

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-523776

(P2013-523776A)

(43) 公表日 平成25年6月17日 (2013.6.17)

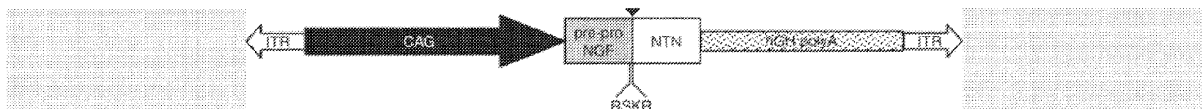
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 1
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	4 C 0 8 7
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-502910 (P2013-502910)	(71) 出願人	510215499
(86) (22) 出願日	平成23年4月1日 (2011.4.1)		セレジーン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成24年11月8日 (2012.11.8)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/031027		ディエゴ ジュディカル ドライブ 93
(87) 国際公開番号	W02011/123842		81 スイート 130
(87) 国際公開日	平成23年10月6日 (2011.10.6)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/320,654		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成22年4月2日 (2010.4.2)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 パーキンソン病および脳のドーパミン作動性ニューロンのその他の障害を処置する方法

(57) 【要約】

パーキンソン病などの神経変性状態の処置のために特に有用な、哺乳動物の脳における、欠陥のある、疾患のある、および損傷を受けたニューロンの治療に使用するための具体的な臨床プロトコルを開示する。本プロトコルは、黒質へ、好ましくは線条体へも、タンパク質の送達を介して一定の濃度の神経成長因子を直接送達するか、神経成長因子を機能的にコードする発現ベクターを直接送達するか、またはそのような発現ベクターを含有しているドナー細胞を直接移植することにより、実施される。本方法は標的ニューロンの成長を刺激し、かつ処置される神経変性疾患に関連する機能障害の回復を刺激する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト対象の脳内の、欠陥のある、疾患のある、または損傷を受けたドーパミン作動性の標的ニューロンへの治療用神経成長因子の送達方法であって、該欠陥、疾患、または損傷を、発現される神経成長因子に応答して寛解させるために、神経成長因子をコードする発現ベクターを黒質および線条体へ直接送達する工程を含む、方法。

【請求項 2】

線条体への直接送達が被殻の少なくとも一つの領域になされる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

線条体へ送達される、神経成長因子をコードする発現ベクターの全単位投与量が、黒質へ送達される、神経成長因子をコードする発現ベクターの単位投与量より多い、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

被殻へ送達される単位投与量が、黒質へ送達される単位投与量の10倍以下である、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

ドーパミン作動性ニューロンにおける修復または活性の刺激により疾患が寛解する、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

パーキンソン病に関連した運動機能障害の回復により疾患が寛解する、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

神経成長因子が、GDNF、ニューロツリン、パーセフィン、およびアルテミンからなる分子の群より選択されるGDNFファミリーに属するものである、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

神経成長因子がニューロツリンである、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

AAVベクターが2型AAVベクターである、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

送達がポンプを用いて実施される、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

対象において黒質への逆行性輸送が損なわれている、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

被殻へ送達される単位投与量が、黒質へ送達される単位投与量の4倍である、請求項4記載の方法。

【請求項 14】

対象が進行期パーキンソン病を有する、請求項6記載の方法。

【請求項 15】

対象が早期パーキンソン病を有する、請求項6記載の方法。

【請求項 16】

寛解が、処置後1ヶ月目以降に観察可能である、請求項6記載の方法。

【請求項 17】

寛解が、処置後12ヶ月目以降に観察可能である、請求項6記載の方法。

【請求項 18】

寛解が、処置後18ヶ月目以降に観察可能である、請求項6記載の方法。

【請求項 19】

寛解が、処置後24～48ヶ月目以降に観察可能である、請求項6記載の方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

神経成長因子が黒質の細胞体において発現される、請求項1記載の方法。

【請求項 2 1】

TH上方制御が線条体において起こる、請求項1記載の方法。

【請求項 2 2】

TH上方制御が黒質において起こる、請求項1記載の方法。

【請求項 2 3】

線条体における送達、脳、の各側につき少なくとも一つの部位になされる、請求項1記載の方法。

【請求項 2 4】

黒質への送達、脳、の各側につき少なくとも一つの部位になされる、請求項1記載の方法。

10

【請求項 2 5】

ヒト対象の脳内の、欠陥のある、疾患のある、または損傷を受けたドーパミン作動性の標的ニューロンへの治療用神経成長因子の送達方法であって、該欠陥、疾患、または損傷を、発現される神経成長因子に応答して寛解させるために、神経成長因子を黒質および線条体へ直接送達する工程を含む、方法。

【請求項 2 6】

ヒト対象の脳内の、欠陥のある、疾患のある、または損傷を受けたドーパミン作動性の標的ニューロンへの治療用神経成長因子の送達方法であって、該欠陥、疾患、または損傷を、発現される神経成長因子に応答して寛解させるために、神経成長因子をコードする発現ベクターを黒質へ直接送達する工程を含む、方法。

20

【請求項 2 7】

ヒト対象の脳内の、欠陥のある、疾患のある、または損傷を受けたドーパミン作動性の標的ニューロンへの治療用神経成長因子の送達方法であって、該欠陥、疾患、または損傷を、発現される神経成長因子に応答して寛解させるために、神経成長因子を黒質へ直接送達する工程を含む、方法。

【請求項 2 8】

ヒト対象の脳内の、欠陥のある、疾患のある、または損傷を受けたドーパミン作動性の標的ニューロンへの治療用神経成長因子の送達方法であって、該欠陥、疾患、または損傷を、発現される神経成長因子に応答して寛解させるために、神経成長因子を含有しているドナー細胞を黒質および線条体へ直接移植する工程を含む、方法。

30

【請求項 2 9】

ヒト対象の脳内の、欠陥のある、疾患のある、または損傷を受けたドーパミン作動性の標的ニューロンへの治療用神経成長因子の送達方法であって、該欠陥、疾患、または損傷を、発現される神経成長因子に応答して寛解させるために、神経成長因子を含有しているドナー細胞を黒質および線条体へ直接移植する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

40

本発明は、全般的に、哺乳動物の脳へ治療用神経成長因子を投与することにより、パーキンソン病などの神経変性疾患を処置する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景情報

パーキンソン病は、臨床的には、動作緩慢、硬直、振戦、および歩行障害を特徴とし、病理学的には、黒質緻密部（黒質）におけるドーパミンニューロンの変性、および（被殻を含む）線条体への投射を特徴とする、一般的な神経変性障害である。現在の治療は、大部分の患者、特に、早期の患者のため、良好な疾患コントロールを提供する。しかしながら、これらのニューロンの継続的な変性を防御する処置は存在せず、時間の経過と共に、

50

全ての治療が失敗する。

【0003】

例えば、慢性的なレボドパ処置は、運動合併症に関連しており、転倒および痴呆などの日常生活に影響を与える可能性のある特色をコントロールせず、疾患進行を防止することはできない。Olanow et al., *Neurology* 72:suppl 4:S1-S136(2009) (非特許文献1)。従って、臨床的な疾患コントロールを改善し、かつ進行を遅らせる、より効果的な処置が緊急に必要とされている。

【0004】

神経栄養因子は、ニューロンの機能を改善し、神経変性を防御することができる。グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) は、インビトロおよびパーキンソン病の動物モデルにおいてドーパミンニューロンを防御する (Lin et al., *Science* 260:1130-1132(1993) (非特許文献2) および Gash et al., *Nature* 380:252-255(1996) (非特許文献3))。ニューロツリン (NRTN) は、高齢サルにおいてドーパミン作動性の活性を改善し (Herzog et al., *Mov Disord* 22:1124-1132(2007) (非特許文献4))、パーキンソン病の動物モデルにおいてドーパミンニューロンを防御することが証明されている、GDNFの天然に存在する構造的かつ機能的なアナログである (Kotzbauer et al., *Nature* 384:467-470(1996) (非特許文献5))。Horger et al., *J Neurosci* 18:4929-4937(1998) (非特許文献6) ; Gasmi et al., *Neurobiol Dis* 27:67-76(2007) (非特許文献7) ; Gasmi et al., *Mol Ther* 15:62-68(2007) (非特許文献8) ; および Kordower et al., *Ann Neurol* 60:706-715(2006) (非特許文献9)。

