

(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2015-525783

(P2015-525783A)

(43) 公表日 平成27年9月7日(2015.9.7)

(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 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/16 (2006.01)	A 6 1 K 47/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00 1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-525565 (P2015-525565)	(71) 出願人	515028816 ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700, ルーム ダブリュー 172
(86) (22) 出願日	平成25年7月31日 (2013.7.31)	(71) 出願人	514137997 オハイオ・ステイト・イノベーション・フ ァウンデーション アメリカ合衆国オハイオ州43201, コ ロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1 524
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月23日 (2015.2.23)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/053065		
(87) 国際公開番号	W02014/022582		
(87) 国際公開日	平成26年2月6日 (2014.2.6)		
(31) 優先権主張番号	61/678, 458		
(32) 優先日	平成24年8月1日 (2012.8.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えアデノ随伴ウイルス9の髄腔内送達

(57) 【要約】

本発明は、ポリヌクレオチドの髄腔内送達のために有用なアデノ随伴ウイルス9型の方法および物質に関する。上記方法および物質の使用は、例えば、下位運動ニューロン疾患（例えば、SMAおよびALS）、ならびにポンペ病およびリソソーム蓄積症の処置について示される。生存運動ニューロンタンパク質の発現のためにrAAV9ベクターといっしょに非イオン性低浸透性造影剤を投与すると、発現ベクター単独の投与と比較してSMN変異体マウスの生存を改善することを開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリヌクレオチドの送達を必要とする患者の中枢神経系にポリヌクレオチドを送達する方法であって、該方法は、該患者への r A A V 9 および非イオン性の低浸透性造影剤の髄腔内送達を包含し、ここで該 r A A V 9 は、該ポリヌクレオチドを含む自己相補性ゲノムを含む、方法。

【請求項 2】

前記ポリヌクレオチドが、脳に送達される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが、脊髄に送達される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが、グリア細胞に送達される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記グリア細胞が、星状細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドが、下位運動ニューロンに送達される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記非イオン性の低浸透性造影剤が、イオビトリドール、イオヘキソール、イオメプロール、イオパミドール、イオベントール、イオプロミド、イオベルソールもしくはイオキシランである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記非イオン性の低浸透性造影剤が、イオヘキソールである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ポリヌクレオチドが、生存運動ニューロン (S M N) ポリヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

神経学的疾患の処置を必要とする患者において神経学的疾患を処置する方法であって、該方法は、該患者への r A A V 9 および非イオン性の低浸透性造影剤の髄腔内送達を包含し、ここで該 r A A V 9 は、治療用ポリヌクレオチドを含む自己相補性ゲノムを含む、方法。

30

【請求項 11】

前記神経学的疾患が、レット症候群である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記神経学的疾患が、神経変性疾患である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記治療用ポリヌクレオチドが、生存運動ニューロン (S M N) ポリヌクレオチドである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記神経変性疾患が、脊髄性筋萎縮症である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記神経変性疾患が、筋萎縮性側索硬化症である、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記ポリヌクレオチドが、脳に送達される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記ポリヌクレオチドが、脊髄に送達される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ポリヌクレオチドが、グリア細胞に送達される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

前記グリア細胞が、星状細胞である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

50

前記ポリヌクレオチドが、下位運動ニューロンに送達される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 21】

前記非イオン性の低浸透性造影剤が、イオピトリドール、イオヘキソール、イオメプロール、イオパミドール、イオベントール、イオプロミド、イオベルソールもしくはイオキシランである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 22】

前記非イオン性の低浸透性造影剤が、イオヘキソールである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記患者が、前記 rAAV9 の髄腔内送達後に、トレンドレンプルグ体位に置かれる、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

この出願は、2012年8月1日に提出された米国仮出願第61/678,458号(これは、その全体が参考として本明細書に援用される)からの優先権を主張する。

【0002】

(政府の権利に関する陳述)

本発明は、National Institutes of Health (NIH) によって付与されたRC2 NS69476-01の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

20

【0003】

(電子提出された物件の参照による援用)

本明細書と同時に提出されかつ以下: 「47099PCT__SeqListing.txt」と称されるASCIIテキストファイル(8,954バイト、2013年7月31日作製)のとおり識別されるコンピューター読み取り可能な形態での配列表は、その全体において本明細書に参考として援用される。

【0004】

(発明の分野)

本発明は、ポリヌクレオチドの髄腔内送達(すなわち、脳もしくは脊髄のくも膜の下にある空間への送達)に有用なアデノ随伴ウイルス9型の方法および物質に関する。上記方法および物質の使用は、例えば、下位運動ニューロン疾患(例えば、SMAおよびALS)、ならびにポンペ病およびリソソーム蓄積症の処置に関して示される。

30

【背景技術】

【0005】

(背景)

大型分子薬物は、血液脳関門(BBB)を横切らず、小型分子のうちの98%は、この関門を通過できず、それによって、多くのCNS障害の薬物開発の努力が制限されている [Pardridge, W.M. Nat Rev Drug Discov 1: 131-139 (2002)]。遺伝子送達は、BBBを迂回するための方法として近年提唱された [Kasparら、Science 301: 839-842 (2003)]; しかし、脳および脊髄への広く行き渡る送達は、困難であった。運動ニューロン疾患に関する成功裡の遺伝子治療の開発は、脊髄および運動皮質内の広く行き渡る形質導入をおそらく必要とする。最も一般的な運動ニューロン疾患のうちの2つは、脊髄性筋萎縮症(SMA)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)であり、これらはともに、それぞれ、小児および成人を衰弱させる障害であり、今までのところ有効な治療はない。SMAおよびALSの齧歯類モデルでの近年の研究は、筋肉内注射の後に逆行して輸送されるウイルスを使用する遺伝子送達を含む [Kasparら、Science 301: 839

40

50

- 842 (2003); Azzouzら、J Clin Invest 114: 1726-1731 (2004); Azzouzら、Nature 429: 413-417 (2004); Ralphら、Nat Med 11: 429-433 (2005)]。しかし、脊髄、脳幹および運動皮質全体にわたって神経変性が広く行き渡った領域を標的としてこれら疾患を有効に処置するために多くの注射が必要とされることを考慮すれば、臨床開発は困難であり得る。AAVベクターはまた、神経学的障害についての近年の多くの臨床試験で使用されてきており、持続する導入遺伝子発現、比較的
安全なプロフィール、および有望な機能的応答を示すが、外科的な実質組織内注射 (in
traparenchymal injection) を要した [Kaplittra、Lancet 369: 2097-2105 (2007); Marksら、Lancet Neurol 7: 400-408 (2008); Worgallら、Hum Gene Ther (2008)]。

10

【0006】

SMAは、生後6ヶ月以内に弛緩性麻痺によって特徴付けられる小児期早期の神経変性障害である。この疾患の最も重篤な症例では、麻痺によって呼吸不全がもたらされ、通常2歳までに死亡する。SMAは、新生児6000人に1人の発生率で嚢胞性線維症に隠れた2番目に一般的な小児の常染色体劣性疾患である。SMAは、脊髄全体の長さに沿って下位運動ニューロン(LMN)喪失が存在することによって特徴付けられる遺伝性障害である。SMAは、骨格筋の脱神経(denervation of skeletal muscle)および顕著な筋萎縮を生じる、生存運動ニューロン(SMN)タンパク質
の発現の低下によって引き起こされる。SMNは、U snRNP生物発生において機能する、
遍在的に発現されるタンパク質である。

