

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年7月20日(20.07.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/122789 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/22 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01) A61P 25/24 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/06 (2006.01) A61P 25/30 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)
A61P 25/20 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/001048
- (22) 国際出願日: 2017年1月13日(13.01.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-006191 2016年1月15日(15.01.2016) JP
- (71) 出願人: 学校法人自治医科大学(JICHI MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 Tochigi (JP). 株式会社遺伝子治療研究所(GENE THERAPY RESEARCH INSTITUTION CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸3-2-1 かながわサイエンスパーク イノベーションセンタービル西棟714A Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 村松 慎一(MURAMATSU Shin-ichi); 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP). 小黒 恵司(OGURO Keiji); 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP). 島崎 久仁子(SHIMAZAKI Kuniko); 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, JP, KE, 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, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 補正された請求の範囲 (条約第19条(1))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2017/122789 A1

(54) Title: ADENO-ASSOCIATED VIRUS VIRION FOR USE IN TREATMENT OF EPILEPSY

(54) 発明の名称: てんかん治療のためのアデノ随伴ウイルスビリオン

(57) Abstract: Provided is a novel gene therapy means for neurological diseases including epilepsy. The present invention provides: a recombinant adeno-associated virus vector for use in the treatment of neurological diseases including epilepsy, which contains a polynucleotide encoding a protein capable of improving the excitation-inhibiting function of an inhibitory synapse *in vivo*, preferably neuroligin-2 protein; a pharmaceutical composition containing the recombinant vector; and others. The present invention also provides a method for treating a disease such as epilepsy using the recombinant vector.

(57) 要約: てんかん等の神経性疾患に対する新規な遺伝子治療手段を提供する。本発明は、生体における抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させるタンパク質、好ましくはニューロリギン2タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、てんかん等の神経性疾患の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクター、これを含む医薬組成物などが提供する。また、この組換えベクターを持ちいたてんかん等の疾患治療方法も提供される。

明 細 書

発明の名称： てんかん治療のためのアデノ随伴ウイルスビリオン
技術分野

[0001] 本発明は、神経性疾患のための遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ビリオンに関する。より具体的には、本発明は、てんかん、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、精神遅滞、不安、躁鬱病、片頭痛、恐怖強迫症状、薬物依存症、アンジェルマン症候群、ジスキネジア、ジストニア、アルツハイマー病、発達障害（注意欠陥多動性障害、アスペルガー症候群）などの神経精神疾患の治療のためのrAAVに関する。

背景技術

[0002] てんかんは、脳神経細胞の異常興奮が比較的限定された部位に生じた結果、体の一部にけいれんが起こる部分発作、またはその異常興奮が全皮質に波及するために全身けいれん生じる全般発作（強直間代発作など）に分類される。全般発作では意識消失が生じる。けいれんは起こさず、意識障害のみまたは異常な精神症状（精神運動発作など）を起こすこともある疾患である。現在の一般的な治療手段としては、抗てんかん薬（フェニトイン、カルバマゼピン、バルプロ酸など）による薬物療法が主体となるが、難治のものについては外科的治療が行われている。

[0003] てんかんの症例のうち約30%は、薬物治療によっても発作が抑制されない難治性疾患である。内側側頭葉てんかんでは、側頭葉切除術などの外科治療が有効な場合があるが、両側の海馬を切除すると記憶力低下を生じるため、発作焦点が両側海馬にあるような場合、手術適応にならない。また、小児てんかん性脳症（West症候群など）などの発作焦点の不明な難治性てんかん患者は、日本で約10万人存在すると見込まれ、このような患者には根治的治療法がない。

[0004] このような難治性のてんかんに対して、神経細胞を対象とする遺伝子治療により各疾患を治療する方法も検討されている。神経細胞を対象として治療

用遺伝子を送達するための手段（ベクター）として、遺伝子組換えされたアデノ随伴ウイルス（rAAV）を用いる手段が公知である。そのようなrAAVとしては、例えば、国際公開公報2012/057363、2008/124724、2003/093479などに記載のものが挙げられる。

- [0005] シナプス関連タンパク質を対象として神経細胞の活動を調整する手段が研究されている。例えば、Kohl, Cらの文献（非特許文献1）には、神経細胞のシナプス局在タンパク質であるニューロリギン2（NLGN2）を発現するrAAVベクターを海馬に直接投与して、NLGN2の過剰発現を行った結果、社会的行動の変化及び抑制性シナプス伝達を生じたことが示されているが、具体的な疾患の治療に関しては説明されていない。Moe' らの文献（非特許文献2）には、ニューロペプチドYを発現するrAAVベクターを用いててんかん治療を行って、てんかん症状が緩和されたことが示されている。また、Fangらの文献（非特許文献3）には、神経細胞のシナプス局在タンパク質であるニューロリギン1（NLGN1）のアンチセンスを発現するrAAVベクターを海馬に直接投与した結果、てんかん症状が緩和されたことが示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開公報2012/057363
特許文献2：国際公開公報2008/124724
特許文献3：国際公開公報2003/093479

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Kohl, C.ら、PLOS ONE, 2013 Feb., vol. 8, e56871
非特許文献2：Moe' , F.M.ら、JASPER' S BASIC MECHANISMS OF THE EPILEPSY, 2012,
非特許文献3：Kullmann, D.M.ら、Nature Reviews Neurology, 2014, vol. 10, page 300-304
非特許文献4：Fangら、Mol. Neurobiol. 2014 Nov.27[Epub]

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] てんかんを遺伝子導入によって治療するための新規の医薬が求められている。さらに、副作用が少ない、より平易な投与が可能であるなど、実際の投薬において有利であることが望ましい。

課題を解決するための手段

[0009] 本願発明者らは、てんかんの遺伝子治療を目指して鋭意努力した結果、抑制性シナプスの興奮抑制能を向上させるタンパク質であるニューロリギン2をコードするポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルスベクターを調製して、このベクターを生体に投与するとてんかん症状が改善することを見出して、本願発明を完成させた。

[0010] すなわち、本出願は、以下の記載される、てんかん等の神経細胞に関する疾患の治療のための、以下に示す組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクター、それを含む医薬組成物などを提供する。

[1] 生体における抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、てんかん、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、精神遅滞、不安、躁鬱病、片頭痛、恐怖強迫症状、薬物依存症、アンジェルマン症候群、ジスキネジア、ジストニア、アルツハイマー病、発達障害（注意欠陥多動性障害、アスペルガー症候群）からなる群より選択される疾患の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[2] 前記ポリヌクレオチドが、配列番号2、4もしくは6のアミノ酸配列、またはこれら配列と約90%以上の同一性を有してニューレキシンと結合するアミノ酸配列を含むニューロリギン2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、[1]に記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[3] 前記疾患がてんかんである、[1]又は[2]に記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[4] 前記組換えアデノ随伴ウイルスベクターが、野生型AAV1カプシドタンパク質のアミノ酸配列中445位のチロシンがフェニルアラニンに置換されて

いる変異アミノ酸配列を有するタンパク質、野生型のAAV2カプシドタンパク質のアミノ酸配列中445位のアミノ酸がフェニルアラニンに置換されている変異アミノ酸配列を有するタンパク質、または野生型のAAV9カプシドタンパク質のアミノ酸配列中446位のアミノ酸がフェニルアラニンに置換されている変異アミノ酸配列を有するタンパク質を含む、[1]～[3]のいずれかに記載のアデノ随伴ウイルス組換えベクター。

[5] 前記ポリヌクレオチドが、シナプシンIプロモーター配列、ミエリン塩基性タンパク質プロモーター配列、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター配列、カルシウム/カルモジュリンー依存性蛋白キナーゼII(CMKII)プロモーター配列、チュブリン α Iプロモーター配列、血小板由来成長因子 β 鎖プロモーター配列、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)プロモーター配列、L7プロモーター配列(小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター)、グリア線維酸性タンパク質(hGfa2)プロモーター配列、およびグルタミン酸受容体デルタ2プロモーター(小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター)配列、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65/GAD67)プロモーター配列からなる群より選択されるプロモーター配列を含む、[1]～[4]のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[6] 前記ポリヌクレオチドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV8、およびAAV9からなる群より選択されるインバーテッドターミナルリピート(ITR)を含む、[1]～[5]のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[7] 前記ポリヌクレオチドが、興奮性シナプスの興奮を抑制するためのポリヌクレオチドをさらに含む、[1]～[6]のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[8] [1]～[7]のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルス組換えベクターを含む、医薬組成物。

[9] 脳内投与されるための、[8]に記載の医薬組成物。

[10] 髄腔内投与されるための、[8]に記載の医薬組成物。

[11] 末梢投与されるための、[8]に記載の医薬組成物。

[12] 神経精神疾患に係る化学療法剤と併用するための、[8]～[11]のいずれかに記載の医薬組成物。

[13] 生体における抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルスベクターを生体に投与することを含む、てんかん、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、精神遅滞、不安、躁鬱病、片頭痛、恐怖強迫症状、薬物依存症、アンジェルマン症候群、ジスキネジア、ジストニア、アルツハイマー病、発達障害（注意欠陥多動性障害、アスペルガー症候群）からなる群より選択される疾患の治療方法。

[14] 化学療法と併用される、[13]に記載の治療方法

発明の効果

[0011] 本願発明に係るシナプス抑制系の機能増強を遺伝子治療によって行うことは、てんかんの治療法として有用である。小児てんかん性脳症（West症候群など）などの発作焦点の不明な難治性てんかん患者に対しても、本願発明の組成物は有効であることが期待できる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1 aは、血管投与型rAAVを投与したマウスにおける組換えニューロリギン2タンパク質の発現を、組織切片に対するFLAG抗体染色によって確認した結果を示す。図1 bは、コントロールを投与したマウスにおける組換えニューロリギン2の発現を検出した結果を示す。

[図2]3種の心腔内投与（NLGN2を発現する血管投与型rAAV、GFPタンパク質を発現する血管投与型rAAV、および生理食塩水の心腔内投与）を行ったマウスのてんかん発作頻度を、横軸に記載される週齢において測定した結果を示す。

[図3]上記3種の心腔内投与を行ったマウスの発作時間の結果を示す。

[図4]上記3種の心腔内投与を行ったマウスの発作強度の結果を示す。

[図5]図3及び図4に記載される結果の発作時間×発作強度の集計結果を示す

。

[図6]上記3種の投与を行ったマウスを各週齢において電気刺激した際の閾値の結果を示す。

[図7]NLGN2を発現する血管投与型rAAV、GFPタンパク質を発現する血管投与型rAAV、および生理食塩水を海馬に局所投与したマウス（図7 a）、ならびにNLGN2を発現する血管投与型rAAV及びGFPタンパク質を発現する血管投与型rAAVを心腔内投与したマウス（図7 b）のてんかんの発作頻度を、横軸に記載される週齢において測定した結果を示す。

[図8]図7のマウスについて発作時間を測定した結果を示す。

[図9]図7のマウスについて発作強度を測定した結果を示す。

[図10]図7のマウスについて発作時間×発作強度を集計した結果を示す。

[図11]図7のマウスについて、各週齢において測定した電気刺激の閾値を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本出願において、生体における抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、てんかん、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、精神遅滞、不安、躁鬱病、片頭痛、恐怖強迫症状、薬物依存症、アンジェルマン症候群、ジスキネジア、ジストニア、アルツハイマー病、発達障害（注意欠陥多動性障害、アスペルガー症候群）からなる群より選択される疾患の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクターが提供される。

[0014] 1. 興奮性シナプス及び抑制性シナプスにおける興奮制御について

本出願において、シナプスとは、神経細胞の軸索終末等が膨らんだシナプス小頭部と、その標的のニューロンまたは筋細胞との接合部を指す。生体において、シナプスには、興奮を伝達する興奮性シナプスと、興奮の伝達を抑制する抑制性シナプスとが存在する。また、大部分のシナプスは、化学物質の伝達によって媒介される化学シナプス（信号伝達が遅い）である。もう一つの型は、時間的に速い応答を示す電気シナプスであるが、成熟哺乳類の中