10

20

【0005】

しかしながら、神経変性疾患のための処置として神経栄養因子を使用することは、非常に困難であることが判明している。それは、十分かつ持続的なレベルのタンパク質を変性ニューロンへ標的的特異的に送達することを妨げる障壁によるところが大きい。進行期パーキンソン病を有する患者におけるその後の非盲検試験からの結果は、被殻へのGDNFの連続注入の利益を示した。Gill et al., *Nat Med* 9:589-595(2003) (非特許文献10) および Sle vin et al., *J Neurosurg* 102:216-222(2005) (非特許文献11)。しかしながら、これらの結果は、二重盲検試験においては確認されなかった (Nutt et al., *Neurology* 60:69-73(2003) (非特許文献12) および Lang et al., *Ann Neurol* 59:459-466(2006) (非特許文献13))。それは、おそらく、栄養因子が標的領域全体にわたり十分に分布しなかったためである。Kordower et al., *Ann Neurol* 46:419-424(1999) (非特許文献14) および Salvatore et al., *Exp Neurol* 202:497-505(2006) (非特許文献15)。

30

【0006】

にも関わらず、タンパク質注入、特に遺伝子送達は、ある外科的手技において、治療用タンパク質の広範な分布および長期にわたる発現を提供する可能性を有する。アデノ随伴2型 (AAV2) -ニューロツリンは、ニューロツリンのヒト遺伝子を発現し分泌するよう遺伝学的に操作されたベクターである。Gasmi et al., *Mol Ther* 15:62-68(2007) (非特許文献16)。AAV2ベクターは、炎症反応を誘導せず、臨床試験において安全に使用されており、長期にわたるトランスジーン発現を提供する。Bankiewicz et al., *Mol Ther* 14:564-570(2006) (非特許文献17)。進行期パーキンソン病を有する患者におけるAAV2-ニューロツリンの両側定位的被殻内注射の非盲検12ヶ月第1相試験は、その処置が安全であり、耐受性が高く、運動機能における利益に関連していることを示した。Marks Jr. et al., *Lancet Neurol* 7:400-408(2008) (非特許文献18)。

40

【0007】

しかしながら、第2相試験における処置の効力は、全ての第一目標に関して、統計的に有意な程度にはプラセボ応答を超えず、治療の見込みを完全には満たさなかった。従って、パーキンソン病のための臨床的に有効な遺伝子治療の緊急の必要性が、未だ存在している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

50

【 0 0 0 8 】

【非特許文献 1】Olanow et al., Neurology 72:suppl 4:S1-S136(2009)

【非特許文献 2】Lin et al., Science 260:1130-1132(1993)

【非特許文献 3】Gash et al., Nature 380:252-255(1996)

【非特許文献 4】Herzog et al., Mov Disord 22:1124-1132(2007)

【非特許文献 5】Kotzbauer et al., Nature 384:467-470(1996)

【非特許文献 6】Horger et al., J Neurosci 18:4929-4937(1998)

【非特許文献 7】Gasmi et al., Neurobiol Dis 27:67-76(2007)

【非特許文献 8】Gasmi et al., Mol Ther 15:62-68(2007)

【非特許文献 9】Kordower et al., Ann Neurol 60:706-715(2006)

10

【非特許文献 10】Gill et al., Nat Med 9:589-595(2003)

【非特許文献 11】Slevin et al., J Neurosurg 102:216-222(2005)

【非特許文献 12】Nutt et al., Neurology 60:69-73(2003)

【非特許文献 13】Lang et al., Ann Neurol 59:459-466(2006)

【非特許文献 14】Kordower et al., Ann Neurol 46:419-424(1999)

【非特許文献 15】Salvatore et al., Exp Neurol 202:497-505(2006)

【非特許文献 16】Gasmi et al., Mol Ther 15:62-68(2007)

【非特許文献 17】Bankiewicz et al., Mol Ther 14:564-570(2006)

【非特許文献 18】Marks Jr. et al., Lancet Neurol 7:400-408(2008)

【発明の概要】

20

【 0 0 0 9 】

本発明は、哺乳動物の脳への神経成長因子の送達のための臨床的に有用なシステムおよびプロトコルを提供する。本発明は、霊長類における神経変性状態の処置において特に有用であり、本発明によって送達された神経成長因子は、ニューロンの成長および神経学的機能の回復を刺激する。

【 0 0 1 0 】

一つの局面において、本発明は、ヒト対象の脳における、欠陥のある、疾患のある、または損傷を受けたドーパミン作動性の標的ニューロン（例えばパーキンソン病において損なわれたニューロン）へ治療用神経成長因子を送達する方法を含む。本方法は、欠陥のある、疾患のある、または損傷を、神経成長因子に応答して寛解させるために、黒質へ、好ましくは線条体へも、神経成長因子、神経成長因子をコードする発現ベクターを直接送達するか、またはそのような発現ベクターを含有しているドナー細胞を直接移植する工程を含む。一つの態様において、線条体への送達は、被殻の少なくとも一つの領域になされる。

30

【 0 0 1 1 】

様々な態様において、神経成長因子をコードする発現ベクターの、線条体へ送達される全単位投与量は、神経成長因子をコードする発現ベクターの、黒質へ送達される単位投与量より多い。例えば、被殻へ送達される単位投与量は、黒質へ送達される単位投与量の3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、または9倍までであり得る。

【 0 0 1 2 】

40

いくつかの態様において、疾患は、ドーパミン作動性ニューロンの修復または活性を刺激することにより寛解する。関連する態様において、疾患は、パーキンソン病に関連した運動機能障害の回復により寛解する。

【 0 0 1 3 】

いくつかの態様において、神経成長因子は、GDNFファミリー分子；例えば、GDNF、ニューロトロフィン、パーセフィン、またはアルテミンである。

【 0 0 1 4 】

さらなる態様において、神経成長因子発現のために細胞へ送達するのに使用される組換え発現ベクターは、AAVベクターである。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 1 5 】

【図 1】 AAV2-ニューロツリン組換え発現ベクターを示す図を提供する。ベクターゲノムにおいて、CAGプロモーター、プレプロNGF-NTNハイブリッドcDNA、およびヒト成長ホルモン遺伝子ポリアデニル化シグナルからなるNTN発現カセットの両側に、AAV2 ITRが隣接している。NGFプロドメインに由来する古典的なRXXR配列の位置および切断部位が示される。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 6 】

発明の詳細な説明

一般的注意事項

10

具体的な用語が本明細書において利用されるが、それらは、限定のためではなく、一般的かつ記述的な意味でのみ使用される。他に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本明細書に記載された主題が属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同一の意味を有する。

【 0 0 1 7 】

本明細書および添付の特許請求の範囲のため、他に示されない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される、量 (amounts)、サイズ、寸法、割合、形、組成、パラメーター、百分率、パラメーター、量 (quantities)、特徴を表す数、およびその他の数値は、全て、「約」という用語がその値、量、または範囲と共に明示されていなくても、全ての場合において「約」という用語によって修飾されているものとして理解されるべきである。従って、反対のことが示されない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲において示された数値のパラメーターは、本明細書に開示された主題によって入手することが求められる所望の特性に依って、正確でないかまたは正確である必要はなく、近似値であって、かつ/または、所望により、より大きいかもしれない、より小さくてもよく、許容誤差、換算係数、端数処理、測定誤差等、および当業者に公知のその他の因子を反映していてもよい。例えば、「約」という用語は、ある値をさす場合、指定された量からの、いくつかの態様においては $\pm 100\%$ 、いくつかの態様においては $\pm 50\%$ 、いくつかの態様においては $\pm 20\%$ 、いくつかの態様においては $\pm 10\%$ 、いくつかの態様においては $\pm 5\%$ 、いくつかの態様においては $\pm 1\%$ 、いくつかの態様においては $\pm 0.5\%$ 、いくつかの態様においては $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味し得、そのような変動は、開示された方法を実施するかまたは開示された組成物を利用するために適切である。

20

30

【 0 0 1 8 】

さらに、「約」という用語は、一つまたは複数の数または数値的範囲に関して使用された場合、範囲内の全ての数を含む、全てのそのような数をさし、かつ示された数値の上限および下限を拡大することによってその範囲を修飾することが理解されるべきである。エンドポイントによる数値的範囲の記述は、その範囲に内含される全ての数、例えば、整数（その端数を含む）（例えば、1~5という記述は、1、2、3、4、および5、ならびに、それらの端数、例えば、1.5、2.25、3.75、4.1等を含む）、ならびにその範囲内の任意の範囲を含む。

