

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年8月13日(13.08.2020)



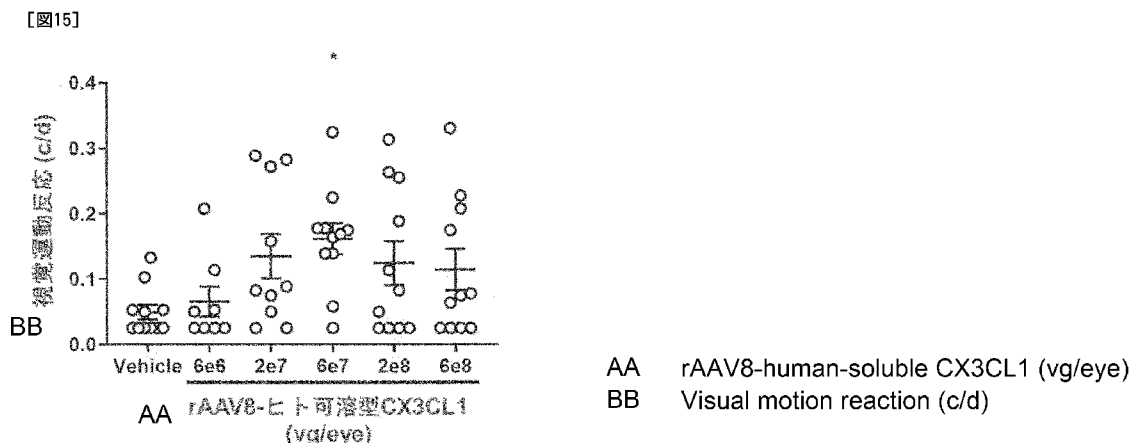
(10) 国際公開番号

WO 2020/162422 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) C12N 15/864 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/004029
- (22) 国際出願日: 2020年2月4日(04.02.2020)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2019-018559 2019年2月5日(05.02.2019) JP
- (71) 出願人: アステラス製薬株式会社(ASTELLAS PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 貴志 直紀(KISHI, Naoki); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 竹内 幹夫(TAKEUCHI, Mikio); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 澤田 昌依(SAWADA, Masae); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 濱井 康丞, 外(HAMAI, Kousuke et al.); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 アステラス製薬株式会社 イノベーション知財室内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: TREATMENT OF RETINAL DEGENERATIVE DISEASE BY INTRODUCTION OF CX3CL1 GENE USING ADENO-ASSOCIATED VIRUS

(54) 発明の名称: アデノ随伴ウイルスを用いたCX3CL1遺伝子の導入による網膜変性疾患の治療



(57) Abstract: [Problem] Provided are a method for the prophylaxis or treatment of retinal degenerative diseases by introducing the CX3CL1 gene using an adeno-associated virus (AAV), and a prophylactic or therapeutic pharmaceutical composition for retinal degenerative diseases that includes, as an active ingredient, an AAV vector carrying the CX3CL1 gene. [Solution] As a result of diligently studying gene therapies for retinal degenerative diseases, the present inventors have found that the introduction of the CX3CL1 gene using an AAV vector, particularly an AAV8 vector, exhibits a pyramidal cell protective action, and that an AAV vector, particularly an AAV8 vector, carrying the CX3CL1 gene can be used as a therapeutic agent for retinal degenerative diseases, thereby accomplishing the present invention. An AAV vector carrying the CX3CL1 gene can be used as a prophylactic and/or therapeutic agent for retinal degenerative diseases.

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 【課題】 アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いたCX3CL1遺伝子の導入による網膜変性疾患の予防又は治療方法、及び、CX3CL1遺伝子を搭載したAAVベクターを有効成分として含む、網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物を提供する。【解決手段】 本発明者らは、網膜変性疾患の遺伝子治療について鋭意検討した結果、AAVベクター、特にAAV8ベクターを用いたCX3CL1遺伝子の導入が錐体細胞保護作用を示すこと、CX3CL1遺伝子を搭載したAAVベクター、特にAAV8ベクターが、網膜変性疾患の治療剤として使用できることを知見して本発明を完成した。CX3CL1遺伝子を搭載したAAVベクターは、網膜変性疾患の予防及び／又は治療剤として使用できる。

明 細 書

発明の名称：

アデノ随伴ウイルスを用いたC X 3 C L 1 遺伝子の導入による網膜変性疾患の治療

技術分野

[0001] 本発明は、アデノ随伴ウイルス（a d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s : A A V）を用いたC X 3 C L 1 遺伝子の導入による網膜変性疾患の予防又は治療方法、及び、C X 3 C L 1 遺伝子を搭載したA A Vベクターを有効成分として含む、網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 網膜は眼底に位置する組織であり、光の情報を電気信号に変え、脳に刺激を伝える役割を持つ。組織学的に幾つかの層に分けることができ、外側から網膜色素上皮層、内節・外節層、外顆粒層、外網状層、内顆粒層、内網状層、神経節細胞層、神経線維層に分けられる。光刺激を電気信号に変換する役割を担う視細胞は核を外顆粒層に持ち、外節に光に反応するタンパク質オプシンを発現する。また、視細胞はそれぞれ暗所と明所で機能する杆体細胞と錐体細胞に分類できる。ヒトの網膜においては、杆体細胞は周辺部に位置し、錐体細胞は黄斑に密集している（中心窩に一番多い）ことが知られ、このため、杆体細胞は周辺視野を、錐体細胞は中心視野及び視力をつかさどることが知られている。

[0003] 網膜組織を構成する細胞に障害が発生することにより、視機能に異常をきたす疾患として、網膜色素変性症等の種々の網膜変性疾患が知られている。これらの疾患には、杆体細胞の変性を伴う網膜疾患及び錐体細胞の変性を伴う網膜疾患が含まれる。

[0004] 網膜色素変性症（R e t i n i t i s P i g m e n t o s a : R P）は、杆体細胞、錐体細胞、又は網膜色素上皮細胞における遺伝子変異が原因で

視細胞及び網膜色素上皮細胞が変性する、数千人に一人の頻度で発症する病気である。多くの場合は杆体細胞に何らかの変異が認められ、まず杆体細胞の変性が発生し、患者は夜盲及び視野狭窄を経験する。更に病気が進行すると、二次的に錐体細胞の変性が起き、中心視力の低下及び最終的な失明に至る。現在、治療法は確立されておらず、患者の視覚機能を回復又は維持させる治療法が望まれている。

[0005] 黄斑ジストロフィーは、錐体細胞が密集する黄斑が徐々に障害を受けることにより視力低下をきたす、遺伝性進行性疾患である。黄斑ジストロフィーは、スタルガルト黄斑ジストロフィー又は黄色斑眼底としても公知のスタルガルト病を含む。黄斑ジストロフィーは錐体細胞機能障害にともなう色覚異常、中心視力低下又は中心視野異常によって特徴付けられる。

[0006] 錐体杆体ジストロフィー (Cone-rod dystrophy: CRD) 及び杆体錐体ジストロフィー (Rod-cone dystrophy: RCD) は、錐体細胞及び杆体細胞の変性を引き起こし、多くの場合盲目をもたらす、遺伝性進行性疾患である。CRDは、錐体細胞の生存性低下又は細胞死と、続く杆体細胞の生存性低下又は細胞死によって特徴付けられる。対照的に、RCDは、杆体細胞の生存性低下又は細胞死と、続く錐体細胞の生存性低下又は細胞死によって特徴付けられる。

[0007] 加齢性黄斑変性症 (Age-related macular degeneration: AMD) は、黄斑変性症とも称され、高齢者に盲目を引き起こす病態である。加齢性黄斑変性症は、滲出性及び非滲出性のAMDの両方を含む。非滲出性のAMDは、ドライ型、萎縮性、又はドルーゼノイド (drusenoid) (加齢性) 黄斑変性症としても公知である。非滲出性のAMDにおいて、ドルーゼンは、網膜色素上皮細胞に隣接するブルッフ膜に典型的に蓄積する。続いて、ドルーゼン及び障害された網膜色素上皮細胞が、黄斑における錐体細胞の機能に干渉すると、視力喪失が起こり得る。非滲出性のAMDは、長年にわたり漸進的な視力喪失を生じる。非滲出性のAMDは、滲出性のAMDをもたらす得る。滲出性のAMDは、ウェット型

又は血管新生黄斑症としても知られ、急速に進行し、中心視力に重度の損傷を引き起こし得る。

[0008] マイクログリアは網膜内に存在するグリア細胞の一つである。近年、マイクログリアの網膜における有害な作用が複数報告されており、新たな標的細胞として注目されている (Silvermanら、Annu. Rev. Vis. Sci., 2018年、第15巻、4号、45～77頁)。正常な網膜ではマイクログリアは内網状層及び外網状層に局在するが、網膜色素変性症においては、外顆粒層に浸潤することが報告されている。浸潤したマイクログリアは活性化した形態をとっており、高い貪食機能を持っている。マイクログリアは一般的に、細胞死を起こした細胞の残骸を貪食し、除去することが知られているが、網膜色素変性症においては、マイクログリアが生きている視細胞も過剰に貪食してしまい、病態の進行を速めることが報告されている (非特許文献1)。また、活性化したマイクログリアはTNF α 等のサイトカインを放出し、それら自体が更なる視細胞の変性を誘導することでも知られている。実際に、網膜色素変性症のモデルマウスであるrd10マウスにおいてマイクログリアの活性を抑制させると、病態進行を遅延できることが報告されている (Pengら、J. Neurosci., 2014年、第34巻、8139～8150頁)。よって、マイクログリアを標的とする新規薬剤探索は網膜色素変性症等の網膜変性疾患の進行を抑制する新たな治療選択肢になる可能性がある。

[0009] CX3CL1 (FKN, フラクタルカイン) は、CX3Cサブファミリーに属する唯一の遺伝子であり、正常な神経において恒常的に発現しているケモカインである。マイクログリアではその唯一の受容体であるCX3CR1が発現している。CX3CL1はN末端からシグナルペプチド、ケモカインドメイン、ムチン様ストロクドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインに分けられる。CX3CL1は膜貫通タンパク質として発現されるが、細胞外切断酵素であるADAM-10やADAM-17、カテプシンSなどにより細胞外領域の根元が切断され、可溶性タンパク質として存在することが知ら

れている。また、CX3CL1／CX3CR1シグナル経路はマイクログリアを非活性化状態に保つ機能を持つことが知られている。

[0010] 網膜色素変性症モデルにおいては、リコンビナントCX3CL1タンパク質を硝子体内投与することにより、マイクログリアの活性抑制及び病態の進行抑制を誘導することが報告されている（非特許文献1）。活性酸素により誘導された網膜変性症モデルにおいても、リコンビナントCX3CL1タンパク質を硝子体内投与することにより、網膜保護作用を誘導することが報告されている（特許文献1）。リコンビナント可溶型CX3CL1タンパク質についても、*in vitro*で網膜細胞保護作用を示すことが報告されている（非特許文献2）。

[0011] そして、AAV8を用いた網膜下投与での遺伝子導入が複数報告されている（例えば、Vandenbergherら、*Sci. Transl. Med.*、2011年、第3巻、88ra54頁、Igarashiら、*Hum. Gene Ther.*、2010年、第21巻、631～7頁、Igarashiら、*Curr. Eye Res.*、2013年、第38巻、569～77頁）。

[0012] 可溶型CX3CL1をコードする核酸を搭載したAAVベクターは、パーキンソン病及びアルツハイマー病をターゲットした報告がされている。具体的には、可溶型CX3CL1をコードする核酸を搭載したAAV9ベクターが、神経細胞脱落を抑制することが報告されている（特許文献2、非特許文献2、3及び4）。また、可溶型CX3CL1をコードする核酸を搭載したAAV4ベクターを脳室内に投与した結果、可溶型CX3CL1の分泌が確認されたことが記載されている（非特許文献5及び6）。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：国際公開第2011／065958号

特許文献2：国際公開第2013／006514号

非特許文献

[0014] 非特許文献1：Z a b e lら、G l i a、2016年、第64巻、1479～1491頁

非特許文献2：R o c h e rら、S c i . R e p . 2017年、第7巻、記事番号43067

非特許文献3：N a s hら、M o l . T h e r . 、2015年、第23巻、17～23頁

非特許文献4：N a s hら、N e u r o b i o l . A g i n g、2013年、第34巻、1540～1548頁

非特許文献5：M o r g a n t iら、J . N e u r o s c i . 、2012年、第32巻、14592～14601頁

非特許文献6：F i n n e r a nら、C e l l T r a n s p l a n t a t i o n、2015年、第24巻、757頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] アデノ随伴ウイルス（A A V）を用いたC X 3 C L 1遺伝子の導入による網膜変性疾患の予防又は治療方法、及び、C X 3 C L 1遺伝子を搭載したA A Vベクターを有効成分として含む、網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物を提供する。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者らは、網膜変性疾患の遺伝子治療について鋭意検討した結果、A A Vベクター、特にA A V 8ベクターを用いたC X 3 C L 1遺伝子の導入が錐体細胞保護作用を示すこと、C X 3 C L 1遺伝子を搭載したA A Vベクター、特にA A V 8ベクターが、網膜変性疾患の予防又は治療剤として使用できることを知見して本発明を完成した。

[0017] 本発明のある態様を以下に示す。

（1）C X 3 C L 1をコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含む、網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物。

(2) 前記C X 3 C L 1 が可溶型C X 3 C L 1 である、(1) に記載の医薬組成物。

(3) 前記可溶型C X 3 C L 1 がヒト可溶型C X 3 C L 1 である、(2) に記載の医薬組成物。

(4) 前記ヒト可溶型C X 3 C L 1 が配列番号4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、(3) に記載の医薬組成物。

(5) 前記A A V ベクターが、A A V 8 ベクターである、(1) 乃至(4) のいずれか1 つに記載の医薬組成物。

(6) 前記A A V ベクターが、配列番号4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むA A V 8 ベクターである、(1) に記載の医薬組成物。

(7) 網膜変性疾患が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーである、(1) 乃至(6) のいずれか1 つに記載の医薬組成物。

(8) 進行期の網膜色素変性症の治療用である(7) に記載の医薬組成物。

(9) 網膜下に投与するための、(1) 乃至(8) のいずれか1 つに記載の医薬組成物。

(10) 硝子体内に投与するための、(1) 乃至(8) のいずれか1 つに記載の医薬組成物。

[0018] 本発明の別の態様を以下に示す。

(a-1) C X 3 C L 1 をコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むアデノ随伴ウイルス(A A V) ベクターの治療有効量を対象に投与することを含む、網膜変性疾患の予防又は治療方法。

(a-2) 前記C X 3 C L 1 が可溶型C X 3 C L 1 である、(a-1) に記載の方法。

(a-3) 前記可溶型C X 3 C L 1 がヒト可溶型C X 3 C L 1 である、(a-2) に記載の方法。

(a-4) 前記ヒト可溶型C X 3 C L 1 が配列番号4 に示されるアミノ酸配

列からなるポリペプチドである、(a-3)に記載の方法。

(a-5) 前記AAVベクターが、AAV8ベクターである、(a-1)乃至(a-4)のいずれか1つに記載の方法。

(a-6) 前記AAVベクターが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むAAV8ベクターである、(a-1)に記載の方法。

(a-7) 網膜変性疾患が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーである、(a-1)乃至(a-6)のいずれか1つに記載の方法。

(a-8) 進行期の網膜色素変性症の治療のための(a-7)に記載の方法。

(a-9) 投与がAAVベクターの網膜下への投与である、(a-1)乃至(a-8)のいずれか1つに記載の方法。

(a-10) 投与がAAVベクターの硝子体内への投与である、(a-1)乃至(a-8)のいずれか1つに記載の方法。

[0019] 本発明の別の態様を以下に示す。

(b-1) 網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物の製造のためのCX3CL1をコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの使用。

