

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7237364号

(P7237364)

(45)発行日 令和5年3月13日(2023.3.13)

(24)登録日 令和5年3月3日(2023.3.3)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 Z

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 31/7088 Z N A

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

C 1 2 N 15/55

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

請求項の数 20 (全46頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-542703(P2019-542703)

(86)(22)出願日 平成30年2月7日(2018.2.7)

(65)公表番号 特表2020-506714(P2020-506714  
A)

(43)公表日 令和2年3月5日(2020.3.5)

(86)国際出願番号 PCT/GB2018/050347

(87)国際公開番号 WO2018/146473

(87)国際公開日 平成30年8月16日(2018.8.16)

審査請求日 令和3年2月8日(2021.2.8)

(31)優先権主張番号 1701968.8

(32)優先日 平成29年2月7日(2017.2.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
英国(GB)

(73)特許権者 314000752

ザ・ユニバーシティ・オブ・マンチェス  
ターTHE UNIVERSITY OF M  
ANCHESTERイギリス国エム13・9ピーエル、マン  
チェスター、オックスフォード・ロード

(74)代理人 100120891

弁理士 林 一好

(74)代理人 100165157

弁理士 芝 哲央

(74)代理人 100126000

弁理士 岩池 満

(72)発明者 ビガー ブライアン

イギリス国エム13・9ピーエル、マン  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子治療

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

イズロン酸 - 2 - スルファターゼ (IDS) 遺伝子配列と、アポリポタンパク質 E (ApoEII) 遺伝子配列の縦列反復とを含む、核酸。

## 【請求項2】

前記 IDS 配列と前記 ApoEII 配列との間に位置する介在リンカー配列をさらに含む、請求項1に記載の核酸。

## 【請求項3】

前記 IDS 配列は野生型 IDS 配列のコドン最適化配列を含む、請求項1または2に記載の核酸。

## 【請求項4】

前記 IDS 配列は、配列番号1もしくは配列番号2による配列、またはその少なくとも90%の配列同一性を有する誘導体配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項5】

前記 ApoEII 配列は、配列番号3による配列、またはその少なくとも95%の配列同一性を有する誘導体配列による配列を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項6】

介在リンカー配列は、配列番号4による配列、またはその少なくとも95%の配列同一性を有する誘導体配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 7】

前記核酸は遺伝子治療ベクターに組み込まれる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 8】

前記ベクターはレンチウイルスベクターである、請求項 7 に記載の核酸。

## 【請求項 9】

前記核酸は、1 つまたはそれ以上の造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）に形質導入される、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 10】

イズロン酸 - 2 - スルファターゼ（IDS）欠損に起因し得る疾患または状態の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるための、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の核酸であって、前記疾患または状態は、ムコ多糖症 II 型（MPS II）またはハンター症候群を含む、前記核酸。

10

## 【請求項 11】

a) 第 1 のイズロン酸 - 2 - スルファターゼ（IDS）部分と、  
b) 第 2 のアポリポタンパク質 E（APOE II）の縦列反復部分とを含む、組成物であって、前記第 1 の IDS 部分と、前記第 2 の APOE II の縦列反復部分とが、それらの間に位置する介在リンカー部分を有する、前記組成物。

## 【請求項 12】

a) 前記第 1 の部分のアミノ酸配列は、配列番号 5 による配列、またはその少なくとも 90 % の配列同一性を有する誘導体配列を含む、および / または、  
b) 前記第 2 の部分のアミノ酸配列は、配列番号 7 による配列、またはその少なくとも 95 % の配列同一性を有する誘導体配列の配列を含む、および / または、  
c) 前記介在リンカー部分のアミノ酸配列は、配列番号 8 による配列、またはその少なくとも 95 % の配列同一性を有する誘導体配列を含む、  
請求項 11 に記載の組成物。

20

## 【請求項 13】

イズロン酸 - 2 - スルファターゼ（IDS）欠損に起因し得る疾患または状態の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるための、請求項 11 又は 12 に記載の組成物であって、前記疾患または状態は、ムコ多糖症 II 型（MPS II）またはハンター症候群を含む、前記組成物。

30

## 【請求項 14】

個体におけるムコ多糖症 II 型（MPS II）またはハンター症候群の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるための造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）であって、前記 HSPC は患者から除去され、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の核酸によってエキスピボで形質導入され、前記形質導入された HSPC は前記個体に投与される、造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）。

## 【請求項 15】

IDS タンパク質の欠損の結果もたらされる状態である個体における血液脳関門を横断して脳に IDS タンパク質を送達するための方法で使用するための APOE II 遺伝子配列の縦列反復につながれた IDS 遺伝子配列を含むウイルスベクターで形質導入された造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）の集団を含む医薬組成物であって、前記方法は、形質導入された HSPC を前記個体に投与することを含み、そこで前記形質導入された HSPC は前記血液脳関門を横断するために十分な、より高い生理学的レベルの前記 IDS タンパク質を発現する、医薬組成物であって、前記状態は、ムコ多糖症 II 型（MPS II）またはハンター症候群を含む、医薬組成物。

40

## 【請求項 16】

ベクターは、前記 IDS タンパク質をコードする遺伝子配列と、前記 APOE II 遺伝子配列の前記縦列反復との間に、可動性リンカーに対する配列を含む、請求項 15 に記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 17】

前記 A p o E I I 縦列反復遺伝子配列は、配列番号 3 による配列、またはその少なくとも 95%の配列同一性を有する変異体配列を含む、請求項 16 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 18】

前記可動性リンカー配列は、配列番号 4 による配列、またはその少なくとも 95%の配列同一性を有する変異体配列を含む、請求項 16 または 17 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 19】

前記 H S P C は自己のものである、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 20】

イズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 遺伝子配列およびアポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) 遺伝子配列の反復を含む核酸と、1 つまたはそれ以上の造血幹細胞および前駆細胞 ( H S P C ) とを含む組成物であって、前記核酸は前記 H S P C に形質導入できる、前記組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ムコ多糖症 ( M P S : m u c o p o l y s a c c h a r i d o s i s ) I I 型の処置のための幹細胞遺伝子治療に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ムコ多糖症 I I 型 ( M P S I I 、 O M I M # 3 0 9 9 0 0 ) またはハンター症候群は、小児科の X 連鎖リソソーム貯蔵障害であり、その原因は I D S 遺伝子の突然変異によってイズロン酸 - 2 - スルファターゼ酵素 ( E C 3 . 1 . 6 . 1 3 ) の欠損がもたらされることである。この I D S 酵素の不足は、次いでヘパラン硫酸 ( H S : h e p a r a n s u l p h a t e ) およびデルマタン硫酸の両方の異化反応に影響し、その後すべての細胞のリソソームコンパートメントにそれらの調節されない蓄積がもたらされる ( 非特許文献 1 ) 。 M P S I I は出生男性 1 0 0 , 0 0 0 人当り 1 . 3 人が発症し ( 非特許文献 2 ~ 4 ) 、歴史的に軽症型または重症型のいずれかに分類されてきた。しかし近年、ほとんどの臨床的展望は、症状の重症度に依存して 2 つの極値の間の連続体を記述している ( 非特許文献 4 ) 。 M P S I I は慢性かつ進行性の多系統疾患であり、たとえば脳、心臓、骨格、および関節などの多数の器官に影響する。より軽症型の M P S I I の臨床症状は重度の骨格異常を含み、それらは多発性骨形成不全、低身長、関節硬直、および肝脾腫として公知であり、心臓呼吸性の症状を伴う ( 非特許文献 4 、 5 ) 。重症型 M P S I I は付加的に進行性神経変性を特徴とし、その後閉塞性気道疾患および心不全によって 1 0 代の年齢で死に至る ( 非特許文献 4 、 6 、 7 ) 。

## 【0003】

酵素補充療法 ( E R T : E n z y m e r e p l a c e m e n t t h e r a p y ) は、外来性の補充酵素を静脈内に送達し、マンノース - 6 - リン酸受容体を用いる細胞によって内部移行させるものであり、疾患の重症度にかかわらず M P S I I 患者の身体症状を処置するために用いられてきた ( 非特許文献 8 、 9 ) 。しかし、血流中を循環する酵素は血液脳関門 ( B B B : b l o o d - b r a i n b a r r i e r ) によって C N S への到達を妨げられ、3 分の 2 の M P S I I 患者に対する治療上の利益がかなり低減して、認知的に影響される。さらに、補充酵素に対する重度のアナフィラキシー反応 ( 非特許文献 9 、 1 0 ) 、および酵素に対する中和抗体 ( 非特許文献 1 1 ) が報告されており、これらは処置の有効性を減少させるおそれがある ( 非特許文献 1 2 ) 。

## 【0004】

M P S I I における神経症状を処置するために特異的に設計されて認可された治療法は現在存在しないが、多様な戦略が開発されている。特に遺伝子治療は、M P S I I などの単一遺伝子疾患に対する魅力的な治療の可能性である。第 2 世代レンチウイルスベク

10

20

30

40

50

ター (LV: lentiviral vectors) を用いた幹細胞遺伝子治療 (非特許文献 13)、および CNS へのさまざまなアデノ随伴ベクター (AAV: adeno-associated vectors) の直接注入 (非特許文献 5、14、15) によって、有望な結果が得られている。しかし、マウスの脳からヒトの脳へのスケールアップが主要なハードルであり、治療ベクターの脳組織全体への適切な分配も同様である。

#### 【0005】

同種幹細胞移植は、MPS I ハーラーにおける神経症状を処置するために推奨されている (非特許文献 16 ~ 18) が、MPS II の CNS の処置においては可変性が高く、主に拒絶反応および移植片対宿主病によってもたらされる高い罹患率および死亡率に関連付けられる (非特許文献 19、20)。同種移植片から送達される酵素のレベルは、末梢器官における主要な貯蔵材料を除去するためには十分であるが、脳においては低すぎるのかもしれない、したがって完全な神経補正に対する制限因子であることが示唆されている (非特許文献 21、22)。実際に、LV 形質導入した造血幹細胞および前駆細胞 (HSPC: haematopoietic stem and progenitor cells) ならびにそれらの後代における超生理学的酵素レベルは、異染性白質ジストロフィー、MPS I、および MPS II I A における神経疾患の徴候を補正することが示されている (非特許文献 21、23 ~ 25)。これは、隣接細胞を交差補正するためにリソソーム酵素を合成および分泌する、遺伝子改変ドナー HSPC に由来する細胞によるレシピエントのマクロファージおよびミクログリア集団の再構成をもたらす (非特許文献 22)。さらに、骨髓系前駆細胞に由来する補正されたミクログリア細胞も CNS ミクログリアのターンオーバーに著しく寄与する可能性があるが、成人 CNS におけるそれらの維持および再生に関する議論が存在する。

#### 【0006】

CNS を処置するための幹細胞遺伝子治療アプローチの有効性の程度は、HSC およびそれらの後代で産生されて分泌される酵素のレベルに大きく依拠すると考えられる (非特許文献 22、23)。一般的に、血流には高レベルの酵素が見出されるが、BBB の高密度の微小血管系によって、CNS に入ることが妨げられる (非特許文献 26)。

#### 【0007】

CNS の関与する疾患の神経病理の処置における主要なハードルは、BBB をバイパスすることである。こうした戦略の 1 つは、たとえばトランスフェリン受容体 (TfR: transferrin receptor) および低密度リポタンパク質受容体 (LDLR: low-density lipoprotein receptor) などの BBB 表面に位置する受容体を利用する、経細胞輸送として公知のプロセスを介して CNS に移動させるために、タンパク質を標的にすることである (非特許文献 27)。LDLR ファミリーは、アリポタンパク質 (Apo: a lipoprotein) 複合体に結合してそれらをリソソームに対する標的とする細胞表面受容体である (非特許文献 28)。Apo 複合体は BBB の表面で LDLR に結合し、ニューロンおよびアストロサイトへの取り込みの前に放出される前に反管腔側に経細胞輸送される (非特許文献 29)。多数の研究では、LDLR 結合ドメインペプチドと目的の酵素とを融合することによってこの最小限の侵襲性の技術を利用しており、動物モデルにおいてこれらのキメラコンストラクトが BBB を横断する効率的な送達を示している (非特許文献 29 ~ 33)。

#### 【0008】

本発明者らはこの技術を利用して、第 3 世代レンチウイルスベクターにおいて C 末端におけるインバリエント可動性リンカーによってヒトアリポタンパク質 E (ApoE: a lipoprotein E) の受容体結合ドメインを縦列反復として IDS 遺伝子に融合することによって、MPS II における脳病理および認知機能低下を効率的に処置することを探求した。これによって、エクスピボで補正された HSPC が、移植された動物において BBB を優先的にバイパスし得る超生理学的レベルの IDS 酵素を発現することによって、血流から脳実質に到達する酵素のレベルを増加させることが可能になる。

#### 【0009】

10

20

30

40

50

本発明の目的は、MPS IIに対する上に提案された治療に関連する問題の1つ以上を克服することである。MPS IIに対する効果的な処置を提供することも、本発明の目的である。こうした処置は、投与が比較的容易であり、かつ低い毒性学的プロファイルを有することが理想的であろう。こうした処置が、血液脳関門を横断する必要のある処置の投与に関する問題を克服または回避できることも望ましいだろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

- 【文献】Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: McGraw-Hill, editor. Lysosomal Disorders 2001. p. 3421-52 10
- Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. Journal of inherited metabolic disease. 2005; 28(6): 1011-7
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. Human genetics. 1999; 105(1-2): 151-6. Epub 1999/09/10 20
- Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. European journal of pediatrics. 2008; 167(3): 267-77. Epub 2007/11/27
- Cardone M, Polito VA, Pepe S, Mann L, D'Azzo A, Auricchio A, et al. Correction of Hunter syndrome in the MPS II mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. Human molecular genetics. 2006; 15(7): 1225-36. Epub 2006/03/01 30
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. Jama. 1999; 281(3): 249-54. Epub 1999/01/26
- Holt JB, Poe MD, Escolar ML. Natural Progression of Neurological Disease in Mucopolysaccharidosis Type II. Pediatrics. 2011; 127(5): E1258-E65 40
- Eng C, Muenzer J, Wraith E, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, et al. Clinical benefit of enzyme replacement therapy (ERT) in mucopolysaccharidosis II (MPS II, Hunter syndrome). Molecular genetics and metabolism. 2007; 92(4): S18-S
- Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy wit 50

h idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genetics in Medicine*. 2006; 8(8): 465 - 73

Muenzer J, Beck M, Eng CM, Giugliani R, Hartz P, Martin R, et al. Long-term, open-label extension study of idursulfase in the treatment of Hunter syndrome. *Genetics in Medicine*. 2011; 13(2): 95 - 101

Scarpa M, Almassy Z, Beck M, Bodamer O, Bruce IA, De Meirleir L, et al. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011; 6: 72. Epub 2011/11/09  
Brooks DA, Kakavanos R, Hopwood JJ. Significance of immune response to enzyme-replacement therapy for patients with a lysosomal storage disorder. *Trends in molecular medicine*. 2003; 9(10): 450 - 3. Epub 2003/10/15

Wakabayashi T, Shimada Y, Akiyama K, Higuchi T, Fukuda T, Kobayashi H, et al. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Corrects Neuropathic Phenotype in Murine Model of Mucopolysaccharidosis Type II. *Hum Gene Ther*. 2015. Epub 2015/03/13

Hinderer C, Katz N, Louboutin JP, Bell P, Yu H, Nayal M, et al. Delivery of an adeno-associated virus vector into CSF attenuates central nervous system disease in mucopolysaccharidosis type II mice. *Hum Gene Ther*. 2016. Epub 2016/08/12

Motas S, Haurigot V, Garcia M, Marco S, Ribera A, Roca C, et al. CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *JCI Insight*. 2016; 1(9)

Aldenhoven M, Jones SA, Bonney D, Borrill RE, Coussons M, Mercer J, et al. Hematopoietic cell transplantation for mucopolysaccharidosis patients is safe and effective: results after implementation of international guidelines. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015; 21(6): 1106 - 9. Epub 2015/02/25

Aldenhoven M, Wynn RF, Orchard PJ, O'Meara A, Veys P, Fischer A, et al. Long-term outcome of Hurler syndrome patients after hematopoietic cell transplantation: an international multicenter study. *Blood*. 2015; 125(13):

10

20

30

40

50

2164-72. Epub 2015/01/28

Boelens JJ, Aldenhoven M, Purtill D, Ruggeri A, DeFor T, Wynn R, et al. Outcomes of transplantation using various hematopoietic cell sources in children with Hurler syndrome after myeloablative conditioning. *Blood*. 2013;121(19):3981-7. Epub 2013/03/16

Guffon N, Bertrand Y, Forest I, Fouilhoux A, Froissart R. Bone marrow transplantation in children with Hunter syndrome: outcome after 7 to 17 years. *The Journal of pediatrics*. 2009;154(5):733-7. Epub 2009/01/27

10

Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 1999;22:638-48

Visigalli I, Delai S, Politi LS, Di Domenico C, Cerri F, Mrak E, et al. Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood*. 2010;116(24):5130-9. Epub 2010/09/18

20

Biffi A, Visigalli I. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders: Expected Benefits and Limitations. *Stem Cells Biol Reg*. 2013:127-38

Biffi A, De Palma M, Quattrini A, Del Carro U, Amadio S, Visigalli I, et al. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(8):1118-29. Epub 2004/04/16

30

Langford-Smith A, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Holley RJ, Sergijenko A, Howe SJ, et al. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20(8):1610-21. Epub 2012/05/02

40

Sergijenko A, Langford-Smith A, Liao AY, Pickford CE, McDermott J, Nowinski G, et al. Myeloid/Microglial driven autologous hematopoietic stem cell gene therapy corrects a neuronopathic lysosomal disease. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(10):1938-49. Epub 2013/05/02

50

ub 2013/06/12

Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. Molecular biotechnology. 2005;30(1):57-70. Epub 2005/04/05

Pardridge WM. Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier. Archives of neurology. 2002;59(1):35-40. Epub 2002/01/16

Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. The Journal of clinical investigation. 1998;101(5):1084-93. Epub 1998/04/16

10

Sorrentino NC, D'Orsi L, Sambri I, Nusco E, Monaco C, Spampinato C, et al. A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidoses type I IIA. Embo Mol Med. 2013;5(5):675-90. Epub 2013/04/10

20

Spencer B, Verma I, Desplats P, Morvinski D, Rockenstein E, Adame A, et al. A neuroprotective brain-penetrating endopeptidase fusion protein ameliorates Alzheimer disease pathology and restores neurogenesis. The Journal of biological chemistry. 2014;289(25):17917-31. Epub 2014/05/16

30

Spencer BJ, Verma IM. Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(18):7594-9. Epub 2007/04/28

Bockenhoff A, Cramer S, Wolte P, Knieling S, Wohlenberg C, Gieselmann V, et al. Comparison of five peptide vectors for improved brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulphatase A. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. 2014;34(9):3122-9. Epub 2014/02/28

40

Wang D, El-Amouri SS, Dai M, Kuan CY, Hui DY, Brady RO, et al. Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of receptor-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(8):2999-3004. Epub 2013/02/06

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

50



本発明の態様によると、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ (IDS: iduronate - 2 - sulfatase) 遺伝子配列と、アポリポタンパク質 (Apolipoprotein) E (ApoE II) 遺伝子配列の反復、または ApoE II 遺伝子配列の一部の反復とを含む核酸が提供される。

