

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7496971号  
(P7496971)

(45)発行日 令和6年6月10日(2024.6.10)

(24)登録日 令和6年5月31日(2024.5.31)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
請求項の数 34 (全42頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-548865(P2020-548865)	(73)特許権者	501443261 コペルニクス セラピューティクス イン コーポレーティッド アメリカ合衆国 オハイオ州 クリーブラ ンド スト 1 4 5 シダー アベニュー 1 1 0 0 0
(86)(22)出願日	平成30年11月28日(2018.11.28)	(73)特許権者	520188101 クリアサイド バイオメディカル アメリカ合衆国 3 0 0 0 5 ジョージア 州 アルファレッタ ノース ポイント パ ークウェイ 9 0 0 スイート 2 0 0
(65)公表番号	特表2021-504491(P2021-504491 A)	(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(43)公表日	令和3年2月15日(2021.2.15)	(74)代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(86)国際出願番号	PCT/US2018/062712		
(87)国際公開番号	WO2019/108570		
(87)国際公開日	令和1年6月6日(2019.6.6)		
審査請求日	令和2年9月24日(2020.9.24)		
審判番号	不服2022-5174(P2022-5174/J1)		
審判請求日	令和4年4月7日(2022.4.7)		
(31)優先権主張番号	62/592,033		
(32)優先日	平成29年11月29日(2017.11.29)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 眼の改善のための遺伝子治療の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸を含むある量の薬学的製剤を哺乳動物の眼の上脈絡膜腔 ( S C S ) に非外科的に投与する場合に使用するための、薬学的製剤であって、

前記製剤が電荷中性核酸ナノ粒子を含み、前記ナノ粒子がそれぞれ、その最小可能サイズに圧縮されている単一分子の核酸を含み、かつ、該ナノ粒子が 15 nm ~ 45 nm の短径を有する楕円体である、前記薬学的製剤。

【請求項2】

前記ナノ粒子が、30 nm未満の短径を有する楕円体である、請求項1に記載の薬学的製剤。

【請求項3】

前記ナノ粒子が、20 nm未満の短径を有する楕円体である、請求項1に記載の薬学的製剤。

【請求項4】

前記ナノ粒子が、ポリエチレングリコール置換ポリリジンを含む、請求項1に記載の薬学的製剤。

【請求項5】

前記核酸が、30 kb未満または30 kbp未満である、請求項1に記載の薬学的製剤。

【請求項6】

前記核酸が、眼内で転写されて転写物を形成し、前記転写物のうちの少なくとも1つが

翻訳されてタンパク質を発現する、請求項 1 に記載の薬学的製剤。

【請求項 7】

前記核酸が、眼内で転写されて転写物を形成し、前記転写物のうちの少なくとも 1 つがアンチセンス転写物である、請求項 1 に記載の薬学的製剤。

【請求項 8】

前記核酸が、眼内で翻訳されてタンパク質を発現する、請求項 1 に記載の薬学的製剤。

【請求項 9】

前記核酸が、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、抗血管新生因子、および抗体または抗体断片もしくは抗体構築物からなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の薬学的製剤。

10

【請求項 10】

前記核酸が、DNA である、請求項 1 に記載の薬学的製剤。

【請求項 11】

前記核酸が、RNA である、請求項 1 に記載の薬学的製剤。

【請求項 12】

中空マイクロニードルを介して前記 SCS に投与される、請求項 1 に記載の薬学的製剤。

【請求項 13】

ある量の薬学的製剤を哺乳動物の眼の上脈絡膜腔 (SCS) に非外科的に投与することにより哺乳動物の眼障害を治療する場合に使用するための、薬学的製剤であって、

前記量が前記眼障害に対する治療反応を誘発するのに十分であり、前記製剤が電荷中性核酸ナノ粒子を含み、前記ナノ粒子がそれぞれ、その最小可能サイズに圧縮された単一分子の核酸を含み、かつ、該ナノ粒子が 15 nm ~ 45 nm の短径を有する楕円体である、前記薬学的製剤。

