

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2016-514152
(P2016-514152A)**

(43) 公表日 平成28年5月19日(2016.5.19)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 35/761 (2015.01)	A 61 K 35/761	4 B 02 4
A61K 31/713 (2006.01)	A 61 K 31/713	4 C 07 6
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 C 08 4
A61K 47/42 (2006.01)	A 61 K 47/42	4 C 08 6
A61K 47/48 (2006.01)	A 61 K 47/48	4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-501968 (P2016-501968)	(71) 出願人	306011126 ザ・チルドレンズ・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA アメリカ合衆国ペンシルバニア州 19104, フィラデルフィア, サーティフォース・ストリート・アンド・シビック・センター・ブルバード
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日 (2014.3.13)	(74) 代理人	100104411 弁理士 矢口 太郎
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月6日 (2015.11.6)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/025794		
(87) 國際公開番号	W02014/160092		
(87) 國際公開日	平成26年10月2日 (2014.10.2)		
(31) 優先権主張番号	61/780,423		
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013.3.13)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アデノ随伴ウイルスベクターおよびその使用の方法

(57) 【要約】

【解決手段】本発明は、対象への導入遺伝子または治療的な核酸の送達のためのAAVベクターおよびその使用の方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の脳に核酸分子を送達する方法であって、前記対象にアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを投与する工程を有し、前記A A Vベクターは前記核酸分子と、配列ID番号1または3と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するカプシドタンパク質とを有する方法。

【請求項 2】

請求項1記載の方法において、前記カプシドタンパク質は配列ID番号1と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するものである方法。

【請求項 3】

請求項1記載の方法において、前記カプシドタンパク質は配列ID番号1を有するものである方法。

【請求項 4】

請求項1記載の方法において、前記核酸分子は治療用タンパク質または抑制性核酸分子をコードするものである方法。

【請求項 5】

請求項1記載の方法において、前記核酸分子は脳内のニューロンに送達されるものである方法。

【請求項 6】

対象の脳に影響を及ぼす疾患または障害を治療する方法であって、前記対象にアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを投与する工程を有し、前記A A Vベクターは治療用タンパク質または抑制性核酸分子をコードする核酸分子と、配列ID番号1または3と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するカプシドタンパク質とを有する方法。

【請求項 7】

請求項6記載の方法において、前記カプシドタンパク質は配列ID番号1と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するものである方法。

【請求項 8】

請求項6記載の方法において、前記カプシドタンパク質は配列ID番号1を有するものである方法。

【請求項 9】

請求項6記載の方法において、前記核酸分子は治療用タンパク質をコードするものである方法。

【請求項 10】

請求項6記載の方法において、前記疾患または障害はリソソーム蓄積症である方法。

【請求項 11】

請求項6記載の方法において、前記疾患または障害は神経変性疾患である方法。

【請求項 12】

請求項6記載の方法において、前記核酸分子は - グルクロニダーゼをコードするものである方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本出願は、2013年3月13日に出願された米国仮特許出願第61/780,423号への35U.S.C. § 119(e)による優先権を主張する。当該出願はこの参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

本発明は、国立神経疾患・脳卒中研究所（NINDS）により授与されたR01NS038690および国立糖尿病・消化器・腎疾病研究所（NIDDK）により授与されたR01DK063973に従い政府支援でなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

10

20

30

40

50

【0003】

本出願は、遺伝子治療および分子生物学の分野に関する。より詳しくは、本発明は、脳への改善した遺伝子導入を伴うアデノ随伴ウイルスベクターを提供する。

【背景技術】**【0004】**

いくつかの出版物および特許文献が、本発明に関連する最先端の技術を記述するため、明細書を通し引用される。これらの引用の各々は、参照することにより全体が記載されているように本明細書に組み込まれる。

【0005】

アデノ随伴ウイルスはパルボウイルス科のヘルパー依存型ウイルス（ディpendウイルス）であり、複製のためにヘルパーウイルスを必要とする。感染の後、一般的にAAVは潜伏相、具体的に言うとAAVゲノムが宿主染色体にインテグレートされた部位に入る。AAVゲノムはただ、ヘルパーウイルスによる再度の感染により、レスキューされ、複製され、感染性ウイルスにパッケージングされるのみである。したがって、自然感染は、アデノウイルスまたは単純疱疹ウイルスのようなヘルパーウイルスの感染を背景として生じる。

10

【0006】

AAVベクターは非病原性で、コードされた異種遺伝子の長期の発現をもたらすのみならず、それらはまた、中枢神経系（CNS）の治療に必要不可欠である、分裂しない細胞を形質導入するという能力を有する。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、拡張性があり、効率的で、遺伝性疾患の治療のために主に用いられる非細胞変性の遺伝子送達ベクターである。実際に、AAVベクターにより、脳、心臓、肺、目、および肝臓の疾患を含む広範囲のヒト疾患動物モデルの治療に成功した（Mingozzi et al. (2011) *Nat. Rev. Genet.*, 12: 341-355）。さらに、例えば、レーバーの先天性黒内障、血友病、鬱血性心不全、リポタンパクリバーゼ欠損症、およびパーキンソン病を含む様々な疾患の治療において、AAVベクターを用いた多数の臨床試験は、現在肯定的な結果で進行中である（Maguire et al. (2008) *New Eng. J. Med.*, 358: 2240-2248；Bainbridge et al. (2008) *New Eng. J. Med.*, 358: 2231-2239；Hauswirth et al. (2008) *Human Gene Ther.*, 19: 979-990；Nathwani et al. (2011) *New Eng. J. Med.*, 365: 2357-2365；Jessup et al. (2011) *Circulation* 124: 304-313；LeWitt et al. (2011) *Lancet Neurology*, 10: 309-319）。様々な障害の治療のためのAAVをベースにした遺伝子治療法の見込みがあるにもかかわらず、標的組織への特異的な送達を行う改良されたAAVベクターが望まれる。

20

30

30

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0007】**

本発明によれば、脳、特にその中のニューロンへの核酸分子の改善された送達のための組成物および方法が提供される。特定の実施形態において、この方法は、目的の核酸分子を有するAAVベクターを対象に投与する工程を有し、前記AAVベクターはhu.32またはrh.8カプシドタンパク質またはそのバリエントを有する。特定の実施形態において、カプシドタンパク質は、配列ID番号1または3と、少なくとも90%、95%若しくはそれ以上の相同性／同一性を有し、または配列ID番号2または4と少なくとも90%、95%若しくはそれ以上の相同性／同一性を有する核酸分子によってコードされる。AAVは、例えば、少なくとも1つの薬学的に許容される担体を有する組成物の一部として、経脈管的に対象に送達されてもよい。

40

【0008】

本発明の別の観点によれば、疾患または障害、特に脳に関連した遺伝性疾患の治療、抑

50

制、および／または予防のための治療法が提供される。特定の実施形態において、この疾患または障害は脳以外にも影響を及ぼす（例えば、この疾患または障害は、多臓器疾患または障害（例えば、LSD）である）。特定の実施形態において、この方法は、治療用タンパク質または抑制性核酸分子をコードする核酸分子を有するAAVベクターを対象に投与する工程を有し、前記AAVベクターはhu.32またはrh.8カプシドタンパク質またはそのバリエントを有する。特定の実施形態において、前記カプシドタンパク質は、配列ID番号1または3と少なくとも90%、95%若しくはそれ以上の相同性／同一性を有し、または配列ID番号2または4と少なくとも90%、95%若しくはそれ以上の相同性／同一性を有する核酸分子によってコードされる。前記AAVは、例えば、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と、任意選択で、少なくとも1つの他の治療剤とを有する組成物の一部として経脈管的に対象に送達されてもよい。

10

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1Aは、hu.32カプシドのアミノ酸配列を提供する（配列ID番号1）。図1Bは、hu.32カプシドのヌクレオチド配列を提供する（配列ID番号2）。図1Cは、rh.8カプシドのアミノ酸配列を提供する（配列ID番号3）。図1Dは、rh.8カプシドのヌクレオチド配列を提供する（配列ID番号4）。

【図2】図2Aおよび2Bは、GFP発現により証明されるようにAAV感染を示すマウス脳の様々な領域の画像を提供する。

20

【図3】図3A～3Dは、緑色蛍光タンパク質（GFP）発現により証明されるようにAAV感染を示すマウス脳の様々な領域の画像を提供する。図3Aは、AAV2/hu32であり、図3Bは、AAV2/rh8であり、図3CはAAV2/9であり、図3Dは、AAV2/hu11である。

20

【図4】図4は、GFP発現により証明されるようにAAV感染を示すネコ脳の様々な領域の画像を提供する。

【図5】図5Aは、AAV感染を示すGFP発現およびニューロンを示すNeuN（Fox-3）染色を示す大脳皮質（cortex）、海馬（hippocampus）、小脳（cerebellum）、および線条体（striatum）由来の脳切片の画像を提供する。図5Bは、AAV感染を示すGFP発現および星状膠細胞を示すグリア細胞線維性酸性タンパク質（GFAP）染色を示す大脳皮質（cortex）、海馬（hippocampus）、および線条体（striatum）由来の脳切片の画像を提供する。図5Cは、AAV感染を示すGFP発現および希突起神経膠細胞を示すadenomatous polyposis coli（APC）染色を示す大脳皮質（cortex）、および線条体（striatum）由来の脳切片の画像を提供する。

30

【図6】図6は、正常マウス、無治療MPS VIIマウス、およびAAV.hu32.hGbp.GUSBで形質導入したMPS VIIマウス由来の海馬、視床、および内嗅皮質脳切片の組織病理画像を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0010】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、インビオ遺伝子導入のためのウイルスベクターの中でも最も有望なものである。プロトタイプAAV2ベクターは、中枢神経系（CNS）細胞の比較的限られた形質導入という結果に終わり、多くのヒトはAAV2の血清反応陽性であり、それにより臨床応用におけるその使用は制限的である。しかしながら、別のAAV血清型由来のカプシドタンパク質を用いたAAV2ゲノムのクロスパッケージングは、脳を含む様々な組織で、改善された遺伝子導入をもたらした（Davidson et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 3428-3432；Passini et al. (2003) J. Virol., 77: 7034-7040；Burger et al. (2004) Mol. Ther., 10: 302-317；Cearley et al. (2006) Mol. Ther., 13: 528-537；Taymans et al. (2007) Hum. Gene. Ther., 18: 195-206；Cearley et al. (2008) Mol. Ther.