(b-2) 前記CX3CL1が可溶性CX3CL1である、(b-1)に記載の使用。

(b-3) 前記可溶性CX3CL1がヒト可溶性CX3CL1である、(b-2)に記載の使用。

(b-4) 前記ヒト可溶性CX3CL1が配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、(b-3)に記載の使用。

(b-5) 前記AAVベクターが、AAV8ベクターである、(b-1)乃至(b-4)のいずれか1つに記載の使用。

(b-6) 前記AAVベクターが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むAAV8ベクターである、(b-1)に記載の使用。

(b-7) 網膜変性疾患が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーである、(b-1)乃至(b-6)のいずれか1つに記載の使用。

(b-8) 進行期の網膜色素変性症の治療用医薬組成物の製造のための(b-7)に記載の使用。

(b-9) 医薬組成物が網膜下に投与するための医薬組成物である、(b-1)乃至(b-8)のいずれか1つに記載の使用。

(b-10) 医薬組成物が硝子体内に投与するための医薬組成物である、(b-1)乃至(b-8)のいずれか1つに記載の使用。

[0020] 本発明の別の態様を以下に示す。

(c-1) 網膜変性疾患の予防又は治療のためのCX3CL1をコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの使用。

(c-2) 前記CX3CL1が可溶性CX3CL1である、(c-1)に記載の使用。

(c-3) 前記可溶性CX3CL1がヒト可溶性CX3CL1である、(c-2)に記載の使用。

(c-4) 前記ヒト可溶性CX3CL1が配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、(c-3)に記載の使用。

(c-5) 前記AAVベクターが、AAV8ベクターである、(c-1)乃至(c-4)のいずれか1つに記載の使用。

(c-6) 前記AAVベクターが配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むAAV8ベクターである、(c-1)に記載の使用。

(c-7) 網膜変性疾患が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーである、(c-1) 乃至 (c-6) のいずれか 1 つに記載の使用。

(c-8) 進行期の網膜色素変性症の治療のための (c-7) に記載の使用。

(c-9) 予防又は治療が AAV ベクターを網膜下に投与することによる、(c-1) 乃至 (c-8) のいずれか 1 つに記載の使用。

(c-10) 予防又は治療が AAV ベクターを硝子体内に投与することによる、(c-1) 乃至 (c-8) のいずれか 1 つに記載の使用。

[0021] 本発明の別の態様を以下に示す。

(d-1) CX3CL1 をコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むアデノ随伴ウイルス (AAV) 8 ベクター。

(d-2) 前記 CX3CL1 が可溶性 CX3CL1 である、(d-1) に記載の AAV 8 ベクター。

(d-3) 前記可溶性 CX3CL1 がヒト可溶性 CX3CL1 である、(d-2) に記載の AAV 8 ベクター。

(d-4) 前記ヒト可溶性 CX3CL1 が配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、(d-3) に記載の AAV 8 ベクター。

(d-5) AAV 8 ベクターが、自己相補型 AAV 8 ベクターである、(d-1) 乃至 (d-4) のいずれか 1 つに記載の AAV 8 ベクター。

(d-6) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む、(d-1) に記載の AAV 8 ベクター。

(d-7) 前記 AAV 8 ベクターが、自己相補型 AAV 8 ベクターである、(d-6) に記載の AAV 8 ベクター。

(d-8) (d-1) 乃至 (d-7) のいずれか 1 つに記載の AAV 8 ベクター、及び一以上の賦形剤を含有する医薬組成物。

(d-9) 網膜変性疾患の予防又は治療用である (d-8) に記載の医薬組

成物。

(d-10) 網膜変性疾患が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーである、(d-9) に記載の医薬組成物。

(d-11) 進行期の網膜色素変性症の治療用である(d-10) に記載の医薬組成物。

(d-12) 網膜下に投与するための、(d-8) 乃至(d-11) のいずれか1つに記載の医薬組成物。

(d-13) 硝子体内に投与するための、(d-8) 乃至(d-11) のいずれか1つに記載の医薬組成物。

(d-14) (d-1) 乃至(d-7) のいずれか1つに記載のAAV8ベクターを用いて、CX3CL1をコードする核酸分子を視細胞及び／又は網膜色素上皮細胞に導入することを含む、網膜変性疾患の予防又は治療方法。

(d-15) 網膜変性疾患が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーである、(d-14) に記載の方法。

(d-16) 進行期の網膜色素変性症の治療のための(d-15) に記載の方法。

発明の効果

[0022] CX3CL1 遺伝子を搭載したAAVベクターは、網膜変性疾患の予防及び／又は治療剤として使用できる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1] 図1は、マウス可溶型Cx3cl1 遺伝子を搭載したAAVベクタープラスミドであるpscAAV-MCS-マウス可溶型Cx3cl1のベクターマップを示す。

[図2] 図2は、ヒト可溶型CX3CL1 遺伝子を搭載したAAVベクタープラスミドであるpscAAV-MCS-ヒト可溶型CX3CL1のベクターマップを示す。

[図3]図3は、マウス可溶型C x 3 c l 1 遺伝子を搭載したA A V 8ベクター（r A A V 8－マウス可溶型C x 3 c l 1）のr d 1 0マウスへの各種用量での投与による、網膜組織におけるマウス可溶型C x 3 c l 1の発現を示す。縦軸は対照ビヒクル（V e h i c l e）投与群の網膜組織におけるC x 3 c l 1の遺伝子発現の平均を1とした時の相対的な発現値を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図4]図4は、r A A V 8－マウス可溶型C x 3 c l 1のr d 1 0マウスへの投与による、網膜組織におけるマウス可溶型C x 3 c l 1の経時的遺伝子発現変化を示す。図中の丸印、四角印、及び三角印は、それぞれの投与群を示す。縦軸は各評価日における対照ビヒクル（V e h i c l e）投与群の網膜におけるC x 3 c l 1の遺伝子発現の平均を1とした時の相対的な発現値を表す。横軸は薬剤投与後の日数を表す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図5]図5は、r A A V 8－マウス可溶型C x 3 c l 1のr d 1 0マウスへの投与による、硝子体におけるマウス可溶型C X 3 C L 1タンパク質量を示す。縦軸は硝子体におけるC X 3 C L 1のタンパク質の濃度を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図6]図6は、r A A V 8－マウス可溶型C x 3 c l 1のr d 1 0マウスへの投与による、血漿におけるマウス型C X 3 C L 1タンパク質量を示す。縦軸は血漿におけるC X 3 C L 1のタンパク質の濃度を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図7]図7は、ヒト可溶型C X 3 C L 1 遺伝子を搭載したA A V 8ベクター（r A A V 8－ヒト可溶型C X 3 C L 1）のr d 1 0マウスへの投与による、網膜組織におけるヒト可溶型C X 3 C L 1タンパク質の発現を示す。縦軸は網膜組織におけるC X 3 C L 1のタンパク質量を組織重量で補正した値を表

す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図8]図8は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、RPE／脈絡膜／強膜組織におけるヒト可溶性CX3CL1タンパク質の発現を示す。縦軸はRPE／脈絡膜／強膜組織におけるCX3CL1のタンパク質量を組織重量で補正した値を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図9]図9は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、硝子体におけるヒト可溶性CX3CL1タンパク質量を示す。縦軸は硝子体におけるCX3CL1のタンパク質の濃度を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図10]図10は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、血漿におけるヒト可溶性CX3CL1タンパク質量を示す。縦軸は血漿におけるCX3CL1のタンパク質の濃度を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図11]図11は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、網膜組織におけるヒト可溶性CX3CL1タンパク質の経時的発現変化を示す。図中の丸印、及び四角印は、それぞれの投与群を示す。縦軸は網膜組織におけるCX3CL1のタンパク質量を組織重量で補正した値を表す。横軸は投与後の日数を示す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図12]図12は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、RPE／脈絡膜／強膜組織におけるヒト可溶性CX3CL1タンパク質の経時的発現変化を示す。図中の丸印、及び四角印は、それぞれの投与群を示す。縦軸はRPE／脈絡膜／強膜組織におけるCX3CL1のタンパク質量を組織重量で補正した値を表す。横軸は投与後の日数を示す。

グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図13]図13は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、血漿におけるヒト可溶性CX3CL1タンパク質量の経時的変化を示す。縦軸は血漿におけるCX3CL1のタンパク質の濃度を表す。横軸は投与後の日数を示す。グラフ内の棒はそれぞれの群における平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図14]図14は、rAAV8-マウス可溶性Cx3cl1のrd10マウスへの投与による、視覚運動反応保護作用を示す。縦軸は視覚運動反応に基づくマウスが認識できる空間周波数の限界(c/d)を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれ平均値±平均値の標準誤差を示す。

[図15]図15は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、視覚運動反応保護作用を示す。縦軸は視覚運動反応に基づくマウスが認識できる空間周波数の限界(c/d)を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれ平均値±平均値の標準誤差を示す。*P<0.05、ダネット多重比較検定。

[図16]図16は、rAAV8-マウス可溶性Cx3cl1のrd10マウスへの投与による、錐体細胞保護作用を示す。縦軸は観察エリアにおける抗錐体オプシン抗体陽性である細胞(外節)数(錐体オプシン数)の平均を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれ平均値±平均値の標準誤差を示す。**P<0.01、ダネット多重比較検定。

[図17]図17は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、錐体細胞保護作用を示す。縦軸は観察エリアにおける抗錐体オプシン抗体陽性である細胞(外節)数(錐体オプシン数)の平均を表す。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれ平均値±平均値の標準誤差を示す。*P<0.05、**P<0.01、ダネット多重比較検定。

[図18]図18は、rAAV8-マウス可溶性Cx3cl1のrd10マウスへの投与による、錐体細胞保護作用を示す。縦軸は観察エリアにおける抗錐体オプシン抗体陽性である細胞(外節)数(錐体オプシン数)の平均を表す。

。横軸は投与群を表す。グラフ内の棒はそれぞれ平均値±平均値の標準誤差を示す。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、ダネット多重比較検定。

[図19]図19は、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1のrd10マウスへの投与による、錐体細胞保護作用を示す。縦軸は観察エリアにおける抗錐体オプシン抗体陽性である細胞（外節）数（錐体オプシン数）の平均を表す。横軸は投与群、及び、組織採材時のマウスの日齢を表す。尚、投与日（生後29日齢）に未投与で採材したrd10マウスの網膜をNaiveとして表す。グラフ内の棒はそれぞれ平均値±平均値の標準誤差を示す。 $**P<0.01$ 、ダネット多重比較検定。

発明を実施するための形態

[0024] 以下、本発明について詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本明細書中で使用される用語が具体的に定義されていない場合、当該用語は、当業者に一般的に受け入れられている意味で使用される。

[0025] 本発明は、CX3CL1をコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（以下、「本発明のAAVベクター」とも称する）、並びに、本発明のAAVベクターを含む、網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物（以下、「本発明の医薬組成物」とも称する）を提供する。

[0026] <本発明のAAVベクター>

1. CX3CL1をコードする核酸分子

本発明のAAVベクターは、CX3CL1をコードする核酸分子を含む。CX3CL1は、正常な神経において恒常的に発現しているケモカインであり、N末端からシグナルペプチド、ケモカインドメイン、ムチン様ストロクドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインから構成される。天然において、CX3CL1は膜貫通タンパク質として発現されるが、細胞外切断酵素で切断され、可溶性CX3CL1としても存在できる。

[0027] 本発明において、CX3CL1には、天然に存在するCX3CL1及びその機能を有する改変体が含まれる。ある態様では、CX3CL1は、哺乳動

物由来のCX3CL1であり、ある態様では、ヒトCX3CL1である。本発明において、ヒトCX3CL1には、天然に存在するヒトCX3CL1及びその機能を有する改変体が含まれる。

[0028] 本発明において、CX3CL1には、全長型（膜貫通型）CX3CL1及び可溶型CX3CL1が含まれる。ある態様では、CX3CL1は、可溶型CX3CL1である。本発明において、「可溶型CX3CL1」とは、ケモカインドメイン及びムチン様ストロクドメインを含み、かつ、膜貫通ドメインと細胞内ドメインを含まないCX3CL1ポリペプチドをいう。可溶型CX3CL1には、天然に存在する可溶型CX3CL1及びその機能を有する改変体が含まれる。ある態様では、CX3CL1は、ヒト可溶型CX3CL1である。本発明において、ヒト可溶型CX3CL1には、天然に存在するヒト可溶型CX3CL1及びその機能を有する改変体が含まれる。

[0029] ある態様では、ヒト可溶型CX3CL1は、アクセッション番号NM_002996.6のコーディング領域（配列番号1）を翻訳した配列（配列番号2）のアミノ酸番号1から338までのアミノ酸配列（配列番号4）からなるポリペプチドである。別の態様では、ヒト可溶型CX3CL1は、配列番号4に示されるアミノ酸配列において1～数個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～7個、さらに好ましくは1～5個、1～3個、又は1～2個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒト可溶型CX3CL1の機能を有するポリペプチドである。別の態様では、ヒト可溶型CX3CL1は、配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒト可溶型CX3CL1の機能を有するポリペプチドである。

[0030] ある態様では、CX3CL1は、マウスCX3CL1であり、ある態様では、マウス可溶型CX3CL1である。ある態様では、マウス可溶型CX3CL1は、アクセッション番号NM_009142.3のコーディング領域（配列番号5）を翻訳した配列（配列番号6）のアミノ酸番号1から336

までのアミノ酸配列（配列番号8）からなるポリペプチドである。

[0031] 本明細書において、「同一性」とは、EMBOSS NEEDLE program (Needlemanら、J. Mol. Biol.、1970年、第48巻、443～453頁) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値 Identityを意味する。前記のパラメータは以下の通りである。

Gap Open penalty=10

Gap Extend penalty=0.5

Matrix=EBLOSUM62

[0032] 本発明において、CX3CL1又は可溶型CX3CL1の機能として、CX3CR1に結合する能力が挙げられる。また、CX3CL1又は可溶型CX3CL1の機能として、マイクログリアの活性を抑制する能力が挙げられる。このようなCX3CL1の機能は、公知の方法を用いて当業者に容易に評価され得る。

[0033] ある態様では、CX3CL1をコードする核酸分子は、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子であり、ある態様では、配列番号3に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドからなる核酸分子である。

[0034] CX3CL1をコードする「核酸分子」には、DNA分子（例えば、cDNA又はゲノムDNA）及びRNA分子（例えば、mRNA）並びにヌクレオチドアナログを使用して生成されるDNA又はRNAのアナログが含まれる。当該核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、ある態様としては、一本鎖DNAである。

[0035] CX3CL1をコードする核酸分子は、公的に利用可能な配列情報に基づき、当該分野で公知の標準的なポリヌクレオチド合成法を使用して合成することができる。また、CX3CL1をコードする核酸分子を一旦取得すれば、部位特異的変異誘発法 (Current Protocols in Molecular Biology edition、1987、John

Wiley & Sons Section 8.1-8.5)等の当業者に公知の方法を使用して、所定の部位に変異を導入することによって、CX3CL1の機能を有する改変体を作製することも可能である。

[0036] 2. AAVベクター

本発明では、CX3CL1をコードする核酸分子を搭載するベクターとしてアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを使用する。AAVは、AAVの宿主細胞への感染や複製に必要な機能をコードする遺伝子(Rep遺伝子及びCap遺伝子)及び末端逆位反復配列(Inverted terminal repeats: ITR)を含む一本鎖DNA分子からなるゲノム(AAVゲノム)を有するエンベロープを持たない正十二面体ウイルスである。AAVは、非病原性であり、非分裂期の細胞へも感染できることが知られている。AAVには100を超える血清型が存在しており、血清型の違いによって宿主域やウイルスの持つ特徴が異なることが知られている。AAVベクターは、キャプシド、及びそれに封入された、1つ以上のITRが隣接した異種核酸分子配列を含むゲノム(AAVベクターゲノム)を含む。