中枢神経では余り見られない。

- [0015] 興奮性シナプスにおいて、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン酸、ホモシステイン等のアミノ酸などが伝達物質として機能して、興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential: EPSP) が発生し、その電位が閾値を超えると興奮 (インパルス) の伝達が行われる。一方、抑制性シナプスにおいて、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、グリシン、タウリン、アラニン、シスタチオニン、セリン等のアミノ酸などが伝達物質として機能して、抑制性シナプス後電位 (inhibitory postsynaptic potential: IPSP) が発生し、シナプス後ニューロンのインパルスを抑制するか、発生しにくくすると考えられている。EPSPやIPSPには、速い時間経過 (全経過100ミリ秒以内) を示すもの (fast EPSPまたはfast IPSP) と、数10秒から数10分続く遅い遅い時間経過を示すもの (slow EPSPまたはslow IPSP) とが存在する。ここで、速いIPSPでは、GABA_A受容体 (Cl⁻) チャンネルに関するGABAやグリシン受容体 (Cl⁻) チャンネルに関するグリシンが作用し、遅いIPSPの伝達物質としては、GABA_B受容体を介するGABA_Bやアセチルコリンやカテコールアミンが作用することが知られている。
- [0016] 抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させるタンパク質としては、シナプスの安定化に関与するニューロリギン2及びニューレキシン、GABA受容体、GABA生合成に関与するグルタミン脱炭酸酵素 (GAD)、グリシン輸送に関与するNa⁺チャンネルタンパク質及びCl⁻チャンネルタンパク質、ニューロペプチドY、足場タンパク質のゲフィリン、膜貫通蛋白質で抑制性シナプス形成に関与するSLITRK3、SLITRK3と結合する受容体型チロシンホスファターゼのPTPRDが挙げられる。本発明のベクターが含むポリヌクレオチドは、抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させるタンパク質として、好ましくはニューロリギン2タンパク質をコードするヌクレオチド配列 (配列番号2、4又は6) を含む。
- [0017] ニューロリギン (NLGN) とは、シナプス後膜に存在する膜タンパク質ファミリーをいい、一般にはニューロリギン1~4に分けられる。これらニュー

ロリギンは各々、シナプス前膜の細胞接着因子ニューレキシン (Neurexin : NRXN) タンパク質と特異的に結合してシナプス前末端とシナプス後部とを繋いでいる。ニューロリギン1は興奮性シナプスに局在しており、興奮性シナプス伝達を媒介していると考えられている。一方、ニューロリギン2は、抑制性シナプスに局在しており、抑制性シナプス伝達を媒介していると考えられている。また、ニューロリギン3は興奮性シナプスと抑制性シナプスとの両方、心臓、膵臓等に発現しており、ニューロリギン4は心臓、肝臓等に発現している。

[0018] ニューロリギンの結合パートナーであるニューレキシンタンパク質は、一般にはニューレキシン1 α ~3 α 及び1 β ~3 β に分けられる。ここで、 α 体と β 体とは、同じ遺伝子から異なるプロモーターの作用によって生じるそれぞれ長鎖タンパク質と短鎖タンパク質である。本願発明において用いるニューロリギン2はニューレキシン1 α と機能的に結合する。

[0019] 本願発明において用いられるニューロリギン2タンパク質のアミノ酸配列としては、公知のものが利用できる。このようなアミノ酸配列としては、例えば、Genbankアクセッション番号AAM46111 (ヒト)、EDL12455 (マウス)、EDM04903 (ラット) が挙げられる。他に利用可能な動物種としては、例えば、サル、イヌ、ブタ、ウシ、ウマなどの哺乳動物由来のものが挙げられる。ヒト、マウス及びラットのニューロリギン2タンパク質のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号2、4及び6に記載される。

[0020] また、本願発明において用いられるニューロリギン2タンパク質は、配列番号2、4又は6アミノ酸配列に対して、約90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ生理条件下でニューレキシン1 α タンパク質と結合可能であるタンパク質が含まれる。上記数値は一般的に大きい程好ましい。なお、ヒトとマウスのニューロリギン2のアミノ酸配列は98%以上同一であり、ヒト

とラットのニューロリギン2のアミノ酸配列は91%以上同一である。本発明において、変異タンパク質と元のタンパク質とが同程度に機能する（例えば、同程度の結合能を示す）とは、例えば、比活性が約0.01~100、好ましくは約0.5~20、より好ましくは約0.5~2である範囲内であることを意味するが、これらに限定されない。

[0021] さらに、本願発明において用いられるニューロリギン2タンパク質は、配列番号2、4又は6のアミノ酸配列または上記同一性を有するアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加したアミノ酸配列を含み、かつ生理条件下でニューレキシン1 α タンパク質と結合可能であるタンパク質が含まれる。上記のアミノ酸の欠失、置換、挿入及び付加のうち2種以上が同時に生じてよい。このようなタンパク質としては、例えば、配列番号2、4又は6のアミノ酸配列に、例えば、1~50個、1~40個、1~39個、1~38個、1~37個、1~36個、1~35個、1~34個、1~33個、1~32個、1~31個、1~30個、1~29個、1~28個、1~27個、1~26個、1~25個、1~24個、1~23個、1~22個、1~21個、1~20個、1~19個、1~18個、1~17個、1~16個、1~15個、1~14個、1~13個、1~12個、1~11個、1~10個、1~9個（1~数個）、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、1~3個、1~2個または1個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ生理条件下でニューレキシン α タンパク質と結合可能なタンパク質が挙げられる。タンパク質が挙げられる。上記アミノ酸残基の欠失、置換、挿入および／または付加の数は、一般的に小さい程好ましい。

[0022] 本発明のタンパク質（ポリペプチド）において相互に置換可能なアミノ酸残基の例を以下に示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、*o*-メチルセリン、*t*-ブチルグリシン、*t*-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン；B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピ

ン酸、2-アミノスベリン酸； C群：アスパラギン、グルタミン； D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸； E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン； F群：セリン、スレオニン、ホモセリン； G群：フェニルアラニン、チロシン。アミノ酸残基が置換されたニューロリギンタンパク質は、通常の遺伝子操作技術など、当業者に公知の方法に従って作製することができる。このような遺伝子操作手順については、例えば、Molecular Cloning 3rd Edition, J.Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997などを参照することができる。

[0023] また、本願発明に用いられる好ましいポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1、3または5のポリヌクレオチド配列において、1個以上（例えば、1～50個、1～40個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、1～10個、1～9個（1～数个）、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、1個など）のヌクレオチドの欠失、置換、挿入および／または付加を有するポリヌクレオチドであって、配列番号2、4または6のアミノ酸配列を含むタンパク質、あるいは配列番号2、4または6のアミノ酸配列において上記の1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加したアミノ酸配列を含みニューレキシン1 α と結合可能であるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。これら欠失、置換、挿入及び付加のうち2種以上の組み合わせを同時に含んでもよい。上記ヌクレオチドの欠失、置換、挿入および／または付加の数は、一般的に小さい程好ましい。また、本願発明において好ましいポリヌクレオチドは、例えば、配列番号：7、9もしくは11またはその相補配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドであって、配列番号2、4または6のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、あるいは配列番号2、4または6のアミノ酸配列において上記の1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加したアミノ酸配列を含みニューレキシンと結合可

能であるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。

[0024] ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning 3rd Edition, J.Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、製造業者により提供される使用説明書などに記載の方法に従って行うことができる。ここで、「ストリンジエントな条件」は、低ストリンジエントな条件、中ストリンジエントな条件及び高ストリンジエントな条件のいずれでもよい。

「低ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、32℃の条件である。また、「中ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、42℃の条件である。「高ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、50℃の条件である。これらの条件において、温度を上げるほど高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0025] ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、FASTA、BLASTなどの相同性検索ソフトウェアにより、デフォルトのパラメーターを用いて計算したときに、配列番号：7、9又は11のヌクレオチド配列と、例えば、70%以上、80%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを挙げるができる。上記相同性の数値は一般的に大きい程好ましい。

[0026] アミノ酸配列やポリヌクレオチド配列の同一性または相同性は、カーリン

およびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990 ; Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 5873, 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。

[0027] 2. 本発明の対象疾患について

本願発明は、てんかん、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、精神遅滞、不安、躁鬱病、片頭痛、恐怖強迫症状、薬物依存症、アンジェルマン症候群、ジスキネジア、ジストニア、アルツハイマー病、発達障害（注意欠陥多動性障害、アスペルガー症候群）からなる群より選択される疾患、とりわけてんかんの治療に有用であるrAAVベクターを提供するものである。

[0028] てんかんとは、大脳の神経細胞の過剰な同期的発射活動が起こることによって、同一個人の中では同じ型の臨床発作(全身強直-間代発作、欠神発作、幻聴発作、四肢の一部の強直発作など)が繰り返す病態を指す。1981年の国際抗てんかん連盟 International League Against Epilepsy(ILAE)の分類では、臨床発作は部分発作(単純部分発作、複雑部分発作)、全般発作(欠神発作、ミオクロニー発作、強直-間代発作、脱力発作)、分類不能発作に区分されている。また、1989年のILAEの「てんかん、てんかん症候群、および関連発作性疾患の分類」では、局在関連性(年齢関連性、症候性、潜因性に下位分類)、全般性(特発性、潜因性あるいは症候性、症候性に下位分類)、焦点性か全般性か決定できないもの、特殊症候群(熱性痙攣など)に分けられている。

[0029] また、1歳前後の乳児期に始まる短時間の前屈型発作を主徴とするてんかんとして、ウエスト症候群(または點頭痙攣)がある。この疾患は、上体と頭部を強く前屈する瞬間的強直発作が続けて起きるシリーズを形成する。ウ

エスト症候群の病因は多様であり、先天脳奇形、結節性硬化症など神経皮膚症候群、ビタミンB6欠乏症など先天代謝異常などが公知である。精神発達遅滞(精神遅滞)を伴うことが多く、成長に伴って全身強直-間代発作(大発作てんかん)を主とする全般てんかんやレノックス症候群、側頭葉てんかんなど他の型のでんかんに移行することが普通である。本発明のrAAVベクターは、ウエスト症候群に対して治療効果を有し得る。

[0030] 3. 本発明の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクター

本願発明において、シナプスの機能制御に用いられる遺伝子を神経系細胞に送達するためのベクターとしては、WO 2012/057363に記載される、末梢投与によっても神経細胞に効率的に遺伝子送達できる組換えアデノ随伴ウイルスベクター(本明細書中、血管投与型ベクターともいう)、あるいはWO 2008/124724などに記載されるものを用いることができる。本発明のrAAVベクターは、生体の血液脳関門を通過可能であり、したがって血液脳関門を介して脳に送達される投与手段、例えば患者への末梢投与などによって、患者の脳、脊髄などの神経系細胞に目的の治療用遺伝子を導入可能である。また、髄腔内投与や脳内の標的部位に直接投与することも可能である。

[0031] 本発明のrAAVベクターは、好ましくは由来の天然のアデノ随伴ウイルス1型(AAV1)、2型(AAV2)、3型(AAV3)、4型(AAV4)、5型(AAV5)、6型(AAV6)、7型(AAV7)、8型(AAV8)、9型(AAV9)などより作製できるが、これらに限定されない。これらのアデノ随伴ウイルスゲノムのヌクレオチド配列は公知であり、それぞれ、GenBank登録番号: AF063497.1 (AAV1)、AF043303 (AAV2)、NC_001729(AAV3)、NC_001829.1 (AAV4)、NC_006152.1 (AAV5)、AF028704.1 (AAV6)、NC_006260.1 (AAV7)、NC_006261.1 (AAV8)、AY530579 (AAV9)のヌクレオチド配列を参照できる。これらのうち、2型、3型、5型および9型がヒト由来である。本発明において、特にAAV1、AAV2またはAAV9に由来するカプシドタンパク質(VP1、VP2、VP3など)を利用することが好ましい。AAV1とAAV9はヒト由来のAAVのうちで神経細胞への感染効率が比較的高いことが報告されている(Taymans, et al., Hum Gene Ther 1

8:195-206, 2007など)。

[0032] 本発明に用いるrAAVベクターが含むカプシドタンパク質は、好ましくはWO 2012/057363やWO 2008/124724などに記載されるように、野生型のアミノ酸配列と比較して、少なくとも1つのチロシンがフェニルアラニンなどの別のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を有する変異体タンパク質である。例えば、野生型AAV1カプシドタンパク質のアミノ酸配列中445位のチロシンがフェニルアラニンに置換されているアミノ酸配列(配列番号9)、野生型のAAV2カプシドタンパク質のアミノ酸配列中444位のチロシンがフェニルアラニンに置換されているアミノ酸配列(配列番号10)、または野生型のAAV9カプシドタンパク質のアミノ酸配列中446位のチロシン残基がフェニルアラニン残基に置換されているアミノ酸配列(配列番号11)を有する変異タンパク質が挙げられる(WO 2012/057363、WO 2008/124724)。このようなカプシドタンパク質は、単独で又は他のカプシドタンパク質メンバー(例えば、VP2、VP3など)と一緒にキャプソメアを形成する機能を有する。また、当該キャプソメア内には、神経系細胞に送達されるための目的の治療用遺伝子などを含むポリヌクレオチドがパッケージングされる。