【 0 0 1 9 】

40

発明の概説

本発明は、パーキンソン病脳の黒質などの、神経が損なわれた脳の深部への、神経成長因子の送達、変性ニューロンの強化を提供し得るという発見に基づく。本発明は、細胞体に曝されるタンパク質を制限することにより、送達された神経成長因子の生理活性を予想外に低下させるという、進行期パーキンソン病における黒質線条体ニューロンに沿った軸索輸送の、従来認識されていなかった欠陥を克服するための、効果的なアプローチを提供する。これは、最大利益の達成を確実にするために特定の組織を標的化することについての洞察を与える。

【 0 0 2 0 】

より具体的には、進行期パーキンソン病を有する患者におけるAAV2-ニューロツリン遺

50

伝子治療の効力および安全性を試験する第2相臨床試験において、2人の処置された患者が、無関係の事象により死亡したことから、処置後の脳組織を剖検において分析することが可能となった。両症例は、背腹面において4mmの間隔で被殻内ボラス注射を4回受容した。ニュールツリン免疫標識が、調査された全ての半球において同定された。2種の異なるアプローチを独立に使用して定量的容量分析を実施したところ、各々、被殻の平均カバー率がおよそ15%であり、半球間にある程度の変動があることが明らかとなった。

【0021】

最も密なニュールツリン免疫標識を有する区域において、チロシン水酸化酵素（TH）免疫反応性繊維の増加を観察することができた。しかしながら、これらの繊維は常に、十分にニュールツリンシグナルの範囲内に含まれていた。動物における過去の全研究とは対照的に、線条体から黒質へのニュールツリンの逆行性輸送の明らかな証拠は存在せず、黒質におけるTH誘導の証拠も存在しなかった。これらのデータは、パーキンソン病の遺伝子治療に対して異なるアプローチを要求しており、それが本発明により提供される。

10

【0022】

本発明の方法および方法論を説明する前に、記載された具体的な方法は変動し得るため、本発明がそのような方法に限定されないことを理解されたい。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲においてのみ制限されるため、本明細書において使用される用語は、具体的な態様を記載するためのものに過ぎず、限定的なものではないことも理解されたい。

【0023】

20

標的組織

本発明は、脳内ニューロン（特に、黒質における損失がパーキンソン病などの神経変性状態に関連しているニューロン）を神経成長因子を用いて成功裏に再生するための方法についての必要なパラメーターを同定し、明らかにする。

【0024】

本発明により明らかにされた第1の方法パラメーターは、適切な標的組織の選択である。神経栄養因子に対する応答性の保持に関して、脳における領域が選択される。ヒトにおいて、神経栄養因子に対する応答性を成年期まで保持しているCNSニューロンには、コリン作動性前脳基底核ニューロン、黒質、線条体の区域、被殻のドーパミン作動性ニューロン、嗅内皮質ニューロン、視床ニューロン、青斑核ニューロン、脊髄感覚ニューロン、および脊髄運動ニューロンが含まれる。黒質のニューロンにおける機能性の損失は、原因としてパーキンソン病の発症に関連している。

30

【0025】

黒質は、はるかに大きな線条体の下に位置する比較的小さな深部脳構造である。黒質に直接アクセスすることに関わる外科的リスクのため、黒質への送達は、発現された神経成長因子の線条体からの輸送を介して試みられた。しかしながら、前記の第2相研究において、予想外に、線条体へのAAV-ニュールツリン構築物の送達は、パーキンソン病の非ヒト霊長類モデルにおいて同一アプローチを使用して証明されたものと同等の治療結果をヒトにおいて達成するために十分なタンパク質を、黒質に供給することができなかった。ヒトパーキンソン病患者において、黒質線条体経路は、従来理解されていた以上に変性していると考えられる。

40

【0026】

実施例においてさらに明らかにされるように、本発明による神経成長因子の送達は、黒質を（好ましくは、線条体も）標的とする。線条体への送達については、例えば、被殻、淡蒼球、および尾状核を含む、線条体の異なる領域を標的とすることができる。

【0027】

被殻および黒質の両方などの、脳の複数の区域を同時に標的としてもよい。さらに、特定の区域の複数の位置、例えば、一方または両方の半球の被殻および/または黒質の各々1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の区域を標的とすることができる。ヒト患者において、各半球または各側につき1回または複数回の黒質への注射、好ましくは各半球また

50

は各側につき1回または複数回の線条体への注射は、疾患の治療的寛解を達成するのに十分であると考えられる。

【0028】

線条体へ送達される発現ベクターの投与は、黒質に送達される量より多くてもよい。例えば、一回の処置過程において、線条体へ送達される全用量は、黒質へ送達される用量の1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、または10倍であってもよい。最も好ましくは、線条体へ供給される全用量は、黒質へ供給される全用量の5倍～10倍である。

【0029】

本開示において使用されるように、「単位投与量」とは、本発明において使用するために調製された神経栄養性薬学的組成物1ml当たりの神経成長因子の濃度を一般にさす。ウイルスベクターを介した送達（インビボまたはエキスピボ）について、神経成長因子濃度は、神経栄養性組成物1ml当たりのウイルス粒子の数により定義される。最適には、ウイルス発現ベクターを使用した神経成長因子の送達について、神経成長因子の各单位投与量は、薬学的に許容される液体の中にウイルス発現ベクターを含み、かつ神経栄養性組成物1ml当たり $10^6 \sim 10^{20}$ 個の発現ウイルス粒子を提供する神経栄養性組成物を、臨床的に示されるように、少なくとも $2.5 \mu\text{l} \sim 25 \mu\text{l}$ 、 $60 \mu\text{l}$ 、 $100 \mu\text{l}$ 、 $200 \mu\text{l}$ 、 $300 \mu\text{l}$ 、またはそれ以上、含むであろう。この手法に沿って、当業者は、神経成長因子タンパク質の送達について、投与プロトコルを適切な単位用量へと容易に変換することができるであろう。

【0030】

本発明により明らかにされたプロトコルに従って、神経成長因子の直接送達は、外科的切開による微量注入（例えば、Capecchi, Cell, 22:479-488(1980)を参照のこと）、注入、ターゲティング分子または共沈殿剤（例えば、リポソーム、カルシウム）との化学的な複合体化、電気穿孔（例えば、Andreason and Evans, Biotechniques, 6:650-660(1988)を参照のこと）を含む当業者に周知の手段により達成され得、神経成長因子をコードする発現ベクターの組成物の送達については、標的組織への微粒子銃法（Tang et al., Nature, 356:152-154(1992)）により達成され得る。

【0031】

当業者は、特に遺伝子治療における使用について、本発明により利用される直接送達法が、遺伝子治療に関連した限定的リスクファクター（即ち、神経成長因子をコードするトランスジーンを保持しているベクターによる非標的細胞のトランスフェクションの可能性）を除去することを認識するであろう。本発明においては、送達が直接的であり、標的ニューロンとの接触を最適化し、非標的細胞との接触を最小化するため、分泌された神経成長因子の拡散が、脳の制御された予定された領域において起こるよう、送達部位が選ばれている。さらに、霊長類およびヒトにおいて、機能性の神経成長因子をコードするトランスジーンを有するウイルスベクターは、脳への送達の後、数年間、ヒト神経成長因子を発現することが示されている。従って、本発明は、脳における神経成長因子の長期にわたって利用可能な供給源を提供する。

【0032】

本発明の実施において使用するための材料

本発明の方法において有用な材料には、インビボ適合性の組換え発現ベクター、パッケージング細胞株、ヘルパー細胞株、合成インビボ遺伝子治療ベクター、制御可能な遺伝子発現システム、封入材料、薬学的に許容される担体、および関心対象の神経系成長因子をコードするポリヌクレオチドが含まれる。

【0033】

神経成長因子

公知の神経系成長因子には、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、神経成長因子-3（NT-3）、神経成長因子-4/5（NT-4/5）、神経成長因子-6（NT-6）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）およびGDNF分子ファミリーのその他のメンバー（GDNFの天然に存在する類似体、ニューロツリン、パーセフィン、お