【0012】

この核酸は、IDS 配列と ApoE II 配列との間に位置する介在リンカー配列をさらに含んでもよい。

【0013】

IDS 配列は、野生型 IDS 配列のコドン最適化配列であってもよい。

【0014】

ApoE II 配列の反復は、縦列反復の形であってもよい。ApoE II 配列の反復は、IDS 配列の上流および / または下流であってもよい。

【0015】

IDS 配列は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 による配列、またはその少なくとも 90 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。その配列が誘導体配列であるとき、好ましくはその配列は少なくとも 93 % の相同性を有する。さらにより好ましくは、その配列は、配列番号 1 または配列番号 2 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列であってもよい。

【0016】

ApoE II 配列は、配列番号 3 またはその少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列による 1 つ以上の配列を含んでもよい。

【0017】

介在リンカー配列は、配列番号 4 による配列、またはその少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。

【0018】

本発明の別の態様によると、個体における酵素の血漿レベルまたは血漿における安定性の増加に用いるための核酸が提供され、この核酸は酵素遺伝子配列と、アポリポタンパク質 E (ApoE II) 遺伝子配列の反復とを含む。

【0019】

この核酸は、酵素配列と ApoE II 配列との間に位置する介在リンカー配列をさらに含んでもよい。

【0020】

酵素配列は、酵素配列のコドン最適化配列であってもよい。

【0021】

ApoE II 配列の反復は、縦列反復の形であってもよい。ApoE II 配列の反復は、酵素配列の上流および / または下流であってもよい。

【0022】

ApoE II 配列は、配列番号 3 またはその少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列による 1 つ以上の配列を含んでもよい。

【0023】

介在リンカー配列は、配列番号 4 による配列、またはその少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。

【0024】

酵素は、リソソーム貯蔵疾患である個体において欠損しているか、または低血漿レベルにて存在する酵素であってもよい。リソソーム貯蔵疾患は、ムコ多糖症 II 型 (MPS

10

20

30

40

50

II)を含んでもよい。

【0025】

核酸はDNA、RNA、cDNA、またはPNAであってもよく、組み換えまたは合成のものであってもよい。核酸は一本鎖であっても、二本鎖であってもよい。核酸配列は、たとえば制限消化、連結、ゲル電気泳動(たとえば、Sambrook et al; Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbour laboratory Pressに記載されるものなど)を含む標準的な分子クローニング技術などを用いるクローニングによって導出されてもよい。核酸配列は、PCR技術を用いて単離または増幅されてもよい。こうした技術は、増幅されるべき核酸配列の配列に基づくプライマーを使用してもよい。提供される配列情報によって、当業者は利用可能なクローニング技術を用いて、細胞への形質導入のために好適な核酸配列またはベクターを生成できる。

10

【0026】

コドン最適化IDS核酸配列は、発現または活性の増強を可能にするように、多数のやり方で最適化されてもよい。たとえば、ヒト細胞において最も一般的なコドンを選択すること、ならびに/または後で形成されるmRNAにおいて生じ得る1つもしくはそれ以上の二次構造およびヘアピンを低減させること、ならびに/またはATG開始点にコザック配列を挿入することなどによって、配列が最適化されていてもよい。

【0027】

好ましくは、核酸配列は発現ベクターとともに、その中に、またはその一部として提供される。好ましくは、核酸配列は遺伝子治療ベクターとして提供されてもよく、それは好ましくは後で発現のために哺乳動物の体に戻される造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)へのエクスピボ形質導入のために好適なものである。ベクターは、ウイルス性または非ウイルス性(例、プラスミド)であってもよい。ウイルスベクターは、レンチウイルス、アデノウイルス、突然変異形を含むアデノ随伴ウイルス(AAV: adeno associated virus)、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、MMLV、GalV、サル免疫不全ウイルス(SIV: Simian Immune Deficiency Virus)、HIV、ポックスウイルス、およびSV40に由来するものを含む。ウイルスベクターは好ましくは複製欠損であるが、ウイルスベクターは複製欠損、複製可能、または条件的であってもよいことが想定される。ウイルスベクターは通常、標的神経細胞のゲノムに組み込まれずに染色体外の状態で存続してもよい。好ましいウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。ウイルスベクターは、任意の非必須配列を除去するために改変されてもよく、これらの非必須配列は当業者に明らかになるだろう。

20

30

【0028】

ウイルスベクターは、細胞に入る能力を有する。しかし、たとえばプラスミドなどの非ウイルス性ベクターは、標的細胞による自身の取り込みを促進するための薬剤と複合体を形成してもよい。こうした薬剤は、ポリカチオン剤を含む。代替的に、たとえばリポソームに基づく送達系などの送達系が用いられてもよい。

【0029】

40

本発明において用いるためのベクターは、好ましくはインビボもしくはエクスピボまたはインビトロで用いるために好適であり、かつ好ましくはヒトに用いるために好適である。最も好ましくは、ベクターはエクスピボで造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)に形質導入するために好適である。

【0030】

ベクターは、好ましくは核酸の発現を指示するための1つ以上の制御配列を含むこととなる。制御配列は、IDSおよびApoeII核酸配列に動作可能にリンクされたプロモーター、エンハンサー、転写終結シグナル、ポリアデニル化配列、複製起点、核酸制限部位、および相同組み換え部位を含んでもよい。加えてベクターは、たとえば成長系(たとえばバクテリア細胞など)または標的細胞におけるベクターの発現を判定するための選択

50

可能マーカ－を含んでもよい。

【 0 0 3 1 】

「動作可能にリンクされる」とは、核酸配列が自身に動作可能にリンクされた配列と機能的に関連して、互いの発現または機能に影響するような方式でリンクされることを意味する。たとえば、プロモーターに動作可能にリンクされた核酸配列は、そのプロモーターに影響される発現パターンを有することとなる。

【 0 0 3 2 】

本発明の態様によると、個体におけるイズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 欠損および / またはムコ多糖症 I I 型 ( M P S I I ) の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるための造血幹細胞および前駆細胞 ( H S P C ) が提供され、この H S P C は患者から除去され、本明細書において上述された核酸によってエキスピボで形質導入され、形質導入された H S P C は個体に投与される。

10

【 0 0 3 3 】

本発明の関連する態様によると、個体におけるイズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 欠損および / またはムコ多糖症 I I 型 ( M P S I I ) の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化の方法に用いるため、あるいはそれを行うための造血幹細胞および前駆細胞 ( H S P C ) が提供され、この H S P C は患者から除去されて、本明細書において上述された核酸によってエキスピボで形質導入されており、形質導入された H S P C は個体に投与される。

【 0 0 3 4 】

20

本発明の関連する態様によると、個体におけるイズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 欠損および / またはムコ多糖症 I I 型 ( M P S I I ) の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化の方法に用いるための造血幹細胞および前駆細胞 ( H S P C ) が提供され、この方法は、前記イズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 欠損を有し、かつ / またはイズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) レベルの上昇を必要とする個体を識別するステップと、その個体から H S P C の一部分を除去するステップと、その H S P C を本明細書において上述された核酸によってエキスピボで形質導入するステップと、形質導入された H S P C の治療上有効な量を個体に投与するステップとを含む。

【 0 0 3 5 】

関連する発明によると、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 欠損に起因し得る疾患または状態の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化のための薬物の製造に用いるための造血幹細胞および前駆細胞 ( H S P C ) が提供され、この H S P C は患者から除去されて、本明細書において上述された核酸によってエキスピボで形質導入されており、形質導入された H S P C は、患者への投与のための薬物に形成される。

30

【 0 0 3 6 】

上記の H S P C の態様は、好ましくは自己 H S P C を使用する ( 最初に患者または個体から除去されている ) が、同種 H S P C も使用されてもよく、したがって患者または個体から H S P C を除去して、エキスピボで形質導入してから患者または個体に投与する必要がなくなる。同種 H S P C は、臍帯血に由来していてもよい。

【 0 0 3 7 】

40

本発明の態様によると、

a ) イズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) を含む第 1 の部分と、

b ) アポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) の反復を含む第 2 の部分とを含む組成物が提供される。

【 0 0 3 8 】

A p o E I I の反復は、縦列反復の形であってもよい。第 2 の部分は、第 1 の部分の上流および / または下流であってもよい。

【 0 0 3 9 】

第 1 および第 2 の部分は、それらの間に位置する介在リンカー部分を有してもよい。

【 0 0 4 0 】

50

第 1 の部分のアミノ酸配列は、配列番号 5 による配列、またはその少なくとも 90 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。その配列が誘導体配列であるとき、好ましくはその配列は少なくとも 93 % の相同性を有する。さらにより好ましくは、その配列は、配列番号 5 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列であってもよい。

【 0 0 4 1 】

第 2 の部分のアミノ酸配列は、配列番号 7 またはその少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列による 1 つ以上の配列を含んでもよい。

【 0 0 4 2 】

介在リンカー部分のアミノ酸配列は、配列番号 8 による配列、またはその少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。

【 0 0 4 3 】

本発明のさらなる態様によると、酵素の血漿レベルまたは血漿における安定性を増加させるための組成物が提供され、この組成物は、

a ) 酵素を含む第 1 の部分と、

b ) アポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) の反復を含む第 2 の部分とを含む。

【 0 0 4 4 】

A p o E I I の反復は、縦列反復の形であってもよい。第 2 の部分は、第 1 の部分の上流および / または下流であってもよい。

【 0 0 4 5 】

第 1 および第 2 の部分は、それらの間に位置する介在リンカー部分を有してもよい。

【 0 0 4 6 】

有利なことに、これらの部分は酵素の血漿における活性を増加させ得ることを発明者らは見出し、これは酵素に対するリンカーを介した A p o E I I の縦列反復を含むことによって、酵素の安定性および循環時間、分泌または細胞への取り込みが変化する可能性を示唆する。

【 0 0 4 7 】

本発明のさらなる態様においては、配列番号 1 またはその少なくとも 95 % の相同性を有する誘導体配列による核酸を含む組成物が提供される。

【 0 0 4 8 】

この組成物は、配列番号 1 の少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。

【 0 0 4 9 】

この組成物は、個体におけるイズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 欠損および / またはムコ多糖症 I I 型 ( M P S I I ) の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるためのものであってもよい。

【 0 0 5 0 】

本発明の別の態様においては、個体におけるイズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 欠損および / またはムコ多糖症 I I 型 ( M P S I I ) の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるためのポリペプチドまたは核酸が提供され、このポリペプチドはアポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) の縦列反復に係留されたイズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) を含むか、またはこの核酸はアポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) 遺伝子配列の縦列反復に係留されたイズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 遺伝子配列を含む。

【 0 0 5 1 】

ポリペプチドまたは核酸は、リンカーまたはリンカー配列によって係留されてもよい。

【 0 0 5 2 】

A p o E I I の縦列反復は、I D S の上流および / または下流であってもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 3 】

I D S 遺伝子配列は、野生型 I D S 遺伝子配列のコドン最適化配列であってもよい。

## 【 0 0 5 4 】

I D S は、配列番号 5 によるアミノ酸配列、またはその少なくとも 9 0 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。その配列が誘導体配列であるとき、好ましくはその配列は少なくとも 9 3 % の相同性を有する。さらにより好ましくは、その配列は配列番号 5 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の相同性を有する誘導体配列であってもよい。

## 【 0 0 5 5 】

I D S 遺伝子配列は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 による配列、またはその少なくとも 9 0 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。その配列が誘導体配列であるとき、好ましくはその配列は少なくとも 9 3 % の相同性を有する。さらにより好ましくは、その配列は、配列番号 1 または配列番号 2 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の相同性を有する誘導体配列であってもよい。

10

## 【 0 0 5 6 】

アポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) の縦列反復は、配列番号 7 によるアミノ酸配列、またはその少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。アポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) 遺伝子配列の縦列反復は、配列番号 3 によるアミノ酸配列、またはその少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。

20

## 【 0 0 5 7 】

リンカーは、配列番号 8 によるアミノ酸配列、またはその少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。

## 【 0 0 5 8 】

リンカー配列は、配列番号 4 による配列、またはその少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の相同性を有する誘導体配列を含んでもよい。

30

## 【 0 0 5 9 】

ポリペプチドまたは核酸は、好適なペプチドまたは核酸送達媒体またはベクターに関連付けられるか、あるいはそれに組み込まれてもよい。

## 【 0 0 6 0 】

「遺伝子配列」という用語は、一般的に発現されて必要なタンパク質となり得る核酸配列を包含することが意図されており、それはゲノム配列、および c D N A を含む 1 つ以上の非コード構成要素（たとえばイントロンなど）が存在しない配列を含む。

## 【 0 0 6 1 】

上記態様のすべてにおいて、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（H S P C）は、リソソーム貯蔵疾患の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるためのものであってもよい。代替的または付加的に、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（H S P C）は、リソソーム貯蔵疾患の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化の方法に用いられてもよい。代替的または付加的に、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（H S P C）は、リソソーム貯蔵疾患の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化の方法に用いられてもよく、この方法は、前記リソソーム貯蔵疾患を有し、かつ/または酵素レベルの上昇を必要とする個体を識別するステップと、前記個体に治療上有効な量の組成物、核酸、ベクター、またはポリペプチドを投与するステップとを含む。なおさらに代替的または付加的に、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（H S P C）は、リソソーム貯蔵疾患の処置、管理、進行

40

50

の遅延、または発達の正常化のための薬物の製造に用いるためのものであってもよい。

【0062】

特に、上記態様のすべてにおいて、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）は、イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）欠損に起因し得る疾患または状態の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるためのものであってもよい。代替的または付加的に、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）は、イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）欠損に起因し得る疾患または状態の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化の方法に用いられてもよい。代替的または付加的に、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）は、イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）欠損に起因し得る疾患または状態の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化の方法に用いられてもよく、この方法は、前記イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）欠損を有し、かつ/またはイズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）レベルの上昇を必要とする個体を識別するステップと、前記個体に治療上有効な量の組成物、核酸、ベクター、またはポリペプチドを投与するステップとを含む。なおさらに代替的または付加的に、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）は、イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）欠損に起因し得る疾患または状態の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化のための薬物の製造に用いるためのものであってもよい。イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）欠損に起因し得る疾患または状態は、ムコ多糖症II型（MPS II）またはハンター症候群を含むだろう。

10

20

【0063】

組成物、核酸、ベクター、およびポリペプチドは液体または固体であってもよく、たとえば粉末、ゲル、またはペーストなどであってもよい。好ましくは、組成物、核酸、ベクター、ポリペプチド、ならびに造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）は液体であり、好ましくは注射可能な液体である。こうした注射可能な液体は、好ましくは静脈内および頭蓋内投与に好適となる。

【0064】

本発明の先行態様の組成物、核酸、ベクター、およびポリペプチドは、さらに薬学的に許容できる賦形剤、アジュバント、希釈剤、または担体を含んで、調合物を提供してもよい。

30

【0065】

「薬学的に許容できる」には、調合物が無菌でありかつ発熱物質を含まないことが含まれる。好適な医薬担体は、薬学の技術分野において周知である。担体（単数または複数）は、本発明の薬剤と適合可能であり、かつ自身のレシピエントに対して有害でないという意味で「許容できる」必要がある。通常、担体は無菌かつ発熱物質を含まない水または食塩水となるが、他の許容できる担体が用いられてもよい。

【0066】

ヒトの治療において、本発明（単数または複数）の調合物は単独で投与され得るが、一般的には意図される投与経路および標準的な医薬診療に関して選択された好適な医薬賦形剤希釈剤または担体との混合物において投与されることとなる。

40

【0067】

加えて、本発明（単数または複数）の調合物は非経口的に、たとえば静脈内、動脈内、腹腔内、くも膜下腔内、脳室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、または皮下などに投与されてもよいし、それらは注入技術によって投与されてもよい。それらの調合物は無菌水溶液の形で最良に用いられ、この無菌水溶液は、たとえば溶液を血液と等張にするために十分な塩またはグルコースなどの他の物質を含有してもよい。もし必要であれば、水溶液は好適に（好ましくはpH3から9に）緩衝されるべきである。無菌条件下での好適な非経口調合物の調製は、当業者に周知の標準的な製薬技術によって容易に達成される。

【0068】

50

非経口投与のために好適な調合物は、抗酸化剤と、緩衝剤と、静菌剤と、調合物を意図されるレシipientの血液と等張にする溶質とを含有し得る水性および非水性の無菌注射溶液；ならびに懸濁剤と増粘剤とを含み得る水性および非水性の無菌懸濁物を含む。調合物は、単位用量または複数用量の容器、たとえば密封アンプルおよびバイアルなどにおいて提供されてもよく、使用の直前にたとえば注射用水などの無菌液体担体の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）の状態と保存されてもよい。前に記載される種類の無菌粉末、顆粒、および錠剤から、即時の注射溶液および懸濁物が調製されてもよい。

【0069】

本発明の別の態様によると、タンパク質の欠損の結果もたらされる状態である個体における血液脳関門を横断して脳に欠損タンパク質を送達するための方法が提供され、組成物は、アポリポタンパク質E（ApoEII）遺伝子配列の縦列反復に係留された欠損タンパク質をコードする遺伝子配列を含むウイルスベクターを含み、このベクターは造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）の集団によってエクスピボで形質導入され、形質導入されたHSPCは個体に投与され、そこで形質導入されたHSPCは血液脳関門を横断するために十分である十分なレベルの欠損タンパク質を発現する。

10

【0070】

ベクターは、欠損タンパク質をコードする遺伝子配列と、アポリポタンパク質E（ApoEII）遺伝子配列の縦列反復との間に、インバリエント可動性リンカーに対する配列を含んでもよい。

【0071】

20

欠損タンパク質は酵素を含んでもよい。酵素は、リソソーム貯蔵疾患酵素であってもよい。好ましくは、酵素はイズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）を含む。

【0072】

この方法において、ApoEII縦列反復遺伝子配列は、配列番号3による配列、またはその最大95%、最大96%、最大97%、最大98%、もしくは最大99%の相同性を有する変異体配列を含んでもよく、一方でインバリエント可動性リンカー配列は、配列番号4による配列、またはその最大95%、最大96%、最大97%、最大98%、もしくは最大99%の相同性を有する変異体配列を含んでもよい。

【0073】

本発明のさらに別の態様によると、リソソーム貯蔵疾患の処置に用いるための組成物が提供され、この組成物は欠損タンパク質をコードする遺伝子配列を含むウイルスベクターを含み、この遺伝子配列はリソソーム貯蔵疾患に関係しており、かつアポリポタンパク質E（ApoEII）遺伝子配列の縦列反復に係留される。

30

【0074】

ベクターは好ましくは、造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）の集団によってエクスピボで形質導入され、形質導入されたHSPCは、リソソーム貯蔵疾患である個体に投与される。

【0075】

ベクターは、欠損タンパク質をコードする遺伝子配列と、アポリポタンパク質E（ApoEII）遺伝子配列の縦列反復との間に、インバリエント可動性リンカーに対する配列を含んでもよい。

40

【0076】

欠損タンパク質は酵素を含んでもよい。酵素は、リソソーム貯蔵疾患酵素であってもよい。好ましくは、酵素はイズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）を含む。