20

【請求項 14】

前記ナノ粒子が、30 nm 未満の短径を有する楕円体である、請求項 13 に記載の薬学的製剤。

【請求項 15】

前記ナノ粒子が、20 nm 未満の短径を有する楕円体である、請求項 13 に記載の薬学的製剤。

【請求項 16】

前記ナノ粒子が、ポリエチレングリコール置換ポリリジンを含む、請求項 13 に記載の薬学的製剤。

30

【請求項 17】

前記核酸が、30 kb 未満または 30 kbp 未満である、請求項 13 に記載の薬学的製剤。

【請求項 18】

前記眼障害が、ぶどう膜炎、緑内障、黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜症、加齢性黄斑変性症、強膜炎、視神経変性、地図状萎縮、脈絡膜疾患、眼サルコイドーシス、視神経炎、脈絡膜血管新生、眼癌、網膜色素変性症、若年発症黄斑変性症、遺伝性失明障害、後眼部に影響を与える自己免疫疾患、網膜炎および角膜潰瘍からなる群から選択される、請求項 13 に記載の薬学的製剤。

40

【請求項 19】

前記眼障害が、脈絡膜血管新生、脈絡膜血管増殖、ポリープ状脈絡膜血管症、中心性漿液性脈絡膜症、多巣性脈絡膜症および脈絡膜ジストロフィーからなる群から選択される、請求項 13 に記載の薬学的製剤。

【請求項 20】

前記核酸が、眼内で転写されて転写物を形成し、前記転写物のうちの少なくとも 1 つが翻訳されてタンパク質を発現する、請求項 13 に記載の薬学的製剤。

【請求項 21】

前記核酸が、眼内で転写されて転写物を形成し、前記転写物のうちの少なくとも 1 つが

50

アンチセンス転写物である、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【請求項 2 2】

前記アンチセンス転写物が、眼内で内在性タンパク質の合成を阻害する、請求項 2 1 に記載の薬学的製剤。

【請求項 2 3】

前記アンチセンス転写物が、眼内でドミナントネガティブ変異を有する内在性タンパク質の合成を阻害する、請求項 2 1 に記載の薬学的製剤。

【請求項 2 4】

前記アンチセンス転写物が、眼内でドミナントネガティブ変異を有する内在性ロドプシントタンパク質の合成を阻害する、請求項 2 1 に記載の薬学的製剤。

10

【請求項 2 5】

前記核酸が、眼内で翻訳されてタンパク質を発現する、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【請求項 2 6】

前記核酸が、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、抗血管新生因子、および抗体または抗体断片もしくは抗体構築物からなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【請求項 2 7】

前記核酸が、ABCA4、MYO7A、ND4、GUCY2D、RPE65、色素上皮由来因子(PEDF)、sFlt-1、ABCA、BEST、CORF、CA、CERKL、CHM、CLRN、CNGA、CNGB、CRB、CRX、DHDDS、EYS、FAMA、FSCN、GUCAB、IDHB、IMPDH、IMPG、KLHL、LRAT、MAK、MERTK、NRE、NRL、OFD、PDEA、PDEB、PDEG、PRCD、PROM、PRPF、PRPH、PRPH2、RBP、RDH、RGR、RHO、RLBP、ROM、RP、RPE、RPGR、RS1、SAG、SEMAA、SNRNP、SPATA、TOPORS、TTC、TULP、USHA、ZNF、ABHD12、CDH23、CIB2、CLRN1、DFNB31、GPR98、HARS、MYO7A、PCDH15、USH1C、USH1G、USH2A、ARL6、BBS1、BBS2、BBS4、BBS5、BBS7、BBS9、BBS10、BBS12、CEP290、INPP5E、LZTFL1、MKKS、MKS1、SDCCAG8、TRIM32、TTC8、エンドスタチンおよびアンジオスタチンからなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

20

30

【請求項 2 8】

前記核酸が、野生型タンパク質をコードし、前記タンパク質の変異型が、網膜色素変性症を引き起こす、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【請求項 2 9】

前記核酸が、野生型タンパク質をコードし、前記タンパク質の変異型が、遺伝性失明障害を引き起こす、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 0】

前記核酸が、野生型タンパク質をコードし、前記タンパク質の変異型が、眼疾患を引き起こす、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

40

【請求項 3 1】

前記核酸が、DNAである、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 2】

前記核酸が、RNAである、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 3】

前記眼疾患が、後天性である、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 4】

中空マイクロニードルを介して前記SCSに投与される、請求項 1 3 に記載の薬学的製剤。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

## 発明の技術分野

本発明は、遺伝子治療の分野に関する。特に、眼に対する遺伝子治療に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

## 発明の背景

眼疾患の治療において、遺伝子治療の普及を妨げてきた課題として、眼への核酸の効果的かつ長期的な導入と発現がある。当技術分野では、眼に大きな損傷を引き起こすことのない、核酸の効果的な導入および長期間にわたる発現のための方法を開発することが、継続的に必要とされている。