10

20

30

40

50

よびアルテミン)、繊維芽細胞成長因子ファミリー(FGF1~15)、白血病抑制因子(LIF)、インスリン様成長因子ファミリーのある種のメンバー(例えば、IGF-1)、骨形成タンパク質(BMP)、イムノフィリン、トランスフォーミング成長因子(TGF)成長因子ファミリー、ニューレグリン、上皮細胞成長因子(EGF)、血小板由来成長因子(PDGF)等が含まれる。

【0034】

成長因子は、精製されてもよいし、合成されてもよいし、または組み換え作製されてもよい。「神経成長因子」とは、本明細書において言及された神経成長因子と実質的に相同であって、かつ生物学的に等価である、任意の起源の成長因子を意味する。そのような実質的に相同な成長因子は、任意の組織または種に固有のものであってもよく、同様に、生物学的活性は、多数の生物学的アッセイ系のうちの任意のものにおいて特徴決定されてもよい。例えば、「神経成長因子」には、本発明の神経成長因子の生物学的活性を保持している限り、融合タンパク質および断片を含む、分子のハイブリッド型および修飾型、ならびにある種のアミノ酸が欠失しているかまたは置換されているハイブリッド型および修飾型、ならびに1個または複数個のアミノ酸が修飾型アミノ酸または異常アミノ酸へと変化しているような修飾、ならびにグリコシル化などの修飾も含まれる。生物学的活性の保持とは、必ずしも、単離され精製された型の神経成長因子または組み換え作製された神経成長因子と同レベルの効力ではなくてもよいが、ニューロン修復が達成されるかまたは活性が促進されることを意味する。

【0035】

本明細書における神経成長因子のプレプロ配列との言及は、プレ配列またはリーダー配列またはシグナル配列の領域、プロ配列領域、および成熟タンパク質を含有しているプレプロ成長因子を含んで解釈されるものとする。プレ領域および/またはプロ領域のヌクレオチド配列は、他の成長因子またはタンパク質のコード配列とのキメラ遺伝子を構築するために使用されてもよく、同様に、他の成長因子またはタンパク質の遺伝子に由来するプレ領域および/またはプロ領域をコードする配列と結合された、本発明の神経成長因子のコード配列から、キメラ遺伝子が構築されてもよい(参照により組み入れられる、Booth et al., Gene 146:303-8(1994); Ibanez, Gene 146:303-8(1994); Storic et al., FEBS Letters 337:303-7(1994); Sha et al., J Cell Biol 114:827-839(1991))。そのようなキメラタンパク質は、活性タンパク質種の改変された産生または発現を示すことができる。

【0036】

(例えば、パーキンソン病の処置のために)本発明において使用する神経成長因子の具体例には、GDNF、ニュールツリン(NRTN)、パーセフィン、およびアルテミンのGDNFファミリーが含まれる。これらの神経成長因子のコード配列は、当業者に周知であるか、または当業者によって容易に同定可能であり、ここで繰り返される必要はない。

【0037】

GDNFファミリーについて、例えば、
www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2668(遺伝子ID 2668、ヒトGDNF)、
www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4902(遺伝子ID 4902、ヒトニュールツリン、米国特許第6,090,778号も参照のこと)、
www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5623(遺伝子ID 5623; ヒトパーセフィン)、および
www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9048(遺伝子ID 9048; ヒトアルテミン)、
ならびにその他の起源:
に示されるヌクレオチド配列を参照することができる。

【0038】

GDNFファミリーについて、例えば、
www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAG46721.1(アクセッション番号CAG46721; ヒトGDNF);
www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EAW69140.1(アクセッション番号EAW69140; ヒトニュールツリン、米国特許第6,090,778号も参照のこと);
www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC39640.1(アクセッション番号AAC39640; ヒトパーセフ

イン)、

www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAD13109.1 (アクセッション番号AAD13109.1; ヒトアル
テミン)、

およびその他の情報源

に示されるポリペプチド配列を参照することができる。

【0039】

ヒト神経成長因子は、同種(allogenic)の成長因子と比較して免疫原性が比較的低い
ため、本発明によるヒト疾患の治療において使用するために好ましい。しかしながら、本
明細書に記載された種類の適切な試験について本発明において使用するために適切であり
得るその他の神経成長因子が知られている。

10

【0040】

組換え発現ベクター

インビボにおける標的細胞への遺伝子移入の戦略には、以下の基本的な工程が含まれる
：(1)発現がCNSの疾患または機能障害と関連している適切なトランスジーンを選択；(2)
遺伝子移入のための適切かつ効果的なベクターの選択および開発；(3)インビボでの
標的細胞の形質導入およびトランスジーン発現が安定的かつ効果的に起こることの証明；
(4)インビボ遺伝子治療法が重篤な有害効果を引き起こさないことの証明；ならびに(5)
)宿主動物における所望の表現型効果の証明。

【0041】

他のベクターが使用されてもよいが、本発明の方法において使用するための好ましいベ
クターは、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターであり、例えばDNAベクター(例
えば、アデノ随伴ウイルス(AAV)およびアデノウイルス、特に、前者)である。選択さ
れるベクターは、以下の基準を満たすべきである：(1)ベクターは標的細胞に感染する
ことができなければならない；従って、適切な宿主範囲を有するウイルスベクターが選択
されなければならない；(2)移入された遺伝子が、細胞における安定的な維持および発現
のため、(細胞死を引き起こすことなく)長期間にわたり細胞において持続し発現されな
なければならない；ならびに(3)ベクターは標的細胞に損傷をもし与えたとしてもほとん
ど与えてはならない。

20

【0042】

成体哺乳動物脳細胞は非分裂性であるため、選ばれる組換え発現ベクターは、非分裂
細胞にトランスフェクトし、非分裂細胞において発現されることができなければならない。
この能力を有することが公知のベクターには、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AA
V)などのDNAウイルス、およびHIVに基づくレンチウイルス、ネコ免疫不全ウイルス(FIV
)、およびウマ免疫不全ウイルス(EIV)などのある種のRNAウイルスが含まれる。この能
力を有するその他のベクターには、単純ヘルペスウイルス(HSV)が含まれる。

30

【0043】

本発明において使用するための神経系成長因子の組換え発現のためのベクターの構築は
、当業者への詳細な説明を必要としない従来技術を使用して達成可能である。本発明に
おいて有用なAAVベクターの構築のための具体的なプロトコルは、実施例において例示さ
れる。AAV2血清型の使用が例証されるが、他の公知のAAV血清型が利用されてもよい。ベ
クター構築のための一般的な技術に関するさらなる概説について、当業者は、Maniatis e
t al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY
1982)を参考にすることができる。

40

【0044】

多数のウイルスプロモーターおよび非ウイルスプロモーターのプロモーター領域および
エンハンサー領域も記載されている(例えば、非ウイルスプロモーターに関しては、Schm
idt et al., Nature 314:285(1985); Rossi and de Crombrughe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
84:5590-5594(1987))。静止状態の細胞におけるトランスジーンを発現を維持し増加さ
せる方法には、I型コラーゲン(1および2)プロモーター(Prockop and Kivirikko, N. Eng
. J. Med. 311:376(1984); Smith and Niles, Biochem. 19:1820(1980); de Wet et al., J. Bio

50

I.Chem., 258:14385(1983))、SV40プロモーター、ニワトリ アクチンプロモーター、およびLTRプロモーターを含むプロモーターの使用が含まれる。

【 0 0 4 5 】

プロモーター活性をモジュレートするためにサイトカインを使用して、長期の安定的発現のためにトランスジーン発現を増加させることもできる。例えば、トランスフォーミング成長因子 (TGF)、インターロイキン (IL) -1、およびインターフェロン (INF) は、LTRなどの様々なプロモーターにより駆動されるトランスジーン発現を下方制御する。腫瘍壊死因子 (TNF) およびTGF1は、プロモーターにより駆動されるトランスジーン発現を上方制御し、該発現を制御するために使用可能である。有用であることが判明し得るその他のサイトカインには、塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) および上皮細胞成長因子 (EGF) が含まれる。

