬学的に許容され得る塩、例えば、塩酸塩、臭酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの無機酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸塩がそこに含まれ得る。加えて、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などの補助物質は、このようなビヒクルに存在し得る。薬学的に許容され得る賦形剤の詳細な議論は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J., 1991) で入手可能である。

【0118】

本明細書の教示を考慮した当業者には明らかであるように、追加しなければならないウイルスベクターの有効量は、経験的に決定することができる。投与は、処置過程を通して

10

20

30

40

50

連続的または断続的に単回投与で行うことができる。最も有効な投与手段および投与量を決定する方法は当業者に周知であり、ウイルスベクター、治療の組成、標的細胞および処置される被験体によって変化するであろう。単回投与および複数回投与は、処置する医師によって選択される用量レベルおよびパターンによって行うことができる。

【0119】

送達されるウイルスベクターによって複数の導入遺伝子を発現させ得ることを理解すべきである。あるいは、それぞれが1つまたは複数の異なる導入遺伝子を発現する別個のベクターを、本明細書に記載されるようにCNSに送達することもできる。さらに、本開示の方法によって送達されるウイルスベクターを、他の適切な組成物および治療と組み合わせることも意図される。

10

【0120】

遺伝物質を細胞に導入するための方法

トランスフェクションまたは形質導入などの遺伝子導入法によって、外因性遺伝物質（例えば、1つまたは複数の治療用タンパク質をコードするcDNA）をエキスピボまたはインピボで細胞に導入して、遺伝子改変細胞を提供する。様々な発現ベクター（すなわち、標的細胞への外因性遺伝物質の送達を促進するためのビヒクル）は当業者に公知である。

【0121】

本明細書で使用される場合、「細胞のトランスフェクション」は、追加DNAの組み込みによって、細胞が新規遺伝物質を獲得することを指す。したがって、トランスフェクションは、物理的または化学的方法を使用して核酸を細胞に挿入することを指す。いくつかのトランスフェクション技術が当業者に公知であり、リン酸カルシウムDNA共沈殿；DEAE-デキストラン；エレクトロポレーション；陽イオンリポソーム媒介トランスフェクション；およびタングステン粒子促進微粒子銃が挙げられる。リン酸ストロンチウムDNA共沈殿は、別の可能なトランスフェクション方法である。

20

【0122】

対照的に、「細胞の形質導入」は、DNAまたはRNAウイルスを使用して核酸を細胞に導入する方法を指す。核酸を細胞に導入するためのRNAウイルス（すなわち、レトロウイルス）は、本明細書では形質導入キメラレトロウイルスと称される。レトロウイルス内に含まれる外因性遺伝物質は、形質導入細胞のゲノムに組み込まれる。キメラDNAウイルス（例えば、治療剤をコードするcDNAを有するアデノウイルス）で形質導入された細胞は、そのゲノムに組み込まれる外因性遺伝物質を有しないが、細胞内で染色体外に保持される外因性遺伝物質を発現することができる。

30

【0123】

典型的に、外因性遺伝物質は、（通常は、治療用タンパク質をコードするエクソンを含むcDNAの形態の）異種遺伝子を、新規遺伝子の転写を制御するプロモーターと一緒に含む。プロモーターは、特徴的に、転写を開始するのに必要な特定のヌクレオチド配列を有する。場合により、外因性遺伝物質は、所望の遺伝子転写活性を得るのに必要なさらなる配列（すなわち、エンハンサー）をさらに含む。この議論のために、「エンハンサー」は、単純に、プロモーターによって指令された基礎転写レベルを変化させるように（cisで）コード配列と隣接して働く任意の非翻訳DNA配列である。プロモーターおよびコード配列が作動可能に連結されてコード配列の転写が可能になるように、外因性遺伝物質をプロモーターのすぐ下流の細胞ゲノムに導入することができる。レトロウイルス発現ベクターは、挿入された外因性遺伝子の転写を制御する外因性プロモーター要素を含み得る。このような外因性プロモーターとしては、構成的および誘導性プロモーターの両方が挙げられる。

40

【0124】

天然に存在する構成的プロモーターは、不可欠な細胞機能の発現を制御する。結果として、構成的プロモーター制御下の遺伝子は、すべての細胞増殖条件下で発現される。例示的な構成的プロモーターとしては、ある特定の構成的または「ハウスキーピング」機能を

50

コードする以下の遺伝子：ヒボキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（H P R T）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（D H F R）、アデノシンデアミナーゼ、ホスホグリセロールキナーゼ（P G K）、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグリセロールムターゼのプロモーター、アクチンプロモーターおよび当業者に公知の他の構成的プロモーターが挙げられる。加えて、多数のウイルスプロモーターは、真核生物細胞において構成的に機能する。これらとしては、とりわけ、S V 4 0 の初期および後期プロモーター；モロニー白血病ウイルスおよび他のレトロウイルスの長末端反復（L T R）；ならびに単純疱疹ウイルスのチミジンキナーゼプロモーターその他が挙げられる。したがって、上記構成的プロモーターのいずれかを使用して異種遺伝子インサートの転写を制御することができる。

【 0 1 2 5 】

誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導剤の存在下においてわずかにまたはかなりの程度まで発現される（例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下の転写は、ある特定の金属イオンの存在下で大きく増加する）。誘導性プロモーターは、それらの誘導性因子が結合した場合に転写を刺激する応答性要素（R E）を含む。例えば、血清因子、ステロイドホルモン、レチノイン酸およびサイクリック A M P の R E が挙げられる。誘導反応を得るために、特定の R E を含有するプロモーターを選択することができ、いくつかの場合、R E 自体を様々なプロモーターに結合させることによって、誘導性を組換え遺伝子に与えることができる。したがって、適切なプロモーター（構成的対誘導性；強対弱）を選択することによって、遺伝子改変細胞における治療剤の存在および発現レベルの両方を制御することが可能である。治療剤をコードする遺伝子が誘導性プロモーターの制御下にある場合、例えば、該薬剤の転写を制御する誘導性プロモーターの特異的誘導因子を腹腔内注射することによって、治療剤の転写を可能にする条件に遺伝子改変細胞をインサイチューで曝露することによって、インサイチューにおける治療剤の送達を引き起こされる。例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下の遺伝子によってコードされる治療剤の遺伝子改変細胞によるインサイチュー発現は、遺伝子改変細胞と、適切な（すなわち、誘導性）金属イオンを含有する溶液とをインサイチューで接触させることによって増強される。

【 0 1 2 6 】

したがって、インサイチューで送達される治療剤の量は、（ 1 ）挿入された遺伝子の転写を指示するのに使用されるプロモーターの性質（すなわち、プロモーターが構成的であるかまたは誘導性であるか、強いまたは弱い）；（ 2 ）細胞に挿入される外因性遺伝子のコピー数；（ 3 ）患者に投与される（例えば、埋め込まれる）形質導入／トランスフェクト細胞の数；（ 4 ）インプラント（例えば、移植片または封入される発現系）のサイズ；（ 5 ）インプラントの数；（ 6 ）形質導入／トランスフェクト細胞またはインプラントを放置する時間長さ；および（ 7 ）遺伝子改変細胞による治療剤の生産速度などの因子を制御することによって調節される。治療有効量の特定の治療剤の送達のためのこれらの因子の選択および最適化は、上記に開示された因子および患者の臨床プロファイルを考慮して、過度の実験を伴うことなく当業者の範囲内であると考えられる。

【 0 1 2 7 】

少なくとも 1 つのプロモーターおよび治療剤をコードする少なくとも 1 つの異種核酸に加えて、発現ベクターは、好ましくは、発現ベクターでトランスフェクトまたは形質導入された細胞の選択を容易にするためのネオマイシン耐性遺伝子などの選択遺伝子を含み得る。あるいは、細胞は、2 つ以上の発現ベクター、治療剤をコードする遺伝子を含有する少なくとも 1 つのベクター、選択遺伝子を含有する他のベクターでトランスフェクトされる。適切なプロモーター、エンハンサー、選択遺伝子および／またはシグナル配列（下記）の選択は、過度の実験を伴うことなく当業者の範囲内であると考えられる。

【 0 1 2 8 】

細胞外、細胞内または膜位置への送達のために、治療剤をターゲティングすることができる。遺伝子産物が細胞から分泌されることが望まれる場合、治療剤を細胞から細胞外環境に分泌するのに適切な分泌「シグナル」配列を含むように発現ベクターを設計する。遺

10

20

30

40

50

伝子産物が細胞中内に保持されることが望まれる場合、この分泌シグナル配列は省かれる。同様に、治療剤を細胞原形質膜内にアンカリングするための「保持」シグナル配列を含むように発現ベクターを構築することができる。例えば、膜タンパク質はすべて、膜内におけるタンパク質の移動を停止し、タンパク質を分泌させない疎水性膜貫通領域を有する。遺伝子産物を特定の位置にターゲティングするためのシグナル配列を含む発現ベクターの構築は、過度の実験を必要とすることなく当業者の範囲内であると考えられる。

【実施例】

【0129】

実施例 1

アミロイド枯渇の進行の変化

本実施例では、アデノ随伴ウイルス血清型 4 (AAV4) の脳室内注射によって異なる ApoE アイソフォームを過剰発現させた後の APP/PS マウスにおけるアミロイド沈着の進行の変化を研究した。

【0130】

ApoE のイプシロン 4 対立遺伝子 (ApoE 4) は、アルツハイマー病 (AD) の第 1 の遺伝的リスク因子であるのに対して、ApoE の珍しいイプシロン 2 対立遺伝子 (ApoE 2) の遺伝はこのリスクを半減する。しかしながら、ほぼ 17 年前にはこれらの強力な遺伝的手掛かりが発見されていたにもかかわらず、ApoE がリスクを与える機構は依然として不明である。

【0131】

異なる ApoE アイソフォーム (ApoE 2、3 および 4) が線維性アミロイドプラークの形成および安定性にどのように影響を与えるかを解明するために、各 ApoE アイソフォームをコードする AAV4 ベクターを 7 カ月齢の APP/PS マウスの脳室に注射した。インビボ多光子イメージングに使用して、ベースライン時および ApoE 曝露後に 2 カ月間隔でアミロイド沈着の集団を追跡することにより、生きている動物におけるアミロイドーシスの進行を動的に見ることができた。

【0132】

2 カ月後において、アミロイドプラーク沈着の速度は各アイソフォームに応じて変動することが観察されたところ、ApoE 3 と比較して、ApoE 4 注射マウスでは老人斑が 38% 増加したのに対して、ApoE 2 処置マウスではアミロイド沈着数が 15% 減少した。死後分析によりこれらの結果を確認し、プラークをデコレイトするヒト ApoE タンパク質が皮質に存在することが明らかになったが、これは、このタンパク質が実質全体に広く拡散しており、Aβ ペプチドの沈着部位に局所的に蓄積していることを反映している。この ApoE 4 タンパク質含有量の増加はまた、アミロイド沈着周囲におけるより重度のシナプス消失に関連していたことに留意することが重要である。

【0133】

全体として、本データにより、異なる ApoE アイソフォームの過剰産生は疾患進行に影響を与えることができ、シナプス消失 (これは、AD 患者における認知機能障害と最も良く相関するパラメータの 1 つである) の程度を調節し得ることが実証された。