[0037] 本発明で使用されるAAVベクターは、例えば、米国特許第7,056,502号及びYanら、J. Virol., 2002年、76巻、2043~2053頁に記載されているAAVベクターであり、具体的には、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター等である。ある態様では、本発明で使用されるAAVベクターは、AAV8ベクターである(例えば、国際公開第2003/052051号)。本発明で使用されるAAVベクターは、キャプシドのアミノ酸配列を改変した改変AAVベクターであってもよい。ある態様では、本発明で使用されるAAVベクターは、改変AAV8ベクターである。本発明で使用されるAAVベクターに含まれるITRは、野生型の配列であってもよく、或いは、ITRの機能を有する改変体又は後述の自己相補型ベクターで使用される変異を含むITR(変異ITR)であってもよい。ある態様では、本発明で使用されるITRは、AAV

1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV8、AAV9等に由来のITR又はその変異ITRである。ある態様では、本発明で使用されるITRは、AAV2由来のITR又はその変異ITRである。

[0038] ある態様では、本発明で使用されるAAVベクターは、自己相補型AAV (Self complementary (sc)) AAV) ベクターである。ある態様では、本発明で使用されるAAVベクターは、自己相補型AAV8ベクターである。自己相補型AAVベクターは、自己相補性のAAVベクターゲノムを有するAAVベクターである（例えば、国際公開第2001/092551号、国際公開第2001/011034号）。通常のAAVベクターでは、ベクターゲノムが一本鎖DNAであるために宿主細胞への感染後に一本鎖ゲノムから二本鎖ゲノムを形成するためには時間がかかる。一方、自己相補型AAVベクターでは、連結された異種核酸分子配列とその相補配列を有するベクターゲノム（自己相補性ベクターゲノム）を含み、宿主細胞内で速やかに二本鎖ゲノムを形成する。ある態様では、自己相補型AAVベクターは、変異ITRによって連結された異種核酸分子配列とその相補配列を含み、さらに両端に2つのITRを有する。ある態様では、変異ITRはDシーケンス（パッケージングシグナル）が欠損し、 Δtrs （末端切断領域（terminal resolution site）の変異）が含まれる構造を有する。当該構造はRepを介したニッキングを防ぎ、自己相補性ベクターゲノムのパッケージングを誘導することができる。

[0039] 3. プロモーター

本発明のAAVベクターは、CX3CL1をコードする核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。「作動可能に連結された」とは、目的の核酸分子にコードされたタンパク質が宿主細胞において発現可能なように1以上のプロモーターが目的の核酸分子に連結されていることを意味する。本発明において使用されるプロモーターとしては、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）由来プロモーター、並びに当業者に公知の他のウイルス及び真核細胞プロモーターが挙げられるがこれらに限定されな

い。ある態様として、本発明において使用されるプロモーターは、CMV由来プロモーターである。ある態様として、本発明において使用されるプロモーターは、組織特異的プロモーターである。組織特異的プロモーターの例としては、網膜色素上皮細胞特異的プロモーター、視細胞特異的プロモーター、杆体細胞特異的プロモーター、及び錐体細胞特異的プロモーターが挙げられる。より具体的な例としては、Nr1、Crx、Rax (Matsuda 及び Cepko、2007年、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、104巻、1027～1032頁)、オプシンプロモーター、光受容体間レチノイド結合タンパク質プロモーター (IRBP156)、ロドプシンキナーゼ (RK) プロモーター、神経ロイシンジッパー (NRL) プロモーター (例えば、Semple-Rowlandら、Mol. Vis.、2010年、16巻、916～934頁を参照) が挙げられる。別の態様としては、錐体アレスチンプロモーター、Cabp5プロモーター、Crabpプロモーター、Ndr4プロモーター、ベストロフィン1プロモーター、チキンベータアクチン (CBAプロモーター)、クラスタリンプロモーター、Hes1プロモーター、ビメンチンプロモーター、表面抗原分類 (CD44) プロモーター及びグリア線維酸性タンパク質 (GFAP) プロモーターが挙げられる。

[0040] 本発明のAAVベクターは、プロモーターの他にも、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル (poly (A))、コザック配列等 (例えば、Goeddel、Gene Expression Technology、Methods in Enzymology、1990年、185巻、Academic Press、San Diego、Calif.) の発現調節配列を含んでもよい。

[0041] ある態様では、本発明のAAVベクターは、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたCMV由来プロモーターを含む、AAV8ベクターである。ある態様では、本発明のAAVベクターは、配列番号4に示されるアミノ酸

配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたCMV由来プロモーターを含む、自己相補型AAV8ベクターである。

[0042] <本発明のAAVベクターを製造する方法>

本発明のAAVベクターは、当該分野で公知の方法を使用して製造することができる。製造方法の一例としては、第一に、野生型AAVゲノムから、両端のITRを残して、Rep遺伝子及びCap遺伝子の代わりに、異種核酸分子（例えば、CX3CL1をコードする核酸分子）配列を挿入したAAVベクタープラスミドを作製する。また、AAVヘルパー機能を補完するAAVのRep遺伝子及びCap遺伝子を含むプラスミド、及び、AAVの複製を促進するヘルパーウイルス付属遺伝子（例えば、領域VA、E2A、E4）を含むプラスミドを準備する。これらの3つのプラスミドをパッケージング細胞にコトランスフェクトすることで該細胞内に組換えAAV（即ち、AAVベクター）が産生される。その後、パッケージング細胞を培養して、AAVベクターを生成し、当該分野において公知の標準的技術を使用して、AAVベクターを精製する。使用されるパッケージング細胞の例としては、哺乳動物細胞、具体的には、A549細胞、HeLa細胞、HEK293細胞、HEK293T17細胞が挙げられる。精製方法としては、塩化セシウム密度勾配遠心分離法、ベンゾナーゼを用いたDNA及びRNAの消化、ショ糖勾配遠心分離法、イオジキサノール（Iodixanol）密度勾配遠心分離法、限外ろ過法、ダイアフィルトレーション法、アフィニティークロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、ポリエチレングリコール沈殿法や硫酸アンモニウム沈殿法などを用いることができる。

[0043] 本発明のAAVベクターの製造方法として、別の態様では、AAVベクターゲノムは、バキュロウイルスとしてパッケージングされ、昆虫細胞、例えば、Sf9細胞に導入されてもよい。この際、Rep及びCap遺伝子も別のバキュロウイルスによって同様に昆虫細胞に導入される。バキュロウイルスは、AAVベクターの効率的な産生のために必要な遺伝子を含んでいても

よい。次に、2種のバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞を培養してAAVベクターを生成し、当該分野で公知の方法を使用してAAVベクターを精製し、製剤化することができる（例えば、米国特許第5436146号、同第5753500号、同第6093570号、及び同第6548286号、US2002/0168342）。

[0044] <本発明の医薬組成物>

本発明の医薬組成物は、本発明のAAVベクターを含む、網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物である。網膜変性疾患とは、網膜組織を構成する細胞に障害が発生することにより、視機能に異常をきたす疾患の総称であり、杆体細胞の変性を伴う網膜疾患及び錐体細胞の変性を伴う網膜疾患を含む。ある態様では、網膜変性疾患は、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーである。ある態様では、網膜変性疾患は、網膜色素変性症である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、進行期の網膜色素変性症の治療用医薬組成物である。本明細書において「進行期の網膜色素変性症」とは、杆体細胞機能の消失が認められる時期以降の網膜色素変性症、光干渉断層撮影において外顆粒層の菲薄化を認める網膜色素変性症、矯正視力がlogMAR視力において20/80から20/400であることを認める網膜色素変性症、又は夜盲を認める網膜色素変性症をいう。杆体細胞機能の消失は暗順応網膜電図における振幅の消失を認めることで判断できる。また、中心視野が20度以下に狭まることから判断できる。

[0045] 本発明の医薬組成物は、当該分野において通常用いられている賦形剤、すなわち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製することができる。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のAAVベクター、及び一以上の賦形剤を含有する。これらの医薬組成物の剤型としては、例えば、注射用医薬組成物、及びその他の非経口用医薬組成物が挙げられ、眼内投与、網膜下投与、硝子体内投与、脈絡膜上投与等により投与することができる。ある態様では、本発明の医薬組成物は、網膜下又は

硝子体内に投与される。本発明のAAVベクターの製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、又は添加剤等を使用することができる。本発明の医薬組成物は、さらに、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝剤、アジュバント又は免疫賦活薬等、少量の補助的物質を含有することができる。

[0046] <本発明の予防又は治療方法>

本発明はまた、本発明のAAVベクターの治療有効量を対象に投与することを含む、網膜変性疾患の予防又は治療方法（以下、「本発明の予防又は治療方法」ともいう）を提供する。ある態様では、本発明の予防又は治療方法は、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーの予防又は治療方法である。ある態様では、本発明の予防又は治療方法は、網膜色素変性症の予防又は治療方法である。ある態様では、本発明の予防又は治療方法は、進行期の網膜色素変性症を治療する方法である。

[0047] 本発明の予防又は治療方法において、「対象」とは、その予防又は治療を必要とするヒト又はその他の動物であり、ある態様では、その予防又は治療を必要とするヒトである。対象への「投与」には、眼内投与、硝子体内投与、網膜下投与、脈絡膜上投与等が含まれる。投与方法としては、注射（例えば、硝子体内又は網膜下又は脈絡膜上注射）、遺伝子銃、ゲル、エレクトロポレーション、脂質に基づくトランスフェクション試薬の使用、薬物送達デバイスの埋め込み、又は他のいずれかの適したトランスフェクション方法が挙げられる。

[0048] ある態様において、本発明のAAVベクターは、硝子体内に投与される。硝子体内投与において、本発明のAAVベクターは、懸濁液又は溶液等の剤型で送達され得る。硝子体内投与に際しては、例えば、最初に、眼の表面に局所麻酔剤を適用し、その後局所消毒溶液を適用する。器具を使用するか、又は使用せずに眼を開いたまま維持し、直接観察下、細く短い（例えば、30ゲージの）針によって、強膜を通して対象の眼の硝子体腔内にベクターを

注射する。硝子体内投与は他の眼内投与方法に比べて、比較的侵襲性が低いことが特徴である。

[0049] ある態様において、本発明のAAVベクターは、網膜下に投与される。網膜下に投与されたAAVベクターは、一般的に、視細胞や網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelium: RPE) 等の細胞に導入されることが知られている (Alloccaら、J. Virology、2007年、81巻、11372～11380頁)。網膜下投与において、本発明のAAVベクターは、懸濁液や溶液等の剤型で、直接観察下、手術用顕微鏡を使用して網膜下注射される。網膜下投与のある態様としては、硝子体切開後、微細なカニューレを使用して、1つ以上の小さな網膜切開を通して網膜下の空間に注射することが挙げられる。

[0050] ある態様において、本発明のAAVベクターは、脈絡膜上投与 (suprachoroidal injection) される。脈絡膜上投与において、ベクターは、懸濁液又は溶液の剤型で投与される。最初に、眼の表面に局所麻酔剤を適用し、その後、局所消毒溶液を適用する。脈絡膜上投与に際しては、器具を使用するか、又は使用せずに、眼を開いたまま維持し、直接観察下、細く短い (例えば、30ゲージの) 針によって、対象の眼の脈絡膜上にAAVベクターを注射する。

[0051] ある態様において、本発明の予防又は治療方法は、本発明のAAVベクターを用いて本発明の核酸分子を視細胞及び／又は網膜色素上皮細胞に導入することを含む。

[0052] 本発明のAAVベクターの治療有効量は、疾患の重症度、以前の処置、対象の一般的な健康状態、年齢、投与方法、他の疾患等を考慮して適宜最適化され得る。ある態様では、本発明のAAVベクターの治療有効量は、約0.001～30mg/kg体重、ある態様では約0.01～25mg/kg体重、別の態様では約0.1～20mg/kg体重、別の態様では約1～10mg/kg、2～9mg/kg、3～8mg/kg、4～7mg/kg又は5～6mg/kg体重である。本発明のAAVベクターの治療有効量は1眼

あたりに投与するベクターゲノムの量 (vg/eye) でも表すことができる。 vg は、ゲノムコピー (GC) とも表記できる。ある態様では、本発明の AAV ベクターの治療有効量は、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12} \text{vg}/\text{eye}$ であり、別の態様では、約 $1 \times 10^7 \sim 4 \times 10^{10} \text{vg}/\text{eye}$ である。本発明の AAV ベクターの治療有効量の投与には、単回投与、複数回投与、漸減投与、漸増投与が含まれる。ある態様では、本発明の AAV ベクターは、1 日に少なくとも 1、2、3、又は 4 回投与することができる。予防又は治療のための投与期間は、少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 又は 24 週間の期間に及び得る。

[0053] 本発明の AAV ベクターは、それが有効性を示すと考えられる疾患の種々の治療剤又は予防剤と併用することができる。当該併用は、同時投与、或いは別個に連続して、若しくは所望の時間間隔をおいて投与してもよい。同時投与製剤は、配合剤であっても別個に製剤化されていてもよい。

[0054] 本発明はまた、網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物の製造のための本発明の AAV ベクターの使用を提供する。本発明はまた、網膜変性疾患の予防又は治療のための本発明の AAV ベクターの使用を提供する。

[0055] 本発明についてさらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提供するが、これらは例示目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0056] 実施例 1 コンストラクトの作製：クローニング、プラスミド作製、rAAV8-マウス可溶型Cx3cl1作製

マウス可溶型Cx3cl1の核酸分子配列を搭載したAAVベクタープラスミドを、pscAAV-MCSプラスミド (Cell Bios社、カタログ番号VPK-430) にマウス可溶型Cx3cl1核酸分子配列 (配列番号7) をBamHI (5'側) とXbaI (3'側) 制限酵素を使用し挿入して、作製した。得られたプラスミドをpscAAV-MCS-マウ

ス可溶型C x 3 c l 1 と称する。マウス可溶型C x 3 c l 1 遺伝子はCMV 由来プロモーターの下流、かつ、SV40 poly (A) の上流に位置しており、開始コドンの前にコザック配列(GCCACC)が存在する。また、マウス可溶型C x 3 c l 1 遺伝子の下流に終止コドン配置し、マウス全長C X 3 C L 1 アミノ酸配列（配列番号6）の内のアミノ酸番号1から336までのアミノ酸配列（配列番号8）を有するマウス可溶型C X 3 C L 1 が発現されるようにデザインした。ITRを含むITR間の長さは1969 b. p. であり、AAVベクターにパッケージできるサイズである。p s c AAV-MCS-マウス可溶型C x 3 c l 1 のベクターマップを図1に示す。このプラスミドをSt b l 3大腸菌株（Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号C737303）を用いて増幅した。その他、組換えAAV（rAAV）作製に必要なプラスミドpHelper（AAV pro Helper Free System（AAV2）、タカラバイオ社、カタログ番号6230）及びpRCAAV8をDH5α大腸菌株（タカラバイオ社、カタログ番号9057）を用いて増幅した。pRCAAV8は、pRC5（AAV pro Packaging Plasmid（AAV5）、タカラバイオ社、カタログ番号6664）のCap配列部分をAAV8のCap配列（アクセッション番号NC_006261.1の2121 b. p.-4337 b. p.）に変換したプラスミドである。1平方センチメートルあたり2500細胞の密度でHEK293T17細胞株を播種し、4日後にp s c AAV-MCS-マウス可溶型C x 3 c l 1、pHelper、及びpRCAAV8をポリエチレンジイミン（Polyethyleneimine ‘Max’、Polysciences社、カタログ番号24765-1）を用いて、添付のプロトコールに従い、一過性にトランスフェクションし、37℃及び5%CO₂条件下で3日間及び6日間培養した細胞培養上清を回収した。培養上清中に含まれるrAAV8をmPES MiniKros Sampler 300kDa（Spectrum Labs社、カタログ番号 S-02-E300-05-N）を用いてタンジェンシャル