10

【 0 0 4 6 】

処置された脳において、免疫から防御された状態であるにも関わらず生じる可能性がある、ベクターに対するさらなる免疫応答を抑制することにより、トランスジーン発現を増加させるために、コラーゲンエンハンサー配列 (ColI(E)) を有するコラーゲンプロモーターも使用可能である。さらに、ベクター組成物の送達直後に、処置された宿主に対し、ステロイド (例えばデキサメタゾン) を含む抗炎症剤を投与してもよく、好ましくはサイトカインにより媒介される炎症応答が鎮まるまで継続してもよい。LTRプロモーターおよびColI(E)プロモーター-エンハンサーを下方制御してトランスジーン発現を低下させるインターフェロンの産生を低下させるために、シクロスポリンなどの免疫抑制剤を投与してもよい。

20

【 0 0 4 7 】

ヒトニュールツリンcDNA配列を含有しているAAV2ウイルスベクターの構築は、図1、および開示が参照により本明細書に組み入れられるGasmi et al., Mol Ther 15:62-68(2007)に記載されている。プレプロ型ニュールツリンは、切断されて、成熟タンパク質と、プレプロ領域を含有しているヒトプレプロ型とを形成する。成熟ニュールツリン分子の分泌を増強するために、米国特許第6,090,778号に記載されたような、プレプロニュールツリン以外のシグナルペプチド配列 (例えばNGFに由来するもの) を利用してもよい (Gasmi, et al. (前記))。

30

【 0 0 4 8 】

ドナー細胞

本開示は、好ましいインビボ送達法に焦点を当てているが、神経成長因子をコードする発現ベクターの脳へのエクスピボ送達のため、繊維芽細胞および幹細胞 (胚性幹細胞および成体の誘導多能性幹細胞または誘導全能性幹細胞を非限定的に含む) などの宿主細胞が利用されてもよいことを、当業者は認識するであろう。神経成長因子トランスジーンをコードする発現ベクターを含有しているドナー細胞の調製は、内容が本明細書に組み入れられる、同一出願人による米国特許第5,650,148号に詳細に記載されている。調製は、神経成長因子タンパク質をコードするトランスジーンを含有しているベクターの導入によってドナー細胞を改変することにより実施され、続いてその細胞が標的組織へ移植される。

40

【 0 0 4 9 】

ドナー細胞の調製は当業者に公知である。簡単に説明すると、ドナー細胞へのインビトロでの遺伝子移入の戦略には、以下の基本的な工程が含まれる: (1) 発現がCNSの疾患または機能障害と関連している適切なトランスジーンを選択; (2) 遺伝子移入のための適切で効果的なベクターの選択および開発; (3) (例えば、初代培養物または樹立細胞株からの) ドナー細胞の調製; (4) 新たな機能を発現する移植されたドナー細胞が生存可能であり、安定的かつ効果的にトランスジーン産物を発現し得ることの証明; (5) 移植が重篤な有害効果を引き起こさないことの証明; ならびに (6) 宿主動物における所望の表現型効果の証明。

【 0 0 5 0 】

薬学的調製物

50

神経成長因子をコードする発現ベクターのインビボでの直接送達は、本発明において使用するために好ましい。その目的のため、神経成長因子をコードする発現ベクターを、薬学的に許容される懸濁物、溶液、またはエマルションの中に置くことができる。類似の担体を、神経成長因子タンパク質の送達のために利用してもよい。

【0051】

より具体的には、薬学的に許容される担体には、無菌の水性または非水性の溶液、懸濁物、およびエマルションが含まれ得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール性/水性の溶液、エマルション、または懸濁物、例えば、生理食塩水および緩衝媒質が含まれる。非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、または不揮発性油が含まれる。静脈内媒体には、水分および栄養素の補充剤、（リンゲルデキストロースに基づくものなどの）電解質補充剤等が含まれる。

10

【0052】

本発明の薬学的組成物は、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、経皮、くも膜下腔内、または脳内を含む、当技術分野において公知の任意の適切な経路によって投与可能である。投与は、注射によって迅速になされてもよいし、または徐々に注入もしくは徐放性製剤の投与によってある期間にわたりなされてもよい。中枢神経系の組織の処置のため、投与は、脳脊髄液（CSF）への注射または注入によってなされ得る。神経成長因子を中枢神経系の細胞へ投与することが目的の場合、投与は、血液脳関門への分子の浸透を促進することができる1種または複数種の薬剤を用いてなされてもよい。

20

【0053】

担体は、製剤のpH、モル浸透圧濃度、粘性、透明性、色、無菌性、安定性、溶解速度、または匂いの修飾または維持のためのその他の薬学的に許容される賦形剤を含有していてもよい。同様に、担体は、放出または吸収または血液脳関門への浸透の修飾または維持のためのその他の薬学的に許容される賦形剤をさらに含有していてもよい。そのような賦形剤は、単位投与剤形（unit dosage form）もしくはマルチ投与剤形（multi-dose form）のいずれかによる非経口投与のため、または連続的もしくは周期的な注入による脳脊髄液への直接注入のため、投与量を処方するために一般のおよび慣習的に利用されている物質である。例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガス等などの保存剤およびその他の添加剤も存在してもよい。さらに、神経成長因子トランスジェンの組成物は、後に復元して本発明において使用するために、当技術分野において周知の手段を使用して凍結乾燥してもよい。

30

【0054】

投与は、投与製剤の薬物動態学的パラメーターおよび使用される投与経路によっては反復されてもよい。具体的な用量は、患者の体重もしくは体表面積の近似値、または占有される体腔（body space）の体積に応じて計算される。用量は、選択された特定の投与経路に応じて計算される。処置のための適切な投与量を決定するのに必要な計算のさらなる改良は、当業者によってルーチンになされる。そのような計算は、標的細胞のアッセイ調製物における本明細書に開示された活性を考慮すれば、過度の実験なしに、当業者によってなされ得る。正確な投与量は、標準的な用量応答研究により決定される。実際に投与される組成物の量は、処置すべき状態、投与される組成物の選択、個々の患者の年齢、体重、および応答、患者の症状の重度、ならびに選ばれた投与経路を含む、関連する環境を考慮して、実務者によって決定されることが理解されるであろう。

40

【0055】

コロイド分散システムも、標的特異的な遺伝子送達のために使用可能である。コロイド分散システムには、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型エマルション、ミセル、混合ミセル、およびリボソームを含む、脂質に基づくシステムが含まれる。リボソームは、インビトロおよびインビボで送達媒体として有用な人工膜小胞である。0.2~4.0 μm の範囲のサイズの大型単層小胞（LUV）は、大きな高分子を

50

含有している水性緩衝液を十分な割合で封入可能であることが示されている。RNA、DNA、および完全ピリオンを、水性の内部に封入し、生物学的活性を有する形態で細胞へ送達することができる (Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。

【0056】

リボソームが効果的な遺伝子移入媒体であるためには、以下の特徴が存在しなければならない：(1) 生物学的活性を損なうことのない、アンチセンスポリヌクレオチドをコードする遺伝子の高効率の封入；(2) 非標的細胞と比較して優先的かつ十分な、標的細胞への結合；(3) 小胞の水性内容物の、標的細胞の細胞質への高効率での送達；ならびに(4) 遺伝情報の正確で効果的な発現 (Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988)。

【0057】

一般的に、リボソームの組成は、一般的には、ステロイド、特に、コレステロールと組み合わせられた、リン脂質、特に、相転移温度が高いリン脂質の組み合わせである。その他のリン脂質またはその他の脂質が使用されてもよい。リボソームの物理的特徴は、pH、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。

【0058】

リボソーム作製において有用な脂質の例には、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミンなどのホスファチジル化合物、スフィンゴ脂質、セレブロシド、およびガングリオシドが含まれる。特に有用であるのは、脂質モエティが14~18個の炭素原子、特に、16~18個の炭素原子を含有しており、かつ飽和している、ジアシルホスファチジルグリセロールである。例示的なリン脂質には、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、およびジステアロイルホスファチジルコリンが含まれる。

【0059】

リボソームのターゲティングは、解剖学的因子および機構的因子に基づいて分類可能である。解剖学的分類は、選択性のレベルに基づき、例えば、器官特異的、細胞特異的、および細胞小器官特異的である。機構的ターゲティングは、受動的であるか能動的であるかに基づき区別可能である。受動ターゲティングは、類洞毛細血管を含有している器官の細胞内皮系 (RES) の細胞へ分布するリボソームの本来の傾向を利用する。他方、能動ターゲティングは、本来の局在部位以外の器官および細胞型へのターゲティングを達成するための、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、もしくはタンパク質などの特異的なリガンドとリボソームのカップリングによる、またはリボソームの組成もしくはサイズの変化による、リボソームの改変を含む。