40

50

, 16 : 1710 - 1718)。多くのAAVカプシド配列は、内因性AAVsの配列の分子レスキューにより、ヒトおよびヒト以外の靈長類から分離された。カプシド配列は、AからFの6つの分岐群に系統学的に特徴づけられた(Gao et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99: 11854 - 11859; Gao et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100: 6081 - 6086; Gao et al. (2004) J. Virol., 78: 6381 - 6388)。他のAAV血清型はニューロン投射に沿ってベクター輸送を行うことが可能であるが、特定のAAV血清型は、ニューロン特異的な親和性を有し、星状膠細胞または希突起神経膠細胞のような脳内の他の種類の細胞を効率的に形質導入することが不可能である(Davidson et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 3428 - 3432; Burger et al. (2004) Mol. Ther., 10: 302 - 317; Cearley et al. (2006) Mol. Ther., 13: 528 - 537; Kaspar et al. (2003) Science 301: 839 - 842; Passini et al. (2005) Mol. Ther., 11: 754 - 762; Cearley et al. (2007) J. Neurosci., 27: 9928 - 9940; Cearley et al. (2008) Mol. Ther., 16: 1710 - 1718; Fouast et al. (2009) Nat. Biotech., 27: 59 - 65)。

10

【0011】

本発明は、hu.32またはrh.8、特にhu.32カプシドタンパク質を有するAAVベクターが、血管内注射の後にマウスの脳にAAVベクター遺伝子導入を調節することを提示する。学名の最初の2つの文字は、単離の種を指し(hu:ヒト)、その後にその種からの単離の番号が続く。AAVベクターは特に脳、特に大脳皮質においてニューロンを形質導入し、非常に広範にわたる。脳内の分布量と同様に、本発明のAAVベクターにより形質導入される細胞の種類は特有である。さらに、本発明のAAVベクターは、肝臓の形質導入において他のAAV血清型より効率的でなく、それにより、多くのAAVベクターの臨床的障害である、インビオにおけるAVVベクターに対する有害な免疫反応を軽減する。脳内の分布が、本発明のAAVベクターを、リソソーム蓄積症および神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病)のような脳に影響を及ぼす遺伝性疾患を含む(脳に加え、体の他の箇所にも影響を及ぼす疾患または障害を含む)様々な疾患の治療に対する優れたベクターにしている。

20

【0012】

GenBankアクセッション番号AY530597およびAAS99282は、hu.32カプシド(vp1)のアミノ酸およびヌクレオチド配列の例を提供する。GenBankアクセッション番号AAO88183およびAY242997は、rh.8カプシド(vp1)のアミノ酸およびヌクレオチド配列の例を提供する。AAVカプシドは3つのタンパク質、vp1、vp2、およびvp3から成り、それは選択的スプライスバリエントである。言い換えると、vp2およびvp3は、vp1の断片である。図1Aは、hu.32 vp1カプシドの野生型アミノ酸配列である配列ID番号1を提供する。図1Bは、hu.32 vp1カプシドの野生型ヌクレオチド配列である配列ID番号2を提供する。図1Cは、rh.8 vp1カプシドの野生型アミノ酸配列である配列ID番号3を提供する。図1Dは、rh.8 vp1カプシドの野生型ヌクレオチド配列である配列ID番号4を提供する。本発明は、hu.32およびrh.8カプシドのバリエントを包含する。特定の実施形態において、本発明のカプシドは、配列ID番号1または配列ID番号3と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%一致するアミノ酸配列を有する。特定の実施形態において、本発明のカプシドをコードする核酸分子は、配列ID番号2または配列ID番号4と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%一致するヌクレオチド配列を有する。

30

40

【0013】

50

本発明は、特に対象（すなわち、インビボ）において、目的の（例えば、異種の）核酸分子を細胞に送達する方法を包含する。特定の実施形態において、この方法は、核酸分子をニューロンまたは脳、特に脳内のニューロンに送達する。特定の実施形態において、この方法は、核酸分子を嗅球、線条体、大脳皮質、海馬、視床下部、視床腹部、中脳、脳幹、上丘、下丘、内嗅皮質、鉤状回、および／または小脳に送達する。この方法は本発明の hu . 32 または rh . 8 カプシドを有する AAVベクターに、（例えば、対象への投与によって）細胞を接触させる工程を有してもよく、前記 AAVベクターは送達される核酸分子を有する。パッケージングされた核酸分子は、例えば、目的のタンパク質（例えば、治療用タンパク質）または抑制性核酸分子（例えば、アンチセンス、siRNA、Ds iRNA (Dicer siRNA / Dicer - 基質RNA)、shRNA、miRNA (マイクロRNA)など）をコードしてもよい。特定の実施形態において、対象に送達する核酸分子は機能獲得型操作である。本発明による目的の核酸分子の送達は、対象において疾患モデル（例えば、脳疾患モデル）をつくるために用いられてもよい（例えば、疾患または障害と関連する少なくとも1つの目的のタンパク質の発現（例えば、変異体））。例えば、本発明による目的の核酸分子の送達が、（例えば、アルツハイマー病と関連した少なくとも1つの遺伝子（例えば、変異体）を発現させることによる（例えば Chin, J. (2011) Methods Mol. Biol., 670: 169-89; Min et al. (2005) Neural. Plast., 12: 299-310; Hall et al. (2012) Brain Res. Bulletin 88: 3-12 を参照））アルツハイマー病、または（例えば、ハンチントン病と関連した変異ハンチントン遺伝子（別名 interesting transcript 15 (IT151) 遺伝子）を発現させることによる）ハンチントン病のような神経変性疾患の疾患モデルをつくるために用いられてもよい。本発明はまた、本発明の方法により作出した疾患モデルを包含する。本発明の核酸分子はさらに、タンパク質または抑制性核酸分子をコードしたものを発現するためのプロモーターまたは発現オペロンのような適切な制御エレメントを有してもよい。

【0014】

対象における疾患または障害を治療、抑制、および／または予防する方法はまた、本発明により包含される。特定の実施形態において、この方法は、その必要に応じて対象に本発明の hu . 32 または rh . 8 カプシドを有する AAVベクターを投与する工程を有し、前記 AAVベクターは送達される目的の核酸分子（例えば、治療的な核酸分子）を有する。特定の実施形態において、AAVベクターは、少なくとも1つの薬学的に許容される担体を有する組成物の一部として投与される。本発明の AAVベクターは、疾患または障害の治療のため、他の任意の治療法と同時投与されてもよい。AAVベクターの核酸分子は、治療用タンパク質または治療用抑制性核酸分子（例えば、siRNA）をコードしてもよい。核酸分子はさらに、タンパク質または抑制性核酸分子をコードするものを発現するためのプロモーターまたは発現オペロンのような適切な制御エレメントを有してもよい。

【0015】

特定の実施形態において、疾患または障害は、脳に影響を及ぼす遺伝性疾患または障害である。治療することができる疾患または障害の例は、これに限定されるものではないが、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病 (HD)、脳卒中、心的外傷、感染症、髄膜炎、脳炎、神経膠腫、（脳転移を含む）がん、多系統萎縮症、進行性核上麻痺、レビー小体病、神経炎症疾患、脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、神経エイズ、クロイツフェルト・ヤコブ病、ピック病、多発脳梗塞性認知症、前頭葉変性症、大脳皮質基底核変性症、HIV-1関連認知症 (HAD)、HIV関連神経認知障害 (HAND)、麻痺、筋萎縮性側索硬化症 (ALS または ルー・ゲーリック病)、多発性硬化症 (MS)、CNS関連の心血管疾患、プリオൺ病、肥満、代謝異常、炎症性疾患、代謝異常、およびリソソーム蓄積症 (LSD、例えば、限定されずに、ゴーシェ病、ポンペ病、ニーマン・ピック、ハンター症候群 (MPS II)、ムコ多糖症 (MPS)) (

例えば、ムコ多糖症Ⅰ（MPS I）、ムコ多糖症ⅥⅡ（MPS VI）など）、G M 2 - ガングリオシドーシス、サンフィリッポ症候群（MPS IIIA）、ティ・サックス病、サンドホフ病、クラッベ病、異染性白質ジストロフィー、およびファブリー病）を含む。特定の実施形態において、疾患または障害は、リソゾーム蓄積症である。