フロー・フィルトレーション (T a n g e n t i a l F l o w F i l t r a t i o n) で濃縮した。濃縮されたサンプルを0.22 μ mフィルターにかけ、AKTA explorer 100 (GE Healthcare社)を用いたアフィニティーカラムPOROS (登録商標) Capture Select (登録商標) AAV8 Affinity Resin (Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号A30790)で精製した。精製したサンプルを塩化セシウムの濃度勾配を利用した超遠心にかけた。この超遠心では垂直ローター (VTi50 (ベックマン・コールター社、カタログ番号362758))を使用した。超遠心したサンプルにおいて、280nm及び260nmの吸光測定値が高いフラクションを回収した。回収したサンプルをりん酸緩衝生理食塩水を用いて3回透析したものを、作製されたマウス可溶性CX3CL1遺伝子を搭載したAAV8ベクター (rAAV8-マウス可溶性CX3CL1と称する)のストックとした。ウイルスタイトー測定はQuickTiter AAV Quantitation kit (Cell Biolabs社、カタログ番号VPK-145)を用いて実施した。

[0057] 実施例2 コンストラクトの作製：クローニング、プラスミド作製、rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1作製

ヒト可溶性CX3CL1の核酸分子配列を搭載したAAVベクタープラスミドを、pscAAV-MCSプラスミド (Cell Biolabs社、カタログ番号VPK-430)にヒト可溶性CX3CL1核酸分子配列 (配列番号3)をBamHI (5'側)とXbaI (3'側)制限酵素を使用し挿入して、作製した。得られたプラスミドをpscAAV-MCS-ヒト可溶性CX3CL1と称する。ヒト可溶性CX3CL1遺伝子はCMV由来プロモーターの下流、かつ、SV40 poly (A)の上流に位置しており、開始コドンの前にコザック配列 (GCCACC)が存在する。また、ヒト可溶性CX3CL1遺伝子の下流に終止コドンを配置し、ヒト全長CX3CL1配列 (配列番号2)の内のアミノ酸番号1から338までのアミノ酸配列

(配列番号4)を有するヒト可溶型CX3CL1が発現されるようにデザインした。LTRを含むLTR間の長さは1975bpであり、AAVベクターにパッケージできるサイズである。pscAAV-MCS-ヒト可溶型CX3CL1のベクターマップを図2に示す。このプラスミドをStbl3大腸菌株を用いて増幅した。この他、rAAV作製に必要なプラスミドpHelper及びpRCAAV8をDH5 α 大腸菌株を用いて増幅した。1平方センチメートルあたり2500細胞の密度でHEK293T細胞株を播種し、5日後にpscAAV-MCS-ヒト可溶型CX3CL1、pHelper、及びpRCAAV8をポリエチレンジイミン(Polyethylenimine ‘Max’、Polysciences社、カタログ番号24765-1)を用いて、添付のプロトコールに従い、一過性にトランスフェクションし、37℃及び5%CO₂条件下で4日間培養した細胞の培養上清を回収した。培養上清中に含まれるrAAV8をmPES Minikross Sampler 300kDa(Spectrum社、カタログ番号S-02-E300-05-N)を用いてTangential Flow Filtrationで濃縮した。濃縮されたサンプルを0.22 μ Mフィルターにかけ、実施例1と同様に、AKTAexplorer100(GE Healthcare)を用いたアフィニティーカラムで精製した。精製したサンプルを塩化セシウムの濃度勾配を利用した超遠心にかけて。この超遠心では垂直ローター(VTi50)を使用した。超遠心したサンプルにおいて、280nm及び260nmの吸光測定値が高いフラクションを回収した。回収したサンプルをりん酸緩衝生理食塩水を用いて3回透析したものを、作製されたヒト可溶型CX3CL1遺伝子を搭載したAAV8ベクター(rAAV8-ヒト可溶型CX3CL1と称する)のストックとした。ウイルスタイター測定はQuickTiter AAV Quantitation kit(Cell Biolabs社、カタログ番号VPK-145)を用いて実施した。

[0058] 実施例3 ウイルス感染プロトコル

生後1日齢にrAAV8-マウス可溶性Cx3cl1又はrAAV8-ヒト可溶性CX3CL1を投与するプロトコルはXiongらの方法(J. Clin. Invest. 2015年、125巻、1433~1445頁)に従ったものである。実施例1で作製したrAAV8-マウス可溶性Cx3cl1又は実施例2で作製したrAAV8-ヒト可溶性CX3CL1を網膜色素変性症のモデルマウスであるrd10マウスに投与した。生後1日齢のマウスを氷上麻酔させ、眼球を露出し、ガラスシリンジで網膜下に投与を行った。rAAV8-マウス可溶性Cx3cl1に関しては、最終濃度が $2.2 \times 10^{10} \text{ vg/mL}$ 、 $2.2 \times 10^{11} \text{ vg/mL}$ 又は $2.2 \times 10^{12} \text{ vg/mL}$ になるようにビヒクル(りん酸緩衝生理食塩水に0.25%のFast Green FCF(ナカライテスク社、カタログ番号15939-54)及び0.001%のプルロニック F-68(Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号24040032)を添加した溶液)で調製し、1眼あたり 6.5×10^6 ($6.5 \text{ e } 6$) $\text{vg}/0.3 \mu\text{L}$ 、 6.5×10^7 ($6.5 \text{ e } 7$) $\text{vg}/0.3 \mu\text{L}$ 又は 6.5×10^8 ($6.5 \text{ e } 8$) $\text{vg}/0.3 \mu\text{L}$ で投与した。rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1に関しては、最終濃度が $2 \times 10^{10} \text{ vg/mL}$ 、 $6 \times 10^{10} \text{ vg/mL}$ 、 $2 \times 10^{11} \text{ vg/mL}$ 、 $6 \times 10^{11} \text{ vg/mL}$ 又は $2 \times 10^{12} \text{ vg/mL}$ になるようにビヒクルで調製し、1眼あたり 6×10^6 ($6 \text{ e } 6$) $\text{vg}/0.3 \mu\text{L}$ 、 1.8×10^7 (図中では小数点以下を四捨五入し $2 \text{ e } 7$ として示す) $\text{vg}/0.3 \mu\text{L}$ 、 6×10^7 ($6 \text{ e } 7$) $\text{vg}/0.3 \mu\text{L}$ 、 1.8×10^8 (図中では小数点以下を四捨五入し $2 \text{ e } 8$ として示す) $\text{vg}/0.3 \mu\text{L}$ 又は 6×10^8 ($6 \text{ e } 8$) $\text{vg}/0.3 \mu\text{L}$ で投与した。投与したマウスは体温を戻し覚醒させ、親マウスと共に飼育し、生後28日齢~生後35日齢で離乳後、生後50日齢~生後51日齢まで生存させた。

rd10マウスでは網膜色素変性症患者同様、杆体細胞の細胞死(生後20日齢~生後28日齢)が発生した後に錐体細胞の細胞死が起こる(Garginiら、J. Comp. Neurol.、2007年、500巻、

222～238頁)。また、杆体細胞の保護は間接的に錐体細胞の保護に繋がることも知られている(L e v e i l l a r d ら、C. R. B i o l .、2014年、337巻、207～213頁)。rd10マウスにおける網膜保護効果を検証する場合は、杆体細胞変性前又はそれと同時に薬剤を投与する方法が一般的である(非特許文献1)。しかし、その場合は薬剤の錐体細胞直接的な保護効果が検証できないため、杆体細胞非依存的に錐体細胞保護効果が期待できるかを、生後28日齢～生後29日齢のrd10マウスに薬剤を投与し検証した。その際の投与方法は次の通りである。rd10マウスにミドリン(登録商標)P点眼液(参天製薬社)を点眼し、散瞳させ、ケタミン・キシラジン混合麻酔液を筋肉内注射し麻酔した。麻酔後にヒアレイン(登録商標)点眼液0.3%(参天製薬社)を点眼し、角膜を保護した。耳側の強膜に30ゲージの針で穴をあけ、投与液を1 μ L充填したハミルトンシリンジの針を通し、硝子体を通り、鼻側の網膜に挿して網膜下投与した。rAAV8-マウス可溶型Cx3cl1に関しては、最終濃度が 2×10^{11} vg/mL又は 2×10^{12} vg/mLになるようにビヒクルで調製し、1眼あたり 2×10^8 (2e8)vg/1 μ L又は 2×10^9 (2e9)vg/1 μ Lで投与した。rAAV8-ヒト可溶型CX3CL1に関しては、最終濃度が 2×10^9 vg/mL、 2×10^{10} vg/mL、 2×10^{11} vg/mL又は 2×10^{12} vg/mLになるようにビヒクルで調製し、1眼あたり 2×10^6 (2e6)vg/1 μ L、 2×10^7 (2e7)vg/1 μ L、 2×10^8 (2e8)vg/1 μ L又は 2×10^9 (2e9)vg/1 μ Lで投与した。対象ビヒクル群には、ビヒクルを1 μ L投与した。投与したマウスはアンチセダン(登録商標)(日本全薬工業社)を筋肉内注射し覚醒させ、最長生後51日齢まで生存させた。

[0059] 実施例4 網膜組織のCx3cl1遺伝子発現評価

実施例3において生後1日齢にrAAV8-マウス可溶型Cx3cl1又はビヒクルを網膜下に投与したrd10マウスを、生後51日齢でイソフルラン麻酔下で放血により安楽死させ、眼球を摘出した。角膜及び水晶体を除

去し、網膜を他組織から単離するように採材し、網膜組織におけるC x 3 c l 1 の遺伝子発現評価を実施した。網膜からRNAを抽出し、逆転写でcDNAを作製した。得られたcDNAを鋳型として、C x 3 c l 1 に対する下記プライマー及びプローブ (Thermo Fisher Scientific 社、カタログ番号4324034) を用いて、Taqman 遺伝子発現アッセイを行った。Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社、カタログ番号4369016) の添付プロトコールに従い実施した。ハウスキーピング遺伝子 (ベータアクチン) (Thermo Fisher Scientific 社、カタログ番号Mm00607939__s1) に対しても同様にTaqman 遺伝子発現アッセイを行った。

フォワードプライマー : CGGCAAGCGTGCCATT (配列番号 9)

リバースプライマー配列 : CCTTCGGGTCAGCACAGAA (配列番号 10)

プローブ配列 : CTGGAGACGACACAGC (配列番号 11)

C x 3 c l 1 のCt 値をベータアクチンのCt 値で補正し、比較Ct 法により対照ビヒクル群と各投与群の比較を行った。結果を図3に示す。6.5 × 10⁶ (6.5 e 6) v g / e y e 投与群、6.5 × 10⁷ (6.5 e 7) v g / e y e 投与群及び6.5 × 10⁸ (6.5 e 8) v g / e y e 投与群において用量依存的なC x 3 c l 1 mRNA の発現上昇が見られた。

[0060] 実施例3において生後28日齢～生後29日齢にrAAV8-マウス可溶性C x 3 c l 1 又はビヒクルを網膜下に投与したrd10マウスについては、投与7日後 (Post d 7)、14日後 (Post d 14)、及び22日後 (Post d 22) に上記に記載の通り網膜からcDNAを作製し、前記と同様にTaqman 遺伝子発現アッセイでC x 3 c l 1 遺伝子発現を評価した (図4)。2 × 10⁸ (2 e 8) v g / e y e 投与群において、C x 3 c l 1 mRNA の発現は投与7日後に対照ビヒクル群に比べ上昇して

おり、14日後及び22日後では更に上昇していた。なお、 2×10^9 (2×10^9) vg/eye 投与群は投与22日後のみで評価しており、その時点において、 2×10^8 vg/eye 投与群より高い発現傾向が見られた。

[0061] 実施例5 網膜組織、RPE／脈絡膜／強膜組織、硝子体中及び血漿中のCX3CL1タンパク質量評価

実施例3において生後1日齢にrAAV8－マウス可溶型CX3CL1又はビヒクルを網膜下に投与したrd10マウスを生後50日齢まで生存させ、血漿及び硝子体を採材した。硝子体は、眼球から角膜及び水晶体を切除し、露出させた硝子体をりん酸緩衝生理食塩水に浸して採材した。血漿は、イソフルラン麻酔下で腹部大静脈から血液をヘパリン採血管に採取し、遠心して分離した上清から採取した。抗マウスCX3CL1抗体を用いたELISAキット (R&D Systems社、カタログ番号 MCX310) により硝子体及び血漿中のCX3CL1タンパク質量を評価した。結果をそれぞれ図5及び図6に示す。硝子体においては、 6.5×10^6 (6.5×10^6) vg/eye 投与群、 6.5×10^7 (6.5×10^7) vg/eye 投与群、 6.5×10^8 (6.5×10^8) vg/eye 投与群において用量依存的なCX3CL1タンパク質量の上昇が確認でき、特に 6.5×10^7 vg/eye 投与群及び 6.5×10^8 vg/eye 投与群において大幅な上昇が見られた。血漿においては対照ビヒクル群に比べ、 6.5×10^7 vg/eye 投与群及び 6.5×10^8 vg/eye 投与群において用量依存的な上昇が確認できた。これらは、網膜組織で発現したCX3CL1タンパク質が一部全身血流に移行していることを示唆する。

実施例3において生後1日齢にrAAV8－ヒト可溶型CX3CL1又はビヒクルを網膜下に投与したrd10マウスを生後50日齢まで生存させ、血漿、硝子体、網膜組織、及び、RPE／脈絡膜／強膜組織を採材した。網膜は、上記の通りに硝子体を採材した眼球の残りからピンセットで組織をつまみ出して採材した。RPE／脈絡膜／強膜組織は、硝子体採材後の眼球から網膜をピンセットで取り除いた残りの組織を指す。網膜組織及びRPE／

脈絡膜／強膜組織はRadioimmunoprecipitation Assay (RIPA) バッファー (Merck社、カタログ番号R0278-50ML) に採材し、グライNDERを用いて組織を溶解した。抗ヒトCX3CL1抗体を用いたELISAキット (R&D Systems社、カタログ番号DCX310) により網膜組織、RPE／脈絡膜／強膜組織、硝子体中及び血漿中のCX3CL1タンパク質量を評価した。結果をそれぞれ図7、図8、図9及び図10に示す。尚、網膜組織及びRPE／脈絡膜／強膜組織に関しては組織中のCX3CL1タンパク質量を組織重量で補正した値を示す。いずれの組織においても用量依存的なCX3CL1タンパク質の発現が確認された。

実施例3において生後28日齢にrAAV8-ヒト可溶型CX3CL1 (2×10^8 vg/eye) 又はビヒクルを網膜下に投与したrd10マウスから網膜組織、RPE／脈絡膜／強膜組織及び血漿を投与後7日、14日、21日及び49日に採材し、抗ヒトCX3CL1抗体を用いたタンパク質定量キット (MSD社、カタログ番号K151VCK) によりそれぞれの組織におけるCX3CL1タンパク質量を評価した。結果をそれぞれ図11、図12及び図13に示す。尚、網膜組織及びRPE／脈絡膜／強膜組織に関してはCX3CL1タンパク質量を組織重量で補正した値を示す。いずれの組織においても時間依存的なCX3CL1タンパク質の発現が確認され、投与14日後に発現がプラトーに達することが確認された。