[0033] 本発明のrAAVベクターは、血流中に投与される場合、成体及び胎児を含む生体の血液脳関門を通過できる。本発明において、遺伝子導入標的としての神経系細胞は、少なくとも脳、脊髄など中枢神経系に含まれる神経細胞を含み、さらに、神経膠細胞、小膠細胞、星状膠細胞、乏突起膠細胞、脳室上衣細胞、脳血管内皮細胞などを含んでもよい。遺伝子導入される神経系細胞のうち神経細胞の割合は、好ましくは、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上、または100%である。

[0034] 本発明において用いられるRepタンパク質は、ITR配列を認識してその配列に依存してゲノム複製を行う機能、ウイルスベクター内へと野生型AAVゲノム

(又はrAAVゲノム)をリクルートしてパッケージングする機能、本発明のrAAVベクターを形成する機能など公知の機能を同程度に有する限り、上記と同様の数のアミノ酸配列同一性を有してもよいし、上記と同様の数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および／または付加を含み得る。機能的に同程度の範囲については、上記の比活性に関する説明において記載される範囲が挙げられる。本発明において、好ましくは、公知のAAV3由来のRepタンパク質が使用される。

[0035] 本発明において用いられるRepタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ITR配列を認識してその配列に依存してゲノム複製を行う機能、ウイルスベクター内へと野生型AAVゲノム(又はrAAVゲノム)をリクルートしてパッケージングする機能、本発明のrAAVベクターを形成する機能などの公知の機能を同程度に有するRepタンパク質をコードする限り、上記と同様の数の同一性を有してもよいし、上記と同様の数のヌクレオチドの欠失、置換、挿入および／または付加を含んでもよい。機能的に同程度の範囲については、上記の比活性に関する説明において記載される範囲が挙げられる。本発明において、好ましくは、AAV3またはAAV2由来のrep遺伝子が使用される。

[0036] 本発明の1実施形態において、上記の野生型AAVゲノムの内部領域にコードされるカプシドタンパク質VP1など(VP1、VP2および／またはVP3)、およびRepタンパク質は、これをコードするポリヌクレオチドがAAVヘルパープラスミドに組み込まれて用いられる。本発明で用いるカプシドタンパク質(VP1、VP2および／またはVP3)、ならびにRepタンパク質は、必要に応じて1種、2種、3種またはそれ以上のプラスミドに組み込まれていてもよい。場合によって、これらのカプシドタンパク質およびRepタンパク質のうちの1種以上がAAVゲノムに含まれてもよい。本発明において、好ましくは、カプシドタンパク質(VP1、VP2および／またはVP3)およびRepタンパク質は全て、1種のポリヌクレオチドにコードされ、AAVヘルパープラスミドとして提供される。

[0037] 本発明のrAAVベクター中にパッケージングされるポリヌクレオチド(すなわち、ポリヌクレオチド)は、野生型ゲノムの5'側および3'側に位置するITR

の間に位置する内部領域（すなわち、rep遺伝子及びcap遺伝子の一方または両方）のポリヌクレオチドを、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（治療用遺伝子）およびこのポリヌクレオチドを転写するためのプロモーター配列などを含む遺伝子カセットによって置換することにより作製できる。好ましくは、5'側および3'側に位置するITRは、それぞれAAVゲノムの5'末端および3'末端に位置する。好ましくは、本発明のrAAVゲノムは、5'末端および3'末端に位置するITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV8またはAAV9のゲノムに含まれる5'側ITRおよび3'側ITRを含む。一般的に、ITR部分は容易に相補配列が入れ替わった配列(flip and flop structure)をとるため、本発明のrAAVゲノムに含まれるITRは、5'と3'の方向が逆転していてもよい。本発明のrAAVゲノムにおいて、内部領域と置き換えられるポリヌクレオチド（すなわち、治療用遺伝子）の長さは、元のポリヌクレオチドの長さと同程度が実用上好ましい。すなわち、本発明のrAAVゲノムは、全長が野生型の全長である5kbと同程度、例えば約2~6kb、好ましくは約4~6kbであることが好ましい。本発明のrAAVゲノムに組込まれる治療用遺伝子の長さは、プロモーター、ポリアデニレーションなどを含めた転写調節領域の長さ（例えば、約1~1.5kbと仮定する場合）を差し引くと、好ましくは長さが約0.01~3.7kb、より好ましくは長さが約0.01~2.5kb、さらに好ましく約0.01~2kbであるが、これに限定されない。

[0038] 一般的に、組換えアデノ随伴ウイルスベクター内にパッケージングされるポリヌクレオチドは、一本鎖である場合には目的の治療用タンパク質を発現するまで時間（数日）を要する場合がある。この場合、導入される治療用遺伝子を、自己相補性を有するsc (self-complementary)型となるように設計して、より短期間に効果を示すことも可能である。具体的な詳細については、例えば、Foust KD, et al. (Nat Biotechnol. 2009 Jan;27(1):59-65)などに記載されている。本発明のrAAVベクター中にパッケージングされているポリヌクレオチドは、非sc型であってもよいしsc型であってもよい。

[0039] 1実施形態において、本発明のrAAVベクターは、好ましくは、神経系細胞

特異的なプロモーター配列およびそのプロモーター配列と作動可能に連結された治療用遺伝子を含むポリヌクレオチドを含む（すなわち、そのようなポリヌクレオチドがパッケージングされている）。本発明に用いるプロモーター配列としては、神経系細胞に特異的なプロモーター配列は、例えば、神経細胞、神経膠細胞、乏突起膠細胞、脳血管内皮細胞、小膠細胞、脳室上皮細胞などに由来するが、これらに限定されない。このようなプロモーター配列としては、具体的には、シナプシンIプロモーター配列、ミエリン塩基性タンパク質プロモーター配列、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター配列、グリア線維性酸性タンパク質プロモーター配列、L7プロモーター配列（小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター）、グルタミン酸受容体デルタ2プロモーター（小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター）配列、グリア線維酸性タンパク質(hGfa2)プロモーター配列、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD65/GAD67）プロモーター配列が挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明のrAAVベクターにおいて、カルシウム/カルモジュリンー依存性蛋白キナーゼII(CMKII)プロモーター配列、チュブリン α Iプロモーター配列、血小板由来成長因子 β 鎖プロモーター配列などのプロモーター配列も使用され得る。上記のこれらプロモーター配列は、単独であっても任意の複数の組み合わせであってもよい。また、CMVプロモーター、CAGプロモーターなどの通常使用される強力なプロモーター配列であってもよい。本発明において特に好ましいプロモーター配列としては、シナプシンIプロモーター配列、ミエリン塩基性タンパク質プロモーター配列、L7プロモーター配列（小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター）、グルタミン酸受容体デルタ2プロモーター（小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター）が挙げられる。さらに、mRNAの転写、タンパク質への翻訳などを補助するエンハンサー配列、Kozak配列、適切なポリアデニル化シグナル配列などの公知の配列を含んでもよい。

[0040] 本発明のrAAVゲノムに組込まれる目的の治療用遺伝子は、高い効率で神経系細胞に送達され、その細胞のゲノム中に組込まれる。本発明のrAAVベクターを使用する場合、従来のrAAVベクターを用いる場合と比較して、約10倍以

上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上または約50倍以上の数の神経細胞に遺伝子導入可能である。遺伝子導入された神経細胞の数は、例えば、任意のマーカ遺伝子を組込んだrAAVベクターゲノムをパッケージングするrAAVベクターを作製し、次いでこのrAAVベクターを被検動物に投与して、rAAVベクターゲノムに組み込まれたマーカ遺伝子（またはマーカタンパク質）を発現する神経系細胞の数を計測することによって測定可能である。使用されるマーカ遺伝子としては公知のものを選択できる。このようなマーカ遺伝子としては、例えば、LacZ遺伝子、緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子、発光タンパク質遺伝子（ホタルルシフェラーゼなど）などが挙げられる。

[0041] 4. 他の治療用遺伝子について

抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させる他の手段または追加の手段として、例えば、ニューロリギン2の結合パートナーであるニューレキシン1 α の発現を増強させる手段、ニューロリギン2の細胞内シグナル伝達を向上させる手段などが期待できる。あるいは、そのような他の手段または追加の手段として、興奮性シナプスの機能を低下させる手段、例えば興奮性シナプスの作動に関するタンパク質の発現を抑制すること、具体的にはニューロリギン1のアンチセンスによってニューロリギン1を低減させる手段（非特許文献4：Fangら、Mol. Neurobiol. 2014 Nov.）等もまた有用となり得る。

[0042] 本発明のrAAVベクターは、シナプスの機能制御のための異なるタンパク質を発現させてもよいが、このような異なるタンパク質としては、例えば、シナプスの膜上に存在するタンパク質やレセプターに対する中和抗体（抗原結合部位、Fab、Fab2、単鎖抗体（scFv）などを含む）などが挙げられる。これら抗体のクラスとしては、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE等が挙げられる。

[0043] 例えば興奮性シナプスの機能抑制のために、本発明のrAAVゲノムに組み込まれる治療用遺伝子は、アンチセンス分子、リボザイム、干渉性RNA（iRNA）、マイクロRNA(miRNA)のような、標的とする内在性遺伝子の機能を変化（例えば、破壊、低下）させるためのポリヌクレオチド、または内在性タンパク質の発現レベルを変化（例えば、低下）させるためのポリヌクレオチドであっ

てもよい。例えば、アンチセンス配列を用いて標的遺伝子の発現を効果的に阻害するには、好ましくは、アンチセンス核酸の長さは、10塩基以上、15塩基以上、20塩基以上であり、100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンス核酸の長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

[0044] リボザイムを用いることによって、目的のタンパク質のmRNAを特異的に切断してそのタンパク質の発現を抑制できる。このようなりボザイムの設計については、種々の公知文献を参照することができる（例えば、FEBS Lett. 228: 228, 1988; FEBS Lett. 239: 285, 1988; Nucl. Acids. Res. 17: 7059, 1989; Nature 323: 349, 1986など参照）。

[0045] また、「RNAi」とは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNAを細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも抑制される現象のことを指す。ここで用いられるRNAとしては、例えば、21～25塩基長のRNA干渉を生ずる二重鎖RNA、例えば、dsRNA (double strand RNA)、siRNA (small interfering RNA)、shRNA (short hairpin RNA)、又はmiRNA (microRNA)が挙げられる。このようなRNAは、リポソームなどの送達システムにより所望の部位に局所送達させることも可能であり、また上記二重鎖RNAが生成されるようなベクターを用いてこれを局所発現させることができる。このような二重鎖RNA(dsRNA、siRNA、shRNA又はmiRNA)の調製方法、使用方法などは、多くの文献から公知である（特表2002-516062号公報；米国公開許第2002/086356A号；Nature Genetics, 24(2), 180-183, 2000 Feb. 等参照）。

[0046] これら他の治療用遺伝子を用いるために、例えば、本発明のベクターが含むポリヌクレオチドに、公知のinternal ribosome entry site(IRES)配列を介在させることができる。本発明のrAAVゲノムが非sc型である場合、より広範な長さのプロモーターと目的遺伝子とを選択でき、複数の目的遺伝子を利用することも可能である。本発明のrAAVベクター中にパッケージングされるポリヌクレオチドの全長は約5kb以下（ITR領域を除いて約4.7kb以下）である

ことが好ましい。

[0047] 5. 本発明のrAAVベクターの調製

本発明のrAAVベクターを調製する方法としては一般的なものを利用することができ、例えば、(a)カプシドタンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド（一般に、AAVヘルパープラスミドと称される）、および(b)本発明のrAAVベクター内にパッケージングされる第2のポリヌクレオチド（目的の治療用遺伝子を含む）を、培養細胞にトランスフェクトする工程を含むことができる。本発明における調製方法はさらに、(c)アデノウイルス（AdV）ヘルパープラスミドと称されるアデノウイルス由来因子をコードするプラスミドを培養細胞にトランスフェクトする工程、またはアデノウイルスを培養細胞に感染させる工程も含むことができる。さらに、上記のトランスフェクトされた培養細胞を培養する工程、および培養上清より組換えアデノ随伴ウイルスベクターを収集する工程を含むこともできる。(d)さらに、本発明のrAAVベクターの調製方法は、上記(a)(b)のポリヌクレオチドをそれぞれ含むバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞であるSf9などに感染させることにより、rAAVを大量に産生する方法も含む。このような方法は既に公知であり、本明細書の実施例においても利用される。