【0016】

遺伝子導入は、様々な病態に治療を提供するのに用いることができる。一般に、遺伝子導入は以下を治療するのに用いられてもよい。1) 欠乏状態であり、タンパク質（例えば、酵素）が、異常に低いレベルで発現し、または（例えば、変異して）不完全であり、活性が減退しており、それはタンパク質（例えば、野生型タンパク質）をエンコードする核酸を誘導することにより治療されることが可能である。および2) 過剰発現状態であり、タンパク質が異常に高いレベルで発現し、または（例えば、変異して）不完全であり、増加または無制御な活性を有し、それはタンパク質に対する抑制性核酸分子を誘導することにより治療されることが可能である。突然変異を引き起こす、または異常を修正する核酸配列の部位特異的インテグレーションの使用はまた、本発明に包含される。

10

【0017】

特定の実施形態において、治療用タンパク質は、細胞または対象においてタンパク質の欠損または異常から生じる症状を軽減または緩和するペプチドまたはタンパク質である。治療用タンパク質は、疾患または障害の治療において用いることのできるペプチドまたはタンパク質であってもよい。治療用タンパク質は、これに限定されるものではないが、酵素、抗体、ホルモン、成長因子、他のポリペプチドを含み、その細胞（例えば、ニューロン）への投与は、疾患、障害、病变、および／またはそれとともに関連する症状の改善および／または治癒をもたらすことが可能である。本発明における有用な神経刺激性ポリペプチドは、これに限定されるものではないが、これらの（神経栄養因子レセプターのような）ポリペプチド、サイトカイン、エンドルフィン、酵素、ポリペプチド拮抗薬、C NS 細胞により発現されるレセプターの作動薬、リソゾーム蓄積症に関するポリペプチドなどのレセプターと結合する、任意の（神経栄養因子、成長因子、およびその他のような）上記のポリペプチド、抗体、および抗体断片と結合する内分泌因子、成長因子、視床下部放出因子、神経栄養因子、パラクリン因子、神経伝達物質ポリペプチド、抗体、および抗体断片を含む。特定の実施形態において、治療用タンパク質は、C NS、特に脳に対しその効果を発揮する。

20

【0018】

特定の治療用タンパク質の例は、これに限定されるものではないが、- グルクロニダーゼ（例えば、リソゾーム蓄積症の治療のため）、カタラーゼ、テロメラーゼ、スーパー オキシドディスクターゼ（SOD）、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタミナーゼ、サイトカイン、エンドルフィン（例えば、エンケファリン）、成長因子（例えば、上皮成長因子（EGF））、酸性、および塩基性線維芽細胞増殖因子（aFGF および bFGF）、インシュリン様成長因子I（IGF-I、例えば、Oppenheim, RW (1996) Neuron 17: 195-197; Thoenen et al. (1993) Exp. Neurol. 124: 47-55; Henderson, CE (1995) Adv. Neurol. 68: 235-240）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF、例えば、Li et al. (2009) Biochem. Biophys. Res. Comm., 390: 947-951）、ニュートロトロフィン-3（NT-3）、NT-4/5、プロテアーゼネキシンI（PNI、例えば、アルツハイマー病の治療のため（Houenou et al. (1995) PNAS 92: 895-899））、セリンプロテアーゼ阻害剤タンパク質（SPI3、例えば、Safaei, R. (1997) Brain Res Dev Brain Res., 100: 5-12）、血小板由来成長因子（PDGF）、血管増殖因子（VGF）、神経成長因子（NGF）、インシュリン様成長因子-II（IGF-II）、腫瘍壞死因子-B（TGF-B）、survival motor neuron (SMN、例えば、脊髄性筋萎縮症の治療のため、Lefebvre et al. (1995) Ce

30

40

50

11 80 : 155 - 165 ; Roy et al. (1995) Cell 80 : 16
 7 - 178)、白血病阻止因子 (LIF)、抗アポトーシスタンパク質 (例えば、BCL-2、PI3キナーゼ)、アミロイドベータバインダー (例えば、抗体)、ブチリルコリンエステラーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ (例えば、Carmona et al. (1999) Drug Metab. Dispos., 28 : 367 - 371; Carmona (2005) Eur. J. Pharmacol., 517 : 186 - 190)、-、-、および / または - セクレターゼのモジュレータ、血管作動性腸管ポリペプチド、レプチン、酸性アルファ - グルコシダーゼ (GAA)、酸性スフィンゴミエリナーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ (I2S)、-L- イズロニダーゼ (IDU)、- ヘキソサミニダーゼ A (HexA)、-N- アセチルヘキソサミニダーゼ A、
 - グルコセレブロシダーゼ、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ、- ガラクトシダーゼ A、および神経伝達物質 (例えば、Schapira, AH (2003) Neurology 61 : S56 - 63; Ferrari et al. (1990) Adv Exp Med Biol. 265 : 93 - 99; Ferrari et al. (1991) J. Neurosci., Res. 30 : 493 - 497; Koliatsos et al. (1991) Ann. Neurol. 30 : 831 - 840; Dogrukol-Ak et al. (2003) Peptides 24 : 437 - 444; Amalfitano et al. (2001) Genet Med. 3 : 132 - 138; Simonaro et al. (2002) Am. J. Hum. Genet., 71 : 1413 - 1419; Muenzer et al. (2002) Acta Paediatr Suppl. 91 : 98 - 99; Wraith et al. (2004) J. Pediatr. 144 : 581 - 588; Wicklow et al. (2004) Am. J. Med. Genet. 127A : 158 - 166; Grabowski (2004) J. Pediatr. 144 : S15 - 19; Auclair et al. (2003) Mol. Genet. Metab. 78 : 163 - 174; Przybylska et al. (2004) J. Gene Med. 6 : 85 - 92) を含む。特定の実施形態において、治療用タンパク質は、- グルクロニダーゼである。
 【0019】

本発明は治療用タンパク質の送達について前述されるが、本発明のAAVは検出可能なタンパク質をコードする核酸分子を (例えば、単独療法あるいは治療用タンパク質との併用療法で) 送達してもよい。検出可能なタンパク質は、これに限定されるものではないが、蛍光タンパク質 (例えば、GFP)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコアミラーゼ、フェリチン、ドーパミン受容体、および - ガラクトシダーゼを含む。

【0020】

AAVベクターを合成する方法は、本技術分野で周知である (例えばPCT/US04/028817およびGao et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99 : 11854 - 11859を参照)。特定の実施形態において、この方法は、hu.32またはrh.8カブシドをコードする核酸配列と、repをコードする核酸と、少なくとも目的の核酸分子に隣接するAAV逆方向末端反復 (ITRs) を有する核酸コンストラクトとを有する宿主細胞を培養する工程を有し、目的の核酸がAAVベクター中でパッケージングされる。特定の実施形態において、全長AAVゲノムが用いられる。自己相補型ベクター (scAAV; AA9とともに一般的に用いられるベクター等) を本発明で用いてもよいが、rAAVにおいて認められる最大のコーディング能力が約4.5kbまたはそれより大きいのに対して、scAAVは一般的に約2.3kbの能力を有する。特定の目的のタンパク質 (例えば、酵素) がscAAVの能力を上回る長さを有する核酸によってコードされる可能性があるため、全長AAVベクターが望ましい。宿主細胞はまた、AAVベクターをパッケージするヘルパー機能 (例えば、ヘルペスウイルスまたはアデノウイルスにより供給されるそれら) を提供することができる。AAVベクターに核酸分子をパッケージングするのに宿主細胞が必要とする構成要素は、tran

10

20

30

40

50

s で、または安定して形質導入された宿主細胞により提供されてもよい。r e p 遺伝子および / または A A V I T R s は任意の A A V 血清型由来であってもよい。例えば、r e p 遺伝子および / または A A V I T R s は、限定されずに、A A V - 1、A A V - 2、A A V - 3、A A V - 4、A A V - 5、A A V - 6、A A V - 7、A A V - 8、A A V - 9 など由来であってもよい。特定の実施形態において、A A V I T R s は A A V 2 血清型由来である。封入された核酸分子は複数のタンパク質またはポリペプチドをコードしてもよい。核酸分子が複数のタンパク質 / ポリペプチドをコードする場合、エンコーディング領域は 2 A ペプチドのような自己切断型のペプチドをコードする内部リボソーム導入部位 (I R E S) または核酸配列により分離されてもよい。

【 0 0 2 1 】

本発明は、その必要に応じて対象に本発明の A A V ベクターおよび少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体を有する組成物を投与する工程を有する、対象における疾患または障害（例えば、神経疾患または障害）を治療する方法を包含する。「対象」という本明細書において用いられる用語は、ヒトまたは動物の（特に哺乳類の）対象を指す。

【 0 0 2 2 】

本発明の A A V ベクターは、任意の薬学的に許容される担体とともに投与のために都合よく製剤することができる。例えば、ウイルスベクターは、水、緩衝食塩水、エタノール、多価アルコール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレン glycol など）、ジメチルスルホキシド (D M S O) 、油、洗浄剤、懸濁化剤、または適切なそれらの混合物のような許容できる媒体とともに製剤することができる。選択した媒体における A A V ベクターの濃度は変化させることができ、媒体は医薬品の投与の望ましい経路に基づいて選択することができる。任意の従来型の媒体または薬剤が、投与される A A V ベクターと互換性がない場合以外は、医薬品のその使用は検討される。