20

【0007】

ヒトでは、SMN遺伝子の2つの非常によく似たコピーが存在し、SMN1およびSMN2といわれる。上記2つの遺伝子によってコードされるアミノ酸配列は、同一である。しかし、エキソン7において生じるエキソン7のSMN2におけるサイレントな単一ヌクレオチド変化は、SMN2からの転写物のうちの80~90%で排除される。得られた短縮型のタンパク質(SMN7といわれる)は、安定性が低く、急速に分解される。SMN2の転写物のうちの残りの10~20%が、全長SMNタンパク質をコードする。SMN1の全てのコピーが失われ、SMN2のみが残されて全長SMNタンパク質を生成する
ときに疾患が生じる。よって、SMN2は、より高いSMN2コピー数を有する患者は一般にはより遅い発症および重篤度がより低い疾患を示すという点において、SMAにおける表現型調節因子(phenotypic modifier)として作用する。

30

【0008】

SMAの治療的アプローチは、SMNレベルを増大させるかまたは残りのSMN機能を
増強するための薬物開発に主に焦点が当てられてきた。数年間のスクリーニングにも拘わらず、どの薬物も、回復治療としてSMNレベルを増大させるために十分に有効ではなかった。多くのマウスモデルがSMAに関して開発されてきた。Hsieh-Liら、Nature Genetics, 24 (1): 66-70 (2000); Leら、Hum. Mol. Genet., 14 (6): 845-857 (2005)
); Monaniら、J. Cell. Biol., 160 (1): 41-52 (2003)およびMonaniら、Hum. Mol. Genet., 9 (3): 333-339 (2000)を参照のこと。近年の研究は、マウスモデルにおいて全長SMN cDNAを発現させ、著者らは、ニューロンにおけるSMNの発現がSMAの症状に対して顕著に影響を有し得ると結論づけた。Gavriliinaら、Hum. Mol. Genet., 17 (8): 1063-1075 (2008)を参照のこと。

40

【0009】

ALSは、筋肉および/もしくは筋機能の喪失を生じるもう1つの疾患である。これは、1869年にCharcotによって最初に特徴付けられ、100,000個体のうち

50

の約5個体に影響を及ぼす広く行き渡った成人発症の神経変性疾患である。ALSは、随意運動を司る脳および脊髄の中の特定の神経細胞が徐々に変性するときに生じる。臨床上の発症から2～5年以内に、これらの運動ニューロンの喪失によって、骨格筋の進行性の萎縮が生じ、それは、麻痺、発語欠陥、および呼吸不全に起因する死亡を生じる筋機能の喪失を生じる。

【0010】

ALS発症を引き起こすかもしくはその素因がある遺伝子異常は未知であるが、SOD-1遺伝子におけるミスセンス変異が家族性ALS症例のうちの約10%で起こっており、そのうちの最大で20%までが、第21染色体に位置するCu/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)をコードする遺伝子に変異を有する。SOD-1は、フリーラジカルスーパーオキシドアニオンを過酸化水素および分子酸素へと変換することによって、酸化ストレスの調節において通常は機能している。現在まで、SOD-1遺伝子の全てのエキソンにわたって90を超える変異が同定されてきた。これら変異のうちのいくつかは、変異型ヒトSOD-1を発現するトランスジェニックマウスの系統を作って、ALSの進行性の運動ニューロン疾患および病因のモデル化するために使用されてきた。

10

【0011】

SMAおよびALSは、最も一般的な運動ニューロン疾患のうちの2つである。SMAおよびALSの齧歯類モデルにおける近年の研究は、筋肉内注射の後に逆行して輸送されるウイルスを使用する遺伝子送達による処置を試験した。Azzouzら、*J. Clin. Invest.*, 114: 1726-1731 (2004); Kasparら、*Science*, 301: 839-842 (2003); Azzouzら、*Nature*, 429: 413-417 (2004)およびRalphら、*Nature Medicine*, 11: 429-433 (2005)を参照のこと。脊髄、脳幹および運動皮質全体にわたる神経変性を標的とするために多くの注射が必要とされることを考慮すれば、このような処置の臨床使用は困難であり得る。

20

【0012】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、複製欠損パルボウイルスであり、その中の1本鎖DNAゲノムは、長さ約4.7kbであり、145ヌクレオチド逆方向末端反復(ITR)を含む。AAV血清型2(AAV2)ゲノムのヌクレオチド配列は、Ruffingら、*J. Gen. Virol.*, 75: 3385-3392 (1994)によって訂正されたが、Srivastavaら、*J. Virol.*, 45: 555-564 (1983)で示された。ウイルスDNA複製(rep)、キャプシド化/パッケージングおよび宿主細胞染色体組み込みを指示するシス作用性配列は、上記ITR内に含まれる。3つのAAVプロモーター(それらそれぞれのマップ位置にちなんでp5、p19、およびp40と称される)は、rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする2つのAAV内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。2つのrepプロモーター(p5およびp19)は、1つのAAVイントロンの(ヌクレオチド2107および2227での)差次的スプライシングと合わせて、rep遺伝子から4つのrepタンパク質(rep78、rep68、rep52、およびrep40)の生成を生じる。Repタンパク質は、ウイルスゲノム複製を最終的に担う複数の酵素特性を有する。cap遺伝子は、p40プロモーターから発現され、それは、3つのキャプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位は、上記3つの関連キャプシドタンパク質の生成を担う。1つのコンセンサスポリアデニル化部位は、AAVゲノムのマップ位置95に位置する。AAVの生活環および遺伝的特質は、Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992)において総説されている。

30

40

【0013】

AAVは、外来DNAを細胞に送達するためのベクターとして(例えば、遺伝子治療において)それを魅力的にする特有の特徴を有する。培養における細胞のAAV感染は、非

50

細胞障害性であり、ヒトおよび他の動物の自然な感染は、無症状かつ無症候性である。さらに、AAVは、多くの哺乳動物細胞に感染し、多くの異なる組織をインビボで標的とする可能性がある。さらに、AAVは、分裂細胞および非分裂細胞をゆっくりと形質導入し、転写的に活性な核エピソーム(nuclear episome)(染色体外エレメント)として本質的にそれら細胞の寿命にわたって残っている。AAVプロウイルスゲノムは、組換えゲノムの構築を実行可能にするプラスミド中のクローニングされたDNAとして感染性である。さらに、AAV複製、ゲノムキャプシド化および組み込みを指示するシグナルはAAVゲノムのITR内に含まれるので、上記ゲノムの内部の約4.3kbのうちのいくらかもしくは全て(複製および構造的キャプシドタンパク質、rep-capをコードする)は、外来DNA(例えば、プロモーター、目的のDNAおよびポリアデニル化シグナルを含む遺伝子カセット)で置き換えられ得る。上記repタンパク質およびcapタンパク質は、トランスで提供され得る。AAVの別の重要な特徴は、これが極めて安定なかつ強いウイルスであることである。上記ウイルスは、アデノウイルスを不活化するために使用される条件(数時間にわたって56 ~ 65)に容易に耐え、AAVの低温保存をそれほど不可欠にしない。AAVは、さらに凍結乾燥され得る。最後に、AAV感染細胞は、重感染に対して耐性ではない。

10

【0014】

AAVには複数の血清型があり、種々の組織向性を表す。既知の血清型としては、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10およびAAV11が挙げられる。AAV9は、米国特許第7,198,951号およびGaora, J. Virol., 78: 6381-6388(2004)に記載されている。AAV6およびAAV8の送達の進歩は、簡単な全身静脈内注射もしくは腹腔内注射の後に骨格筋および心筋のこれら血清型による形質導入を可能にした。Pacakら、Circ. Res., 99(4): 3-9(1006)およびWangら、Nature Biotech., 23(3): 321-8(2005)を参照のこと。しかし中枢神経系内の細胞タイプを標的とするためにAAVを使用することは、外科的な実質組織内注射を要した。Kaplittra, 前出; Marksら, 前出およびWorgallら, 前出を参照のこと。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0015】

【特許文献1】米国特許第7,198,951号明細書

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Pardridge, W.M. Nat Rev Drug Discov(2002)1:131~139