[0062] 実施例6 視覚運動反応試験

Xiongらの方法 (J. Clin. Invest.、2015年、125巻 1433～1445頁) に従って視覚運動反応試験を実施した。実施例3において生後1日齢にrAAV8-マウス可溶型Cx3cl1又はビヒクルを網膜下に投与したrd10マウスを対象に生後44日齢～生後45日齢に視覚運動反応試験を実施した。本試験にはCerebral Mechanics社のOptoMotry HDを使用した。全てのマウスは評価のおよそ1週間前に覚醒下でプラットフォームに5分ほど置き、チャンバー

に順化させた。評価当日、マウスを覚醒下でプラットフォームに乗せ、動物が探索行動をやめ、プラットフォームから落ちることなく、落ち着いたと実験者が判断したら検査を開始した。白黒の格子のコントラストを100%、回転速度を12度/秒に設定し、格子画面を回転させ、回転させた格子に対するマウスの視覚運動反応を観察した。盲目マウスは応答せず、目の見えるマウスは回転させた格子の動きを追跡するかのようにその頭部も回した。視覚運動反応は、マウスが認識できる格子の最小の厚さ、すなわち空間周波数の限界 (spatial frequency threshold; cycles/degree (c/d) で表される) を指標に評価した。なお、実験者はそれぞれの個体の投与内容が分からないよう、ブラインドで試験を実施した。結果を図14に示す。6.5×10⁶ (6.5e6) vg/eye 投与群では対照ビヒクル群に比べ変化は見られなかったが、6.5×10⁷ (6.5e7) vg/eye 投与群及び6.5×10⁸ (6.5e8) vg/eye 投与群において視覚運動反応が保持される傾向が確認された。

前記と同様の方法で視覚運動反応試験を、実施例3において生後1日齢に rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1又はビヒクルを網膜下に投与した rd10マウスを対象に生後42日齢～生後43日齢に実施した。結果を図15に示す。rAAV8-ヒト可溶性CX3CL1を1.8×10⁷ (図中では小数点以下を四捨五入し2e7として示す) vg/eye以上投与した群において視覚運動反応が保持される傾向が見られ、6×10⁷ (6e7) vg/eye 投与群では対照ビヒクル群に比べ有意な上昇が見られた (P<0.05、ダネット多重比較検定)。

[0063] 実施例7 錐体細胞保護効果の評価

rd10マウスにおいて、rAAV8-マウス可溶性Cx3cl1による錐体細胞保護効果を検証するため、錐体細胞の外節を免疫組織化学法で染色し、陽性となった各外節1つを各錐体細胞1つとみなし、残存する錐体細胞数の評価を実施した。具体的には以下の通りである。実施例3において生後1日齢に網膜下に rAAV8-マウス可溶性Cx3cl1又はビヒクルを投

与した r d 1 0 マウスを生後 5 0 日齢にイソフルラン麻酔下で放血により安楽死させ、眼球を採材し、4 %パラホルムアルデヒドで 3 0 分間固定した。固定した眼球から角膜・水晶体・虹彩・強膜・脈絡膜・網膜色素上皮細胞を除き、網膜を単離した。単離した網膜を免疫組織染色用ブロッキング剤でブロッキング後、A l e x a F l u o r o (登録商標) 6 4 7 がラベルされた抗赤色／緑色オプシン抗体 (メルク社、カタログ番号 A B 5 4 0 5) 及び D y L i g h t (登録商標) 4 8 8 がラベルされた抗青色オプシン抗体 (メルク社、カタログ番号 A B 5 4 0 7) で染色した。染色した網膜は 4 か所に切れ込みを入れ、視細胞側を上にするようにスライドに乗せ、フラットマウントを作製した。視神経乳頭部位から 1 . 5 m m の位置を K E Y E N C E B Z - X 7 1 0 蛍光顕微鏡の 4 0 倍レンズを用いて画像を取得した。撮影部位に存在する抗錐体オプシン抗体で陽性となった細胞 (外節) 数は I m a g e J (v e r 1 . 4 9) ソフトウェアを用いて定量化した。1 画面 (観察エリア) における錐体オプシンの数を残存する錐体細胞の数の指標として評価した。結果を図 1 6 に示す。6 . 5 × 1 0 ⁶ (6 . 5 e 6) v g / e y e 投与群では対照ビヒクル群に比べ変化は見られなかったが、6 . 5 × 1 0 ⁷ (6 . 5 e 7) v g / e y e 投与群では有意な上昇を示した (P < 0 . 0 1 、ダネット多重比較検定)。また、6 . 5 × 1 0 ⁸ (6 . 5 e 8) v g / e y e 投与群でも上昇傾向を示している。これらのデータは r d 1 0 マウスにおいて、r A A V 8 - マウス可溶型 C x 3 c l 1 の網膜下投与によりマウス錐体細胞数が保持されることを示している。

実施例 3 において生後 1 日齢に r A A V 8 - ヒト可溶型 C X 3 C L 1 又はビヒクルを網膜下に投与した r d 1 0 マウスの網膜を生後 5 0 日齢に採材し、前記と同様の方法で錐体オプシンの数を評価した結果を図 1 7 に示す。全ての r A A V 8 - ヒト可溶型 C X 3 C L 1 投与群において対照ビヒクル群に比べ有意な上昇を示した (6 × 1 0 ⁶ (6 e 6) v g / e y e 及び 6 × 1 0 ⁸ (6 e 8) v g / e y e 投与群では P < 0 . 0 5 、 2 × 1 0 ⁷ (2 e 7) v g / e y e 、 6 × 1 0 ⁷ (6 e 7) v g / e y e 及び 2 × 1 0 ⁸ (2 e 8) v g / e

y e 投与群では $P < 0.01$ 、共にダネット多重比較検定)。これらのデータは r d 1 0 マウスにおいて、r A A V 8 - ヒト可溶型 C X 3 C L 1 の網膜下投与によりマウス錐体細胞数が保持されることを示している。

従って、r A A V 8 - 可溶型 C X 3 C L 1 の網膜下投与により、錐体細胞保護効果が認められた。

[0064] 実施例 3 において、生後 28 日齢に網膜下に r A A V 8 - マウス可溶型 C x 3 c l 1 又はビヒクルを投与した r d 1 0 マウスを投与後 22 日（生後 50 日齢）で網膜を採材し、前記と同様の方法で錐体オプシン数を評価した結果を図 18 に示す。 2×10^8 (2 e 8) v g / e y e 投与群及び 2×10^9 (2 e 9) v g / e y e 投与群では対照ビヒクル群に比べ有意な上昇を示した（それぞれ $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、ダネット多重比較検定）。これらのデータは、病態がある程度進行し、杆体細胞死が起こった後に r A A V 8 - マウス可溶型 C x 3 c l 1 を網膜下投与しても r d 1 0 マウスの錐体細胞数が保持されることを示している。

実施例 3 において生後 29 日齢に r A A V 8 - ヒト可溶型 C X 3 C L 1 又はビヒクルを網膜下に投与した r d 1 0 マウスの網膜を生後 51 日齢に採材し、前記と同様の方法で錐体オプシンの数を評価した。尚、本実験には投与日（生後 29 日齢）に未投与で採材した r d 1 0 マウスの網膜 (N a i v e) も評価対象に含めた。結果を図 19 に示す。投与日の錐体オプシン数に比べて、ビヒクル投与群の生後 51 日齢での錐体オプシン数は減少しており、投与日からの錐体細胞変性の進行を表している。しかし、r A A V 8 - ヒト可溶型 C X 3 C L 1 投与群ではビヒクル投与群に比べて用量依存的な錐体オプシン数の上昇が見られた。このうち、 2×10^8 (2 e 8) v g / e y e 投与群及び 2×10^9 (2 e 9) v g / e y e 投与群では対照ビヒクル群に比べ有意な上昇を示した ($P < 0.01$ 、ダネット多重比較検定)。これらのデータは、病態がある程度進行し、杆体細胞死が起こった後に r A A V 8 - ヒト可溶型 C X 3 C L 1 を網膜下投与しても r d 1 0 マウスの錐体細胞数が保持されることを示している。

従って、rAAV8-可溶型CX3CL1を、病態がある程度進行し、杆体細胞死が起こった後に投与しても、錐体細胞保護効果が認められることが示された。

[0065] 以上の結果から、rAAV8-可溶型CX3CL1は、視覚運動反応を保持する効果及び錐体細胞保護効果を有することが示された。従って、本発明のCX3CL1遺伝子を搭載したAAVベクターは、視覚運動反応の保持や錐体細胞保護により予防又は治療できると考えられる、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィー等の網膜変性疾患の予防及び／又は治療剤として期待される。

産業上の利用可能性

[0066] 本発明のCX3CL1遺伝子を搭載したAAVベクターは、網膜変性疾患、例えば、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、杆体錐体ジストロフィー等の予防及び／又は治療剤として期待される。

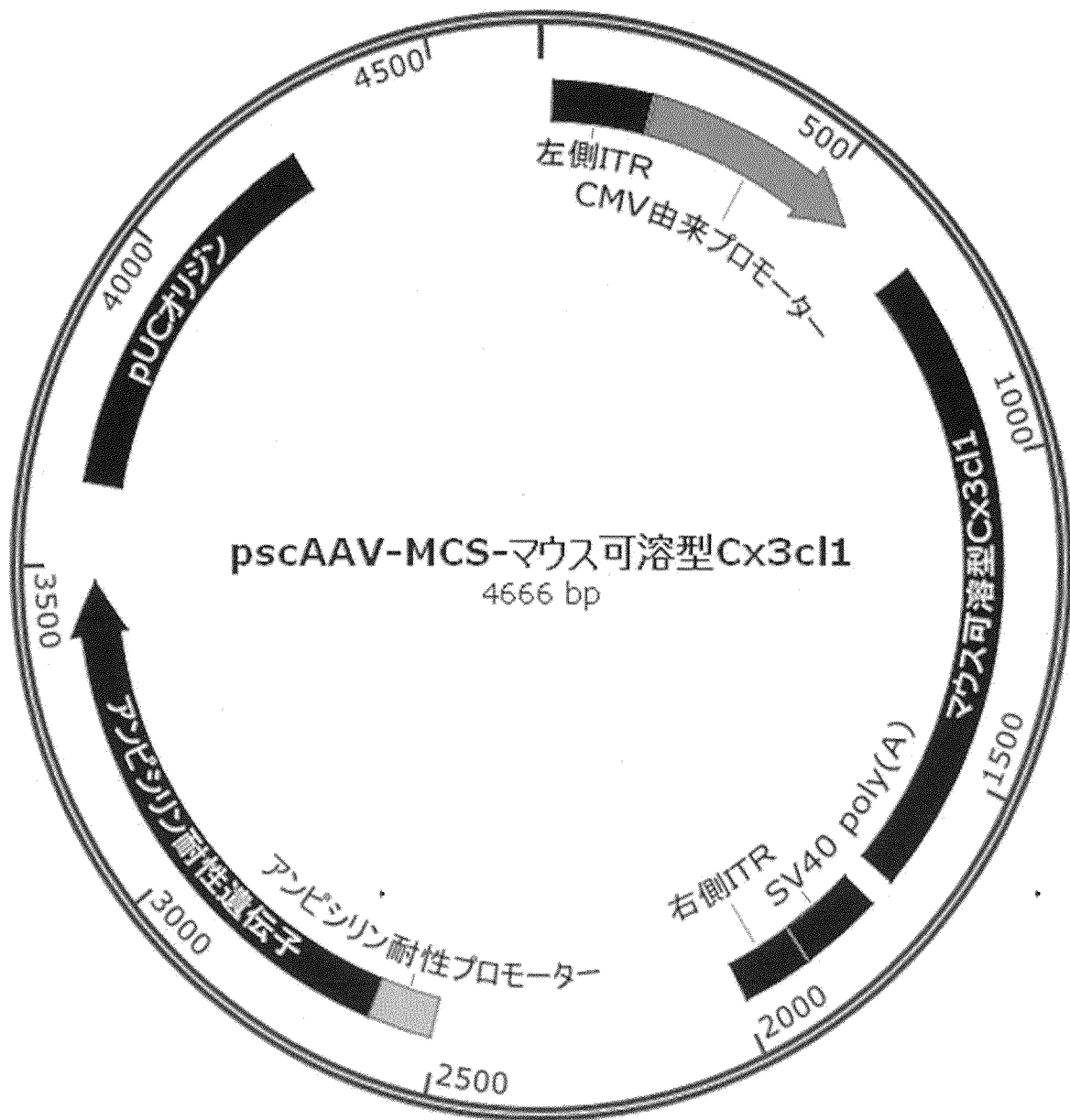
配列表フリーテキスト

[0067] 配列番号9～11：DNA配列

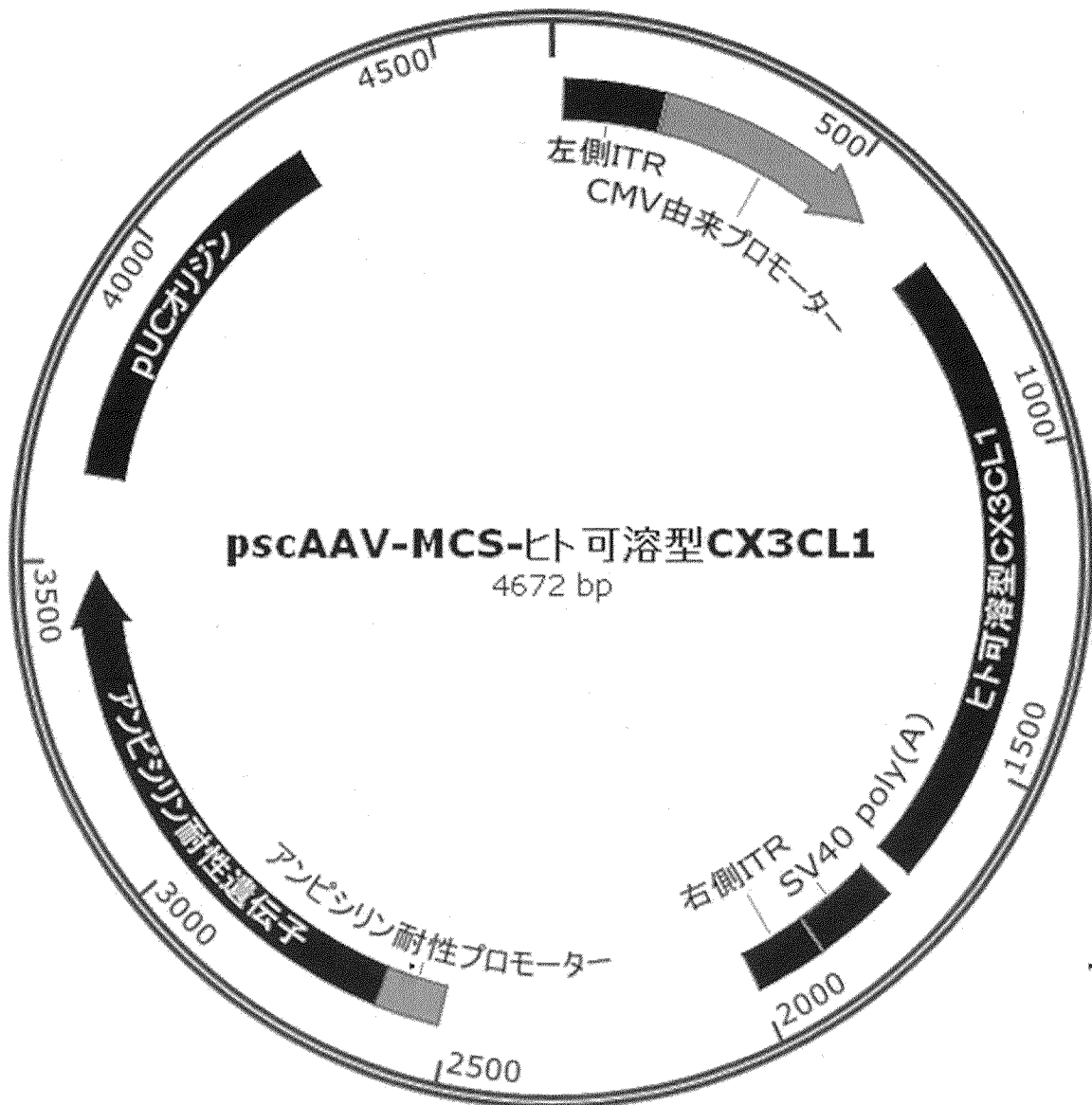
請求の範囲

- [請求項1] C X 3 C L 1 をコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含む、網膜変性疾患の予防又は治療用医薬組成物。
- [請求項2] 前記C X 3 C L 1 が可溶型C X 3 C L 1 である、請求項1 に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 前記可溶型C X 3 C L 1 がヒト可溶型C X 3 C L 1 である、請求項2 に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 前記ヒト可溶型C X 3 C L 1 が配列番号4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項3 に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 前記A A Vベクターが、A A V 8ベクターである、請求項1 乃至4 のいずれか1 項に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 前記A A Vベクターが、配列番号4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸分子及び該核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むA A V 8ベクターである、請求項1 に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 網膜変性疾患が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、又は杆体錐体ジストロフィーである、請求項1 乃至6 のいずれか1 項に記載の医薬組成物。
- [請求項8] 進行期の網膜色素変性症の治療用である、請求項7 に記載の医薬組成物。
- [請求項9] 網膜下に投与するための、請求項1 乃至8 のいずれか1 項に記載の医薬組成物。
- [請求項10] 硝子体内に投与するための、請求項1 乃至8 のいずれか1 項に記載の医薬組成物。