【 0 0 2 3 】

特定の患者への投与に適した、本発明による組成物の投与量および投与計画は、患者の年齢、性別、体重、全身病状、および A A V ベクターが投与される特定の条件およびその重症度を考慮する医者 / 獣医 / 医療専門家によって決定されてもよい。医者 / 獣医 / 医療専門家はまた、投与の経路、医薬担体、および A A V ベクターの生物活性を考慮することができる。治療効果を達成するための典型的な投与量は、少なくとも約 1 0 ⁵ 、 1 0 ⁶ 、 1 0 ⁷ 、 1 0 ⁸ 、 1 0 ⁹ 、 1 0 ^{1 0} 、 1 0 ^{1 1} 、 1 0 ^{1 2} 、 1 0 ^{1 3} 、 1 0 ^{1 4} 、 1 0 ^{1 5} 、 1 0 ^{1 6} 形質導入単位若しくはそれ以上、特に約 1 0 ⁸ から 1 0 ^{1 3} の形質導入単位の A A V 力値である。本発明の特定の実施形態において、複数の投与（例えば、2、3、4、若しくはそれ以上の投与）が、望まれる遺伝子発現の（例えば治療的な）レベルを達成するために使用することができる。

【 0 0 2 4 】

適切な医薬品の選択はまた、選択される投与方法に依存する。医薬品は、注射部位と互換性を持つ媒体で望ましくは分散する A A V ベクターを有する。本発明の A A V ベクターは、血流への注射、経口投与、または皮下投与、頭蓋内投与、筋肉内投与、腹腔内注射のような任意の方法によって投与してもよい。本発明の A A V ベクターは、隣接した領域または血液脳関門全体に、直接注射によって投与してもよい。特定の実施形態において、A A V ベクターを有する組成物は、ニューロンに直接、または隣接した領域に投与される。特定の実施形態において、A A V ベクターを有する組成物は、血管内投与または静脈内投与される。本発明の A A V ベクターは、これに限定されるものではないが、血液または脳脊髄液 (C S F) を含む対象の任意の流体部分に投与してもよい。注射のための医薬品は、当技術分野で周知である。注射が A A V ベクターを投与する方法として選択される場合、ウイルスベクターの十分な量が生物学的効果を及ぼすためそれらの標的細胞に到達することを確実にするための手段をとる必要がある。

【 0 0 2 5 】

薬学的に許容される担体との密な混合物における有効成分として本発明の A A V ベクターを含む医薬組成物は、従来の製薬技術技術に従い調製されることが可能である。担体は

投与、例えば、血管内、直接注射、頭蓋内、および筋肉内投与のために求められる製剤の形態に依存し、多種多様な形態をとってもよい。

【0026】

本発明の医薬品は、投与の簡便性および投薬量の均一性のために用量単位の形態で製剤することができる。本明細書において用いられるように、用量単位の形態は、治療を受けている患者に適切な医薬品の物理的に個別の単位を指す。各々の用量は、選択した医薬担体と関連し、望ましい影響を生じることが予測される有効成分の量を含む必要がある。適切な用量単位を決定する方法は、当業者に周知である。

【0027】

本発明によれば、動物モデルにおいて、AAVベクターの投与のための適切な用量単位は、もしあれば毒性を評価することによって決定することができる。医薬品における様々な濃度のAAVベクターは、マウスまたは他の動物（例えば、治療する疾患のモデル）に投与することができ、最小および最大の投薬量は治療の結果として観察される有益な結果および副作用に基づいて決定してもよい。適切な用量単位はまた、他の標準的な薬剤と組み合わせてAAVベクター治療の有効性を評価することで測定することができる。AAVベクターの用量単位は、個々に、または各々の治療と組み合わせて検出される効果に従い決定してもよい。

10

【0028】

本発明のAAVベクター、試薬、および方法は、核酸を分裂する、または分裂しない細胞に向かわせ、安定してその中の核酸を発現するため用いられることが可能である。本発明のベクターは、このように、病態における、または細胞生理学の実験的な改変における遺伝子治療に有用であることがある。

20

【0029】

定義

単数形の「a」、「an」、および「the」は、文脈上明白に他の意味を指示する場合を除き、複数形指示を含む。

【0030】

「遺伝子治療」は、疾患または障害、一般的な先天性または遺伝性疾患を治療するため、個人の細胞および/または組織への核酸（例えば、遺伝子）の挿入である（例えば、不完全な変異対立遺伝子は置換される、または機能的なもので補完される）。

30

【0031】

「治療」という本明細書において用いられる用語は、病気に苦しむ患者に恩恵を与える任意の種類の治療を指し、患者の状態（例えば、1若しくはそれ以上の症状）の改善、状態の進行の遅延などを含む。

【0032】

化合物または医薬組成物の「治療的に有効な量」は、それに関連した特定の障害または疾患および/または症状を予防、抑制、治療、または減少させるための有効な量を指す。本明細書における神経疾患または障害の治療は、神経疾患または障害、その症状、またはその素因を治癒、緩和、抑制、および/または予防することを指すことができる。

30

【0033】

「抑制性核酸分子」は、標的mRNAの発現レベルを調節することが可能な小さな核酸分子（例えば、siRNA、shRNA、miRNA、DsirNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）を指す。これらの分子は疾患過程の仲介に関する標的遺伝子の発現を抑制することができ、それによりそれと関連した疾患および/または症状を予防または軽減する。

40

【0034】

「small, interfering RNA (siRNA)」という語句は、（siRNAは、より長いdsRNA分子の切断により生じさせることができるが）短い（一般的に30未満のヌクレオチド長、特に12～30または20～25のヌクレオチドの長さ）二重鎖RNA分子を指す。一般的に、siRNAは、siRNAがターゲットとする

50

遺伝子の発現を調節する。s i R N A sは、ターゲット遺伝子の同族m R N Aの配列と相同性（例えば、完全な相補性）を有する。s i R N A分子を特定し、合成する方法は、当技術分野で周知である（例えばAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Incを参照）。s i R N A分子の典型的な修飾は米国出願公開第2005/0032733号において提供される。s i R N A分子の発現のための発現ベクターは、構成的であるか制御することができる強力なプロモーターを望ましくは使用する。そのようなプロモーターは当技術分野で周知であり、これに限定されるものではないが、R N AポリメラーゼI I プロモーター、T 7 R N Aポリメラーゼプロモーター、およびR N AポリメラーゼI I I プロモーターU 6およびH 1を含む（例えばMyslinski et al. (2001) Nucl. Acids Res., 29: 2502-09を参照）。

10

【0035】

「短ヘアピンR N A」または「s h R N A」という用語は、s i R N Aおよび少なくとも1、一般的に1～10ヌクレオチドの一本鎖ループ部分を有するヘアピン構造に折りたたまれる単一のR N A分子であるs i R N A前駆体を指す。s h R N A分子は、エンドヌクレアーゼにより細胞の中でs i R N Aに典型的にプロセシングされる。

20

【0036】

本明細書において用いられるように、「マイクロR N A」または「m i R N A」という用語は、これに限定されるものではないが、（天然にゲノムに存在する）内在性マイクロR N Aおよび人工マイクロR N Aを含む任意の種類のinterfering R N Aを指す。マイクロR N Aは一般的に、約18から約30までのヌクレオチド、特に約21から約25までのヌクレオチドの範囲の長さを有する。マイクロR N Aは、一本鎖R N A分子であってもよい。マイクロR N Aはp re - m i R N A、一般的に約50から約90までのヌクレオチド、特に約60から約80までのヌクレオチドの長さを有する短いスムーラー構造の形態であってもよく、それは機能的なm i R N Aにその後プロセシングされる。

20

【0037】

「R N A干渉」または「R N A i」という用語は、標的分子（例えば、標的遺伝子、タンパク質、またはR N A）が二本鎖R N Aにより下方制御される、配列特異的または選択的なプロセスを指す。R N A i活性を一般的にドライブする二本鎖R N A構造は、s i R N A s、s h R N A s、マイクロR N A、およびR N A干渉により標的転写物の発現を抑制するスモールR N A種を産生するようプロセシングされることが可能である他の二本鎖構造である。

30

【0038】

「Dicer 基質R N A」または「D s i R N A」という用語は、少なくとも1つのs i R N A分子を有し、s i R N A分子、一般的に長さ21ヌクレオチドを放出するDicerのための基質として用いられるオリゴヌクレオチドを指す。D s i R N Aは二本鎖であり、R N AまたはD N AおよびR N Aを有する。一般的に、D s i R N Aは長さ約100未満のヌクレオチド、長さ約50未満のヌクレオチド、長さ約40未満のヌクレオチド、長さ約35未満のヌクレオチド、または長さ約30未満のヌクレオチドである。特定の実施形態において、D s i R N Aは長さが27ヌクレオチドである。D s i R N Aの例は、米国特許出願公開第2005/0244858号、2005/0277610号、2007/0265220号、および2010/0184841号において提供される。

40

【0039】

「アンチセンス核酸分子」および「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、目的のタンパク質の発現を抑制する選択した配列に（例えば、翻訳開始部位および/または金色のスプライス部位に）ターゲティングされる（相補的な）核酸分子（例えば、一本鎖分子）を含む。そのようなアンチセンス分子は、一般的に、長さ約10と約100間のヌクレオチド、特に約15と約50間のヌクレオチド、とりわけ約15と約30間のヌクレオチドで

50

あり、多くの場合mRNA分子の翻訳開始部位に及ぶ。逆方向で標的核酸分子の全ての配列を含むアンチセンスコンストラクトはまた、作成することができる。任意の既知のヌクレオチド配列にターゲティングされるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標準的な方法によるオリゴヌクレオチド合成により調製されることがある。

【0040】

「薬学的に許容される」は、連邦政府または州政府または米国薬局方または他の承認された薬局方においてリストされる規制機関による、動物における、特にヒトにおける使用に対する承認を意味する。