【0077】

ApoEII縦列反復遺伝子配列は、配列番号3による配列、またはその最大95%、最大96%、最大97%、最大98%、もしくは最大99%の相同性を有する変異体配列を含んでもよく、一方でインバリエント可動性リンカー配列は、配列番号4による配列、またはその最大95%、最大96%、最大97%、最大98%、もしくは最大99%の相同性を有する変異体配列を含んでもよい。

50

## 【 0 0 7 8 】

本発明の別の態様によると、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 遺伝子配列およびアポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) 遺伝子配列の反復を含む核酸と、1つ以上の造血幹細胞および前駆細胞 ( H S P C ) との組み合わせが提供され、この核酸は H S P C に形質導入できる。

## 【 0 0 7 9 】

H S P C は好ましくは自己のものとなり、すなわち形質導入された H S P C が投与されるべき個体に由来する。代替的に、H S P C は同種のものであってもよく、すなわち形質導入された H S P C が投与されるべき個体とは異なる個体に由来する。

## 【 0 0 8 0 】

この組み合わせは、本明細書において前の態様に関して上述された核酸を含んでもよく、同様に本明細書において上述されたベクターに組み込まれてもよい。

## 【 0 0 8 1 】

別の態様において、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ ( I D S ) 欠損に起因し得る疾患または状態の処置、管理、進行の遅延、または発達の正常化に用いるための薬物を調製する方法が提供され、この方法は、

( a ) 1つ以上の H S P C を提供するステップと、

( b ) アポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) 配列の縦列反復に係留された I D S をコードする配列を含むウイルスベクターを提供するステップと、

( c ) 遺伝子配列による H S P C の形質導入を可能にするために有効な条件下で H S P C とウイルスベクターとを組み合わせるステップとを含み、形質導入された H S P C は I D S を発現する。

## 【 0 0 8 2 】

好ましくは、ベクターはレンチウイルスベクターを含み、I D S をコードする配列はリンカーによってアポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) 遺伝子配列の縦列反復に係留される。

## 【 0 0 8 3 】

さらなる態様において、造血幹細胞および前駆細胞 ( H S P C ) において、欠損タンパク質および/またはより高いレベルのタンパク質を発現させる方法が提供され、この方法は、

( a ) 1つ以上の H S P C を提供するステップと、

( b ) アポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) 配列の縦列反復に係留されたタンパク質をコードする配列を含むウイルスベクターを提供するステップと、

( c ) その配列による H S P C の形質導入を可能にするために有効な条件下で H S P C とウイルスベクターとを組み合わせるステップとを含む。

## 【 0 0 8 4 】

好ましくは、ベクターはレンチウイルスベクターを含み、タンパク質をコードする配列はリンカーによってアポリポタンパク質 E ( A p o E I I ) 遺伝子配列の縦列反復に係留される。

## 【 0 0 8 5 】

驚くべきことに、かつ有利なことに、本発明者らは、第3世代レンチウイルスベクターにおいてC末端におけるインバリアント可動性リンカーによってヒトアポリポタンパク質 E ( A p o E ) の受容体結合ドメインを縦列反復として I D S 遺伝子に融合することによって、それらが M P S I I における脳病理および認知機能低下を効率的に処置することを示すことに成功した。これによって、エクスピボで補正された H S P C が、移植された動物において B B B を優先的にバイパスし得る超生理学的レベルの I D S 酵素を発現することによって、血流から脳実質に到達する酵素のレベルを増加させることが可能になる。

## 【 0 0 8 6 】

本明細書における「 a 」または「 a n 」への言及は、その範囲内に単数形および複数形の両方、すなわち1つ以上を含む。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 8 7 】

別様に述べられない限り、各態様の特徴は、必要な変更を加えて本発明の他の態様にも適用される。

## 【 0 0 8 8 】

この明細書の記載および請求項の全体にわたって、「含む」および「含有する」という言葉およびそれらの変形は、「含むがそれ（ら）に限定されない」ことを意味し、それらの言葉は他の部分、付加物、構成要素、整数、またはステップを除外することを意図しない（除外しない）。この明細書の記載および特許請求の範囲の全体にわたって、状況が別様を要求しない限り、単数形は複数形を包含する。特に不定冠詞が用いられるところで、状況が別様を要求しない限り、この明細書は単一性と同様に複数性を予期するものと理解されるべきである。

10

## 【 0 0 8 9 】

本発明の特定の態様、実施形態、または実施例とともに記載される特徴、整数、特性、化合物、化学的な部分または基は、不適合性でない限り、本明細書に記載される任意のその他の態様、実施形態、または実施例に適用可能であることが理解されるべきである。この明細書（任意の添付の特許請求の範囲、要約書、および図面を含む）において開示されるすべての特徴、および／または開示される任意の方法またはプロセスのすべてのステップは、こうした特徴および／またはステップの少なくともいくつかが互いに排他的であるような組み合わせ以外は、任意の組み合わせで組み合わせられてもよい。本発明は、任意の前述の実施形態の詳細に制限されない。本発明は、この明細書（任意の添付の特許請求の範囲、要約書、および図面を含む）において開示される特徴の任意の新規のものもしくは任意の新規の組み合わせ、または開示される任意の方法もしくはプロセスのステップの任意の新規のものもしくは任意の新規の組み合わせに及ぶ。

20

## 【 0 0 9 0 】

本発明の詳細な説明

ここで添付の図面を参照して、例として本発明の態様および実施形態を示すこととする。当業者にはさらなる態様および実施形態が明らかになるだろう。この本文において言及したすべての文書は、本明細書において引用により援用される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 9 1 】

30

【図 1 - 1】インビトロにおける新規の血液脳関門横断 I D S 酵素の生成および確認を示す図である。（ a ）コドン最適化ヒト I D S 遺伝子、またはヒト I D S 遺伝子に続く可動性リンカーおよび縦列反復としての A p o E I I ペプチド配列をコードする p C C L レンチウイルスベクターを示す概略的表示である。どちらのレンチウイルスベクターも、ヒト C D 1 1 b プロモーターによって駆動される。（ b ） I D S 遺伝子の C 末端に付加されたインバリアントリンカーおよび A p o E I I 縦列反復の概略的表示および配列である。（ c ） L V . I D S または L V . I D S . A p o E I I のいずれかの 2  $\mu$  g プラスミド D N A による 2 4 時間のトランスフェクション後のヒトミクログリア細胞株（ C H M E 3 ）において、トランスフェクションの 4 8 時間後に測定した細胞内 I D S 酵素活性を示すグラフである。 n = 3。（ d ） L V . I D S または L V . I D S . A p o E I I のいずれかの 2  $\mu$  g プラスミド D N A によって 2 4 時間トランスフェクトしたヒトミクログリア細胞（ C H M E 3 ）において、トランスフェクションの 4 8 時間後に測定した分泌 I D S 酵素活性。 n = 3 一方向 A N O V A、\* \* = p < 0 . 0 1 v s . 非トランスフェクト。

40

【図 1 - 2】インビトロにおける新規の血液脳関門横断 I D S 酵素の生成および確認を示す図である。（ E ） 2 4 時間後の I D S または I D S . A p o E I I の培地から b E N D . 3 細胞への取り込み、 n = 3 ウェル / 条件。（ F ） 4 時間の 7 . 5 m M M 6 P または 5 0  $\mu$  g / m l のヒト組み換え a p o E によるブロッキングの 2 4 時間後の、 M 6 P R または L D L R を通じた I D S または I D S . A p o E I I の受容体介在性の取り込み、 n = 3 ウェル / 条件。データを平均  $\pm$  S E M として示す、二方向 A N O V A、\* = p < 0 . 0 5、\* \* = p < 0 . 0 1、\* \* \* \* = p < 0 . 0 0 0 1 比較をブラケットによって示す。

50

【図2 - 1】LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIは脳特異的IDS活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現することを示す図である。

(a) 幹細胞遺伝子治療の戦略の概略的表示である。ブスルファン条件付けした6～8週齢のMPS IIマウスに、LV・IDSまたはLV・IDS・ApoEIIでMOI 100にて形質導入した $4 \times 10^5$  lin-HSC、または $1 \times 10^7$ の全骨髓細胞を移植した。(b) ベクターのコピー数を示すグラフ、および(c) IDS酵素活性を示すグラフは、移植におけるコロニー形成単位アッセイから形質導入HSCにおいて測定した。(d) WBCにおけるドナーキメラ化を示すグラフは、すべての移植マウスにおける移植4週間後のフローサイトメトリーによって測定した。

【図2 - 2】LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIは脳特異的IDS活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現することを示す図である。

(e) ベクターのコピー数を示すグラフは、対照および処置マウス(n = 6)から8月齢に取ったBM、WBC/血漿、脾臓、および脳を含む器官において測定した。

【図2 - 3】LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIは脳特異的IDS活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現することを示す図である。

(f) IDS酵素活性を示すグラフは、対照および処置マウス(n = 6)から8月齢に取ったBMを含む器官において測定した。(g) 骨髓(n = 6)における個々のマウスのVCNと酵素活性との相関を示すグラフである。

【図2 - 4】LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIは脳特異的IDS活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現することを示す図である。

(f) IDS酵素活性を示すグラフは、対照および処置マウス(n = 6)から8月齢に取ったWBC/血漿を含む器官において測定した。(g) WBC/血漿(n = 6)における個々のマウスのVCNと酵素活性との相関を示すグラフである。

【図2 - 5】LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIは脳特異的IDS活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現することを示す図である。

(f) IDS酵素活性を示すグラフは、対照および処置マウス(n = 6)から8月齢に取った脾臓を含む器官において測定した。(g) 脾臓(n = 6)における個々のマウスのVCNと酵素活性との相関を示すグラフである。

【図2 - 6】LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIは脳特異的IDS活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現することを示す図である。

(f) IDS酵素活性を示すグラフは、対照および処置マウス(n = 6)から8月齢に取った脳を含む器官において測定した。(g) 脳(n = 6)における個々のマウスのVCNと酵素活性との相関を示すグラフである。

【図2 - 7】LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIは脳特異的IDS活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現することを示す図である。

(I) IDS酵素活性を示すグラフは、8月齢に取った対照からの心臓において測定した。(M) 血漿IDS酵素活性とELISAによって測定したIDSタンパク質との相関。

【図2 - 8】LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIは脳特異的IDS活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現することを示す図である。

リソソーム酵素 - ヘキササミニダーゼ活性のレベルを8月齢マウスの(N) 血漿、(O) 脾臓、および(P) 脳において分析した。データを平均 $\pm$ SEMとして示す、一方向ANOVA、\* =  $p < 0.05$ 、\*\* =  $p < 0.01$ 、\*\*\* =  $p < 0.001$ 、\*\*\*\* =  $p < 0.0001$  vs. MPS II、他の比較をブラケットによって示す。

【図3】LV・IDS・ApoEIIはMPS IIマウスの認知異常を補正し、すべての移植は協調およびバランスを回復させることを示す図である。(a) Y迷路テストの概略的表示である。マウスを中央に置き、10分間自由に探索させる。(b) Y迷路における自発的交替を示すグラフは、8月齢の対照および処置マウスにおいて測定した。(c) 合計進入数を示すグラフは、自発運動活性の代理尺度として記録した。(d) 加速ロータロッドを表す。(e) 8月齢の対照および処置マウスを示すグラフは、最大300秒間(4～4 rpm、300秒)にわたって加速ロータロッドにおいて3回試験した。

10

20

30

40

50

【図4-1】LV・IDS・ApoEIIは8月齢のマウスにおける神経炎症に関連するサイトカインを正常化することを示す図である。(a)~(c)MIP-1、MCP-1、IL-1、およびRANTESを測定するサイトカインビーズアレイを示すグラフは、フローサイトメトリーを用いて8月齢のマウスの全脳可溶化物に対して行った(n=6)。

【図4-2】LV・IDS・ApoEIIは8月齢のマウスにおける神経炎症に関連するサイトカインを正常化することを示す図である。(a)~(c)MIP-1、MCP-1、IL-1、およびRANTESを測定するサイトカインビーズアレイを示すグラフは、フローサイトメトリーを用いて8月齢のマウスの全脳可溶化物に対して行った(n=6)。

10

【図4-3】LV・IDS・ApoEIIは8月齢のマウスにおける神経炎症に関連するサイトカインを正常化することを示す図である。(e)合計HSの合計相対量を示すグラフである。(f)脳サンプルから分析した対照および処置マウス(n=6)からのHSの組成的二糖分析。

【図4-4】LV・IDS・ApoEIIは8月齢のマウスにおける神経炎症に関連するサイトカインを正常化することを示す図である。(g)活性化ミクログリアを識別するための、イソレクチンB4(ILB4:isolectin B4)で染色した運動皮質(M2)および線条体の30μm切片の代表的画像、40x。(h)皮質および(i)線条体のマウス当り4つの30μm切片のILB4陽性細胞数をカウントした(ブレグマから約0.26mmから-1.94mm)、n=3/群。スケールバー:50μm。データを平均±SEMとして示す、一方向ANOVA、\* = p < 0.05、\*\* = p < 0.01、\*\*\* = p < 0.001、\*\*\*\* = p < 0.001 vs. MPS II、他の比較をブラケットによって示す。

20

【図5-1】WT-HSCT、LV・IDS、およびLV・IDS・ApoEIIはMPS IIマウスにおける全体的骨格異常を正常化することを示す図である。(a)8月齢における対照および処置MPS IIマウス頭蓋のX線画像である。(b)頬骨弓の幅を示すグラフ。(c)上腕骨の幅を示すグラフ。(d)大腿骨の幅を示すグラフは、ImageJソフトウェア(n=5~11)を用いて分析した。

【図5-2】WT-HSCT、LV・IDS、およびLV・IDS・ApoEIIはMPS IIマウスにおける全体的骨格異常を正常化することを示す図である。(E)MCP-1、(F)MIP-1、および(G)RANTESを測定するサイトカインビーズアレイは、フローサイトメトリーを用いて8月齢のマウスの肝臓可溶化物に対して行った、n=4~6。対照および処置MPS II動物の心臓における(H)Nppbおよび(I)Myh7の遺伝子発現(WT n=3、MPS II n=4、WT-HSCT、LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEII n=6)。(J)血漿においてIDS特異的IgG抗体価を測定した。(K)ELISAによって血漿サンプルにおけるIDSに対する合計IgG抗体を定めた(Pos.対照n=1、neg.対照n=6、LV・IDS/LV・IDS・ApoEII n=6)。データを平均±SEMとして示す、一方向ANOVA、\* = p < 0.05、\*\* = p < 0.01、\*\*\* = p < 0.001、\*\*\*\* = p < 0.0001 vs. MPS II。

30

40

【図6-1】LV・IDSではなくLV・IDS・ApoEIIを用いると、脳におけるヘパラン硫酸の主要蓄積およびその硫酸化パターン形成が完全に正常化してWTレベルになることを示す図である。(A)HSの合計相対量、ならびに(B)対照および処置マウスからのHSの組成的二糖分析は脳サンプルから分析した、n=6/群。

【図6-2】LV・IDSではなくLV・IDS・ApoEIIを用いると、脳におけるヘパラン硫酸の初期蓄積およびその硫酸化パターン形成が全体的に正常化してWTレベルになることを示す図である。(C)NeuN(ニューロン核(neuronal nuclei); 緑色)およびLAMP2(リソソームコンパートメント; 赤色)で染色した、対照および処置マウスからの運動皮質(M2)、尾状核被殻(どちらもブレグマから約-0.46mm)、海馬(CA3)、および扁桃体(どちらもブレグマから約-1.22mm)

50

m) の  $30\ \mu\text{m}$  脳切片の代表的画像、 $n = 6$  / 群、 $40\times$ 、バックグラウンドを低減するためにすべての画像において非線形調整を等しく行った。ガンマ  $0.72$ 、入力レベル  $0 - 190$ 。スケールバー： $50\ \mu\text{m}$ 。データを平均  $\pm$  SEM として示す、一方向 ANOVA、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 、 $*** = p < 0.001$ 、 $**** = p < 0.0001$  vs. MPS II、他の比較をブラケットによって示す。

【図 7 - 1】LV. IDS. ApoE II は 8 月齢の MPS II マウスにおけるアストログリオーシスを正常化することを示す図である。(A) GFAP (グリア線維酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein); 緑色) および LAMP2 (リソソームコンパートメント; 赤色) で染色した、対照および処置マウスからの運動皮質 (M2、ブレグマから約  $-0.46\text{mm}$ )、尾状核被殻 (ブレグマから約  $-0.46\text{mm}$ )、海馬 (CA3)、および扁桃体 (どちらもブレグマから約  $-1.22\text{mm}$ ) の  $30\ \mu\text{m}$  脳切片の代表的画像、 $n = 6$  / 群、 $40\times$ 、バックグラウンドを低減するためにすべての画像において非線形調整を等しく行った。ガンマ  $0.72$ 、入力レベル  $0 - 190$ 。スケールバー： $50\ \mu\text{m}$ 。

【図 7 - 2】LV. IDS. ApoE II は 8 月齢の MPS II マウスにおけるアストログリオーシスを正常化することを示す図である。8 月齢の MPS II マウスの (B) 皮質および (C) 扁桃体における GFAP 免疫蛍光を定量化した、 $n = 3$  / 群、AU: 任意単位 (arbitrary units)。データを平均  $\pm$  SEM として示す、一方向 ANOVA、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$  vs. MPS II、他の比較をブラケットによって示す。

【図 8】IDS. ApoE II が MPS II マウスにおける認知表現型を補正することを可能にする、MPS II マウスにおける IDS. ApoE II 酵素の作用の提案される機構を示す概略図である。ApoE II 残基は IDS が血漿においてより長く活性であり続けることを可能にし、より長い循環時間およびより高確率の CNS への横断をもたらす。一方で非改変 IDS は迅速に分解されて不活性形になる。脳内で、骨髄に由来する補正されたミクログリアが IDS または IDS. ApoE II を類似のレベルで分泌するが、IDS. ApoE II の取り込みの方が効率的であり、改善された安定性で結合し、主要貯蔵および神経炎症のより良好な補正をもたらす。

【図 9 - 1】複数の機構を介した血漿安定性の増加および脳内皮細胞による取り込みの増強を示すグラフおよび免疫蛍光染色画像を示す図である。(A)  $12\text{ng}$  の合計 IDS 酵素を注射した MPS II マウスにおいて注射後 1、10、および 30 分に測定した IDS タンパク質の血漿クリアランス、 $n = 2$  / 群。(B) 血漿 IDS 酵素活性と ELISA によって測定した IDS タンパク質との相関。(C) FITC - デキストランの bEND.3 細胞への取り込み。(D、E) bEND.3 細胞における LDLR (D) または LRP1 (E) に対する免疫蛍光染色。