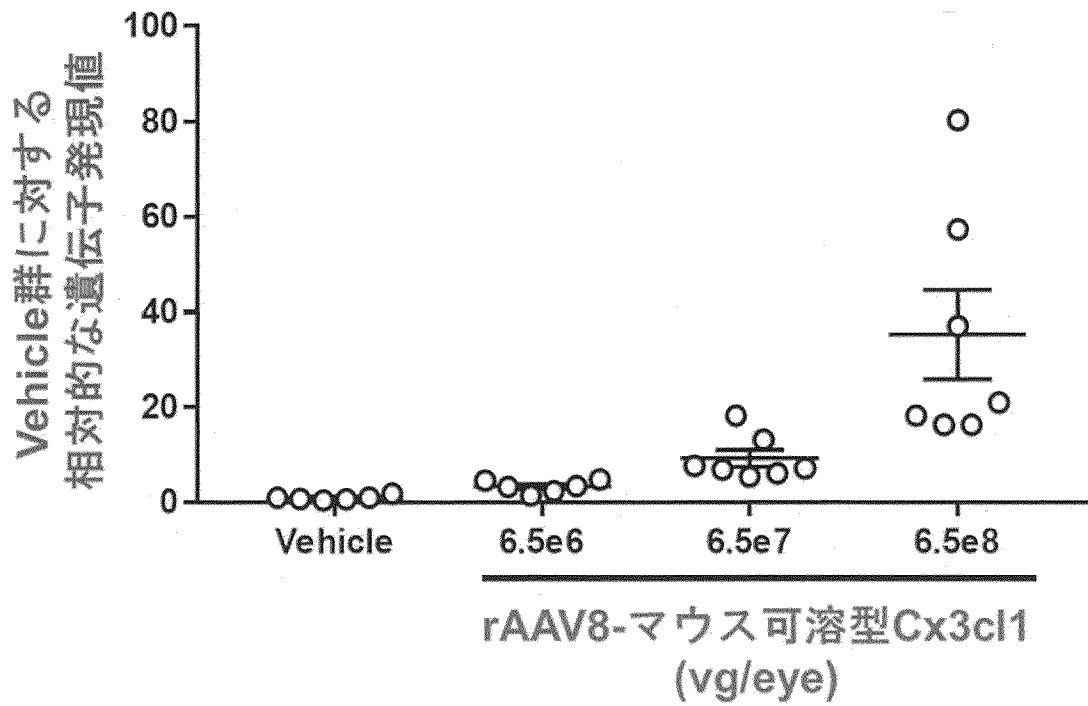
[図1]



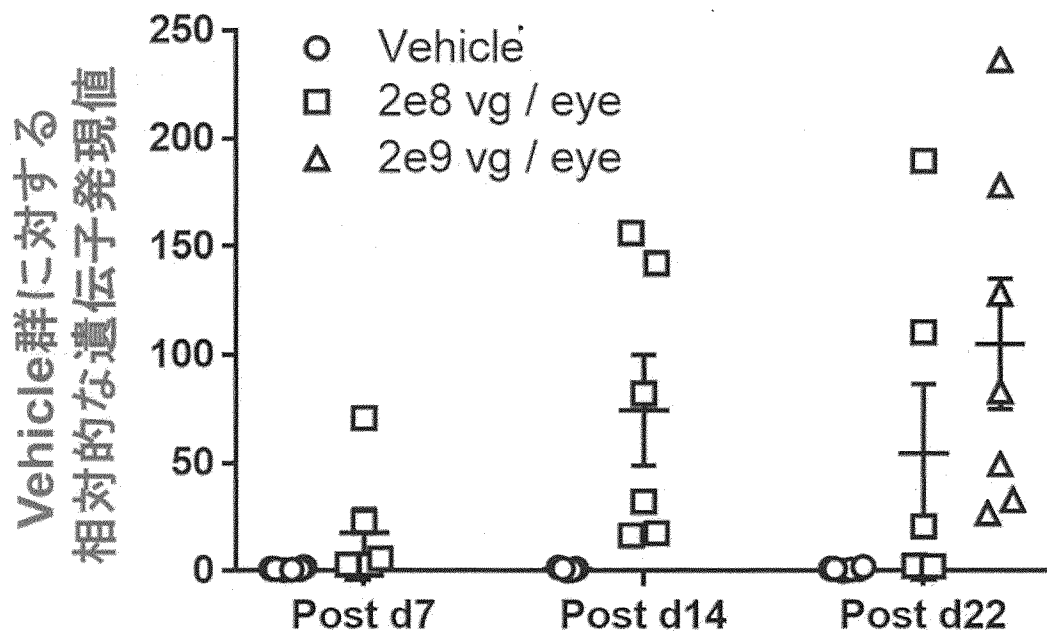
[図2]



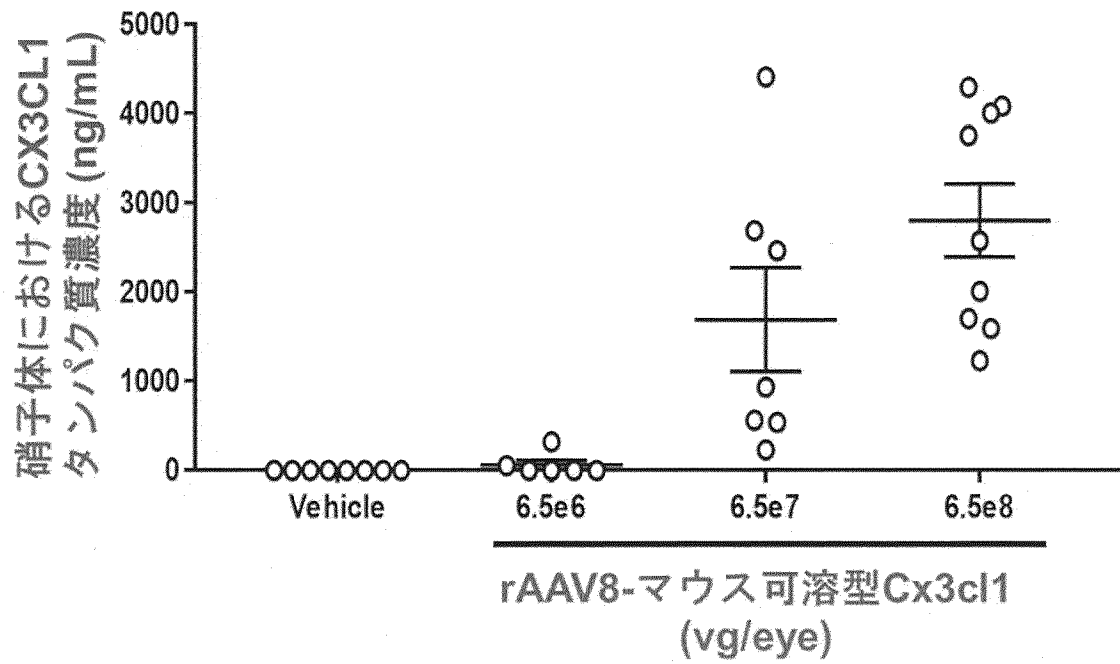
[図3]



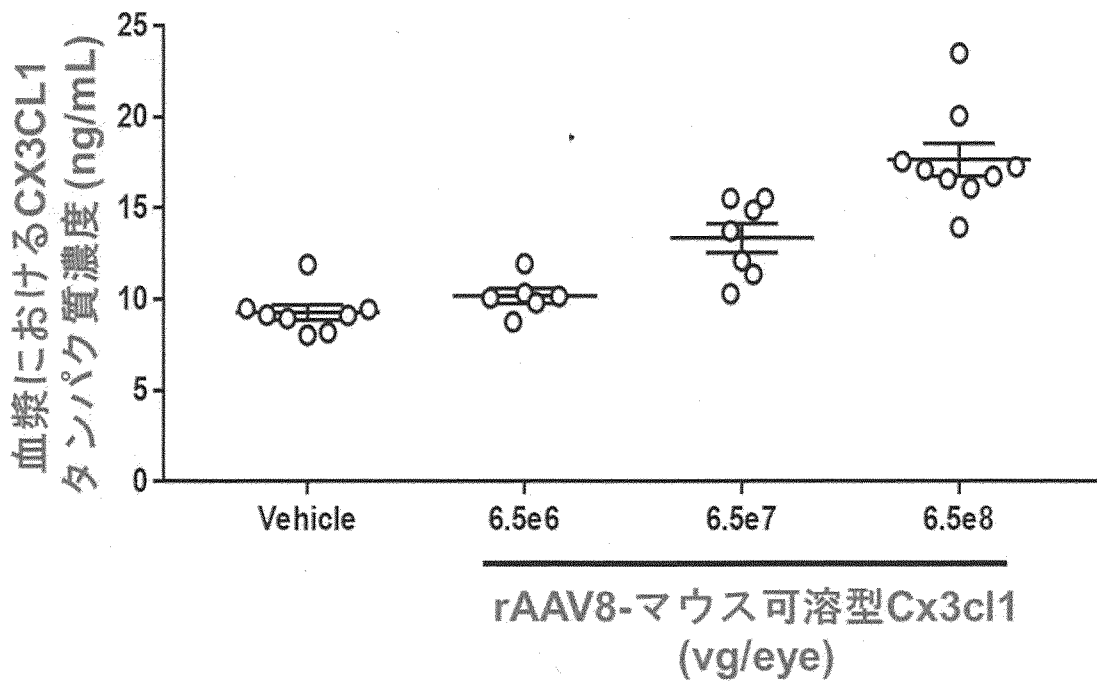
[図4]



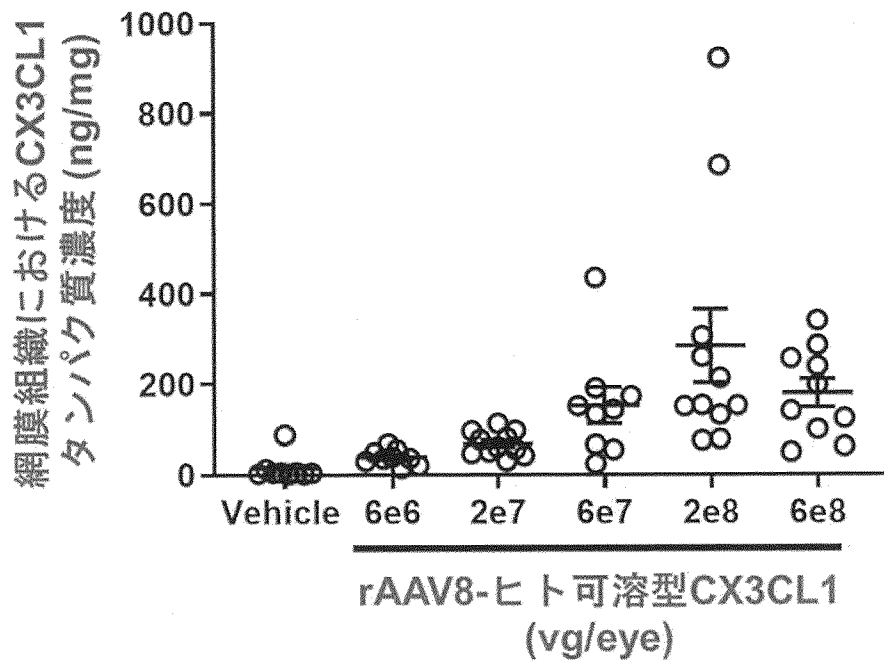
[図5]



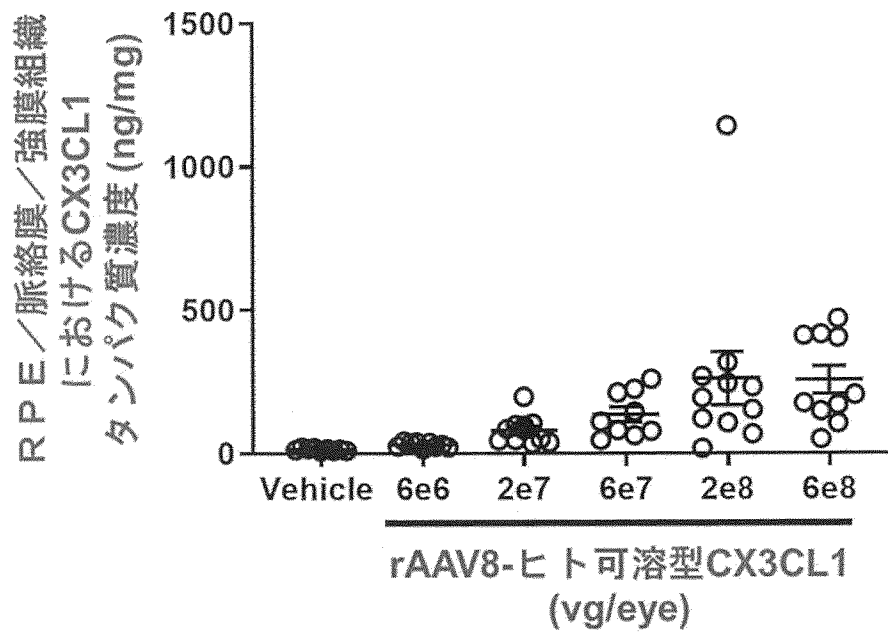
[図6]