【0041】

「担体」は、例えば、希釈剤、補助剤、防腐剤（例えば、チメロサール、ベンジルアルコール）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、ピロ亜硫酸ナトリウム）、可溶化剤（例えば、Tween（商標）80、ポリソルベート80）、乳化剤、バッファ（例えば、Tris HCl、アセテート、リン酸塩）、水、水溶液、油、增量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）、賦形剤、助剤、または投与される本発明の活性薬剤を有するベクターを指す。適切な医薬担体は、E.W.Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co., Easton, PA); Gennaro, A.R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Lippincott, Williams and Wilkins); Liberman, et al., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y.; and Kibbe, et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients (3rd Ed.), American Pharmaceutical Association, Washington.において記述される。10
20

【0042】

本明細書において用いられる「プロモーター」という用語は、組換え産物をコードするDNA配列に隣接して位置するDNA配列を指すことがある。プロモーターは、隣接するDNA配列に望ましくは動作可能に連結される。プロモーターは、一般的に、プロモーターが存在しない場合の発現された組換え産物の量と比較して、DNA配列から発現される組換え産物の量を増加する。ある生物由来のプロモーターを、別の生物由来のDNA配列からの組換え産物の発現を増強するために利用することができる。例えば、脊椎動物のプロモーターを、脊椎動物においてクラゲGFPを発現するために用いてもよい。さらに、あるプロモーターエレメントは、タンデムに結合させた複数のDNA配列を発現する組換え産物の量を増加させることが可能である。従って、あるプロモーターエレメントは、1若しくはそれ以上の組換え産物の発現を増強することが可能である。複数のプロモーターエレメントは、本技術分野における当業者に周知である。誘導可能なプロモーター、組織特異的プロモーター、天然のプロモーター、または構成的または高レベルプロモーターが用いられてもよい。特定の実施形態において、高レベルの構成的発現が望まれる場合がある。そのようなプロモーターの例は、これに限定されるものではないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター/エンハンサー、サイトメガロウイルス(CMV)即時初期プロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、細胞質-アクチンプロモーター、およびホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーターを含む。別の実施形態において、導入遺伝子のため天然のプロモーターまたは目的の核酸配列が用いられる。導入遺伝子または核酸配列の発現が、天然の発現を模倣することが望まれる場合、天然のプロモーターが好ましいかもしれない。導入遺伝子または他の核酸配列の発現が、時間的に、または発生的に、あるいは、組織特異的に、または特定の転写刺激に応じて制御される必要がある場合、天然のプロモーターが用いられてもよい。さらなる実施形態において、エンハンサーホーメント、ポリアデニル化部位、またはコザック共通配列のような他の天然の発現制御エレメントはまた、天然の発現を模倣するのに用いることができる。特定の実施形態において、組織特異的プロモーターの組合せが用いられる。また、複数のプロモーターが組み合わさることによって、複数の組換え産物の発現を増強することができる。30
40
50

口モーターはニューロン特異的である。ニューロンに特異的なプロモーターの例は、これに限定されるものではないが、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)プロモーター(Andersen et al . (1993) Cell . Mol . Neurobiol . , 13 : 503 - 15)、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子(Piccioli et al . (1991) Proc . Natl . Acad . Sci . , 88 : 5611 - 5)、ニューロン特異的 vgf 遺伝子(Piccioli et al . (1995) Neuron , 15 : 373 - 84)などを含む。

【 0043 】

「エンハンサー」という本明細書において用いられる用語は、組み換え型産物をコードするDNA配列に隣接して位置するDNA配列を指すことがある。エンハンサー要素は一般的にプロモーターエレメントの上流、またはコーディングDNA配列(例えば、組み換え型産物または産物に転写、または翻訳されるDNA配列)の下流またはその中に位置することがある。それゆえに、エンハンサー要素は、組み換え型産物をコードするDNA配列の100塩基対、200塩基対、または300若しくはそれ以上の塩基対上流または下流に位置することがある。エンハンサー要素は、プロモーターエレメントにより提供される上記の発現が増加したDNA配列から発現される組み換え型産物の量を増加することが可能である。複数のエンハンサー要素は、当技術分野における当業者が容易に利用可能である。

10

【 0044 】

本明細書において用いられる「核酸」または「核酸分子」は、任意の一本鎖または二重のDNAまたはRNA分子および、一本鎖の場合、直線状または環状のその相補的配列の分子を指す。核酸分子について論じる場合、本明細書では、特定の核酸分子の配列または構造は、5'から3'方向に配列を提供する通常の慣例に従って記載される。本発明の核酸に関して、「単離した核酸」という用語が、時として用いられる。DNAに適用される場合、この用語は、それが起源であるものにおける生物の天然に存在するゲノムにおいて直接に連続する配列から分離されるDNA分子を指す。例えば、「単離した核酸」は、プラスミドまたはウイルスベクターのようなベクターに挿入される、または原核または真核生物細胞または宿主生物のゲノムDNAに組み込まれるDNA分子を含むことができる。

20

【 0045 】

「ベクター」は、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージ、またはウイルスのようなレプリコンであり、それに別の遺伝子配列またはエレメント(DNAまたはRNA)が付着させた配列またはエレメントの発現および / または複製をもたらすように結合できる。

30

【 0046 】

「遺伝子」という用語は、エクソンおよび(任意選択で)イントロン配列を含むポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸を指す。核酸はまた、プロモーターまたはエンハンサー配列のような非翻訳配列を任意選択で含むことができる。「イントロン」という用語は、タンパク質に翻訳されず、エクソンの間に認められる所定の遺伝子に存在するDNA配列を指す。

40

【 0047 】

「発現オペロン」は、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル(例えば、ATGまたはAUGコドン)、ポリアデニル化シグナル、ターミネータなどのような転写および翻訳制御配列を有することができる核酸断片を指し、それは宿主細胞または生物におけるポリペプチドコード配列の発現を促進する。

【 0048 】

「動作可能に連結された」という用語は、コード配列の発現のために必要な制御配列がコード配列の発現を生じるようにコード配列に対して適切な位置でDNA分子に置かれることを意味する。この同じ定義は、発現ベクターにおける転写ユニットおよび他の転写調節エレメント(例えばエンハンサー)の配置に、時として適用される。

【 0049 】

50

「オリゴヌクレオチド」という本明細書において用いられる用語は、本発明の配列、プライマー、およびプローブを指し、2若しくはそれ以上、望ましくは3以上のリボまたはデオキシリボヌクレオチドを有する核酸分子と定義される。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは、様々な要因およびオリゴヌクレオチドの特定の応用および使用に依存する。

【0050】

「単離した」という用語は、例えば、「実質的には純粋な」形態で存在するように、それが天然に関与する環境から十分に分離されたタンパク質、核酸、化合物、または細胞を指すことができる。「単離した」は、必ずしも他の化合物または材料との人工のまたは合成混合物の除去を意味するというわけではなく、基本的な活性を妨げない不純物の存在、例えば、不完全な精製による存在であってもよい。

10

【0051】

「パーセント同一性」という用語は、2若しくはそれ以上の核酸配列の比較において認められる配列同一性のパーセンテージを指す。パーセント同一性は、標準的な整列アルゴリズム、例えば、Al t sh u l r aにより記述されるBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) (J. Mol. Biol. (1990) 215: 403-10)ならびにGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA (GC G (登録商標) Wisconsin Package (登録商標) (Accelrys Inc.、マサチューセッツ州Burlington) の一部として利用可能である)により決定されることがある。

20

【0052】

「ポリペプチド」および「タンパク質」は、時として同じ意味で本明細書において用いられ、アミノ酸の分子鎖を示す。用語ポリペプチドは、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質を包含する。本用語はまた、ポリペプチド、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などの発現後の修飾を含む。さらに、タンパク質断片、類似物、変異、または変異タンパク質、融合タンパク質などは、ポリペプチドの意義の範囲内で含まれる。

【0053】

以下の実施例は、本発明の特定の実施形態を例示するために提供される。それらは任意の方法で発明を制限することを意図しない。

【実施例1】

【0054】

AAV_hu.32カプシドは、記述されるようにフレームにおいてAAV2repおよび選択的capを用いハイブリッドコンストラクトを得るために、AAV2ベースのパッケージングプラスミドにクローニングされた(Gao et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99: 11854-11859)。すべてのベクターは、サイトメガロウイルスプロモーターを有し、GFP導入遺伝子を増強し、記述されるようにトリプルトランスフェクション法を用い、テストしたAAVバリアントからの異種cap配列でAAV2組み換え体ゲノムにクロスパッケージングした(Gao et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99: 11854-11859)。パッケージング、精製、およびベクター力価の定量はペンシルバニア大学のベクターコアにより行われた。すべての組み換え型ベクターは塩化セシウム沈殿法を用いて精製し、記述されるように、ゲノムコピーラー力を測定した(Gao et al. (2000) Hum. Gene Ther., 11: 2079-2091)。

30

【0055】

成体マウスにGFP導入遺伝子を有するhu.32AAVベクターを、静脈内に注射した。注射の後、マウスをケタミンおよびキシラジン(マウスにつき~0.15ml)の混合物で麻酔し、リン酸緩衝生理食塩水の溶液の後、4%のパラホルムアルデヒドを心臓を通し灌流させた。その後、動物から脳を取り出し、一晩4%のパラホルムアルデヒドに静置し、その後、それらを凍結保護のために30%のスクロースへ移動した。脳をスクロース中に沈ませた後、それらをoptimum cutting temperature solution (Sakura、カリフォルニア州Torrance)にマウント

