

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-540756

(P2023-540756A)

(43)公表日 令和5年9月26日(2023.9.26)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全47頁) 最終頁に続く

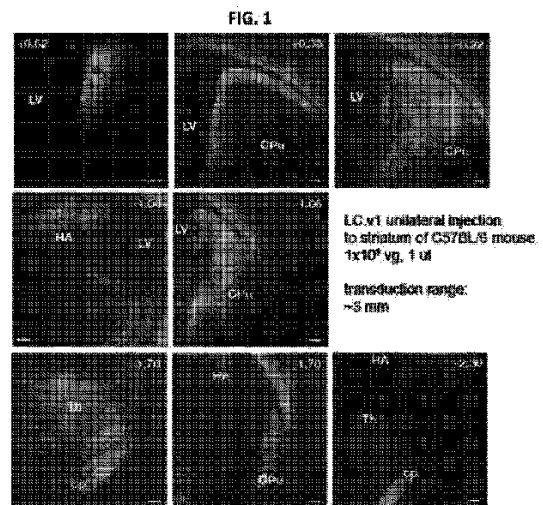
(21)出願番号	特願2023-514976(P2023-514976)	(71)出願人	514137997 オハイオ・ステイト・イノベーション・ ファウンデーション
(86)(22)出願日	令和3年9月3日(2021.9.3)		
(85)翻訳文提出日	令和5年4月26日(2023.4.26)		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/049081		アメリカ合衆国オハイオ州43201, コロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1524
(87)国際公開番号	WO2022/051633	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(87)国際公開日	令和4年3月10日(2022.3.10)		
(31)優先権主張番号	63/074,548	(74)代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(32)優先日	令和2年9月4日(2020.9.4)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100157956 弁理士 稲井 史生
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, .RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA( AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100170520 弁理士 笹倉 真奈美
		(74)代理人	100221545 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 向上した形質導入効率及び脳内における広範な分布を有する組換えアデノ随伴ウイルスベクターの新規の操作されたキャプシド血清型

(57)【要約】

操作された脳指向性アデノ随伴ウイルスベクター及びそれらの使用の方法が開示される。

【選択図】図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヘパリン結合遺伝子座内に1つ以上の置換を含む組換え2 (Rec2) キャプシドを含む操作されたアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであって、前記置換が、神経組織に対する指向性を前記ベクターに付与する、操作されたアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター。

## 【請求項 2】

前記1つ以上の置換が、配列番号1の残基588、589、及び/又は594に対応する残基で生じる、請求項1に記載の操作されたAAVベクター。

## 【請求項 3】

前記1つ以上の置換が、Q588P、Q589L、Q589I、Q589V、Q589G、Q594L、Q594I、及び/又はQ594Vを含む、請求項2に記載の操作されたAAVベクター。

## 【請求項 4】

調節要素、及びプロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子を含む第1の発現カセットと、前記第1の発現カセット内の前記調節要素を標的にするRNAサイレンシング要素に作動可能に連結された組織特異的プロモーターを含む第2の発現カセットと、を更に含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の操作されたAAVベクター。

## 【請求項 5】

前記第1のカセットの前記調節要素が、ウッドチャック転写後調節要素 (WPRE) 配列である、請求項4に記載の方法。

## 【請求項 6】

対象の脳内の神経組織に遺伝子を送達する方法であって、前記対象に、請求項1~5のいずれか一項に記載の操作されたAAVベクターを投与することを含む、方法。

## 【請求項 7】

対象における神経疾患を治療する方法であって、前記対象に、請求項1~5のいずれか一項に記載の操作されたAAVベクターを投与することを含み、前記操作されたベクターが、治療剤をコードする、方法。

## 【請求項 8】

前記導入遺伝子又は治療剤が、 - ガラクトシダーゼ1 (GLB1)、ニーマン - ピックC1 (NPC1)、アポリポタンパク質E (APOE)、GD3シンターゼ、ハンチンチン (Htt)、インターロイキン (IL) - 10 (IL - 10)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ8相互作用タンパク質3 (MAPKA8IP3)、生存運動ニューロン (SMN) 1 (SMN1)、SMN2、Cas9、 - グルコセレブロシダーゼ (GBA)、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1 (SMPD1)、ベータ - ヘキササミニダーゼA (HEXA)、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン (NT) 3 (NT - 3)、NT - 4 / 5、NT - 6、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、白血病阻止因子 (LIF)、インスリン様成長因子 (IGF) 1 (IGF - 1)、 - 線維芽細胞成長因子 (FGF)、ニューロトロフィン、ペルセフィン、アルテミン、トランスフォーミング成長因子 (TGF) アルファ (TGF )、TGF、IGF - 2、血小板由来成長因子 (PDGF)、上皮成長因子 (EGF)、カルジオトロピン、血管内皮成長因子 (VEGF)、ソニックヘッジホッグ (SHH)、骨形成タンパク質 (BMP)、FGF20、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、プレイオトロフィン (PTN)、芳香族L - アミノ酸脱炭酸酵素 (ADC)、TH、5 - ヒドロキシトリプタミン (5HT)、肝細胞成長因子 (HGF)、miRNA - 222、miRNA - 7、及び/又はmiRNA - 132を含む、請求項6又は7に記載の遺伝子を送達するか、又は神経疾患を治療する方法。

## 【請求項 9】

前記神経疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、及び/又は筋ジストロフィーを

10

20

30

40

50

含む、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記操作された AAV ベクターが、後眼窩、静脈内、又は脳脊髄液注射を介して投与される、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の遺伝子を送達するか、又は神経疾患を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

I . 関連出願の相互参照

本出願は、2020年9月4日に提出された米国仮特許出願第63/074,548号の利益を主張し、その開示は、その全体が参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

II . 背景技術

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、その安全性プロファイル、及び臨床試験における有望な結果のために、神経疾患の遺伝子療法にしばしば使用される。AAVベースの遺伝子療法に対する1つの課題は、多数の適切な細胞型の効果的な形質導入である。脳及び神経組織は、効果的な形質導入にとって特に困難な部位である。必要なのは、効果的かつ効率的に神経組織、特に脳を形質導入することができる新しいベクターである。

【発明の概要】

【0003】

III . 発明の概要

操作されたアデノ随伴ウイルスベクター及びその使用が開示される。

【0004】

一態様では、本明細書に開示されるのは、ヘパリン結合遺伝子座での1つ以上の置換、挿入、及び/又は欠失(例えば、配列番号1の残基561と591との間の残基に対応する残基での置換、欠失、又は及び/又は挿入)を有する組換え2(Rec2)キャプシドを含む、操作されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり、当該置換は、ベクターにニューロン指向性を付与する。一態様では、1つ以上の置換は、配列番号1の残基585、587、588、589、及び/又は594に対応する残基(例えば、Q588P、Q589L、Q589I、Q589V、Q589G、Q594L、Q594I、及び/又はQ594Vなどの置換など)で生じる。

【0005】

また、本明細書に開示されるのは、調節要素(例えば、ウッドチャック転写後調節要素(WPRE)配列など)、及びプロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子(例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ1(GLB1)、ニーマン-ピックC1(NPC1)、アポリポタンパク質E(APOE)、GD3シンターゼ、ハンチンチン(Htt)、インターロイキン(IL)-10(IL-10)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ8相互作用タンパク質3(MAPKAKIP3)、生存運動ニューロン(SMN)1(SMN1)、SMN2、Cas9、 $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ(GBA)、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1(SMPD1)、ベータ-ヘキササミニダーゼA(HEXA)、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン(NT)3(NT-3)、NT-4/5、NT-6、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、白血病阻止因子(LIF)、インスリン様成長因子(IGF)1(IGF-1)、 $\beta$ -線維芽細胞成長因子(FGF)、ニューロトロフィン、ベルセフィン、アルテミン、トランスフォーミング成長因子(TGF)アルファ(TGF $\alpha$ )、TGF $\beta$ 、IGF-2、血小板由来成長因子(PDGF)、上皮成長因子(EGF)、カルジオトロピン、血管内皮成長因子(VEGF)、ソニックヘッジホッグ(SHH)、骨形成タンパク質(BMP)、FGF20、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、プレイオトロフィン(PTN)、芳香族

L - アミノ酸脱炭酸酵素 ( A A D C )、 T H、 5 - ヒドロキシトリプトタミン ( 5 H T )、肝細胞成長因子 ( H G F )、 m i R N A - 2 2 2、 m i R N A - 7、 及び / 又は m i R N A - 1 3 2 など) を含む第 1 の発現カセットと、 第 1 の発現カセット内の調節要素を標的にする R N A サイレncing 要素に作動可能に連結された組織特異的プロモーターを含む第 2 の発現カセットと、 を更に含む、 任意の先行態様に記載の操作された A A V ベクターである。

【 0 0 0 6 】

一態様では、 本明細書に開示されるのは、 対象の脳 ( 例えば、 前頭皮質及び / 又は前頭前野 ) 内の神経組織に遺伝子 ( 例えば、 - ガラクトシダーゼ 1 ( G L B 1 )、 ニーマン - ピック C 1 ( N P C 1 )、 アポリポタンパク質 E ( A P O E )、 G D 3 シンターゼ、 ハンチンチン ( H t t )、 インターロイキン ( I L ) - 1 0 ( I L - 1 0 )、 ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 ( M O G )、 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ 8 相互作用タンパク質 3 ( M A P K A 8 I P 3 )、 生存運動ニューロン ( S M N ) 1 ( S M N 1 )、 S M N 2、 C a s 9、 - グルコセレブロシダーゼ ( G B A )、 スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 1 ( S M P D 1 )、 ベータ - ヘキソサミニダーゼ A ( H E X A )、 神経成長因子 ( N G F )、 脳由来神経栄養因子 ( B D N F )、 ニューロトロフィン ( N T ) 3 ( N T - 3 )、 N T - 4 / 5、 N T - 6、 グリア細胞由来神経栄養因子 ( G D N F )、 毛様体神経栄養因子 ( C N T F )、 白血病阻止因子 ( L I F )、 インスリン様成長因子 ( I G F ) 1 ( I G F - 1 )、 - 線維芽細胞成長因子 ( F G F )、 ニュールツリン、 ペルセフィン、 アルテミン、 トランスフォーミング成長因子 ( T G F ) アルファ ( T G F )、 T G F - 1、 T G F - 2、 血小板由来成長因子 ( P D G F )、 上皮成長因子 ( E G F )、 カルジオトロピン、 血管内皮成長因子 ( V E G F )、 ソニックヘッジホッグ ( S H H )、 骨形成タンパク質 ( B M P )、 F G F 2 0、 血管作動性腸管ペプチド ( V I P )、 プレイオトロフィン ( P T N )、 芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素 ( A A D C )、 T H、 5 - ヒドロキシトリプトタミン ( 5 H T )、 肝細胞成長因子 ( H G F )、 m i R N A - 2 2 2、 m i R N A - 7、 及び / 又は m i R N A - 1 3 2 など) を送達する方法であり、 対象に、 任意の先行態様に記載の操作された A A V ベクターを投与することを含む。 いくつかの態様では、 A A V ベクターは、 少なくとも 5 0、 5 1、 5 2、 5 3、 5 4、 5 5、 5 6、 5 7、 5 8、 5 9、 6 0、 6 1、 6 2、 6 3、 6 4、 6 5、 6 6、 6 7、 6 8、 6 9、 7 0、 7 1、 7 2、 7 3、 7 4、 7 5 % の形質導入の効率を有する。 また、 遺伝子を神経組織に送達する方法も開示され、 A A V ベクターは、 全身投与される ( 例えば、 これらに限定されないが、 i . v . 注射若しくは i . v . 点滴を含む静脈内に、 及び / 又は後眼窩に、 など) か、 又は脳脊髄液注射を介して投与される。

【 0 0 0 7 】

また、 本明細書に開示されるのは、 対象における神経疾患 ( 例えば、 アルツハイマー病、 パーキンソン病、 多系萎縮症 ( M S A )、 リソソーム貯蔵病 ( L S D )、 及び / 又は筋肉ジストロフィーなど) を治療、 阻止、 減少、 低減、 改善、 及び / 又は予防する方法であり、 対象に、 治療剤をコードする任意の先行態様に記載の操作された A A V ベクター ( 例えば、 これらに限定されないが、 - ガラクトシダーゼ 1 ( G L B 1 )、 ニーマン - ピック C 1 ( N P C 1 )、 アポリポタンパク質 E ( A P O E )、 G D 3 シンターゼ、 ハンチンチン ( H t t )、 インターロイキン ( I L ) - 1 0 ( I L - 1 0 )、 ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 ( M O G )、 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ 8 相互作用タンパク質 3 ( M A P K A 8 I P 3 )、 生存運動ニューロン ( S M N ) 1 ( S M N 1 )、 S M N 2、 C a s 9、 - グルコセレブロシダーゼ ( G B A )、 スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 1 ( S M P D 1 )、 ベータ - ヘキソサミニダーゼ A ( H E X A )、 神経成長因子 ( N G F )、 脳由来神経栄養因子 ( B D N F )、 ニューロトロフィン ( N T ) 3 ( N T - 3 )、 N T - 4 / 5、 N T - 6、 グリア細胞由来神経栄養因子 ( G D N F )、 毛様体神経栄養因子 ( C N T F )、 白血病阻止因子 ( L I F )、 インスリン様成長因子 ( I G F ) 1 ( I G F - 1 )、 - 線維芽細胞成長因子 ( F G F )、 ニュールツリン、 ペルセフィン、 アルテミン、 トランスフォーミング成長因子 ( T G F ) アルファ ( T G F )、 T G F - 1、 T G F - 2、 血小板由来成長因子 ( P D G F )、 上皮成長因子 ( E G F )、 カルジオトロピン、 血管内皮成長因子 ( V E G F )、 ソニックヘッジホッグ ( S H H )、 骨形成タンパク質 ( B M P )、 F G F 2 0、 血管作動性腸管ペプチド ( V I P )、 プレイオトロフィン ( P T N )、 芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素 ( A A D C )、 T H、 5 - ヒドロキシトリプトタミン ( 5 H T )、 肝細胞成長因子 ( H G F )、 m i R N A - 2 2 2、 m i R N A - 7、 及び / 又は m i R N A - 1 3 2 など) を送達する方法であり、 対象に、 任意の先行態様に記載の操作された A A V ベクターを投与することを含む。 いくつかの態様では、 A A V ベクターは、 少なくとも 5 0、 5 1、 5 2、 5 3、 5 4、 5 5、 5 6、 5 7、 5 8、 5 9、 6 0、 6 1、 6 2、 6 3、 6 4、 6 5、 6 6、 6 7、 6 8、 6 9、 7 0、 7 1、 7 2、 7 3、 7 4、 7 5 % の形質導入の効率を有する。 また、 遺伝子を神経組織に送達する方法も開示され、 A A V ベクターは、 全身投与される ( 例えば、 これらに限定されないが、 i . v . 注射若しくは i . v . 点滴を含む静脈内に、 及び / 又は後眼窩に、 など) か、 又は脳脊髄液注射を介して投与される。

TGF、IGF-2、血小板由来成長因子(PDGF)、上皮成長因子(EGF)、カルジオトロピン、血管内皮成長因子(VEGF)、ソニックヘッジホッグ(SHH)、骨形成タンパク質(BMP)、FGF20、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、プレイオトロフィン(PTN)、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)、TH、5-ヒドロキシトリプタミン(5HT)、肝細胞成長因子(HGF)、miRNA-222、miRNA-7、及び/又はmiRNA-132などを含む、導入遺伝子)を投与することを含む。また、任意の先行態様に記載の神経疾患を治療、阻止、減少、低減、改善、及び/又は予防する方法も開示され、AAVベクターは、全身投与される(例えば、これらに限定されないが、i.v.注射若しくはi.v.点滴を含む静脈内に、後眼窩に、又は脳脊髄液注射を介して)。

10

【図面の簡単な説明】

【0008】

IV. 図面の簡単な説明

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、一部の実施形態を例示し、説明と共に、開示される組成物及び方法を例示する。

【図1】[図1]マウスの線条体へのLC.V1ベクターの片側注射の3週間後の代表的なGFP蛍光を示す。

【図2】[図2]AAV:LC.V1(ロット番号LC-195);力価:  $1.2 \times 10^{13}$  v.g./mlで形質導入されたラット1を示す。送達は、右線条体へのCEDであった( $15 \mu\text{l}$ ;  $1 \mu\text{l}/\text{分}$ )。形質導入の3週間後に安楽死を行った。染色は、GFP(導入遺伝子)に対するIHCであった。

20

【図3】[図3]AAV:LC.V1(ロット番号LC-195);力価:  $1.2 \times 10^{13}$  v.g./mlで形質導入されたラット2を示す。送達は、右線条体へのCEDであった( $15 \mu\text{l}$ ;  $1 \mu\text{l}/\text{分}$ )。形質導入の3週間後に安楽死を行った。染色は、GFP(導入遺伝子)に対するIHCであった。

【図4-1】[図4A~4C]非ヒト霊長類(NHP)の視床へのLC.V1の脳内送達を示す。4A-神経マーカーNeuNで染色されたNHP脳切片(赤色蛍光)。4B-導入遺伝子/レポーター遺伝子GFPに対して染色されたNHP脳切片(緑色蛍光)。4C-サル(視床)のほぼ完全な被覆を示す、NeuN+GFPの併合染色。[図4D~4K]前頭前野及び前頭皮質内の層Vの錐体ニューロンの形質導入を示す、NHP脳切片の蛍光染色を示す。この形質導入は、注射部位(視床)からのLC.V1の逆行性輸送の結果であった。赤色蛍光-ニューロンマーカー、NeuNに対する染色;緑色蛍光-レポーター遺伝子、GFP。

30

【図4-2】同上。

【図5-1】[図5A~5C]層V内のニューロンの形質導入を示す、前頭前野からの代表的なNHP染色(二重蛍光)脳切片のより高い倍率を示す。5A-脳切片をニューロンマーカー、NeuN(赤色蛍光)に対して染色した。5B-脳切片をレポーター遺伝子、GFP(緑色蛍光)に対して染色した。5C-NeuN+GFPの併合染色。[図5D~5H]視床(注射の一次部位)に注入されたLC.V1ベクターによる海馬/海馬台の神経形質導入-視床からの逆行性輸送の結果を示す。NHP切片を、ニューロンマーカー、NeuN(赤色蛍光)及びレポーター遺伝子、GFP(緑色蛍光)に対して染色した。その領域からの脳切片のより高い倍率がパネル5F~5Hに示される。[図5I]NHP視床に注入されたLC.V1ベクターを用いた神経形質導入の効率を示す。値は、NeuN及びGFPに対する二重蛍光によって染色された脳切片から計算された。

40

【図5-2】同上。

【図5-3】同上。

【図5-4】同上。

【図6】[図6A~6D]LC.V1ベクター(6A)を用いた一次標的-中脳(VTA及び黒質)のニューロン形質導入、及び遠隔脳構造、尾状核(6B及び6C)、及び尾状核被殻(6B及び6D)へのその順行性輸送を示す。NHP切片を、ニューロンマーカー