[0048] 第1のポリヌクレオチド(a)において本発明のカプシドタンパク質をコードするヌクレオチドは、好ましくは、培養細胞において作動可能である公知のプロモーター配列に作動可能に結合される。このようなプロモーター配列としては、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、EF-1 α プロモーター、SV40プロモーターなどを適宜使用することができる。さらに、公知のエンハンサー配列、Kozak配列、ポリA付加シグナル配列などを適宜含み得る。

[0049] 第2のポリヌクレオチド(b)は、神経系細胞特異的プロモーターと作動可能である位置に治療用遺伝子を含む。さらに、公知のエンハンサー配列、Kozak配列、ポリA付加シグナル配列などを適宜含み得る。この第1のポリヌクレオチドはさらに、神経系細胞特異的プロモーター配列の下流に、種々の公知の

制限酵素によって切断可能なクローニングサイトを含み得る。複数の制限酵素認識部位を含むマルチクローニングサイトがより好ましい。当業者は、公知の遺伝子操作手順に従って、目的の治療用遺伝子を神経系細胞特異的プロモーターの下流に組込むことができる。このような遺伝子操作手順については、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning 3rd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) などを参照のこと。

[0050] 本発明のrAAVベクターの調製において、ヘルパーウイルスプラスミド（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス又はワクシニア）を使用して、上記第1および第2のポリヌクレオチドと同時に培養細胞に導入され得る。好ましくは、本発明の調製方法は、アデノウイルス (AdV) ヘルパープラスミドを導入する工程をさらに含む。本発明において、好ましくは、AdVヘルパーは、培養細胞と同じ種のウイルスに由来する。例えば、ヒト培養細胞293Tを用いる場合、ヒトAdV由来のヘルパーウイルスベクターを用いることができる。このようなAdVヘルパーベクターとして、市販されているもの（例えば、Agilent Technologies社のAAV Helper-Free System (カタログ番号240071)) を使用することができる。

[0051] 本発明のrAAVベクターの調製において、上記の1種以上のプラスミドを培養細胞にトランスフェクションする方法は、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法など、公知の種々の方法を使用することができる。このような方法は、例えばMolecular Cloning 3rd Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997などに記載されている。

[0052] 6. 本発明のrAAVベクターを含む医薬組成物

本発明のrAAVベクターは、神経疾患、とりわけシナプスにおけるタンパク質機能異常に係る疾患（例、統合失調症、自閉症スペクトラム障害など）などに対する治療に有用である遺伝子を含むことができる。それら遺伝子を含むrAAVベクターを、例えば血管内に投与し、血液脳関門を通過して脳、脊髄

、網膜の神経細胞中に組み込むことができる。このような治療用遺伝子を含むrAAVベクターは、本発明の医薬組成物に含められる。このような治療用遺伝子としては、例えば上記のような抗体、神経栄養因子(NGF)、成長因子(HGF)、酸性線維細胞増殖因子(aFGF)、miRNAなどをコードするポリヌクレオチドを選択できる。このようなrAAVベクターを被検体に末梢投与することによって、などの神経疾患を治療することが期待できる。

[0053] 本発明の医薬組成物の有効成分は単独で、あるいは組み合わせて配合されても良いが、これに製薬学的に許容しうる担体あるいは製剤用添加物を配合して製剤の形態で提供することもできる。この場合、本発明の有効成分は、例えば、製剤中、0.1～99.9重量%含有することができる。

[0054] 製薬学的に許容しうる担体あるいは添加剤としては、例えば賦形剤、崩壊剤、崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、溶解剤、溶解補助剤、等張化剤、pH調整剤、安定化剤等を用いることができる。経口投与の場合、微晶質セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウムなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸などの崩壊剤、ポリビニルピロリドンなどの顆粒形成結合剤、滑沢剤など、当該分野において慣用される賦形剤と共に使用することができる。経口投与用として水性懸濁液および／またはエリキシルにしたい場合、活性成分を各種の甘味料または香味料、着色料または染料と併用する他、必要であれば乳化剤および／または懸濁化剤も併用し、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン等、およびそれらを組み合わせた希釈剤と共に使用することができる。

[0055] 経口投与に適する製剤の例としては、例えば散剤、錠剤、カプセル剤、細粒剤、顆粒剤、液剤またはシロップ剤等を挙げることが出来る。非経口投与に適する製剤としては、例えば注射剤、髄注液、坐剤等を挙げることが出来る。非経口投与の場合、本発明の有効成分をゴマ油または落花生油のいずれかに溶解するか、あるいはプロピレングリコール水溶液に溶解した溶液を使用することができる。水溶液は必要に応じて適宜に緩衝し（好適にはpH 8以上）、液体希釈剤をまず等張にする必要がある。このような液体希釈剤と

しては、例えば、生理食塩水を使用できる。調製された水溶液は静脈内注射に適し、一方、油性溶液は関節内注射、筋肉注射および皮下注射に適する。これらすべての溶液を無菌状態で製造するには、当業者に周知の標準的な製薬技術で容易に達成することができる。さらに、本発明の有効成分は皮膚など局所的に投与することも可能である。この場合は標準的な医薬慣行によりクリーム、ゼリー、ペースト、軟膏の形で局所投与するのが望ましい。

[0056] 本発明の医薬組成物の投与量は特に限定されず、疾患の種類、患者の年齢や症状、投与経路、治療の目的、併用薬剤の有無等の種々の条件に応じて適切な投与量を選択することが可能である。本発明の医薬組成物の投与量は、例えば、成人（例えば、体重60kg）1日当たり1~5000mg、好ましくは10~1000mgであるが、これらに限定されない。これらの1日投与量は2回から4回に分けて投与されても良い。また、投与単位としてvg (vector genome) を利用する場合、例えば、体重1kgあたり、 10^9 ~ 10^{14} vg、好ましくは 10^{10} ~ 10^{13} vg、さらに好ましくは 10^{10} ~ 10^{12} vgの範囲の投与量を選択することが可能であるが、これらに限定されない。

[0057] 7. 本発明のrAAVベクターの投与

本発明のrAAVは、生体の血液脳関門（未完成な胎児及び新生児の血液脳関門、および確立した成体の血液脳関門を含む）を通過可能であるので、生体（成体および胎児または新生児を含む）に末梢投与することによって、本発明のrAAVを脳、脊髄などの神経系細胞に遺伝子の送達が可能である。さらに、本発明に用いるrAAVベクターは、末梢投与によって成体の脳、脊髄などに含まれる神経細胞を標的とすることができる。本明細書において末梢投与とは、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、心腔内投与、筋肉内投与、臍帯血管内投与（例えば、胎児を対象とする場合）など、当業者に末梢投与として通常理解される投与経路をいう。また、血液以外に脳と流体接続される投与方法、例えば髄腔内投与も、本発明のrAAVベクターに用いることができる。別の実施形態において、本発明のrAAVベクターを、海馬などの脳内の標的部位に局所投与することも可能である。例えば、本発明のrAAVを、髄腔内投

与にて髄液内に、または末梢投与によって血中内に投与する場合、脳実質内投与と比較して、より平易な投与手段を提供できる。

[0058] 8. 本発明のrAAVベクターの調製キット

本発明は別の実施形態において、本発明のrAAVを作製するためのキットを提供する。このようなキットは、例えば、(a)カプシドタンパク質VP1等を発現するための第1のポリヌクレオチド、および(b)rAAVベクター内にパッケージングされる第2のポリヌクレオチドを含むことができる。例えば、第1のポリヌクレオチドは、配列番号：のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドを含む。例えば、第2のポリヌクレオチドは、目的の治療用遺伝子を含んでも含まなくてもよいが、好ましくは、そのような目的の治療用遺伝子を組込むための種々の制限酵素切断部位を含むことができる。

[0059] 本発明のrAAVベクターを作製するためのキットは、本明細書中に記載されるいずれの構成（例えば、AdVヘルパーなど）もさらに含むことができる。本発明のキットはまた、本発明のキットを使用してrAAVベクターを作製するためのプロトコルを記載した指示書もさらに含み得る。

[0060] 9. 本発明のrAAVと併用される化学療法剤について

本願発明に係るrAAVベクターは、既存の化学療法剤と併用することもできる。そのような化学療法剤の例としては、フェニトイン、カルバマゼピン、バルプロ酸、トピラマート、ラモトリギン、ルフィナミド、フェノバルビタール、ジアゼパム、クロナゼパム、エトスクシミド、ゾニサミド、ガバペンチン、レベチラセタム、ミダゾラム、クロバザム、プロポフォールが挙げられる。例えば、本願発明のrAAVの投与後に、上記化学治療剤の投与量を大きく低減することが期待できる。

[0061] 10. 治療効果の測定について

本発明のrAAVベクターの治療効果は、興奮が抑えられることを測定するための公知手段を用いて判断される。そのような公知手段としては、例えば、行動レベルの解析、標識した伝達物質（GABAなど）の薬理動態の解析、興奮性シナプス後電位や抑制性シナプス後電位の測定、薬剤または電気刺激による

てんかん誘発閾値変化の測定、脳波、光トポグラフィー、陽電子放出断層撮影（PET）などが挙げられるが、これらに限定されない。。

1.1. 本明細書中の用語について

本明細書中に用いられる各用語が示す意味は以下のとおりである。本明細書中、特には説明されない用語については、当業者が通常理解する用語が意味する範囲を指すことが意図される。

[0062] 本明細書中で使用される場合、特に述べられない限り、「ウイルスベクター」、「ウイルスビリオン」、「ウイルス粒子」の各用語は、相互に交換可能に用いられる。

[0063] 本明細書中に用いられる場合、「神経系」とは、神経組織により構成される器官系を指す。また、本明細書中に用いられる場合、「神経系細胞」とは、少なくとも脳、脊髄など中枢神経系に含まれる神経細胞を含み、さらに、神経膠細胞、小膠細胞、星状膠細胞、乏突起膠細胞、脳室上衣細胞、脳血管内皮細胞などを含んでもよい。

[0064] 本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は、「核酸」、「遺伝子」または「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体が意図される。本明細書中で使用される場合、用語「ヌクレオチド配列」は、「核酸配列」または「塩基配列」と交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチド（A、G、CおよびTと省略される）の配列として示される。例えば、「配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドまたはそのフラグメント」とは、配列番号1の各デオキシヌクレオチドA、G、Cおよび／またはTによって示される配列を含むポリヌクレオチドまたはその断片部分が意図される。

[0065] 本発明に係る「ウイルスゲノム」および「ポリヌクレオチド」は各々、DNAの形態（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）で存在し得るが、場合によってはRNA（例えば、mRNA）の形態であってもよい。本明細書において使用されるウイルスゲノムおよびポリヌクレオチドは各々、二本鎖または一本鎖のDNAであり得る。一本鎖DNAまたはRNAの場合、コード鎖（センス鎖としても知られる）

であっても、非コード鎖（アンチセンス鎖としても知られる）であってもよい。特に述べられない限り、本明細書中、rAAVゲノムがコードするプロモーター、目的遺伝子、ポリアデニレーションシグナルなどの遺伝子上の配置について説明される場合、rAAVゲノムがセンス鎖である場合についてはその鎖自体について、アンチセンス鎖である場合はその相補鎖について記載される。

[0066] 本明細書において、「タンパク質」と「ポリペプチド」とは相互に交換可能に用いられ、アミノ酸の重合体が意図される。本明細書において使用されるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。本発明のポリペプチドの部分ペプチド（本明細書中、本発明の部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のポリペプチドの部分ペプチドで、好ましくは、前記した本発明のポリペプチドと同様の性質を有するものである。

[0067] 本明細書において、用語「プラスミド」は、種々の公知の遺伝子要素、例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体等を意味する。プラスミドは特定の宿主において複製することができ、そして細胞間で遺伝子配列を輸送できる。本明細書において、プラスミドは、種々の公知のヌクレオチド（DNA、RNA、PNAおよびその混合物）を含み、一本鎖であっても二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖である。例えば、本明細書において、用語「rAAVベクタープラスミド」は、特に明記しない限り、rAAVベクターゲノムおよびその相補鎖により形成される二本鎖を含むことが意図される。本発明において使用されるプラスミドは、直鎖状であっても環状であってもよい。