40

50

し、セクショニングまで - 20 で凍結させた。セクショニングはクライオスタッフ (Leica Microsystems、ドイツWetzlar) を用い 20 μm の厚さで行い、切片をその後 3 組のスライドに載せ、共焦点顕微鏡検査によるイメージングまで - 20 に維持した。

【0056】

図 2において見られるように、GFP は静脈注射の後、脳全体にわたり強く発現した。さらに具体的に言うと、GFP 発現は、嗅球、大脳皮質、線条体、海馬、中脳、上丘、内嗅皮質、および小脳におけるニューロンにおいて検出された。これらの結果は、AAV9 で観察されるより、さらに大幅に増加した形質導入のレベルを示す (Foust et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27: 59 - 65)。さらに、GFP の広範囲にわたる発現は、Balb/c、C3H、および C57BL/6 マウスで観察された。10

【0057】

図 3 は、AAV2/9、AAV2/hu11、AAV2/rh8、および AAV2/hu32 の遺伝子導入の比較を示す。マウスに同じ量のウイルスを静脈注射した。しかしながら、図 3 により明示されるように、hu32 は他の系統と比較して脳への送達を劇的に増加した。実際に、hu11 は脳への最小のターゲティングを示し、AAV9 は弱いターゲティングを示し、rh8 は改善されたターゲティングを示し、hu32 は予想外に強いターゲティングを示した。20

【実施例 2】

【0058】

本発明の AAV ベクターターゲティングはまた、ネコにおいてテストされた。hGBp はヒト - グルクロニダーゼ (hGUSB) プロモーター (378 bp 断片) であり、GFP は緑色蛍光タンパク質である AAV.hu32.hGBp.GFP を 6 週齢のネコ (n = 3) に 2.88 × 1013 ベクターゲノム (vg) / kg で頸動脈より注射した。GFP 発現を感染 8 週間後観察した。図 4 において見られるように、GFP は血管内 (頸動脈) 注射の後、脳全体にわたり強く発現した。さらに具体的に言うと、GFP 発現は、前頭葉前部皮質、尾状核、果核、大脳皮質、海馬、中脳、小脳、および脳幹におけるニューロンにおいて検出された。30

【実施例 3】

【0059】

本発明の hu32 AAV ベクターがニューロンに感染していることを証明するために、感染した脳領域の細胞の (AAV ベクターによる感染を示す) GFP 発現および細胞型特異的マーカーの解析を行った。具体的には、NeuN (Fox-3) の発現はニューロンを同定するのに用い、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP) の発現は星状膠細胞を同定するのに用い、adenomatous polyposis coli (APC) の発現は希突起神経膠細胞を同定するのに用いた。図 5A は、大脳皮質、海馬、小脳、および線条体におけるニューロン (GFP+、NeuN+) の二重染色を示し、ニューロンが GFP をエンコードする hu32 AAV ベクターに感染したことを見出す。対照的に、図 5B および 5C は、それぞれ、星状膠細胞または希突起神経膠細胞の二重染色がないことを示し、それにより、hu32 AAV ベクターがこれらの細胞型を形質導入しなかったことを示す。したがって、これらの結果は、本発明の AAV ベクターが星状膠細胞および希突起神経膠細胞でなく、選択的にニューロンに感染することが可能であることを示す。40

【実施例 4】

【0060】

アデノ随伴ウイルス血清型 9 (AAV9) は、血液脳関門を通過することが可能であり、ニューロンおよび星状膠細胞および他の組織に感染することが可能である (Foust et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27: 59 - 65; Carle et al. (2008) Mol. Ther., 16: 1710 - 171850)

)。しかしながら、AAV9はリソソーム蓄積症(LSD)ムコ多糖症(MPS)VIIのマウスモデルにおいてCNSニューロンを形質導入することが不可能であることが近年明らかとなった(Chen et al.(2012)Mol. Ther., 20:1393-1399)。

【0061】

全く対照的に、本発明のhu32AAVベクターは、全身投与でニューロンを形質導入することが可能であった。表1は、AAV.hu32.hGBp.GUSBで治療した4匹のMPS VIIマウスからクライオスタットで切り出した脳切片の溶解物のβ-グルクロニダーゼ(GUSB)活性を示す。簡潔に言うと、GUSB酵素活性は、GUSBによる4-メチルウンベリフェロン(4-MU)への基質の分解により測定され、そこで4-MUは蛍光定量的に同定することが可能である。表1において見られるように、hu32AAVベクターの血管内送達は脳ニューロンの形質導入および非常に高い、治療的なレベルよりはるかに高い、GUSBの発現を誘導する。

10

【0062】

【表1】

	nMoles/mg/hr	正常%
24617	0.41	13.69
24734	0.31	10.45
24736	0.40	13.46
24740	0.44	14.82

20

表1：正常のパーセントとしてのβ-グルクロニダーゼ活性は、AAV.hu32.hGBp.GUSBで形質導入した4匹のMPS VIIマウスから得た4つのクライオスタットで切り出した脳サンプルから提供される。

【0063】

図6は、AAV.hu32.hGUSB.GFPを用い形質導入した正常マウス、無治療のMPS VIIマウス、およびMPS VIIマウスの組織病理画像を提供する。海馬、視床、および内嗅皮質の切片を検査した。無治療のMPS VIIマウス脳切片は、MPS VIIで観察される特徴的病変を示す。全く対照的に、AAV.hu32.hGUSBで処理したMPS VIIマウスは、MPSの顕著な特徴的病変を認めず、正常マウスに類似した組織病理を示す。

30

【0064】

特定の本発明の好ましい実施形態は、記述され、特に上記に例示されたが、発明がそのような実施形態に限られることを意図しない。以下の請求項に記載したように、本発明の範囲および趣旨を逸脱することなく、様々な修正がそれになされてもよい。

【図1A】

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGLPPPKPAERKDDSRGLVLPGY 50
 KYLGPNGNLDKGEPVNAAADAALEHDKAYDQQLKAGDKPYLKYNHADADEF 100
 QBRILKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLPEPLGLVVEAAKATAPGKKRVEQSP 150
 QEPDSSAGIGKSGSQAKKLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAALPGVS 200
 LTMASGGAPVADNNEGADVGSSGNWECDSQWLGRDRITTSTRWALP 250
 TYNHNLKYQISNSTSGSSNDNFYGYSTPWYDFDNFKFHCFSPRDWQR 300
 LINNNWGFPRPKRLNFKLFNIQKVETDNNNGVTIANLSTTVQVFDSY 350
 QLPYVLGSAHEGLPFFADVFMIEQYGYLTNDGSQAVGRSSFYCLEYF 400
 PSQMLRTGNNFQFSYEVENVPFHSSYAHQSLSRIMNPLIDQYLYLSKT 450
 INGSGQNQQTTLKFVAGPSNMAVQGRNYIPGYSYRQQVRSTVTQNNNSE 500
 FAWPGASSWALNGRNSLMNPMPAMASHKEGEDRFFFPLSGSJIIFGKQGTGR 550
 DNVADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQGVATNHQSQAQAOQTGWVNQG 600
 ILPGMVQRDRDVYLQCPIWAKIPTDGNFHPSPIMGGFMKHPPQILIK 650
 NTPVPADPPTAFNQDKLNSFITQYSTQVSVEIEWLQKENSKRNPNPEIQ 700
 YTSNYYKSNNVFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL 736

【図1B】

1 atggctccg atggatattc tccagatgg ctgcaggaca acctctctga aggaataaga
 61 catgttgaa agtcaaaacc ttggccacca ccaccaaaacg ccgcagacg gcataaggac
 121 gagcaggagg gttttgtgtc ttctgggtt aagtacctcg gacccggcaa cggactcgac
 181 aacggggaggc cggtcaacccg acaacggatcg ooggccctcg aacacgacaa ggctacac
 241 caacggatcg aggccggaga caacccgtaa ctcaagata aacacgcega cgcggatcc
 301 caacggatcg tcaaaaggaa taatgtttt tggggcaacc tcggccggc agtcttcac
 361 cggaaaaaggc ggttttttgc acctttgtt ctgttttggg aacccgttaa gacggccctt
 421 gggaaaaggc gggccgtata qcaatgttctt cggggccccc actttttccg ggttattttc
 481 aaatgggtt cacacccggc taaaaggaa ctcaatggc ttggatgtgg aacccgtttt
 541 tcacccccc acccttaaac accctggaaa ccccccggc ctttttttttgggatgt
 601 ttttttttttgggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttttt
 661 gtggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttttt
 721 accacccggc ccggggggcc accttccaa atccctctca caacccatcc
 781 ttttttttttgggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttttt
 841 tgggggtttt ttttttttttgggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt
 901 ctcaatccaa aacactggg atttccggcc atggatgtcc aacccgtttt
 961 caacccggc aacccggc aacccggc aacccgtttt
 1021 gggggccggc ttccggggc ccggggggcc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1081 gggggccggc ttccggggc ccggggggcc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1141 accggccatgg atggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1201 ccgtggggaa gggggggcc ttccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1261 ctccggggaa gggggggcc ttccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1321 gggggggggcc ttccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1381 ctcaatccaa aacactggg atttccggcc atggatgtcc aacccgtttt
 1441 gggggggggcc ttccggggc ttggatgtgg aacccgtttt
 1501 ttttttttttgggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1561 gggggggggcc ttccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1621 ttttttttttgggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1681 accccggcc aacccggc aacccggc aacccgtttt
 1741 gggggggggcc ttccggggc ttggatgtgg aacccgtttt gtttttttttttt
 1801 atccatccgg atttccggcc atggatgtcc aacccgtttt
 1861 aaaaatccgg atccggcc aacccgtttt
 1921 aacccggcc ctccggggcc ttccggggc ttccggggc
 1981 gtttttttttgggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt
 2041 gggggggggcc ttccggggc ttggatgtgg aacccgtttt
 2101 tacacttccaa atccggggcc ttccggggc ttggatgtgg aacccgtttt
 2161 ttttttttttgggatgtt ctccggggc ttggatgtgg aacccgtttt