【非特許文献2】Kasparら、Science(2003)301:839~842

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

40

従って、中枢神経系にポリヌクレオチドを送達するための方法およびベクターが当該分野で未だに必要である。

【課題を解決するための手段】

【0018】

(要旨)

本発明は、組換えAAV9(rAAV9)をベクターとして使用する、中枢神経系へのポリヌクレオチドの髄腔内送達に有用な方法および物質を提供する。

【0019】

より具体的には、本発明は、必要な患者の中枢神経系にポリヌクレオチドを送達するための方法を提供し、上記方法は、上記患者へのrAAV9および非イオン性の低浸透性造

50

影剤の髄腔内送達を包含し、ここで上記 r A A V 9 は、上記ポリヌクレオチドを含む自己相補性ゲノムを含む。上記ポリヌクレオチドは、例えば、脳、脊髄、グリア細胞、星状細胞および/もしくは下位運動ニューロンに送達される。上記非イオン性の低浸透性造影剤は、例えば、イオビトリドール (i o b i t r i d o l)、イオヘキソール (i o h e x o l)、イオメプロール (i o m e p r o l)、イオパミドール (i o p a m i d o l)、イオペンツール (i o p e n t o l)、イオプロミド (i o p r o m i d e)、イオベルソール (i o v e r s o l) もしくはイオキシラン (i o x i l a n) である。いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、生存運動ニューロン (S M N) ポリヌクレオチドである。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、必要な患者における神経学的疾患を処置するための方法を提供し、上記方法は、上記患者への r A A V 9 および非イオン性の低浸透性造影剤の髄腔内送達を包含し、ここで上記 r A A V 9 は、治療用ポリヌクレオチドを含む自己相補性ゲノムを含む。上記神経学的疾患は、例えば、脊髄性筋萎縮症もしくは筋萎縮性側索硬化症のような神経変性疾患である。上記治療用ポリヌクレオチドは、例えば、S M N ポリヌクレオチドである。上記 S M N ポリヌクレオチドは、例えば、脳、脊髄、グリア細胞、星状細胞および/もしくは下位運動ニューロンに送達される。上記非イオン性の低浸透性造影剤は、例えば、イオビトリドール、イオヘキソール、イオメプロール、イオパミドール、イオペンツール、イオプロミド、イオベルソールもしくはイオキシランである。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 1 】

(詳細な説明)

従って、一局面において、本発明は、患者の中枢神経系へのポリヌクレオチドの髄腔内送達のための方法を提供し、上記方法は、上記ポリヌクレオチドを含むゲノムを有する r A A V 9 を投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、非イオン性の低浸透性造影剤はまた、上記患者に投与される。上記非イオン性の低浸透性造影剤は、上記患者の中枢神経系における標的細胞の形質導入を増大させる。いくつかの実施形態において、上記 r A A V 9 ゲノムは、自己相補性ゲノムである。他の実施形態において、上記 r A A V 9 ゲノムは、1本鎖ゲノムである。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、脳に送達される。送達が企図される脳の領域としては、運動皮質および脳幹が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、脊髄に送達される。いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、下位運動ニューロンに送達される。本発明の実施形態は、ポリヌクレオチドを神経およびグリア細胞に送達するために r A A V 9 を使用する。いくつかの実施形態において、上記グリア細胞は、小グリア細胞、希突起膠細胞もしくは星状細胞である。いくつかの実施形態において、上記 r A A V 9 は、ポリヌクレオチドをシュワン細胞に送達するために使用される。

【 0 0 2 3 】

本発明の方法および物質の使用は、例えば、下位運動ニューロン疾患 (例えば、S M A および A L S)、ならびにポンペ病、リソソーム蓄積症、多形膠芽腫およびパーキンソン病の処置に関して示される。リソソーム蓄積症としては、アクチベーター欠損 (A c t i v a t o r D e f i c i e n c y) / G M 2 ガングリオシドーシス、 α -マンノシドーシス、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステロールエステル貯蔵病、慢性ヘキササミニダーゼ A 欠損症、シスチン症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー病、フコース蓄積症、ガラクトシアリドーシス、ゴーシェ病 (I 型、I I 型、I I I 型)、G M 1 ガングリオシドーシス (乳児型、乳児後期型 / 若年型、成人 / 慢性型)、I 細胞病 / ムコリピドーシス I I、乳児型遊離シアル酸蓄積症 / I S S D、若年型ヘキササミニダーゼ A 欠損症、クラッペ病 (乳児発症型、後期発症型)、異染性白質ジストロフィー、ムコ多糖症 (偽ハーラー多発性ジストロフィー / ムコリピドーシス I I I A、M P S I ハーラー症候群、

10

20

30

40

50

MPS I シャイエ症候群、MPS I ハーラー・シャイエ症候群、MPS II ハンター症候群、サンフィリポ症候群 A 型 / MPS III A、サンフィリポ症候群 B 型 / MPS III B、サンフィリポ症候群 C 型 / MPS III C、サンフィリポ症候群 D 型 / MPS III D、モルキオ A 型 / MPS IVA、モルキオ B 型 / MPS IVB、MPS IX ヒアルロニダーゼ欠損症、MPS VI マロトー・ラミー、MPS VII スライ症候群、ムコリピドーシス I / シアリドーシス、ムコリピドーシス II IC、ムコリピドーシス IV 型)、多発性スルファターゼ欠損症、ニーマン・ピック病 (A 型、B 型、C 型)、神経セロイドリポフスチノーシス (CLN6 疾患 (不定型乳児後期型、後期発症型変種、早期若年型)、パッテン・シュピールマイアー・フォクト (Batten-Spielmeier-Vogt) / 若年型 NCL / CLN3 疾患、フィンランド変種乳児後期型 CLN5、ジャンスキー・ピールショウスキー病 / 乳児後期型 CLN2 / TPP1 疾患、クフス / 成人発症型 NCL / CLN4 病、北方癲癇 (Northern Epilepsy) / 変種乳児後期型 CLN8、サンタビューリ・ハルティア (Santavuori-Haltia) / 乳児型 CLN1 / PPT 疾患、ニーマン・ピック病 / 糖原病 II 型、濃化異骨症 (Pycnodysostosis)、サンドホフ病 / 成人発症型 / GM2 ガングリオシドーシス、サンドホフ病 / GM2 ガングリオシドーシス-乳児型、サンドホフ病 / GM2 ガングリオシドーシス-若年型、シンドラー病、サラ病 / シアル酸蓄積症、テイ・サックス / GM2 ガングリオシドーシス、ウォルマン病が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0024】

さらなる実施形態において、上記方法および物質の使用は、神経系疾患 (例えば、レット症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病) の処置に関して、または神経系損傷 (脊髄および脳の外傷 / 損傷、脳卒中、および脳の癌が挙げられる) の処置に関して示される。

【0025】

別の局面において、本発明は、rAAV ゲノムを提供する。上記 rAAV ゲノムは、ポリペプチド (SMN ポリペプチドが挙げられるが、これに限定されない) をコードするか、またはそれらの遺伝子の変異したタンパク質もしくは制御配列に指向される siRNA、shRNA、アンチセンス、および / もしくは miRNA をコードするポリヌクレオチドに隣接する 1 個以上の AAV ITR を含む。上記ポリヌクレオチドは、遺伝子カセットを形成するために標的細胞において機能的である転写制御 DNA、具体的には、プロモーター DNA およびポリアデニル化シグナル配列 DNA に作動可能に連結される。上記遺伝子カセットはまた、哺乳動物細胞で発現される場合に、RNA 転写物のプロセッシングを促進するために、イントロン配列を含み得る。