【図 9 - 2】複数の機構を介した血漿安定性の増加および脳内皮細胞による取り込みの増強を示すグラフおよび免疫蛍光染色画像を示す図である。(F) 単層培養で 24 時間増殖させた bEND.3 細胞の増殖培地に加えた CHME3 細胞によって産生された IDS または IDS. ApoE II の取り込み。 $n = 2$  独立実験、3 ウェル / 条件。(G) transwell 培養で 24 時間増殖させた bEND.3 細胞の増殖培地に加えた CHME3 細胞によって産生された IDS または IDS. ApoE II の取り込み。 $n = 3$  独立実験、2 ウェル / 条件。(H) G からの bEND.3 細胞の基底層に対する経細胞輸送のパーセンテージ。(I) 細胞層のヘパリナーゼ処理または酵素添加前の 1 時間の  $7.5\text{mM}$  M6P もしくは  $50\ \mu\text{g/ml}$  のヒト組み換え ApoE によるブロッキングに続く、24 時間後の IDS または IDS. ApoE II の受容体介在性の取り込み。 $n = 3$  ウェル / 条件。データは平均  $\pm$  SEM、一方向 ANOVA または適切なときに T 検定、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 、 $*** = p < 0.001$ 、 $**** = p < 0.0001$  vs. MPS II。

【実施例】

【0092】

## 実施例 1

コドン最適化IDSを含有するベクターの造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)での形質導入を行うための実験を行い、その後マウスモデルにおいてこれらの細胞のIDS発現をテストし、特に血液脳関門を通過するIDSの量を評価した。

## 【0093】

## 発現ベクター

コドン最適化IDS cDNA (coIDS) (配列番号1)を形成するようにヒトIDS cDNA (配列番号2)を適合させて、Gene Art技術(サーモフィッシャー(ThermoFisher)、ペーズリー(Paisley)、UK)を用いて合成し、Gatewayクローニングを用いて第3世代LV pCCL.sin.cPPT.hCD11b.ccdB.wpreにクローニングしてpCCL.sin.cPPT.hCD11b.IDS.wpre)を作製した。LGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLinker (配列番号8)を提供するように長いインバリアントリンカーcDNA配列(配列番号4)を用いて、縦列反復(LRKLRKRLRLRLRKLRKRLRL) (配列番号7)としての脳標的ペプチド配列ApoEIIのcDNA配列(配列番号3)を含有する付加的なベクターを、コドン最適化ヒトIDS cDNAの下流に挿入した(非特許文献32)。プラスミドをコドン最適化し、Gene Art技術を用いて合成して、前に記載されるとおりに第3世代レンチウイルスバックボーンにクローニングした。ヒトIDS cDNA (配列番号2)に対するアミノ酸配列を配列番号6として参照し、ここでcoIDS cDNA (配列番号1)に対するアミノ酸配列を配列番号5として参照する。ヒトIDS cDNAおよびcoIDS cDNAの両方に対する結果として得られるアミノ酸配列は同じである。

## 【0094】

## トランスフェクションおよび交差補正

7.5mMの高力価直鎖ポリエチレンジイミン(pH7.4、MW40,000、ポリサイエンス社(PolySciences Inc.)、ウォリントン(Warrington)、PA、USA)および150mM NaClを用いて、ヒトミクログリア細胞(CHME3)を、2μgのプラスミドCD11b.IDSまたはCD11b.IDS.ApoEIIDNAによってトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に、RIPA緩衝剤(150mM NaCl、1%Triton-X100、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、50mM Tris、pH8)中に細胞を収集し、振とう機上で4にて30分間インキュベートした後、14,000rpm、4にて20分間遠心分離した。細胞可溶化物を収集し、-80にて保存した。トランスフェクションの48時間後に培地上清を収集し、1,000rpm、4にて10分間遠心分離して細胞片を除去し、-80にて保存した。

## 【0095】

## LV産生および滴定

pMD2G、p8.91gag/pol、LVプラスミド(非特許文献24、非特許文献25、34、35)、および7.5mMポリエチレンジイミン(40kDa、ポリサイエンス、ウォリントン、PA、USA)(36)によるHEK293T細胞の一過性トランスフェクションによって、LVを産生した(非特許文献25)。4にて21,191gで150分間遠心分離することによってレンチウイルスベクター粒子を濃縮し、調合物緩衝剤(PBS、1mg/mlヒト血清アルブミン、5μg/mlプロタミン硫酸塩、40mg/mlラクトース、pH7.2)に再懸濁した。EL4マウスリンパ腫細胞(ATCC TIB-39; ATCC、マナッサス(Manassas)、VA、USA)を濃縮LVの3つの希釈物によって形質導入し、72時間後に収集した。GeneLute Mammalian Genomic DNA Miniprepキット(シグマアルドリッチ(Sigma-Aldrich)、プール(Poole)、UK)を用いて、ゲノムDNAを抽出した。2コピー2組み込みコピー/細胞のpHRsin.SFFV.eGFP.att.wpre(ALS EL4 eGFP2.2)を含有するEL4細胞株クロー

ンからのゲノムDNAの希釈物によって生成された標準曲線を用いて、定量的PCRによって細胞当りの組み込まれたウイルスゲノムの数を定めた（非特許文献24）。前に記載されるとおりにwpreに対するプライマーおよびプローブのセット（TAMRA）を使用し（非特許文献24、25）、げっ歯類gapdh（VIC）（アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）、ペーズリー、UK）に対して標準化した。

#### 【0096】

##### マウスおよび移植手順

X連鎖アレルに対するヘテロ接合性のメスをジョゼフ・ミュンツァー（Joseph Muenzer）教授（ノースカロライナ大学チャペルヒル校（University of North Carolina at Chapel Hill）、NC、USA）から得て、野生型C57BL/6Jのオス（エンヴィーゴ（Envigo）、アルコンベリー（Alconbury）、UK）と繁殖させて、野生型のオスおよびメス、ならびに罹患したヘミ接合性のオスおよびキャリアのメスを得た。前に記載されるとおりにドナーおよびレシピエント細胞を区別するために、PEP3CD45.1コンジェニックバックグラウンド（B6.SJL-Ptprca<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>/BoyJ）にMPSIIを戻し交配した（非特許文献24）。全体を通じて、WT同腹仔を対照として用いた。

#### 【0097】

MPSIIマウスからの全骨髄単核細胞を大腿骨および脛骨から単離し、murine lineage cell depletionキット（ミルテニーバイオテック（Miltenyi Biotec）、ビズリー（Bisley）、UK）を用いて製造者の指示に従って系統枯渇させた。2%ウシ血清アルブミンを含有するX-Vivo-10培地（バイオウィッタカー（BioWhittaker））中に細胞を $1 \times 10^6$ 細胞/mlにて再懸濁し、100ng/mlマウス幹細胞因子、100ng/mlマウスfms様チロシンキナーゼ-3、および10ng/ml組み換えマウスインターロイキン3（ペプロテック（PeproTech）、ロッキーヒル（Rocky Hill）、NJ、USA）を用いて3時間刺激した後に、感染効率100にてレンチウイルスベクターによって20～24時間形質導入した。

#### 【0098】

個別に通気したケージに収容した6～8週齢のマウスに対し、腹腔内注射による5日量（25mg/kg/日）の125mg/kgブスルファン（Busilvex；ピエールファール（Pierre Fabre）、カストル（Castres）、フランス（France））を用いて骨髄破壊した。骨髄破壊の前に、マウスに酸性化した水（pH2.8）、照射した食物、およびマッシュを与えた。ブスルファンの最後の注射を受けてから24時間以内に、外側尾静脈を通じてマウスに $3 \sim 4 \times 10^5$ の系統枯渇し形質導入した造血幹細胞を注射した。野生型移植（WT-HSCT）に対して、マウスは $1 \sim 2 \times 10^7$ の非形質導入全骨髄細胞を受けた。

#### 【0099】

##### フローサイトメトリーを用いたキメラ化分析

移植の4週間後に、末梢血においてドナー造血幹細胞の生着を評価した。細胞をToPro3ヨウ化物（サーモフィッシャーサイエンティフィック（ThermoFisher Scientific）、ペーズリー、UK）の5%溶液中で抗マウスCD45.1-PE（ドナーHSC）、CD45.2-FITC（レシピエントHSC）、CD3-PerCp5（T細胞）、CD19-APC-Cy7（B細胞）、およびCD11b-PerCp7（マクロファージ/ミクログリア）（BD Pharmingen、オックスフォード（Oxford）、UK）によって染色し、BD FACS Canto IIフローサイトメーター（BD）において分析した。

#### 【0100】

##### サンプル処理

8月齢において、マウスに麻酔をして37℃リン酸緩衝食塩水による経心腔的灌流を行

10

20

30

40

50

って器官から血液を除去した。1つの脳半球を4%パラホルムアルデヒド中で24時間固定し、30%ショ糖、2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>/リン酸緩衝食塩水溶液に48時間移した後に、-80℃で凍結した。脳、脾臓、心臓、腎臓、筋肉、および肝臓の薄片をドライアイス上で急速凍結し、-80℃にて保存した。IDS酵素活性アッセイに対して、均質化緩衝剤(0.5 mol/l NaCl、0.02 mol/l Tris、0.1% Triton-X100、pH 7~7.5)中でサンプルをホモジナイズおよび超音波処理した後に、4℃にて14,000 rpmで30分間遠心分離した。1つの脛骨および大腿骨を1 mlの2% FBS/PBSで洗浄し、70 μmフィルターを用いてろ過し、赤血球溶解緩衝剤(150 mM NH<sub>4</sub>Cl、10 mM KHCO<sub>3</sub>、0.1 mM EDTA、pH 7.2~7.4)を用いて溶解することによって、骨髓サンプルを収集した。上清を収集し、-80℃にて保存した。GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprepキットを用いて、器官VCN分析に用いるゲノムDNAを抽出した。

10

#### 【0101】

##### IDS酵素活性

前に記載されるとおりに蛍光基質MU-IdoA-2S(カルボシンス(Carbo synth)、コンプトン(Compton)、UK)および第2のステップの基質としてのラロニダーゼ(Aldurazyme、ジェンザイム(Genzyme))を用いた2ステッププロトコルにおいて、IDS酵素活性を測定した(37)。出発材料の量は、BCAアッセイ(サーモフィッシャー)を用いて血漿に対して20 μgの総タンパク質、肝臓、脾臓および骨髓に対して40 μg、脳に対して60 μgに標準化した。

20

#### 【0102】

##### 精製グリコサミノグリカンの調製

前に記載されるとおりに、可溶性脳フラクションを収集して処理した(38)。簡単にいうと、脳組織を機械的にホモジナイズして3 ml PBS中で37℃にて4時間Pronase処理(1 mg/組織)した。各サンプルに30 μlのTriton X100を加えて1%の最終濃度にし、室温にて1時間インキュベートした後に、1 mgのPronaseの2度目の添加を37℃にて4時間行った。予め平衡化したDEAE-Sepharoseカラムにサンプルをロードし、カラムを50 mlの0.25 M NaCl/20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O(pH 7)で洗浄することによってヒアルロナンを除去した。5 mlの1.5 M NaCl/20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O(pH 7)によってGAGを溶出し、PD10カラム(アマシャム(Amersham)、GEヘルスケア(Healthcare))を用いて脱塩して凍結乾燥した。

30

#### 【0103】

##### HSおよびDSのヘパリナーゼ消化に続くAMAC標識分析

100 μlの0.1 M酢酸ナトリウムおよび0.1 M酢酸カルシウム(pH 7)中で、各5 mIUのヘパリナーゼI、II、およびIII(生化学工業(Seikagaku)、東京(Tokyo)、日本(Japan))を用いてHS鎖を消化した。結果として得られる二糖類を凍結乾燥し、20 μlの0.1 M 2-アミノアクリドン(AMAC: 2-aminoacridone)の85% Me<sub>2</sub>SO/15%酢酸(v/v)溶液に再溶解し、室温にて20分間インキュベートした。各サンプルに20 μlのNaBH<sub>3</sub>CNを加え、室温にて一晩インキュベートした。Zorbax Eclipse XDB-C18カラム(2.1 x 500 mm、3.5 μm)(アジレントテクノロジー(Agilent Technologies)、ストックポート(Stockport)、UK)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーによって、AMAC標識した二糖類を分離した。

40

#### 【0104】

##### サイトメトリックビーズアレイ(CBA: Cytometric bead array)

BDサイトメトリックビーズアレイ(CBA)フレックスセット(Flex Set)キット(BDバイオサイエンス(Biosciences)、オックスフォード、UK)を用いて、8月齢の全脳抽出物(n=6/群)におけるIL-1、MCP-1、MIP

50

- 1 、および R A N T E S のレベルを測定した ( 4 0 ) 。 F A C S C a n t o I I フローサイトメーター ( B D ) において分析を行った。 F S C v s S S C プロットを用いてシングレットピーズ集団の識別を行い、 A P C および A P C - C y 7 を用いて各個々のサイトカインピーズを分離し、 P E を用いてサイトカインレベルを測定した。 F C A P A r r a y ソフトウェア ( B D ) を用いて、結果をエクスポートして分析した。 B C A アッセイを用いて脳タンパク質濃度を得て、各サンプルに対するタンパク質レベルに対してサイトカインレベルを標準化した。

#### 【 0 1 0 5 】

##### 行動分析

##### ロータロッド

わずかな変更を伴う前の記載のとおり 3 2 週齢における運動協調性およびバランスを評価するために、ロータロッドテストを用いた ( 4 1 ) 。オスのマウス ( W T 、 n = 1 6 、 M U T 、 n = 1 2 、処置群 n = 1 2 ~ 1 6 ) を、ロータロッド ( ウゴバジレ ( U g o B a s i l e ) 、ヴァレーゼ ( V a r e s e ) 、イタリア ( I t a l y ) ) における 3 回の訓練試験 ( 4 r p m で 1 2 0 秒、 4 r p m で 3 0 0 秒、 4 ~ 4 0 r p m で 3 0 0 秒 ) にわたって訓練し、各セッションの間に 3 0 分の間隔を置いた。訓練の 2 4 時間後に 3 回のテスト試験を行った。テスト試験に対しては、ロータロッドを 4 ~ 4 0 r p m の加速する速度で 3 0 0 秒間回転させ、各試験の間に 5 分間静止した。すべての訓練およびテスト試験に対して落下までの時間を記録し、落下までの時間を合計試験時間のパーセンテージとして算出した。

#### 【 0 1 0 6 】

##### 自発的交替

自発的交替テスト ( 4 1 、 4 2 ) を用いて、 3 2 週齢のすべてのマウスの空間的作業記憶を評価した。 3 つの同一のアームからなる Y 迷路における単一の 1 0 分間の試験において、自発的交替を評価した。テストマウスを 3 つのアームの中央に置き、自由に探索させた。重複する 3 つ組のセットにおいて 3 つのアームに連続的に進入することを、自発的交替と記述した。その効果を、交替パーセント = [ 交替回数 / ( 合計アーム進入数 - 2 ) ] x 1 0 0 として算出した。

#### 【 0 1 0 7 】

##### 生マウスの X 線イメージング

イソフルランを用いて対照および処置マウスを麻酔し、高感度の裏面入射型裏面照射型 4 M P 、 1 6 ビット、デジタル C C D カメラで適合させたブルカー ( B r u k e r ) I n V i v o X t r e m e システムを用いて、放射線透過写真を撮影した ( 4 5 k e V ) 。個々の骨の幅に対して、 I m a g e J ソフトウェアを用いて X 線画像を分析した。

#### 【 0 1 0 8 】

##### 統計

G r a p h P a d P r i s m 7 ソフトウェア ( ラホヤ ( L a J o l l a ) 、 C A 、 U S A ) を用いて、統計分析を行った。個々の群比較に対して、両側パラメトリックの対応のない t 検定を適用し、有意性を  $p < 0 . 0 5$  に設定した。多群分析に対して一方向 A N O V A を行い、その後チューキー多重比較検定を行った。

#### 【 0 1 0 9 】

##### 血液脳関門を標的とする I D S 酵素の開発およびインビトロ確認

実験の際に発明者らは、受容体介在性の経細胞輸送を介して、 L D L R の使用を通じて効率的に B B B を横断できる新規の M P S I I 特異的スルファターゼ酵素の開発を探索した。ヒト I D S 単独、または縦列反復としてのヒト A p o E 受容体結合領域にリンクされたヒト I D S をコードする新規のレンチウイルスベクターを、ヒト骨髄特異的 C D 1 1 b プロモーターの下に構築した ( 図 1 a に示す ) 。

#### 【 0 1 1 0 】

I D S 遺伝子の C 末端にインバリアント可動性リンカーを加えた後に、ヒト A p o E の受容体結合部分のコドン最適化配列を縦列反復として加えることによって、このスルファ

10

20

30

40

50



ターゼを改変した(図1bに示す)。通常、リンカーおよびペプチドの付加によってタンパク質の折り畳みが変わり、酵素活性に有害な影響を与える可能性がある。

#### 【0111】

本発明のコンストラクトがなおもIDSの過剰発現および分泌を可能にすることを検証するために、ヒトミクログリア細胞株(CHME3)をLV・IDSまたはLV・IDS・ApoEIIのいずれかを発現するプラスミドDNAによってトランスフェクトした。LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIによって、それぞれ26倍および24倍の細胞活性の増加を観察した(図1cに示す)。より重要なことに、トランスフェクションの72時間後に分泌IDS活性の84倍および81倍の増加を検出した(図1d)。このことは特に、C末端の改変がインピトロにおける改変IDS酵素の分泌または発現に負の影響を与えないことを示す。24時間後にマウス内皮bEND.3細胞におけるIDSに対するIDS・ApoEIIの取り込みの有意な増加を検出し(図1E、図1F)、これは排他的ではないが主にM6P受容体を介するものであった(図1F)。

10

#### 【0112】

LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIの介在する幹細胞遺伝子治療は、脳におけるIDS酵素活性を改善し、末梢器官において超生理学的レベルの活性IDSを発現する

IDSまたはIDS・ApoEIIを発現するLV・IDSまたはLV・IDS・ApoEIIのいずれかで形質導入したMPS IIドナーからの $4 \times 10^5$ の系統枯渇した造血幹細胞(HSC)を、16匹のブスルファン条件付けした6~8週齢のMPS IIマウスレシピエントに移植した(図2aに示す)。同種幹細胞移植と同等に、改変していない全骨髓細胞も、完全に骨髓破壊したMPS IIレシピエントに注射しており、これを以後WT-HSCTと呼ぶ。

20

#### 【0113】

移植前に、コロニー形成単位(CFU: colony-forming unit)アッセイから単離した系統枯渇したHSC(lin-HSC: lineage-depleted HSC)において、IDS活性およびベクターコピー数(VCN: vector copy number)を測定した。この実験は、LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEIIで形質導入したHSCにおける平均ベクターコピー数が3.1および3.8であること(図2bに示す)、ならびにIDS酵素の過剰発現がそれぞれWTの124倍および152倍であること(図2cに示す)を示した。これらのデータは、造血細胞におけるベクターゲノム組み込み数と、酵素過剰発現との正の相関を示す。移植の4週間後の末梢WBCのフローサイトメトリー分析は、MPS IIレシピエントへの形質導入細胞の完全な生着を示し、80~100%のドナーCD45.1+細胞を達成した(図2dに示す)。