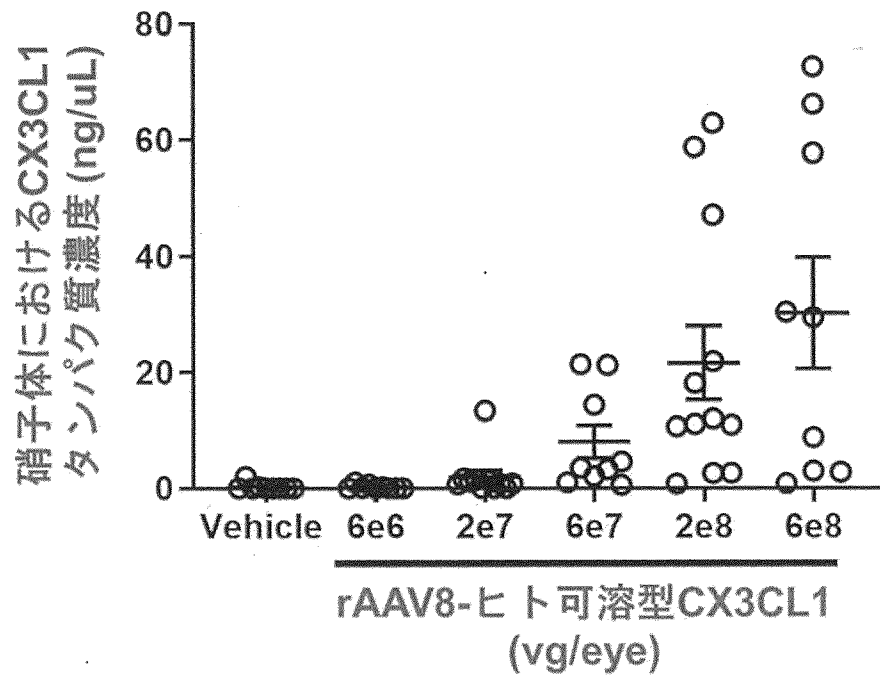
[図7]



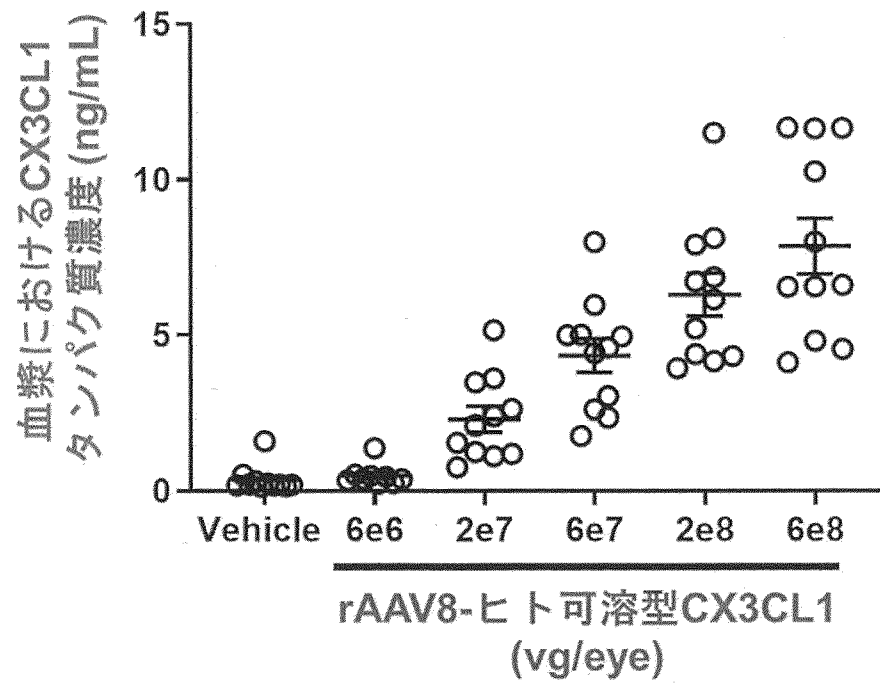
[図8]



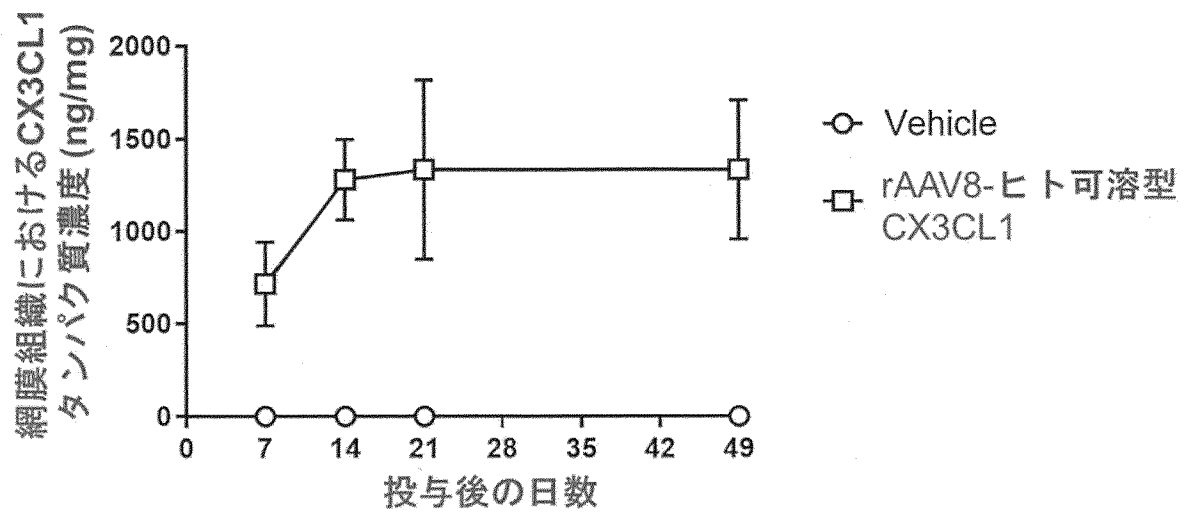
[図9]



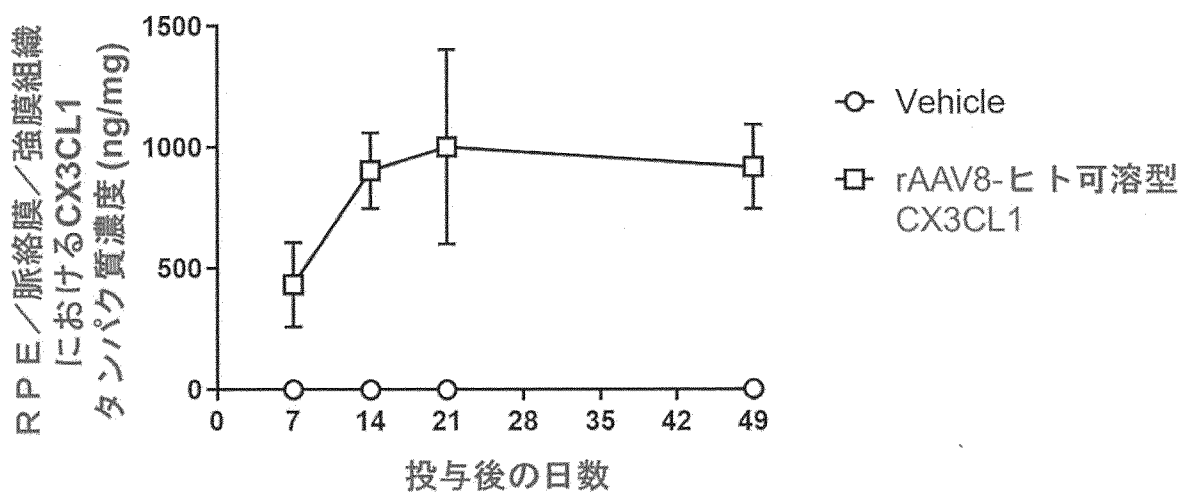
[図10]



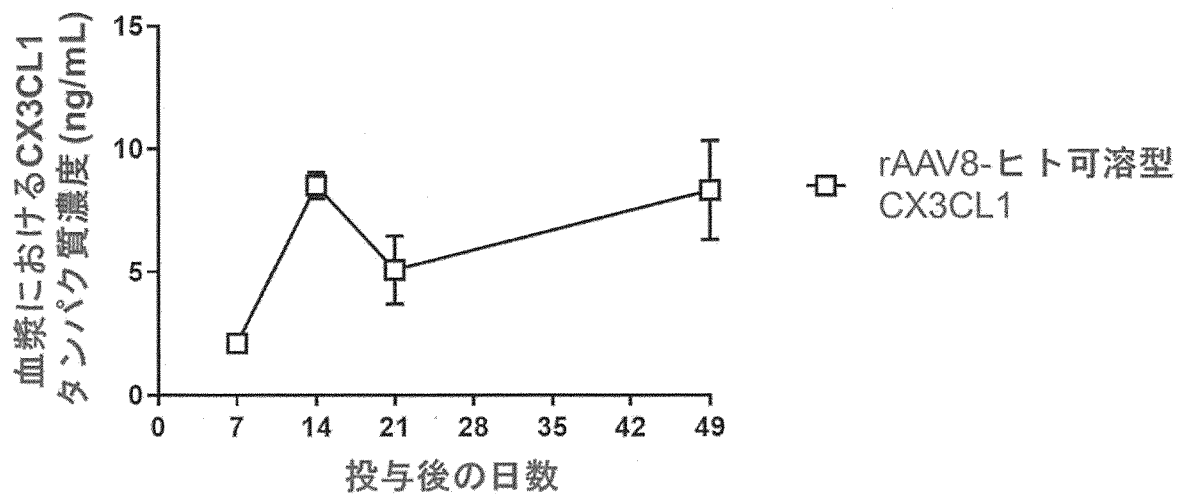
[図11]



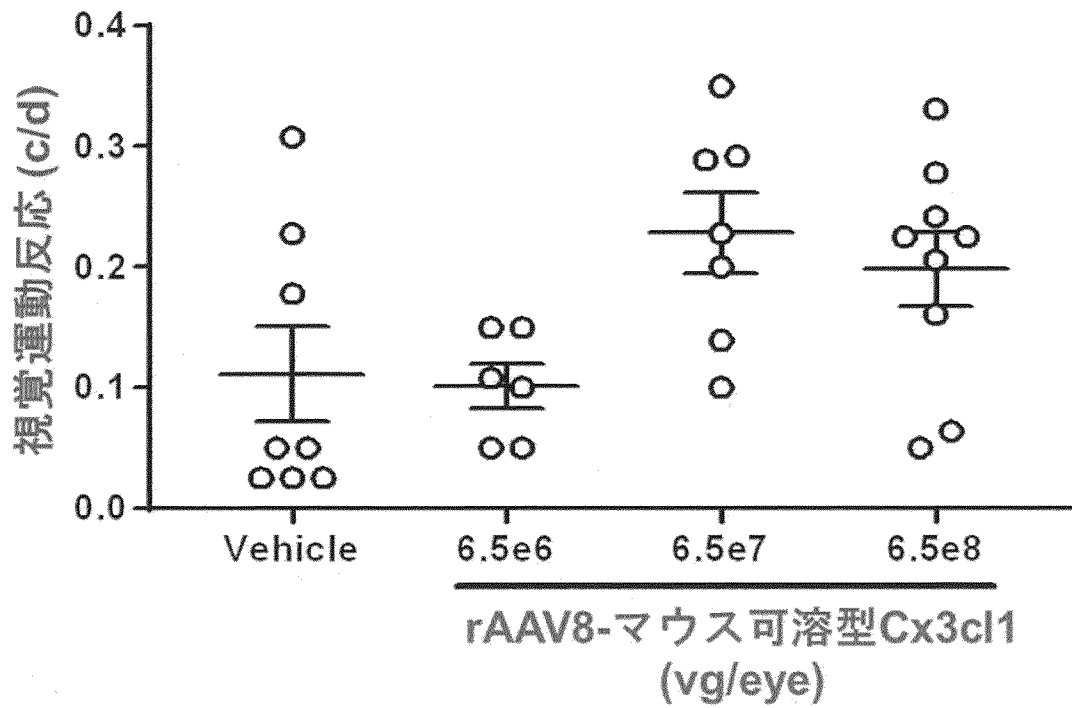
[図12]



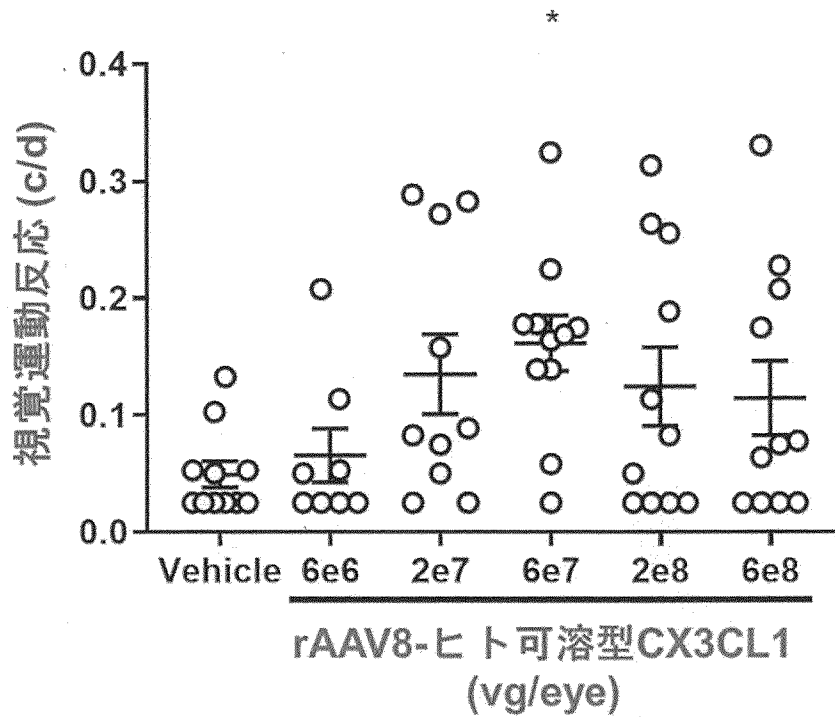
[図13]



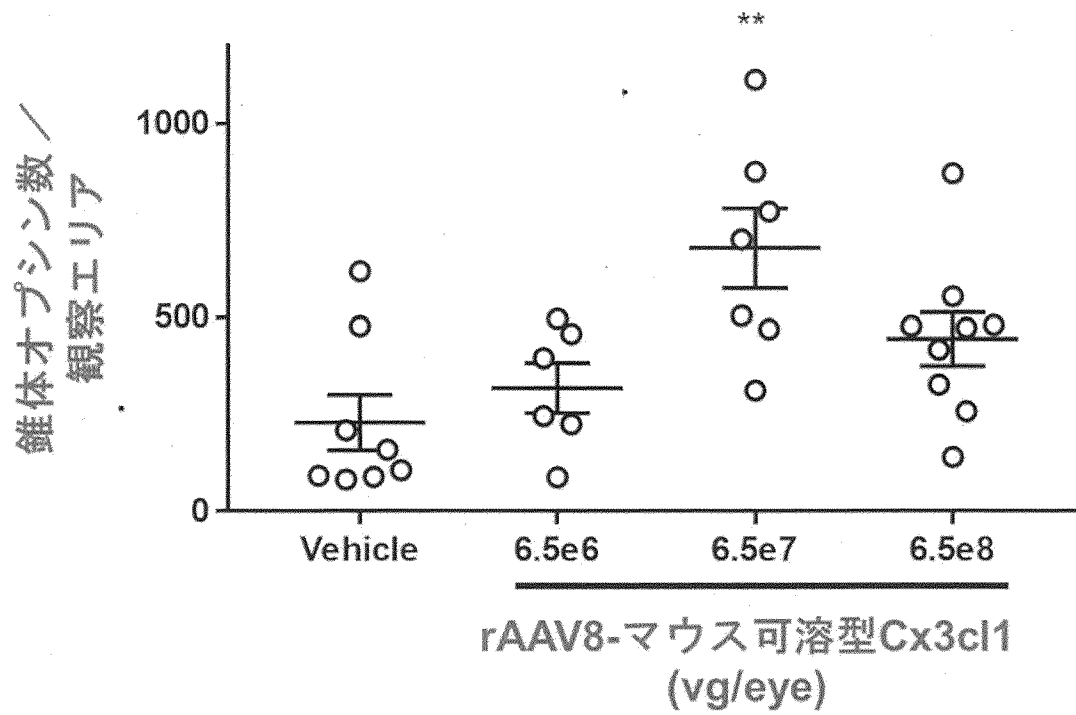
[図14]