【0134】

1. AAV4 - ApoE を脳室内注射すると、脳で huAPOE が安定的に発現し、組換えヒト ApoE (huApoE) タンパク質が持続的に検出された。

【0135】

簡潔に言えば、AAV4 ベクターを注射した APP/PS マウスにおいて、GFP および huApoE を免疫検出した。ヒト APOE と同様に、GFP シグナルが、脳室領域全体 (上のパネル) および脳室の内側を覆う細胞の中に入るのを観察することができた。

【0136】

本方法を評価するために、AAV4 - Venus (対照)、- ApoE 2、- ApoE 3 および - ApoE 4 を野生型マウスの脳室に注射した。注射の 2 カ月後、アミロイド沈着周囲の皮質実質において、ヒト ApoE タンパク質を検出することができた (AAV4

10

20

30

40

50

- G F P 注射マウスでは、3 H 1 抗体；非特異的バックグラウンドのみが観察されたことに留意する）。したがって、有意なレベルのヒト A p o E が E L I S A によって脳で検出され、V e n u s および A p o E の免疫組織学的染色により、脳室の内側を覆う細胞による異なる導入遺伝子の発現を確認した。

【0137】

導入遺伝子の m R N A レベルを評価するために、q R T - P C R 実験を実施した。標準曲線により、本発明者らは、内因性 G A P D H レベルに応じた h u A p o E m R N A の濃度を決定することができた。2 または 5 カ月間曝露したマウス由来の試料が含まれていた。ヒト A P O E を特異的に検出するように設計した E L I S A アッセイを脳ホモジネートに対して実施した（図 1 A）。ヒト A P O E に対して特異的な E L I S A によって定量し（図 1 B）、ウエスタンブロットによって確認したところ、A A V 4 - A P O E 注射マウスでは、A A V 4 - G F P 処置マウスと比較して低レベルの組換えタンパク質を検出することができた。

【0138】

2. 各 A P O E アイソフォームの過剰発現は、アミロイドーシスの進行に差次的に影響を与える。

【0139】

インビボ二光子イメージングを使用して、生きている動物におけるアミロイド沈着を経時的に追跡した。簡潔に言えば、A p o E 2、A p o E 3、A p o E 4 および V e n u s をコードする A A V 4 ベクターを A P P / P S マウス（7 カ月齢）に定位注射した。1 週間後に頭蓋窓を移植し、開頭後にアミロイド沈着を経時的にイメージングした。2 カ月後に動物を屠殺し、死後分析を実施した。

【0140】

A A V 4 - A p o E 2、A A V 4 - A p o E 3 または A A V 4 - A p o E 4 を注射した A P P / P S マウスの二光子画像を作成した。メトキシ - X O 4（5 m g / k g）および T e x a s R e d デキストラン（分子量 70,000 D a；12.5 m g / m l 滅菌 P B S 溶液）の腹腔内注射を外側尾静脈に注射して蛍光血管造影図を得た後、アミロイドプラークを検出することができた。注射の 1 週間（= T 0）、1 カ月および 2 カ月後に画像を取得した。同じ領域を経時的に撮影して、病変の進行を追跡した。いくつかの新たなアミロイド沈着が現れたが、それらのいくつかは 2 カ月の期間にわたってもはや検出することができなかった。

【0141】

インビボ画像の全分析は、A A V 4 - A p o E 4 注射 A P P / P S マウスでは、アミロイド沈着数が、A A V 4 - A p o E 3 および A A V 4 - V e n u s 処置動物の両方と比較して有意により急速に増加していることを示している。対照的に、A A V 4 - A p o E 2 を使用した場合、少ないが有意なプラーク密度の減少が測定されている（図 2）。A A V 4 - A p o E 4 を注射した A P P / P S マウスでは、プラークがより大きい傾向が観察されるが（ $p < 0.06$ ）、全体的なプラークサイズは依然として一定である。インビボイメージングの要約データは、各 A P O E アイソフォームの過剰発現が、インビボにおけるアミロイド沈着の進行に差次的に影響を与えることを示している。A A V 4 - A p o E 2 を注射すると、アミロイド密度が経時的にわずかに低下するのに対して、A A V 4 - A p o E 4 の注射はアミロイドーシスを悪化させる。

【0142】

3. アミロイドプラークのサイズは、各 A p o E アイソフォームに応じて異なる。

【0143】

インビボ二光子イメージングにより、各アミロイド沈着のサイズの変化を 2 カ月の期間にわたって追跡した。プラークのサイズは依然として安定であり得るか、経時的に増加または減少し得る。T 1 / T 0 と T 2 / T 1 とのサイズ比の分布は、A A V 4 - A p o E 4 を注射したマウスでは、アミロイドプラークが他の群と比較して大きい傾向があることを示している（図 3）。

【 0 1 4 4 】

4 . アミロイド負荷の死後評価により、アミロイド沈着に対する A p o E 2 および A p o E 4 の効果を確認する。

【 0 1 4 5 】

A A V 4 注射の 2 カ月後、立体的死後評価により、A A V 4 - A p o E 4 注射動物では、皮質におけるアミロイドブラークがより高密度であるのに対して、他の群間では差異を検出することができなかったことが明らかになった（図 4 A）。ブラークを T h i o S または B a m 1 0 で標識した場合、このアミロイド沈着数の増加が観察される。しかしながら、B a m 1 0 と T h i o S との比の変化は検出されなかった。注射の 5 カ月後、各 A p o E アイソフォームの効果は、2 カ月と比較して顕著である（図 4 B）。A A V 4 - A p o E 4 をマウスに注射した場合、沈着密度の有意な増加が観察されたのに対して、A p o E 2 では逆の効果が検出された。やはり、B a m 1 0 と T h i o S との比の変化は検出されなかった。

10

【 0 1 4 6 】

5 . 各 A p o E アイソフォーム (i s f o r m) は、アミロイド沈着周囲のシナプス密度に差次的に影響を与える。

【 0 1 4 7 】

アレイトモグラフィーを使用して、アミロイド沈着周囲のシナプス前要素およびシナプス後要素の密度を正確に決定した。この新たなイメージング法は、組織分子構造の高解像イメージングの可能性を提供する。アレイトモグラフィーは、標本を超薄切片化し（7 0 n m）、免疫染色し、3 D再構成することに基づくものである。アレイトモグラフィー試料の代表的な画像を、アミロイドブラークおよびシナプス後マーカー（m a k e r）P S D 9 5 について染色した。アレイトモグラフィーの画像は、アミロイド沈着周囲ではシナプス後マーカー P S D 9 5 の数の減少が観察されるが、ブラークから離れた場所ではこの効果が消失することを示している。A A V 4 を注射した各マウス群において、ブラーク周辺またはブラークから離れた場所におけるシナプス前マーカー（シナプシン - 1）およびシナプス後マーカーの定量を決定した（図 5 A ~ D）。広範囲にわたるシナプス前要素およびシナプス後要素の定量により、シナプシン 1 および P S D 9 5 の密度の減少はアミロイドブラークに関連しており、この効果は、A P P / P S 1 マウスの脳で A p o E 4 を過剰発現させた場合に劇的に増幅されることが確認された（図 5 C、図 5 D）。A p o E 4 の過剰発現は、他の群と比較して、アミロイド沈着周辺のスパイン消失の増加に関連している。反対に、A p o E 2 処置動物のブラーク周囲では、シナプシンの斑点密度がより高い。

20

30

【 0 1 4 8 】

結論

A A V ウイルス血清型 4 を脳室内注射すると、可溶性組換えタンパク質が脳実質全体で持続的かつ慢性的に過剰産生された。A p o E 2、A p o E 3 および A p o E 4 の過剰発現は、A P P / P S マウスにおける病状経過に差次的に影響を与え、A p o E 4 を注射した場合、アミロイド負荷の進行が A p o E 3 と比較して有意に増加した。逆に、A p o E 2 は防御効果に関連しており、いくつかのアミロイド沈着は注射の 2 カ月後にはもはや検出不可能である。死後免疫組織学的分析により、A p o E 4 の有害効果が確認された。A p o E 4 の持続的な過剰産生は、A p o E 3 と比較して、アミロイド沈着周囲で観察されたシナプス消失を悪化させたのに対して、A p o E 2 は軽度の効果を有していた。本研究により、A p o E アイソフォーム、アミロイドーシスの進行およびシナプス消失の間のインビボにおける直接的な関連性が実証された。

40

【 0 1 4 9 】

実施例 2

大型哺乳動物の脳脊髄液（C S F）を介した中枢神経系障害の処置

アルツハイマー病などの脳障害の遺伝子療法を達成するためには、治療酵素の長期的な定常状態レベルが哺乳動物で達成され得るかを決定する必要があった。上衣細胞（脳の脳

50

室にある細胞)に形質導入し、標的酵素を脳脊髄液(CSF)に分泌させることができることが発見された。アデノ随伴ウイルス(AAV4)は、マウスモデルの上衣に高効率で形質導入することができることが決定された。(Davidsonら、PNAS, 28: 3428-3432, 2000.)マウスでは、AAV4処置後の罹患脳における貯蔵基質レベルが正常化された。

【0150】

CSFにおける酵素の定常状態レベルを達成するために、ベクターの全体的な送達を有効に実施することができるかを調査した。最初に、ベクターが、大型哺乳動物の脳における上衣細胞(脳室の内側を覆う細胞)に形質導入することができることを確認する必要がある。LINCLのイヌモデルおよびLINCLの非ヒト霊長類モデルにおいて、研究を実施した。LINCLイヌは出生時に正常であるが、約7カ月で神経学的兆候を発症し、約5~6カ月で試験可能な認知障害を発症し、10~11カ月で発作を発症し、進行性視力低下を発症する。

【0151】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、そのサイズが小さく(20nm)、ウイルス遺伝子が存在せず複製不能になるようにその遺伝物質のほとんどを除去(「ガット」)することができるので、ベクターとして選択した。-グルクロニダーゼの欠損によって引き起こされるムコ多糖症VII型(MPS VII)のマウスモデルにおいて、アデノ随伴ウイルス4型(AAV4)ベクターは、全体的な機能的および病理学的な改善を媒介することができるかについて以前に試験された(Liuら、J. Neuroscience, 25(41): 9321-9327, 2005)。-グルクロニダーゼをコードする組換えAAV4ベクターを、既存の疾患を有するMPS VIIマウスの側脳室に片側注射した。形質導入上衣は高レベルの組換え酵素を発現し、分泌された酵素は脳および小脳構造ならびに脳幹に浸透した。免疫組織化学的研究により、組換え酵素と脳微小血管系との密接な関連性が明らかになったが、これは、-グルクロニダーゼが、血管の内側を覆う血管周囲腔を介して脳実質に到達したことを示している。文脈恐怖条件付けによって、嫌悪連合学習を試験した。年齢適合ヘテロ接合対照と比較して、罹患マウスは、条件付け恐怖反応および文脈識別の障害を示した。この行動障害は、AAV4 -グルクロニダーゼ処置MPS VIIマウスでは、遺伝子導入の6週間後に回復した。このデータは、上衣細胞が、脳実質周囲およびCSFへの酵素分泌源として役立ち得ることを示している。

【0152】

しかしながら、驚くべきことに、これらの研究を大型哺乳動物(例えば、イヌおよび非ヒト霊長類)に拡大したところ、AAV4ベクターは、これらの動物における上衣を標的とするのに有効ではなかった。代わりに、AAV2ベクターを使用する必要がある。簡潔に言えば、TPP1をコードするrAAV2を作製し(AAV2-CLN2)、脳室内注射して上衣に形質導入した(Liuら、J. Neuroscience, 25(41): 9321-9327, 2005)。TPP1はLINCL欠損酵素である。このデータにより、NHP脳における上衣形質導入は、CSFにおける酵素の有意な増加をもたらしたことが示された。この結果により、様々な脳領域におけるTPP1活性レベルの上昇が示された(図7)(縦軸は、対照の活性に対する%を示す)。