30

#### 【0114】

MPS IIにおけるこの新規の遺伝子治療の治療有効性を評価するために、各群からの6匹の動物を8月齢で殺して、中枢および末梢器官の生化学的分析を行った。全BM、WBC、脾臓、および脳においてベクター組み込みを検出し、WBCにおけるLV・IDS・ApoEII処置マウスのみが有意に低い平均を有した(図2eに示す)。少数の動物は、評価されたすべての器官において一貫してより低いVCNを示したが、別の移植手順において改変HSCを受取った。LV・IDSおよびLV・IDS・ApoEII処置群の両方に対するBM、血漿、および脾臓において、超生理学的レベルのIDSを観察した。脳におけるIDS酵素活性レベルも未処置MPS II動物に比べて上昇しており、それはWT脳における通常のIDS活性の1.5%から8%に相当する。WT-HSCT移植はBM、血漿、および脾臓のみにおいてWTに相当するIDSレベルを回復させたが、脳においては未処置MPS II動物に比べて顕著なIDS活性の増加を検出できなかった。

40

#### 【0115】

有利なことに、LV・IDS・ApoEII処置動物の血漿のIDS活性は、LV・I

50

D S 処置群よりも 3 倍高く、これは酵素の安定性および循環時間、分泌または細胞への取り込みが変わった可能性を示唆する（図 2 f に示す）。さらに、V C N と I D S 酵素活性レベルとの正の相関は、I D S 遺伝子のゲノム組み込みの増加によって酵素の過剰発現が駆動されていることをさらに示唆する（図 2 g）。しかし、血漿における W B C V C N と I D S 活性との相関は、L V . I D S 群と L V . I D S . A p o E I I 群とで有意差を示し、ここでは L V . I D S . A p o E I I W B C における低 V C N の結果もたらされる I D S レベルがどの L V . I D S 処置マウスよりも高く、これは酵素の産生、取り込み、または分泌の機構の相違を示唆している。加えて、L V . I D S . A p o E I I 処置動物の血漿におけるより高い I D S レベルは、脳におけるより高い I D S 酵素レベルをもたらさず、脳における酵素レベルは両方の L V 処置群において同等である（図 2 f に示す）。血漿における注射した酵素のクリアランス速度は、I D S 群と I D S . A p o E I I 群とで類似であった（図 2 j）。B M、脾臓、脳、肺、肝臓、および心臓における V C N と I D S 酵素活性レベルとの正の相関は、I D S および I D S . A p o E I I の両方に対してほぼ同等の活性 / V C N を伴って観察しており、これは I D S 遺伝子のゲノム組み込みの増加によって酵素の過剰発現が駆動されていることを示唆する（図 2 K）。

10

#### 【 0 1 1 6 】

血漿における L V . I D S における 2 . 5 6 単位 / V C N に比べて、L V . I D S . A p o E I I においては 1 5 . 4 1 単位 / V C N の酵素活性の値を検出しており、これは A p o E I I 残基の融合によって血漿における I D S 酵素活性が有意に増加することを示唆する。I D S . A p o E I I における酵素活性のこの増加は、血漿における I D S タンパク質に対する I D S 酵素活性の比較によってさらに示され、I D S . A p o E I I は I D S タンパク質の単位当りの活性がより高いことを示している（図 2 M）。

20

#### 【 0 1 1 7 】

##### リソソームの恒常性

M P S I I におけるリソソームの機能障害および主要貯蔵材料の制御されない蓄積は、リソソームの調節およびその後の恒常性に大きな影響を有すると考えられる。重要なことに、神経変性はリソソーム機能障害およびオートファジー障害に関連する。たとえば M P S I I などの疾患状態において、内性リソソーム酵素は、別のリソソーム酵素の欠損を補償できる。未処置 M P S I I 動物の血漿（W T の 2 倍）、脾臓（W T の 1 . 5 3 倍）、および脳（W T の 2 倍）において、リソソームヒドロラーゼ - ヘキソサミニダーゼのレベル上昇を検出した（図 2 N ~ P）。- ヘキソサミニダーゼの血漿、脾臓、および脳レベルは、L V . I D S および L V . I D S . A p o E I I 処置群の両方において W T レベルまで完全に正常化した（図 2 N ~ P）。W T - H S C T は血漿および脾臓における - ヘキソサミニダーゼレベルを正常化し（図 2 N、図 2 O）、脳におけるレベルを W T レベルまでの完全な正常化は達成せずに回復させた（図 2 P）。

30

#### 【 0 1 1 8 】

ヘパラン硫酸の蓄積を L V . I D S . A p o E I I は完全に正常化するが L V . I D S は正常化しない

脳サンプルから H S および C S / D S グリコサミノグリカンを経過精製し、逆相 H P L C によって分析および定量化した。M P S I I マウスおよび W T - H S C T で処置したマウスの脳において、合計 H S の 6 倍の増加を検出した（図 6 A）。L V . I D S で処置したマウスは、脳における合計 H S 蓄積が W T レベルの約 3 倍までの減少を示した。最も重要なことに、L V . I D S . A p o E I I 処置マウスは、脳 H S レベルの W T レベルまでの完全な正常化、および L V . I D S と比較して有意に低いレベルの H S を示した（図 6 A）。

40

#### 【 0 1 1 9 】

M P S I I マウスにおける H S 組成分析は、脳 H S の 3 1 . 1 % が完全に硫酸化した U A ( 2 S ) - G 1 c N S ( 6 S ) からなることを示し、これに比べて対照 W T マウスでは 1 2 . 3 % であった（図 6 B）。W T マウスにおいて、これらは一般的に鎖に沿って他の硫酸化二糖とクラスターを形成し、M P S I I マウスにおいては H S 鎖全体に沿って硫酸化が有意に増加する。この傾向を、W T - H S C T、L V . I D S、および最も効果的

50

にLV・IDS・ApoEIIによって逆転した。同様に、UA(2S)-GlcNSはWTマウスにおける16.8%からMPSIIマウスにおける31.1%に増加することを観察し、これはLV・IDS・ApoEII群のみにあって18.4%まで完全に補正されて減少した。

#### 【0120】

加えて、合計脳CS/DSレベルがLV・IDS・ApoEIIマウスにおいてMPSIIと比べて有意に低減することを観察した(補足図2A)が、WTとMPSIIマウスとの有意差は検出できなかった。UA(2S)-GalNAc(4S)はWTマウスにおける1.03%からMPSIIマウスにおける6.5%に増加することを出し、これはLV・IDS・ApoEII群において完全な補正が得られた。

10

#### 【0121】

LV・IDS・ApoEIIは脳全体にわたるニューロンのリソソーム蓄積を補正する次いで、8月齢(移植の6ヵ月後)の移植MPSIIマウスの脳におけるIDS酵素レベルの増加が、ニューロン(NeuN)におけるリソソーム拡大および基質蓄積に与える影響を、リソソームマーカーLAMP2を用いて定めた。WT動物は、運動皮質(層V/VI)においてNeuNと部分的にしか共存しない弱い点状の核周囲LAMP2染色を示した。未処置MPSII動物およびWT-HSCT処置動物は、運動皮質、尾状核被殻、海馬、および扁桃体においてNeuNおよびLAMP2の強い共存染色を示し、ニューロンまたは衛星グリア細胞における重いリソソーム負荷を示唆した(図6C)。大脳皮質、尾状核被殻、および扁桃体におけるLV・IDSの介在する改善、ならびに海馬において充血したリソソームコンパートメントがなおみられることは、脳に検出されるHSのレベルに強く相関する主要基質蓄積の単なる部分的な補正のみを示唆する(図6A、図6B)。LV・IDS・ApoEIIは皮質、尾状核被殻、および海馬における増加したLAMP2染色を完全に正常化し、扁桃体におけるリソソーム負荷の量をかなり低減した(図6C)。

20

#### 【0122】

MPSIIマウスにおいてLV・IDS・ApoEIIは神経炎症を完全に正常化するのに対し、LV・IDSは改善を仲介する

アストロサイトはMPS障害における強い神経炎症反応に介在することが見出されており、これは反応性のグリオシス、アストログリオシス、および炎症性サイトカインのレベル増加につながる。対照および処置MPSIIマウスの脳冠状切片を、アストロサイトのマーカーGFAP(グリア線維関連タンパク質; 緑色)およびLAMP2(赤色)で染色した。未処置MPSIIにおいてはWTマウスよりも顕著に多いGFAP染色を皮質、尾状核被殻、および扁桃体において観察し、これは広範囲のアストログリオシスを示した(図7A)。加えて、未処置およびWT-HSCTマウスの尾状核被殻、海馬、および扁桃体においてGFAPおよびLAMP2の強い共存を観察し(図7A)、ニューロンに加えてアストロサイトにおける顕著なリソソーム基質蓄積を示唆した(図6C)。LV・IDS・ApoEIIはアストログリオシスを完全に抑制して、皮質、尾状核被殻、海馬、および扁桃体におけるLAMP2染色を減少させてWTレベルに戻すことができ、このことは基質貯蔵および炎症性サイトカインの減少と相関した(図6A、図6B、図6A~D)。同様に、LV・IDSは皮質、尾状核被殻、および扁桃体に存在する反応性アストロサイトの数を減少させた。

30

40

#### 【0123】

LV・IDS・ApoEIIはMPSIIマウスにおける認知異常ならびに協調およびバランスを完全に補正する

MPSIIマウスモデルにおけるCNSおよび骨格の表現型がLV・IDSまたはLV・IDS・ApoEII改変HSCによって回復し得るかどうかを理解するために、各群のすべての処置動物に対して移植6ヵ月後に相当する8月齢において認知および感覚運動性能の機能研究を行った。10分間のY迷路テストを用いて空間的作業記憶の認知的評価を評価し、このY迷路テストはマウスが最近探索したアームよりも新規のアームを探索

50

することを生得的に好むことを利用したものである（図3 aに示す）。

【0124】

神経認知評価は、LV・IDS・ApoEII処置マウスにおける自発的交替の完全な正常化を示したが、LV・IDS処置群またはWT-HSCT群においては示さなかった（図3 b）。このことは、LV・IDS・ApoEIIを用いてMPS IIマウスモデルにおいてみられた認知機能障害の完全な補正を示唆するだけでなく、進行性のMPS II疾患に関連するさらなる認知衰退の防止も示す。興味深いことに、WT-HSCTはMPS IIに関連する認知症状に正の影響を有さず、これはWT-HSCTがMPS IIの脳の処置に好適ではない可能性をさらに強調する。Y迷路の異なるアームへの合計進入数を、全体の活動性の代理尺度として用いることもできる。すべてのテスト群の間に合計進入数の差は検出されず、これはLV・IDS・ApoEII処置動物における認知症状の真の表現型の救済を示唆した（図3 cに示す）。

10

【0125】

対照および処置マウスに対して、げっ歯類の運動障害における感覚運動の協調およびバランスに対するよく確立されたテストであるロータロッドのテストも行った（図3 dに示す）。前に記載されるとおり、8月齢のMPS IIマウスは加速するロッドにおける能力の低減を示した。WT-HSCTを含むすべての移植処置は、これを完全に救済した（図3 eに示す）。

【0126】

LV・IDS・ApoEIIは神経炎症性サイトカインを正常化するが、LV・IDSは正常化しない

20

8月齢の対照および処置マウスの全脳抽出物からの慢性神経炎症に関連する多数の炎症性サイトカインを定量化するために、サイトメトリックビーズアレイ（CBA）を用いた。本発明者らは最初に、未処置MPS II動物におけるマクロファージ炎症性タンパク質（macrophage inflammatory protein）（MIP-1/CCL3）、インターロイキン1（IL-1：interleukin 1）タンパク質、RANTES（CCL5）、および単球走化性タンパク質（monocyte chemoattractant protein）（MCP-1/CCL2）の有意な増加を識別した（図4 a、図4 b、図4 c、図4 dに示す）。MIP-1、IL-1、およびRANTESタンパク質レベルをLV・IDS・ApoEIIは正常化し、LV・IDSは部分的にのみ正常化し、MCP-1レベルはすべての群において上昇したままだった（図4 bに示す）。

30

【0127】

加えて本発明者らは、未処理MPS IIマウスの皮質および線条体において、イソレクチンB4（ILB4）陽性細胞のそれぞれ30倍および25倍の増加を観察し（図4 E、図4 F、図4 G）、これはミクログリアの広範囲の活性化およびその後の神経炎症を示唆する。興味深いことに、WT-HSCTおよびLV・IDSはどちらもILB4染色を皮質においてWTレベルのそれぞれ14倍および12倍に低減し（図4 F）、線条体においてWT染色の15倍および13倍に低減した（図4 G）。最も重要なことに、LV・IDS・ApoEIIは皮質および線条体の両方において活性化したミクログリアの数を完全に正常化でき（図4 F、図4 G）、このことは前に観察した神経炎症サイトカインの低減およびLV・IDS・ApoEIIにおけるアストロサイト増加の完全な抑止と強く相関する。

40

【0128】

このことは全体として、MPS IIにおける神経炎症性サイトカインおよびケモカインの放出、反応性アストログリオシス、およびミクログリアの活性化をLV・IDS・ApoEIIは完全に抑止でき、LV・IDSは部分的にのみ抑止できることを示唆する。

【0129】

ヘパラン硫酸の蓄積をLV・IDS・ApoEIIは完全に正常化するがLV・IDSは正常化しない

50

対照および処置MPS IIマウスの脳からHS GAGを精製し、細菌ヘパリナーゼ酵素を用いて脱重合して個々のHS二糖にした後、AMACを用いて個々の二糖の還元末端の蛍光タグ付けを行った。逆相HPLC分離を用いて、各HS二糖の個別の寄与および硫酸化パターンを定量化および決定した。

#### 【0130】

HPLC分析は、WT、未処置MPS II、およびすべての処置群の合計HSの相対的レベルの算出を可能にする(図4eに示す)。MPS IIマウスおよびWT-HSCTで処置したマウスの脳において、合計HSの6倍の増加を検出した( $p < 0.0001$ )。興味深いことに、LV-IDSで処置したマウスは、脳における合計HS蓄積がWTレベルの約3倍までの減少を示した。最も重要なことに、LV-IDS-ApoE II処置マウスは、脳HSレベルのWTレベルまでの完全な正常化を示した(図4eに示す)。

10

#### 【0131】

HS組成分析は、未処理MPS II脳における三硫酸化二糖UA(2S)-GlcNS(6S)の有意な増加、およびUA(2S)-GlcNSの増加を示した(図4fに示す)。この傾向をWT-HSCTおよびLV-IDSは部分的に逆転させたが、LV-IDS-ApoE II群だけがWTレベルまで戻す完全な補正を得た。

#### 【0132】

一硫酸化HS二糖は著しく異なる傾向を示し、UA-GlcNSの未処置MPS IIおよびWT-HSCT処置レベルはWT脳よりも低かった(図4fに示す)。LV-IDS処置はこれを部分的に改善したが、LV-IDS-ApoE II群のみがこれを完全に補正した。

20

#### 【0133】

MPS IIマウスにおけるすべての移植戦略が骨格病理を寛解させる

MPS IIマウスモデルにおける骨格症状の程度に対する強固なデータを得るために、対照および処置マウスに対する完全麻酔下の全身X線を行った。ImageJイメージングソフトウェアを用いて、頬骨弓ならびに四肢長管骨(上腕骨および大腿骨)の幅を測定した。

#### 【0134】

未処置MPS II動物において有意に増加する頬骨弓の幅は、WT-HSCTを含むすべての移植群においてWTの寸法まで低減した(図5a、図5bに示す)。上腕骨の幅はWT-HSCTおよびLV-IDS群において有意に低減したが、LV-IDS-ApoE II処置動物のみが完全な補正を得た(図5cに示す)。さらに、すべての処置動物における大腿骨の幅は、WT動物と比べて有意差を示さず、顕著な骨格の救済を示唆した。

30

#### 【0135】

WT、LV-IDSまたはLV-IDS-ApoE II改変HSCの移植後に末梢炎症が抑止される

8月齢のMPS IIマウスの肝臓においてMCP-1、MIP-1、およびRANTESのレベルの上昇を検出し、それをWT-HSCT、LV-IDSまたはLV-IDS-ApoE II処置が完全に抑止した(図5E~5G)。これらのデータは、WT-HSCT、LV-IDS、およびLV-IDS-ApoE IIがMPS IIマウスにおける慢性的末梢炎症を完全に補正するために十分な量の末梢酵素を産生することを示唆する。

40

#### 【0136】

WT-HSCT、LV-IDS、およびLV-IDS-ApoE II群において、心不全マーカーNppbおよびMyh7の遺伝子発現が正常化する

MPS IIマウスモデルにおける心不全のリスクがより高いことの指標となり得る、心筋症および心臓病理に関連する2つのマーカーであるNppbおよびMyh7の発現を調査した。心室から分泌されて筋細胞の伸展および血圧を調節する脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP: brain natriuretic peptide)をコードするNppbの発現は、MPS IIにおいてWTオスマウスよりも約16倍高いことを見出した(図5H)。WT-HSCT、LV-IDS、およびLV-IDS-ApoE II群にお

50

いて、N p p b 発現はW T レベルまで完全に安定化した（図 5 H）。主に胎仔の心臓において見出され、心筋および I 型筋線維の主要構成要素としてのミオシン重鎖ベータをコードする M y h 7 の発現は、未処置 M P S I I 動物において上昇した。W T - H S C T、L V . I D S、および L V . I D S . A p o E I I 群における M y h 7 発現は、W T 発現と類似であった（図 5 I）。

#### 【 0 1 3 7 】

L V . I D S および L V . I D S . A p o E I I 形質導入 H S C の移植に続く I D S の過剰発現は、ヒト I D S に対する免疫応答をもたらさない

遺伝子改変細胞は移植後のヒト I D S に対する耐性を仲介できたかどうかを調べるために、本発明者らは、完全な骨髓破壊的条件付けの後に、どちらもヒト I D S を過剰発現する L V . I D S または L V . I D S . A p o E I I 移植のいずれかを受けたマウスの血漿のヒト I D S に対する I g G 抗体を分析した。L V . I D S および L V . I D S . A p o E I I 群における全体の I D S 特異的 I g G 力価は正常範囲にとどまり、酵素に対する免疫応答に寄与しなかった（図 5 J）。

#### 【 0 1 3 8 】

L V . I D S . A p o E I I 処置は複数の機構を通じて作用する

L V . I D S . A p o E I I 処置マウスの血漿における酵素活性の増加および V C N 当りの酵素活性の増加の観察（図 2 f、図 2 j）の後、本発明者らは酵素の循環時間が増加したのではないかという仮説を立てた。等価レベルの I D S および I D S . A p o E I I 酵素を M P S I I マウスに注射して、E L I S A によってタンパク質レベルをモニタした（図 9 A）。興味深いことに、酵素クリアランス速度は、分解または器官への取り込みのいずれによるものであっても、I D S および I D S . A p o E I I 群において類似であり、両方の群において 30 分以内に効果的に除去された。

#### 【 0 1 3 9 】

次に、A p o E I I 残基の付加によって酵素の立体構造が変化して、分解に対する付加的な保護を与えたかもしれないという仮説を立てて、合計 I D S タンパク質と比較した血漿における活性酵素のレベルを E L I S A によって比較および測定した。血漿において、I D S . A p o E I I は I D S タンパク質の単位当りの活性がより高いことを示した（図 9 B）。このことは、天然 I D S 酵素の活性部位は血漿中で迅速に分解するのに対し、A p o E I I 付加は保護的であってインビボにおける酵素活性を効果的に延長することを示唆し得る。