[0068] 本明細書中において使用される場合、用語「パッケージング」とは、1本鎖ウイルスゲノムの調製、外被タンパク質（キャプシド）の組み立て、およびウイルスゲノムをキャプシドで包むこと（encapsidation）などを含む事象をいう。適切なプラスミドベクター（通常、複数のプラスミド）が適切な条件下でパッケージング可能な細胞株に導入される場合、組換えウイルス粒子

(すなわち、ウイルスビリオン、ウイルスベクター) が組み立てられ、培養物中に分泌される。

実施例

[0069] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されるものではない。

[0070] 実験の概要

生後6週時にrAAV-Neurologin2 (rAAV-NL2) を心腔内投与

・発作頻度・持続時間・強さ・持続時間×強さ・電気刺激に対する閾値の変化

ニューロリギン2搭載血管内投与型rAAVの脳内発現

[0071] モデル動物を用いたてんかんの遺伝子治療の報告は散在するが、いずれも定位的に局所投与したものである。ヒト患者に応用する場合、侵襲的処置を伴わない投与方法が望ましい。今回、本願発明者らは、血管内投与型アデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターを作成し、てんかん自然発生ELマウス (Suzuki, Proc. Jpn. Acad., Ser. B89(2013)) に投与し、脳内の発現状況及び発作抑制効果の有無を観察した。

[0072] 実験材料及び方法

○ 組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクター

本実施例において用いるベクターは、先に公開されたAAV9/3 (AAV9のカプシドにチロシン変異(Y446→F)を導入し、AAV3のITRを持つ) にSynapsin I promoterを搭載しているものである (WO 2012/057363)。内因性のNeurologin 2 (NL2) と区別するため、FLAG tag (DDDDK) 配列がN末端に結合したニューロリギン2を発現するrAAVベクターを調製し (AAV9/3-Syn1-FLAG (DDDDK)-NL2)、これを対象動物に投与した。

[0073] ○ 動物への投与

ELマウス (6週齢、雄、体重22 - 32g) を使用した。

2-4%セボフルレン麻酔下にAAV9/3-Syn1-FLAG (DDDDK)-NL2を 4.1×10^{13} vector genome/ml × 0.1ml /mouse心注した (NL2心注群n = 10)。AAV9/3-Syn1-A

cGFP-WPREを 2.3×10^{13} vg/ml \times 0.1ml /mouse心注した群(n=17)と生理食塩水のみを0.1ml/mouse心注した群(n=14)を対照とした。また、局所投与と比較するため、両側海馬CA3領域 (Bregmaより 0.5 mm後方、3.0 mm側方、脳表より2.0 mm) にAAV9/3-Syn1-FLAG (DDDDK)-NL 2を 4.1×10^{13} vg/ml \times 0.005 ml注入したグループを局所投与群 (n = 3) とした。

[表1]

	投与部位	力価 vg/匹	匹数
rAAV-NL2	心腔内	4.1×10^{12}	10
rAAV-GFP	心腔内	2.3×10^{12}	17
生理食塩水	心腔内	—	14
rAAV-NL2	両側海馬	2.0×10^{11}	3
rAAV-GFP	両側海馬	1.1×10^{11}	3
生理食塩水	両側海馬	—	3

[0074] ○ 回転加速度刺激による評価

ベクター等投与後、22週齢に至るまで1週間毎に、尻尾を持ってマウスを一定数回転させ (8回転)、行動をビデオ記録した。後にビデオ上で発作の有無、発作を起こした場合の持続時間、強度を観察した。

発作強度を

- 1点：発作なし
- 2点：尻尾を挙げる、または体を震わせるのみ
- 3点：明らかな発作だが、倒れずに姿勢を保つ
- 4点：激しい発作で、姿勢を保てず、横に倒れる

として得点化した。

発作の持続時間を

- 1点：発作なし
- 2点：1-10秒
- 3点：11-20秒
- 4点：21-30秒
- 5点：31-60秒

6点：61秒－

として得点化した。

各グループの発作出現率、平均発作時間、平均発作強度、平均発作時間×強度を週毎に評価した

[0075] ○ 電気刺激による評価

5（ベクター投与前）、12、18、22週齢において、両耳に電極を装着し、電気刺激（NIHON KOHDEN社製のNeuropack S1において以下のパラメーターを用いた：duration：1ms, interval：50ms, 10train, strength：0mA～5mA毎にmax 50mAまで）を与え、てんかん発作を誘発し、発作閾値を測定した。50mAで発作が誘発されなかった場合は発作閾値を60mAとして評価した。局所投与群のみ5、12、22週齢で行った。

[0076] ○ 統計処理

発作出現率：Fisher正確検定

その他：Welchのt検定

により評価した。

[0077] ○ 組織解析

脳標本作成：ペントバルビタールで深麻酔し、左心室からの4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸バッファー（pH7.4）注入し灌流固定した。固定後、脳を取り出して灌流固定液での半日の浸漬固定後15%ショ糖を含む0.1Mリン酸バッファー（pH7.4）に移して冷蔵庫で組織化学実験まで保存した。

[0078] ○ rAAV9-GFP発現と細胞の同定

凍結ミクロトームで40 μ mの矢状断切片を作成し蛍光顕微鏡で脳各部位のGFP発現を確認した。GFPを発現している細胞の同定は以下のマーカーとの2重染色を行った。神経細胞；NeuNまたはMAP2、グリア細胞；GFAP、抑制性介在ニューロン；Parvalbumin

[0079] ○ rAAV9-NL2発現と細胞の同定

GFP確認と同様、40 μ mの矢状断切片を作成してFLAG（DDDDK）抗体染色によ

り導入遺伝子NL2発現を確認した。FLAG抗体はアブカム株式会社より購入し、Alexafluor 488付き2次抗体を用いた画像処理により蛍光顕微鏡で発現を確認した。

[0080] 実験結果および考察

海馬スライス標本を用いて虚血負荷時の細胞内Ca²⁺流入変化をrhod 2-AM (DOJINDOカタログ番号：R002) の蛍光変化により測定した。虚血負荷により海馬で起きる細胞内Ca²⁺流入はELマウスがDDYマウスに比べてCA3 領域で有意な上昇を示し、CA3 領域における抑制系の脆弱性が示唆された。次に興奮抑制系である介在細胞のEL海馬における発現をparvalbumin抗体 (カタログ番号：LS-C39101) による免疫染色で組織学的に検討した。海馬各領域のparvalbumin陽性細胞数においてはELマウスとDDYマウスで有意差は認められず、シナプスレベルでの変化の可能性が示唆された。以上の結果に基づき、抑制系シナプス関連分子の遺伝子を発現するrAAVベクターを調製し、定位的海馬注入および血管内注入により同ベクターをELに投与し、FLAG抗体を用いる染色によって、組織学的に脳内分布を観察した (図1a、1b)。図1aに示すように、本発明のベクターの血管内投与によって海馬及び大脳皮質の神経細胞にFLAGタグ付NLGN2が広く発現していたため、rAAVによる遺伝子送達が良好であったことを確認できた。

[0081] 次いで、血管内注入群でてんかん発作抑制効果の有無を観察した (図2~6)。緑色蛍光タンパクEGFP発現AAVベクター投与群および生理食塩水投与群をコントロールとした。てんかん抑制効果の評価は、各週齢のマウスにおいて、発作の発現頻度、強さ、持続時間、発作強さ×持続時間の各項目において行った。なお、図中の「*」、「**」を付した箇所において有意差が認められた。NLGN2投与群は、コントロール群に対して発作を有意に抑制しつつも、電気刺激に対する閾値を変更することがなかった (図2~6) 電気刺激の閾値が変更しなかったことから、抑制シナプスの作動開始は導入前と変化せず、よって副作用が低いことが示唆された。

[0082] 海馬注入群では海馬ニューロンに、血管内投与群では海馬を含む全脳ニュー

ーロンに目的遺伝子の発現を認めた（結果は示さず）。海馬注入群では、コントロール群と比較すると、NLGN2投与群は発作頻度において有意差が認められる場合があったが、全体として効果の有意差は認められなかった（図7～11）。なお、図中の「*」、「**」を付した箇所において有意差が認められた。また、心腔内投与群と比較すると、発作頻度、発作時間及び発作強度のいずれにおいても全体的に心腔内投与群の方がてんかんの抑制効果が高い傾向が認められた。

[0083] 血管内投与型AAVベクターにより標的分子が脳全体のニューロンに供給された。本分子の興奮抑制作用がてんかん発作を抑制しつつ、電気刺激の閾値は変化させない、より治療方法として有益な非侵襲的てんかん遺伝子治療の可能性が示唆された。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明のrAAVベクターを用いることによって、神経系細胞における遺伝子上の不具合（先天的なものおよび後天的なものを含む）を治療（緩和、改善、修復など）することが期待できる。

配列表フリーテキスト

[0085] 配列番号1：ヒトニューロリギン2ヌクレオチド配列
配列番号2：ヒトニューロリギン2アミノ酸配列
配列番号3：マウスニューロリギン2ヌクレオチド配列
配列番号4：マウスニューロリギン2アミノ酸配列
配列番号5：ラットニューロリギン2ヌクレオチド配列
配列番号6：ラットニューロリギン2アミノ酸配列
配列番号7：Flagタグ付マウスニューロリギン2のヌクレオチド配列
配列番号8：Flagタグ付マウスニューロリギン2のアミノ酸配列
配列番号9：AAV1カプシドタンパク質Y445F変異体のアミノ酸配列
配列番号10：AAV2カプシドタンパク質Y444F変異体のアミノ酸配列
配列番号11：AAV9カプシドタンパク質Y446F変異体のアミノ酸配列

列

請求の範囲

- [請求項1] 生体における抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、てんかん、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、精神遅滞、不安、躁鬱病、片頭痛、恐怖強迫症状、薬物依存症、アンジェルマン症候群、ジスキネジア、ジストニア、アルツハイマー病、発達障害（注意欠陥多動性障害、アスペルガー症候群）からなる群より選択される疾患の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクター。
- [請求項2] 前記ポリヌクレオチドが、配列番号2、4もしくは6のアミノ酸配列、またはこれら配列と約90%以上の同一性を有してニューレキシンと結合するアミノ酸配列を含むニューロリギン2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。
- [請求項3] 前記疾患がてんかんである、請求項1又は2に記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。
- [請求項4] 前記組換えアデノ随伴ウイルスベクターが、野生型AAV1カプシドタンパク質のアミノ酸配列中445位のチロシンがフェニルアラニンに置換されている変異アミノ酸配列を有するタンパク質、野生型のAAV2カプシドタンパク質のアミノ酸配列中445位のチロシンがフェニルアラニンに置換されている変異アミノ酸配列を有するタンパク質、または野生型のAAV9カプシドタンパク質のアミノ酸配列中446位のチロシンがフェニルアラニンに置換されている変異アミノ酸配列を有するタンパク質を含む、請求項1～3のいずれかに記載のアデノ随伴ウイルス組換えベクター。
- [請求項5] 前記ポリヌクレオチドが、シナプシンIプロモーター配列、ミエリン塩基性タンパク質プロモーター配列、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター配列、カルシウム/カルモジュリンー依存性蛋白キナーゼII(CMKII)プロモーター配列、チュブリン α Iプロモーター配列、血

小板由来成長因子 β 鎖プロモーター配列、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)プロモーター配列、L7プロモーター配列(小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター)、グリア線維酸性タンパク質(hGfa2)プロモーター配列、およびグルタミン酸受容体デルタ2プロモーター(小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター)配列、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65/GAD67)プロモーター配列からなる群より選択されるプロモーター配列を含む、請求項1~4のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項6] 前記ポリヌクレオチドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV8、およびAAV9からなる群より選択されるインバーテッドターミナルリピート(ITR)を含む、請求項1~5のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項7] 前記ポリヌクレオチドが、興奮性シナプスの興奮を抑制するためのポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1~6のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項8] 請求項1~7のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルス組換えベクターを含む、医薬組成物。

[請求項9] 脳内投与されるための、請求項8に記載の医薬組成物。

[請求項10] 髄腔内投与されるための、請求項8に記載の医薬組成物。

[請求項11] 末梢投与されるための、請求項8に記載の医薬組成物。

[請求項12] 神経精神疾患に係る化学療法剤と併用するための、請求項8~11のいずれかに記載の医薬組成物。

補正された請求の範囲
[2017年4月17日(17.04.2017)国際事務局受理]