10

## 【発明の概要】

## 【0003】

本発明の一態様では、哺乳動物の眼に核酸を投与するための方法が提供される。哺乳動物の眼の上脈絡膜腔（SCS）に、ある量の製剤を非外科的に投与する。製剤は、電荷中性核酸ナノ粒子を含み、そのそれぞれが、その最小可能サイズに圧縮されている単一分子の核酸を含む。

## 【0004】

本発明の一態様によれば、哺乳動物の眼障害を治療する方法は、哺乳動物の眼の上脈絡膜腔（SCS）に、ある量の製剤を非外科的に投与する段階を含む。投与される量は、眼障害に対する治療反応を誘発するのに十分である。製剤は、電荷中性の核酸ナノ粒子を含み、そのそれぞれが、その最小可能サイズに圧縮されている単一分子の核酸を含む。

20

## 【0005】

これらの態様および本明細書を読むことで当業者に明らかとなる他の態様は、眼に大きな損傷を引き起こすことなく眼障害を治療する方法を当技術分野に提供する。

## [本発明1001]

哺乳動物の眼に核酸を投与する方法であって、  
前記哺乳動物の眼の上脈絡膜腔（SCS）に、ある量の製剤を非外科的に投与する段階を含み、  
前記製剤は、電荷中性核酸ナノ粒子を含み、前記ナノ粒子はそれぞれ、その最小可能サイズに圧縮されている単一分子の核酸を含む、  
 方法。

30

## [本発明1002]

前記ナノ粒子が、楕円体である、本発明1001の方法。

## [本発明1003]

前記ナノ粒子が、ロッドである、本発明1001の方法。

## [本発明1004]

前記ナノ粒子が、30nm未満の短径を有する楕円体である、本発明1001の方法。

## [本発明1005]

前記ナノ粒子が、20nm未満の短径を有する楕円体である、本発明1001の方法。

40

## [本発明1006]

前記ナノ粒子が、7~12nmの直径を有するロッドである、本発明1001の方法。

## [本発明1007]

前記ナノ粒子が、ポリエチレングリコール置換ポリリジンを含む、本発明1001の方法。

## [本発明1008]

前記核酸が、30kb未満または30kbp未満である、本発明1001の方法。

## [本発明1009]

前記核酸が、転写されて転写物を形成し、前記転写物のうちの少なくとも1つが翻訳されてタンパク質を発現する、本発明1001の方法。

## [本発明1010]

50

前記核酸が、転写されて転写物を形成し、前記転写物のうちの少なくとも1つがアンチセンス転写物である、本発明1001の方法。

[本発明1011]

前記核酸が、翻訳されてタンパク質を発現する、本発明1001の方法。

[本発明1012]

前記核酸が、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、抗血管新生因子、および抗体または抗体断片もしくは構築物からなる群から選択されるタンパク質をコードする、本発明1001の方法。

[本発明1013]

前記核酸が、DNAである、本発明1001の方法。

10

[本発明1014]

前記核酸が、RNAである、本発明1001の方法。

[本発明1015]

前記製剤が、中空マイクロニードルを介して前記SCSに投与される、本発明1001の方法。

[本発明1016]

哺乳動物の眼障害を治療する方法であって、

前記哺乳動物の眼の上脈絡膜腔(SCS)に、ある量の製剤を非外科的に投与する段階を含み、

前記量は、前記眼障害に対する治療反応を誘発するのに十分であり、前記製剤は、電荷中性核酸ナノ粒子を含み、前記ナノ粒子はそれぞれ、その最小可能サイズに圧縮された単一分子の核酸を含む、  
方法。

20

[本発明1017]

前記ナノ粒子が、楕円体である、本発明1016の方法。

[本発明1018]

前記ナノ粒子が、ロッドである、本発明1016の方法。

[本発明1019]

前記ナノ粒子が、30nm未満の短径を有する楕円体である、本発明1016の方法。

[本発明1020]

前記ナノ粒子が、20nm未満の短径を有する楕円体である、本発明1016の方法。

30

[本発明1021]

前記ナノ粒子が、7~12nmの直径を有するロッドである、本発明1016の方法。

[本発明1022]

前記ナノ粒子が、ポリエチレングリコール置換ポリリジンを含む、本発明1016の方法。

[本発明1023]