#### 【 0 1 4 0 】

B B B 内皮細胞株 b E N D . 3 を用いて、内皮細胞による酵素取り込みに何らかの差があるかどうかを定めた。これらの細胞は t r a n s w e l l に有効な B B B 層を産生し（図 9 C）、L D L R および L D L R 関連タンパク質 1（L R P 1 : L D L R - r e l a t e d p r o t e i n 1）受容体の両方を発現する（図 9 D、図 9 E）。各酵素が H S C G T 産生酵素のものと類似の M 6 P 状態を有することを確認するために、本発明者らは、C H M E 3 ヒトミクログリア細胞のトランスフェクションの後に培地に分泌された I D S および I D S . A p o E I I 酵素を用い、E L I S A によって標準化した。単層培養において、本発明者らは I D S 対 I D S . A p o E I I の b E N D . 3 細胞への取り込みを比較し、A p o E I I ペプチドの付加による細胞取り込みの 4 . 7 倍の増加を識別した（図 9 F）。B B B を擬態するための t r a n s w e l l における b E N D . 3 内皮細胞の極性化細胞層を横断する I D S または I D S . A p o E I I の取り込みおよび経細胞輸送を、次いで比較した。細胞を単層において成長させたときと同様に、取り込みの 2 . 6 倍の増加が明らかであり、それとともに t r a n s w e l l の基底外側への経細胞輸送の 1 . 5 倍の増加が明らかであった（図 9 G、図 9 H）。

#### 【 0 1 4 1 】

加えて、A p o E を用いた A p o E 依存性受容体の遮断、または M 6 P を用いた M 6 P 受容体の封鎖（図 9 I）は、I D S . A p o E I I が優先的かつ予想外に M 6 P 受容体を介して取り込まれることを明らかにしたが、A p o E ペプチドによる遮断も I D S . A p

10

20

30

40

50

o E I I の取り込みを約 30% 有意に阻害した。A p o E I I ペプチド配列は H S 部位もコードしており、この H S 部位は L D L R および L R P 1 を含む受容体への A p o E の受容体 / リガンド結合のための共受容体として必要とされる ( J i ら、1993 )。A p o E ペプチドによる結果と同様に、細胞のヘパリナーゼ前処理も I D S . A p o E I I 取り込みの約 30% の低減をもたらしており、A p o E / H S も取り込みおよび b E N D 3 細胞を横断する経細胞輸送に重要である可能性を示唆した。

#### 【 0 1 4 2 】

##### 考察

リンカーおよび A p o E I I ペプチドの付加は、インビトロにおける I D S 酵素の発現、産生、または分泌を変えなかったが、類似のベクターコピー数に対する L V . I D S および L V . I D S . A p o E I I ベクターの両方を用いて形質導入した H S C において超生理学的レベルの I D S 酵素を産生した。すべての移植動物においてブスルファンを用いた完全な骨髄破壊的条件付けを用いて、C D 4 5 . 1 + ドナー細胞 ( > 80% ) の完全な生着を得て、移植時の下流インビトロ分化アッセイにおける有意差はなかった ( データは示さず )。

#### 【 0 1 4 3 】

驚くべきことに、L V . I D S . A p o E I I 群における血漿の I D S 酵素活性レベルは、たとえ W B C においてより低い V C N であっても L V . I D S より約 3 倍高かった。このことは、L V . I D S . A p o E I I 群におけるコピー当りのより高い酵素活性につながり、A p o E I I 残基は自身の立体構造を変えることによって活性を安定化または改善することを示唆し、酵素不活性化に対する保護効果を提供するが血漿におけるクリアランスに対しては提供しないことを示す ( 図 8 )。I D S . A p o E I I は非改変 I D S よりも b E N D . 3 細胞への取り込みが高いことを検出しており、これには主に M 6 P R が介在すると考えられた。I D S . A p o E I I 融合酵素に用いた a p o E の受容体結合部分 ( 残基 1 4 2 ~ 1 4 7 ) は、内皮細胞表面に豊富にあり、かつ M P S I I にはさらにより豊富にある U A ( 2 S ) - G l c N S ( 6 S ) の 4 反復で構成される八糖 H S フラグメントと高親和性結合複合体を形成できる。H S は通常多くの受容体リガンド相互作用における共受容体の役割をし、A p o E I I を通じた H S プロテオグリカン ( H S P G : H S p r o t e o g l y c a n s ) への結合の増加は、L D L R、L D L R 関連タンパク質 1 ( L R P 1 )、M 6 P を通じた細胞取り込み、または a p o E - H S P G 複合体の直接の取り込みによる細胞取り込みの増加に介在し得る。

#### 【 0 1 4 4 】

L V . I D S 群と L V . I D S . A p o E I I 群とで類似の量の脳内酵素活性を検出したが、L V . I D S . A p o E I I のみにおいてニューロンおよびアストロサイトからの L A M P 2 のクリアランス改善を伴う完全な補正を検出した。これに対する説明の 1 つは、I D S . A p o E I I を用いた方が間質空間からの酵素取り込みが効率的なのかもしれない、それによって同じ全体レベルを維持しながら非改変 I D S よりもかなり効果的に常在脳細胞を補正するのではないかというものである ( 図 8 )。

#### 【 0 1 4 5 】

L V . I D S . A p o E I I 処置動物において、主要貯蔵上昇の完全な補正と、神経炎症において大きな役割を果たす硫酸化パターン形成の全体的正常化とを観察した。脳における主要 H S 貯蔵の部分的補正は、認知行動を補正するには不十分である。M P S I I における H S の蓄積は、神経炎症および神経変性の悪化を引き起こす第 1 のシグナルの 1 つを提供し得ると考えられる。硫酸化パターン形成は細胞機能および H S 結合恒常性にも重要な役割を果たす。なぜなら、6 - O - および 2 - O - 硫酸化 H S は線維芽細胞増殖因子およびストロマ細胞由来因子 1 ( C X C L 1 2 ) のシグナル伝達のために必須だからである。実際に、M P S I I における異常な過剰 H S は、C X C L 1 2 の隔離を介した制限条件下での H S C の移動を低減させることが示された ( 4 2 )。この研究の状況において、疾患動物の脳組織内に硫酸化二糖が増加することは、I D S . A p o E I I 酵素の細胞取り込みの改善を促進することによって、疾患細胞を酵素の標的とすることを増強し得る。

## 【 0 1 4 6 】

A p o E / H S に基づく機構およびM 6 P 受容体の両方を介して、b E N D . 3 細胞におけるI D S . A p o E I I のI D S よりも有意に増加した取り込みを観察した。複数の標的化機構を使用することによって、酵素欠損細胞に対するより効率的な標的化を身体全体にわたって、およびB B B を横断して仲介できた。ここで用いたA p o E の受容体結合部分は、内皮細胞表面に豊富にあり、かつM P S I I にはさらにより豊富にあるU A ( 2 S ) - G l c N S ( 6 S ) の4 反復で構成される八糖H S フラグメントと高親和性結合複合体を形成できる。この研究の状況において、疾患動物の脳組織内に硫酸化二糖が増加することは、A p o E I I ペプチドのH S 結合モチーフを介してI D S . A p o E I I 酵素の細胞取り込みの改善を促進することによって、疾患細胞を酵素の標的とすることを増強し得る。H S は通常多くの受容体リガンド相互作用における共受容体の役割をし、A p o E I I を通じたH S プロテオグリカンへの結合の増加は、L D L R、L R P 1、M 6 P を通じた細胞取り込み、またはA p o E - H S P G 複合体の直接の取り込みによる細胞取り込みの増加に介在し得る。血漿安定性の改善と、B B B 取り込みおよび経細胞輸送の増加とを一緒にすることで、脳酵素量の有意差の不在下でL V . I D S . A p o E I I によってみられる脳内のH S およびD S 貯蔵ならびにいくつかのその他の神経病理の正常化を説明できる。I G F I I 受容体に向けられたペプチドを介してM 6 P の代替的エピトープを標的とするG I L T タグに結合した酵素を用いて、M P S I I I B およびポンペ病における類似の酵素活性に対する取り込み、クリアランス、および細胞結合の増加の類似の効果がみられた。この研究は、天然I D S に対する顕著な変化なしにS G S H . A p o B による脳酵素活性の少しの増加を示した。

10

20

## 【 0 1 4 7 】

神経炎症はL S D において一般的に報告されており、これはさまざまな未分解分子の蓄積によって引き起こされると考えられ、これらの分子は協調的に神経炎症性の環境を活性化および永続化して、疾患自体を悪化させるおそれがある。M P S I I マウスは脳において強い炎症反応を誘発し、それはM I P - 1、I L - 1、R A N T E S、およびM C P - 1 のレベル上昇を伴う。M I P - 1、I L - 1、およびR A N T E S レベルはL V . I D S . A p o E I I 群において完全に正常化し、L V . I D S 処置マウスにおいては部分的な減少のみであった。興味深いことに、M P S I I およびすべてのブスルファン条件付けマウスにおいてはM C P - 1 レベルが上昇したままであった。本発明者らが前に示したとおり、ブスルファン条件付けは脳におけるM C P - 1 レベルの長期的増加をもたらし、これはC N S に対する細胞遊出の主要なメディエータであり、かつ長期的な遊出効果を発揮する。静脈内注射したブスルファンの約2 0 % がB B B を横断でき、さらにより強力な移動促進性M C P - 1 応答を駆動し、これが最終的にM P S I I マウスにおいてドナー由来白血球がB B B を横断してC N S に入る遊出を促進して、酵素を脳実質に輸送する付加的な手段を提供してもよい。

30

## 【 0 1 4 8 】

ミクログリアの活性化およびアストロサイト増加は、M P S 障害においてこの研究を含め一般的に報告されている。本発明者らはL V . I D S . A p o E I I マウスの皮質、尾状核被殻、海馬、および扁桃体におけるG F A P およびL A M P 2 染色の完全な抑止を観察し、L V . I D S 群の同じ範囲においては部分的な補正しか観察しなかった。さらに、L V . I D S . A p o E I I 処置マウスの皮質および線条体において活性化ミクログリアの完全な正常化を観察し、L V . I D S においてはわずか5 0 % の低減であった。L V . I D S . A p o E I I 処置は、C S F への直接のA A V 9 - I D S 注射を用いて報告されたアストログリオシスおよびミクログリア活性化の補正に匹敵する( 非特許文献1 5 ) 。M P S I I マウスの肝臓において末梢炎症を検出し、これはM C P - 1、M I P - 1、およびR A N T E S のレベルの明確な上昇を伴い、かつすべての移植によって抑止され、同種移植によって得られる末梢I D S 酵素レベルは末梢における炎症の低減を仲介し得ることを示した。

40

## 【 0 1 4 9 】

50



探索行動および空間的作業記憶の感受性かつ広く受容されるパラダイムとして、Y迷路はMPS IIマウスにおける身体障害の可能性を説明するものであり、これは異なる身体能力によって無効化され得るバーンズ迷路とは異なる。LV・IDS・ApoE II群において、認知障害の完全な行動補正を観察し、それとともに協調およびバランスの正常化を観察した。本発明者らは、認知の改善が以下の要素の組み合わせから生じるのではないかという仮説を立てている。すなわち、HSの主要貯蔵の低減とともに、慢性神経炎症、アストログリオシス、およびミクログリア活性化の完全な抑止であり、これらはすべてLV・IDS・ApoE II処置動物のみにおいて観察した。協調およびバランスの救済は、中枢または末梢の救済のいずれか、またはそれらの組み合わせに起因し得る。最も重要なことに、このことは、MPS IIマウスにおける神経認知の態様の完全な補正を提供するためにIDS酵素に脳を標的とさせるためには、ApoE縦列ペプチドの付加が絶対に必要であることをさらに強調している。

10

#### 【0150】

本発明者らなどは、MPS II患者にみられる骨形成不全に関連する、MPS IIマウスモデルにおけるたとえば頭蓋顔面骨構造および大腿骨の拡大)などの進行性の骨格異常を報告していた。わずかな酵素が軟骨または骨病変を標的とするため、イデュルスルファーズを用いたERTは関節の疼痛、硬直、または運動範囲に限られた利益しか示さなかったが、より早期の処置は利益を提供できた。本発明者らの研究においては、WT-HSCTを含むすべての移植動物において頬骨弓、上腕骨、および大腿骨の幅が有意に低減しており、これは骨格表現型がまだ軽度である早い時点で処置されれば、いくらかのレベルの酵素が骨組織に侵入し得ることを示唆した。これは肝臓に向けられたAAV2/8TBG-IDS遺伝子治療と部分的に比較可能であり、この遺伝子治療においても頭蓋顔面奇形が補正された。重要なことに、早い時点からの骨格および関節への酵素の持続的利用能が臨床的改善のために必要であると考えられる。

20

#### 【0151】

MPS IIにおける心臓合併症の範囲は進行性心臓弁病理、左室肥大、壁厚の増加から全身性高血圧症にわたり、まだ処置が困難な複合心臓表現型をもたらす(49)。多量の因子が転写因子、共調節因子、およびマイクロRNAの活性化を引き起こすことができ、それらが心臓遺伝子発現を変更することとなる。加えてHS GAGは、MPS IIマウスにおいてPtch1、FoxM1、およびBmp4とともにダウンレギュレートされる、心臓個体発生および心臓再生に関与するソニックヘッジホッグ(Shh: Sonic Hedgehog)を部分的に調節する。MPS IIIBマウスにおける心不全に以前関係付けられた2つの遺伝子NppbおよびMyh7の発現は、それぞれWTレベルの最大18倍および9倍に上昇し、MPS IIマウスにおける心臓遺伝子および心臓経路の顕著な調節解除を示唆し、それはすべての移植によって救済される。よって、末梢におけるIDS酵素の持続的送達、部分的にでも心臓組織に利益を与えて正常な心臓遺伝子発現を回復できる。全体として、内在性または超生理学的レベルのIDS酵素を発現するHSCを移植することによって、心不全に関与する心臓遺伝子の発現をWTレベルまで調節できること、およびこのことがMPS II患者における心臓呼吸系の表現型の処置における重要なステップであり得ることが初めて示された。

30

40

#### 【0152】

たとえばERTなどの免疫学的に外来性のタンパク質および酵素は、治療有効性を減少させ得る阻害抗体の放出を引き起こし得るが、HSC後の分子および細胞のキメラ化はドナー特異的抗原に対する耐性を誘導できる。LV・IDSおよびLV・IDS・ApoE II処置マウスの血漿においてヒト組み換えIDSに対するIgG抗体は検出されず、中和抗体に起因し得る有害な症状は識別されなかった。全体として、このことは造血幹細胞遺伝子治療(HSCGT: hematopoietic stem cell gene therapy)が耐性を誘導できること、および産生されるどちらの酵素も免疫系によってよく許容されることを強く示す。最後に、ApoE IIペプチド残基の付加は、非改変IDSと比べて免疫感受性の増加を生じない。

50

## 【 0 1 5 3 】

顕著なことに、ヒトIDSへのapoE縦列反復の付加は、MPS IIマウスモデルにおける神経炎症、神経変性、および認知行動の完全な補正を可能にし、これはおそらく取り込みの増加および酵素安定化機構の組み合わせによるものである。過去の遺伝子治療アプローチは、LSDの疾患モデルにおける脳病理を補正するための、たとえばapoBおよびapoEなどの他のapo複合体の受容体結合ドメインとのBBB融合酵素の治療可能性、およびMPS障害に対するそれらの有望な臨床的使用を強調していた。この研究は、MPS IIマウスにおける神経、骨格、炎症、および行動の表現型を完全に補正するためのHSCGTとapoE II融合酵素との併用を強調する最初の研究である。これらの実験は、MPS II患者の処置に対するapoE II改変酵素を用いたHSCGTの適合性を示している。

10

## 【 0 1 5 4 】

前述の実施形態は、請求項によって提供される保護の範囲を限定することは意図されておらず、本発明をいかに実現し得るかという例を説明することが意図されている。

## 【 0 1 5 5 】

## 配列リスト

## 配列番号1 (c o I D S DNA配列)

atgcctccac ctagaactgg aagaggcctg ctgtggctgg gcctggtgct gtctagtgtg	60	
tgtgtggccc tgggcagcga gacacaggcc aacagcaciaa ccgacgccct gaacgtgctg	120	
ctgatcatcg tggacgacct gaggcctagc ctgggctgct acggcgataa gctcgtgcgg	180	20
agccccaaca tcgatcagct ggcctctcac agcctgctgt tccagaacgc attcgcacag	240	
caggcagtgt gcgccccag cagagtgtct ttcctgaccg gcagaaggcc cgacaccacc	300	
cggctgtacg acttcaacag ctactggcgg gtgcacgccg gcaacttcag caccatcccc	360	
cagtacttca aagaaaacgg ctacgtgacc atgagcgtgg gcaagggtgt ccaccccgcc	420	
atcagctcca accacaccga cgacagcccc tacagctggt ccttccacc ctaccacccc	480	
agcagcgaga agtacgagaa caccaagacc tgcagaggcc ccgacggcga gctgcatgcc	540	
aatctgctgt gcccgtgga cgtgctggat gtgcctgagg gaaccctgcc cgacaagcag	600	
tctaccgagc aggccattca gctgctggaa aagatgaaga ccagcgccag ccccttcttc	660	
ctggccgtgg gctatcacia gcccacatc ctttcagat acccaaaga gttccagaag	720	
ctgtaccccc tggaaaacat caccctggcc cccgatcctg aggtgccaga tggactgcct	780	30
cccgtggcct acaaccctg gatggacatc cggcagcgcg aggatgtgca ggccctgaat	840	
atcagcgtgc cctacggccc catccccgtg gatttcagc ggaagatccg gcagagctac	900	
ttcgccagcg tgtcctacct ggacaccaa gtgggcagac tgcctgagcgc cctggacgat	960	
ctgcagctgg ccaactccac catcattgcc ttcaccagcg accacggctg ggccctggga	1020	
gaacatggcg agtggggcaa gtacagcaac ttcgacgtgg ccacccacgt gcccctgac	1080	
ttctacgtgc caggcagaac cgccagcctg cctgaggctg gcgagaagct gttcccttac	1140	
ctggacccct tcgacagcgc ctcccagctg atggaacctg gcagacagag catggacctg	1200	
gtggaactgg tgtccctgtt cccacactg gccggactgg ctggactgca ggtgccccct	1260	
agatgtcccg tgcctagctt tcacgtggaa ctgtgcagag agggcaagaa cctgctgaag	1320	
cacttccggt tccgggacct ggaagaagat ccctacctgc ccggcaaccc cagagagctg	1380	40
atgcctaca gccagtacc cagaccagc gacatccctc agtggaacag cgacaagccc	1440	
agcctgaagg acatcaagat catgggctac agcatccgga ccacgacta ccggtacacc	1500	
gtgtgggtgg gattcaaccc cgacgagttc ctggccaatt tctccgacat ccacgccggg	1560	
gagctgtact tcgtggacag cgatccccctg caggaccaca acatgtacaa cgacagccag	1620	
ggcggcgacc tgttccagct gctgatgccc	1650	