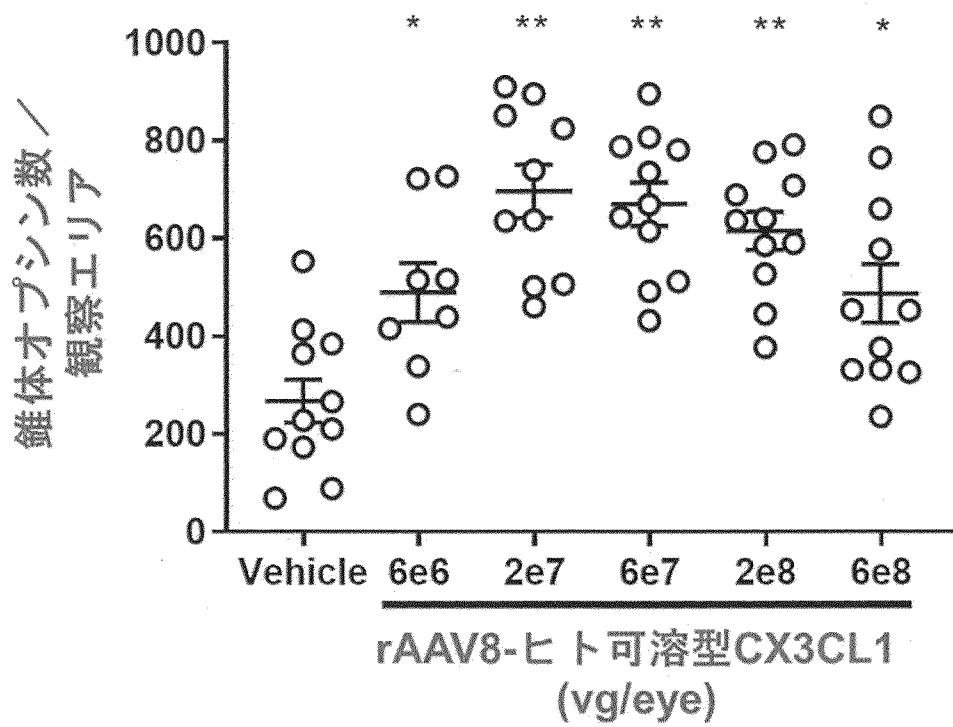
[図15]



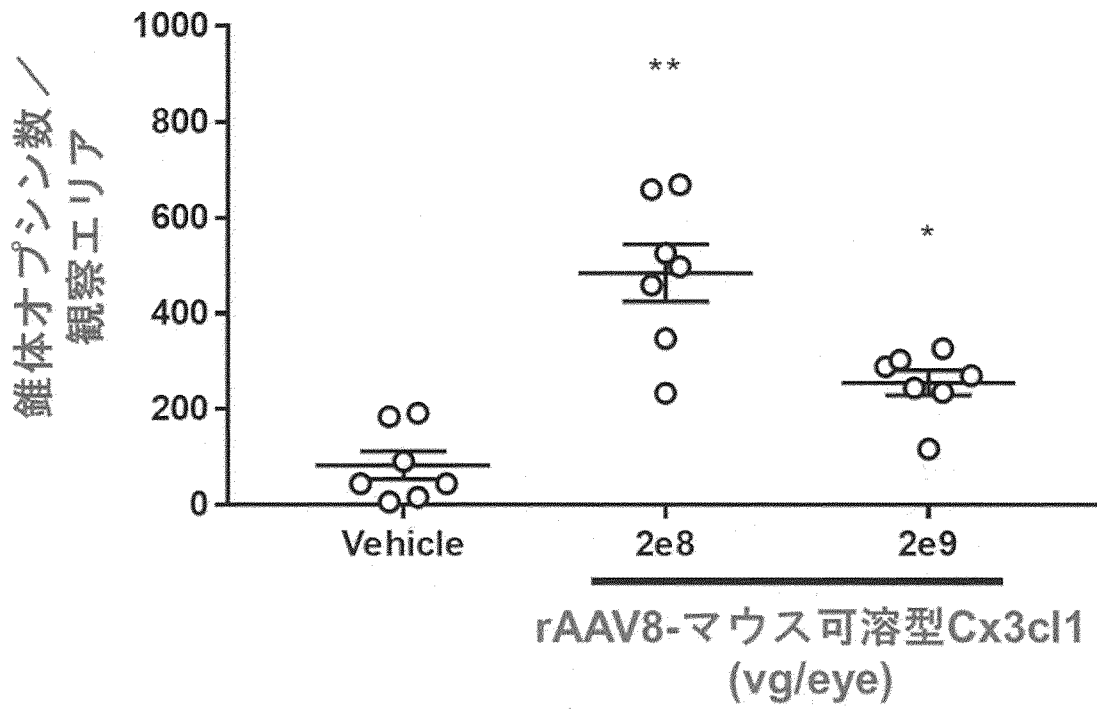
[図16]



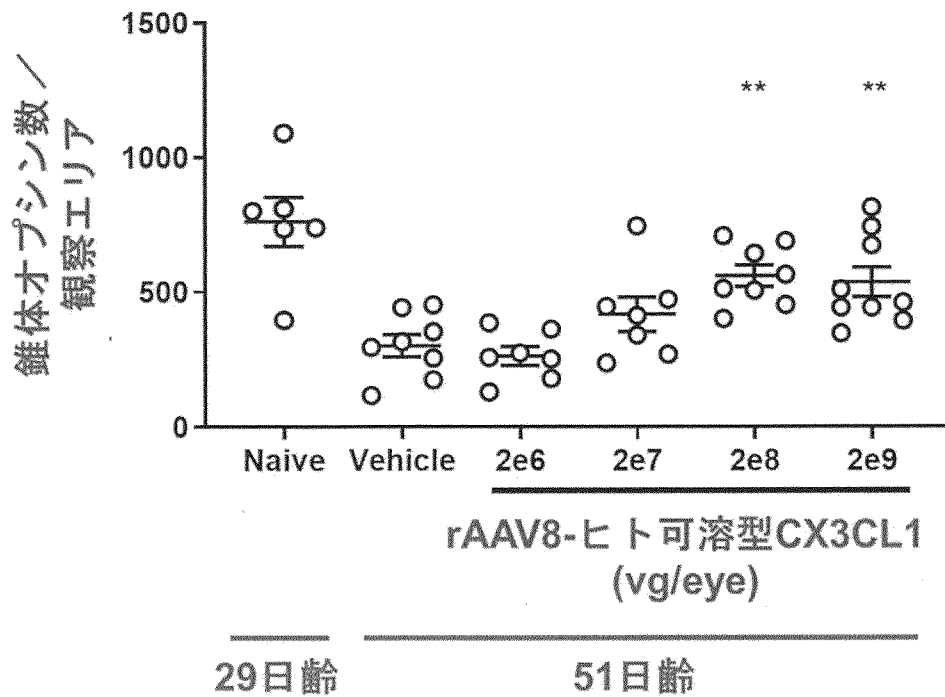
[図17]



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/004029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i; A61K 38/19(2006.01)i

FI: A61K35/76; A61K35/76 ZNA; A61K38/19; A61K48/00; A61P27/02; A61P43/00 111; C12N15/12; C12N15/864 100Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K48/00; A61P27/02; A61P43/00; A61K35/76; C12N15/12; C12N15/864; A61K38/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZABEL, Matthew K. et al., "Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX3CL1-CX3CR1 signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa", GLIA, 17 June 2016, vol. 64, pp. 1479-1491, abstract, p. 1481, right column, paragraph [0004], fig. 5	1-10
Y	ROCHE, Sarah L. et al., "Fractalkine-CX3CR1 signaling is critical for progesterone-mediated neuroprotection in the retina", Sci Rep, 20 February 2017, vol. 7, no. 43067, pp. 1-15, DOI: 10.1038/srep43067, abstract, p. 1, paragraph [0004], p. 2, paragraph [0001], fig. 4-7	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 March 2020 (16.03.2020)

Date of mailing of the international search report
31 March 2020 (31.03.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/004029

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	五十嵐 勉、ほか 6 名、眼科分野における遺伝子導入法の開発、日医大 医会誌、2017、vol. 13, no. 2, pp. 88-96, p. 89, 2.1 AAV vector serotypes, p. 90, 3.1 Intravitreal administration and subretinal administration, p. 92, 3.4 Utilization of tissue-specific promoters, (IGARASHI, Tsutomu et al., "New innovations for ocular gene therapy", Nihon Ika Daigaku Igakkai Zasshi)	1-10
Y	WO 2017/180936 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 19.10.2017 (2017-10-19) claims, example 2	1-10
Y	WO 2017/144611 A1 (EYESERV GMBH) 31.08.2017 (2017- 08-31) claims, examples 1, 4, 5	1-10
Y	JP 2012-511921 A (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)) 31.05.2012 (2012-05-31) paragraphs [0041]-[0046]	3, 4, 6
Y	JP 2012-506538 A (ASTUTE MEDICAL, INC.) 15.03.2012 (2012-03-15) paragraphs [0067]-[0068]	3, 5, 6
P, X	VIANG, Sean K. et al., "Soluble CX3CL1 gene therapy improves cone survival and function in mouse models of rerinitis pigmentosa", PNAS, 29 April 2019, vol. 116, no. 20, pp. 10140-10149, abstract, fig. 1-4	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/004029

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/180936 A1	19 Oct. 2017	JP 2019-518427 A claims, example 2 EP 3452103 A1 CA 3019426 A KR 10-2019-0031196	
WO 2017/144611 A1	31 Aug. 2017	JP 2019-505239 A claims, examples 1, 4, 5 EP 3210632 A1 CA 3014704 A CN 109328073 A	
JP 2012-511921 A	31 May 2012	US 2012/0141538 A1 paragraphs [0110]- [0118] WO 2010/070394 A1 EP 2358738 A1 CA 2746976 A	
JP 2012-506538 A	15 Mar. 2012	US 2011/0207161 A1 paragraphs [0075], [0076] WO 2010/048347 A2 EP 2767833 A2 AU 2009308375 A CN 102246038 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 48/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i; A61K 38/19(2006.01)i FI: A61K35/76; A61K35/76 ZNA; A61K38/19; A61K48/00; A61P27/02; A61P43/00 111; C12N15/12; C12N15/864 100Z																	
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K48/00; A61P27/02; A61P43/00; A61K35/76; C12N15/12; C12N15/864; A61K38/19 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table> 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); PubMed			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2020年																
日本国実用新案登録公報	1996-2020年																
日本国登録実用新案公報	1994-2020年																
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>ZABEL, Matthew, K. et al., Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX3CL1-CX3CR1 signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa, GLIA, 2016.06.17, Vol.64, pp.1479-1491 Abstract, p.1481右欄第4段落, Figure 5</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ROCHE, Sarah, L. et al., Fractalkine-CX3CR1 signaling is critical for progesterone-mediated neuroprotection in the retina, Sci Rep, 2017.02.20, Vol.7, No.43067, pp.1-15, DOI: 10.1038/srep43067 Abstract, p.1第4段落, p.2第1段落, Figures 4-7</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>五十嵐 勉、ほか6名、眼科分野における遺伝子導入法の開発、日医大医会誌、2017, Vol.13, No.2, pp.88-96 p.89 2.1 AAV vector serotypes, p.90 3.1 硝子体投与と網膜下投与、p.92 3.4 組織特異的プロモーターの活用</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017/180936 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 19.10.2017 (2017-10-19) Claims, Example 2</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	ZABEL, Matthew, K. et al., Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX3CL1-CX3CR1 signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa, GLIA, 2016.06.17, Vol.64, pp.1479-1491 Abstract, p.1481右欄第4段落, Figure 5	1-10	Y	ROCHE, Sarah, L. et al., Fractalkine-CX3CR1 signaling is critical for progesterone-mediated neuroprotection in the retina, Sci Rep, 2017.02.20, Vol.7, No.43067, pp.1-15, DOI: 10.1038/srep43067 Abstract, p.1第4段落, p.2第1段落, Figures 4-7	1-10	Y	五十嵐 勉、ほか6名、眼科分野における遺伝子導入法の開発、日医大医会誌、2017, Vol.13, No.2, pp.88-96 p.89 2.1 AAV vector serotypes, p.90 3.1 硝子体投与と網膜下投与、p.92 3.4 組織特異的プロモーターの活用	1-10	Y	WO 2017/180936 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 19.10.2017 (2017-10-19) Claims, Example 2	1-10
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
Y	ZABEL, Matthew, K. et al., Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX3CL1-CX3CR1 signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa, GLIA, 2016.06.17, Vol.64, pp.1479-1491 Abstract, p.1481右欄第4段落, Figure 5	1-10															
Y	ROCHE, Sarah, L. et al., Fractalkine-CX3CR1 signaling is critical for progesterone-mediated neuroprotection in the retina, Sci Rep, 2017.02.20, Vol.7, No.43067, pp.1-15, DOI: 10.1038/srep43067 Abstract, p.1第4段落, p.2第1段落, Figures 4-7	1-10															
Y	五十嵐 勉、ほか6名、眼科分野における遺伝子導入法の開発、日医大医会誌、2017, Vol.13, No.2, pp.88-96 p.89 2.1 AAV vector serotypes, p.90 3.1 硝子体投与と網膜下投与、p.92 3.4 組織特異的プロモーターの活用	1-10															
Y	WO 2017/180936 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 19.10.2017 (2017-10-19) Claims, Example 2	1-10															
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																	
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献																	
国際調査を完了した日 16.03.2020		国際調査報告の発送日 31.03.2020															
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 渡部 正博 4U 5801 電話番号 03-3581-1101 内線 3452															

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2017/144611 A1 (EYESERV GMBH) 31.08.2017 (2017 - 08 - 31) Claims, Examples 1, 4, 5	1-10
Y	JP 2012-511921 A (ユニヴェルシテ ピエール エ マリ キューリ (パリ 6)) 31.05.2012 (2012 - 05 - 31) [0041]-[0046]	3, 4, 6
Y	JP 2012-506538 A (アスチュート メディカル, インコーポレイテッド) 15.03.2012 (2012 - 03 - 15) [0067]-[0068]	3, 5, 6
P, X	WANG, Sean, K. et al., Soluble CX3CL1 gene therapy improves cone survival and function in mouse models of rerinitis pigmentosa, PNAS, 2019.04.29, Vol.116, No.20, pp.10140-10149 Abstract, Figures 1-4	1-10

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/004029

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2017/180936	A1	19.10.2017	JP	2019-518427	A	
				特許請求の範囲、実施例 2			
				EP	3452103	A1	
				CA	3019426	A	
				KR	10-2019-0031196	A	
WO	2017/144611	A1	31.08.2017	JP	2019-505239	A	
				特許請求の範囲、実施例 1, 4, 5			
				EP	3210632	A1	
				CA	3014704	A	
				CN	109328073	A	
JP	2012-511921	A	31.05.2012	US	2012/0141538	A1	
				[0110]-[0118]			
				WO	2010/070394	A1	
				EP	2358738	A1	
				CA	2746976	A	
JP	2012-506538	A	15.03.2012	US	2011/0207161	A1	
				[0075], [0076]			
				WO	2010/048347	A2	
				EP	2767833	A2	
				AU	2009308375	A	
				CN	102246038	A	