【0153】

処置した最初のイヌでは、ベクターの送達是最適以下であったが、脳では依然としてCLN2活性が示された。次のイヌは、定位脳手術によるICV送達を受けた。処置イヌの認知能力は、T迷路行動によって測定した場合に非処置イヌよりも有意に改善したことが見出された(図8)。さらに、LINCLのイヌモデルにおけるAAV2-CLN2のICV送達の効果は非常に顕著であった。未処置(-/-)動物では大きな脳室が存在するのに対して、未処置対照および処置動物の脳は脳室を示さなかった。AAV, TPP1をLINCLイヌの脳室に送達した後、小脳および上部脊髄を含む様々な脳領域において、検出可能な酵素活性が認められた。2匹の生きているさらなる罹患イヌでは、脳萎縮が有意に軽減され、寿命が増加し、認知機能が改善した。最後に、NHPにおいて、本発明者

らは、この方法により野生型を2～5倍上回るTPP1活性レベルを達成し得ることを示している。

【0154】

いくつかのAAVベクターを作製および試験して、ITRおよびカプシドの最適な組み合わせを決定した。5つの異なる組み合わせを生産し、AAV2 ITRが最も有効であると決定した：AAV2/1（すなわち、AAV2 ITRおよびAAV1カプシド）、AAV2/2、AAV2/4、AAV2/5およびAAV2/8。大型哺乳動物（イヌおよびNHP）では、AAV2/2がかなり良く機能し、続いてAAV2/8、AAV2/5、AAV2/1およびAAV2/4となることを発見した。ウイルスベクターの有効性の順番はマウスで観察されたものとは反対であるため、これは非常に驚くべきものであった。

10

【0155】

したがって、本研究により、脳室の内側を覆う細胞は、脳全体への分布のために、CSFにおける組換え酵素の供給源となり得ること、およびAAV2/2は、イヌおよび非ヒト霊長類において、CLN2（TPP1）をコードする遺伝子などの治療剤を投与するための有効なビヒクルであることが示された。

【0156】

実施例3

遺伝子導入によって送達したヒトAPOEアイソフォームは、アミロイド沈着、クリアランスおよび神経毒性に影響を与えることによってアルツハイマー病を差次的に調節する

20

アルツハイマー病（AD）は最も多い加齢性神経変性障害であり、主な公衆衛生上の懸念になっている。遅発性散発型ADに関連する感受性遺伝子の中では、アポリポタンパク質E4（APOE遺伝子；ApoEタンパク質）対立遺伝子は、飛び抜けて最も重要な遺伝的リスク因子である。1コピーのAPOE4の存在は、最も一般的なAPOE3対立遺伝子と比較して、疾患を発症するリスクを実質的に3倍増加させるのに対して、2コピーは12倍増加させる。興味深いことに、APOE2は逆の効果を有する防御因子であり、この特定の対立遺伝子を遺伝で受け継ぐと、APOE3/3と比較して、ADの年齢調整リスクが約半減する。認知症の発症の平均年齢もこれらのリスクプロファイルに対応しており、APOE4/4保因者は60代半ばに発症し、APOE2/3保因者は90代前半に発症する（ほぼ30年のずれ）のに対して、APOE3/3個体は発症年齢がその間（1970年代半ば）である。

30

【0157】

ApoEがADに影響を与える機構には議論がある。珍しい常染色体優性型疾患の公知の原因遺伝子すべてがAβペプチドの産生に関与しているので、患者の海馬および皮質における老人斑を含有するAβ蓄積は、ADにおいて中心的な役割を果たすと考えられている。興味深いことに、APOE遺伝子型は、AD患者におけるアミロイド沈着の程度、および剖検試料で検出された神経毒性可溶性オリゴマーAβの量に強く影響を与えることが示された。ApoEアイソフォームは脳血管の完全性に差次的に影響を及ぼし、血液脳関門を通じたAβペプチドの流出に影響を与えて、血管周囲のアミロイド凝集体の蓄積（脳アミロイド血管症またはCAA）を調節することが示唆されている。加えて、ApoEはまた、神経変性および神経可塑性に直接関与している。これらの状況において、ApoE2の効果は相対的には研究中である。

40

【0158】

ヒトAPOE2、-E3および-E4を発現する遺伝子操作動物は、アミロイド負荷の順序がヒトと同様であり、これは、異なるApoEアイソフォームがプラークの開始および/または成長に影響を与えるという仮説と一致している。しかしながら、既存のアミロイド沈着および現存の神経変性に対するApoE媒介性効果の機構を分析するためには、さらなる研究が必要とされる。この知識不足を克服するために、本発明者らは、様々なAPOE対立遺伝子（またはGFP対照）を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを側脳室に注射して主に上衣に形質導入し、次いでこれが、ApoEを脳脊髄液および間質液内に

50

送達する生体工場として作用する遺伝子導入法を使用した。次いで、本発明者らは、生体多光子顕微鏡法を使用してプラークの形成、成長およびApoE2の場合には溶解に対する様々なApoEアイソフォームの効果を追跡し、インピボ微小透析法を使用してISFにおけるApoEおよびA β の生化学的変動をモニタリングし、アレイトモグラフィーを使用してA β 関連神経毒性の変化を評価した。本発明者らは、ApoEアイソフォームが、ISFにおける可溶性オリゴマーA β のレベル、A β 線維化および沈着の速度、一旦形成されたアミロイド沈着の安定性、それらのクリアランス、ならびにプラーク周囲の神経毒性効果の程度に影響を与えることを見出した。実際、ApoE4で処置したADマウスは、可溶性A β の量の増加、より高密度な線維性プラーク、シナプス要素の消失の悪化、および各沈着周囲の神経突起ジストロフィーの数の増加を示すのに対して、ApoE2では相対的な防御効果が観察された。これらのデータは、APOE対立遺伝子が主にA β を介してADに対するそれらの効果を媒介するという仮説を裏付けており、治療標的としてのApoEを強調している。

10

【0159】

結果

AAV4 - APOEを脳室内注射すると、脳でAPOE表現が安定的に発現し、ヒトApoEが持続的に産生される

アポリポタンパク質Eは自然に分泌されるタンパク質であり、アストロサイトおよびミクログリア細胞によって主に産生され、脳実質全体に拡散することができる。本発明者らは、GFP（対照）または各APOE対立遺伝子をコードするAAV血清型4を7カ月齢のAPP/PS1マウスの側脳室に注射することによって、この特性の利点を利用した。大脳領域がADの特徴的病変によって冒されていることを考慮すると、この戦略により、複数回の実質内注射と比較して大きな利点が得られた。

20

【0160】

注射の2カ月後、脈絡叢および脳室の内側を覆う上衣において形質導入細胞が検出され、AAV4ベクターの機能性が確認された。各種に対して特異的な抗体を使用してELISA（図9A、9Bおよび15A）およびウエスタンブロットによって、ヒトおよびマウスApoEタンパク質の両方を検出した。本発明者らは、ヒトアポリポタンパク質Eの濃度が平均で全タンパク質1mg当たり20 μ gに達したことを観察したが（図9A）、これは、内因性マウスapoEの約10%に相当する（図9B）。このわずかなさらなる量のヒトApoEの存在は、内因性マウスapoEタンパク質のレベルを検出可能に変化させなかった（図15A）。AAV4注射の2～5カ月後、少ないが統計的に有意な減少が観察された（図15B）。それにもかかわらず、ヒトタンパク質のレベルは対照群と比較して依然として検出可能であったが、これは、AAV4を介した形質導入により、実質全体に分泌される組換えタンパク質の持続的生産プラットフォームが提供されたことを示唆している。実際、内因性マウスapoEタンパク質が蓄積することが公知の皮質マントル全体にわたって、APP/PS1マウスのアミロイド沈着周囲において、ヒトApoEタンパク質を検出することができた。

30

【0161】

次に、本発明者らは、間質液（ISF）（これは、非常に生物学的に活性なA β 可溶性種を含有する細胞外区画である）におけるヒトApoEの存在を評価した。脳溶解物全体で検出されたApoEは比較的少量であるので、本発明者らは、各AAV4 - APOEベクターをいくつかのapoEノックアウト（KO）マウスに注射し、高感度だが非種特異的な抗体を使用してヒトタンパク質の存在を追跡した。微小透析技術を使用して、本発明者らは、apoEノックアウト（KO）注射動物のISFにおけるApoEの存在を確認した。

40

【0162】

全体として、これらのデータは、AAV4の単回脳室内注射が、脳実質全体にわたるおよびISF内における目的のタンパク質の持続的生産に十分であったこと、および上衣/脈絡叢が、治療用タンパク質を脳に潜在的に送達するための「生物学的ポンプ」として使

50

用することができることを裏付けている。

【0163】

ApoEアイソフォームの注入は、アミロイドペプチドおよびプラーク沈着に差次的に影響を与える

安楽死の5カ月前に、GFPまたは様々なApoEのアイソフォームを発現するベクターをAPP/PS1マウスに形質導入した。アミロイドプラーク負荷の分析により、5カ月後において、AAV4-APOE4を注射した動物の皮質では、APOE2を発現するものと比較して、アミロイド沈着密度の有意な増加が観察されたことが明らかになった。AAV4-GFPおよびAAV4-APOE3処置マウスにおけるプラーク密度は、中間レベルで互いに異なるものではなかった(図16A)。

10

【0164】

ギ酸抽出物から測定したA₄₀およびA₄₂ペプチド濃度は、アミロイドプラーク含有量について観察された変化に似ており、5カ月後において、APOE4対立遺伝子を発現するマウスではアミロイドペプチド濃度の増加が見られ(図16B)、APOE2では逆の効果が検出された。TBS可溶性画分におけるA₄₀およびA₄₂ペプチド含有量は、各AAV-APOEの注射によって同様に影響を受けた(図16C)。加えて、凝集A₄₀ペプチドと可溶性A₄₀ペプチドとの比はApoE曝露によって依然として変化せず、これは、区別可能な各ヒトApoEアイソフォームの過剰発現が線維性および可溶性アミロイド種の両方を同時に調節することを示唆している。

20

【0165】

各ApoEアイソフォームを2カ月間だけ過剰発現させると、5カ月間の研究で観察されたよりも効果は小さい。それにもかかわらず、AAV4-APOE4注射マウスの皮質領域内では、他の実験群と比較して、アミロイドプラーク密度の有意な増加が観察された(図16A)。これは、ギ酸画分に含まれるA₄₀の量と同等であったが(図16C)、これは、この特定の変異体の優勢効果を実証している。それぞれAAV4-APOE2またはAAV4-APOE4を2カ月間発現させた場合、TBS可溶性A₄₀/A₄₂種のみがより低くなるかまたはより高くなる傾向を示した(データは示さず)。

【0166】

ヒトApoEアイソフォームの存在が、A₄₀線維化の程度の初期変化を反映し得るかを決定するために、本発明者らはまた、注射の2カ月後に、(すべてのアミロイド沈着を標識する)Bam10および(高密度コアのみを染色する)Thio-Sを使用して、ロバスタなA₄₀免疫染色間の比を測定した。3つのアイソフォーム間で変化は検出されず、これは、この時間枠では実験群全体を通して、高密度および広範囲のアミロイド沈着集団の分布に対する差次的効果がなかったことを示唆している(図16B)。これらのデータは、ApoE変異体へのより長期の曝露が、より短期の曝露よりもアミロイド沈着に対する効果が強いことを示している。