[請求項 1] (補正後) 生体における抑制性シナプスの興奮抑制機能を向上させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、てんかん、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、精神遅滞、不安、躁鬱病、片頭痛、恐怖強迫症状、薬物依存症、アンジェルマン症候群、ジスキネジア、ジストニア、アルツハイマー病、発達障害（注意欠陥多動性障害、アスペルガー症候群）からなる群より選択される疾患の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクターであって、

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 2、4 もしくは 6 のアミノ酸配列、またはこれら配列と約 90%以上の同一性を有してニューレキシンと結合するアミノ酸配列を含むニューロリギン 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、

前記組換えアデノ随伴ウイルスベクターが、野生型 AAV1 カプシドタンパク質のアミノ酸配列中 445 位のチロシンがフェニルアラニンに置換されている変異アミノ酸配列を有するタンパク質、野生型の AAV2 カプシドタンパク質のアミノ酸配列中 445 位のチロシンがフェニルアラニンに置換されている変異アミノ酸配列を有するタンパク質、または野生型の AAV9 カプシドタンパク質のアミノ酸配列中 446 位のチロシンがフェニルアラニンに置換されている変異アミノ酸配列を有するタンパク質を含む、
組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項 2] (削除)

[請求項 3] (補正後) 前記疾患がてんかんである、請求項 1 に記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項 4] (削除)

[請求項 5] (補正後) 前記ポリヌクレオチドが、シナプシン I プロモーター配列、ミエリン塩基性タンパク質プロモーター配列、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター配列、カルシウム/カルモジュリン-依存性蛋白キナーゼ II (CMKII) プロモーター配列、チューブリン α I プロモーター配列、血小板由来成長因子 β 鎖プロモーター配列、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター配列、L7 プロモーター配列 (小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター)、グリア線維酸性タンパク質 (hGfa2) プロモーター配列、およびグルタミン酸受容体デルタ 2 プロモーター (小脳プルキンエ細胞特異的プロモーター) 配列、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD65/GAD67) プロモーター配列からなる群より選択される

プロモーター配列を含む、請求項 1 または 3 に記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項 6] (補正後) 前記ポリヌクレオチドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV8、および AAV9 からなる群より選択されるインバーテッドターミナルリピート(ITR)を含む、請求項 1、3 および 5 のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項 7] (補正後) 前記ポリヌクレオチドが、興奮性シナプスの興奮を抑制するためのポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1、3、5 および 6 のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項 8] (補正後) 請求項 1、3 および 5～7 のいずれかに記載の組換えアデノ随伴ウイルス組換えベクターを含む、医薬組成物。

[請求項 9] 脳内投与されるための、請求項 8 に記載の医薬組成物。

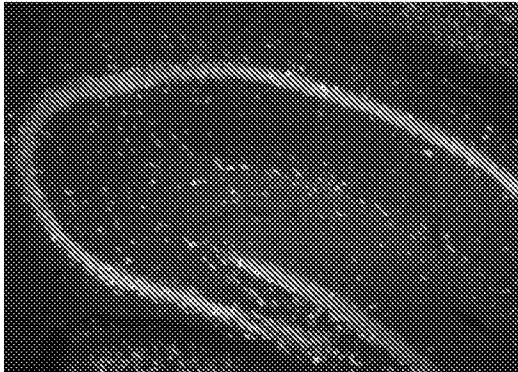
[請求項 10] 髄腔内投与されるための、請求項 8 に記載の医薬組成物。

[請求項 11] 末梢投与されるための、請求項 8 に記載の医薬組成物。

[請求項 12] 神経精神疾患に係る化学療法剤と併用するための、請求項 8～11 のいずれかに記載の医薬組成物。

[図1]

a. NL2(+) FLAG抗体染色

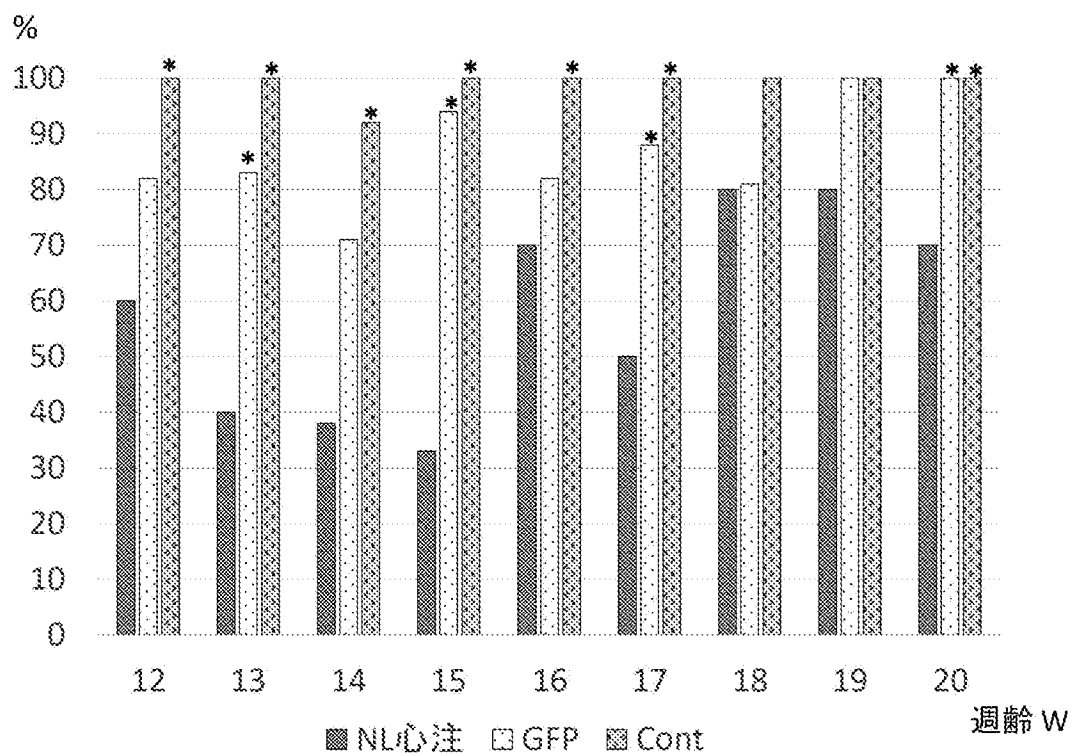


b. NL2(-) FLAG抗体染色

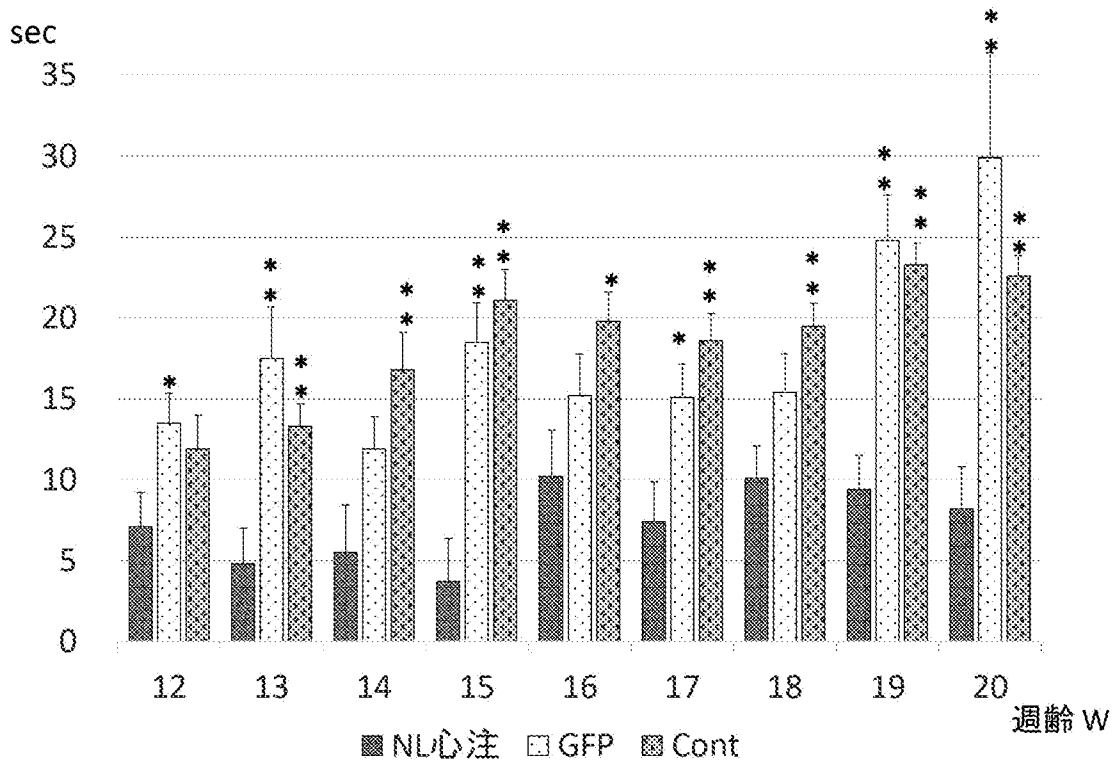


[図2]

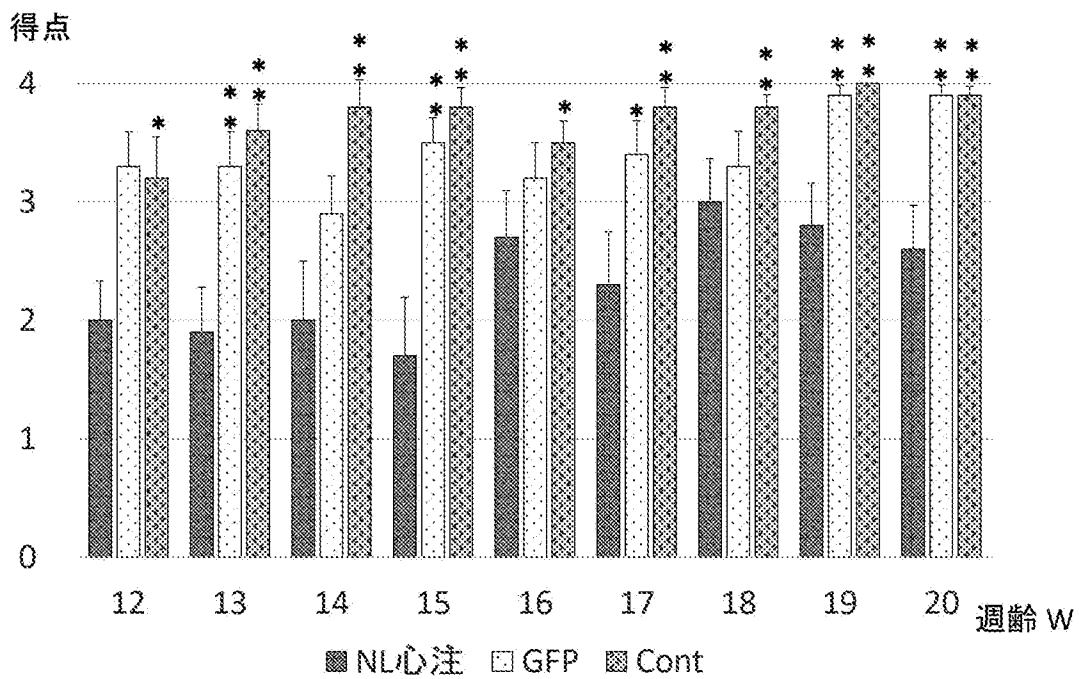
発作頻度 NL2 (心腔内投与)



[図3]
発作時間 NL2(心腔内投与)