前記核酸が、30kb未満または30kbp未満である、本発明1016の方法。

[本発明1024]

前記哺乳動物が、ぶどう膜炎、緑内障、黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜症、加齢性黄斑変性症、強膜炎、視神経変性、地図状萎縮、脈絡膜疾患、眼サルコイドーシス、視神経炎、脈絡膜血管新生、眼癌、網膜色素変性症、若年発症黄斑変性症、遺伝性疾患、後眼部に影響を与える自己免疫疾患、網膜炎および角膜潰瘍からなる群から選択される眼障害を有する、本発明1016の方法。

40

[本発明1025]

前記哺乳動物が、脈絡膜血管新生、脈絡膜血管増殖、ポリープ状脈絡膜血管症、中心性漿液性脈絡膜症、多巣性脈絡膜症および脈絡膜ジストロフィーからなる群から選択される眼障害を有する、本発明1016の方法。

[本発明1026]

前記核酸が、転写されて転写物を形成し、前記転写物のうちの少なくとも1つが翻訳されてタンパク質を発現する、本発明1016の方法。

50

[本発明1027]前記核酸が、転写されて転写物を形成し、前記転写物のうちの少なくとも1つがアンチセンス転写物である、本発明1016の方法。[本発明1028]前記アンチセンス転写物が、内在性タンパク質の合成を阻害する、本発明1027の方法。[本発明1029]前記アンチセンス転写物が、ドミナントネガティブ変異を有する内在性タンパク質の合成を阻害する、本発明1027の方法。[本発明1030]前記アンチセンス転写物が、ドミナントネガティブ変異を有する内在性ロドプシンタンパク質の合成を阻害する、本発明1027の方法。

10

[本発明1031]前記核酸が、翻訳されてタンパク質を発現する、本発明1016の方法。[本発明1032]前記核酸が、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、抗血管新生因子、および抗体または抗体断片もしくは構築物からなる群から選択されるタンパク質をコードする、本発明1016の方法。[本発明1033]前記核酸が、ABCA4、MYO7A、ND4、GUCY2D、RPE65、色素上皮由来因子(PEDF)、sFlt-1、ABCA、BEST、CORF、CA、CERKL、CHM、CLRN、CNGA、CNGB、CRB、CRX、DHDDS、EYS、FAMA、FSCN、GUCAB、IDHB、IMPDH、IMPG、KLHL、LRAT、MAK、MERTK、NRE、NRL、OFD、PDEA、PDEB、PDEG、PRCD、PROM、PRPF、PRPH、PRPH2、RBP、RDH、RGR、RHO、RLBP、ROM、RP、RPE、RPGR、RS1、SAG、SEMAA、SNRNP、SPATA、TOPORS、TTC、TULP、USHA、ZNF、ABHD12、CDH23、CIB2、CLRN1、DFNB31、GPR98、HARS、MYO7A、PCDH15、USH1C、USH1G、USH2A、ARL6、BBS1、BBS2、BBS4、BBS5、BBS7、BBS9、BBS10、BBS12、CEP290、INPP5E、LZTFL1、MKKS、MKS1、SDCCAG8、TRIM32、TTC8、エンドスタチンおよびアンジオスタチンからなる群から選択されるタンパク質をコードする、本発明1016の方法。

20

30

[本発明1034]前記核酸が、野生型タンパク質をコードし、前記タンパク質の変異型が、網膜色素変性症を引き起こす、本発明1016の方法。[本発明1035]前記核酸が、野生型タンパク質をコードし、前記タンパク質の変異型が、遺伝性失明障害を引き起こす、本発明1016の方法。[本発明1036]前記核酸が、野生型タンパク質をコードし、前記タンパク質の変異型が、眼疾患を引き起こす、本発明1016の方法。

40

[本発明1037]前記核酸が、DNAである、本発明1016の方法。[本発明1038]前記核酸が、RNAである、本発明1016の方法。[本発明1039]前記眼疾患が、後天性である、本発明1016の方法。[本発明1040]前記製剤が、中空マイクロニードルを介して前記SCSに投与される、本発明1016の方法。

【図面の簡単な説明】

50

## 【 0 0 0 6 】

【図 1】ルシフェラーゼ遺伝子のナノ粒子を上脈絡膜（SC）または網膜下（SR）に注入した後のウサギの眼の脈絡膜の分析を示す。ナノ粒子は、ナノ粒子の作成時に使用された対イオンに応じて、ロッドまたは楕円体の形状であった。ネガティブコントロール群は、生理食塩水の SC 投与を受けた。OS（左眼）は、注入された左眼を表し、OD（右眼）はコントロールの右眼を表す。