30

40

50

【0026】

いくつかの実施形態において、上記 rAAV9 ゲノムは、神経系損傷 (脊髄および脳の外傷 / 損傷、脳卒中、および脳の癌が挙げられる) とともに、神経変性障害 (アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病が挙げられるが、これらに限定されない) の処置のための栄養因子もしくは保護因子をコードする。公知の神経系増殖因子の非限定的例としては、神経増殖因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン - 3 (NT-3)、ニューロトロフィン - 4 / 5 (NT-4 / 5)、ニューロトロフィン - 6 (NT-6)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、線維芽細胞増殖因子ファミリー (例えば、FGF の 1 ~ 15)、白血病抑制因子 (LIF)、インスリン様増殖因子ファミリーの特定のメンバー (例えば、IGF-1)、ニールツリン、パーセフィン、骨形成タンパク質 (BMP)、イムノフィリン、増殖因子のトランスフォーミング増殖因子 (TGF) ファミリー、ニューレグリン、上皮増殖因子 (EGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、血管内皮細胞増殖因子ファミリー (例えば、VEGF 165)、フォリスタチン、Hif1 などが挙げられる。本明細書で企図される栄養因子もしくは保護因子の各々を調節するジンクフィンガー転写因子もまた、一般に企図される。さらなる実施形態において、神経 - 免疫機能を調節するため

の方法が企図される (s i R N A、 s h R N A、アンチセンス、もしくは m i R N A による例えば、 N F k B 阻害、または神経保護 (種々の細胞型における N F k B および関連経路の二重活性化) のための N F k B を介する小グリア細胞活性化および大グリア細胞活性化の阻害が挙げられるが、これらに限定されない)。なおさらなる実施形態において、上記 r A A V 9 ゲノムは、アポトーシスインヒビター (例えば、 b c l 2、 b c l x L) をコードする。栄養因子もしくは脊髄損傷調節タンパク質 (s p i n a l c o r d c o r d i n j u r y m o d u l a t i n g p r o t e i n) または軸索成長のインヒビターのサプレッサー (例えば、 N o g o のサプレッサー [O e r t l e r、 T h e J o u r n a l o f N e u r o s c i e n c e、 2 3 (1 3) : 5 3 9 3 - 5 4 0 6 (2 0 0 3)] をコードする r A A V 9 の使用はまた、脊髄損傷を処置するために企図される。

10

【 0 0 2 7 】

神経変性障害 (例えば、パーキンソン病) の処置のために、上記 r A A V 9 ゲノムは、種々の実施形態において芳香族酸ドパデカルボキシラーゼ (A r o m a t i c a c i d d o p a d e c a r b o x y l a s e) (A A D C)、チロシンヒドロキシラーゼ、 G T P - シクロヒドロラーゼ 1 (g t p c h 1)、アポトーシスインヒビター (例えば、 b c l 2、 b c l x L)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (G D N F)、抑制性神経伝達物質 - アミノ酪酸 (G A B A)、またはドパミン合成に關与する酵素をコードする。さらなる実施形態において、上記 r A A V 9 ゲノムは、例えば、 P a r k i n および / もしくはシヌクレインの調節因子をコードし得る。

20

【 0 0 2 8 】

神経変性障害 (例えば、アルツハイマー病) の処置のために、いくつかの実施形態において、アセチルコリン生成を増大させるための方法が企図される。いくつかの実施形態において、コリンアセチルトランスフェラーゼ (C h A T) のレベルを増大させるか、またはアセチルコリンエステラーゼ (A c h E) の活性を阻害するための方法が、企図される。

【 0 0 2 9 】

上記 r A A V 9 ゲノムは、いくつかの実施形態において、神経変性障害 (例えば、ハンチントン病) を処置するために、変異型ハンチントンタンパク質 (h t t) 発現を減少させるための方法において使用するために、 s i R N A、 s h R N A、アンチセンス、および / もしくは m i R N A をコードする。

30

【 0 0 3 0 】

上記 r A A V 9 ゲノムは、種々の実施形態において、神経変性障害 (例えば、 A L S) の処置において使用するために、 s i R N A、 s h R N A、アンチセンス、および / もしくは m i R N A をコードする。処置は、疾患の分子マーカー (例えば、 T N F、一酸化窒素、ペルオキシ亜硝酸、および / もしくは一酸化窒素合成酵素 (N O S)) の発現における減少を生じる。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態において、上記ベクターは、変異タンパク質 (例えば、 A L S についてのスーパーオキシドジスムターゼ)、または神経栄養因子 (例えば、 A L S もしくはパーキンソン病についての G D N F もしくは I G F 1) に指向されるショートヘアピン R N A をコードする。

40

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態において、本発明の物質および方法の使用は、神経発生障害 (例えば、レット症候群) を処置することに関して示される。レット症候群に関する実施形態について、上記 r A A V 9 ゲノムは、例えば、メチルシトシン結合タンパク質 2 (M e C P 2) をコードし得る。

【 0 0 3 3 】

「処置」は、本発明の r A A V を含む組成物の有効用量、もしくは有効複数回用量を必要な動物 (ヒトが挙げられる) に、髄腔内経路を介して投与する工程を包含する。上記用

50

量が障害/疾患の発生前に投与される場合、上記投与は、予防的である。上記用量が障害/疾患の発後に投与される場合、上記投与は、治療的である。本発明の実施形態において、有効用量は、処置されている上記障害/疾患の状態と関連する少なくとも1つの症状を緩和する(除去するかもしくは低減するかのいずれか)、障害/疾患の状態への進行を遅らせるかもしくは予防する、障害/疾患の状態の進行を遅らせるかもしくは予防する、疾患の程度を縮小させる、疾患の寛解(部分的もしくは全体)を生じる、ならびに/または生存を延ばす用量である。本発明の方法による処置が企図される疾患の状態の例は、上記に示される。

【0034】

組み合わせ治療はまた、本発明によって企図される。組み合わせは、本明細書で 사용되는場合、同時の処置もしくは逐次的な処置の両方を含む。本発明の方法と標準的医療処置(例えば、ALSにおけるリルゾール)との組み合わせが、新規治療との組み合わせと同様に、具体的に企図される。

10

【0035】

生後必要な個体への送達が企図される一方で、胎児への子宮内送達もまた、企図される。

【0036】

rAAVでの形質導入はまた、インピトロで行われ得る。一実施形態において、所望の標的細胞は、被験体から取り出され、rAAVで形質導入され、被験体へと再導入される。あるいは、同系細胞もしくは異種細胞は、それら細胞が被験体において不適切な免疫応答を生じない場合に使用され得る。

20

【0037】

被験体への形質導入および形質導入した細胞の再導入に適した方法は、当該分野で公知である。一実施形態において、細胞は、rAAVと上記細胞とを、例えば、適切な培地中で合わせ、目的のDNAを有する細胞を、従来技術(例えば、サザンブロットおよび/もしくはPCR)を使用して、または選択マーカを使用することによってスクリーニングすることによって、インピトロで形質導入され得る。形質導入された細胞は、次いで、薬学的組成物へと処方され得、上記組成物は、種々の技術によって(例えば、脊髄への注射によって)被験体へと導入され得る。

【0038】

本発明のrAAVゲノムは、AAV rep DNAおよびcap DNAを欠いている。上記rAAVゲノム中のAAV DNA(例えば、ITR)は、組換えウイルスが由来し得る任意のAAV血清型(AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10およびAAV-11が挙げられるが、これらに限定されない)に由来し得る。上記AAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当該分野で公知である。例えば、AAV-1の完全ゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_002077に提供され; AAV-2の完全ゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_001401およびSrivastavaら、J. Virol., 45: 555-564 (1983)に提供され; AAV-3の完全ゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_1829に提供され; AAV-4の完全ゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_001829に提供され; AAV-5ゲノムは、GenBankアクセッション番号AF085716に提供され; AAV-6の完全ゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_001862に提供され; AAV-7およびAAV-8ゲノムのうちの少なくとも一部は、それぞれGenBankアクセッション番号AX753246およびAX753249に提供され; AAV-9ゲノムは、Gaoら、J. Virol., 78: 6381-6388 (2004)に提供され; AAV-10ゲノムは、Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006)に提供され; そしてAAV-11ゲノムは、Virology, 330(2): 375-383 (2004)に提供される。