50

、NeuN（赤色蛍光）及びレポーター遺伝子、GFP（緑色蛍光）に対して染色した。  
 【図7-1】[図7A~7F]脳実質内のLC・V1ベクターの分布が、リアルタイムMRIによって監視され得ることを示す。7A - 神経マーカー、NeuN（赤色蛍光）及びレポーター遺伝子、GFP（緑色蛍光）に対して二重蛍光で染色したNHP視床脳切片。7B - MRI造影剤、ProHanceと混合したLC・V1の注射中のリアルタイムMRIからのMRIスキャン。7C - LC・V1ベクターからのGFP発現とProHanceシグナルの面積とのほぼ完全な相関を示す、重ね合わせられた図7A及び7B。7D - MRI造影剤、ProHanceと混合したLC・V1の、右中脳（VTA及び黒質）への注射中のリアルタイムMRIからのMRIスキャン。7E - ニューロンマーカー、NeuN（赤色蛍光）及びレポーター遺伝子、GFP（緑色蛍光）に対して二重蛍光で染色されたNHP脳切片。7F - LC・V1ベクターからのGFP発現とProHanceシグナルの面積とのほぼ完全な相関を示す、重ね合わせられた図7D及び7E。

10

【図7-2】同上。

【図8-1】[図8]前後軸からの異なる脳レベルでの、代表的な動物からの導入遺伝子の形質導入（GFP）の代表的な画像を示す。動物は、右眼窩後洞（RO）若しくは尾静脈（TV）を通る全身注射、又は左側脳室送達（LV）を通るCSF注射のいずれかを受けた。各動物は、全身的に50µL又はCSFへ25µLのAAV:LC・V1を $8.36E+13$ vg/mL（ロット番号CS1851）の力価で受けた。クレシルバイオレットの対比染色を用いたGFP（導入遺伝子）1:1000に対する免疫組織化学。略語：前頭前野（PFCtx）、線条体（Str）、視床（Thal）、黒質（SN）、小脳（Cb）、緑色蛍光タンパク質（GFP）。

20

【図8-2】同上。

【図8-3】同上。

【図9】[図9]代表的な動物からの異なる末梢器官における導入遺伝子の形質導入（GFP）の代表的な画像を示す。動物は、右眼窩後洞（RO）若しくは尾静脈（TV）を通る全身注射、又は左側脳室送達（LV）を通るCSF注射のいずれかを受けた。各動物は、全身的に50µL又はCSFへ25µLのAAV:LC・V1を $8.36E+13$ vg/mL（ロット番号CS1851）の力価で受けた。クレシルバイオレットの対比染色を用いたGFP（導入遺伝子）1:1000に対する免疫組織化学。ナイーブマウス（注射されていない）は、GFPシグナルの不在を示すために陰性対照として含まれた。緑色のシグナルは、ベクター形質導入からの天然のGFPシグナルを示す。略語：野生型（WT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）。

30

【図10】[図10]代表的な動物からの海馬及び歯状回における導入遺伝子の形質導入（GFP）の代表的な画像を示す。動物は、右眼窩後洞（RO）若しくは尾静脈（TV）を通る全身注射、又は左側脳室送達（LV）を通るCSF注射のいずれかを受けた。各動物は、全身的に50µL又はCSFへ25µLのAAV:LC・V1を $8.36E+13$ vg/mL（ロット番号CS1851）の力価で受けた。クレシルバイオレットの対比染色を用いたGFP（導入遺伝子）1:1000に対する免疫組織化学。略語：海馬コルヌアンモニス（CA）、歯状回（DG）、緑色蛍光タンパク質（GFP）。

【図11】[図11]ニューロン指向性評価（NeuN）の代表的な画像を示す。GFP（導入遺伝子、緑色）及び特異的ニューロンマーカーNeuN（赤色）に対する二重免疫蛍光染色。白い矢印ヘッドは、LC・V1ベクターの神経指向性を確認する、NeuN/GFP共同在を示す。青い矢印ヘッドは、形質導入された非NeuN細胞を示す。略語：緑色蛍光タンパク質（GFP）、ニューロン核タンパク質（NeuN）

40

【図12】[図12]説明なし。

【発明を実施するための形態】

【0009】

V. 発明を実施するための形態

本発明の化合物、組成物、物品、デバイス、及び/又は方法を開示及び説明する前に、それらは、特に明記しない限り、特定の合成方法又は特定の組換えバイオテクノロジー方

50

法に限定されず、特に明記しない限り、特定の試薬（当然、変化し得るため）に限定されないことを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0010】

A. 定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈上別段明らかに指示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「薬学的担体」への言及は、2つ以上のそのような担体の混合物などを含む。

【0011】

本明細書では、範囲は、「約」ある特定の値から、及び/又は「約」別の特定の値まで、のように表現され得る。そのような範囲が表現される場合、別の実施形態は、そのある特定の値から、及び/又はその他の特定の値まで、を含む。同様に、値が近似値として表現される場合、先行詞の「約」を使用することによって、特定の値は別の実施形態を形成することが理解されよう。範囲の各終点は、他の終点と関連して、及び他の終点とは独立して、両方とも重要であることが更に理解されよう。本明細書に開示されるいくつかの値が存在し、各値は、値自体に加えて、その特定の値を「約」として本明細書に開示されることも理解される。例えば、値「10」が開示される場合、「約10」も開示される。当業者によって適切に理解されるように、ある値が「その値以下」であることが開示される場合、「その値以上」及びその値の間の可能な範囲も開示されることも理解される。例えば、値「10」が開示される場合、「10以下」並びに「10以上」も開示される。また、本出願全体にわたって、データは、いくつかの異なる形式で提供され、このデータは、終点及び始点、並びにデータポイントの任意の組み合わせの範囲を表すことも理解される。例えば、特定のデータポイント「10」及び特定のデータポイント15が開示される場合、10と15の間に加えて、10より大きい、10以上、10未満、10以下、及び10に等しい、15より大きい、15以上、15未満、15以下、及び15に等しい値が開示されるとみなされることが理解される。また、2つの特定のユニット間の各ユニットも開示されることを理解される。例えば、10及び15が開示される場合、11、12、13、及び14も開示される。

【0012】

本明細書及び添付の特許請求の範囲では、以下の意味を有するべく定義されたいいくつかの用語を参照されたい。

【0013】

「任意選択の」又は「任意選択で」は、後で説明する事象又は状況が生じても生じなくてもよいことを意味し、この記載には、当該事象又は状況が生じる事例及び生じない事例が含まれる。

【0014】

「増加」は、より多くの量の症状、疾患、組成物、状態、又は活性をもたらす任意の変化を指し得る。増加は、統計的に有意な量の状態、症状、活性、組成物の任意の個々の値、中央値、又は平均の増加であり得る。したがって、増加は、その増加が統計的に有意である限り、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、又は100%の増加であり得る。

【0015】

「減少」は、より少ない量の症状、疾患、組成物、状態、又は活性をもたらす任意の変化を指し得る。ある物質はまた、その物質を含む遺伝子産物の遺伝的出力が、その物質を含まない遺伝子産物の出力と比較して少ない場合に、遺伝子の遺伝的出力を減少させると理解される。また、例えば、減少は、症状が以前に観察されたよりも少ないような、障害の症状の変化であり得る。減少は、統計的に有意な量の状態、症状、活性、組成物の任意の個々の値、中央値、又は平均の減少であり得る。したがって、減少は、その減少が統計

10

20

30

40

50

的に有意である限り、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、又は100%の減少であり得る。

【0016】

「阻害する」、「阻害すること」、及び「阻害」は、活性、応答、状態、疾患、又は他の生物学的パラメータを減少させることを意味する。これには、活性、応答、状態、又は疾患の完全な除去が含まれ得るが、これらに限定されない。これには、例えば、天然又は対照レベルと比較して、活性、応答、状態、又は疾患の10%の低減も含まれ得る。したがって、低減は、天然又は対照レベルと比較して、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、又はその間の任意の量の低減であり得る。

10

【0017】

「reduce（低減）」又はこの用語の他の形態、例えば、「reducing（低減）」若しくは「reduction（低減）」は、事象又は特徴（例えば、腫瘍成長）の低下を意味する。これは典型的には、いくつかの標準値又は期待値に関連しており、換言すれば、それは相対的であるが、標準値又は相対値を参照することが必ずしも必要ではないことが理解される。例えば、「腫瘍成長を低減する」は、標準又は対照と比較して、腫瘍の成長速度を低減することを意味する。

【0018】

「予防する」又は単語の他の形態、例えば「予防すること」又は「予防」とは、特定の事象又は特徴を停止すること、特定の事象又は特徴の発達又は進行を安定化させるか、又は遅らせること、あるいは特定の事象又は特徴が発生する可能性を最小限に抑えることを意味する。予防は、典型的には、例えば、低減よりも絶対的であるため、対照との比較を必要としない。本明細書で使用される場合、何かを低減することができるが、予防することができない場合があるが、低減される何かを予防することができる場合もある。同様に、何かを予防することができるが、低減することができない場合があるが、予防される何かを低減することができる場合もある。低減又は予防が使用される場合、特に具体的に指定しない限り、他の単語の使用も明示的に開示されることを理解されたい。

20

【0019】

「対象」という用語は、投与又は治療の標的である任意の個体を指す。対象は、脊椎動物、例えば、哺乳動物であり得る。一態様では、対象は、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、又はネコであり得る。対象はまた、モルモット、ラット、ハムスター、ウサギ、マウス、又はモグラであってもよい。したがって、対象は、ヒト又は獣医患者であり得る。「患者」という用語は、臨床医、例えば、医師の治療下にある対象を指す。

30

【0020】

「治療的に有効な」という用語は、使用される組成物の量が、疾患又は障害の1つ以上の原因又は症状を軽減するのに十分なものであることを指す。このような軽減は、低減又は改変を必要とするだけであり、排除である必要はない。

【0021】

「治療」という用語は、疾患、病的な状態、又は障害を治癒し、軽減し、安定化し、又は予防する意図を有する患者の医学的管理を指す。この用語は、能動的治療、すなわち、疾患、病的な状態、又は障害の改善に特異的に向けられた治療を含み、原因治療、すなわち、関連する疾患、病的な状態、又は障害の原因の除去に向けられた治療も含む。加えて、この用語は、緩和的治療、すなわち、疾患、病的な状態、又は障害の治癒ではなく、症状の緩和のために設計された治療、予防的治療、すなわち、関連する疾患、病的な状態、又は障害の発症を最小限に抑えるか、又は部分的若しくは完全に阻害することに向けられた治療、及び補助的治療、すなわち、関連する疾患、病的な状態、又は障害の改善に向けられた別の特定の療法を補充するために使用される治療を含む。

40

【0022】

「生体適合性」は、概して、レシピエントにとって概して無毒であり、対象に重大な副作用を引き起こさない材料及び任意の代謝産物又はその分解産物を指す。

50

## 【 0 0 2 3 】

「含むこと」は、組成物、方法などが、列挙される要素を含むが、他の要素を除外しないことを意味することが意図される。組成物及び方法を定義するために使用される場合、「～から本質的になる」は、列挙された要素を含むが、組み合わせに対する任意の本質的な重要性を有する他の要素を除外することを意味するものとする。したがって、本明細書に定義される要素から本質的になる組成物は、単離及び精製方法から微量汚染物質及び薬学的に許容される担体、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、保存剤などを除外しない。「～からなる」は、本開示で提供される及び／又は特許請求される組成物を投与するための他の成分の微量要素を超えるもの、及び実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これらの移行語の各々によって定義される実施形態は、本開示の範囲内である。

10

## 【 0 0 2 4 】

「対照」は、比較目的で実験に使用される代替の対象又は試料である。対照は、「陽性」であっても「陰性」であってもよい。

## 【 0 0 2 5 】

薬剤の「有効量」とは、所望の効果を提供するのに十分な量の薬剤を指す。「有効」である薬剤の量は、対象の年齢及び全身状態、特定の薬剤などの多くの要因に応じて、対象によって異なるであろう。したがって、定量化された「有効量」を指定することは必ずしも可能ではない。しかしながら、任意の対象の場合における適切な「有効量」は、日常の実験を使用して当業者によって決定されてもよい。また、本明細書で使用される場合、特に明記しない限り、薬剤の「有効量」とは、治療有効量及び予防有効量の両方をカバーする量も指すことができる。治療効果を達成するのに必要な薬剤の「有効量」は、対象の年齢、性別、及び体重などの要因に従って変化し得る。投与レジメンは、最適な治療応答を提供するように調整することができる。例えば、いくつかに分割した用量を毎日投与してもよく、又は治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例して減らしてもよい。

20

## 【 0 0 2 6 】

「薬学的に許容される」成分は、生物学的又は他の望ましくないものではない成分、すなわち、著しく望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、又はそれが含まれる製剤の他の成分のいずれかと有害な様式で相互作用することなく、本開示によって提供される医薬製剤に組み込んで、本明細書に記載のように対象に投与することができる成分を指し得る。ヒトへの投与に関して使用される場合、この用語は、成分が毒性試験及び製造試験の必要な基準を満たしているか、又はそれが米国食品医薬品局によって準備された不活性成分ガイドに含まれていることを一般的に意味する。

30

## 【 0 0 2 7 】

「薬学的に許容される担体」（「担体」と称されることがある）は、一般に安全かつ無毒の薬学的又は治療組成物の調製において有用な担体又は賦形剤を意味し、獣医学的及び／又はヒトの薬学的又は治療的使用が許容される担体を含む。「担体」又は「薬学的に許容される担体」という用語には、リン酸緩衝食塩水、水、エマルジョン（油／水若しくは水／油エマルジョンなど）、及び／又は様々な種類の湿潤剤が含まれ得るが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「担体」という用語は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、脂質、安定剤、又は医薬製剤で使用するために当該技術分野でよく知られた材料、及び本明細書に更に記載される材料を包含するが、これらに限定されない。

40

## 【 0 0 2 8 】

「薬理的に活性な」（又は単に「活性な」）は、「薬理的に活性な」誘導体又は類似体において、親化合物と同じ種類の薬理的活性を有し、程度がほぼ同等な誘導体又は類似体（例えば、塩、エステル、アミド、複合体、代謝産物、異性体、断片など）を指し得る。

## 【 0 0 2 9 】

50

「治療剤」は、有益な生物学的効果を有する任意の組成物を指す。有益な生物学的効果としては、治療効果、例えば、障害又は他の望ましくない生理学的状態の治療、及び予防効果、例えば、障害又は他の望ましくない生理学的状態（例えば、非免疫原性がん）の予防の両方が挙げられる。これらの用語はまた、本明細書に具体的に言及される有益な薬剤の薬学的に許容される、薬理学的に活性な誘導体を包含し、限定されないが、塩、エステル、アミド、前駆薬剤、活性代謝産物、異性体、断片、類似体などを含む。「治療剤」という用語が使用される場合、次いで、又は特定の薬剤が具体的に特定される場合、この用語は、薬剤自体、並びに薬学的に許容される、薬理学的に活性な塩、エステル、アミド、前駆薬剤、複合体、活性代謝産物、異性体、断片、類似体などを含むことを理解されたい。

10

### 【0030】

組成物（例えば、薬剤を含む組成物）の「治療有効量」又は「治療有効用量」は、所望の治療結果を達成するのに有効な量を指す。いくつかの実施形態では、所望の治療結果は、神経疾患又は障害の制御である。所与の治療剤の治療有効量は、典型的には、治療される障害又は疾患の種類及び重症度、並びに対象の年齢、性別、及び体重などの要因に関して異なるであろう。この用語はまた、疼痛緩和などの所望の治療効果を促進するのに有効な、治療剤の量、又は治療剤の送達速度（例えば、経時的な量）を指すこともできる。正確な所望の治療効果は、治療される状態、対象の耐容性、投与される薬剤及び/又は薬剤製剤（例えば、治療剤の効力、製剤中の薬剤の濃度など）、並びに当業者によって理解される様々な他の因子に従って異なるであろう。場合によっては、所望の生物学的応答又は医学的応答は、数日、数週間、又は数年にわたって、組成物を複数回投与した後に達成される。

20

### 【0031】

本出願全体を通して、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物の開示は、それらの全体が、本出願に関係する技術水準をより完全に説明するために参照により本出願に組み込まれる。開示される参考文献はまた、参考文献に依る文章で考察され、それらに含まれる材料について、個別にかつ具体的に参照により本明細書に組み込まれる。

### 【0032】

#### B. 組成物

開示される組成物を調製するために使用される成分、並びに本明細書に開示される方法内で使用される組成物自体が開示される。これら及び他の材料が本明細書に開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、基などが開示されるとき、これらの化合物の各々個々の及び集合的な組み合わせ及び入れ替えの具体的な参照が明示的に開示されない場合があるが、各々が本明細書に具体的に企図及び説明されることが理解される。例えば、特定の操作されたアデノ随伴ウイルスベクターが開示され、考察され、操作されたアデノ随伴ウイルスベクターを含むいくつかの分子に対して行うことができるいくつかの修飾が考察される場合、具体的には、操作されたアデノ随伴ウイルスベクターの各々及び全ての組み合わせ及び入れ替え、並びに特に反対に指示されない限り可能である修飾が企図される。したがって、分子A、B、及びCのクラスだけでなく、分子D、E、及びFのクラス、並びに組み合わせ分子の一例として、A-Dが開示される場合、各々が個別に列挙されていない場合でも、各々が個別にかつ集合的に企図され、すなわち、A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E、及びC-Fが開示されているとみなされる。同様に、これらの任意のサブセット又は組み合わせも開示される。よって、例えば、A-E、B-F、及びC-Eのサブグループは、開示されるとみなされるであろう。この概念は、開示される組成物を作製及び使用する方法におけるステップを含むが、これらに限定されない、本出願の全ての態様に適用される。よって、実施され得る様々な追加ステップが存在する場合、これらの追加ステップの各々が、開示される方法の任意の特定の実施形態又は実施形態の組み合わせで実施され得ることが理解される。

30

40

### 【0033】

ウイルス遺伝子送達の効率を改善することは、様々な臨床試験の成功を高めるためにま

50

すまず重要になってきている。霊長類の脳から単離された異なる r A A V 血清型の構造ドメインを組み合わせて、新規のハイブリッド組換え A A V 血清型、r A A V 2 / r e c 2 を作成した。しかしながら、R e c 2 血清型は、網膜形質導入に関して、天然に存在する A A V 2 キャプシドと同然であったことが見出された。R e c 2 キャプシド血清型は、天然に存在する A A V 血清型よりもはるかに優れた効率で脂肪組織を形質導入する。R e c 2 キャプシドの1つの懸念は、脂肪組織の選択的遺伝子移入の必要性を阻害する肝臓形質導入のためのその高い効率である。改善された脂肪指向性を有する新しい血清型を生成し、肝臓形質導入を排除するために、A A V 8、R e c 2、R e c 3、及び A A V 2 の間のキャプシドのアミノ酸配列を分析することによって、R e c 2 のキャプシドにおいていくつかの点変異を作製した。