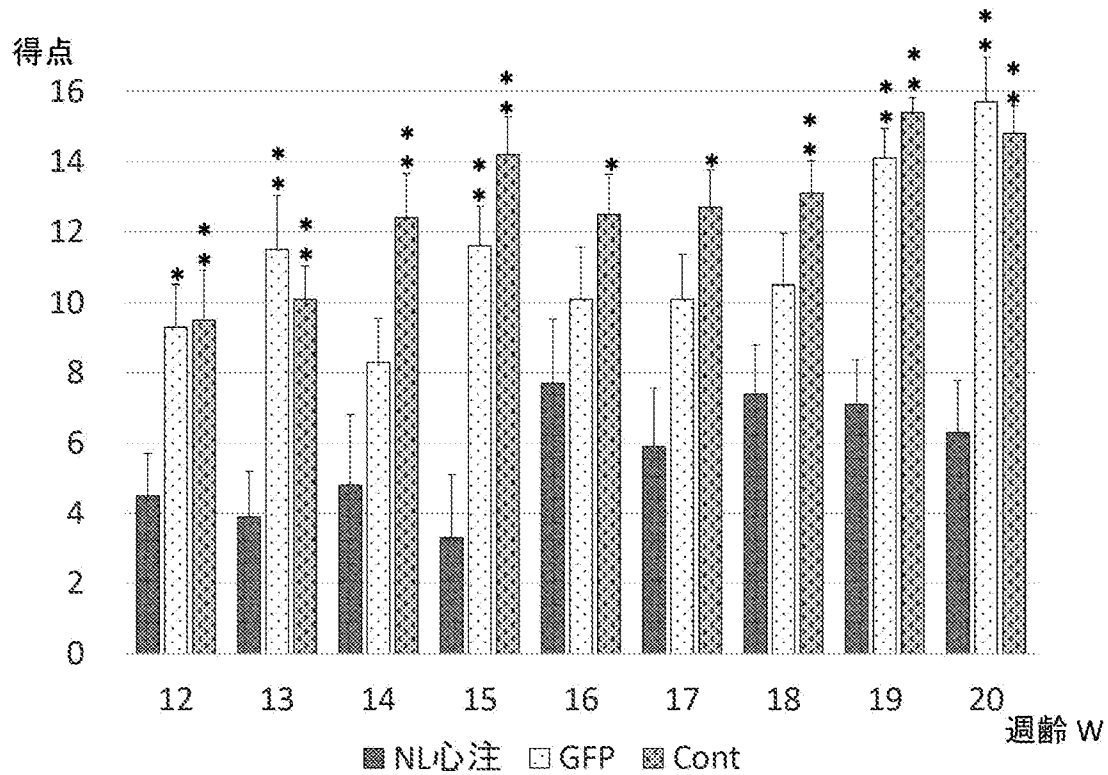


[図4]
発作強度NL2(心腔内投与)



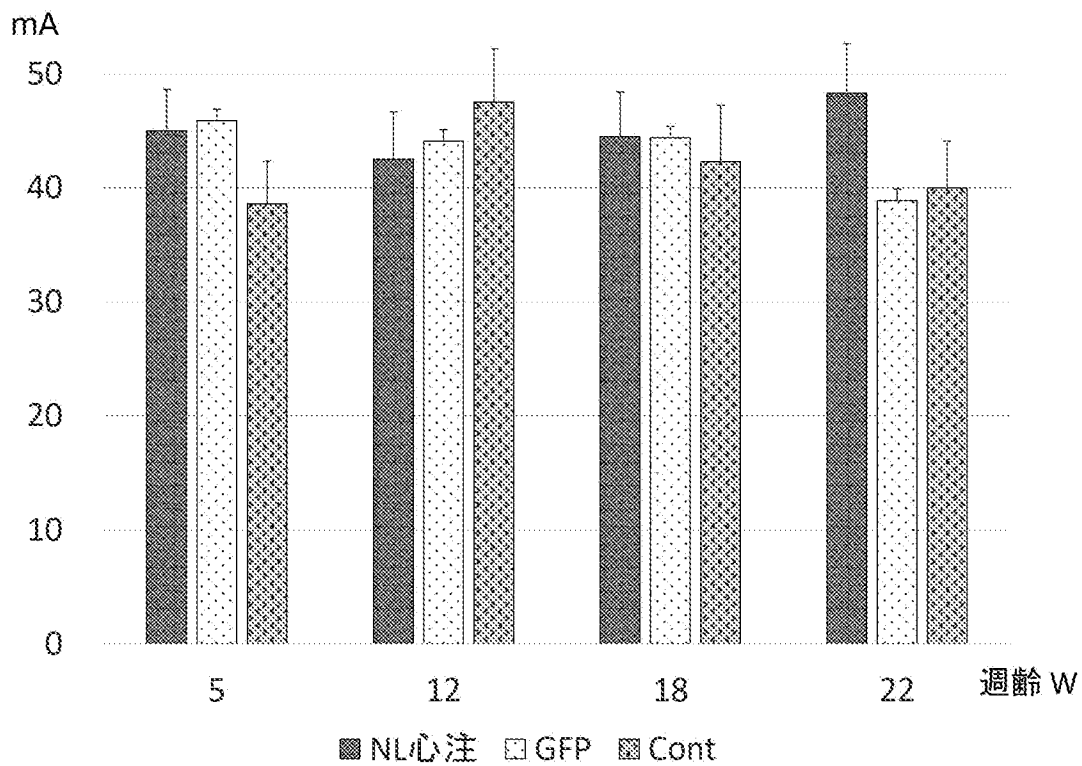
[図5]

発作時間 x 強度 NL2(心腔内投与)



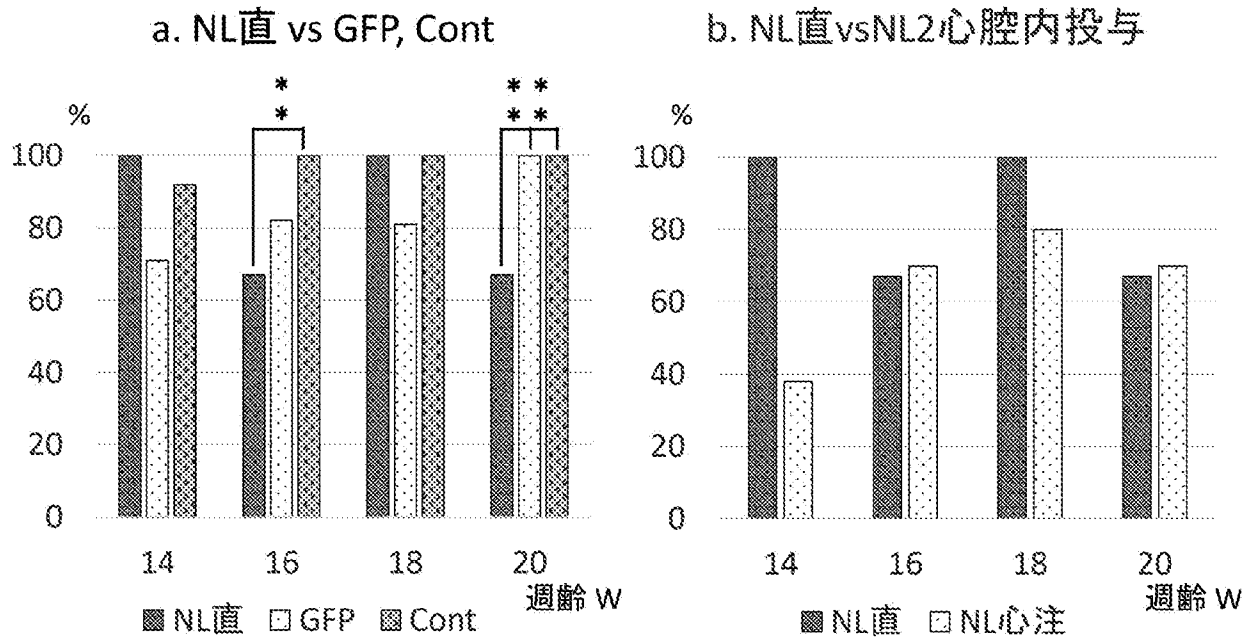
[図6]

電気刺激閾値 NL2(心腔内投与)



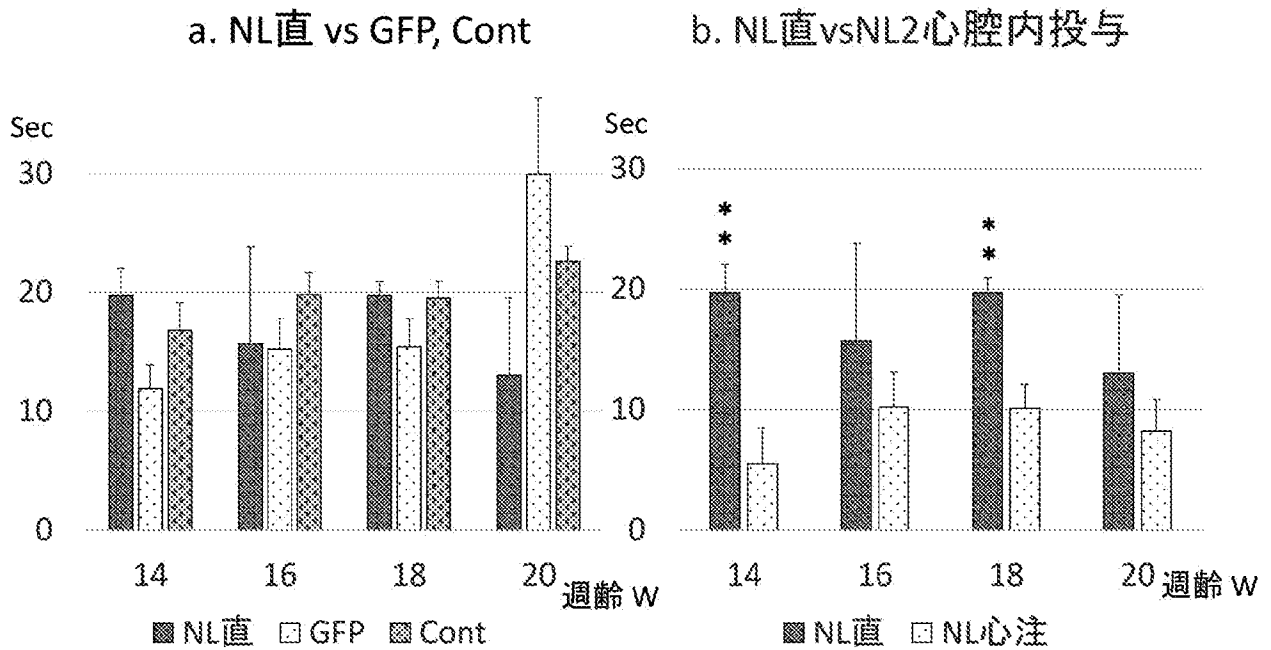
[図7]

発作頻度 NL2(海馬局所投与)



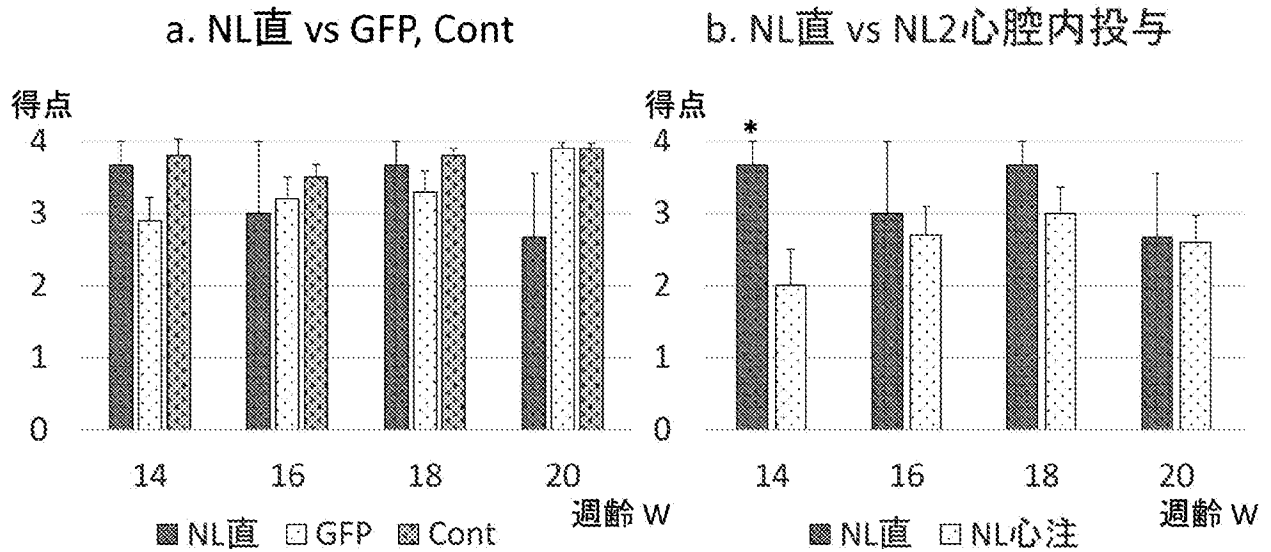
[図8]

発作時間 NL2(海馬局所投与)