【図 2】ルシフェラーゼ遺伝子のナノ粒子を上脈絡膜（SC）または網膜下（SR）に注入した後のウサギの眼の網膜の分析を示す。ナノ粒子は、ナノ粒子の作成時に使用された対イオンに応じて、ロッドまたは楕円体の形状であった。ネガティブコントロール群は、生理食塩水の SC 投与を受けた。OS（左眼）は、注入された左眼を表し、OD（右眼）はコントロールの右眼を表す。

10

【図 3】常染色体劣性網膜色素変性症（RP）の変異を示す。

【図 4】常染色体優性網膜色素変性症（RP）の変異を示す。

【図 5】X連鎖性網膜色素変性症（RP）の変異を示す。

【図 6 A】サル網膜のルシフェラーゼ活性の分析を示す。

【図 6 B】図 6 A のデータの統計分析を示す。

【図 7 A】サル虹彩のルシフェラーゼ活性の分析を示す。

【図 7 B】図 7 A のデータの統計分析を示す。

【図 8 A】サル角膜上皮のルシフェラーゼ活性の分析を示す。

【図 8 B】図 8 A のデータの統計分析を示す。

20

【図 9 A】サル毛様体のルシフェラーゼ活性の分析を示す。

【図 9 B】図 9 A のデータの統計分析を示す。

【図 10 A】脈絡膜 - 網膜色素上皮（RPE）のルシフェラーゼ活性の分析を示す。

【図 10 B】図 10 A のデータの統計分析を示す。

【図 11 - 1】図 6 A ~ 図 10 B に示された各動物および組織の生データである。

【図 11 - 2】図 6 A ~ 図 10 B に示された各動物および組織の生データである。

【図 11 - 3】図 6 A ~ 図 10 B に示された各動物および組織の生データである。

【図 11 - 4】図 6 A ~ 図 10 B に示された各動物および組織の生データである。

【図 11 - 5】図 6 A ~ 図 10 B に示された各動物および組織の生データである。

【図 11 - 6】図 6 A ~ 図 10 B に示された各動物および組織の生データである。

30

【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 0 7 】

## 発明の詳細な説明

本発明者らは、電荷中性ナノ粒子の上脈絡膜への送達を含む、眼障害を治療する方法を開発し、ナノ粒子はそれぞれ、その最小可能サイズに圧縮された単一分子の核酸を含む。簡潔に、製剤は哺乳動物の眼の（SCS）に非外科的に投与される。典型的に、哺乳動物は眼障害を有する。望ましくは、ナノ粒子は、眼障害に対する治療反応を誘発するのに十分な量で送達される。

## 【 0 0 0 8 】

ナノ粒子が形成される条件によって、異なる形状のナノ粒子が得られる。例えば、ポリリジンなどの核酸の凝縮に使用されるポリカチオンに酢酸の対イオンを使用すると、ロッド状のナノ粒子が得られる。ポリカチオンへの対イオンとしてトリフルオロ酢酸を使用すると、楕円体状のナノ粒子が得られる。楕円体の短径は、典型的に、45 nm 未満、40 nm 未満、35 nm 未満、30 nm 未満、25 nm 未満、または 20 nm 未満であるが、15 nm 超である。ロッドの直径は、典型的に、8 ~ 11 nm、7 ~ 12 nm、または 6 ~ 13 nm である。他のカチオンを使用して、有利または有用であり得る形状を達成することができる。例えば、米国特許第 8,017,577 号を参照されたい（その開示は明示的に組み込まれる）。核酸の電荷を中和するために使用されるポリカチオンは、有利な特性を達成するために修飾されてもよい。例えば、ポリリジンは、ポリエチレングリコールで置換され得る。これにより、そのように作製されたナノ粒子の発現、送達、または安

40

50

定性が向上する可能性がある。

【0009】

ナノ粒子にされる核酸は、ウイルスベクターを使用する場合ほどサイズ制限されない。しかし、核に効率的に到達できるように、ナノ粒子自体が十分に小さいことが望ましい。一部の実施形態では、核酸は、30 kb未満または30 kbp未満である。他では、核酸は、25 kb未満または25 kbp未満、20 kb未満または20 kbp未満、15 kb未満または15 kbp未満、10 kb未満または10 kbp未満、5 kb未満または5 kbp未満、あるいは1 kb未満または1 kbp未満であってもよい。典型的には、核酸は、少なくとも0.5 kbpまたは0.5 kb、少なくとも1 kbまたは1 kbp、少なくとも5 kb、または少なくとも5 kbpである。核酸は、RNAまたはDNAから構成されてもよく、二本鎖または一本鎖であってもよく、または修飾された塩基または骨格を含む核酸誘導体を含んでいてもよい。