10

## 【0034】

一態様では、本明細書に開示されるのは、ヘパリン結合遺伝子座での1つ以上の置換、挿入、及び/又は欠失(例えば、配列番号1に示されるR e c 2 キャプシドタンパク質の残基561と591との間の残基に対応する残基での置換、欠失、又は及び/又は挿入)を含む組換え2(R e c 2)キャプシドを含む操作されたアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターであり、当該置換は、神経組織に対する指向性をベクターに付与する。一態様では、1つ以上の置換は、配列番号1の残基585、587、588、589、及び/又は594に対応する残基(例えば、Q588P、Q589L、Q589I、Q589V、Q589G、Q594L、Q594I、及び/又はQ594Vなどの置換など)で生じる。一態様では、本明細書に開示されるのは、配列番号1に対してかつ配列番号6に示されるように、Q588P、Q589L、及びQ594L置換を含む組換え2(R e c 2)キャプシドを含む、操作されたアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターである。

20

## 【0035】

また、本明細書に開示されるのは、調節要素(例えば、ウッドチャック転写後調節要素(W P R E)配列など)、及びプロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子を含む第1の発現カセットを更に含む、操作されたA A Vベクターである。一態様では、A A Vベクターはまた、第2のカセットを含むことができ、第2のカセットは、第1の発現カセット内の調節要素を標的にするR N Aサイレンシング要素に作動可能に連結された組織特異的プロモーターを含む。

30

## 【0036】

## 1. 相同性/同一性

本明細書に開示される遺伝子及びタンパク質の任意の既知のバリエーション及び誘導体又は現れ得るものを定義する1つの方式は、特定の既知の配列に対する相同性の観点からバリエーション及び誘導体を定義することによるものであることを理解されたい。具体的には、述べられた配列に対する少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99パーセントの相同性を有する、本明細書に開示されるこれら及び他の遺伝子及びタンパク質のバリエーションが開示される。当業者であれば、2つのタンパク質又は核酸、例えば、遺伝子の相同性を決定する方法を、容易に理解する。例えば、相同性は、相同性が最も高いレベルにあるように、2つの配列を

40

## 【0037】

相同性を計算する別の方式は、公開されたアルゴリズムによって実施することができる。比較のための配列の最適なアライメントは、Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)のローカル相同性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アライメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444 (1988)の類似検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装(G A P、B E S T F I T、F A S T A、及びT F A S T A, W i s c o n s i n G e n

50

etics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)、又は検査によって実施され得る。

【0038】

例えば、Zuker, M. Science 244:48-52, 1989, Jaeger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al. Methods Enzymol. 183:281-306, 1989に開示されているアルゴリズムによって、核酸について同じ種類の相同性を得ることができ、これらは、核酸アラインメントに関連する少なくとも材料について参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0039】

2. 細胞への組成物の送達

インビトロ又はインビボのいずれかで、核酸を細胞に送達するために使用され得るいくつかの組成物及び方法が存在する。これらの方法及び組成物は、ウイルスベースの送達系及び非ウイルスベースの送達系の2つのクラスに大別することができる。例えば、核酸は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、プラスミド、ウイルスベクター、ウイルス核酸、ファージ核酸、ファージ、コスミドなどのいくつかの直接送達系を通じてか、又はカチオン性リポソームなどの細胞又は担体中の遺伝物質の移動を介して送達され得る。ウイルスベクター、化学トランスフェクタント、又はエレクトロポレーション及びDNAの直接拡散などの物理的機械的方法を含む、トランスフェクションのための適切な手段は、例えば、Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1468, (1990)、及びWolff, J. A. Nature, 352, 815-818, (1991)に記載されている。かかる方法は、当該技術分野で周知であり、本明細書に記載の組成物及び方法と共に使用するために容易に適合可能である。特定の場合では、本方法は、大分子DNAで特異的に機能するように改変されるであろう。更に、これらの方法を使用して、担体の標的化特性を使用することによって、特定の疾患及び細胞集団を標的化することができる。

20

【0040】

a) 核酸ベースの送達系

転移ベクターは、遺伝子を細胞(例えば、プラスミド)に送達するために使用されるか、又は遺伝子を送達するための一般的な戦略の一部として、例えば、組換えレトロウイルス若しくはアデノウイルスの一部として使用される任意のヌクレオチド構築物であり得る(Ram et al. Cancer Res. 53:83-88, (1993))。

30

【0041】

本明細書で使用される場合、ウイルスベクターは、導入遺伝子を分解なしで細胞(例えば、脳細胞など)に輸送する薬剤であり、それが送達される細胞内で遺伝子の発現をもたらすプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される操作されたウイルスベクターは、アデノ随伴ベクター(AAV)に由来する。

【0042】

(1) アデノ随伴ウイルスベクター

別の種類のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)に基づく。この欠陥のあるパルボウイルスは、多くの細胞型に感染することができ、ヒトに対して非病原性であるため、好ましいベクターである。AAV型ベクターは、約4~5kbのDNAを輸送することができ、野生型AAVは、染色体19(例えば、AAV統合部位1(AAVS1)などで)に安定して挿入することが知られている。一態様では、開示されるAAVベクターは、例えば、緑色蛍光タンパク質、GFPをコードする遺伝子などの選択マーカを含むことができる。

40

【0043】

一態様では、AAVは、異種遺伝子に作用可能に連結された細胞特異的発現を指示するプロモーターを含有する少なくとも1つのカセットに隣接する一対の逆位末端反復(IT

50

R)を含有する。この文脈において異種とは、AAV又はB19パルボウイルスに対して天然ではない任意のヌクレオチド配列又は遺伝子を指す。

【0044】

典型的には、AAV及びB19コード領域が欠失しており、安全な非細胞傷害性ベクターをもたらす。AAV ITR (典型的にはAAV2由来)、又はその修飾は、細胞毒性ではなく、感染性及び部位特異的統合を付与し、プロモーターは、細胞特異的発現を指示する。米国特許第6,261,834号は、AAVベクターに関連する材料について、参照により本明細書に組み込まれる。

【0045】

したがって、開示されるベクターは、染色体外として核内に持続し、ヒトゲノムに統合しないように設計されている。統合せずに持続するこの能力は、これらのベクターの安全性を高める。

【0046】

ウイルス及びレトロウイルスにおける挿入遺伝子は、通常、所望の遺伝子産物の発現を制御するのに役立つプロモーター、及び/又はエンハンサーを含有する。プロモーターは、一般に、転写開始部位に関して相対的に固定された位置にあるときに機能するDNAの配列である。プロモーターは、RNAポリメラーゼ及び転写因子の基本的な相互作用に必要なコア要素を含有し、上流要素及び応答要素を含有し得る。

【0047】

b) インビボ/エクスピボ

上述のように、組成物は、薬学的に許容される担体内で投与することができ、当該技術分野で既知の様々な機構(例えば、裸のDNAの取り込み、リポソーム融合、遺伝子銃を介したDNAの筋肉内注射、エンドサイトーシスなど)によって、インビボ及び/又はエクスピボで対象の細胞に送達され得る。

【0048】

エクスピボ法を使用する場合、細胞又は組織を除去し、当該技術分野で周知の標準的なプロトコルに従って体外に維持することができる。組成物は、例えば、リン酸カルシウム媒介遺伝子送達、エレクトロポレーション、マイクロ注入、又はプロテオリポソームなどの任意の遺伝子移入機構を介して細胞に導入され得る。形質導入細胞は、次いで、細胞又は組織型についての標準的な方法によって、対象に注入される(例えば、薬学的に許容される担体内で)か、又は同所的に移植されて戻され得る。標準的な方法は、対象への様々な細胞の移植又は注入に関して知られている。

【0049】

3. 発現系

細胞に送達される核酸は、典型的には、発現制御系を含有する。例えば、ウイルス及びレトロウイルス系における挿入遺伝子は、通常、所望の遺伝子産物の発現を制御するのに役立つプロモーター、及び/又はエンハンサーを含有する。プロモーターは、一般に、転写開始部位に関して相対的に固定された位置にあるときに機能するDNAの配列である。プロモーターは、RNAポリメラーゼ及び転写因子の基本的な相互作用に必要なコア要素を含有し、上流要素及び応答要素を含有し得る。

【0050】

a) ウイルスプロモーター及びエンハンサー

哺乳類宿主細胞内のベクターからの転写を制御する好ましいプロモーターは、様々な供給源、例えば、ポリオーマ、サルウイルス40(SV40)、アデノウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、最も好ましくはサイトメガロウイルスなどのウイルスのゲノムから、又は異種哺乳類プロモーター、例えばベータアクチンプロモーターから得ることができる。SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含有するSV40制限断片として好都合に得られる(Fiers et al., Nature, 273:113(1978))。ヒトサイトメガロウイルスの即時初期プロモーターは、HindIII-E制限断片として好都合に得られる(Greenway, P

10

20

30

40

50

. J . e t a l . , G e n e 1 8 : 3 5 5 - 3 6 0 ( 1 9 8 2 ) ) 。 も ち ろ ん 、 宿 主 細胞又は関連種由来のプロモーターも、本明細書で有用である。

【 0 0 5 1 】

エンハンサーは、一般に、転写開始部位から固定距離なしで機能し、5' (Laimins, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 993 (1981)) 又は3' (Lusky, M. L., et al., Mol. Cell Bio. 3: 1108 (1983)) のいずれかであり得るDNAの配列を指す。更に、エンハンサーは、イントロン内に存在し得 (Banerji, J. L. et al., Cell 33: 729 (1983))、並びにコード配列自体内 (Osborne, T. F., et al., Mol. Cell Bio. 4: 1293 (1984)) に存在することができる。これらは、通常、10~300bpの長さで、シスで機能する。エンハンサーは、近くのプロモーターからの転写を増加させるように機能する。エンハンサーはまた、しばしば、転写の調節を媒介する応答要素を含有する。プロモーターは、転写の調節を媒介する応答要素も含有し得る。エンハンサーは、しばしば、遺伝子の発現の調節を決定する。多くのエンハンサー配列は、現在、哺乳類遺伝子 (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、フェトプロテイン、及びインスリン) から知られているが、典型的には、遺伝子発現については、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを一般発現に使用するであろう。好ましい例は、複製起点の後期側のSV40エンハンサー (bp100~270)、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーである。

10

20

【 0 0 5 2 】

プロモーター及び/又はエンハンサーは、それらの機能を引き起こす光又は特定の化学的事象のいずれかによって特異的に活性化され得る。系は、テトラサイクリン及びデキサメタゾンなどの試薬によって、調節することができる。また、ガンマ線照射などの照射への曝露、又はアルキル化の化学療法薬によって、ウイルスベクターの遺伝子発現を増強する方式も存在する。

【 0 0 5 3 】

特定の実施形態では、プロモーター及び/又はエンハンサー領域は、転写される転写単位の領域の発現を最大化するための構成的プロモーター及び/又はエンハンサーとして作用することができる。特定の構築物では、プロモーター及び/又はエンハンサー領域は、特定の時間に特定の種類の細胞でのみ発現する場合であっても、全ての真核生物の細胞型において活性である。この種類の好ましいプロモーターは、CMVプロモーター (650塩基) である。他の好ましいプロモーターは、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス (全長プロモーター)、及びレトロウイルスベクターのLTRである。

30

【 0 0 5 4 】

全ての特定の調節要素は、クローニングされ、黒色腫細胞などの特定の細胞型において選択的に発現される発現ベクターを構築するために使用され得ることが示されてきた。グリコシル化タンパク質 (GFAP) プロモーターは、グリコシル化細胞で、遺伝子を選択的に発現するために使用されてきた。

【 0 0 5 5 】

また、真核生物宿主細胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は有核細胞) で使用される発現ベクターは、mRNAの発現に影響を及ぼし得る転写の終結に必要な配列を含有してもよい。これらの領域は、組織因子タンパク質をコードするmRNAの非翻訳部分において、ポリアデニル化セグメントとして転写される。3'非翻訳領域には、転写終結部位も含まれる。転写単位は、ポリアデニル化領域も含有することが好ましい。この領域の利点の1つは、転写単位が、mRNAのようにプロセッシング及び輸送される可能性を増加させることである。発現構築物におけるポリアデニル化シグナルの同定及び使用は、十分に確立されている。相同的なポリアデニル化シグナルが、導入遺伝子構築物に使用されることが好ましい。特定の転写単位において、ポリアデニル化領域は、SV40初期ポリアデニル化シグナルに由来し、約400塩基からなる。また、転写単位は、単独で、又

40

50

は上記配列と組み合わせて、構築物からの発現又は安定性を改善する、他の標準的な配列を含有することも好ましい。

【0056】

b) マーカー

ウイルスベクターは、マーカー産物をコードする核酸配列を含むことができる。このマーカー産物を使用して、遺伝子が細胞に送達され、送達されると発現されているかどうかを決定する。好ましいマーカー遺伝子は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードする E. Coli lacZ 遺伝子、及び緑色蛍光タンパク質である。

【0057】

いくつかの実施形態では、マーカーは、選択可能なマーカーであってもよい。哺乳動物細胞に好適な選択可能なマーカーの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)、チミジンキナーゼ、ネオマイシン、ネオマイシン類似体 G418、ヒドロマイシン、及びピュロマイシンである。このような選択可能なマーカーが哺乳動物宿主細胞に成功裏に移行されると、形質転換された哺乳動物宿主細胞は、選択圧下に置かれた場合、生存することができる。選択的レジームには、広く使用される2つの異なるカテゴリが存在する。第1のカテゴリは、細胞の代謝、及び補充培地から独立して成長する能力を欠く変異細胞株の使用、に基づく。2つの例としては、CHO DHFR-細胞及びマウス LTK-細胞がある。これらの細胞は、チミジン又はヒポキサンチンなどの栄養素を添加せずに成長する能力を欠いている。これらの細胞は、完全なヌクレオチド合成経路に必要な特定の遺伝子を欠いているため、欠損したヌクレオチドが補充培地に提供されない限り、生存することはできない。培地を補充する代替手段は、それぞれの遺伝子を欠く細胞に、無傷の DHFR 又は TK 遺伝子を導入することで、それらの成長要件を変化させることである。DHFR 又は TK 遺伝子で形質転換されなかった個々の細胞は、補充されていない培地で生存することができないであろう。

【0058】

第2のカテゴリは、任意の細胞型で使用される選択スキームを指し、変異細胞株の使用を必要としない優性選択である。これらのスキームは、典型的には、宿主細胞の成長を停止するために薬物を使用する。新規遺伝子を有するそれらの細胞は、薬剤耐性を伝達するタンパク質を発現し、選択で生き残るであろう。かかるドミナント選択の例は、薬物、ネオマイシン (Southern P. and Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1: 327 (1982))、ミコフェノール酸、(Mulligan, R. C. and Berg, P. Science 209: 1422 (1980))、又はヒグロマイシン (Sugden, B. et al., Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985)) を使用する。3つの実施例は、真核細胞の制御下の細菌遺伝子を用いて、それぞれ適切な薬物 G418 又はネオマイシン (ジェネティシン)、xgpt (ミコフェノール酸) 又はハイグロマイシン、への耐性を伝達する。他には、ネオマイシン類似体 G418 及びピュロマイシンが含まれる。

【0059】

4. Peptides

a) タンパク質バリエーション

本明細書で考察されるように、既知であり、本明細書で企図される AA V キャプシドタンパク質 (VP1、VP2、及びVP3) の多数のバリエーションが存在する。既知の機能性株バリエーションに加えて、開示される方法及び組成物においても機能する AA V キャプシドタンパク質の誘導体が存在する。タンパク質バリエーション及び誘導体は、当業者に十分に理解されており、いくつかの例では、アミノ酸配列修飾を伴い得る。例えば、アミノ酸配列修飾は、典型的に、置換バリエーション、挿入バリエーション、又は欠失バリエーションの3つのクラスのうちの1つ以上に分類される。挿入には、アミノ末端及び/又はカルボキシル末端の融合、並びに単一若しくは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。挿入は、通常、例えば、1~4個の残基程度で、アミノ末端又はカルボキシル末端の融合の挿入よりは小さいであろう。実施例に記載されるものなどの免疫原性融合タンパク質の誘導体は、イン

10

20

30

40

50

ビトロで架橋することによって、又はその融合体をコードするDNAで形質転換された組換え細胞培養物によって、標的配列に免疫原性を付与するのに十分な大きさのポリペプチドを融合することによって作製される。欠失は、タンパク質の配列から、1個以上のアミノ酸残基を除去することを特徴とする。典型的には、約2～6個以下の残基が、タンパク質分子内の任意の1つの部位で欠失される。これらのバリエーションは、通常、タンパク質をコードするDNA内のヌクレオチドの部位特異的変異誘発によって調製され、それによって、バリエーションをコードするDNAを産生し、その後、組換え細胞培養物中でDNAを発現する。既知の配列を有するDNA中の所定の部位で置換変異を作製するための技術、例えば、M13プライマー変異誘発及びPCR変異誘発がよく知られている。アミノ酸置換は、典型的には、単一残基のものであるが、一度にいくつかの異なる場所で生じ得、挿入は、通常、約1～10個のアミノ酸残基程度であり、欠失は約1～30個の残基の範囲である。欠失又は挿入は、好ましくは、隣接する対、すなわち、2個の残基の欠失又は2個の残基の挿入で行われる。置換、欠失、挿入、又はそれらの任意の組み合わせ、を組み合わせ、最終構築物に到達することができる。変異は、配列をリーディングフレームから外れさせてはならず、好ましくは、二次mRNA構造を産生し得る相補的領域を生成しない。置換バリエーションは、少なくとも1個の残基が除去され、その位置に、異なる残基が挿入されているバリエーションである。このような置換は、概して、以下の表1及び2に従って行われ、保存的置換と称される。

10

## 【表1】

表1:アミノ酸の略語

アミノ酸	略語	
アラニン	Ala	A
アロソロイシン	Ala	
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソレルシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
ピログルタミン酸	pGlu	
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
チロシン	Tyr	Y
トリプトファン	Trp	W
バリン	Val	V

20

30

40

50

## 【表 2】

表2:アミノ酸置換

元の残基の例示的な保存的置換、他は当該技術分野で既知である。

Ala	Ser	
Arg	Lys; Gln	
Asn	Gln; His	
Asp	Glu	
Cys	Ser	
Gln	Asn、Lys	10
Glu	Asp	
Gly	Pro	
His	Asn; Gln	
Ile	Leu; Val	
Leu	Ile; Val	
Lys	Arg; Gln	
Met	Leu; Ile	
Phe	Met; Leu; Tyr	
Ser	Thr	20
Thr	Ser	
Trp	Tyr	
Tyr	Trp; Phe	
Val	Ile; Leu	