Figure 1A

Figure 1B

【図1C】

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWDLKRGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFFNLD
 61 KGEPVNAADA AALENDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADADEF QERLQEDTSP GGNLGRAVFQ
 121 AKKRVLPLGP LVEEGAKTAP GKXRPMVEQSP QEPDSSSGIG KTQQQPAKER LNFQGTGDS
 181 SVPDPQPLGE PPAAPSGLGP NTKASGGAP MADNNEGADG VGNSSGNVAC DSTWLGRV
 241 TTSTRWALP TYNHNLKYQI SNCTSGSTN DNITYFGYST WGYDFDNFRH CHFSPRDWQR
 301 LINNNWGFPR KRNLNFKLFNI QKVETDNNNGVTIANLSTS TVQVFDSY QLPYVLGSAH
 361 QGCLPPFAD VFMPVQYGYL TLNNNGSALG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNNFQFSYEVENVPFHSSYAHQSLSRIMNPLIDQYLYLSKT
 421 PFHSSYAEQ SLDRMLMPLI DQIYLIVRT QTGTGTTQTL LAFSQAGPSS MAQARAEWV
 481 GPCYRQQPVS TTHQUNHSN FAWTGAAKFK LNRGDSLMNP GVAMASHKDD DDERFPSGV
 541 LIFGKQGAGH DGVDSQVLI TDEEEIKATN PVATEEYGAV AIINQAAANTO AQTGLVHNQG
 601 VIPGNWVQNR DYLQGPIA KIPHTDGNFH PSPLMGGJL KHPPQILIK NTPVPADPPL
 661 TFNQAKLNSF ITQYSTQVS VEIEWLQME NSKEWMNPEIQ YTSHYYKSTH VDFAVNTEGV
 721 YSEPRPIGTR YLTRNL

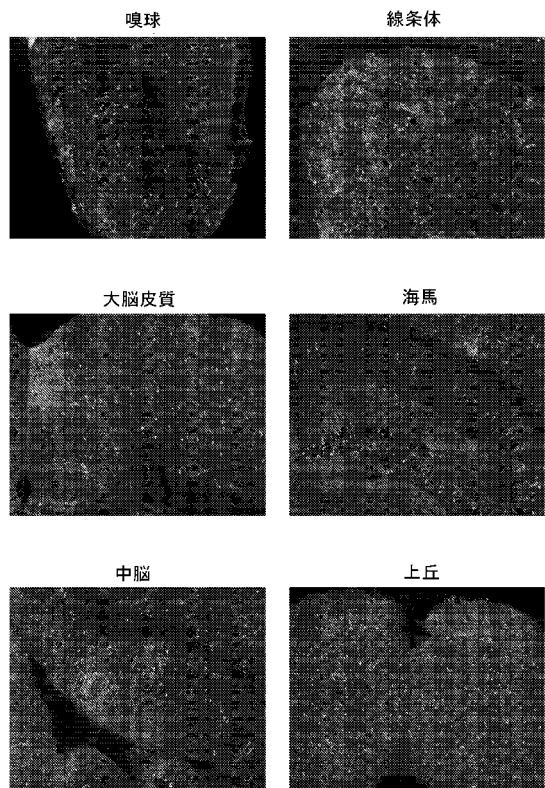
【図1D】

1 atggctccg atggatattc tccagatgg ctgcaggaca acctctctga gggcatccgc
 61 gggatgtgg actggaaacc ttggagcccccc aaacccaaacg ccacccggcc aaaggccggc
 121 gggggccggg ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 181 aacggggaggc ccgtccaaaccg ccggccggccca ccggccctccg agtccggccaa accctccggc
 241 caacggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 301 caacggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 361 aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 421 gggggggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 481 aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 541 tcacccccc acccccaacc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 601 atccatccgg ctccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 661 gggggatgtt ctccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 721 accccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 781 tcccaatccaa aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 841 tcccaatccaa aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 901 ctccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 961 ctccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1021 accccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 1081 ctccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1141 accccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 1201 ctccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1261 ctccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1321 gggggggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1381 gggggggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1441 gggggggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1501 ttggccgtgg cggggggggcc caatggatgg ctggatgtgg aacccgtttt
 1561 gggggggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1621 ctggatgtgg gcaacggccggcc acggccggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1681 acacggatgg aacaaatccaa gggttccaaacccggccca aacccggccca aacccggccca
 1741 gggggggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 1801 qtgtttccgg qcgtttccgg qcgtttccgg qcgtttccgg qcgtttccgg
 1861 aaaaatccgg atccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 1921 aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 1981 accccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca aacccggccca
 2041 gggggggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 2101 tacacttccaa atccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc
 2161 ttttttttttgggatgtt ctccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc ttccggggcc