【0060】

標的特異的な遺伝子送達システムの表面は、多様な方式で修飾されてもよい。リボソーム標的特異的な送達システムの場合、ターゲティングリガンドをリボソーム二重層と安定的に会合させておくため、リボソームの脂質二重層に脂質基を組み入れることができる。ターゲティングリガンドに脂質鎖を結合するため、様々な連結基を使用することができる。

【0061】

動物モデルおよび臨床的評価

非ヒト霊長類対象において、老化の過程は、老化中のヒトが経験する脳内の神経学的変化をシミュレートする。高度の完全性を有するパーキンソン病のモデルとなる非高齢動物モデルが、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MPTP) により処理されたサルである (例えば、Kordower et al., Exp. Neurology, 160:1-16 (1999) を参照のこと)。そのような処理は、黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの広範な変性をもたらし、同時に、行動修飾および運動障害をもたらす (実施例2)。高老非ヒト霊長類およびMPTP処理動物における本発明の方法の使用および効力を証明するデータは、以前に証明されている。さらに、実施例に記述されるように、ヒトにおける本発明の方法の使用を証明するデータも証明された。

【0062】

処置の臨床的評価およびモニタリングは、上記のインビボ画像技術を使用して実施され

10

20

30

40

50

てもよいし、処置された組織の生検および組織学的分析によって実施されてもよい。後者に関しては、例えばTH免疫反応性に関して、組織試料中のニューロン数を定量化することができる。

【0063】

疾患の症状の寛解の臨床的評価およびモニタリングは、処置後の様々な時点で査定され観察されてもよい。様々な態様において、寛解は、処置後30日目以降、60日目以降、90日目以降、180日目以降、12ヶ月目以降、18ヶ月目以降、24ヶ月目以降、48ヶ月目以降、72ヶ月目以降に観察可能である。

【0064】

実質的に定義された (practically defined) オフ状態 (抗パーキンソン病薬の最後の投与からほぼ12時間後)、および最良オン状態 (抗パーキンソン病薬の朝の投与に対する最良の応答) において、URPDRSにより、患者を査定することができる。Fahn et al., Recent Developments in Parkinson's disease, Macmillan Healthcare Information, Florham Park, NJ 2:153-163(1987)。12ヶ月後の各診察時にも、実質的に定義されたオフ状態において、UPDRSの運動サブスケール (パート3) を実施することができる。運動状態の在宅日記による査定、タイムドモーターテスト (timed motor tests)、運動障害評価尺度、および臨床的な全体的所見の査定は、定期的に; 例えば、基線時、6ヶ月目、およびその後の各診察時に実施することができる。生活の質は、パーキンソン病質問票 (PDQ) -39 (Jenkinson et al., Age Ageing 26:353-357(1997)) および簡易版 (SF) -36 (Ware et al., Med Care 30:473-483(1992)) により、定期的に; 例えば、基線時およびその後に査定することができる。

【0065】

本発明を全面的に説明したが、その実施を例示する実施例を以下に示す。しかしながら、これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものと見なされるべきでなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって定められる。

【実施例】

【0066】

実施例1

AAV2-ニューロツリン遺伝子治療 (AAV-ニューロツリン) の生理活性: パーキンソン病脳と非ヒト霊長類脳との間の違い

中程度の進行期パーキンソン病患者12人における第1相試験は、安全性の問題を特定せず、運動機能のいくつかの測定について可能性のある改善を示唆した。Marks et al., Lancet Neurol 7:400-408(2008)。前述のように、58人の対象におけるその後の二重盲検対照第2相試験は、AAV-ニューロツリンの安全性をさらに支持したが、第一エンドポイントについて偽手術と比較して利益を識別することができなかった (12ヶ月目の「オフ」時のUPDRS運動)。しかしながら、いくつかの第二エンドポイントは、中程度の臨床的利益を示唆し、偽対照に有利な測定値はなかった。さらに、15~18ヶ月目に盲検で処置を受け続けていた患者 (n=30) からの全てのデータの、プロトコルに規定された分析は、第一エンドポイントおよび第二エンドポイントについてAAV-ニューロツリン (AAV2-NTRN) による有意な利益を示唆し、偽処置に有利な測定はなかった。

【0067】

第2相試験中、2人のパーキンソン病患者が、AAV2-NTRNとは無関係の事象で死亡し、脳が組織学的に調査された。これらの患者における被殻へのAAV2-NTRNの送達の効果について、被殻および黒質におけるNTRNの発現、ならびに黒質線条体ニューロンにおけるTH誘導を、若年サル、高齢サル、およびパーキンソン病サルにおける同一処理後のものと比較して以下に詳述する。

【0068】

ベクターの設計および構築

ヒトNTRNのみを発現するよう遺伝学的に操作されたAAV2ベクターであるAAV-ニューロツリンを利用した。Gasmi et al., Mol Ther 15:62-68(2007)。

【 0 0 6 9 】

パーキンソン病剖検例

事前に参加基準を満たし、IRBにより認可されたインフォームドコンセントに署名した患者が、各半球4本の別々の針穿刺経路、各経路2個のデポ剤 (deposits) を介して分布させたAAV-ニューロツリン (5.4×10^{11} vg) を受容した。1人の対象 (#1802) は、10.2年前に診断され、AAV-ニューロツリン処置後90日目に肺塞栓で死亡した59歳の男性であった。2人目の対象 (#1904) は、9.5年前に診断され、AAV-ニューロツリン後47日目に致命的な心筋梗塞を起こした73歳の男性であった。対象 #1904は、34/21の基線時UPDRS運動オフ / オン時スコア、および1.33時間/日の自己申告性の日記によるオフ時間を有していた。対象 #1802は、51/34の基線時UPDRS運動オフ / オン時スコア、および4.7時間/日の自己申告性の日記によるオフ時間を有していた。

10

【 0 0 7 0 】

脳を、それぞれ、死後6時間および13時間の間隔で改変ザンボーニ液により固定し、40 μ mに切片化した。2人目の対象からは片方の半球のみが入手可能であった。非パーキンソン病の高齢ヒトを陽性対照として使用し、脳をNRTNおよびチロシン水酸化酵素 (TH) について染色した。両方の脳が、複数の シヌクレイン染色レビー小体を伴う、黒質内の細胞の著しい損失を含む、パーキンソン病の典型的な病理学的特色を示した。

【 0 0 7 1 】

非ヒト霊長類例

実質的により低い用量 (線条体体積でヒト用量のおよそ4%) を意図的に与えて脳をわずか28日後に評価した2匹の若年サルを除いて、相対的な線条体体積に基づき、パーキンソン病患者に投与された範囲の用量のAAV2-NRTNを、10匹のアカゲザル (*Macaca mulatta*) に被殻内投与した。全ての飼育および実験がIACUCにより認可された。Kordower et al., *Ann Neurol* 60:706-715(2006) ; Herzog et al., *Mov Disord* 22:1124-1132(2007) ; Herzog et al., *Mol Ther* 16:1737-1744(2008) ; およびHerzog et al., *Neurosurgery* 64:602-612(2009)。AAV-ニューロツリン投与後、サルに麻酔をかけ、0.9%生理食塩水により経心的に灌流した後、改変ザンボーニで固定し、脳を切片化した。本明細書に提示される具体的なデータは以前に発表されていないが、これらのサルのうちの数匹は、以前の発表の一部であった。Kordower et al., *Ann Neurol* 60:706-715(2006) ; Herzog et al., *Mov Disord* 22:1124-1132(2007) ; Herzog et al., *Mol Ther* 16:1737-1744(2008)。

20

30

【 0 0 7 2 】

2匹の若年サル (およそ5歳) に、各半球 0.5×10^{11} vgのAAV-ニューロツリンを、2個のデポ剤 (総容量25 μ L) で線条体内投与して1ヶ月後に安楽死させ、さらに1匹の若年サルには、各半球 1.0×10^{11} vgのAAV-ニューロツリンを与えて3ヶ月後に安楽死させた。