## 配列番号2 (野生型IDS DNA配列)

atgccgccac cccggaccgg ccgaggcctt ctctggctgg gtctggttct gagctccgtc	60	
tgcgtcgcgc tcggatccga aacgcaggcc aactcgacca cagatgctct gaacgttctt	120	
ctcatcatcg tggatgacct gcgccccctc ctgggctgtt atggggataa gctggtgagg	180	
tcccaaata ttgaccaact ggcatccac agcctcctt tccagaatgc ctttgcgcag	240	50

caagcagtgt gcgccccgag ccgcgtttct ttctcactg gcaggagacc tgacaccacc 300  
 cgctgtacg acttcaactc ctactggagg gtgcacgctg gaaacttctc caccatcccc 360  
 cagtacttca aggagaatgg ctatgtgacc atgtcgggtg gaaaagtctt tcaccctggg 420  
 atatcttcta accataccga tgattctccg tatagctggt cttttccacc ttatcatcct 480  
 tcctctgaga agtatgaaaa cactaagaca tgtcgagggc cagatggaga actccatgcc 540  
 aacctgcttt gccctgtgga tgtgctggat gttcccagg gcaccttgcc tgacaaacag 600  
 agcactgagc aagccataca gtgttgga aagatgaaaa cgtcagccag tcctttcttc 660  
 ctggccgttg ggtatcataa gccacacatc cccttcagat accccaagga atttcagaag 720  
 ttgtatccct tggagaacat caccctggcc cccgatcccg aggtccctga tggcctaccc 780  
 cctgtggcct acaaccctg gatggacatc aggcaacggg aagacgtcca agccttaaac 840 10  
 atcagtgtgc cgtatggtcc aattcctgtg gactttcagc ggaaaatccg ccagagctac 900  
 tttgcctctg tgtcatattt ggatacacag gtcggccgcc tcttgagtgc tttggacgat 960  
 cttcagctgg ccaacagcac catcattgca ttacctcg atcatgggtg ggctctaggt 1020  
 gaacatggag aatggggcaa atacagcaat ttgatgttg ctacctatgt tcccctgata 1080  
 ttctatgttc ctggaaggac ggcttcaact cgggaggcag gcgagaagct tttcccttac 1140  
 ctcgacctt ttgattccgc ctacagttg atggagccag gcaggcaatc catggacctt 1200  
 gtggaacttg tgtctctttt tcccagctg gctggacttg caggactgca ggttcacct 1260  
 cgctgccccg ttcttctatt tcacgttgag ctgtgcagag aaggcaagaa cttctgaag 1320  
 cattttgat tccgtgactt ggaagaggat ccgtacctcc ctggaatcc ccgtgaactg 1380  
 attgcctata gccagtatcc ccggccttca gacatccctc agtggaaatc tgacaagccg 1440 20  
 agtttaaaag atataaagat catgggctat tccatacgca ccatagacta taggtatact 1500  
 gtgtgggttg gcttcaatcc tgatgaattt ctagctaact tttctgacat ccatgcaggg 1560  
 gaactgtatt ttgtggattc tgaccattg caggatcaca atatgtataa tgattcccaa 1620  
 ggtggagatc tttccagtt gttgatgcct 1650  
 配列番号 3 ( A p o E 縦列反復 ( A p o E I I ) D N A 配列 )  
 ctgagaaagc tgcggaagcg gctgctgctg aggaagctga gaaaaagact gctg 54  
 配列番号 4 ( リンカー D N A 配列 )  
 ctgggagggg gaggatctgg cggaggcggg agtggcggcg gaggatcagg gggcggaggc 60  
 tct 63  
 配列番号 5 ( c o I D S アミノ酸配列 ) 30  
 MPPPRGTGRGL LWLGLVLSSV CVALGSETQA NSTTDALNVL LIIVDDL RPS LGCYGD  
 KLVR 60  
 SPNIDQLASH SLLFQNAFAQ QAVCAPSRVS FLTGRRPDTT RLYDFNSYWR VHAGN  
 FSTIP 120  
 QYFKENGYVT MSVGKVFHPG ISSNHTDDSP YSWSFPPYHP SSEKYENTKT CRGPD  
 GELHA 180  
 NLLCPVDVLD VPEGTLDPKQ STEQAIQ LLE KMKTSASPFF LAVGYHKPHI PFRYPK  
 EFQK 240  
 LYPLENITLA PDPEVPDGLP PVAYNPWMDI RQREDVQALN ISVPYGPPIV DFQRKI  
 RQSY 300 40  
 FASVSYLDTQ VGRLLSALDD LQLANSTIIA FTSDHGWALG EHGEWAKYSN FDVAT  
 HVPLI 360  
 FYVPGRTASL PEAGEKLPY LDPFDSASQL MEPGRQSM DL VELVSLFPTL AGLAGL  
 QVPP 420  
 RCPVPSFHVE LCREGKNLLK HFRFRDLEED PYLPGNPREL IAYSQYPRPS DIPQWN  
 SDKP 480  
 SLKDIKIMGY SIRTIDYRYT VWVGFNPDEF LANFSDIHAG ELYFVDS DPL QDHNMY  
 NDSQ 540  
 GGDLFQLLMP 550  
 配列番号 6 ( 野生型 I D S アミノ酸配列 ) 50

MPPPRTRGRGL LWLGLVLSSV CVALGSETQA NSTTDALNVL LIIVDDLRLPS LGCYGD  
 KLVR 60  
 SPNIDQLASH SLLFQNAFAQ QAVCAPSRVS FLTGRRPDTT RLYDFNSYWR VHAGN  
 FSTIP 120  
 QYFKENGYVT MSVGKVFHPG ISSNHTDDSP YSWSFPPYHP SSEKYENTKT CRGPD  
 GELHA 180  
 NLLCPVDVLD VPEGTLDPKQ STEQAIQLE KMKTSASPF LAVGYHKPHI PFRYPK  
 EFQK 240  
 LYPLENITLA PDPEVPDGLP PVAYNPWMDI RQREDVQALN ISVPYGPPIV DFQRKI  
 RQSY 300  
 FASVSYLDTQ VGRLLSALDD LQLANSTIIA FTSDHGWALG EHGEWAKYSN FDVAT  
 HVPLI 360  
 FYVPGRTASL PEAGEKLPY LDPFDSASQL MEPGRQSM DL VELVSLFPTL AGLAGL  
 QVPP 420  
 RCPVPSFHVE LCREGKNLLK HFRFRDLEED PYLPGNPREL IAYSQYPRPS DIPQWN  
 SDKP 480  
 SLKDIKIMGY SIRTIDYRYT VWVGFNPDEF LANFSDIHAG ELYFVDS DPL QDHNMY  
 NDSQ 540  
 GGDLFQLLMP 550  
 配列番号 7 ( A p o E 縦列反復 ( A p o E I I ) アミノ酸配列 )  
 LRKLRKRLLL RKLRKRL 18  
 配列番号 8 ( リンカーアミノ酸配列 )  
 LGGGGSGGGG SGGGGSGGGG S 21

# 【 0 1 5 6 】

## 参考文献

1. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: McGraw-Hill, editor. Lysosomal Disorders 2001. p. 3421-52.
2. Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Wh ybra C, et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. Journal of inherited metabolic disease. 2005;28(6):1011-7. 30
3. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. Human genetics. 1999;105(1-2):151-6. Epub 1999/09/10.
4. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. European journal of pediatrics. 2008;167(3):267-77. Epub 2007/11/27.
5. Cardone M, Polito VA, Pepe S, Mann L, D ' Azzo A, Auricchio A, et al. Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. Human molecular genetics. 2006;15(7):1225-36. Epub 2006/03/01. 40
6. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. Jama. 1999;281(3):249-54. Epub 1999/01/26.
7. Holt JB, Poe MD, Escolar ML. Natural Progression of Neurological Disease in Mucopolysaccharidosis Type II. Pediatrics. 2011;127(5):E1258-E65.
8. Eng C, Muenzer J, Wraith E, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, et al. Clinical benefit of enzyme replacement therapy (ERT) in mucopolysaccharidosis II (MPS II, Hunter syndrome). Molecular genetics and metabolism. 2007;92(4):S18-S.
9. Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in 50

mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genetics in Medicine*. 2006;8(8):465-73.

10. Muenzer J, Beck M, Eng CM, Giugliani R, Harmatz P, Martin R, et al. Long-term, open-labeled extension study of idursulfase in the treatment of Hunter syndrome. *Genetics in Medicine*. 2011;13(2):95-101.

11. Scarpa M, Almassy Z, Beck M, Bodamer O, Bruce IA, De Meirleir L, et al. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:72. Epub 2011/11/09.

12. Brooks DA, Kakavanos R, Hopwood JJ. Significance of immune response to enzyme-replacement therapy for patients with a lysosomal storage disorder. *Trends in molecular medicine*. 2003;9(10):450-3. Epub 2003/10/15.

13. Wakabayashi T, Shimada Y, Akiyama K, Higuchi T, Fukuda T, Kobayashi H, et al. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Corrects Neuropathic Phenotype in Murine Model of Mucopolysaccharidosis Type II. *Hum Gene Ther*. 2015. Epub 2015/03/13.

14. Hinderer C, Katz N, Louboutin JP, Bell P, Yu H, Nayal M, et al. Delivery of an adeno-associated virus vector into CSF attenuates central nervous system disease in mucopolysaccharidosis type II mice. *Hum Gene Ther*. 2016. Epub 2016/08/12.

15. Motas S, Haurigot V, Garcia M, Marco S, Ribera A, Roca C, et al. CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *JCI Insight*. 2016;1(9).

16. Aldenhoven M, Jones SA, Bonney D, Borrill RE, Coussons M, Mercer J, et al. Hematopoietic cell transplantation for mucopolysaccharidosis patients is safe and effective: results after implementation of international guidelines. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(6):1106-9. Epub 2015/02/25.

17. Aldenhoven M, Wynn RF, Orchard PJ, O' Meara A, Veys P, Fischer A, et al. Long-term outcome of Hurler syndrome patients after hematopoietic cell transplantation: an international multicenter study. *Blood*. 2015;125(13):2164-72. Epub 2015/01/28.

18. Boelens JJ, Aldenhoven M, Purtill D, Ruggeri A, Defor T, Wynn R, et al. Outcomes of transplantation using various hematopoietic cell sources in children with Hurler syndrome after myeloablative conditioning. *Blood*. 2013;121(19):3981-7. Epub 2013/03/16.

19. Guffon N, Bertrand Y, Forest I, Fouilhoux A, Froissart R. Bone marrow transplantation in children with Hunter syndrome: outcome after 7 to 17 years. *The Journal of pediatrics*. 2009;154(5):733-7. Epub 2009/01/27.

20. Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 1999;22:638-48.

21. Visigalli I, Delai S, Politi LS, Di Domenico C, Cerri F, Mrak E, et al. Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood*. 2010;116(24):5130-9. Epub 2010/09/18.

22. Biffi A, Visigalli I. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders: Expected Benefits and Limitations. *Stem Cells Biol Reg*. 2013;127-38.

23. Biffi A, De Palma M, Quattrini A, Del Carro U, Amadio S, Visigalli I, et al

10

20

30

40

50

l. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(8):1118-29. Epub 2004/04/16.

24. Langford-Smith A, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Holley RJ, Sergijenko A, Howe SJ, et al. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20(8):1610-21. Epub 2012/05/02.

25. Sergijenko A, Langford-Smith A, Liao AY, Pickford CE, McDermott J, Nowinski G, et al. Myeloid/Microglial driven autologous hematopoietic stem cell gene therapy corrects a neuronopathic lysosomal disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(10):1938-49. Epub 2013/06/12.

26. Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Molecular biotechnology*. 2005;30(1):57-70. Epub 2005/04/05.

27. Pardridge WM. Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier. *Archives of neurology*. 2002;59(1):35-40. Epub 2002/01/16.

28. Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(5):1084-93. Epub 1998/04/16.

29. Sorrentino NC, D'Orsi L, Sambri I, Nusco E, Monaco C, Spampanato C, et al. A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidoses type IIIA. *Embo Mol Med*. 2013;5(5):675-90. Epub 2013/04/10.

30. Spencer B, Verma I, Desplats P, Morvinski D, Rockenstein E, Adame A, et al. A neuroprotective brain-penetrating endopeptidase fusion protein ameliorates Alzheimer disease pathology and restores neurogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(25):17917-31. Epub 2014/05/16.

31. Spencer BJ, Verma IM. Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7594-9. Epub 2007/04/28.

32. Bockenhoff A, Cramer S, Wolte P, Knieling S, Wohlenberg C, Gieselmann V, et al. Comparison of five peptide vectors for improved brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulfatase A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(9):3122-9. Epub 2014/02/28.

33. Wang D, El-Amouri SS, Dai M, Kuan CY, Hui DY, Brady RO, et al. Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of receptor-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(8):2999-3004. Epub 2013/02/06.

34. Bigger BW, Siapati EK, Mistry A, Waddington SN, Nivsarkar MS, Jacobs L, et al. Permanent partial phenotypic correction and tolerance in a mouse model of hemophilia B by stem cell gene delivery of human factor IX. *Gene therapy*. 2006;13(2):117-26.

35. Siapati EK, Bigger BW, Miskin J, Chipchase D, Parsley KL, Mitrophanous K, et al. Comparison of HIV- and EIAV-based vectors on their efficiency in transducing murine and human hematopoietic repopulating cells. *Molecular Therapy*. 2005;12(3):537-46.

36. Kuroda H, Kutner RH, Bazan NG, Reiser J. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection

10

20

30

40

50

n. J Virol Methods. 2009;157(2):113-21.

37. Lu JZ, Hui EK, Boado RJ, Pardridge WM. Genetic engineering of a bifunctional IgG fusion protein with iduronate-2-sulfatase. Bioconjugate chemistry. 2010;21(1):151-6. Epub 2009/12/17.

38. Holley RJ, Deligny A, Wei W, Watson HA, Ninonuevo MR, Dagalv A, et al. Mucopolysaccharidosis Type I, Unique Structure of Accumulated Heparan Sulfate and Increased N-Sulfotransferase Activity in Mice Lacking alpha-L-iduronidase. Journal of Biological Chemistry. 2011;286(43):37515-24.

39. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time R T-PCR. Nature protocols. 2006;1(3):1559-82.

10

40. Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, Badrinath S, Liao A, Langford-Smith A, et al. Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. PloS one. 2012;7(4):e35787. Epub 2012/05/05.

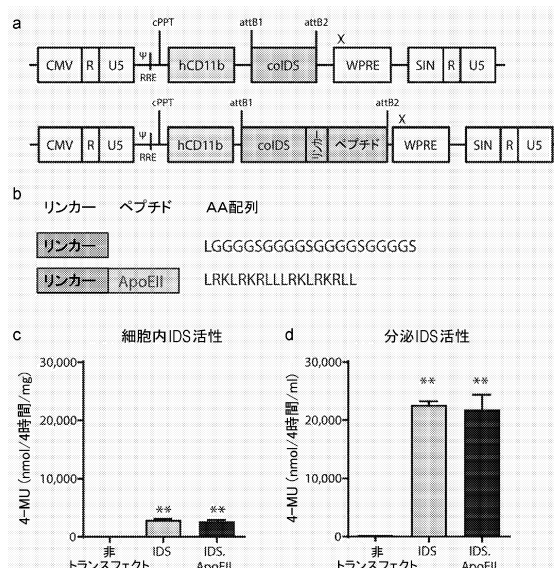
41. Jiang L, O ' Leary C, Kim HA, Parish CL, Massalas J, Waddington JL, et al. Motor and behavioral phenotype in conditional mutants with targeted ablation of cortical D1 dopamine receptor-expressing cells. Neurobiology of disease. 2015;76:137-58. Epub 2015/02/17.

42. O ' Tuathaigh CMP, Babovic D, O ' Sullivan GJ, Clifford JJ, Tighe O, Croke DT, et al. Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with ' knockout ' of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. Neuroscience. 2007;147(1):18-27.