30

【0167】

ApoEは、血液脳関門を通過するA₄₀輸送において役割を果たすことが示唆されている。ApoEアイソフォームへの曝露が、血液脳関門を介したA₄₀ペプチドの流出を調節し得るかを試験するために、各注射動物の血漿中のA₄₀濃度を測定した。本発明者らは、AAV4-APOE3およびAAV4-APOE4を脳室内注射した両マウスにおける血漿ヒトA₄₀含有量が、AAV4-APOE2およびAAV4-GFPの場合と比較して少なかったことを観察した(図10D)。これは、E3およびE4変異体の両方がA₄₀を中枢神経系区画に保持するのを支援することを示唆しており、これは、A₄₀濃度の相対的な増加が脳実質で観察されたこと、およびApoEによるA₄₀半減期の増強を示唆する先のデータと一致している。

40

【0168】

APOE4保因者は神経血管機能障害によりかかりやすく、血液脳関門の破壊は、アミロイド沈着が存在しない場合であってもAPOE4トランスジェニックマウスでよく見られることが最近示された。APP/PS1におけるAAV4-APOEの脳室内注射がBB

50

Bの完全性を損ない得るかを評価するために、プルシアンブルーによる死後染色を実施した。すべての群において、いくつかのヘモジデリン陽性局所領域が脳全体にまばらに広がって存在していたにもかかわらず、いずれの動物実験群間においても明らかな差異は観察されなかった。

【0169】

ApoEアイソフォームの発現は、アミロイドーシスの進行速度を調節する

5カ月後において、ApoE4はアミロイド沈着密度の増加に関連していたのに対して、ApoE2では反対の効果が観察された。これは、アミロイドの沈着、クリアランスまたはその両方の速度の変化を反映している可能性がある。ApoE変異体がアミロイドーシスの動的進行にどのように影響を与えるかを評価するために、本発明者らは、インビボ二光子イメージングを使用してアミロイドプラークの形成およびクリアランスの速度を追跡した。7カ月齢の時点でマウスにAAV4ベクターを脳室内注射し、1回目のイメージングセッションを実施するために、注射の1週間後に頭蓋窓を移植した(T0)。1カ月(T1)および2カ月(T2)後、アミロイド沈着を同じ視野でイメージングした。2回目のイメージングセッションの後、死後分析のためにマウスを安楽死させた。

【0170】

アミロイド沈着の大部分は依然として安定であったが、2カ月の期間の間に新たな偶発的プラークを小さな視体積で検出することができた。また、まれに、実験開始時にイメージングしたメトキシ陽性プラークを1または2カ月後に検出することができなかったが、これは、一部のプラークが排出されなかったことを示唆している。時間と共に、本発明者らは、アミロイド沈着の体積密度が全体的に増加し、T2の密度はT1よりも平均23%大きいことを観察した。2カ月後において、ApoE4処置APP/PS1マウスではアミロイド進行速度がより速かったのに対して、ApoE2曝露動物では、アミロイド沈着密度がGFP(0.66)、ApoE3(0.67)およびApoE4(0.74)と比べて有意に減少した(図11A、11B)。重要なことに、ApoE2の変化はベースラインからの減少を反映しており、免疫を介さないプラークの活性クリアランスを初めて直接示すものである。APOEトランスジェニック動物から得られたデータとは対照的に、これらの結果は、アミロイド沈着が既に始まった後であっても、ApoE量のわずかな増加の誘導が進行中のアミロイド形成過程に影響を与えることができることを実証している。

【0171】

本発明者らは次に、個々の沈着の断面積についてT1/T0とT2/T1との比を測定することによって、単一のアミロイドプラークの成長を評価した。T1(T1/T0の比)時点では群間で差異が検出されたが、T2(T2/T1の比、図12)時点では検出されず、これは、ヒトApoE変異体の存在が、曝露後の最初の1カ月間のプラーク成長に主に影響を与えるが、その後はこのパラメータに差異がないことを示唆している。特に、ApoE4処置マウスでは、アミロイド沈着のサイズは、ApoE2およびApoE3の両方の場合と比較して有意に大きく成長したが、これは、プラークの数だけではなくそれらのサイズもこの対立遺伝子によって悪化したことを示唆している。したがって、ApoE4は、Aβペプチドのシーディングおよび既存のプラークのサイズの両方に影響を与える。

【0172】

アミロイド沈着周囲のシナプス密度は、ApoE2と比較してApoE3およびApoE4アイソフォームによって悪化する

シナプス消失は、認知機能障害と最も良く相関するパラメータである。本発明者らは最近、ApoE4の存在が、ヒトAD患者の脳におけるシナプスオリゴマーAβがより高レベルであることに関連しており、アミロイドプラーク周囲のシナプス密度をApoE3と比較して有意に減少させることを示した(R.M. Koffieら、Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid-beta. Brain 135, 2155 (Jul, 2012); T.

Hashimotoら、Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid beta Peptide. *J Neurosci* 32, 15181 (Oct 24, 2012)). 加えて、最近のインビトロの証拠により、ApoE4は、A β 誘導性シナプス消失を防御することができなかったことが実証された(M. Buttiniら、Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci* 22, 10539 (Dec 15, 2002); A. Sen, D. L. Alkon, T. J. Nelson, Apolipoprotein E3 (ApoE3) but not ApoE4 protects against synaptic loss through increased expression of protein kinase C epsilon. *J Biol Chem* 287, 15947 (May 4, 2012)). したがって、本発明者らは、各ApoEアイソフォームの連続的な広範囲の分布は、APP/PSマウスの脳におけるA β の沈着およびクリアランスの速度だけではなく、アミロイド沈着周囲のシナプスの完全性にも差次的に影響を与え得ると仮説を立てた。

【0173】

アレイトモグラフィー（これは、超薄組織切片の免疫蛍光染色に基づく高解像技術である）を使用して、シナプス前要素およびシナプス後要素（それぞれシナプシン-1およびPSD95）の密度を決定した(K. D. Micheva, S. J. Smith, Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron* 55, 25 (Jul 5, 2007); R. M. Koffieら、Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4012 (Mar 10, 2009)). アミロイドオリゴマー種はアミロイド沈着のすぐ周辺で高濃度であることが示されたので、以前に確立されたプロトコル(R. M. Koffieら、Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4012 (Mar 10, 2009))を使用して、ブランクから離れた場所(50 μ m超)またはブランクの近くの場所(50 μ m未満)のいずれかにおいて、シナプシン-1およびPSD95の斑点を定量した。本発明者らは、APOE3またはAPOE4のいずれかを発現させた場合、ブランク付近のシナプス前要素の消失が悪化したことを観察したが、これは、AAV4-APOE2またはAAV4-GFPの注射後のケースではなかった(図13A)。対照的に、GFP、ApoE2およびApoE3注射マウス間ではシナプス後斑点の密度は依然として不変であったのに対して、ApoE4処置動物は、アミロイド沈着周囲における有意なPSD95消失を示し、これが、A β の神経毒性効果に対するApoE4の有害効果を増強した(図13C)。アミロイド沈着から離れた位置の領域(50 μ m超)においてシナプス要素の密度を評価したところ、群間で差異を検出することができず、これは、ヒトApoE変異体それ自体にはシナプス密度に対して効果がないが、ApoEアイソフォームはA β 誘導性神経毒性に対して重要な効果があることを示唆している。したがって、ApoE3およびApoE4で観察された相対的なシナプス消失は、各ブランク周囲の(その端から50 μ m未満

の距離にある) A ペプチドの存在に直接関係している。

【0174】

さらなる神経病理学的パラメータとして、本発明者らはまた、AAV4注射APP/PS1マウスにおけるアミロイド沈着に関連する神経突起ジストロフィーの数を評価した。また、老人斑は、それらの周囲のスパイン密度の減少に加えて、神経突起の湾曲が増加した神経網および膨張性ジストロフィーの出現というより一般的な変化を引き起こす。これらの病理学的変化は、プラーク表面50 μm内の領域に豊富にある可溶性オリゴマーA種に起因する可能性がある。本発明者らは、ApoE4の過剰発現が、GFP、ApoE2およびApoE3と比較して、アミロイド沈着に関連するSMI312陽性神経突起ジストロフィーの形成を悪化させることを観察した(図13C)。この結果は、ApoE4アイソフォームが最も強力な効果を有し、プラーク形成を調節するだけでなく、アミロイド関連神経毒性にも影響を与えるという観察結果を裏付けている。

10

【0175】

ヒトApoEタンパク質は、ADの別のマウスモデルの間質液に含まれるオリゴマーA種の量を変化させる

本発明者らは次に、ISF内の異なるApoEアイソフォームの存在が、その同じ細胞外区画における可溶性アミロイド種の量を変化させ得るかという問題に取り組んだ。本発明者らの先の知見を異なるトランスジェニックマウス系統で検証するために、本発明者らは別のADモデル(Tg2576マウス)に注射することを選択した。Tg2576マウスは、スウェーデン突然変異を含有する突然変異型APPを過剰発現し、所定の年齢でAPP/PS1マウスよりもはるかに軽度の表現型を示す。本発明者らは、16~18カ月齢の動物のコホートに注射したところ、アミロイド沈着がAAV4-APOE形質導入時に既に存在していた。遺伝子導入の3カ月後、微小透析プローブを海馬に挿入し、試料を採取して、ISF内の各APOE変異体に関連する初期変化を特性決定した。

20

【0176】

本発明者らは、AAV4-APOE4の注射後において、特異的82E1/82E1ELISAアッセイを使用して測定したAオリゴマー種の濃度がAAV4-APOE2の場合と比較して有意に(42±7%)高かったことを観察したが(図14)、これは、ApoEの存在が、この細胞外区画におけるアミロイド凝集体の性質を調節し得ることを示唆している。また、ISFにおいてA₄₀およびA₄₂の合計を評価したところ、同じ傾向が観察されたが有意には達せず(図17A)、これは、ISFにおける異なるApoEアイソフォームの存在が、アミロイドペプチドの凝集状態に対して、総量よりもいくらか影響を及ぼすことを示唆している。

30

【0177】

予想通り、様々なApoEアイソフォームに曝露したTg2576マウス由来の脳の死後生化学分析により、ApoE4処置動物では、ギ酸画分におけるA₄₂濃度が有意に増加していたことが示され(図17B)、APP/PS1マウスにおける本発明者らの観察結果が第2のトランスジェニックモデルで裏付けられた。

【0178】

統合すると、これらの生化学的な測定結果は、Tg2576マウスにおけるApoE発現が、APP/PS1マウスで観察されたのと同様のアミロイド生態変化を誘導することを示唆している。重要なことに、これらの神経毒性種がシナプス末端と直接相互作用し得るISF内において、oA含有量の初期変化が観察されている。

40

【0179】

考察

APOE4対立遺伝子(これは、リスクを増加させる)およびAPOE2対立遺伝子(これは、ADの発症について劇的な逆の効果を有する)遺伝間の顕著な関連性により、このリスクがどのように媒介されるかについての複数の示唆が得られた。ApoEは、Aクリアランスに関与するA結合タンパク質として関与している。しかしながら、apoEノックアウトマウスにおける研究では、驚くべきことに、apoEの非存在下ではA