## 【0060】

機能又は免疫学的同一性の実質的な変化は、表2のものよりも保存性が低い置換を選択することによって、すなわち、(a)例えば、シート若しくはヘリックスの立体構造としての置換エリアにおけるポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子の電荷若しくは疎水性、又は(c)側鎖のかさ、を維持することに対するそれらの効果が著しく異なる残基、を選択することによって行われる。タンパク質特性に最も大きな変化をもたらすと一般に予想される置換は、(a)親水性残基、例えば、セリル又はスレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル、若しくはアラニルに(又はそれによって)置換される、(b)システイン若しくはプロリンが、任意の他の残基に(又はそれによって)置換される、(c)電気陽性側鎖を有する残基、例えば、リジル、アルギニル、若しくはヒスチジルが、電気陰性残基、例えば、グルタミン若しくはアスパルに(又はそれによって)置換される、又は(d)かさばる側鎖を有する残基、例えば、フェニルアニンが、側鎖を有さない残基、例えば、この場合にはグリシン、(e)スルフィル化及び/若しくはグリコシル化のための部位の数を増加させることによるものであるであろう。 30 40

## 【0061】

例えば、あるアミノ酸残基を、生物学的及び/又は化学的に類似する別のアミノ酸残基に置き換えることは、保存的置換として当業者には既知である。例えば、保存的置換は、ある疎水性残基を別の疎水性残基に置き換えること、又はある極性残基を別の極性残基に置き換えることである。置換は、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Leu、Asp、Glu、Asn、Gln、Ser、Thr、Lys、Arg、及びPhe、Tyrなどの組み合わせを含む。このような、各明示的に開示された配列の保存的に置換されたバリエーションは、本明細書に提供されるモザイクポリペプチドに含まれる。

## 【0062】

置換又は欠失変異誘発を用いて、N - グリコシル化 ( A s n - X - T h r / S e r ) 又はO - グリコシル化 ( S e r 又は T h r ) のための部位を挿入することができる。システイン又は他の不安定な残基の欠失も望ましい場合がある。潜在的なタンパク質分解部位、例えば、A r g の欠失又は置換は、例えば、塩基性残基のうちの1つを欠失させるか、又はグルタミル若しくはヒスチジル残基によって1つを置換することによって達成される。

【 0 0 6 3 】

特定の翻訳後の誘導体化は、発現したポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミル及びアスパラギン残基は、翻訳後、対応するグルタミル及びアスパリル残基にしばしば脱アミド化される。代替的に、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。他の翻訳後修飾としては、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のo - アミノ基のメチル化 ( T . E . C r e i g h t o n , P r o t e i n s : S t r u c t u r e a n d M o l e c u l a r P r o p e r t i e s , W . H . F r e e m a n & C o . , S a n F r a n c i s c o p p 7 9 - 8 6 [ 1 9 8 3 ] ) 、 N 末端アミンのアセチル化、並びにいくつかの事例では、C 末端カルボキシルのアミド化が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

本明細書に開示されるタンパク質のバリエーション及び誘導体を定義する1つの方式は、特定の既知の配列に対する相同性/同一性の観点からバリエーション及び誘導体を定義することによるものであることを理解されたい。述べられた配列に対する少なくとも70%又は75%又は80%又は85%又は90%又は95%の相同性を有する、本明細書に開示されるこれら及び他のタンパク質のバリエーションが具体的に開示される。当業者であれば、2つのタンパク質の相同性を決定する方法を、容易に理解することができる。例えば、相同性は、相同性が最も高いレベルにあるように、2つの配列を整列した後に計算することができる。

【 0 0 6 5 】

相同性を計算する別の方式は、公開されたアルゴリズムによって実施することができる。比較のための配列の最適なアライメントは、S m i t h a n d W a t e r m a n A d v . A p p l . M a t h . 2 : 4 8 2 ( 1 9 8 1 ) のローカル相同性アルゴリズムによって、N e e d l e m a n a n d W u n s c h , J . M o l B i o l . 4 8 : 4 4 3 ( 1 9 7 0 ) の相同性アライメントアルゴリズムによって、P e a r s o n a n d L i p m a n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 5 : 2 4 4 4 ( 1 9 8 8 ) の類似検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装 ( G A P , B E S T F I T , F A S T A , 及び T F A S T A , W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , 5 7 5 S c i e n c e D r . , M a d i s o n , W I ) 、 又は検査によって実施され得る。

【 0 0 6 6 】

例えば、Z u k e r , M . S c i e n c e 2 4 4 : 4 8 - 5 2 , 1 9 8 9 , J a e g e r e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 7 7 0 6 - 7 7 1 0 , 1 9 8 9 , J a e g e r e t a l . M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 3 : 2 8 1 - 3 0 6 , 1 9 8 9 に開示されたアルゴリズムによって、核酸について同じ種類の相同性を得ることができる。

【 0 0 6 7 】

保存的変異及び相同性の説明は、例えば、バリエーションが保存的変異である特定の配列に対して少なくとも70%の相同性を有する実施形態のように、任意の組み合わせと一緒に組み合わせることができることが理解される。

【 0 0 6 8 】

本明細書は、様々なタンパク質及びタンパク質配列を考察するため、それらのタンパク

10

20

30

40

50

質配列をコードすることができる核酸もまた開示されることが理解される。これには、特定のタンパク質配列に関連する全ての縮重配列、すなわち、1つの特定のタンパク質配列をコードする配列を有する全ての核酸、並びにタンパク質配列の開示されたバリエーション及び誘導体をコードする縮重核酸を含む全ての核酸、が含まれるであろう。したがって、各特定の核酸配列が本明細書に記載されていない場合があるが、各配列及び全ての配列が、開示されたタンパク質配列を介して、実際に本明細書に開示及び記載されていることを理解される。アミノ酸配列は、どの特定のDNA配列が生物内のそのタンパク質をコードするかは示さないが、開示されたタンパク質の特定のバリエーションが本明細書に開示される場合、そのタンパク質が現れる、そのタンパク質をコードする既知の核酸配列も既知であり、本明細書に開示され、説明されることも理解される。

10

## 【0069】

開示された組成物に組み込まれ得る多数のアミノ酸及びペプチド類似体が存在することが理解される。例えば、表1及び表2に示されるアミノ酸とは異なる機能的置換基を有する多数のDアミノ酸又はアミノ酸が存在する。天然に存在するペプチドの反対の立体異性体、並びにペプチド類似体の立体異性体が開示される。これらのアミノ酸は、tRNA分子に、選択されるアミノ酸を充填し、例えば、琥珀色のコドンを利用して、アナログアミノ酸を部位特異的な方式でペプチド鎖に挿入する遺伝子構築物を操作することによって、ポリペプチド鎖に容易に組み込むことができる。

## 【0070】

ペプチドに似ているが、天然のペプチド結合を介して結合されていない分子を生成することができる。例えば、アミノ酸又はアミノ酸類似体のための結合は、 $\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $- \text{CH}_2\text{S}-$ 、 $- \text{CH}_2- \text{CH}_2-$ 、 $- \text{CH}=\text{CH}-$  (シス及びトランス)、 $- \text{COCH}_2-$ 、 $- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、及び $- \text{CHH}_2\text{SO}-$ を含むことができる (これら及び他は、*Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983) の Spatola, A. F. に、Spatola, A. F., Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (general review)、Morley, Trends Pharm Sci (1980) pp. 463-468、Hudson, D. et al., Int J Pept Prot Res 14: 177-185 (1979) ( $- \text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2-$ )、Spatola et al. Life Sci 38: 1243-1249 (1986) ( $- \text{CHH}_2- \text{S}$ )、Hann J. Chem. Soc Perkin Trans. I 307-314 (1982) ( $- \text{CH}- \text{CH}-$ 、シス及びトランス)、Almqvist et al. J. Med. Chem. 23: 1392-1398 (1980) ( $- \text{COCH}_2-$ )、Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23: 2533 (1982) ( $- \text{COCH}_2-$ )、Szelke et al. European Appln, EP 45665 CA (1982)、97: 39405 (1982) ( $- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ )、Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24: 4401-4404 (1983) ( $- \text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$ )、及びHruby Life Sci 31: 189-199 (1982) ( $- \text{CH}_2- \text{S}-$ )に見ることができ、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。特に好ましい非ペプチド結合は、 $- \text{CH}_2\text{NH}-$ である。ペプチド類似体は、b-アラニン、g-アミノ酪酸などの結合原子間に2つ以上の原子を有し得ることが理解される。

20

30

40

## 【0071】

アミノ酸類似体及び類似体並びにペプチド類似体は、しばしば、より経済的な産生、より大きな化学的安定性、より強化された薬理学的特性 (半減期、吸収、効力、有効性など)、特異性の変化 (例えば、広域の生物学的活性)、抗原性の低減などを有する。

50

## 【 0 0 7 2 】

D - アミノ酸は、ペプチダーゼなどによって認識されないため、D - アミノ酸は、より安定なペプチドを生成するために使用され得る。コンセンサス配列の1つ以上のアミノ酸を同じ種類のD - アミノ酸（例えば、L - リジンの代わりにD - リジン）で系統的に置換することを使用して、より安定なペプチドを生成することができる。システイン残基は、2つ以上のペプチドと一緒に環化する又は結合するために使用され得る。これは、ペプチドを、特定の立体構造に拘束するのに有益であり得る。

## 【 0 0 7 3 】

## 5 . 薬学的担体 / 医薬品の配送

上記のように、組成物はまた、薬学的に許容される担体内で、インピボで投与され得る。「薬学的に許容される」は、いかなる望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、又はそれと接触する医薬組成物の他の成分のいずれとも有害な様式で相互作用することなく、生物学的に又は別途望ましくないものではない材料、すなわち、核酸又はベクターと共に、対象に投与され得る材料、を意味する。担体は、当業者には周知の通り、活性成分のあらゆる分解を最小限に抑え、対象におけるあらゆる有害な副作用を最小限に抑えるように、必然的に選択され得る。

## 【 0 0 7 4 】

組成物（すなわち、本明細書に開示される操作されたAAVベクター）は、経口的、非経口的（例えば、静脈内）、筋肉内注射により、腹腔内注射により、経皮的、脳脊髄液注射により、体外的、局所的に投与されてもよく、局所鼻腔内投与、又は吸入剤による投与が含まれる。本明細書で使用される場合、「局所鼻腔内投与」は、鼻孔の一方又は両方を介して組成物を鼻及び鼻道に送達することを意味し、噴霧機構若しくは液滴機構による、又は核酸若しくはベクターのエアロゾル化による送達を含むことができる。吸入剤による組成物の投与は、噴霧又は液滴機構による送達を介して鼻又は口を通して行うことができる。送達は、挿管を介して呼吸器系の任意の領域（例えば、肺）に直接送達することもできる。必要とされる組成物の正確な量は、対象の種、年齢、体重、及び全身状態、治療されるアレルギー障害の重症度、使用される特定の核酸又はベクター、その投与様式などに応じて、対象によって異なることになる。したがって、全ての組成物に対して正確な量を指定することは不可能である。しかしながら、適切な量は、本明細書の教示を与える日常的な実験のみを使用して、当業者によって決定され得る。

## 【 0 0 7 5 】

組成物の非経口投与は、使用される場合、概して、注射を特徴とする。注射剤は、液体溶液又は懸濁液、注射前の液体中の懸濁液の溶液に好適な固体形態、あるいはエマルジョンのいずれかとして、従来形態で調製され得る。最近改訂された非経口投与のアプローチには、一定の投薬量が維持されるような徐放又は持続放出の使用を伴う。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第3,610,795号を参照されたい。

## 【 0 0 7 6 】

材料は、溶液、懸濁液（例えば、微小粒子、リポソーム、又は細胞に組み込まれる）中であってもよい。これらは、抗体、受容体、又は受容体リガンドを介して、特定の細胞型を標的にし得る。以下の参考文献は、特定のタンパク質を腫瘍組織に標的化するための本技術の使用例である（Senter, et al., Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991)、Bagshawe, K. D., Br. J. Cancer, 60:275-281, (1989)、Bagshawe, et al., Br. J. Cancer, 58:700-703, (1988)、Senter, et al., Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993)、Battelli, et al., Cancer Immunol. Immunother., 35:421-425, (1992)、Pietersz and McKenzie, Immunology Reviews, 129:57-80, (1992)、及びRoffler, et al., Biochem. Pharmacol., 42:2062-2065, (1991)。「ステルス」及び他の抗体共役リポソーム（結腸がんを標的とする

脂質媒介性薬物を含む)などのビヒクル、細胞特異的リガンドを介したDNAの受容体媒介性標的化、リンパ球指向性腫瘍標的化、及びインビボでのマウス神経膠腫細胞の高度に特異的な治療的レトロウイルス標的化。以下の参考文献は、特定のタンパク質を腫瘍組織に標的化するための本技術の使用例である (Hughes et al., *Cancer Research*, 49: 6214 - 6220, (1989)、及びLitzinger and Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104: 179 - 187, (1992))。概して、受容体は、構成的又はリガンド誘導のいずれかのエンドサイトーシスの経路に關与する。これらの受容体は、クラスリン被覆ピット内でクラスター化し、クラスリン被覆小胞を介して細胞内に入り、受容体が選別される酸性化エンドソームを通過し、次いで細胞表面にリサイクルされるか、細胞内に貯蔵されるか、又はリソソーム中で分解されるかのいずれかである。内部移行経路は、栄養素の取り込み、活性化タンパク質の除去、巨大分子のクリアランス、ウイルス及び毒素の日和見進入、リガンドの解離及び分解、並びに受容体レベルの調節などの様々な機能を果たす。多くの受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンドの種類、リガンド価、及びリガンド濃度に応じて、2つ以上の細胞内経路に従う。受容体媒介性エンドサイトーシスの分子及び細胞機構がレビューされている (Brown and Greene, *DNA and Cell Biology* 10: 6, 399 - 409 (1991))。

10

【0077】

a) 薬学的に許容される担体

抗体を含む本組成物は、薬学的に許容される担体と組み合わせて治療に使用することができる。

20

【0078】

好適な担体及びそれらの配合物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995に記載されている。典型的には、製剤を等張性にするために、製剤に適切な量の薬学的に許容される塩が使用される。薬学的に許容される担体の例としては、生理食塩水、リンゲル液、及びデキストロス溶液が挙げられるが、これらに限定されない。溶液のpHは、好ましくは、約5~約8であり、より好ましくは、約7~約7.5である。更なる担体としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスなどの徐放性調製物が挙げられ、このマトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、リポソーム、又は微粒子の形態である。ある特定の担体が、例えば、投与経路及び投与される組成物の濃度に応じて、より好ましくてもよいことは、当業者には明らかであろう。

30

【0079】

薬学的担体は当業者に既知である。これらは、最も典型的には、生理的pHの滅菌水、生理食塩水、及び緩衝液などの溶液を含む、ヒトへの薬物投与のための標準的な担体である。これらの組成物は、筋肉内又は皮下に投与することができる。他の化合物は、当業者が使用する標準的な手順に従って投与されることになる。

【0080】

医薬組成物は、選択される分子に加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤、表面活性剤などを含んでもよい。医薬組成物はまた、抗微生物剤、抗炎症剤、麻酔剤などのような1つ以上の活性成分を含んでもよい。

40

【0081】

本医薬組成物は、局所治療又は全身治療が所望されるかどうか、及び治療される領域に応じて、ある数の方式で投与され得る。投与は、局所的(眼科的、膣的、直腸的、鼻腔内を含む)、経口的、吸入による、又は例えば、静脈内点滴、脳脊髄液注射、皮下注射、腹腔内注射、若しくは筋肉内注射による非経口的であってもよい。開示される操作されたウイルスベクターは、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、又は経皮的に投与され得る。

【0082】

非経口投与のための調製物には、滅菌水溶液又は非水溶液、懸濁液、及びエマルジョン

50

が含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、生理食塩水及び緩衝媒体を含む、水、アルコール性/水性溶液、エマルジョン、又は懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、又は固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流体及び栄養補充剤、電解質補充剤（リンゲルデキストロースに基づくものなど）などが含まれる。保存剤及び他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガスなども存在し得る。

#### 【0083】

局所投与用の製剤には、軟膏、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、点滴剤、座薬、噴霧剤、液剤、及び粉剤が含まれてもよい。従来薬学的担体、水性、粉末、又は油性の基剤、増粘剤などが必要であるか又は望ましくてもよい。

#### 【0084】

経口投与のための組成物には、粉剤又は顆粒剤、水又は非水媒体中の懸濁液又は溶液、カプセル剤、サシェ剤、又は錠剤が含まれる。増粘剤、香料、希釈剤、乳化剤、分散助剤、又は結合剤が望ましくあり得る。

#### 【0085】

本組成物のうちのいくつかは、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、及びリン酸などの無機酸、並びにギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、及びフマル酸などの有機酸との反応によって、又は水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムなどの無機塩基、並びにモノ、ジ、トリアルキル、及びアリールアミン、及び置換エタノールアミンなどの有機塩基との反応によって形成される薬学的に許容される酸又は塩基付加塩として潜在的に投与され得る。

#### 【0086】

##### b) 治療的使用

本組成物を投与するための有効な投薬量及びスケジュールは、経験的に決定され得るため、そのような決定を行うことは、当業者の技術の範囲内である。組成物の投与のための投与量範囲は、障害の症状が影響を受ける所望の効果をもたらすのに十分な大きさのものである。投薬量は、有害な副作用、例えば、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応などを引き起こすほどに大きいものであってはならない。概して、投薬量は、患者の年齢、状態、性別、及び疾患の程度、投与経路、又は他の薬物がレジメンに含まれるかどうかによって変動することになり、当業者により決定され得る。投薬量は、いずれかの禁忌の場合に、個々の医師によって調整することができる。投薬量は、変動し得、1日又は数日間にわたり、毎日1回以上の用量投与で投与され得る。所与のクラスの医薬品に対する適切な投薬量についての指針は、文献に見出すことができる。例えば、抗体の適切な用量を選択する際のガイダンスは、抗体の治療的使用に関する文献、例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N. J., (1985) ch. 22、及びpp. 303 - 357、Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365 - 389に見ることができる。単独で使用される抗体の典型的な1日の投与量は、上記の要因に応じて、1日当たり約1 µg / kg 体重 ~ 最大100 mg / kg 体重以上の範囲であってもよい。

#### 【0087】

##### C. 神経疾患を治療する方法

一態様では、本明細書に開示されるのは、対象における神経疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、多系萎縮症（MSA）、リソソーム貯蔵病（LSD）、及び/又は筋肉ジストロフィーなど）を治療、阻止、減少、低減、改善、及び/又は予防する方