Figure 1C

Figure 1D

【図2A】



【図2B】

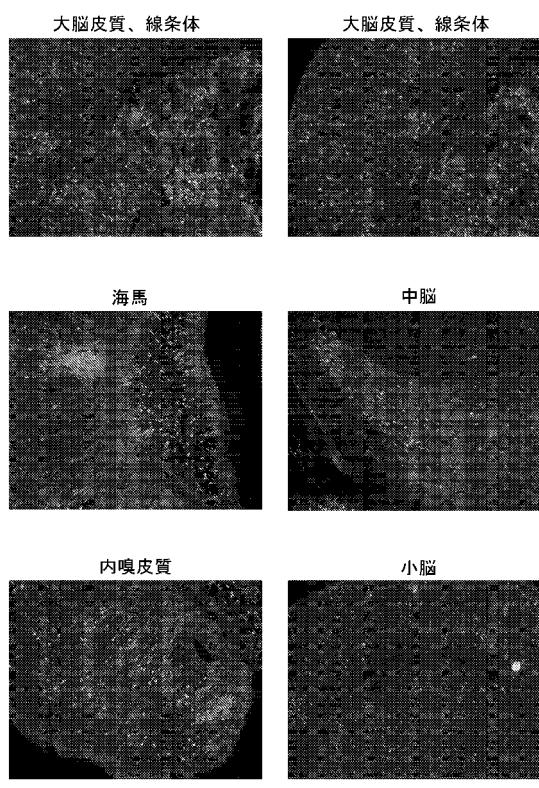


Figure 2A

Figure 2B

【図3A】

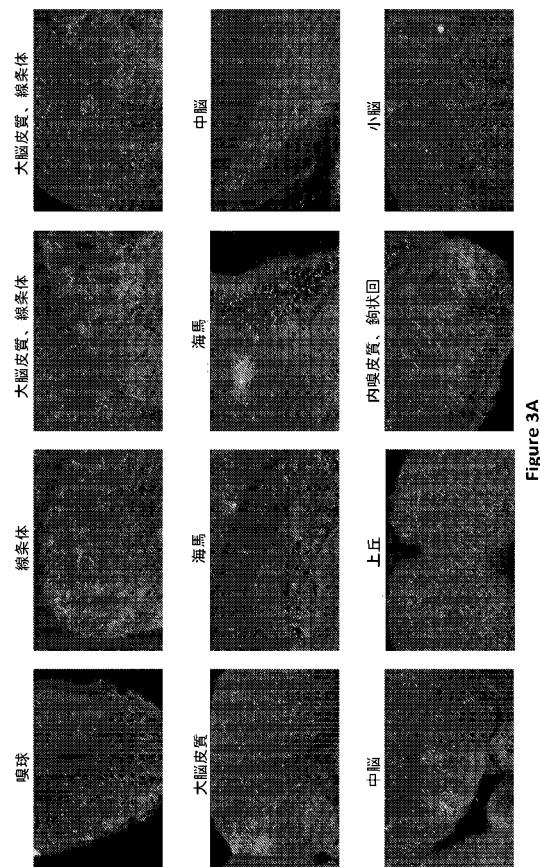


Figure 3A

【図3B】

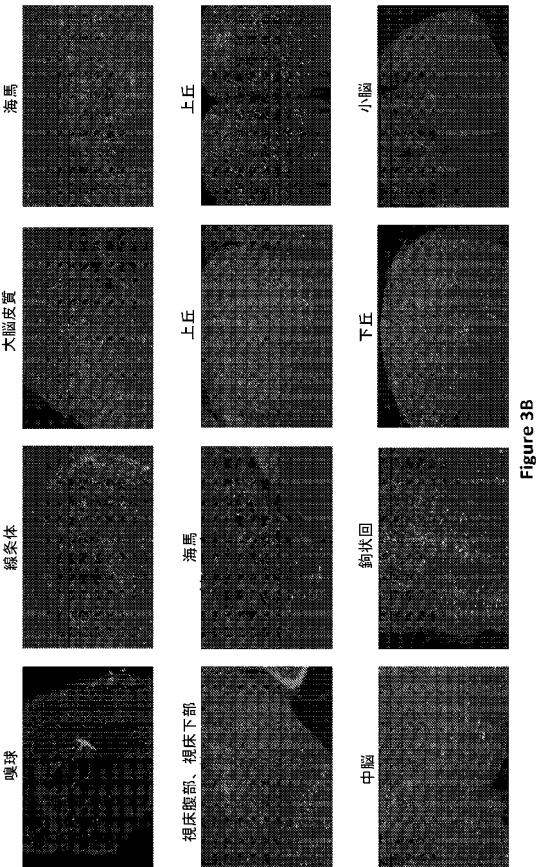


Figure 3B

【図 3 C】

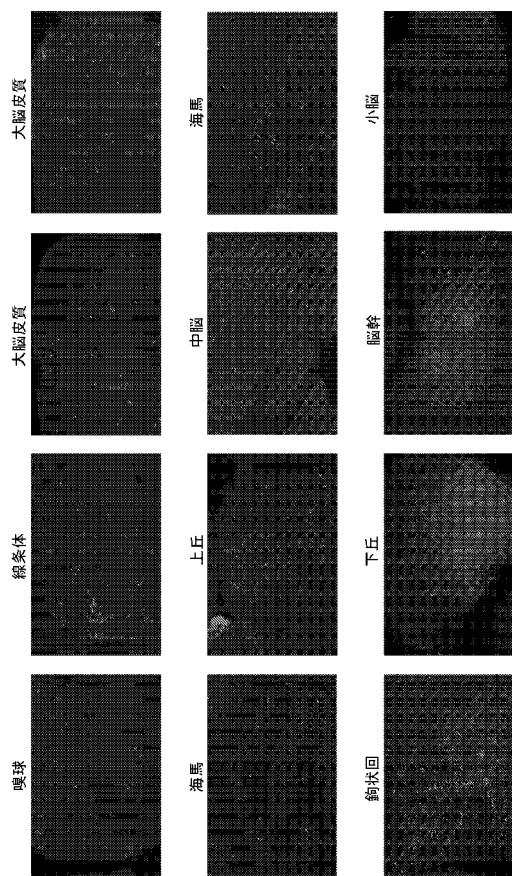


Figure 3C

【図 3 D】

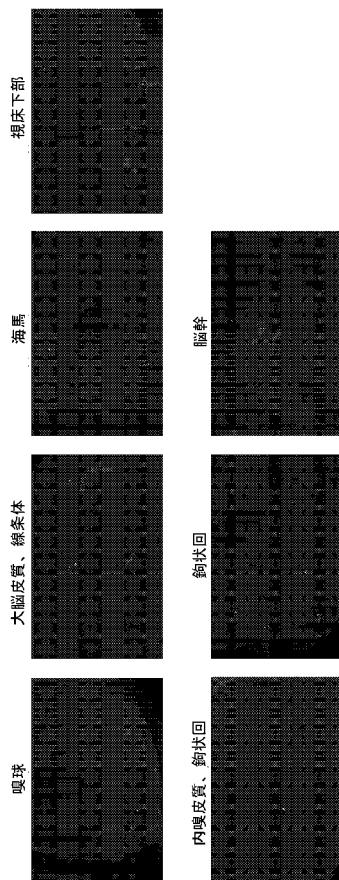


Figure 3D

【図 4】

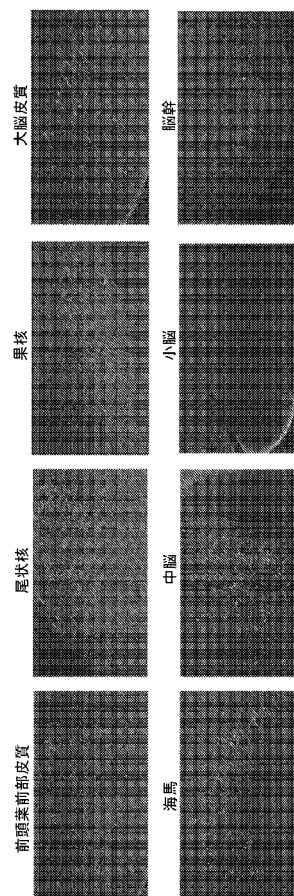


Figure 4

【図 5 A】

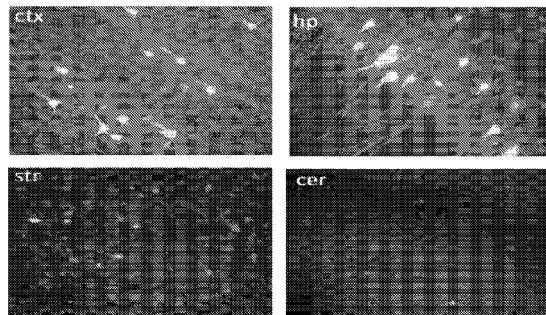
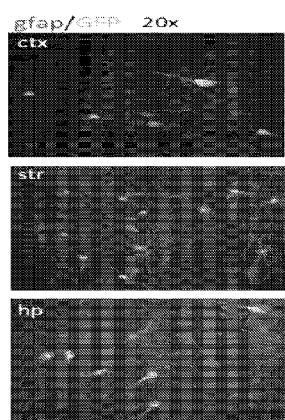


Figure 5A

【図 5 B】



【図 5 C】

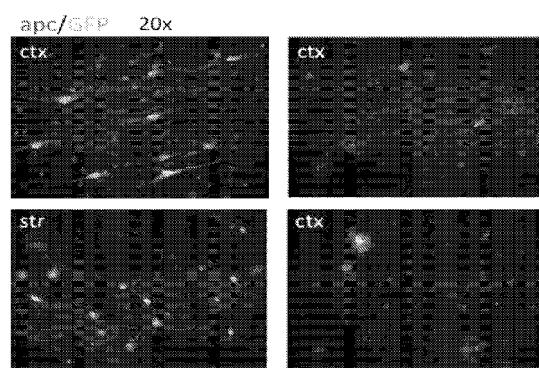


Figure 5B

Figure 5C

【図 6】

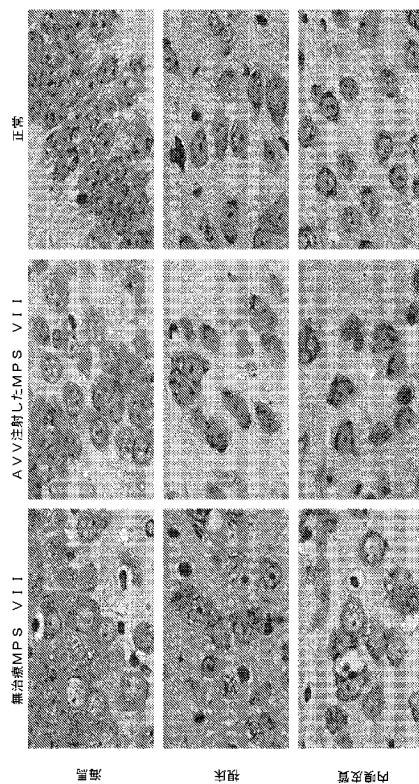


Figure 6

【配列表】

2016514152000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/25794
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/00, C12N 15/86, A61K 39/23, A61K 39/235 (2014.01) USPC - 435/320.1, 435/456, 424/233.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 435/320.1, 435/456, 424/233.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 435/455, 514/44R, 424/93.2; 424/199.1; 435/325		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); PatBase, Google/Scholar: Adeno-associated virus, nucleic acid delivery, brain, capsid protein, brain neuron/nerve cell, AAV, VP1, AAV-9, AAV 9 Clade, β -glucuronidase, dopaminergic neurone, clone hu.32, Q6JC22, Clade F. GenCore 6.4.1: SEQ ID NO:1		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/057363 A1 (Muramatsu) 03 MAY 2012 (03.05.2012) para [0067], [0082], [0084], SEQ ID NO:6 and 8	1, 2, 4, 5
X - Y	Clearley, et al. Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. Mol Ther. 2008, 16(10):1710-8; Abstract, pg 6 [of the posted document], col 2, last para; pg 7. GenBank AY243003	1-3 6-12
A	GenBank Submission AY243003. Non-human primate Adeno-associated virus isolate AAVrh.32 capsid protein (VP1) gene, complete cds. 14 May 2003. [Retrieved from the Internet 14 June 2014: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY243003>]; in entirety	1-12
Y	WO 2011/143557 A2 (Wolfe, et al.) 17 November 2011 (17.11.2011) pg 1, ln 23-30; pg 2, ln 25-35; pg 5, ln 20-35; pg 16, ln 6 to pg 17, ln 10	6-12
A	Ross, et al. Development of small alginate microcapsules for recombinant gene product delivery to the rodent brain. J Biomater Sci Polym Ed. 2002;13(8):953-62; pg 954, 2nd para	12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 June 2014 (13.06.2014)	Date of mailing of the international search report 10 JUL 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	

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

(72)発明者 ウルフ、ジョン、エイチ。

アメリカ合衆国、19422 ペンシルバニア州、ブルー ベル、9 ピューゲル レイン

F ターム(参考) 4B024 AA01 EA02 EA04 GA11 HA17
 4C076 AA95 BB11 BB13 BB14 CC01 CC41 EE41 EE59 FF32 FF34
 4C084 AA13 MA05 MA66 NA13 ZA01 ZA16
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA07 MA66 NA13 ZA01 ZA16
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA05 MA66 NA13 ZA01 ZA16
 4H045 AA30 BA10 CA01 EA20 FA74