50

沈着が実質的に少なかったことを報告した。ヒトA P O E 2、A P O E 3またはA P O E 4で置換すると、A D患者と同じ順序でアミロイド沈着が増加したが、これは、プラークの開始または線維形成に対する効果を介して起こると仮定した。別の仮説は、神経突起伸長に対する差次的効果に注目するものであり、またはアルツハイマー病表現型に対するA P O E 遺伝子型の効果は、別の遺伝子が第19染色体上のA P O E と遺伝的不平衡にある結果であるとさらに提案するものである。

【0180】

リソソーム蓄積症およびハンチントン病の状況で以前に試験された方法を使用して、2匹の異なるマウスモデルの研究から得られた本発明者らのデータは、インビボ多光子イメージング、標準定量免疫組織病理学、シナプス構造のアレイトモグラフィ研究、およびオリゴマーA の検査を可能にする新規な高分子量微小透析法の組み合わせを使用することによって、これらの問題に直接取り組んだ。本発明者らは、既存の疾患を有する動物におけるI S F A p o E 微小環境の変化が、A エコノミーに対して顕著かつ急速な対立遺伝子特異的効果を有することを示した。本発明者らの研究により、I S F に送達されるA p o E 4レベルのわずかな(約10%)増加でさえ、A の表現型およびクリアランス速度に著しく影響を与え(増加した可溶性A ならびに抽出可能な線維およびギ酸形態がA p o E 4に関連して保持される)、シナプス消失および神経突起ジストロフィーの増加を特徴とするプラーク周囲の神経毒性を増加させることが実証された。逆に、a p o E 2はA を減少させ、顕著な神経防御効果を有する。

【0181】

I S F のA p o E レベルのわずかな変化はこのような劇的な結果を招くので、これらの結果から、A P O E 発現に影響を及ぼすことによってA DまたはA D進行のリスクを変化させ得る多種多様な環境的および遺伝的因子の効果に関する洞察が導かれ得る。本発明者らが実証した規模よりも実質的に大きなA p o E の増加が、外傷、癲癇、虚血および高コレステロール食(これらはすべて、脳A の上昇に関連している)の後に起こり得る。また、A P O E 4対立遺伝子と遺伝的不平衡にあると先に見出されたプロモーターの多型は、A P O E 発現に影響を与える。

【0182】

C N SにおけるA p o EまたはA p o E リポタンパク質の恒常性に影響を与える他の操作は、A 沈着を明らかに変化させる。例えば、A P O E レンチウイルスによる局所遺伝子導入(主に海馬ニューロン)実験では、A P O E 4過剰発現は、A P O E 3と比べて、アミロイドに対して強い効果を発揮する。また、先の研究により、内因性のa p o E 合成の増強を含む複数の効果を有するR X R アゴニストは、おそらくは血液脳関門通過クリアランスに対する効果によって、脳からのA クリアランスにつながることが示された。加えて、C N Sにおけるコレステロールを代謝し、そのレベルを低下させるC Y P 4 6 A を脳に形質導入すると、脳におけるL D L - R (これは、a p o E を減少させることが公知である)が増加するにつれてA 沈着が減少する。最後に、遺伝子操作は、a p o E 発現を半分に変化させることによりA 表現型に影響を与え得ることを示唆している。興味深いことに、本発明者らの結果は、よりわずかな変化も劇的な効果を有し得ることを示唆している。

【0183】

本発明者らのデータは、A P O E - アルツハイマー文献で論争のある4つの他の重要な分野に直接取り組むものである。1)本発明者らは、シナプス消失および神経突起ジストロフィー(これらは両方とも、神経系機能の障害に関係する可能性がある)によって評価した、神経毒性に対するA p o E アイソフォームの明らかな効果を実証する。これらの効果は、プラークから離れた領域ではなくプラークのすぐ周辺で明白であったので、A p o E 4と比較したA p o E 2のシナプス防御性は、シナプス安定性に対するA p o E の直接的な効果によるのではなくプラーク周囲のA に対する効果によって媒介される可能性がある。2)縦断的多光子インビボイメージングを使用したプラークの沈着および成長の速度についての直接的な観察は、A p o E 4はプラークの沈着および成長を増強するのに対

して、ApoE2はプラークの分解に実際に関連することを示している - ApoEアイソフォームは、線維性プラーク形成に対する初期効果よりも、疾患の速度および進行に対して強い影響を与えるといえる。この結果は、ApoE4はアミロイド沈着および神経毒性の両方の点で疾患過程を加速させ得る（したがって、より低年齢の発症につながる）が、ApoE2は反対に作用するという考えを補強するものであり、CNSへのApoE2（またはApoE2模倣体）の導入は、疾患が十分に確立された後であっても治療的価値を有し得るという可能性を提起する。3）ApoEは、脳からのA β 排出機構として、またはクリアランス半減期を増加させる保持分子として様々に示唆されている；本発明者らの今回の結果は、ISFへのわずかな量のApoEの導入が、それがApoE2ではない限り、CNSにおけるA β 保持を増強するのに十分であることを示している。4）部分的には、ApoE2はApoE受容体に比較的弱く結合するという理由から、ADにおけるAPOE2の顕著な防御作用機構は長く不明であった。本発明者らの今回のデータは、血漿へのA β クリアランスに対する効果が中立的であるかまたは全くない可能性に加えて、ApoE2が獲得型機能を有する（確立されたA β 沈着を実際に回復させ、シナプスおよび神経突起の可塑性を支援することができる）ことを示唆している。これは、APOE4およびAPOE2対立遺伝子を遺伝で受け継いでいる患者間で発症年齢が数十年間異なるのは、沈着に関連する神経毒性の程度に関する対立遺伝子特異的な差異だけではなく、異なる開始点ならびにA β の沈着およびクリアランスの速度に関する継続的な差異の両方を反映している可能性があることを示唆している。ApoE2のこの二重機能は、そのプラーク除去およびシナプス修復能を模倣することを目的とした治療的アプローチにつながり得る。

10

20

【0184】

これらの結果は、apoEがA β オリゴマー形成の足場として作用するモデル、オリゴマーA β の形成および安定化の効率（ApoE4 > ApoE3 > ApoE2）、ならびにヒトAD患者のCNSでは（プラーク負荷を症例全体で標準化する場合であっても）オリゴマーA β が上昇している（ApoE4 > ApoE3）という本発明者らの最近の観察結果と一致している。ApoE、特にApoE4が神経毒性オリゴマーA β の形成を媒介する場合、本発明者らは、今回のデータの場合のように、ApoE4を増強するとシナプスおよび神経突起の変化が増加すると予測した。これらの結果に基づいて、APOE4対立遺伝子を遺伝で受け継いでいるAD患者の脳におけるapoEレベルを増加させる薬剤に関して注意を払うべきである。

30

【0185】

最後に、本発明者らのデータは、AAVを介した上衣の形質導入が分泌タンパク質を脳およびその皮質マントル全体に送達する力を裏付けている。apoE4を減少させるかまたはapoE2を増加させる遺伝子導入または他のアプローチは、ADの疾患進行に影響を与える強力な手段である。

【0186】

材料および方法

動物。APP^{swE}/PS1^{dE9}（APP/PS1）ダブルトランスジェニックマウス（D.R. Borcheltら、Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. Neuron 19, 939（Oct, 1997））（Jackson laboratory, Bar Harbor, Maineから入手）およびTg2576マウス（K. Hsiaoら、Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 274, 99（Oct 4, 1996））の両方を使用して、実験を実施した。スウェーデン二重突然変異K594N/M595Lを含有するヒト突然変異体アミロイド前駆体タンパク質遺伝子を、プリオンタンパク質プロモーターの制御下でこれら2つのマウス

40

50

系統のゲノムに挿入した。加えて、APP/PS1マウスモデルは、(同じプロモーターによって駆動される)エクソン9が欠失した変異体プレセニン1遺伝子を過剰発現する。APP^{sw}およびPSEN1をAPP/PS1マウスで同時に過剰発現させると、より重度の表現型が得られ、6カ月齢になるとすぐかなりのアミロイド沈着が目に見える。他方、Tg2576マウス系統は、約1歳でアミロイドブラークのみを発症するかなり軽度のモデルである。異なるApoEアイソフォームの導入が疾患進行に影響を与えるかを決定するために、本発明者らは、7カ月齢および16カ月齢のAPP/PS1(条件当たり動物4~7匹)およびTg2576(条件当たり動物3~5匹)マウスにそれぞれ注射した。ApoE欠損マウス(ApoEノックアウト(KO), the Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)も使用した。NIHおよび施設内ガイドラインにしたがって、実験を実施した。

10

【0187】

ウイルスベクターの構築および生産

寛大にも、University of Illinois (Chicago)のDr. LaDuがAPOE-2、-3および-4のcDNAを提供してくれた。PCRによる増幅後、それらをそれぞれBamHIによって消化し、AAV2-pCMV-hrGFP骨格に挿入した。University of Iowa, Iowa CityのGene Transfer Vector Coreによるバキュロウイルス系を使用して、高力価のAAV血清型4ベクター(AAV4-APOE2、AAV4-APOE3、AAV4-APOE4およびAAV4-GFP)を生産した。定量PCRを使用してウイルス

20

【0188】

定位脳室内注射。

以前に記載されているように(T. L. Spireśら、Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. J Neurosci 25, 7278 (Aug 3, 2005); G. Liu, I. H. Martins, J. A. Chiorini, B. L. Davidson, Adeno-associated virus type 4 (AAV4) targets ependyma and astrocytes in the subventricular zone and RMS. Gene Ther 12, 1503 (Oct, 2005))、AAV血清型4ベクターの定位脳室内注射を実施した。ケタミン/キシラジン(それぞれ100mg/kgおよび50mg/kg体重)の腹腔内注射によって動物を麻酔し、定位フレーム(David Kopf Instruments, Tujunga, CA)上に配置した。10μlハミルトンシリンジ(Hamilton Medical, Reno, NV)を取り付けた33ゲージシャープマイクロピペットを使用して0.25μl/分の速度で、ベクターの注射を各側脳室に5μlのウイルス調製物(力価 2×10^{12} vg/ml)で実施した。ブregmaから注射部位の定位座標を計算した(前後0.3mm、内外±1mmおよび背腹-2mm)。

30

40

【0189】

頭蓋窓移植および多光子イメージング。

(T. L. Spireśら、Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. J Neurosci 25, 7278 (Aug 3, 2005)に以前に記載されているように)脳室内注射の1週間後、マウスをイソフルラン(1.5%)で麻酔し、頭蓋骨片を取り出してそれを直径8mmのガラスカバースリップと交換することによって頭蓋窓を移植した。イメージングのために、頭蓋窓の境界に沿ってワックスリングを構築して、対物レ

50

ンズ(20倍対物レンズ、開口数0.95、Olympus)用のウォーターウェルを作った。アミロイド沈着を可視化するために、手術の24時間前にメトキシ-XO₄(5mg/kg)(これは、血液脳関門を通過してアミロイド沈着に結合する蛍光化合物である)をトランスジェニック動物に腹腔内注射した(B. J. Bacskaï, W. E. Klunk, C. A. Mathis, B. T. Hyman, *Imaging amyloid-beta deposits in vivo. J Cereb Blood Flow Metab* 22, 1035 (Sep, 2002))。イメージング前に、Texas Redデキストラン(分子量70,000Da; 12.5mg/ml滅菌PBS溶液PBS; Molecular Probes, Eugene, OR)を外側尾静脈に注射して蛍光血管造影図を得、正確に同じ視野を経時的に追跡するランドマークとして血管系の形状を使用した。アミロイド沈着のベースラインレベルを評価するために、マウスをAAV注射の1週間後にイメージングし、次いで注射の1および2カ月後にイメージングした。