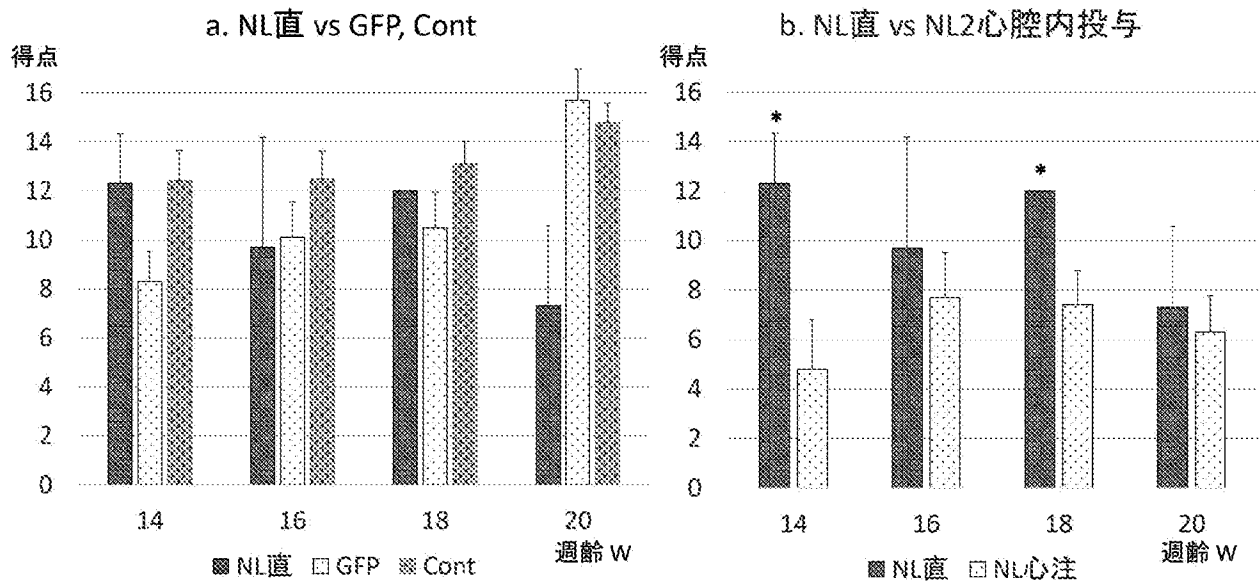
[図9]

発作強度 NL2(海馬局所投与)



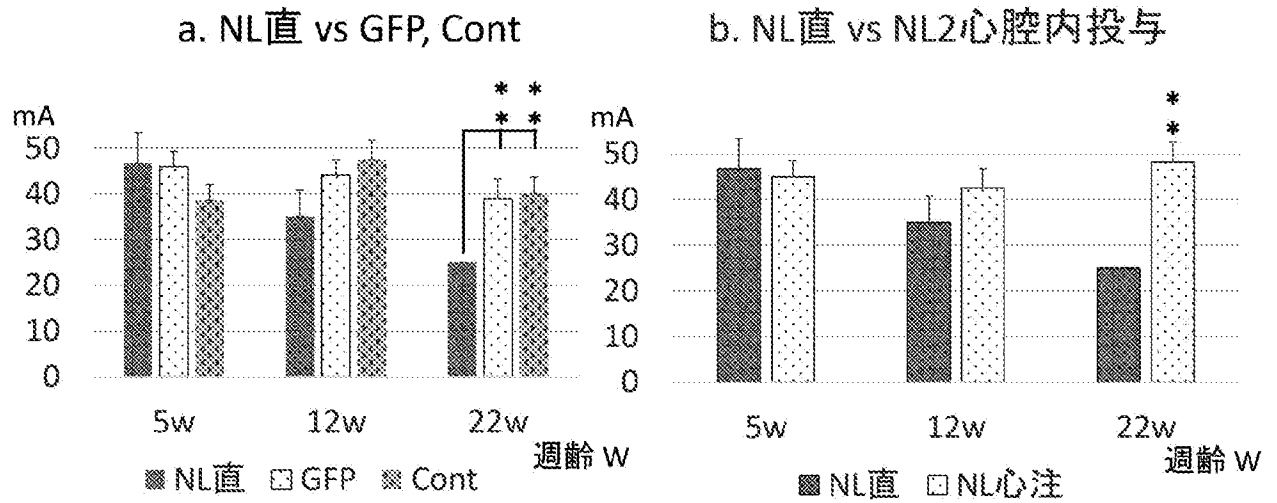
[図10]

発作時間 x 強度 NL2(海馬局所投与)



[図11]

電気刺激閾値 NL2(心腔内投与)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001048

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
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) A61K48/00, A61K35/76, A61K45/00, A61P25/06, A61P25/08, A61P25/18, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, A61P25/30, C07K14/47, C12N7/01, C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	KOHL, C. et al., Hippocampal Neurologin-2 Overexpression Leads to Reduced Aggression and Inhibited Novelty Reactivity in Rats, PLOS ONE, 2013.02, Vol. 8, No. 2, e56871, pp. 1-10, Abstract, p. 2, left column, 5th paragraph to right column, 2nd paragraph, p. 9, left column, 2nd paragraph, p. 9, right column, 2nd paragraph, Figures 3-4	1-2, 6, 8-9, 12 3-9, 11-12 10
X Y A	Keiji OGURO et al., "EL Mouse ni Okeru Kekkannai Toyogata Adeno Zuihan Virus (AAV) Vector ni yoru Tenkan no Idenshi Chiryō", Tenkan Kenkyū, 2015, vol.33, no.2, page 521, 0 2-89, entire text	1, 3, 8-9, 11-12 3-9, 11-12 2, 10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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 16 February 2017 (16.02.17)		Date of mailing of the international search report 28 February 2017 (28.02.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001048

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	NOE, F. M. et al., Gene therapy of focal onset epilepsy using adeno-associated virus vector-mediated overexpression of neuropeptide Y, In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet], Edited by NOEBELS, J. L. et al., 4th edition, Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2012, pp. 1-17, [retrieved on 2017.02.10], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98184/pdf/Bookshelf_NBN98184.pdf>, Summary, p.3 paragraph 6, p. 6 paragraphs 2-4, Table 2	1, 3, 5, 8-9, 12 4-12 2
X Y A	WO 2008/016629 A2 (NEUROLOGIX, INC.), 07 February 2008 (07.02.2008), claims, page 30, lines 14 to 23; page 32, line 31 to page 34, line 33; page 37, lines 25 to 31; examples & US 2009/0098631 A1 & EP 2049660 A2	1, 3, 5-6, 8-10, 12 4-12 2
X Y A	WO 2010/037143 A1 (THE UNIVERSITY OF MONTANA), 01 April 2010 (01.04.2010), claims; examples (Family: none)	1, 3, 5-6, 8-9, 12 4-12 2
X Y A	RAOL, Y. H. et al., Enhancing GABA(A) Receptor alpha 1 Subunit Levels in Hippocampal Dentate Gyrus Inhibits Epilepsy Development in an Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy, J. Neurosci., 2006, Vol. 26, No. 44, pp. 11342-11346, Abstract, p. 11342, right column, 2nd paragraph to p. 11343, left column, 2nd paragraph, Figure 3	1, 3, 8-9, 12 4-12 2
Y A	WO 2012/057363 A1 (Jichi Medical University), 03 May 2012 (03.05.2012), claims; paragraphs [0029], [0054] to [0055]; examples & US 2013/0224836 A1 claims; paragraphs [0079], [0104] to [0105]; examples & EP 2634253 A1 & CN 103189507 A	4-12 1-3
Y A	FANG, M. et al., Neuroligin-1 Knockdown Suppresses Seizure Activity by Regulating Neuronal Hyperexcitability, Mol. Neurobiol., 2014, Vol. 53, pp. 270-284, Abstract, Figs. 3-5	7-12 1-6
P, X P, Y	OGURO, K. et al., "EL Mouse ni Okeru Kekkannai Toyogata Virus Vector ni yoru Tenkan no Idenshi Chiryō", Tenkan Kenkyū, 2016.09, vol.34, no.2, page 442, ES9-4, entire text	1-3, 5, 9, 11-12 4-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001048

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KULLMANN, D. M. et al., Gene therapy in epilepsy--is it time for clinical trials?, Nature Reviews Neurology, 2014.05, Vol. 10, No. 5, pp. 300-304	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001048

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61K48/00(2006.01)i, A61K35/76(2015.01)i, A61K45/00(2006.01)i,
A61P25/06(2006.01)i, A61P25/08(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i,
A61P25/20(2006.01)i, A61P25/22(2006.01)i, A61P25/24(2006.01)i,
A61P25/28(2006.01)i, A61P25/30(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n,
C12N7/01(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K48/00, A61K35/76, A61K45/00, A61P25/06, A61P25/08, A61P25/18, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, A61P25/30, C07K14/47, C12N7/01, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	KOHL, C. et al., Hippocampal Neuroligin-2 Overexpression Leads to Reduced Aggression and Inhibited Novelty Reactivity in Rats, PLOS ONE, 2013.02, Vol. 8, No. 2, e56871, pp. 1-10, Abstract, p. 2 左欄第5パラグラフ-右欄第2パラグラフ, p. 9 左欄第2パラグラフ, p. 9 右欄第2パラグラフ, Figures 3-4	1-2, 6, 8-9, 12 3-9, 11-12 10
X Y A	小黒恵司 ほか, ELマウスにおける血管内投与型アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによるてんかんの遺伝子治療, てんかん研究, 2015, Vol. 33, No. 2, p. 521, 0 2-89, 全文	1, 3, 8-9, 11-12 3-9, 11-12 2, 10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 16.02.2017	国際調査報告の発送日 28.02.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 佳代子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 6219

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	NOE, F. M. et al., Gene therapy of focal onset epilepsy using adeno-associated virus vector-mediated overexpression of neuropeptide Y, In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet], Edited by NOEBELS, J. L. et al., 4th edition, Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2012, pp. 1-17, [retrieved on 2017.02.10], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98184/pdf/Bookshelf_NBN98184.pdf >, Summary, p.3 paragraph 6, p. 6 paragraphs 2-4, Table 2	1,3,5,8-9,12 4-12 2
X Y A	WO 2008/016629 A2 (NEUROLOGIX, INC.) 2008.02.07, claims, p. 30 lines 14-23, p. 32 line 31- p. 34 line 33, p. 37 lines 25-31, EXAMPLES & US 2009/0098631 A1 & EP 2049660 A2	1,3,5-6,8-10,12 4-12 2
X Y A	WO 2010/037143 A1 (THE UNIVERSITY OF MONTANA) 2010.04.01, CLAIMS, EXAMPLES (ファミリーなし)	1,3,5-6,8-9,12 4-12 2
X Y A	RAOL, Y. H. et al., Enhancing GABA(A) Receptor alpha 1 Subunit Levels in Hippocampal Dentate Gyrus Inhibits Epilepsy Development in an Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy, J. Neurosci., 2006, Vol. 26, No. 44, pp. 11342-11346, Abstract, p. 11342 右欄第2パラグラフ-p. 11343 左欄第2パラグラフ, Figure 3	1,3,8-9,12 4-12 2
Y A	WO 2012/057363 A1 (学校法人自治医科大学) 2012.05.03, 請求の範囲, 段落[0029], [0054]-[0055], 実施例 & US 2013/0224836 A1, claims, [0079], [0104]-[0105], EXAMPLES & EP 2634253 A1 & CN 103189507 A	4-12 1-3
Y A	FANG, M. et al., Neuroligin-1 Knockdown Suppresses Seizure Activity by Regulating Neuronal Hyperexcitability, Mol. Neurobiol., 2014, Vol. 53, pp. 270-284, Abstract, Figs. 3-5	7-12 1-6
P, X P, Y	OGURO, K. et al., ELマウスにおける血管内投与型ウイルスベクターによるてんかんの遺伝子治療, てんかん研究, 2016.09, Vol. 34, No. 2, p. 442, ES9-4, 全文	1-3,5,9,11-12 4-12
A	KULLMANN, D. M. et al., Gene therapy in epilepsy--is it time for clinical trials?, Nature Reviews Neurology, 2014.05, Vol. 10, No. 5, pp. 300-304	1-12

発明の属する分野の分類

A61K48/00(2006.01)i, A61K35/76(2015.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P25/06(2006.01)i,
A61P25/08(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/20(2006.01)i, A61P25/22(2006.01)i,
A61P25/24(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P25/30(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n,
C12N7/01(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n