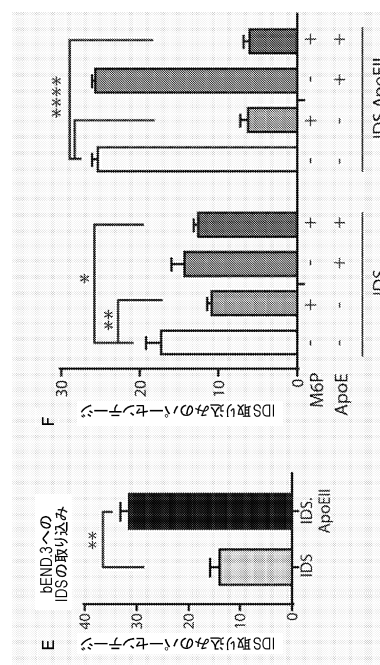
20

# 【図面】

## 【図 1 - 1】



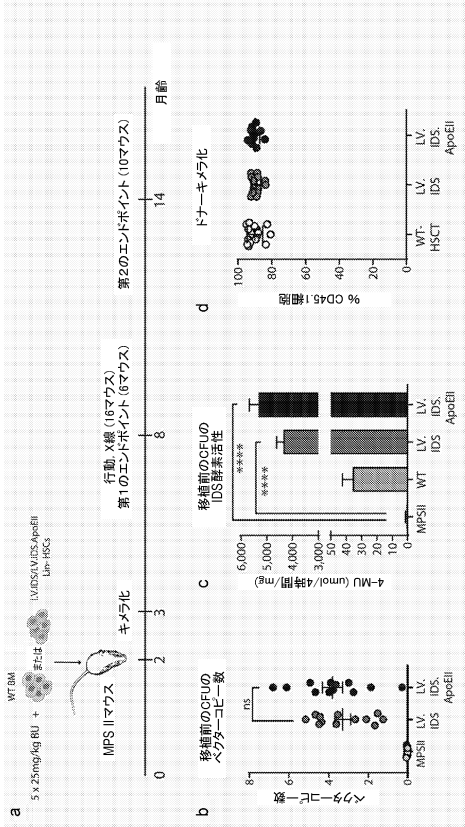
## 【図 1 - 2】



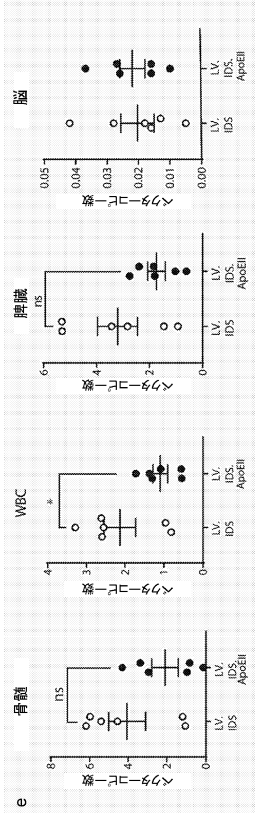
30

40

【図 2 - 1】



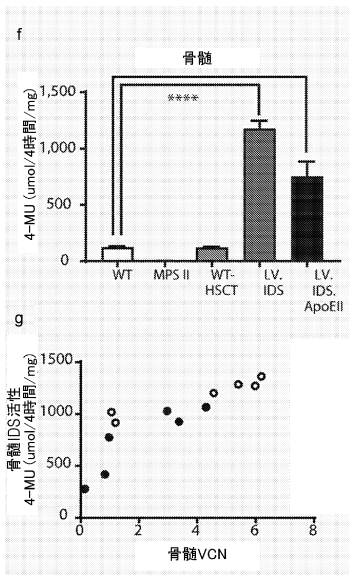
【図 2 - 2】



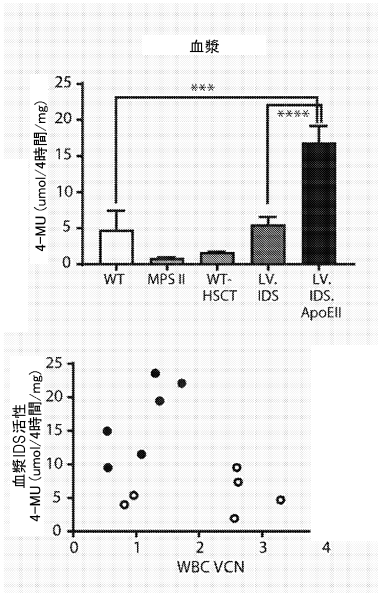
10

20

【図 2 - 3】



【図 2 - 4】



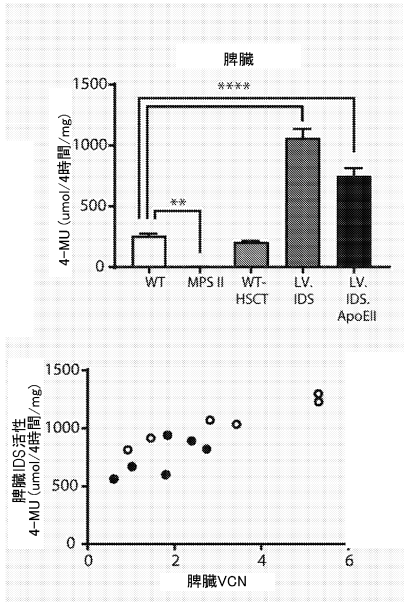
30

40

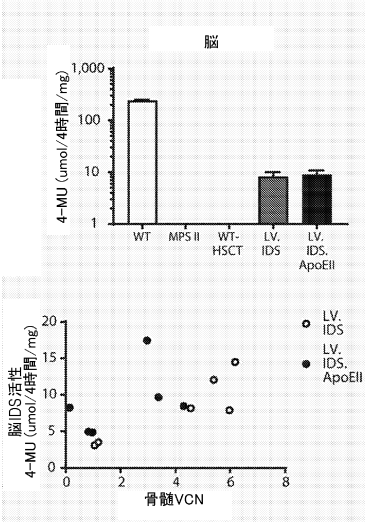
50



【図 2 - 5】

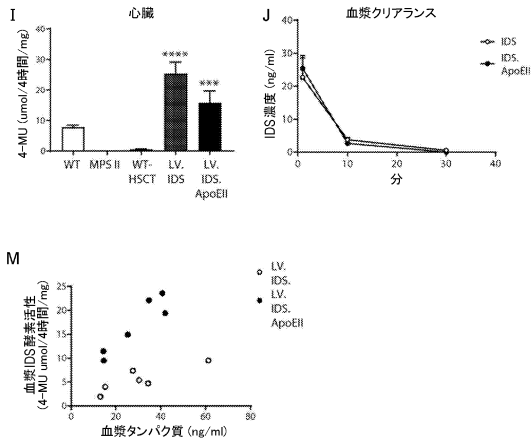


【図 2 - 6】

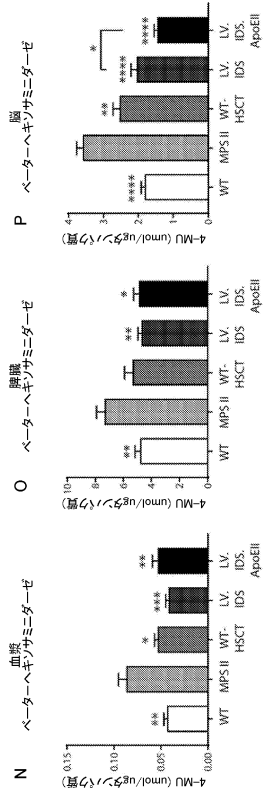


10

【図 2 - 7】



【図 2 - 8】



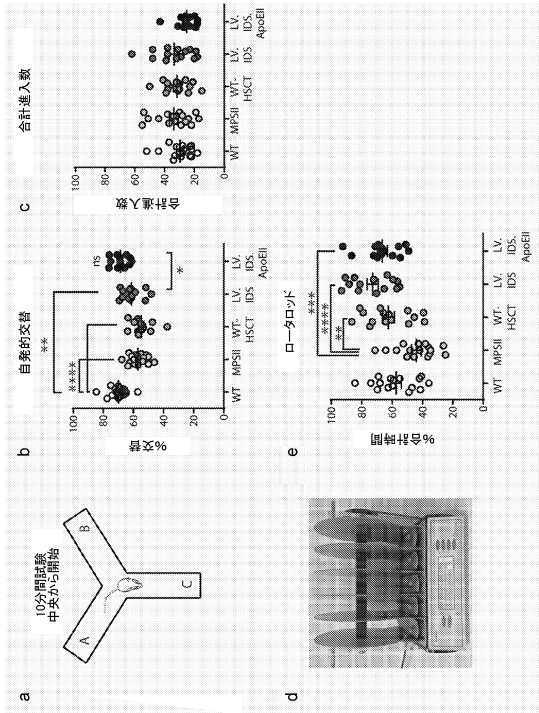
20

30

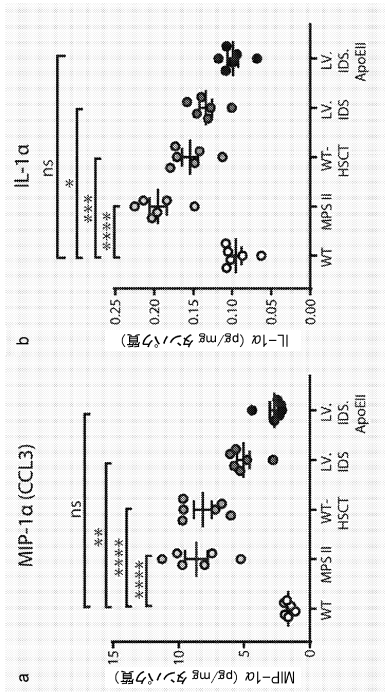
40

50

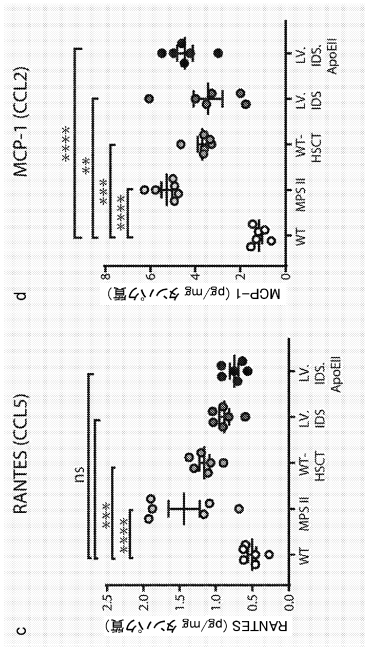
【図 3】



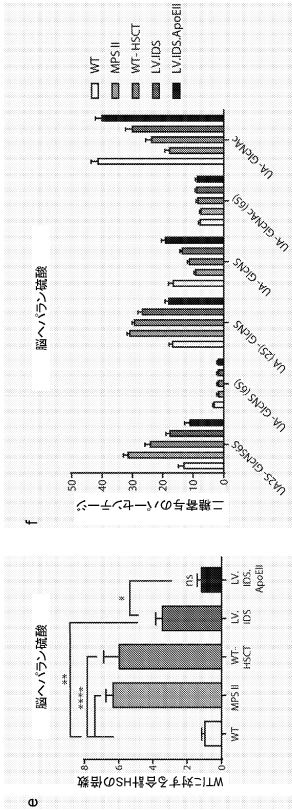
【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



【図 4 - 3】



10

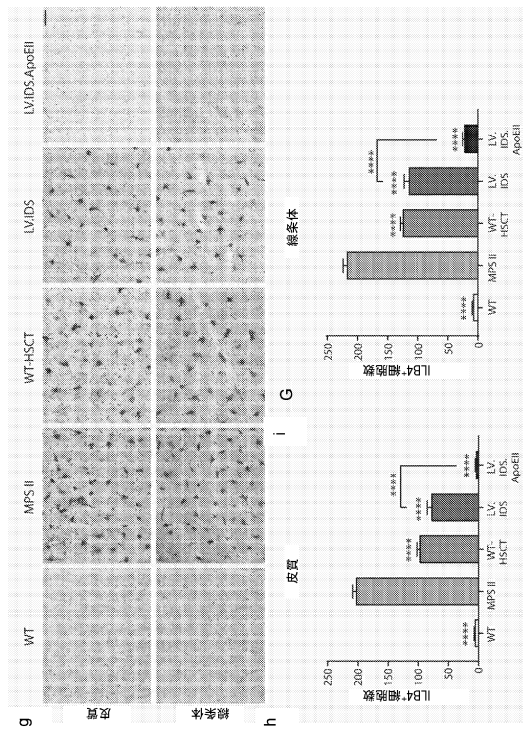
20

30

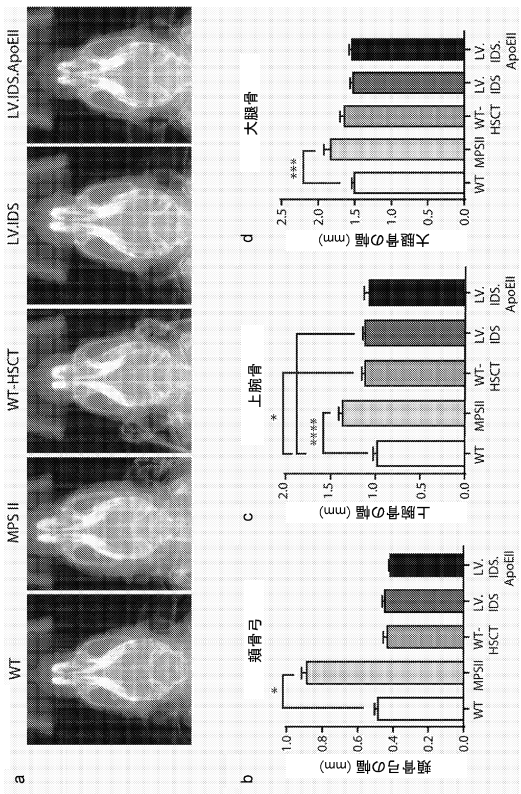
40

50

【図 4 - 4】



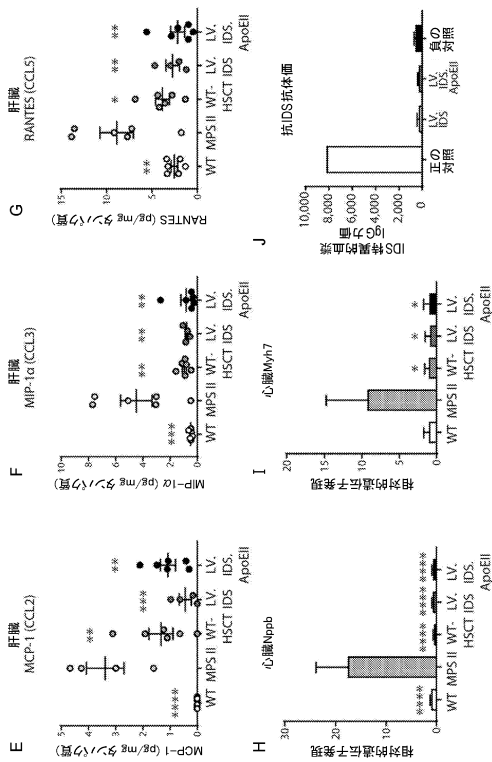
【図 5 - 1】



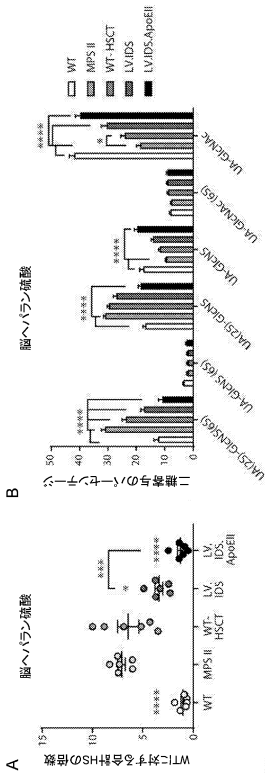
10

20

【図 5 - 2】



【図 6 - 1】

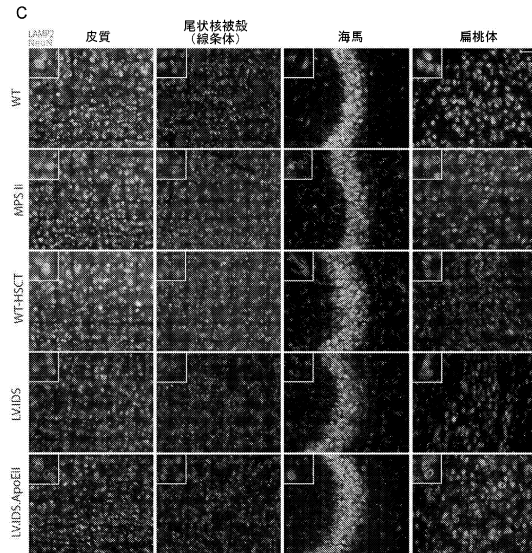


30

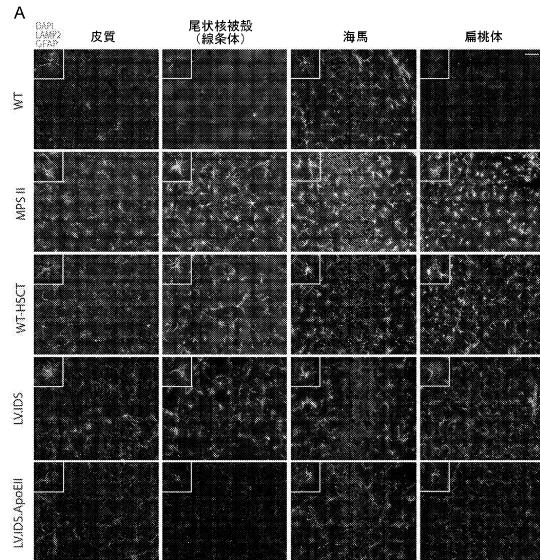
40

50

【 図 6 - 2 】

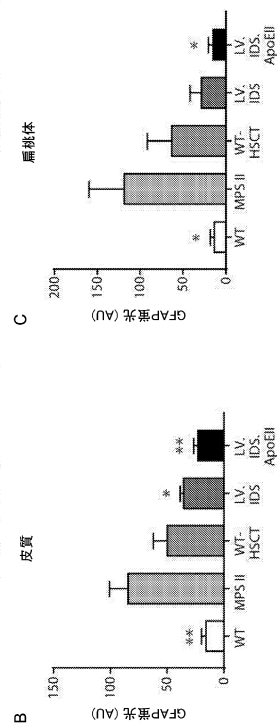


【圖 7 - 1】

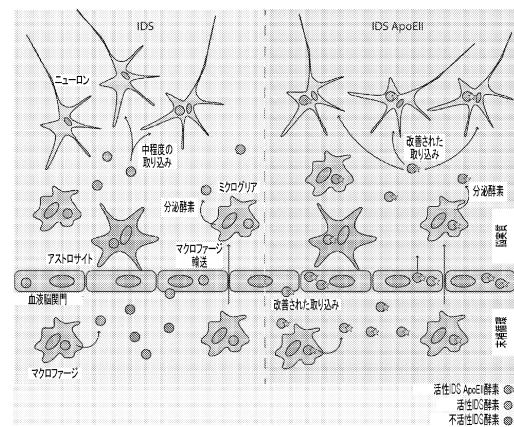


10

【圖 7 - 2】



【 図 8 】



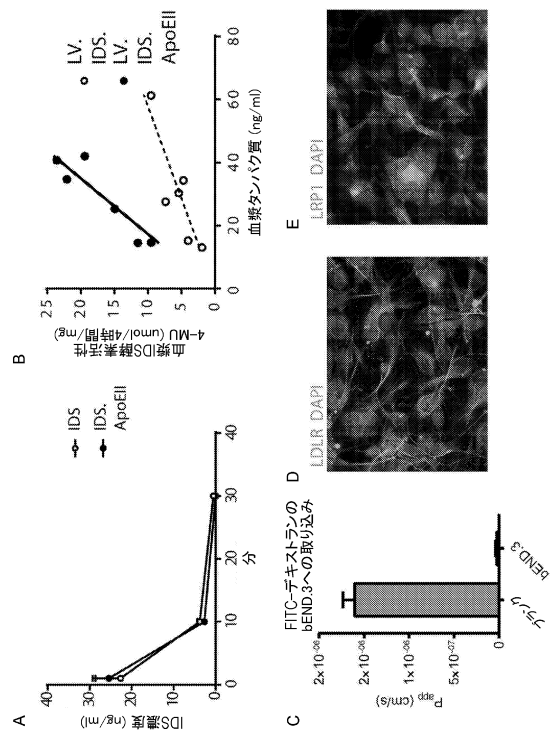
20

30

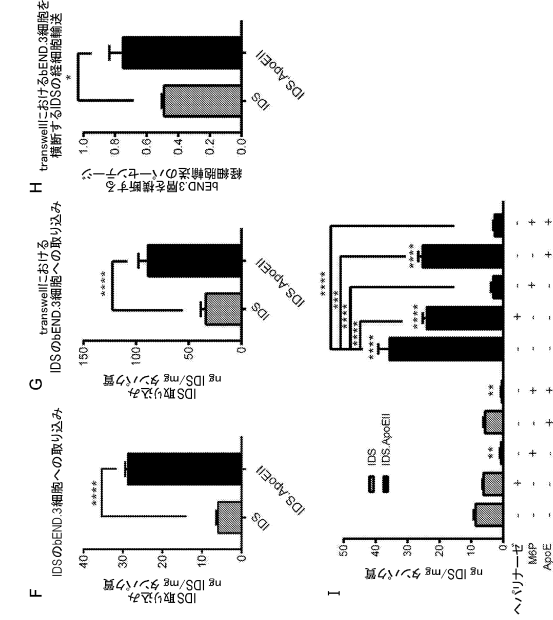
40

50

【図 9 - 1】



【図 9 - 2】



【配列表】

0007237364000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	5/0775 (2010.01)	C 1 2 N	5/0775	
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z
C 0 7 K	14/775 (2006.01)	C 0 7 K	14/775	

チェスター、オックスフォード・ロード ザ・ユニバーシティ・オブ・マンチェスター

## (72)発明者 グレイツ エレーヌ

オランダ国 3 0 0 0 シーエー ロッテルダム ピー・オー・ボックス 2 0 4 0 ユニバーシティ  
メディカル センター ロッテルダム エラスムス エムシー

審査官 林 康子

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 6 / 0 7 7 3 5 6 ( W O , A 2 )

特表 2 0 0 7 - 5 1 3 1 8 8 ( J P , A )

The J of Neuroscience, 2014, Vol.34, No.9, pp.3122-3129

MOLECULAR THERAPY, 2014年12月, VOL:22, NR:12, PAGE(S):2028 - 2037, [http://dx.](http://dx.doi.org/10.1038/mt.2014.152)[doi.org/10.1038/mt.2014.152](http://dx.doi.org/10.1038/mt.2014.152)

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

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

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

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

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