【 0 0 7 3 】

3匹の高齢サル (22~25歳) に、線条体全体に分布させた5個のデポ剤 (各30 μ L) を介して 3×10^{11} vgのAAV-ニューロツリンを片側に投与し、8ヶ月後に安楽死させた。

【 0 0 7 4 】

5匹のサル (年齢範囲: 6~10歳) は、運動障害をもたらすMPTPの片側頸動脈内注入を受容した。次いで、4日後、線条体全体に分布させた5個のデポ剤 (各15 μ L) を介して 1.5×10^{11} vgのAAV-ニューロツリンをそれらに投与し、さらに黒質へ10 μ L (0.2×10^{11} vgの用量) を単回注射し、10.5ヶ月後に安楽死させた。

40

【 0 0 7 5 】

ニューロツリンおよびチロシン水酸化酵素の免疫組織化学的分析

ヒトおよび非ヒト霊長類の線条体および黒質におけるNRTNおよびTHを可視化するため、Kordower et al., *Ann Neurol*, 60:706-715(2006)に記載されるように、免疫ペルオキシダーゼ標識を使用した。立体解析学的試料採取法、複合コンピューター支援イメージングソフトウェア、およびCavalieriの方法を、霊長類線条体におけるNRTN発現を定量化するために使用した。ヒト症例については、被殻におけるNRTN発現の量を計算するため、2種の異なる方法を独立に利用した。一つの方法は、各被殻の全体における6~11の切片の立体

50

解析学的試料採取に基づく容量分析を利用した。第2の方法は、被殻を含有していることが見出された全ての切片（各症例19～29の切片）を採取した。

【0076】

次いで、施設内のヒトおよび霊長類の組織学的切片およびMRIスキャンからの値を使用し、およそ1200mm³/半球の非ヒト霊長類尾状核/被殻、およびおよそ4000mm³/半球のヒト被殻の推定値を提供する発表された値も使用して、各標的構造内のNRTN発現の割合を、標的全体の体積に基づいて計算した。

【0077】

結果

NRTN発現

2例のパーキンソン病例について、AAV2-NRTN処置後7週目または3ヶ月目以降に、無関係の原因による死亡の後、入手可能となった3個の半球において、ニュールツリン発現を定量化した。NRTN免疫反応性は、全ての半球に見られ、標的とされた被殻に制限されていた。2つの独立の盲検分析は、控えめにみてNRTNタンパク質が体積で被殻全体のおよそ15%をカバーしていると推定した。AAV-ニュールツリンのために利用された投与パラダイムは、可能性のある副作用を低下させるため、周辺部位への蔓延を制限しながら、被殻の全体にわたり可能な限り広くAAV2-NRTNを分布させるよう意図されていた。Kordower et al. *Ann Neurol* 46:419-424(1999); Nutt et al., *Neurology* 60:69-73(2003); およびEriksdottir et al., *Dement Geriatr Cogn Disord* 9:246-257(1998)。検出可能なNRTNタンパク質は、試験された3個の半球の各々において、分析された全ての被殻切片の93%、58%、およ

10

20

【0078】

被殻（即ち、ドーパミン黒質ニューロンの終末領域）における強力なNRTN発現とは対照的に、生存しているドーパミン作動性メラニン陽性ニューロンが認識可能であるにも関わらず、黒質（即ち、これらの同一ニューロンのニューロン細胞体）に、NRTN染色はほとんど見られなかった。

【0079】

低いNRTN発現レベルによるAAV-ニュールツリンの初期生理活性の控えめな推定値を提供するため、2匹の若年サルに、特に低い用量のAAV-ニュールツリン（各標的構造の相対体積でヒトパーキンソン病用量の4%未満）を投与し、わずか1ヶ月後に安楽死させた。これらの2匹のサルにおける線条体NRTN発現の体積は、わずか5.6%および1.8%であると推定された。この低い線条体NRTN発現レベルにも関わらず、パーキンソン病例とは対照的に、NRTN逆行標識が黒質核周部に容易に見られ、順行性輸送されたNRTN⁺繊維が、淡蒼球内および黒質網様部内に走行しているのが見られた。

30

【0080】

AAV2-NRTNを8ヶ月前に投与された3匹の高齢サルについて、NRTNは体積で線条体全体の4%、19%、および25%（平均16%）を覆っていると推定された。線条体NRTNカバー率のばらつきにも関わらず、パーキンソン病組織とは対照的に、NRTNが黒質において一貫して観察された。

【0081】

MPTPにより処理された5匹のサル（MPTP処理の4日後にAAV2-NRTNを投与され、10ヶ月後に安楽死させられた）について、体積で被殻全体の平均約13%（それぞれ、8%、8%、13%、15%、および23%）がNRTNについて染色された。他の霊長類研究と同様に、黒質緻密部および網様部において、それぞれ逆行性輸送および順行性輸送されたNRTNの広範な証拠が観察された。

40

【0082】

チロシン水酸化酵素免疫組織化学

ヒトパーキンソン病剖検組織の調査は、AAV-ニュールツリン後のTH誘導の乏しい証拠が見出さなかった。TH誘導の最も明らかな証拠は、標的とされた線条体の、NRTN染色の最も強い部位のうちのいくつかの境界の完全に内部に観察された。まばらなTH陽性繊維のみ

50

を反映するこのシグナルは、NRTN陽性被殻部位の平均して50%に観察された（即ち、それぞれ、0%、62%、および80%）。パーキンソン病脳の黒質においては、多数のメラニン含有TH+ドーパミン作動性ニューロンの存在にも関わらず、TH誘導の証拠は見出されなかった。

【0083】

パーキンソン病例におけるまばらなTH誘導シグナルとは対照的に、サルにおけるAAV2-NRTN処置後のTH誘導は、黒質線条体ニューロンにおいて一貫して観察され、一般に強いものであり、典型的には、線条体および黒質におけるNRTN発現の程度および強度を反映していた。これは、パーキンソン病例より実質的に低い用量および低いNRTN発現で、投与後28日目にすら明白であった。最後に、パーキンソン病脳におけるTH応答とはさらに対照的に、サル線条体におけるTH誘導の区域は、一貫して、隣接切片におけるNRTN染色の区域を越えていた。

10

【0084】

上記データにより、遺伝子治療は、神経変性患者の脳内の深部において、可能性として強力な治療用タンパク質の標的特異的な発現を生じ得ることが示される。パーキンソン病脳内の被殻へのAAV2-NRTN（AAV-ニューロツリン）の投与は、標的とされた被殻においてNRTNの明らかな発現をもたらし、控えめにみて体積でその構造のおよそ15%を覆うと推定された。パーキンソン病患者における臨床的利益のために、どれだけのカバー率が必要とされるかは未知であるが、この量は、数種の非ヒト霊長類モデルにおいて生物学的利益を提供した範囲内に明らかにあり、現在蓄積されている動物およびヒトにおける安全性データは、そのカバー率を確実にさらに拡大するための正当化を提供する。Kordower et al., Ann Neurol 60:706-715(2006) ; Herzog et al., Mov Disord 22:1124-1132(2007) ; Herzog et al., Mol Ther 16:1737-1744(2008) ; およびHerzog et al., Neurosurgery 64:602-612(2009)。

20

【0085】

しかしながら、過去の全ての動物研究とは対照的に、若年サル、高齢サル、およびMPTPパーキンソン病サルにおいてこの応答を生じるのに十分である以上の被殻カバー率にも関わらず、パーキンソン病被殻におけるNRTN発現は、黒質のニューロン細胞体の標識をもたらさなかった。この相違は、進行期パーキンソン病と、パーキンソン病のトランスレーショナルリサーチのために使用されている典型的な動物モデルとでは、黒質線条体ニューロンの状態および機能が大きく異なっていることを示唆している。以下の実施例に例示されるように、本発明はこの違いを考慮に入れた。

30

【0086】

等しく興味深いのは、AAV2-NRTN投与およびその後のNRTN発現の後に、被殻において見られた、AAV2-NRTNにより媒介された中程度のTH誘導である（THは、ドーパミン合成のための主要な酵素であり、変性ドーパミンニューロンの機能的増強のための代用物質である）。AAV-NRTNに応答して起こる非ヒト霊長類における強力なTHシグナルは、以下のものを含む多くの重要な点で、パーキンソン病における限定されたシグナルとは著しく対照的である：（1）パーキンソン病においては、THシグナルの強度がはるかに低く、（2）より低い頻度および信頼性で起こり、かつ（3）被殻のはるかに小さな一部分において、NRTN発現の領域の完全に内部で起こった。