10

【0190】

多光子イメージングシステム(Bio-Rad 1024ES, Bio-Rad, Hercules, CA)にマウントしたモードロックTi:サファイアレーザー(Maitai, Spectra-Physics, Mountain View, CA)により、860nmの二光子蛍光励起光を生成した。三光電子増倍管を含有する特注の外部検出器(Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ)によって、380~480、500~540および560~650nmの範囲内で放出光を収集した。ブランクおよび血管造影に関する2色の画像を同時に取得した。低倍率のインビボ画像(615×615μm; zステップ2μm、深さ約200μm)を取得し、6~8つの視野をイメージングして大皮質領域を網羅した。

20

【0191】

画像処理および分析。Image Jを使用して、イメージングした皮質体積当たりのアミロイド沈着の総数を報告することによって、各視野におけるブランク密度を定量した。本発明者らは、表面の最初のzスタックスライスから始まって、アミロイド沈着を検出することができた最後のスライスまでの皮質体積を検討した。二次元投影後の最大強度から断面積を測定することによって、アミロイド沈着のサイズを経時的に評価した。各ブランクについて、最初の時点と1カ月目との面積比(T1/T0)または2カ月目と1カ月目との面積比(T2/T1)を計算した。

30

【0192】

多光子顕微鏡(レーザー出力およびPMT)の設定は、全実験期間中の異なるイメージングセッションを通して変更しなかった。

【0193】

インビボ微小透析サンプリング。各AAV4を脳室内注射した3カ月後に、脳間質AおよびApoEのインビボ微小透析サンプリングをTg2576マウスで実施した(S. Takedaら、*Novel microdialysis method to assess neuropeptides and large molecules in free-moving mouse. Neuroscience* 186, 110 (Jul 14, 2011))。微小透析プローブは、3.0mm、カットオフ分子量(MWCO)1000kDaのポリエチレン(PE)膜(PEP-4-03, Eicom, Kyoto, Japan)を備える4mmシャフトを有していた。使用前に、プローブをエタノールに簡単に浸漬することによって調整し、次いで、孔径0.2μmの膜に通してろ過した人工脳脊髄液(aCSF)灌流緩衝液(mM単位: 122NaCl、1.3CaCl₂、1.2MgCl₂、3.0KH₂PO₄、25.0NaHCO₃)で洗浄した。フッ素化エチレンプロピレン(FEP)チューブ(内径250μm)を使用して、予め調整したプローブの排出口および注入口をそれぞれ蠕動ポンプ(ERP-10, Eicom, Kyoto, Japan)およびマイクロシリンジポンプ(ESP-32, Eicom, Kyoto, Japan)に接続した。

40

50

【0194】

わずかに修正を加えたが以前に記載されているように (S. Takeda ら、Novel microdialysis method to assess neuropeptides and largemolecules in free-moving mouse. Neuroscience 186, 110 (Jul 14, 2011; J. R. Cirrito ら、In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. J Neurosci 23, 8844 (Oct 1, 2003))、プローブの埋め込みを実施した。簡潔に言えば、ガイドカニューレ (PEG-4, Eicom, Kyoto, Japan) を用いて、麻酔した動物 (1.5% イソフルラン) の海馬 (ブレグマ - 3.1 mm、中線の外側 - 2.5 mm、腹部の腹側 - 1.2 mm) に定位的に埋め込んだ。次いで、バイナリ歯科用セメントを使用して、ガイドを頭蓋骨に固定した。

10

【0195】

ガイドカニューレを埋め込んだ4日後、マウスを標準的な微小透析ケージに入れ、ガイドを介してプローブを挿入した。プローブの挿入後、安定した記録を得るために、プローブおよび接続チューブを試料採取前に流速 $10 \mu\text{l} / \text{分}$ で240分間にわたって aCSF で灌流した。流速 0.25 (A 定量の場合) および $0.1 \mu\text{l} / \text{分}$ (ApoE 検出の場合) で試料を採取した。試料をポリプロピレンチューブに4 で保存した。微小透析の試料採取中、プローブアセンブリに加圧することなく、動物が無制限に動けるように設計された微小透析ケージ (AtmosLM microdialysis system, Eicom, Kyoto, Japan) 内で、マウスは覚醒して自由に運動していた。

20

【0196】

免疫組織学的分析。APP/PS1 マウスは脳室内注射の2または5カ月後 (短期および長期の曝露) に CO_2 吸入によって安楽死させたのに対して、Tg2576 動物は3カ月後に屠殺した。免疫組織学的分析のために1つの大脳半球全体を4%パラホルムアルデヒドのリン酸緩衝生理食塩水で固定し、パラフィンワックスに包埋した。前頭葉の1mm 冠状断面はアレイトモグラフィアッセイのために加工したのに対して、半脳の残りの部分は生化学的生体分子分析を実施するために急速凍結した。

30

【0197】

アミロイド沈着、ApoE および GFP を検出するために、パラフィン包埋切片 ($10 \mu\text{m}$) をキシレンで順次に脱パラフィン化し、エタノールで再水和し、クエン酸緩衝液 (10mM クエン酸ナトリウム、 0.05% Tween 20、 $\text{pH} 6.0$) で処理し、 0.5% Triton を含む PBS で透過処理し、 3% BSA を含む PBS によって室温で2時間ブロッキングした。一次抗体とのインキュベーションを4で一晩行った: アミロイドプラークに対する Bam10 (SIGMA 1:1000) および R1282 (1:500、Dr Dennis Selkoe より提供)、ヒト ApoE に対するマウスモノクローナル抗体 3H1 (Ottawa Heart Institute)、ニワトリ抗 GFP ($1:500$, Aves) および神経突起ジストロフィーに対する SMI-312 ($1:500$, Covance)。翌日、二次抗体とのインキュベーションを室温で2時間行った。マウント前に、切片を Thio-S (Sigma, St Louis, MO) 0.05% の 50% エタノール溶液中で8分間インキュベートすることによって、アミロイド高密度コアプラークを標識した。

40

【0198】

アレイトモグラフィアのための試料調製、免疫染色およびイメージング分析

以前に記載されているように (R. M. Koffie ら、Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. Proc N

50

at1 Acad Sci U S A 106, 4012 (Mar 10, 2009))、シナプス前要素およびシナプス後要素のアレイトモグラフィ分析を実施した。簡潔に言えば、脳室領域に隣接する皮質組織切片 (1 mm^3) を解剖し、4%パラホルムアルデヒド、2.5%スクロースの0.01M PBS溶液で3時間固定した。エタノールで脱水した後、試料をLR White resin (Electron Microscopy Sciences) 中、4 で一晩インキュベートしてから、53 で重合させた。次いで、ultracutミクロトーム (Leica) 上でジャンボヒストダイヤモンドナイフ (Diatome) を使用することによって、リボン状の切片 (70 nm) を切断した。

【0199】

50 mMグリシンのTBS溶液で5分間再水和した後、0.05% Tweenおよび0.1% BSAのTris溶液で切片を5分間ブロッキングし、ブロッキング緩衝液中、一次抗体を1:50で2時間アプライした (PSD95 Abcam Ab12093、シナプシンI Millipore AB1543、およびDr Virginia LeeからのNAB61 (これは、オリゴマーA 種を選択的に染色する)、E. B. Leeら、Targeting amyloid-beta peptide (Abeta) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in Abeta precursor protein (APP) transgenic mice. J Biol Chem 281, 4292 (Feb 17, 2006))。スライドをTBSで洗浄し、二次抗体をアプライした (抗ヤギ-Alexa Fluor 488、抗マウスCy3または抗マウスAlexa Fluor 488 Invitrogen)。前頭葉の7~30個の連続切片の画像を得て、Zeiss AxioPlan LSM510共焦点/多光子顕微鏡 (63x numerical aperture Plan Apochromatic oil objective) を使用することによって取得した。

【0200】

以前に記載されているようにImage J (National Institutes of Health open software) およびMATLAB (Math works) (R. M. Koffieら、Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 4012 (Mar 10, 2009)) を使用して、画像を分析した。各画像セットをスタックに変換し、Image J MultiStackRegおよびStackRegプラグイン (Brad Busse and P. Thevenaz, Stanford Universityの厚意によるもの) を使用することによってアライメントした。既知体積を選択し、閾値ベースの自動化検出プログラムを使用して、複数の連続切片に現れたPSD95およびシナプシンの斑点の両方を計数した (Brad Busse, Stephen Smith, and Kristina Micheva, Stanford Universityから提供を受けた流域プログラム)。複数のアレイスライスに存在した斑点を示す (各チャンネルについて別個の) 閾値画像スタックを流域からエクスポートした。マウス1匹当たりいくつかの皮質部位をサンプリングし、ブランク端からの距離を測定した。

【0201】

A の定量

製造業者の説明書にしたがってBNT-77/BA-27 (A_{40} の場合) およびBNT-77/BC-05 (A_{42} の場合) サンドイッチELISA (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) によって、T

10

20

30

40

50

B S可溶性画分、ギ酸画分および微小透析液におけるA₄₀およびA₄₂濃度を決定した。同じN末端(残基1~16)抗体を捕捉および検出の両方に使用した82E1/82E1サンドイッチELISA(Immuno-Biological Laboratories, Inc, Hamburg, Germany)によって、試料中のオリゴマーA₄₀の量を決定した(W. Xiaら、A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. Arch Neurol 66, 190 (Feb, 2009))。

10

【0202】

イムノブロット分析

SDS-PAGE用MOPSSランニング緩衝液(Invitrogen)中の4~12% Novex Bis-Trisゲル(Invitrogen)上で、脳TBS可溶性画分および微小透析液(20μgのタンパク質)を電気泳動した。ゲルをPVDF膜に転写し、5%ミルク/TBS-T中、室温(RT)で60分間ブロッキングした。ヤギ抗ApoE抗体(1:1000, Millipore, AB947)で膜をプローブして、APOEヌル動物のISFにおける少量のAPOEを検出し、アルブミンを対照として検出した。EP1373Y抗体(1:1000, Novus Biologicals, NB110-55467)およびウサギポリクローナルapoE抗体(1:1000, Abcam, ab20874)でヒトおよびマウスApoEのプロットをそれぞれプローブした。HRPコンジュゲートヤギIgG抗体(Vector)とのインキュベーションを2時間行った。ECLキット(Western Lightning, PerkinElmer)を使用して免疫反応性タンパク質を開発し、Hyperfilm ECL(GE healthcare)上で検出した。

20

【0203】

qRT-PCR

TRIzol(登録商標)試薬(Life technologies; 15596-026)を使用して脳試料由来の全RNAを抽出し、次いで、SuperScript(登録商標)II One-Step RT-PCR System(Life technologies; 12574-018)の製造業者の説明書にしたがってcDNAを合成した。組換えヒトAPOE mRNAならびに内因性ApoEおよびGapdh mRNAを増幅するようにPCRプライマーを特別に設計した(ApoEフォワード: 5'-AGCTCCCAAGTCACACAAGA; ApoEリバース: 5'-GTTGCGTAGATCCTCCATGT; APOEフォワード: 5'-CCAGCGACAATCACTGAAC; APOEリバース: 5'-GCGCGTAATACGACTCACTA; Gapdhフォワード: 5'-ATGACATCAAGAAAGGTGGTGおよびGapdhリバース: 5'-CATACCAGGA AATGAGCTTG)。