10

20

30

40

50

法であって、対象に、本明細書に開示される操作 A A V ベクターによってコードされる治療剤を投与することを含む方法である。治療剤は、G L B 1 ( G M 1 ガンリオシドーシスの治療のための b - ガラクトシダーゼをコードする )、ニーマン - ピック C 1 ( N P C 1 ) ( ニーマン - ピック病の治療用 )、アポリポタンパク質 E ( A P O E ) ( アルツハイマー病の治療用 )、G D 3 シンターゼ、ハンチンチンチン ( H t t ) ( ハンチントン病の治療用 )、インターロイキン ( I L ) - 1 0 ( I L - 1 0 ) ( 多発性硬化症、外傷性脳損傷、脊髄性側索硬化症、アルツハイマー病、及びパーキンソン病を含むがこれらに限定されない障害の治療用 )、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 ( M O G ) ( ナルコレプシーの治療用 )、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ 8 相互作用タンパク質 3 ( M A P K A 8 I P 3 ) ( 痙攣性四肢麻痺、知的障害、大脳萎縮、及び / 又は脳梁低形成の治療用 )、生存運動ニューロン ( S M N ) 1 ( S M N 1 ) 及び / 又は S M N 2 ( 脊髄性筋萎縮 ( S M A ) の治療用 )、C a s 9、 - グルコセレブロシダーゼ ( G B A ) ( ゴーシャール病及び / 又はリソソーム貯蔵病 ( L S D ) の治療用 )、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 1 ( S M P D 1 ) ( ニーマン - ピック病、パーキンソン病、及び / 又はリソソーム貯蔵病の治療用 )、ベータヘキソサミニダーゼ A ( H E X A ) ( テイサックス病及び / 又はリソソーム貯蔵病の治療用 )、神経成長因子 ( N G F ) ( 疼痛及び加齢性神経変性疾患の治療用 )、脳由来神経栄養因子 ( B D N F ) ( 加齢性及び病理学的神経疾患の治療用 )、神経栄養素 ( N T ) 3 ( N T - 3 ) ( 自閉症スペクトラム病、アルツハイマー病、ハンチントン病、及び / 又はパーキンソン病の治療用 )、N T - 4 / 5 ( アルツハイマー病、ハンチントン病、及び / 又はパーキンソン病の治療用 )、N T - 6 ( アルツハイマー病、ハンチントン病、及び / 又はパーキンソン病の治療用 )、グリア細胞由来神経栄養因子 ( G D N F ) ( アルツハイマー病及び / 又は多系萎縮症 ( M S A ) の治療用 )、毛様体神経栄養因子 ( C N T F )、白血病阻止因子 ( L I F )、インスリン様成長因子 ( I G F ) 1 ( I G F - 1 )、b 線維芽細胞成長因子 ( F G F )、ニューツリン ( パーキンソン病の治療用 )、ペルセフィン ( パーキンソン病の治療用 )、アルテミン ( パーキンソン病の治療用 )、トランスフォーミング成長因子 ( T G F ) アルファ ( T G F )、T G F、I G F - 2、血小板由来成長因子 ( P D G F )、表皮成長因子 ( E G F )、カルジオトロピン、血管内皮成長因子 ( V E G F )、ソニックヘッジホッグ ( S H H ) ( 全前脳胞症の治療用 )、骨形成タンパク質 ( B M P )、F G F 2 0、血管作動性腸管ペプチド ( V I P )、プレイオトロフィン ( P T N )、芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素 ( A A D C )、T H、5 - ヒドロキシトリプタミン ( 5 H T )、並びに肝細胞成長因子 ( H G F ) の機能の損失を、発現が救援することができる任意の治療剤であり得る。上述したように、治療剤は、m i R N A - 2 2 2、m i R N A - 7、及び m i R N A - 1 3 2 を含むがこれらに限定されないマイクロ R N A も含むことができる。

#### 【 0 0 8 8 】

また、任意の先行態様に記載の神経疾患を治療、阻止、減少、低減、改善、及び / 又は予防する方法も開示され、A A V ベクターは、全身投与される ( 例えば、これらに限定されないが、i . v . 注射若しくは i . v . 点滴を含む静脈内に、及び / 又は後眼窩に、など ) か、又は脳脊髄液注射を介して投与される。

#### 【 0 0 8 9 】

開示される A A V ベクターは、神経学疾患又は状態の治療に適切な任意のペプチド、タンパク質、抗体、又は核酸をコードすることができる。かかる核酸、ペプチド、タンパク質、当業者に既知の抗体の例。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 9 0 】

#### D . 実施例

以下の実施例は、当業者に、本明細書で特許請求される化合物、組成物、物品、デバイス、及び / 又は方法の作製方法及び評価方法の完全な開示及び説明を提供するために示されるものであり、純粋に例示的であることを意図するものであって、本開示を限定するものではない。数値 ( 例えば、量、温度など ) に関して精度を保證するように努力がなされ

10

20

30

40

50

てはいるが、いくらかの誤差及び偏差が考慮されるべきである。別段の指示がない限り、部は、重量部であり、温度は、であるか、又は周囲温度であり、圧力は、大気圧又はその付近である。

【0091】

1. 実施例1: LC.V1キャプシドの生成

組換えAAVベクターは、低免疫原性及び長期間の導入遺伝子発現を有する分裂組織及び有糸分裂後組織の両方を形質導入することができるため、魅力的な遺伝子送達ビヒクルとなっている。肝臓、筋肉、網膜、及び中枢神経系などの組織へのAAV2媒介性遺伝子移入が報告されている。その後、AAV8などの新しい非ヒト血清型が単離され、霊長類組織のPCRベースのスクリーニングによって同定され、AAV2のものよりも優れたニューロンを形質導入することが示された。更に、これらの新しい霊長類血清型間の比較により、cy5、rh20、及びrh39の注入後の広範なニューロン形質導入が、AAV8よりも高いレベルであることが明らかになった。この研究に基づいて、Rec2キャプシドを含む一連のハイブリッド組換えキャプシドを、構造ドメイン交換又はcy5、rh20、及びrh39からの断片間のシャッフルによって生成し、それらの指向性が新規ハイブリッド血清型を効率的に網膜を標的にすることができることを期待した。インビボ及びインビトロ評価では、Rec2キャプシドの形質導入有効性は、AAV2又はAAV5のそれと同線であった。しかしながら、驚くべきことに、Rec2血清型は、AAV1、AAV8、及びAAV9血清型を含む試験された天然に存在する血清型よりも優れた褐色脂肪組織及び白色脂肪組織の両方において広範な形質導入を呈する。脂肪組織へのRec2媒介性遺伝子移入の最初の公表以来、Rec2血清型ベクターは、基礎研究及び翻訳研究に適用されている。加えて、Rec2はまた、静脈内注射を介して肝臓を効果的に形質導入することができる。脂肪組織への形質導入有効性を改善し、その間に肝臓への形質導入を低減するために、Rec2キャプシドのいくつかのバリエーションを、点変異又は挿入突然変異によって作成した。

【0092】

代替のスプライシング及び開始を介したAAV2ゲノム中のキャプシド(CAP)遺伝子は、VP1、VP2、及びVP3を含む構造ウイルスタンパク質(VP)をコードするため、3つのVPタンパク質全てが同一のカルボキシル末端アミノ酸を共有する。VP1、VP2、及びVP3は、1:1:10のモル比で、各サブユニットを有するAAVキャプシドを構成して、二十面体構造を形成する。AAV指向性は、細胞侵入を決定づける。AAV2は、その一次受容体として膜関連ヘラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)を使用することによって、細胞侵入を行う。他の候補もAAV付着に加わると報告されている。AAV2キャプシドの原子構造は、3.0ミクロンの分解能で決定されている。コンピュータモデリングに基づいて、AAV2血清型に対していくつかの遺伝子キャプシド修飾が許容され得る。例えば、作業結果は、561位と591位との間のクラスターを含む潜在的なヘパリン結合遺伝子座を示唆し、最近の包括的なAAVキャプシド適応度地形研究によって再確認された。更なる研究は、残基R585及びR588を、HSPG結合に關与する一次アミノ酸残基の2つとして同定する。いくつかの研究では、ベクター再標的化のためのN587及びI588周辺残基に焦点を当てた遺伝子修飾が報告されている。したがって、新たな血清型キャプシド改善された脂肪指向性をスクリーニングするために、AAV2キャプシドのR585及びR588を取り囲む領域に相当する領域のRec2キャプシドに変異を生じさせることが決定された。最近、遺伝子修飾は、R585~R588領域を超えて拡大された(表3)。最初のインビボスクリーニングは、天然のRec2キャプシドと比較して、全てのバリエーションが脂肪組織又は肝臓への形質導入効率が低いことを示した。例えば、バリエーション1、すなわちLC.V1キャプシドは、天然のRec2キャプシドと比較して、脂肪組織への形質導入効率を、脂肪内注射を介して76%、腹腔内注射を介して83%低下させた。更に、LC.V1は、天然のRec2キャプシドと比較して、肝臓への形質導入効率が50%低いことを示した。これらのバリエーションは、脂肪特異的AAV血清型を生成する当初の意図の失敗とみなされ、後に他の組織への形質

導入についてスクリーニングされた。驚くべきことに、バリエーション 1、すなわち、LC.V1 キャプシドは、マウス脳（図 1）及びラット脳（図 2、3）において、ニューロンへの高い形質導入及び広範な形質導入遺伝子発現を示した。具体的には、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する LC.V1 ベクターを、1 μL 中  $1 \times 10^9$  個のウイルス粒子の用量で C57BL/6 マウスの線条体に片側だけに注射した。形質導入範囲は、マウス脳の約 15% である約 3 mm であった（図 1）。LC.V1 ベクターは、片側だけの線条体への対流増強送達（CED）を介して、Sprague-Dawley ラット脳において同様の広範な形質導入を示した（15 μL 中  $1.8 \times 10^{11}$  個のウイルス粒子）。驚くべきことに、ラット脳の堅牢な形質導入は、線条体（標的構造）、皮質、中隔、海馬、視床、視床下核、黒質などを含む多くの脳構造で観察された（図 2、図 3）。標的構造からのベクターの広がり、前方で 3.5 mm を超え、後方方向で 5 mm を超えた。LC.V1 ベクターは、非常に高い効率で主にニューロンを形質導入し、逆行方向に輸送されるように見えた。

10

表 3 . Rec2 キャプシドの遺伝子修飾

【表 3】

バリエーション	変異	行われたインビボ試験
LC.V1	Q588P、Q589L、Q594L	マウス脂肪組織、肝臓 マウス脳、ラット脳
LC.V2	N540I、N549I、D559V	マウス脂肪組織、肝臓
LC.V3	585でのCSWKYWFGE(配列番号2)の挿入	パッケージ化できない
LC.V4	(575~585)でのCSWKYWFGEによるATEEYGTVD(575~585)(配列番号3)の置き換え	マウス脂肪組織、肝臓
LC.V5	F503Y	マウス脂肪組織、肝臓
LC.V6	A458T、Q461S、N471S	マウス脂肪組織、肝臓

20

30

【0093】

2. 実施例 2 : LC.V1 キャプシド及び GFP レポーターベクターパッケージングの構築。

Rec2 キャプシドを、Q588P、Q589L 及び Q594L で、GeneArt 部位特異的変異誘発プラスキット（A14604、Invitrogen）を介して変異させた。Rec2 キャプシド配列は、公開されたデータに基づいている。変異誘発のためのプライマーは、Integrated DNA Technologies（IDT）によって合成され、以下のように列挙された：VP3\_1763-FW / CAGATAACTTGCAGCCGCTAAACACGGCT CCTCTAATTGGAACTGTCAA（配列番号 4）、VP3\_1763RV / TTGACAGTTCCAAATTAG AAGGAGCCGTGTTTAGCGGCTGCAAGTTATCTG（配列番号 5）として列挙された。

40

【0094】

キットの指示に従って変異誘発を設定及び実行し、各部位におけるヌクレオチド置換をオハイオ州立大学総合がんセンター（Comprehensive Cancer Center）のコア施設で配列決定することにより確認した。rAAV ベクター骨格は、CBA（ハイブリッドサイトメガロウイルス - 鶏 - アクチン）プロモーター、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素（WPRE）、及び AAV2 反転末端反復に隣接するウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを含有する。GFP を、rAAV 発現プラスミドのポリリンカー部位にクローニングした。ウイルスパッケージングに使用したプラスミド

50

は全て、EndoFree plasmid Maxi and Mega Kit (Qiagen) を使用して調製した。ヒト胚性腎臓 293 細胞を、レポーター遺伝子として GFP を含有する 3 つのプラスミド - rAAV シスプラスミド、rep 及び cap (Rec2) 遺伝子をコードする AAV ヘルパープラスミド、並びに標準 CapO<sub>4</sub> トランスフェクションを使用するアデノウイルスヘルパー pF6 で共トランスフェクションした。rAAV を、ヨードキサノール密度勾配 (OptiPrep 密度勾配培地、D1556、Sigma) を介して超遠心分離することによって細胞溶解物から精製した。rAAV を、Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems # A25742) での定量 PCR によって滴定した。 10

【0095】

遺伝子療法ベクターの最も重要な特徴のうちの 1 つは、標的細胞を形質導入するそれらの効率である。中枢神経系 (CNS) の遺伝子療法では、科学者達は、脳全体に効率的に広がり、最大数のニューロンを形質導入するであろう「最高のパフォーマンス」を常に探している。これは、脳の大部分に影響を及ぼす多くの神経変性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病、リソソーム貯蔵病) の最良の治療成績を保証するであろう。我々は、対流増強送達 (CED) を介して非ヒト霊長類脳に送達される LC.V1 ベクターの形質導入の効率を評価した。簡潔に述べると、我々は、MRI 誘導 CED を用いて、左のサル視床に 124  $\mu$ l の LC.V1 (注入速度 3  $\mu$ l / 分)、右中脳 (腹側被蓋野 - VTA + 黒質) に 59  $\mu$ l の LC.V1 を注入した。動物を鎮静させ、次いで各半球に配置された MR 適合性の頭蓋マウントされた一時的なカニューレガイドを有する定位システムに配置した。軌道を設定するための T1 加重計画スキャン (Siemens 3.0T Trio MR ユニット) の後、3 mm のステップチップを備えたセラミックのカスタム設計された溶融シリカ還流耐性カニューレを注入に使用した。MRI 中の注入物分布を視覚化するために、Prohance (2 mmol / l のキレート化ガドリニウム) をウイルスに添加した。連続 MRI を取得して、各標的部位内の注入物分布を監視し、外科チームにリアルタイムのフィードバックを提供した。3 週間後に動物を安楽死させ、脳を免疫組織化学染色のために処理して、分布及び形質導入の効率を評価した。導入遺伝子、GFP、及びニューロンマーカー、NeuN に対する二重蛍光染色を使用して、形質導入ニューロンの割合 (形質導入の効率) を決定した。 20 30

【0096】

LC.V1 を用いた非ヒト霊長類の脳の形質導入の結果、このベクターは、脳の広い領域の形質導入の分布及び効率において非常に効率的であることが示された。具体的には、視床は、LC.V1 ベクターの 124  $\mu$ l のみの注射の部位における導入遺伝子発現 (GFP) に基づいてほぼ完全な被覆を示した (図 4A ~ C)。4 つの視床核 (腹側前側、腹側内側、外側背側、及び内側背側) からの平均ニューロン形質導入効率は、GFP 発現によって測定した場合、67% (図 5I) であった。LC.V1 は、注射部位 (視床) から皮質領域に逆行的に輸送し、そこで前頭前野及び前頭皮質層 V の錐体ニューロンを形質導入する (図 4D ~ K 及び図 5A ~ C)。これは、前頭前野に影響を及ぼす疾患の治療のための LC.V1 の使用を支持するため、重要である。前頭前野内のニューロン形質導入効率は、全て前頭前野のエリア 9 内の、脳組織の 3 つの別々の切片からの 4 つの外側及び内側の 8 つの皮質領域の平均に基づいて 50% (図 5I) であった。LC.V1 は、注射部位 (視床) から海馬に逆行的に輸送し、海馬台のニューロンを形質導入する (図 5D ~ H)。この構造内の平均ニューロン形質導入効率は、53% である (図 5I)。LC.V1 は、注射部位 (中脳: VTA 及び黒質) から線条体 (尾状核及び尾状核被殻の両方) に逆行的に輸送し、そこで多数の GFP 陽性繊維を見ることができる (図 6A ~ D)。CED を介して送達される脳実質内の LC.V1 の分布は、リアルタイム MRI イメージングによって監視することができる。MRI 造影剤 Prohance (ガドリドール) を含むことにより、Prohance の分布を継続的に監視することにより、LC.V1 ウイ 40 50

ルス粒子の対流運動を追跡することができる。MRIスキャンは、導入遺伝子GFPの発現を示す組織学的（免疫蛍光染色 - IF）脳切片と完全に相関する（図7A～F）。本明細書に示されるデータはまた、LC・V1が逆行性及び順行性輸送の両方を示す双方向であるという観察を支持する。また、ベクトル分布をリアルタイムで監視することができた。これは、投与医師がベクター投与を監視し、一次標的が充填されたとき、又は正しい位置に送達されたときに注入を停止又は調整することができるため、重要である。

#### 【0097】

次に、前後軸（図8）、末梢臓器（図9）から、並びに代表的な動物からの海馬及び歯状回（図10）における異なる脳レベルでの導入遺伝子形質導入（GFP発現を介した）のレベルを評価することによって、全身及びCSFのような非実質的な送達経路を評価した。我々は、LC・V1が非実質的な送達経路にかかわらず、全体的かつ均等に分布していることを観察した。外側尾静脈注射、CSF、又は側脳室注射を使用したときに、全ての皮質葉（前頭前野、前頭皮質、側頭、頭頂、及び後頭）に沿って陽性GFPシグナルも見られた。次に、我々は、神経指向性及び星状膠細胞の指向性の両方をアッセイした。ここで、LC・V1は、全ての皮質及び皮質下領域（錐体細胞、中程度の棘状ニューロン、ドーパミン作動性ニューロン、プルキニエなど）においてニューロン及び介在ニューロンを形質導入するように見えた（図11）。我々は、いくつかのrAAV（特にAAV9）が新生児マウスの中樞神経系で血液脳関門を通過することが示されているが、成体の対象では同じ主張が示されていないことに留意した。AAV9・HRと比較した場合、我々は、同様の用量（ $4.0 \times 10^{12}$  vg対 $4.18 \times 10^{12}$  vg）を注射し、LC・V1は、より良好な分布及びより高い発現レベルを遂行した。AAV-PHP.Bと比較した場合、我々は、より高い用量（ $1.0 \times 10^{12}$  vg対 $4.18 \times 10^{12}$  vg）を注射し、LC・V1は、同様/より良好な分布及び発現レベルを遂行した。