30

40

50

【0039】

別の局面において、本発明は、本発明の rAAVゲノムを含むDNAプラスミドを提供する。上記DNAプラスミドは、上記rAAVゲノムを、AAV9キャプシドタンパク質を有する感染性ウイルス粒子へとアセンブリするために、AAVのヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、E1欠失アデノウイルスもしくはヘルペスウイルス）での感染を可能にする細胞に移される。rAAV粒子を生成する技術（ここでパッケージされる予定のAAVゲノム、rep遺伝子およびcap遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が細胞に提供される）は、当該分野で標準的である。rAAVの生成は、以下の成分が単一の細胞（本明細書でパッケージング細胞と称される）内に存在することを必要とする：rAAVゲノム、上記rAAVゲノムとは別個（すなわち、その中にはない）AAV rep 10
 遺伝子およびcap遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能。偽型化（pseudotyped）rAAVの生成は、例えば、WO 01/83692（その全体において本明細書に参考として援用される）に開示される。種々の実施形態において、AAVキャプシドタンパク質は、組換えベクターの送達を増強するために改変され得る。キャプシドタンパク質の改変は、当該分野で一般に公知である。例えば、US 2005/0053922 およびUS 2009/0202490（これらの開示は、それら全体において本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

【0040】

パッケージング細胞を生成するための方法は、AAV粒子生成に必須の成分を全て安定して発現する細胞株を作製することである。例えば、AAV rep 遺伝子およびcap 20
 遺伝子を欠いているrAAVゲノム、rAAVゲノムとは別個のAAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子、ならびに選択マーカー（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子）を含むプラスミド（もしくは複数のプラスミド）は、細胞のゲノムへと組みこまれる。AAVゲノムは、GCテール化（Samulskiら、1982、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081）、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む合成リンカーの付加（Laughlinら、1983、Gene, 23:65-73）のような手順によって、または直接の平滑末端ライゲーション（Senapathy & Carter, 1984、J. Biol. Chem., 259:4661-4666）によって、細菌プラスミドへと導入されてきた。上記パッケージング細胞株は、次いで、アデノウイルスのようなヘルパーウイルスに感染させられる。この方法の利点は、上記細胞が選択可能でありかつrAAVの大規模生成に適していること 30
 である。適切な方法の他の例は、パッケージング細胞へとrAAVゲノムならびに/もしくはrep 遺伝子およびcap 遺伝子を導入するために、プラスミドよりむしろ、アデノウイルスもしくはバキュロウイルスを使用する。

【0041】

rAAV生成の一般原則は、例えば、Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; および Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial and Immunol., 158:97-129) に総説されている。種々のアプローチが、以下に記載されている：Ratschinら、Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonatら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschinら、Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlinら、J. Virol., 62:1963 (1988); および Lebkowskiら、1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988)。Samulskiら、(1989, J. Virol., 63:3822-3828); 米国特許第5,173,414号; WO 95/13365 および対応の米国特許第5,658,776号; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); 40
 50

WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrinら、(1995) Vaccine 13:1244-1250; Paulら、(1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clarkら、(1996) Gene Therapy 3:1124-1132; 米国特許第5,786,211号; 米国特許第5,871,982号; および米国特許第6,258,595号。前述の文書は、rAAV生成に関する文書のそれら節を特に強調して、それらの全体において本明細書に参考として援用される。

【0042】

本発明は、従って、感染性rAAVを生成するパッケージング細胞を提供する。一実施形態において、パッケージング細胞は、安定に形質転換された癌細胞（例えば、HeLa細胞、293細胞およびPerC.6細胞（同起源の293株））であり得る。別の実施形態において、パッケージング細胞は、形質転換された癌細胞ではない細胞（例えば、継代数が少ない293細胞（アデノウイルスのE1で形質転換したヒト胎児腎臓細胞）、MRC-5細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、WI-38細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、Vero細胞（サル腎臓細胞）およびFRhL-2細胞（アカゲザル胎仔肺細胞））である。

10

【0043】

他の実施形態において、本発明は、本発明のrAAVゲノムを含むrAAV9（すなわち、感染性キャプシド化rAAV9粒子）を提供する。本発明の一面において、上記rAAVゲノムは、自己相補性ゲノムである。

20

【0044】

別の局面において、rAAVが提供される（例えば、「rAAV SMN」と称したrAAV9）。上記rAAV SMNゲノム（配列番号1のヌクレオチド980-3336）は、順に、AAV2 ITR、ニワトリ - アクチンプロモーターとサイトメガロウイルスエンハンサー、SV40イントロン、SMNコードDNA（（GenBank Accession Number NM_000344.2）に示される）、ウシ成長ホルモン由来のポリアデニル化シグナル配列およびもう1つのAAV2 ITRを有する。SMN DNAの保存的ヌクレオチド置換もまた、企図される（例えば、GenBank Accession Number NM_000344.2の625位でのグアニンからアデニンへの変化）。ゲノムは、AAV rep DNAおよびcap DNAを欠いており、すなわち、上記ゲノムのITRの間にAAV rep DNAもcap DNAも存在しない。企図されるSMNポリペプチドとしては、NCBIタンパク質データベース番号NP_000335.1に示されるヒトSMN1ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。SMN1調節因子ポリペプチドプラスチン-3（PLS3）もまた企図される[Opreaら、Science 320(5875): 524-527 (2008)]。他のポリペプチドをコードする配列は、SMN DNAに関して置換され得る。

30

【0045】

上記rAAVは、当該分野で標準的な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィーもしくは塩化セシウム勾配によって精製され得る。rAAVベクターをヘルパーウイルスから精製するための方法は、当該分野で公知であり、例えば、Clarkら、Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69: 427-443 (2002); 米国特許第6,566,118号およびWO 98/09657に開示される方法を含む。

40

【0046】

別の局面において、本発明は、本発明のrAAVを含む組成物を企図する。一実施形態において、本発明の組成物は、SMNポリペプチドをコードするrAAVを含む。他の実施形態において、本発明の組成物は、目的の種々のポリペプチドをコードする2つ以上のrAAVを含み得る。

50

【0047】

本発明の組成物は、薬学的に受容可能なキャリアの中に rAAV を含む。上記組成物はまた、希釈剤およびアジュバントのような他の成分を含み得る。受容可能なキャリア、希釈剤およびアジュバントは、レシピエントに対して非毒性であり、好ましくは、使用される投与量および濃度で不活性であり、緩衝剤（例えば、ホスフェート、シトレート、もしくは他の有機酸）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、もしくはデキストリンが挙げられる）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールもしくはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに / または非イオン性界面活性剤（例えば、Tween、ブルコニックもしくはポリエチレングリコール（PEG））を含む。

10

【0048】

本発明の方法において投与される予定の rAAV の力価は、例えば、特定の rAAV、投与様式、処置目標、個体、および標的となる細胞型に依存して変動し、当該分野で標準的な方法によって決定され得る。rAAV の力価は、約 1×10^6 から、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1×10^{13} 、約 1×10^{14} 以上までの DNase 耐性粒子 (DRP) / ml の範囲に及び得る。投与量はまた、ウイルスゲノムのユニット (vg) 単位で表され得る。投与量はまた、ヒトへの投与のタイミングに基づいて変動し得る。rAAV のこれら投与量は、約 1×10^{11} vg / kg から、約 1×10^{12} 、約 1×10^{13} 、約 1×10^{14} 、約 1×10^{15} 、約 1×10^{16} 以上のウイルスゲノム / kg 成人体重までの範囲に及び得る。新生児については、rAAV の投与量は、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 3×10^{12} 、約 1×10^{13} 、約 3×10^{13} 、約 1×10^{14} 、約 3×10^{14} 、約 1×10^{15} 、約 3×10^{15} 、約 1×10^{16} 、約 3×10^{16} 以上のウイルスゲノム / kg 体重の範囲に及び得る。