40

【0087】

変性黒質線条体ニューロンにおける神経栄養因子（主として、GDNF）による多くの動物研究に基づく従来の通念は、これらのニューロンの終末領域（即ち、線条体）を標的とすることが、最適の神経栄養性の利益を得るために必要かつ十分であること（そして、黒質を標的とすることは、不必要であるか、または逆効果ですらあること）を主張した。Kirik et al., Nat Neurosci 7:105-110(2004) ; Bjorklund et al., Neurobiol Dis 4:186-200(1997) ; およびKirik et al., J Neurosci 20:4686-4700(2000)。この観点は、神経栄養因子が、ニューロン終末により取り込まれ、細胞体へと逆行性輸送されて、栄養効果を誘導することにより最もしばしば機能することを証明している、神経栄養因子の基礎研究によ

50

ってさらに支持された。Mufson et al., Prog Neurobiol 57:451-484(1999)およびLindsay et al., Trends Neurosci 17:182-190(1994)。実際、線条体の終末領域へのGDNFまたはNRTNの送達は、逆行性輸送を介して、軸索終末および黒質細胞体の両方において、GDNFおよびNRTNのレベルを上昇させるのに十分であることが一貫して示されている。Salvatore et al., Exp Neurol 202:495-505(2006) ; Ai et al., J Comp Neurol 461:250-261(2003) ; Su et al., Human Gene Ther 20:1627-1640(2009) ; およびTomac et al., Nature 373:335-339(1995)。

【0088】

しかしながら、被殻における明らかなNRTN、および黒質における十分なドーパミンニューロンにも関わらず、黒質におけるNRTN陽性核周部の欠如を示す本明細書中のデータから、これが、進行期パーキンソン病において同様には起こらないことが明らかになった。被殻送達後のヒト黒質における同様に弱いNRTNシグナルの証拠、黒質の変性核周部へのより大きな神経栄養性の曝露を確実にする戦略は、より迅速で強力な神経栄養性の応答を提供し、従って、より有意義な臨床的利益を提供するであろう。

10

【0089】

線条体に加えて黒質へもGDNFを注射することは無益であって有害であり得ることを示す反対のデータは、注意して解釈されるべきである。Kirik et al., J Neurosci 20:4686-4700(2000)。これらのデータは、線条体GDNFの逆行性輸送により十分な黒質GDNFが存在する時、黒質をさらに標的とする必要はないことを示しているに過ぎない。しかしながら、進行期パーキンソン病を有するヒトにおいて、黒質線条体経路の変性によって、線条体から黒質へのNRTNの逆行性輸送が防止される場合、黒質を標的とすることが不要であるという結論のための基礎は崩壊する。

20

【0090】

実施例II

進行期パーキンソン病のための被殻内AAV2-ニューロツリン (AAV-ニューロツリン) の多施設無作為化二重盲検偽手術対照研究

実施例IおよびGasmi et al., Mol Ther 15:62-68(2007)に記述されたように、AAV2ベクターを、ヒトニューロツリン (NRTN) のみを発現するよう遺伝学的に操作した。それは、脳の細胞へのニューロツリン (NRTN) の標的特異的かつ持続的な送達を提供する。

30

【0091】

AAV2-NRTNを使用した多施設二重盲検偽手術対照試験を実施するため、中央のコンピュータにより生成された無作為のコードによって、AAV2-ニューロツリン (5.4×10^{11} ベクターゲノム) の被殻への両側注射または偽手術のいずれかを受容するよう、患者を無作為に割り当てた (2:1)。神経外科チームを除く全ての患者および研究人員に対して、処置割り当てが隠された。第一エンドポイントは、実質的に定義されたオフ状態における統一されたパーキンソン病評価尺度の運動サブスコアの基線時から12ヶ月目までの変化であった。基線後に少なくとも1回査定された、無作為に割り当てられた全ての患者を、第一分析に含めた。

【0092】

2006年12月～2008年11月に、米国の9箇所からの58人の患者が試験に参加した。AAV2-ニューロツリンにより処置された患者において、対照個体と比較して、第一エンドポイントの有意差は存在しなかった (差 - 0.31 [SE 2.63]、95%CI - 5.58 ~ 4.97 ; $p = 0.91$)。従って、被殻内AAV2-ニューロツリンは、12ヶ月目のUPDRS運動スコアを使用して機能的に査定された場合、偽手術より優れてはいなかった。

40

【0093】

実施例III

黒質および被殻へのAAV-ニューロツリンの送達

2010年10月に開始した進行期パーキンソン病における第2b相多施設偽手術二重盲検対照試験において、AAV2-ニューロツリンが使用されている。進行期の患者は、疾患の初期段階にあり従って本発明が容易に効力を示すと予想される患者よりも、黒質線条体輸送経路

50

の変性が大きいと予想することができる。本出願の時点で、52人の対象のうちのおよそ20パーセントがCERE-120投与または偽手術のいずれかを既に受け、他の多くは手術に登録されて待機中であった。プロトコルは、以下に概説されるパラメーターに沿って本発明を利用する。

【0094】

注射経路を計画するために神経画像処理を用いて定位脳手術を行う。プロボフォールによる深鎮静により、患者に麻酔をかける。積極的治療に割り当てられた患者については、ニュールツリンをコードするDNAを被殻に送達するため、AAV2をベクターとして用いた遺伝子移入法を行う。全脳用量が 5.4×10^{11} のベクターゲノムのAAV2-ニュールツリンを両側に投与する。これらの患者において、黒質は、各側2箇所（穿頭孔を通して到達された）注射部位において直接標的とされ、被殻へは、より高い用量が、各側3箇所の注射部位において、本発明により送達される。

10

【0095】

黒質をAAV-ニュールツリンの標的とし、かつ以前に試験された用量より多い用量を投与することの実現可能性および安全性を初めて評価した、この第2b相試験は、第1相安全性試験における6人の患者への投与の成功の後に開始された。第1相安全性データベースは、各患者について7～13ヶ月の範囲の追跡期間を現在反映しており、体重に対する効果を含め、投与された6人の対象のいずれにおいても重篤な有害事象（SAE）を示していない。全ての患者が、計画通り、手術から48時間以内に退院した。第1相試験において観察された安全性プロファイルと一致して、AAV-ニュールツリンに関連する重篤な有害事象は、進行中の第2相試験においても観察されていない。

20

【0096】

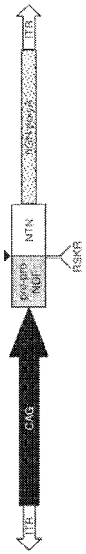
ヒト臨床プロトコルに関して既に概説されたように、登録された最後の患者が15ヶ月目の評価を完了するまで、基線時、術後1ヶ月目、3ヶ月目、6ヶ月目、9ヶ月目、および12ヶ月目に患者を査定し、その後は3ヶ月毎に査定する。神経変性障害の寛解は、処置後早ければ3ヶ月目に観察可能であると予想される。過去の臨床試験において、被殻処置を受けた患者において、12ヶ月後に利益が出現したことから、1年目より後、例えば、処置後18ヶ月目、24ヶ月目、48ヶ月目、または72ヶ月目、および可能性としてそれ以降の追跡も、線条体および黒質の細胞体におけるニュールツリンシグナルのさらなる増幅を立証するかもしれないことが示唆される。

30

【0097】

本発明を上記実施例に関して説明したが、修飾および変動が本発明の精神および範囲に包含されることが理解されるであろう。従って、本発明は以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【 図 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/12 (2006.01)		A 6 1 K 35/12		
A 6 1 L 27/00 (2006.01)		A 6 1 L 27/00	Z	

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

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 パータス レイモンド ティー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ シャノン リッジ レーン 5 4 4 2

(72)発明者 シフェール ジョアオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 デル マー コルデロ ロード 2 2 2 3

F ターム(参考) 4C081 AB18 BA12 CD34
4C084 AA01 AA02 AA13 BA44 DB59 MA67 NA13 NA14 ZA151 ZC021
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA15 ZC02
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA67 NA13 NA14 ZA15 ZC02