#### 【0098】

これらの実験を行うために、動物（C57BL/6匹のマウス）は、右眼窩後洞（RO）若しくは尾静脈（TV）を通して全身注射、又は左側脳室送達（LV）を通してCSF注射のいずれかを受けた。各動物は、全身的に $50 \mu\text{L}$ 又はCSFへ $25 \mu\text{L}$ のAAV:LC・V1を $8.36 \times 10^{13}$  vg/mL（ロット番号CS1851）の力価で受けた。左側脳室への注入（脳室内送達とも知られる）は、カスタムメイドの融合シリカ1mmステップカニューレを使用して達成した。ベクター送達は、マウス脳地図からの以下の座標を使用して定位的に誘導した。前方 - 後方：-0.3mm；内側 - 外側：+0.9mm；背側 - 腹側：-1.8mm。

#### 【0099】

##### E. 配列

配列番号 1 Rec2キャプシドタンパク質のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

## 【化1】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY 50  
 KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF 100  
 QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSP 150  
 QRSPDSSTGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPIGEPAGPSGLG 200  
 SGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWAL 250  
 PTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ 300  
 RLINNNWGFRRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSE 350  
 YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY 400 10  
 FPSQMLRTGNNFEFSYQFEDVPPFHSSYAHSSQSLDRLMNPLIDQYLYLSR 450  
 TQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNN 500  
 SNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILIFGKQNA 550  
 ARDNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIIVADNLQQQNTAPQIGTVNS 600  
 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQIL 650  
 IKNTVPVADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE 700  
 IQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL 738

## 配列番号6 LC.V1キャプシドのアミノ酸配列

20

## 【化2】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY 50  
 KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF 100  
 QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSP 150  
 QRSPDSSTGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPIGEPAGPSGLG 200  
 SGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWAL 250  
 PTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ 300  
 RLINNNWGFRRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSE 350  
 YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY 400  
 FPSQMLRTGNNFEFSYQFEDVPPFHSSYAHSSQSLDRLMNPLIDQYLYLSR 450 30  
 TQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNN 500  
 SNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILIFGKQNA 550  
 ARDNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIIVADNLQPLNTAPLIGTVNS 600  
 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQIL 650  
 IKNTVPVADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE 700  
 IQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL 738

## 【0100】

## F. 参考文献

- Becerra SP, Koczot F, Fabisch P, Rose JA. 1988. Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol* 62: 2745-54 40  
 Buning H, Huber A, Zhang L, Meumann N, Hacker U. 2015. Engineering the AAV capsid to optimize vector-host interactions. *Curr Opin Pharmacol* 24: 94-104  
 Charbel Issa P, De Silva SR, Lipinski DM, S 50

- ingham MS, Mouravlev A, You Q, Barnard AR, Hankins MW, During MJ, Maclaren RE. 2013. Assessment of tropism and effectiveness of new primate-derived hybrid recombinant AAV serotypes in the mouse and primate retina. *PLoS One* 8:e60361
- Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, Kumar SR, Chan KY, Banerjee A, Wu WL, Yang B, Huber N, Pasca SP, Gradinaru V (2016) Cre-dependent selection yields AAV variants for wide spread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol* 34:204-209 10
- Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF. 1999. Dynamitin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 73:10371-6
- During MJ, Liu X, Huang W, Magee D, Slater A, McMurphy T, Wang C, Cao L. 2015. Adipose VEGF Links the White-to-Brown Fat Switch With Environmental, Genetic, and Pharmacological Stimuli in Male Mice. *Endocrinology* 156:2059-73 20
- Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. 2005. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 5:285-97
- Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11854-9 30
- Girod A, Ried M, Wobus C, Lahm H, Leike K, Kleinschmidt J, Deleage G, Hallek M. 1999. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 5:1052-6
- Huang W, Liu X, Queen NJ, Cao L. 2017. Targeting Visceral Fat by Intraperitoneal Delivery of Novel AAV Serotype Vector Restricting Off-Target Transduction in Liver. *Mol Ther Methods Clin Dev* 6:68-78 40
- Huang W, McMurphy T, Liu X, Wang C, Cao L. 2016. Genetic Manipulation of Brown Fat Via Oral Administration of an Engineered Recombinant Adeno-associated Viral Serotype Vector. *Mol Ther* 24:1062-9
- Huang W, Queen NJ, Cao L. 2019. rAAV-Mediated Gene Delivery to Adipose Tissue. *Methods Mol Biol* 1950:389-405
- Huang W, Queen NJ, McMurphy TB, Ali S, Cao L. 2019. Adipose PTEN regulates adult adipo 50

- se tissue homeostasis and redistribution via a PTEN-leptin-sympathetic loop. *Mol Metab* 30:48-60
- KD Foust, E Nurre, CL Montgomery, A Hernandez, CM Chan, BK Kaspar (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*, 27(2009), pp. 59-65
- Kern A, Schmidt K, Leder C, Muller OJ, Wobus CE, Bettinger K, Von der Lieth CW, King JA, Kleinschmidt JA. 2003. Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol* 77:11072-81
- Klein RL, Dayton RD, Leidenheimer NJ, Janse n K, Golde TE, Zweig RM. 2006. Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Mol Ther* 13:517-27
- Lawlor PA, Bland RJ, Mouravlev A, Young D, D uring MJ. 2009. Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Mol Ther* 17:1692-702
- Liu X, Magee D, Wang C, McMurphy T, Slater A, During M, Cao L. 2014. Adipose tissue insulin receptor knockdown via a new primate-derived hybrid recombinant AAV serotype. *Mol Ther Methods Clin Dev* 1
- Lluis Samaranch, Ernesto A Salegio, Waldy San Sebastian, Adrian P Kells, John R Brin gas, John Forsayeth, Krystof S Bankiewicz (2013) Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*. 2013 May; 24(5): 526-32
- McMurphy TB, Huang W, Xiao R, Liu X, Dhurand har NV, Cao L. 2017. Hepatic Expression of Adenovirus 36 E4ORF1 Improves Glycemic Control and Promotes Glucose Metabolism Through AKT Activation. *Diabetes* 66:358-71
- Mingozzi F, High KA. 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 12:341-55
- Ng R, Hussain NA, Zhang Q, Chang C, Li H, Fu Y, Cao L, Han W, Stunkel W, Xu F. 2017. miRNA-32 Drives Brown Fat Thermogenesis and Trans-activates Subcutaneous White Fat Bro

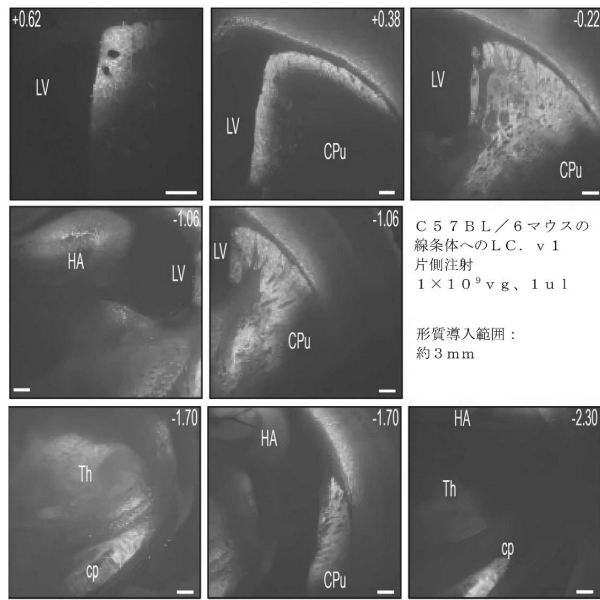
- wning in Mice. Cell Rep 19:1229-46
- Nicklin SA, Buening H, Dishart KL, de Alwis M, Girod A, Hacker U, Thrasher AJ, Ali RR, Hallek M, Baker AH. 2001. Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. Mol Ther 4:174-81
- Ogden PJ, Kelsic ED, Sinai S, Church GM. 2019. Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. Science 366:1139-43 10
- Opie SR, Warrington KH, Jr., Agbandje-Mckenna M, Zolotukhin S, Muzyczka N. 2003. Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. J Virol 77:6995-7006
- Perabo L, Goldnau D, White K, Endell J, Boucas J, Humme S, Work LM, Janicki H, Hallek M, Baker AH, Buning H. 2006. Heparan sulfate proteoglycan binding properties of adeno-associated virus retargeting mutants and consequences for their in vivo tropism. J Virol 80:7265-9 20
- Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, Jae LT, Wosen JE, Nagamine CM, Chapman MS, Carette JE. 2016. An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature 530:108-12
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. Nat Med 5:71-7 30
- Rabinowitz JE, Samulski J. 1998. Adeno-associated virus expression systems for gene transfer. Curr Opin Biotechnol 9:470-5
- Rabinowitz JE, Xiao W, Samulski RJ. 1999. Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. Virology 265:274-85 40
- Ried MU, Girod A, Leike K, Buning H, Hallek M. 2002. Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. J Virol 76:4559-66
- Samaranch L, Salegio EA, San SW, Kells AP, Foust KD, Bringas JR, Lamarre C, Forsayeth J, Kaspar BK, Bankiewicz KS (2012) Adeno-associated 50

- ciated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 23:382-389.
- Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5:78-82
- Summerford C, Samulski RJ. 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72:1438-45 10
- Taymans JM, Vandenberghhe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, Wilson JM, Debyser Z, Baekelandt V. 2007. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther* 18:195-206
- Uhrig S, Coutelle O, Wiehe T, Perabo L, Hallek M, Buning H. 2012. Successful target cell transduction of capsid-engineered rAAV vectors requires clathrin-dependent endocytosis. *Gene Ther* 19:210-8 20
- Wang D, Li SY, Gessler DJ, Xie J, Zhong L, Tran K, Vliet KV, Ren LZ, Su Q, He R, Goetzmann JE, Flotte TR, Agbandje-McKenna M, Gao GP (2018) A rationally engineered capsid variant of AAV9 for systemic CNS-directed and peripheral tissue-detargeted gene delivery in neonates. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 9:234-246. 30
- Wu P, Xiao W, Conlon T, Hughes J, Agbandje-McKenna M, Ferkol T, Flotte T, Muzyczka N. 2000. Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol* 74:8635-47
- Xiao R, Mansour AG, Huang W, Chrislip LA, Wilkins RK, Queen NJ, Youssef Y, Mao HC, Caligiuri MA, Cao L. 2019. Adipocytes: A Novel Target for IL-15/IL-15Ralpha Cancer Gene Therapy. *Mol Ther* 27:922-32 40
- Xie L, Zhang Y, Gunasekar SK, Mishra A, Cao L, Sah R. 2017. Induction of adipose and hepatic SWELL1 expression is required for maintaining systemic insulin-sensitivity in obesity. *Channels (Austin)* 11:673-7
- Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzzi A, Chapman MS. 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl* 50

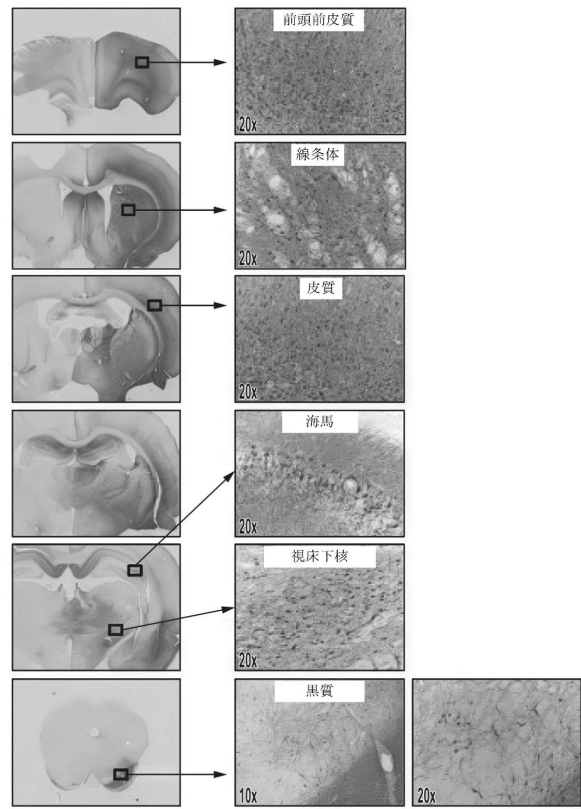
- Acad Sci U S A 99:10405-10
- Yang Q, Mamounas M, Yu G, Kennedy S, Leaker B, Merson J, Wong - Staal F, Yu M, Barber JR. 1998. Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adenoassociated virus vectors for gene therapy. Hum Gene Ther 9:1929-37
- Zhang H, Yang B, Mu X, Ahmed SS, Su Q, He R, Wang HY, Mueller C, Sena - Esteves M, Brown R, Xu ZS, Gao GP (2011) Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. Mol Ther 19:1440-1448
- Zhang R, Xu G, Cao L, Sun Z, He Y, Cui M, Sun Y, Li S, Li H, Qin L, Hu M, Yuan Z, Rao Z, Ding W, Rao Z, Lou Z. 2019. Divergent engagements between adeno-associated viruses with their cellular receptor AAVR. Nat Commun 10:3760
- Zhang Y, Xie L, Gunasekar SK, Tong D, Mishra A, Gibson WJ, Wang C, Fidler T, Marthaler B, Klingelhutz A, Abel ED, Samuel I, Smith JK, Cao L, Sah R. 2017. SWELL1 is a regulator of adipocyte size, insulin signalling and glucose homeostasis. Nat Cell Biol 19:504-17
- Zhu Y, Gao Y, Tao C, Shao M, Zhao S, Huang W, Yao T, Johnson JA, Liu T, Cypess AM, Gupta O, Holland WL, Gupta RK, Spray DC, Tanowitz HB, Cao L, Lynes MD, Tseng YH, Elmquist JK, Williams KW, Lin HV, Scherer PE. 2016. Connexin 43 Mediates White Adipose Tissue Beiging by Facilitating the Propagation of Sympathetic Neuronal Signals. Cell Metab 24:420-33.