20

【0049】

別の局面において、標的細胞（神経細胞もしくはグリア細胞が挙げられるが、これらに限定されない）を rAAV で形質導入するための方法は、本発明によって企図される。

30

【0050】

用語「形質導入」とは、レシピエント細胞による機能的ポリペプチドの発現を生じる本発明の複製欠損 rAAV を介して、ポリヌクレオチドを標的細胞にインビボもしくはインビトロのいずれかで、投与 / 送達することをいうために使用される。

【0051】

本発明の rAAV での細胞の形質導入は、上記 rAAV によってコードされるポリペプチドもしくは RNA の持続的な発現を生じる。本発明は、従って、動物もしくはヒト患者に本発明の rAAV（例えば、SMN タンパク質をコードする）を投与 / 送達するための方法を提供する。これら方法は、神経細胞および / もしくはグリア細胞を 1 以上の本発明の rAAV で形質導入する工程を包含する。形質導入は、組織特異的制御エレメントを含む遺伝子カセットで行われ得る。例えば、プロモーターは、ニューロン内で特異的にもしくは星状細胞内で特異的に発現を可能にする。例としては、ニューロン特異的エノラーゼおよびグリア線維性酸性タンパク質プロモーターが挙げられる。撮取された薬物の制御下での誘導性プロモーターもまた、開発され得る。

40

【0052】

いくつかの局面において、造影剤と組み合わせて使用されない場合の本開示のベクターの形質導入と比較して、本開示のベクターが本明細書に記載されるとおりに造影剤と組み合わせて使用される場合に細胞の形質導入が増大されることは、予期される。種々の実施形態において、細胞の形質導入は、造影剤と組み合わせて使用されない場合の本開示のベクターの形質導入と比較して、本明細書に記載されるとおりに造影剤と組み合わせて本開

50

示のベクターが使用される場合に、少なくとも約 1 %、もしくは少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 120 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 180 %、少なくとも約 200 %、少なくとも約 250 %、少なくとも約 300 %、少なくとも約 350 %、少なくとも約 400 %、少なくとも約 450 %、少なくとも約 500 % 以上増大される。さらなる実施形態において、細胞の形質導入は、造影剤と組み合わせて使用されない場合の本開示のベクターの形質導入と比較して、本明細書で記載されるとおりに造影剤と組み合わせて本開示のベクターが使用される場合、約 10 % ~ 約 50 %、もしくは約 10 % ~ 約 100 %、もしくは約 5 % ~ 約 10 %、もしくは約 5 % ~ 約 50 %、もしくは約 1 % ~ 約 500 %、もしくは約 10 % ~ 約 200 %、もしくは約 10 % ~ 約 300 %、もしくは約 10 % ~ 約 400 %、もしくは約 100 % ~ 約 500 %、もしくは約 150 % ~ 約 300 %、もしくは約 200 % ~ 約 500 % 増大される。

10

20

30

40

50

【0053】

いくつかの局面において、細胞の形質導入は、本開示のベクターが造影剤と組み合わせて使用される場合および患者がトレンドレンプルグ体位（頭を低くした姿勢（head down position））に置かれる場合に、さらに増大されることが企図される。いくつかの実施形態において、例えば、上記患者は、髄腔内ベクター注入の間もしくは後に、約 1 度 ~ 約 30 度、約 15 ~ 約 30 度、約 30 ~ 約 60 度、約 60 ~ 約 90 度、もしくは約 90 度を超えて約 180 度までで頭を低くした姿勢に傾けられる。種々の実施形態において、細胞の形質導入は、造影剤およびトレンドレンプルグ体位と組み合わせて使用されない場合の本開示のベクターの形質導入と比較して、本明細書で記載されるとおりに造影剤およびトレンドレンプルグ体位と組み合わせて本開示のベクターが使用される場合に、少なくとも約 1 %、もしくは少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 120 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 180 %、少なくとも約 200 %、少なくとも約 250 %、少なくとも約 300 %、少なくとも約 350 %、少なくとも約 400 %、少なくとも約 450 %、少なくとも約 500 % 以上増大される。さらなる実施形態において、細胞の形質導入は、造影剤およびトレンドレンプルグ体位と組み合わせて使用されない場合の本開示のベクターの形質導入と比較して、本明細書で記載されるとおりに造影剤およびトレンドレンプルグ体位と組み合わせて本開示のベクターが使用される場合に、約 10 % ~ 約 50 %、もしくは約 10 % ~ 約 100 %、もしくは約 5 % ~ 約 10 %、もしくは約 5 % ~ 約 50 %、もしくは約 1 % ~ 約 500 %、もしくは約 10 % ~ 約 200 %、もしくは約 10 % ~ 約 300 %、もしくは約 10 % ~ 約 400 %、もしくは約 100 % ~ 約 500 %、もしくは約 150 % ~ 約 300 %、もしくは約 200 % ~ 約 500 % 増大される。

【0054】

本開示はまた、本開示のベクターおよび造影剤の、必要な患者の中枢神経系への髄腔内投与が、本開示のベクターが上記造影剤の非存在下で投与される場合の患者の生存と比較して、上記患者の生存の増大を生じる局面を提供する。種々の実施形態において、本開示のベクターおよび造影剤の、必要な患者の中枢神経系への投与は、本開示のベクターが上記造影剤の非存在下で投与される場合の上記患者の生存と比較して、少なくとも約 1 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 200 % 以上の上記患者の生存の増大を生じる。

【0055】

本開示はまた、本開示のベクターおよび造影剤の、トレンドレンプルグ体位に置かれた必要な患者の中枢神経系への髄腔内投与が、本開示のベクターが上記造影剤の非存在下お

よびトレンドレンブルグ体位をとらずに投与される場合の患者の生存と比較して、上記患者の生存のさらなる増大を生じる局面を提供する。種々の実施形態において、本開示のベクターおよび造影剤の、トレンドレンブルグ体位に置かれた必要な患者の中枢神経系への投与は、上記造影剤の非存在下およびトレンドレンブルグ体位をとらずに本開示のベクターが投与される場合の患者の生存と比較して、少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%以上の患者の生存の増大を生じる。

【0056】

本発明の材料および方法を使用して送達されるポリヌクレオチドが当該分野で公知のシステムを使用して調節制御下に置かれ得ることは、当業者によって理解される。非限定的例によれば、テトラサイクリン (TET オン/オフ) システム [例えば、TETシステムに対する近年の改善については Urlingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(14): 7963-7968 (2000) を参照のこと] およびエクジソンレセプター調節可能システム [Palliserら、Eur. J. Biochem 270: 1308-1315 (2003)] のようなシステムが誘導性ポリヌクレオチド発現を提供するために利用され得ることは、理解される。本明細書で企図される方法および材料のうちのいずれかの組み合わせが神経変性疾患を処置するために使用され得ることはまた、当業者によって理解される。

【0057】

本発明は、以下の実施例によって例証され、ここで実施例1は、例示的 rAAV9 の生成を記載し、実施例2は、rAAV9 の髄腔内投与を記載し、実施例3は、rAAV9 SMN と造影剤との脳室内 (ICV) 注入後の SMN 変異体マウスの生存の増大を記載し、実施例4は、カニクイザルにおける rAAV9 での運動ニューロン形質導入を記載する。