30

【0204】

APOE ELISA

特異的ELISAアッセイを使用して、ヒトおよび内因性マウスAPOEタンパク質の両方を検出した。簡潔に言えば、1.5μg/mlのヤギ抗APOE抗体(マウスAPOEの検出用)または1.5μg/mlのWUE4抗体(ヒトAPOEの検出用)でELISAプレートを一晩コーティングし、PBSで希釈した1%脱脂乳によって37℃で1.5時間ブロッキングした。ヒト組換えapoEタンパク質を標準として(ヒト特異的アッセイの場合、Biovision)または脳抽出物由来のインハウスマウス標準(マウス特異的アッセイの場合)を使用し、ELISA緩衝液(0.5%BSAおよび0.025%Tween-20のPBS溶液)で試料を希釈し、一晩インキュベートした。洗浄後、ヒト(ヤギapoE Millipore; 1:10,000)またはマウス(Abcam ab20874; 1:2,000)に対して特異的な検出抗体をそれぞれ使用し、続

40

50

いて、適切なHRPコンジュゲート二次と共に1.5時間インキュベートした。TMB基質を使用してシグナルの可視化を行ってから、 H_3PO_4 を使用して溶液を停止させた。比色分析結果を450nmで測定した。

【0205】

統計分析

Prismソフトウェアを使用して、統計分析を実施した。試料のサイズが小さいので、分析のほとんどについて正規性を仮定することができなかった。すべての死後分析について、注射した各ベクターの効果を評価するために、ノンパラメトリッククラスカル・ワリス検定を実施し、続いてダンの多重比較検定を実施した。マウスについてはランダム効果とし、ベクター、時間およびベースライン体積密度については固定効果とする混合効果モデルを使用して、アミロイド進行のインビボイメージングデータを分析した。この分析では、時間とベクターとの間の相互作用を検討したが有意ではなかった。経時的なブラークサイズの分析では、マウスについてはランダム効果とし、対数ベースラインサイズについては固定効果として、連続する2時点の対数比について2つの混合効果モデルをフィッティングした(第1の分析の t_0 、第2の分析の t_1)。

【0206】

すべての刊行物、特許および特許出願は、参照により本明細書に組み込まれる。上記明細書では、ある特定の好ましい実施形態に関連して本発明を説明し、多くの詳細を例示目的で記載したが、当業者であれば、本発明はさらなる実施形態の影響を受けやすいこと、および本発明の基本原理解から逸脱することなく、本明細書に記載される詳細の一部を大幅に変更し得ることが明らかであろう。

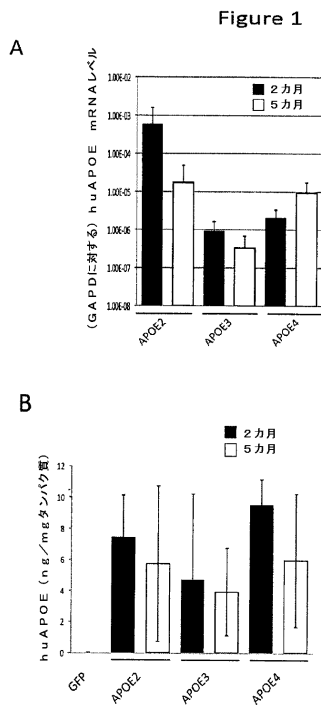
【0207】

本発明を説明する文脈で用語「a」および「an」および「the」ならびに類似指示語を使用することは、特に本明細書で指示がないかまたは文脈上明らかな矛盾がない限り、単数形および複数形の両方を包含するように解すべきである。用語「含む(compri-
sing)」、「有する(having)」、「含む(including)」および「含有する(containing)」は、特に注記がない限り、非限定的な用語(すなわち、「限定されないが、～を含む」を意味する)と解すべきである。本明細書における値域の記載は、特に本明細書で指示がない限り、単にその範囲内にある別個の各値を個々に言及する略記方法としての役割を果たすためのものであり、別個の各値は、本明細書で個々に言及されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される方法はすべて、特に本明細書で指示がないかまたは文脈上明らかな矛盾がない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供される任意およびすべての例または例示的文言(例えば、「などの」)を使用することは、単に本発明をより良く説明するためのものであり、特に特許請求の範囲に記載されていない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書における文言は、特許請求の範囲に記載されていない要素が本発明の実施に必須であることを示すものと解すべきではない。

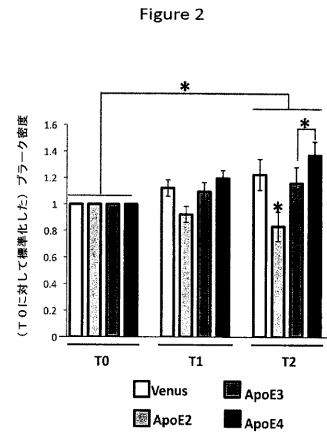
【0208】

本発明者らが理解している発明を実施するための最良の形態を含む本発明の実施形態が本明細書に記載されている。当業者であれば、上記説明を読むことによりこれらの実施形態の変形物が明らかになるであろう。本発明者らは、当業者であればこのような変形物を採用することを予想しており、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されているのとは別の方法で本発明が実施されることを意図する。したがって、本発明は、適用法が許容するように、本明細書に添付されている特許請求の範囲に記載された主題のすべての改変物および均等物を含む。また、特に本明細書で指示がないかまたは文脈上明らかな矛盾がない限り、上記要素をそのすべての可能な変形で任意に組み合わせたものが本発明によって包含される。

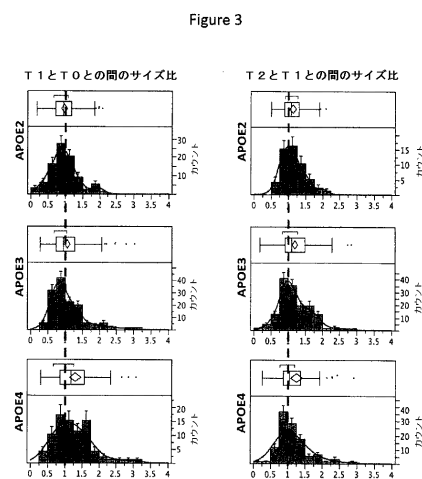
【図 1】



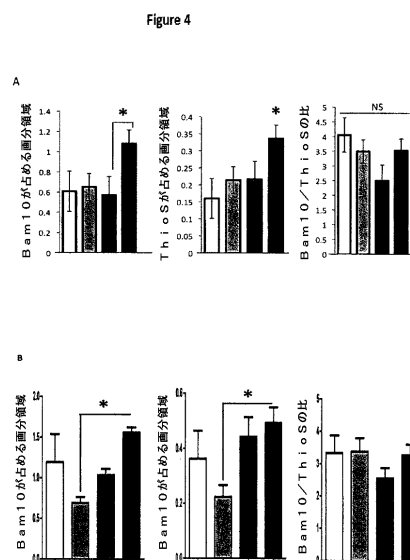
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 6 B - 5】

Figure 6B-5

AAV2capNuc 1372 TCAA--GGCTTCAGTTTCTCAGGCGGAGCG-AGTGACATTCGGACAGCTCTAGGAC 1428
AAV4capNuc1 1354 ACTGCCACACCACTTTACAAAGCTGGGCTTACCACTTTTCGAATTTTAAAGAAC 1413
AAV2capNuc 1429 TGGCTTCTGCACTCTGTACGCGAGCGAGTATCAAGACATCTCGGATACAAAC 1488
AAV4capNuc1 1414 TGGCTTCTGCACTCTGTACGCGAGCGAGTATCTCAAGACTTCCAACTCAACTAC 1473
AAV2capNuc 1489 AACAG--TGAACTCTGTGGCTGGAGTACCAAGTACCA-----CCTCAAT 1533
AAV4capNuc1 1474 AAGATCTCTGCCACCGGCTCAGACAGTCTCATCAATACGAGACGACAGCACTCTGGAC 1533
AAV2capNuc 1534 GCGAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCGGCGCATGGCAAGCCACAAAGGACATGAGAA 1593
AAV4capNuc1 1534 GGAAGATGAGTGCTGCTGACCCCGGACTTCCATTCGCTGAGCTGGAGCTGGAGCA 1593
AAV2capNuc 1594 AAGTTTTTCTCAGAGCGGCTCTCATCTTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAACAAT 1653
AAV4capNuc1 1594 AAGTTTCAG--CAACAGCGAGCTCATCTTTTGGGCGCTTAAACAGAGCGCAAGCGGCC 1650
AAV2capNuc 1654 GTGACATTTGAAAGGTCTGATTACAGAGAGAGAAATCAGGACCAACCAATCCCTG 1713
AAV4capNuc1 1651 ACCGTACCGGAGCTCTGATCTTCACTCTGAGGAGAGCTGGAGCCACCAAGCGCAC 1710
AAV2capNuc 1714 GCTACGGAGCAGTATGGTCTGTATCTACAACTCCAGAGGCAAGAGCAAGCACT 1773
AAV4capNuc1 1711 GATACGGACATGTGGGCAACTACCTGGGCTGACCAAGCAAGCAAGCACTGCGAAC 1770

【図 6 B - 6】

Figure 6B-6

AAV2capNuc 1774 ACCGAGATGTCAAGACAGAGGCTTCTCAGGCTGGTCTGGAGAGAGAGATGTG 1833
AAV4capNuc1 1771 GTGGACAGCTGAGAGCTTGGAGGCTTCTCAGGCTGGTCTGGAGAGAGAGATTT 1830
AAV2capNuc 1834 TACTTCAGGCGCCATCTGGGCAAGATTCCAGACGAGCGAGCATTTTCACTCT 1893
AAV4capNuc1 1831 TACTTCAGGCGCCATCTGGGCAAGATTCTCAAGCTCTCAATCTGAGAGCTTTTCACTCTCA 1890
AAV2capNuc 1894 CCCCTATGGGTGGATTCGAGCTTAAACACCTCTCTCCAGAGATTCTCATCAAGACAC 1953
AAV4capNuc1 1891 CGCTGATGGGTGGATTCGAGCTTAAACACCTCTCTCCAGAGATTCTCATCAAGACAC 1950
AAV2capNuc 1954 CCGGTACCTGGGATCTTCCAGACCTTCACTGCGGCAAGTTTCTTCTCTCATCACA 2013
AAV4capNuc1 1951 CCGGTACCTGGGATCTTCCAGACCTTCACTGCGGCAAGTTTCTTCTCTCATCACA 2010
AAV2capNuc 2014 CAGTACTCCAGGAGAGTCAAGCTGGAGTCAAGTGGAGCTGAGAGGAAAGAC 2073
AAV4capNuc1 2011 CAGTACAGACTTCCGAGTGTGGTCAAGTGGAGTTCAGAGGAGGCTGCTC 2070
AAV2capNuc 2074 AAACGCTGGAATCCGAAATTCAGTACACTTCAACTACAGCAAGTCTGTAATGGAC 2133
AAV4capNuc1 2071 AAACGCTGGAATCCGAAATTCAGTACACTTCAACTACAGCAAGTCTGTAATGGAC 2130
AAV2capNuc 2134 TTTACTGTGGAGCACTAATGGGTGATTAGAGCTTCCGCCCCATTGGCAGACAGATCTG 2193
AAV4capNuc1 2131 TGGGCTCCGATGGGCTGGAATACAGCTGAGGCTTATGGTACCCGCTACTCT 2190