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



10

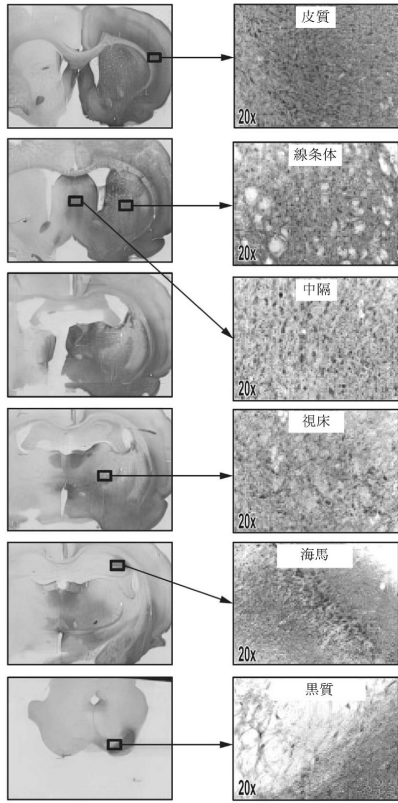
20

30

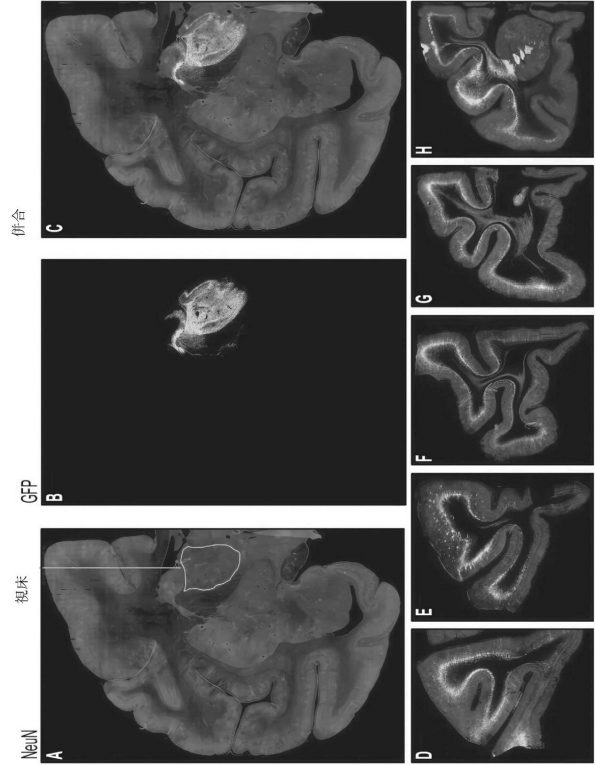
40

50

【 図 3 】



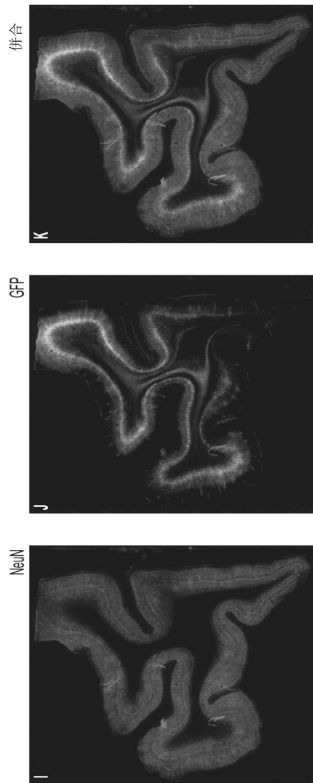
【 図 4 - 1 】



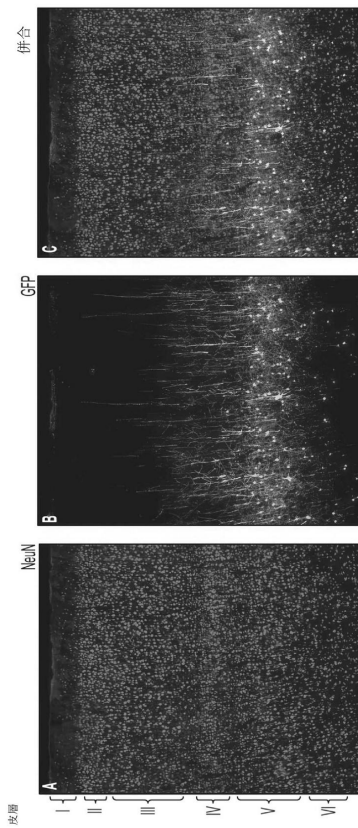
10

20

【 図 4 - 2 】



【 図 5 - 1 】

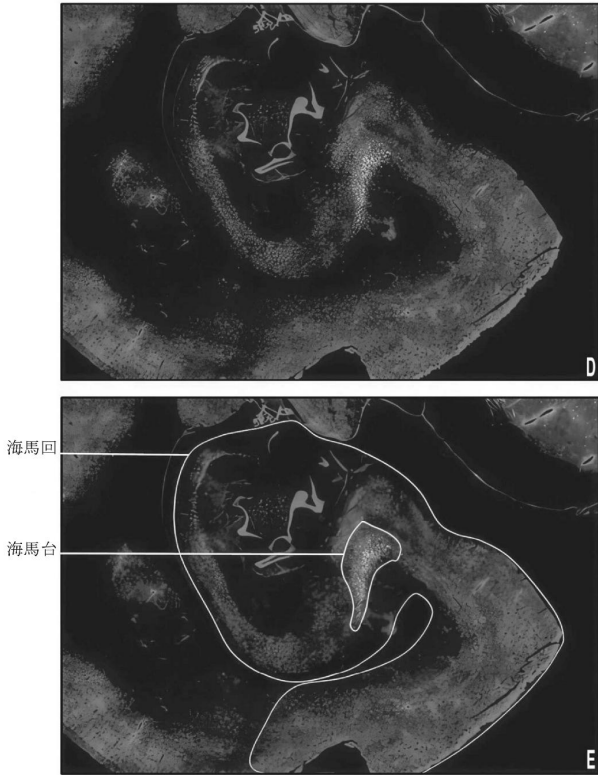


30

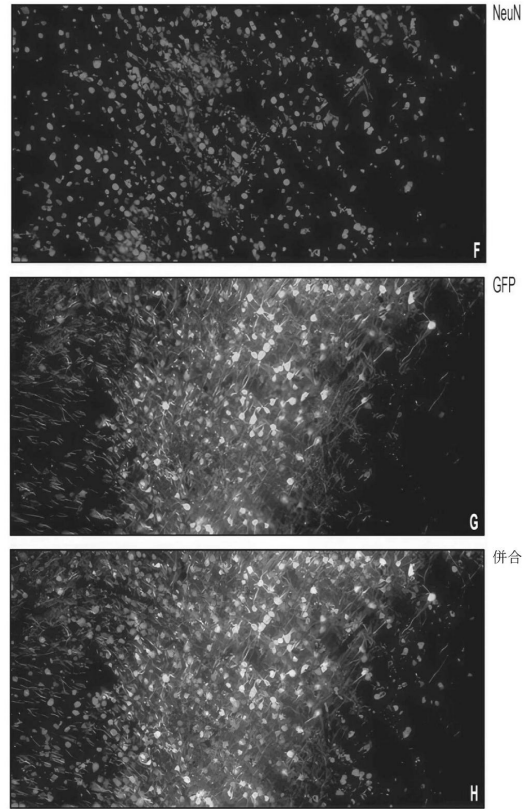
40

50

【 図 5 - 2 】



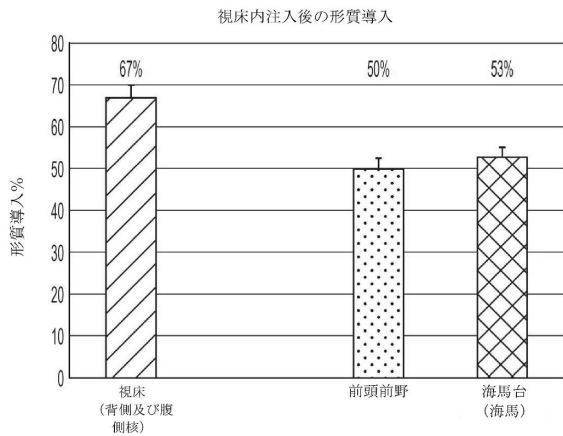
【 図 5 - 3 】



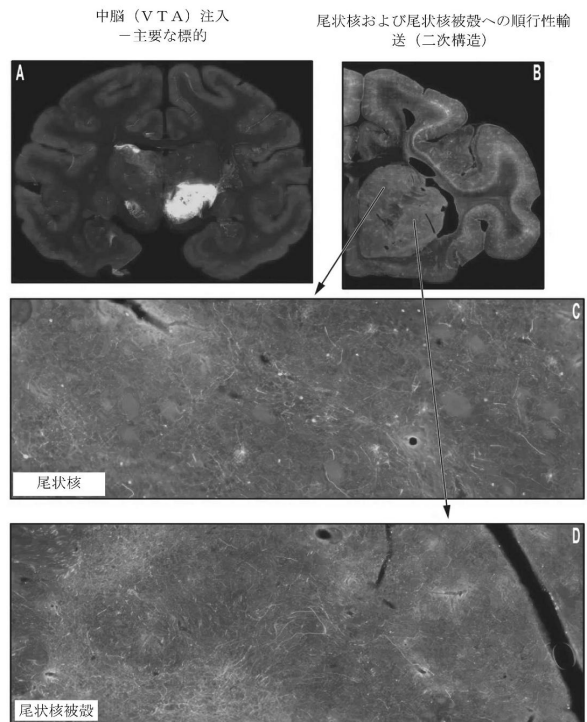
10

20

【 図 5 - 4 】



【 図 6 】

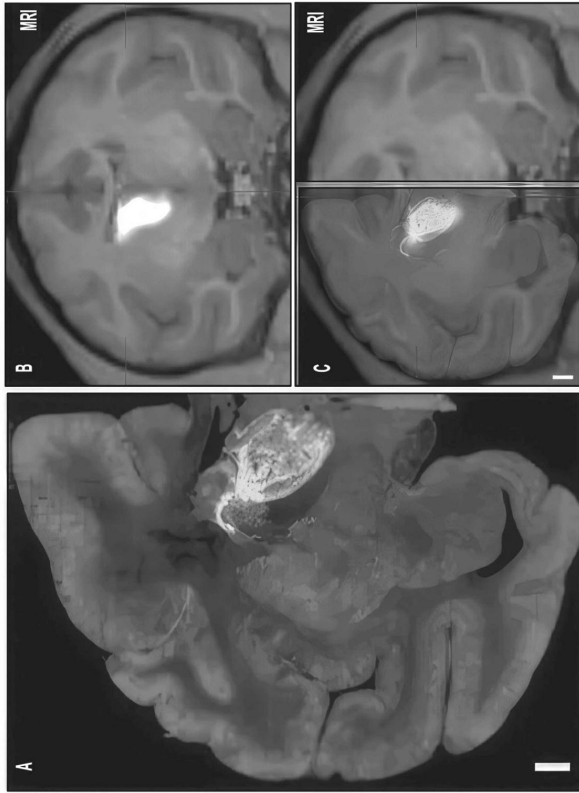


30

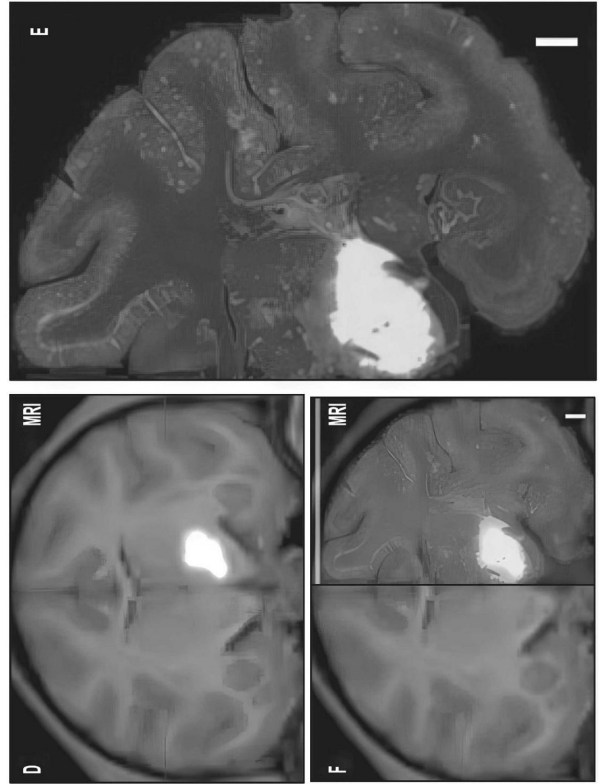
40

50

【 図 7 - 1 】



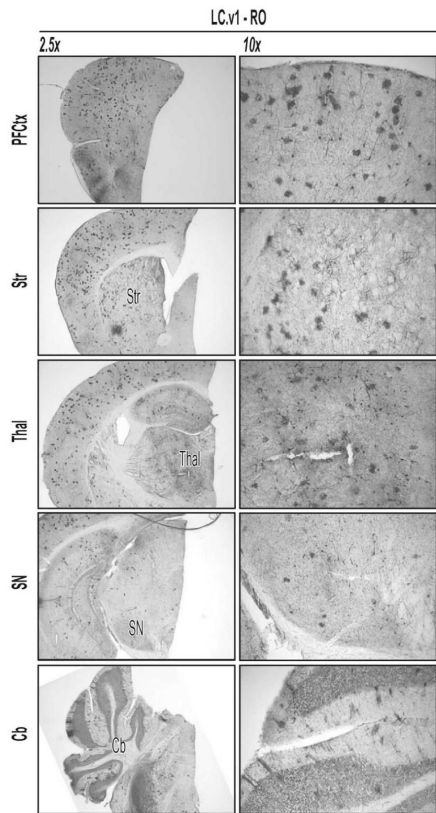
【 図 7 - 2 】



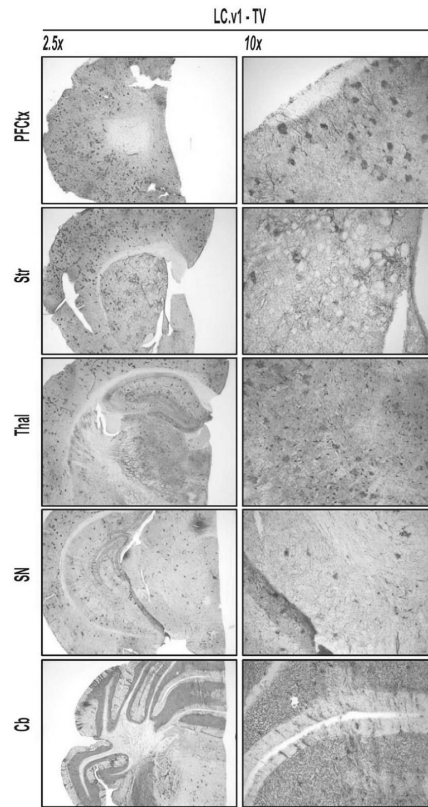
10

20

【 図 8 - 1 】



【 図 8 - 2 】

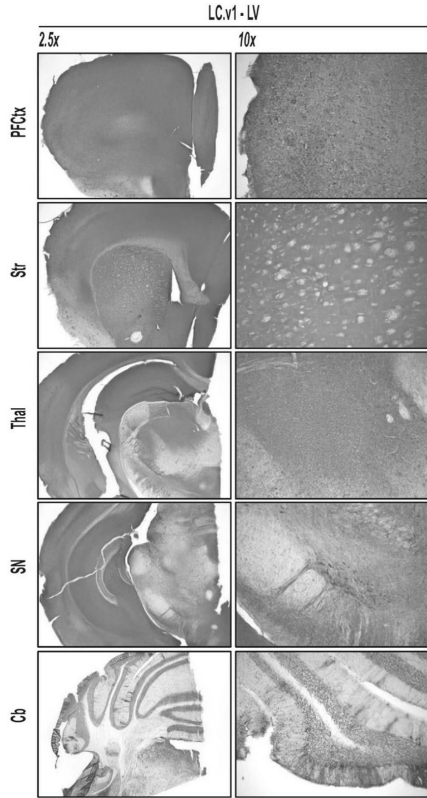


30

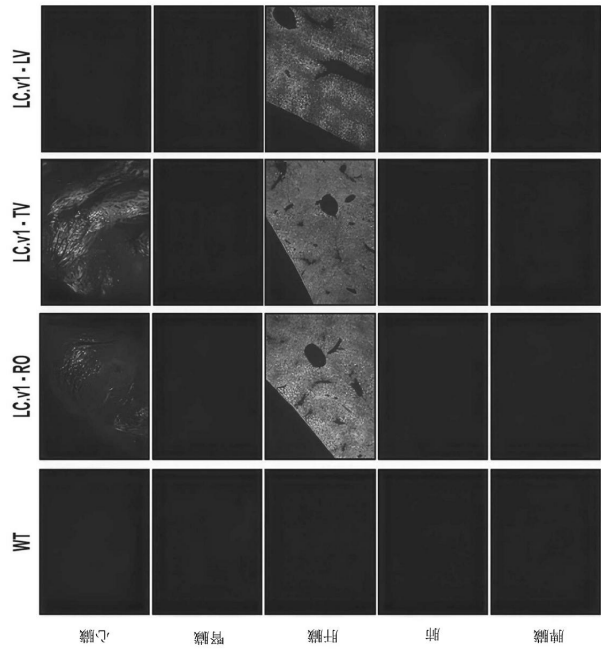
40

50

【 図 8 - 3 】



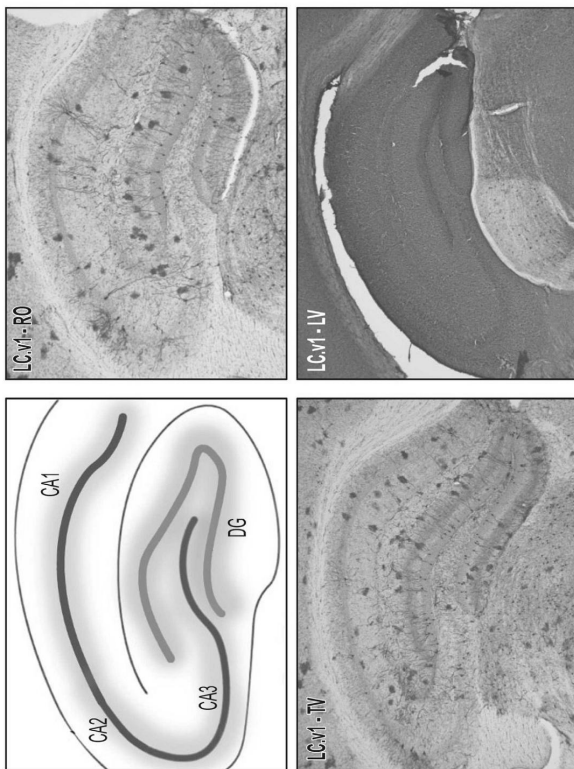
【 図 9 】



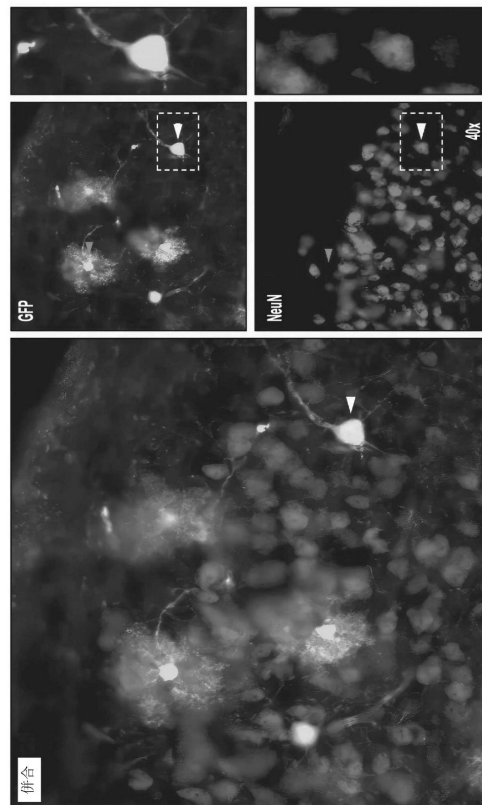
10

20

【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

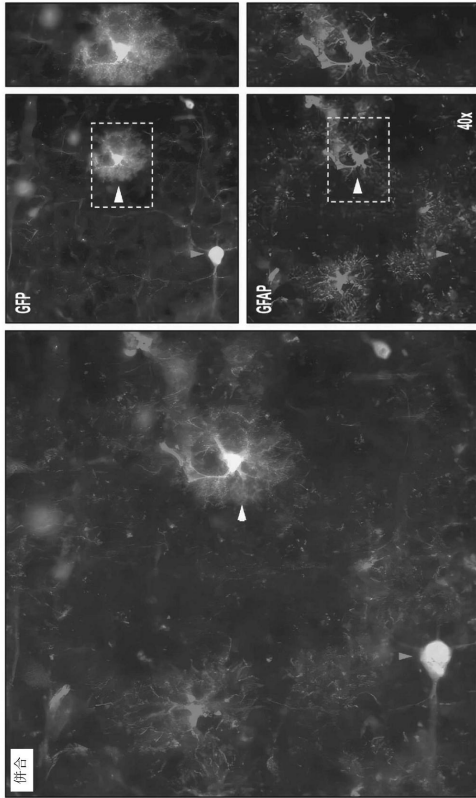


30

40

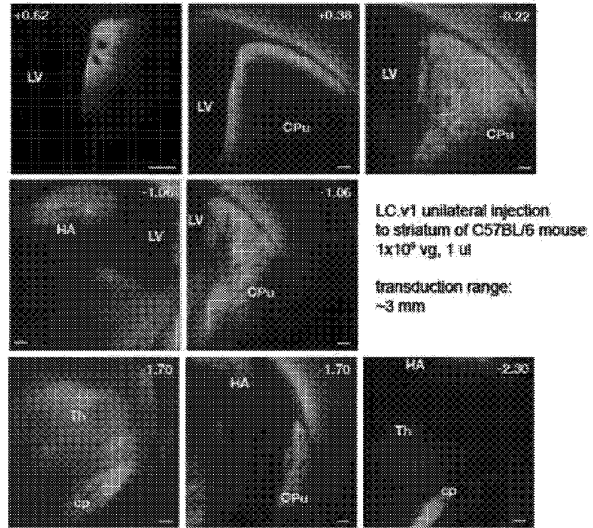
50

【 図 1 2 】



【 図 】

FIG. 1

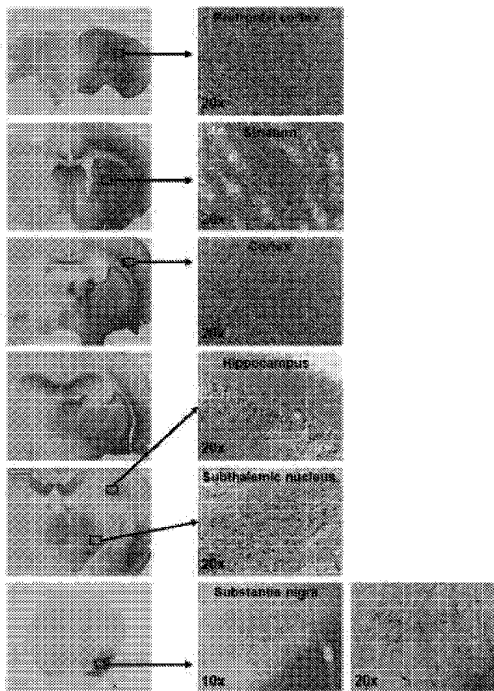


10

20

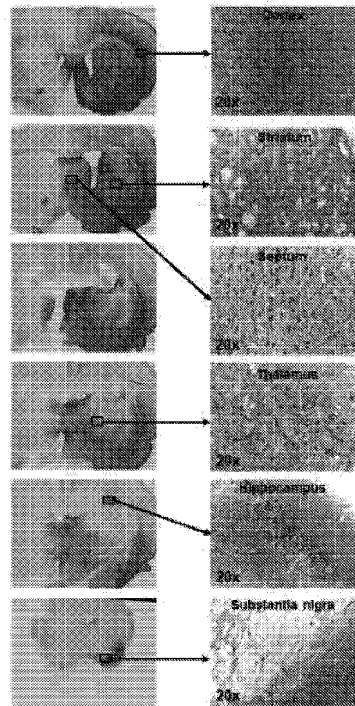
【 図 】

FIG. 2



【 図 】

FIG. 3



30

40

50

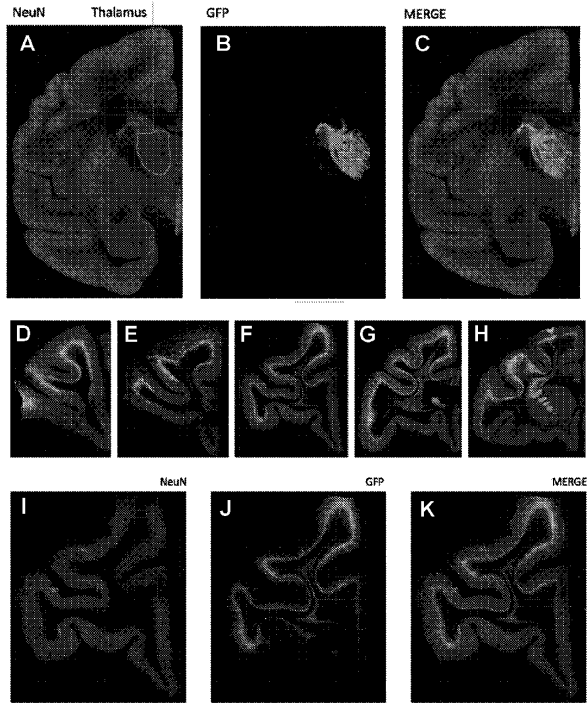


FIG. 4A, FIG. 4B, FIG. 4C, FIG. 4D, FIG. 4E, FIG. 4F, FIG. 4G, FIG. 4H, FIG. 4I, FIG. 4J, and FIG. 4K

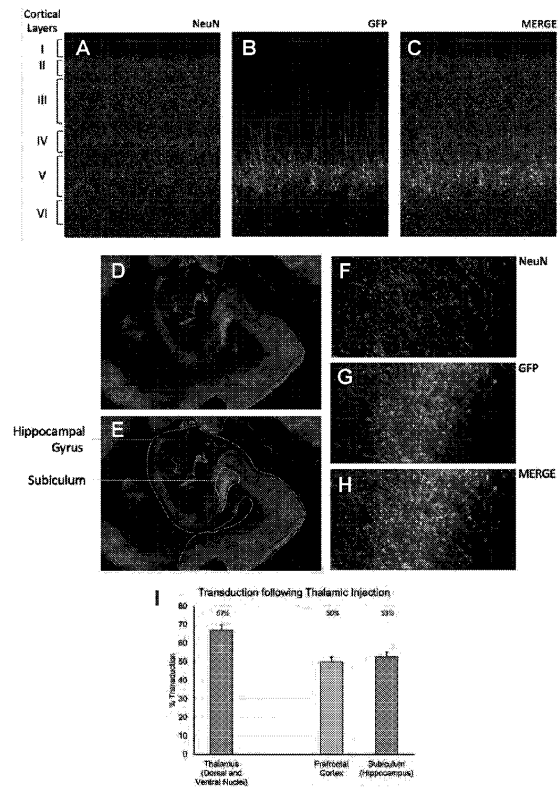


FIG. 5A, FIG. 5B, FIG. 5C, FIG. 5D, FIG. 5E, FIG. 5F, FIG. 5G, FIG. 5H, and FIG. 5I

10

20

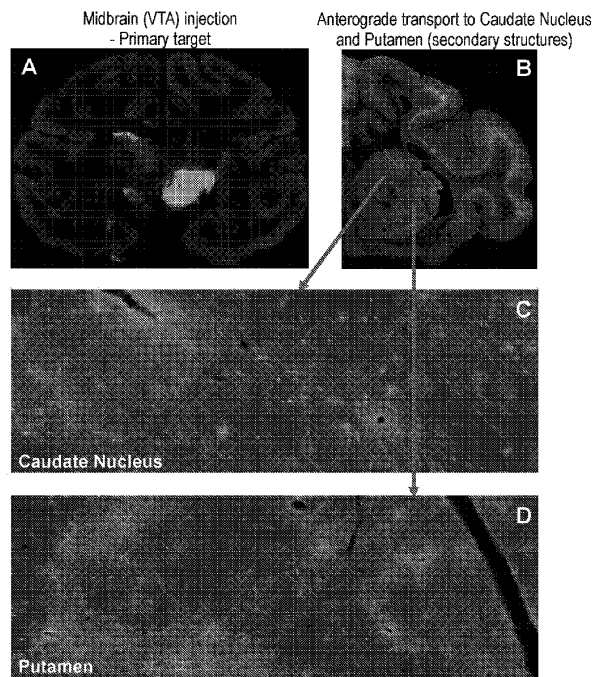


FIG. 6A, FIG. 6B, FIG. 6C, and FIG. 6D

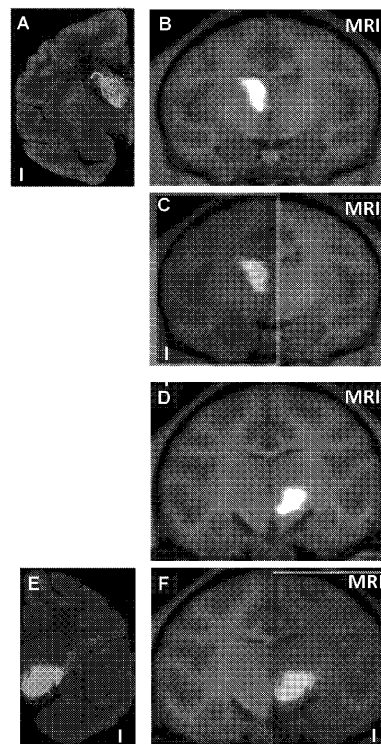


FIG. 7A, FIG. 7B, FIG. 7C, FIG. 7D, FIG. 7E, and FIG. 7F

30

40

50

【 図 】

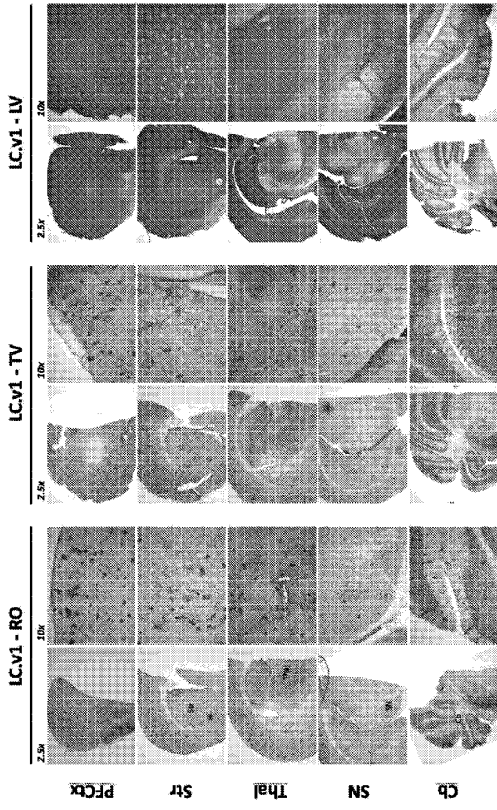


FIG. 8

【 図 】

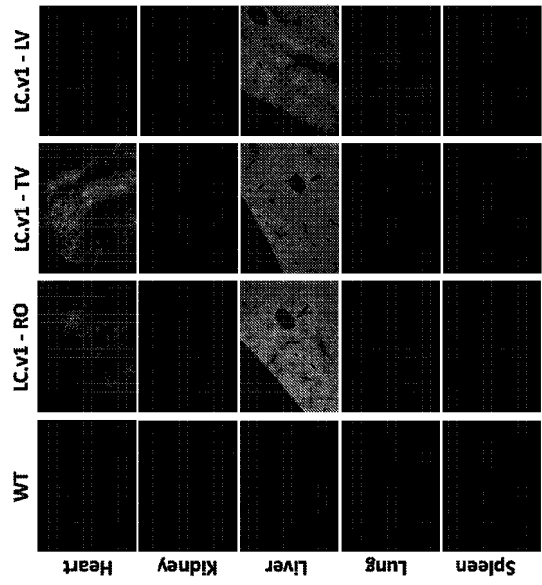


FIG. 9

【 図 】

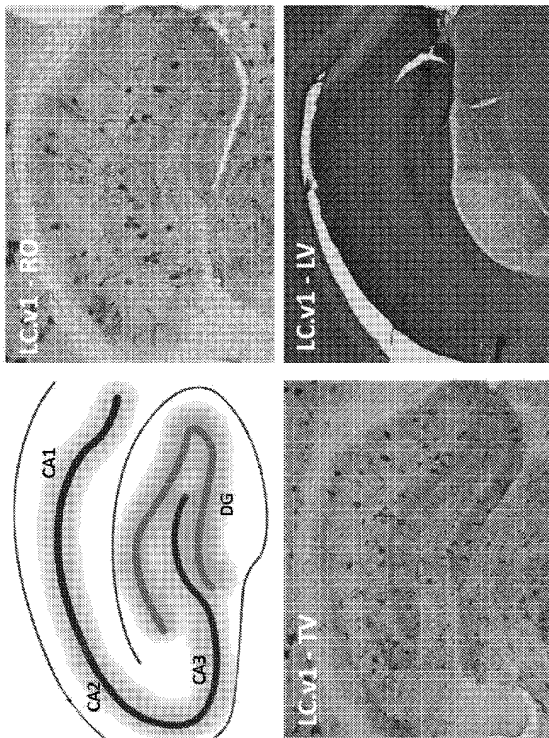


FIG. 10

【 図 】

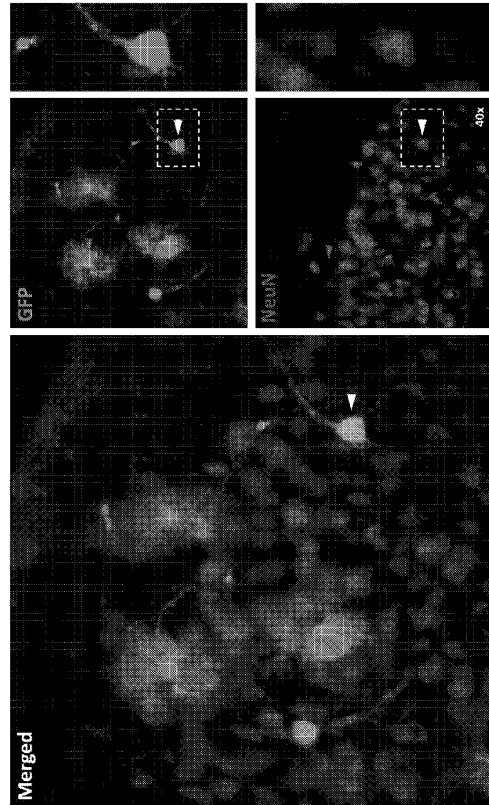


FIG. 11

10

20

30

40

50

【配列表】

2023540756000001.app

10

20

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/49081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
IPC - C12N 15/861, A61K 35/761, A61K 48/00, A61P 25/28 (2021.01)														
CPC - C12N 15/861, A61K 35/761, A61K 48/00, A61P 25/28, C12N 2750/14111, C12N 2750/14141, C12N 2750/14122														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	SIU, Hypothalamic Gene Therapy by an Autoregulatory BDNF Vector to Prevent Melanocortin-4-Receptor-Deficient Obesity. Dissertation, Ohio State University. 2018 [online] [Retrieved on 9 November 2021] Retrieved from internet at <URL: <a href="https://atd.ohiolink.edu/apexprod/rws_etd/send_file/send?accession=osu1523884097811049&amp;dlposition=inline">https://atd.ohiolink.edu/apexprod/rws_etd/send_file/send?accession=osu1523884097811049&amp;dlposition=inline</a> > especially, page 27, para 1; page 33, para 1; page 105, para 2	1												
Y	US 2017/0096683 A1 (GENZYME CORPORATION) 6 April 2017 (06.04.2017) para [0182]; para [0183]; para [0315]; para [0329]; claim 1	2-5												
Y	US 2019/0085358 A1 (OVID THERAPEUTICS INC.) 21 March 2019 (21.03.2019) para [0057]; claim 2; Fig 1a	2-5												
A	US 2007/0036757 A1 (KLEINSCHMIDT et al.) 15 February 2007 (15.02.2007) whole document	2												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"D" document cited by the applicant in the international application</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"D" document cited by the applicant in the international application	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"&" document member of the same patent family	"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	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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													
"D" document cited by the applicant in the international application	"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													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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													
"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)	"&" document member of the same patent family													
"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														
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report													
20 December 2021	FEB 28 2022													
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300													

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/49081

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

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

10

a.  forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

20

3. Additional comments:

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/49081

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 6-10  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

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

-----continued on supplemental sheet-----

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-5, limited to substitution Q588P of SEQ ID NO: 1

30

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 21/49081

continued from:

Box III: Observations where unity of invention is lacking:

Group I+: Claims 1-5, directed to an engineered adeno-associated virus (AAV) vector comprising recombinant 2 (Rec2) capsid with one or more substitutions in the heparin binding loci which confers tropism for neural tissue to the vector. The engineered AAV will be searched to the extent that the substitution corresponds to Q588P of SEQ ID NO: 1. It is believed that claims 1-5 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the engineered AAV comprises a substitution corresponding to Q588P of SEQ ID NO: 1. Additional substitutions will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected substitutions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be engineered AAV comprising a substitution corresponding to Q589L of SEQ ID NO: 1 (claims 1-5).

10

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

Special Technical Features:

Group I+ requires an engineered adeno-associated virus (AAV) vector comprising recombinant 2 (Rec2) capsid with substitutions to SEQ ID NO: 1 recited therein, wherein each invention requires a substitution not required by any of the other inventions.

Common Technical Features:

The features shared by the inventions listed as Group I+ are an engineered adeno-associated virus (AAV) vector comprising recombinant 2 (Rec2) capsid with one or more substitutions in the heparin binding loci which confers tropism for neural tissue to the vector.

20

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by "Hypothalamic Gene Therapy by an Autoregulatory BDNF Vector to Prevent Melanocortin-4-Receptor-Deficient Obesity" by Siu (hereinafter "Siu") (2018 [online]. [Retrieved on 9 November 2021]. Retrieved from website <URL: [https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws\\_etd/send\\_file/send?accession=osu1523884097811049&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws_etd/send_file/send?accession=osu1523884097811049&disposition=inline) >) in view of US 2007/0036757 A1 to Kleinschmidt et al. (hereinafter "Kleinschmidt").

Siu discloses (instant claim 1) an engineered adeno-associated virus (AAV) vector comprising recombinant 2 (Rec2) capsid comprising one or more substitutions in the heparin binding loci; wherein the substitution confers tropism for neural tissue to the vector (page 27, para 1- "that Rec2, among a family of novel engineered hybrid capsid serotypes (Rec1-4) transduces adipose tissue with far superior efficiency than naturally occurring AAV serotypes. Here we assessed the transduction of adult spinal cord at two different doses of AAV vectors"; page 33, para 1- "On the ipsilateral injection side, a trend towards higher transduction of NeuN+ neurons was observed in both Rec2 and Rec3 (88.07% and 87.96%, respectively) compared with that by AAV9 (73.20%) (Figure 5b)"; page 105, para 2- "we performed site-directed mutagenesis of three amino acids in the heparin binding domain of Rec2 (mutant Rec2, or mRec2). After intraperitoneal delivery of this novel variant, we observed either no or significantly reduced transduction of adipose tissue compared to Rec2 control vector. Instead, we next wondered whether transduction of neural cells was improved with this modified capsid. Interestingly, targeted intraparenchymal injections to striatum resulted in at least 2.90 mm of transduced brain tissue when measured longitudinally anterior to posterior in coronal sections (Figure 24A). Furthermore, this vector was able to transduce a variety of cell types, from neurons to astrocytes and microglia, indicated by NeuN, GFAP, and Iba1 immunohistochemistry, respectively").

Siu discloses (instant claim 2) the engineered AAV vector of claim 1, but does not teach wherein the one or more substitutions occurs at a residue corresponding to residues 588, 589, and/or 594 of heparin binding locus.

However, Siu teaches mutations in the heparin binding locus (page 105, para 2- "we performed site-directed mutagenesis of three amino acids in the heparin binding domain of Rec2 (mutant Rec2, or mRec2)").

Kleinschmidt discloses substitutions at various position in the heparin binding locus including position 588 (claim 1- "An AAV vector characterized in that it carries at least one mutation resulting in a heparin-binding motif of a capsid protein being located within aa positions 470 to 592"; claim 2- "arginine 588"). Since, Kleinschmidt teaches that the disclosed substitutions can increase the transduction efficiency in non-hepatic tissue (Abstract- "the AAV vectors of the present invention are particularly suitable for gene therapy by systemic application, since (a) transduction of the liver is eliminated or at least drastically reduced and (b) the transduction efficiency of non-hepatic tissues is increased"), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art, to have combined the teachings of Siu with Kleinschmidt and optimized the AAV vector to have substitution at position 588 of heparin binding domain to achieve a desired transduction efficiency, using routine experimentation.

30

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued)

Claims 6-10 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

40

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 白江 雄介

- (72)発明者 ツアオ, レイ  
アメリカ合衆国 4 3 2 0 1 オハイオ州 コロンバス、ノース・ハイ・ストリート 1 5 2 4、オハイオ  
・ステイト・イノベーション・ファウンデーション内
- (72)発明者 ホアン, ウエイ  
アメリカ合衆国 4 3 2 0 1 オハイオ州 コロンバス、ノース・ハイ・ストリート 1 5 2 4、オハイオ  
・ステイト・イノベーション・ファウンデーション内
- (72)発明者 バンキエヴィチ, クシシュトフ  
アメリカ合衆国 4 3 2 0 1 オハイオ州 コロンバス、ノース・ハイ・ストリート 1 5 2 4、オハイオ  
・ステイト・イノベーション・ファウンデーション内
- (72)発明者 ハダチェク, ピョートル  
アメリカ合衆国 4 3 2 0 1 オハイオ州 コロンバス、ノース・ハイ・ストリート 1 5 2 4、オハイオ  
・ステイト・イノベーション・ファウンデーション内
- (72)発明者 サマランチ, ルイス  
アメリカ合衆国 4 3 2 0 1 オハイオ州 コロンバス、ノース・ハイ・ストリート 1 5 2 4、オハイオ  
・ステイト・イノベーション・ファウンデーション内

F ターム (参考) 4C084 AA13 MA58 MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA16 ZA94  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA58 MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA16  
ZA94