【実施例】

【0058】

実施例1

rAAV9 が中枢神経系を標的として、そこでタンパク質を発現する能力を、インビボモデル系で評価した。rAAV9 ゲノムは、先に Bevanら、Molecular Therapy, 19(11): 1971-1980 (2011) に記載されるように、順に、AAV2 ITR、ニワトリ - アクチンプロモーターとサイトメガロウイルスエンハンサー、SV40 イントロン、緑色蛍光タンパク質 (GFP) DNA、ウシ成長ホルモン由来のポリアデニル化シグナル配列およびもう1つの AAV2 ITR を含んだ。

【0059】

自己相補性 AAV9 (AAV9 GFP) を、293細胞においてアデノウイルスヘルパープラスミド pHelper (Stratagene, Santa Clara, CA) とともに以前に記載されるように Rep2Cap9 配列をコードするプラスミドと、2本鎖 AAV2 - ITR ベースの CB - GFP ベクターを使用する一過性トランスフェクション手順によって生成した [Gaoら、J. Virol., 78: 6381-6388 (2004)]。血清型9配列を、配列決定によって確認したところ、以前に記載されるものと同じであった。ウイルスを、実験のために3つの別々のバッチで生成し、2回の塩化セシウム密度勾配精製工程によって精製し、PBS に対して透析し、0.001% ブルゴニック - F68 とともに処方して、ウイルス凝集を防止し、4℃ で貯蔵した。全てのベクター調製物を、Taq-Man 技術を使用する定量的 PCR によって力価測定した。ベクターの純度を、4-12% ドデシル硫酸ナトリウム - アクリルアミドゲル電気泳動および銀染色 (Invitrogen, Carlsbad, CA) によって評価した。

【0060】

10

20

30

40

50

実施例 2

いくつかの神経学的障害は、遍在的に発現されるタンパク質の欠損によって引き起こされるものの、他の障害においては、CNSのみにおける遺伝子発現が実質的な影響を有し得る。本発明は、CSFへの遺伝子送達脳脊髄軸に沿った形質導入と、必要とされる用量を潜在的に低下させるという付加的な利益を生じ得ることを企図する。従って、より局所化したCNS送達をもたらすために、 5.2×10^{12} vg/kgのAAV9 GFPおよび非イオン性の低浸透性造影剤の、5日齢のブタ(各々n=3)への髄腔内注入および/もしくは槽内注入を行い、それらの脳および脊髄を、GFP発現について試験した。

【0061】

髄腔内注射。農場で繁殖した雌ブタ(*Sus scrofa domestica*)を、地域の農場から得た。5日齢(P5)の子豚に、0.5cc/kg ケタミン導入麻酔を受けさせ、次いで、酸素中5% イソフルランのマスク吸入によって維持した。体温、心電図、および呼吸数を手順の間中モニターした。腰椎穿刺のために、子ブタをうつぶせにし、椎骨間腔を拡げるために脊椎を弯曲させた。上前腸骨棘を触診し、2点を繋ぐ線を視覚化した。この線の吻側にある椎骨間腔は、ほぼL5-L6である。手術中にX線透視で吻側-尾側および中外側軌跡を確認した。滅菌技術を使用して、1mlシリンジに取り付けた25ゲージ針を挿入した。CSFの透明な飛び出しが見えるまでニードルを進めながら、軽い陰圧を上記シリンジに加えた。大槽穿刺のために、気道の完全性を維持しながら子ブタの頭部を弯曲させた。X線透視で適切な軌跡を再び確認した。25ゲージ針を後頭骨の直ぐ尾側に入れ、透明なCSFが飛び出てくることから、大槽に入ったのを確認した。

【0062】

ベクターもしくはコントロールの送達のために、上記針を適所に保持すると同時に上記シリンジを外した。ウイルス溶液(5.2×10^{12} vg/kg)もしくはPBSのいずれかを含む第2の1ccシリンジを固定し、上記溶液を、ゆっくりと一定の速度で髄腔内空間へと注入した。送達後、約0.25mlの滅菌PBSを、試薬の完全な送達を確実にするように、脊椎の針を通して一気に流し込んだ。イオヘキソール放射線不透過性薬剤[Omni-paque™(イオヘキソール、N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N(2,3-ジヒドロキシプロピル)-アセトアミド]-2,4,6-トリヨード(trioldo)-イソフタルアミド), GE Healthcare, Waukesha, WI]およびリアルタイム連続X線透視での髄腔内での拡散の記録。

【0063】

灌流および組織処理。全ての被験体を注入後21日~24日の間の屠殺した。被験体を、テラゾール、続いて、プロポフォルの筋肉内注射によって深麻酔した。胸骨正中開胸術(midventral sternal thoracotomy)を行い、カニユールを左心室を通して大動脈に挿入した。右心房を開き、0.5~1リットルのPBSを、重力流によってカニユールを通して注入し、続いて、リン酸緩衝液(pH 7.4)中の4% パラホルムアルデヒド1リットルで灌流した。器官を取り出し、組織学切片形成のためにさらに処理する前に4% パラホルムアルデヒド中で48時間後固定するか、または0.1% NaNO₃ PBS溶液中で長期間貯蔵した。

【0064】

組織学および鏡検。脊髄セグメントを3% アガロース中に包埋し、その後、Leica VT1200パイプレーティングマイクローム(Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL)を使用して40μm水平切片へと切断した。切片を、Tris緩衝化食塩水中に移し、処理するまで4で貯蔵した。10%、20%、および30%のスクロース溶液中で逐次的なインキュベーションをすることによって、脳を低温保護した。いったん十分に低温保護(30%スクロース溶液中に浸漬させる)した後、脳を凍結し、OCT(Tissue-Tek, Torrance, CA

10

20

30

40

50

) 中で改変 Leica SM 2000R スライディングマイクローム (Leica Microsystems) 上に全体をマウントし、40 μm 冠状面切片へと切断した。

【0065】

形質導入した細胞タイプの免疫蛍光決定のために、浮遊切片を、ブロッキング溶液 (10% ロバ血清、Tris 緩衝化食塩水中 1% Triton-X100) の中に 1 時間沈め、続いて一次抗体溶液中、4 で一晩インキュベートした。以下の一次抗体をこの研究で使用した: ウサギ抗 GFP (1:500; Invitrogen)、ヤギ抗 ChAT (1:100; Millipore, Billerica, MA)、モルモット抗 GFAP (1:1,000; Advanced Immunochemical, Long Beach, CA) およびウサギ抗 Iba1 (1:500; Dako, Carpinteria, CA)。一次抗体を、Fitc 結合体化、Cy3 結合体化、もしくは Cy5 結合体化二次抗体 (1:1,000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を使用して検出し、PVA-DABCO 媒体にマウントした。

10

【0066】

免疫組織化学染色のために、切片を、0.5% H₂O₂ / 10% MeOH 溶液中で室温においてインキュベートし、その後、ブロッキングし、ウサギ抗 GFP で一晩上記のように染色した。抗 GFP 抗体を、ビオチン化ロバ抗ウサギ二次抗体 (1:200; Jackson ImmunoResearch) を使用して検出し、提供されたプロトコルに従って、Vector NovaRed を使用して発色させた (Vector Labs, Burlingame, CA)。次いで、切片を Cytoseal 60 媒体 (Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI) にマウントした。

20

【0067】

非神経組織を、約 1 cm の 3 ブロックに切断し、30% スクロース溶液中で一晩インキュベートすることによって低温保護した。次いで、それらをトラガカントガムの中に包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結した。サンプルを、10~12 μm 切片へとクリオスタットで切断し、スライドを -20 で貯蔵した。GFP 発現を、上記と類似の免疫蛍光プロトコルによって二次抗体溶液 (1:1,000; Invitrogen) 中に DAPI を添加して検出した。

30

【0068】

蛍光画像を、TRINCH に配置した Zeiss 710 Meta 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY) を使用して捕捉し、LSM ソフトウェアで処理した。