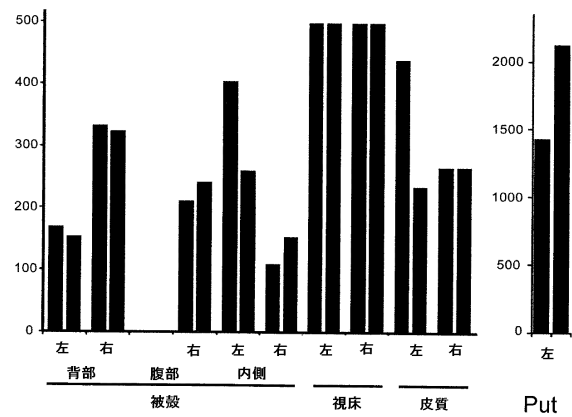
【図 6 B - 7】

Figure 6B-7

AAV2capNuc 2194 ACTCGTAATCTGTAA 2208
AAV4capNuc1 2191 ACCCACCACCTGTAA 2205

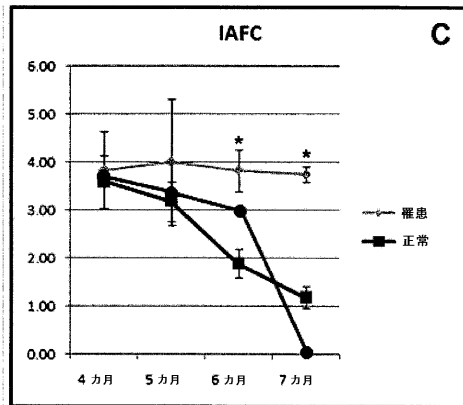
【図 7】

Figure 7



【図 8】

Figure 8



【図 9】

Figure 9A

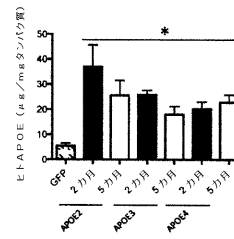
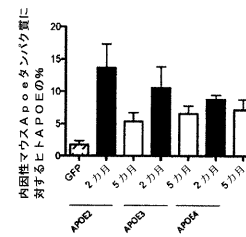
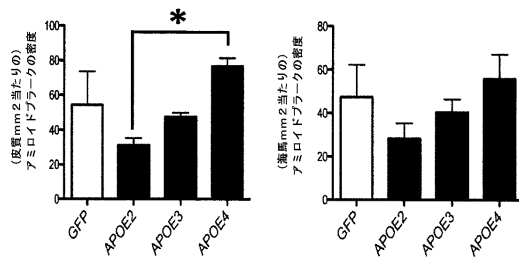


Figure 9B



【図 10 - 1】

Figure 10A



【図 10 - 2】

Figure 10C

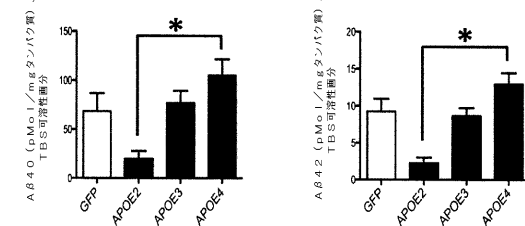
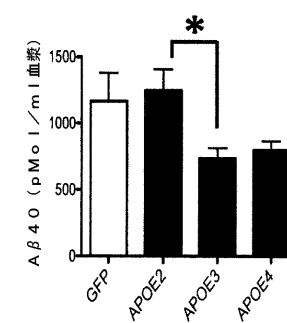
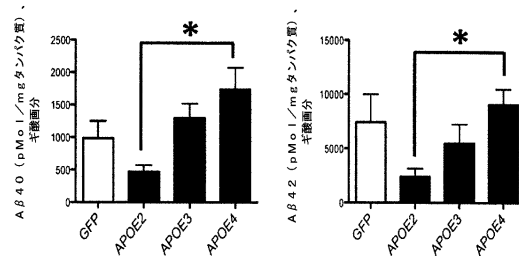


Figure 10D

Figure 10B



【図 1 1】

Figure 11A

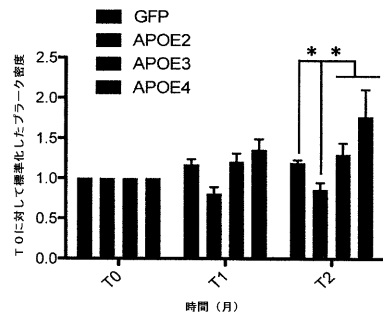
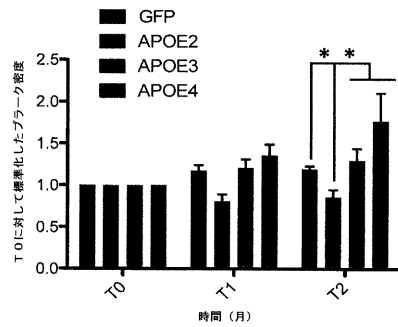
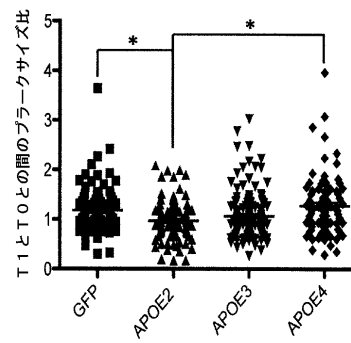


Figure 11B



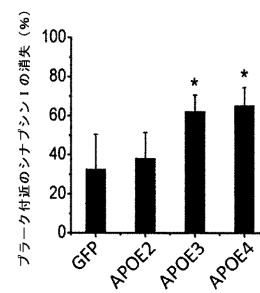
【図 1 2】

Figure 12



【図 1 3 - 1】

Figure 13A



【図 1 3 - 2】

Figure 13B

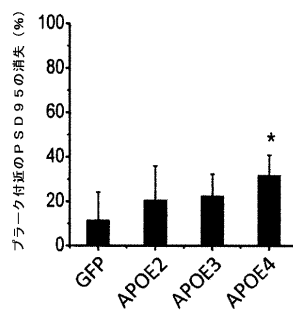
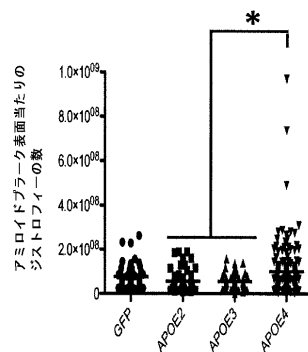
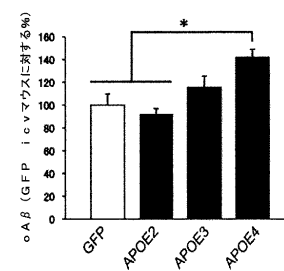


Figure 13C



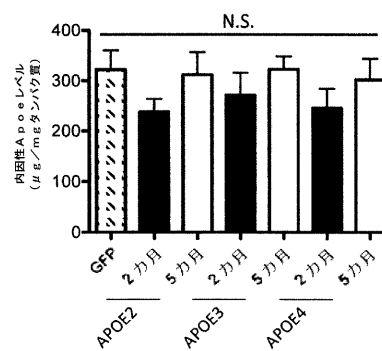
【図 1 4】

Figure 14



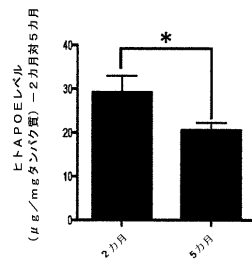
【図 1 5 - 1】

Figure 15A



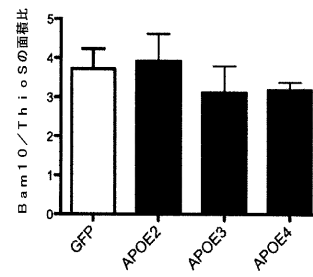
【図 15 - 2】

Figure 15B



【図 16 - 2】

Figure 16B



【図 16 - 1】

Figure 16A

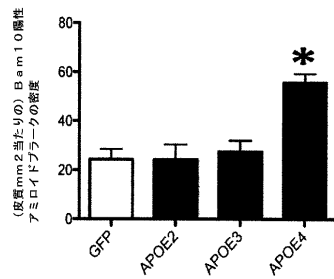
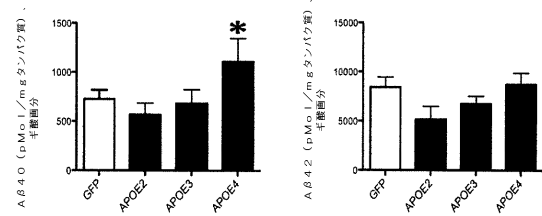


Figure 16C



【図 17】

Figure 17A

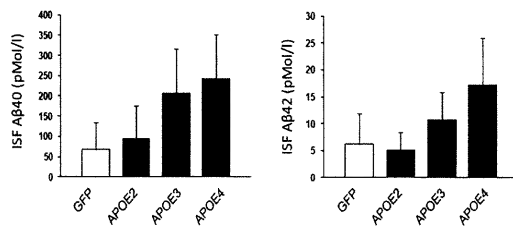
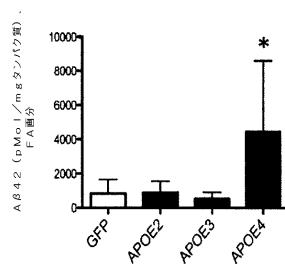


Figure 17B



【配列表】

0006469000000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 7/00 (2006.01) C 1 2 N 7/00
 A 6 1 K 38/17 (2006.01) A 6 1 K 38/17

(72)発明者 デイビッドソン, ビバリー エル.
 アメリカ合衆国 アイオワ 5 2 2 4 2 - 5 5 0 0, アイオワ シティ, ギルモア ホール
 6, エヌ. キャピトル ストリート 1 1 2

(72)発明者 ハイマン, ブラッドリー ティー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 1 4, ボストン, フルート ストリート 5 5

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 1 3 3 9 0 1 (WO, A 1)
 特表 2 0 1 0 - 5 0 4 9 0 9 (JP, A)
 特表 2 0 0 8 - 5 4 0 4 3 5 (JP, A)
 特表平 1 0 - 5 0 9 4 5 7 (JP, A)
 特表 2 0 1 0 - 5 3 5 1 5 3 (JP, A)
 米国特許第 0 6 4 6 8 5 2 4 (US, B 1)
 Frontiers in Bioscience, 2 0 0 4 年, 9, p.1540-1546
 The Journal of Neuroscience, 2 0 0 5 年, 25(14), p.3621-3627
 Neuroscience Letters, 2 0 1 0 年, 479, p.332-336
 BMC Biotechnology, 2 0 0 8 年, 8, 75, 1-17
 Gene Therapy, 2 0 1 1 年 9 月, 19, p.483-493
 The Journal of Gene Medicine, 2 0 0 4 年, 6, S212-S222
 PNAS, 2 0 0 0 年, 97(7), p.3428-3432
 Molecular Therapy, 2 0 1 0 年, 18, Suppl.1, S142, 366
 Ann.Neurol., 2 0 1 5 年, 77(6), p.917-929

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
 A 6 1 K 4 8 / 0 0
 WPI
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)