【0069】

全脳切片を、Aperio 自動化スライドスキャナー (Aperio, Vista, CA) を使用して、Nationwide Children's Hospital の研究所にある Research Informatics Core 中の Biopathology Center で x40 解像度までスキャンし、得られた画像を ImageScope ソフトウェアで処理した。

40

【0070】

全ての動物において、GFP 発現は、後根神経節、ならびに脊髄の灰白質および白質において認められた。重要なことには、頭蓋基部の槽空間もしくは L5 の髄腔内空間のいずれかへの AAV9 GFP 注入は、インサイチュハイブリダイゼーションによって試験される場合、広範囲な運動ニューロン形質導入および脊髄の全てのレベルでグリアを生じた。大きな前角ニューロンはまた、脊髄の全てのレベルでの免疫組織化学によれば GFP 発現陽性であった。免疫蛍光によって、GFP + 細胞が運動ニューロンマーカー ChAT を発現することが確認された。

【0071】

最後に、5 歳のブタへの AAV9 - GFP の槽内注入もしくは髄腔内注入後の発現のバ

50

ターンをさらに特徴付けるために、脳を、GFP免疫蛍光を使用して、再び導入遺伝子発現について調べた。最高レベルのGFP発現を有する領域は、小脳プルキンエ細胞、髄質内の神経線維、ならびにオリブ核のような不連続核であった。脳の残りの中での発現は、髄膜表面近くの散在した細胞に制限された。末梢器官におけるGFP発現の試験から、目に見えるGFP発現を生じなかった。このことは、ウイルスの大部分がCNSに局在したことを示す。

【0072】

従って、若いブタの脳脊髄液へのAAV9注入は、運動ニューロンを効率的に標的とした。

【0073】

実施例3

SMN変異体マウスの脳脊髄液(CSF)へのrAAV9 SMN [Foustら、Nature Biotechnology 28(3): 271-274 (2010) および本明細書中上記の説明を参照のこと。ここでベクターゲノム挿入物の配列は、配列番号1のヌクレオチド980~3336として示される] および造影剤のインビボ送達の効果を試験した。

【0074】

簡潔には、上記rAAV9 SMNを造影剤と混合し、続いて、ICV注入して、上記組成物をSMN変異体マウスのCSFへと配置した。コントロール実験として、上記rAAV9 SMNベクターを、造影剤なしで別の群のSMN変異体マウスへと注入した。

【0075】

結果から、約 10^8 vg/kgのrAAV9 SMNと造影剤との注入が、20日というSMN変異体マウスのメジアン生存を生じる一方で、造影剤の非存在下での等量のrAAV9 SMNの注入は生存を生じないことを示した。

【0076】

約 10^9 vg/kgのrAAV9 SMNと造影剤との注入は、70日を超えるSMN変異体マウスのメジアン生存を生じた。対して、造影剤の非存在下で等量のrAAV9 SMNを注入したSMN変異体マウスの生存は認められなかった。

【0077】

最後に、約 10^{10} vg/kgのrAAV9 SMNと造影剤との注入は、100日を超えるSMN変異体マウスのメジアン生存を生じた。対して、造影剤の非存在下で等量のrAAV9 SMNを注入したSMN変異体マウスでは、70日のメジアン生存を生じた。

【0078】

従って、造影剤の非存在下でのrAAV9 SMNの注射後のSMN変異体マウスの生存と比較して、SMN変異体マウスの生存は、rAAV9 SMNと造影剤との注射後に増大する。

【0079】

実施例4

3匹の1歳のカニクイザルに、 1×10^{13} vg/KgのshRNAおよびGFPをコードするrAAV9の髄腔内注入を受けさせた。上記注入を、腰椎髄腔(lumbar thecal sac)のくも膜下腔への腰椎穿刺によって行った。上記rAAV9を、オムニパーク(イオヘキソール)(臨床状況で慣用的に使用されるヨウ素化合物)とともに再懸濁した。イオヘキソールを、くも膜下腔カニューレ挿入が成功したことを確認するために使用し、用量100mg/Kgを投与した。被験体を側臥位に配置し、ほぼL4/5レベルの後正中線注入部位(脊髄円錐の下)を確認した。滅菌条件下で、スタイルット付きの脊髄穿刺針(spinal needle)を挿入し、くも膜下カニューレ挿入を針から透明なCSFが流れ出てくることで確認した。くも膜下腔での圧力を減らすために、0.8mlのCSFを排出し、直後に2.1mLのウイルスと混合した0.7mLイオヘキソール(300mg/ml 処方物)を含む混合物(合計2.8ml)を注入

10

20

30

40

50

した。上記ウイルスの吻側流動分布が頸部領域の細胞形質導入を改善し得るか否かを調査するために、ある被験体を側臥位で回復させ、第2の被験体および第3の被験体を、トレンデレンブルグ体位（頭を低くした姿勢）にて傾けた。これは、ヒト被験体でCTミエログラムを行う場合の慣用的手順である。

【0080】

ウイルスを注入したカニクイザルを、注射後2週間で安楽死させた。動物に、80～100mg/kgの用量において静脈内でペントバルビタールナトリウムで麻酔し、生理食塩水で灌流した。脳および脊髄の解剖を直ぐに行い、組織を、核酸単離のために処理するか（急速凍結）、または4%パラホルムアルデヒド中で後固定し、その後、30%スクロースで低温保護し、イソペンタン中で-65で凍結した。上記ウイルスによって形質導入された細胞を同定するために緑色蛍光タンパク質（GFP）を用いた、そして運動ニューロンを同定するためにコリンアセチルトランスフェラーゼ（Chat）を用いた遊離浮遊免疫染色のためにクリオスタットを使用して12μm冠状面切片を腰髄から集めた。二重陽性細胞を、頸髄、胸髄（thoracic cord）および腰髄の10個の切片で計数し、それらの数を、同じセグメントの中のChat陽性細胞の総数に対して正規化した。

10

【0081】

細胞計数から、ウイルス注入後に被験体を傾けると、胸椎レベルおよび頸椎レベルでの運動ニューロン形質導入の2倍（100%）の改善を生じることが明らかにされた。

【0082】

本発明は、種々の実施形態および実施例に関して記載されてきたが、変形および改善他当業者に想起されることは理解される。従って、特許請求の範囲において現れるような限定のみが、本発明に対して定められるべきである。

20

【0083】

本明細書で言及される全ての文書は、それらの全体において参考として援用される。

【配列表】

2015525783000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/053065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K48/00 ADD. C12N15/864 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KEVIN D FOUST ET AL: "Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 28, no. 3, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 271-274, XP055073169, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1610 cited in the application the whole document -----	1-23
A	FEDERICI T. ET AL.: "Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs", GENE THERAPY, vol. 19, 15 September 2011 (2011-09-15), pages 852-859, XP002711717, the whole document ----- -/--	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 2013		Date of mailing of the international search report 02/09/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Galli, Ivo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/053065

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/112902 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; HOFMANN LAWRENCE V [US]; HWANG GLORI) 15 September 2011 (2011-09-15) abstract -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/053065

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011112902 A2	15-09-2011	US 2013131154 A1 WO 2011112902 A2	23-05-2013 15-09-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A

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

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 カスパー , ブライアン ケー .
アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 0 5 4 , ニュー オールバニー , カルバートン スクエア
7 8 8 3

(72)発明者 パージェス , アーサー
アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 1 4 , コロンバス , プレヴォート ロード 1 0 4

(72)発明者 ポレンスキー , ポール
アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 0 8 5 , ワージントン , ダブリュー . スタントン アベニ
ュー 1 2 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA20 EA02 HA17
4C076 BB11 CC01 DD52A FF32
4C084 AA13 MA05 MA65 NA10 ZA022 ZA222 ZB222
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA65 NA10 ZA02 ZA22 ZB22
4C087 AA02 BC83 CA12 MA05 MA65 NA10 ZA02 ZA22 ZB22