10

【0010】

眼障害は、本発明に従って治療することができる。例えば、ぶどう膜炎、緑内障、黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜症、加齢性黄斑変性症、強膜炎、視神経変性、地図状萎縮、脈絡膜疾患、眼サルコイドーシス、視神経炎、脈絡膜血管新生、眼癌、網膜色素変性症、若年発症黄斑変性症、遺伝性疾患、後眼部に影響を与える自己免疫疾患、網膜炎および角膜潰瘍が挙げられるが、これらに限定されない。これらには、脈絡膜血管新生、脈絡膜血管増殖、ポリープ状脈絡膜血管症、中心性漿液性脈絡網膜症、多巣性脈絡膜症または脈絡膜ジストロフィーなどの脈絡膜障害も含まれるが、これらに限定されない。ナノ粒子の搭載物は、疾患によって異なる場合がある。搭載物は、例えば、治療用タンパク質、抑制性タンパク質、または症状改善タンパク質をコードしてもよく、または搭載物は、抑制性RNAであってもよい。

20

【0011】

眼のイメージングは、開示された方法によって送達されたマーカーの検出によって増強または達成することができる。マーカーは、例えば、蛍光性、放射性、発色性、または酵素性であり得る。イメージング技術は、走査型レーザー検眼鏡(SLO)、走査型レーザー偏光計、光干渉断層撮影(OCT)、超音波、MRI、および血管造影を含むがこれらに限定されず、当技術分野で既知の任意のものでよい。検出可能な実体は、例えば、核酸、または転写されたタンパク質によって産生される産物であり得る。

30

【0012】

核酸は、転写されて転写物を形成してもよく、転写物のうちの少なくとも1つは、翻訳されてタンパク質を発現してもよい。代替の実施形態では、送達された核酸自体が翻訳されてタンパク質を発現する。したがって、転写物は、治療用タンパク質をコードし、好ましくは、コード配列に対して好適な位置に配置されたプロモーターなどの、転写に必要な配列の特徴を有する。あるいは、核酸が転写されて、有害な内在性転写物に対してアンチセンスである転写物を形成してもよい。アンチセンス転写物は、眼障害に悪影響を与える内在性タンパク質の合成を阻害することができる。例えば、アンチセンス転写物は、ドミナントネガティブ変異を有する内在性タンパク質の合成を阻害することができる。一実施形態では、アンチセンス転写物は、ドミナントネガティブ変異を有する内在性ロドプシンタンパク質の合成を阻害し得る。

40

【0013】

核酸がタンパク質をコードする場合、それは、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、抗血管新生因子、または抗体または抗体断片もしくは構築物であるタンパク質であり得る。この方法で使用され得る特定のタンパク質には、ABCA4、MYO7A、ND4、GUCY2D、RPE65、色素上皮由来因子(PEDF)、sFlt-1、ABCA、BEST、CORF、CA、CERKL、CHM、CLRN、CNGA、CNGB、CRB、CRX、DHDDS、EYS、FAMA、FSCN、GUCAB、IDHB、IMPDH、IMPG、KLHL、LRAT、MAK、MERTK、NRE、NRL、OFD、PDEA、PDEB、PDEG、PRCD、PROM、PRPF、PRPH、PRPH2、

50

RBP、RDH、RGR、RHO、RLBP、ROM、RP、RPE、RPGR、RS1、SAG、SEMAA、SNRNP、SPATA、TOPORS、TTC、TULP、USHA、ZNF、ABHD12、CDH23、CIB2、CLRN1、DFNB31、GPR98、HARS、MYO7A、PCDH15、USH1C、USH1G、USH2A、ARL6、BBS1、BBS2、BBS4、BBS5、BBS7、BBS9、BBS10、BBS12、CEP290、INPP5E、LZTFL1、MKKS、MKS1、SDCCAG8、TRIM32、TTC8、エンドスタチン、およびアンジオスタチンが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0014】

一部の実施形態では、核酸は、野生型タンパク質をコードし、その変異型は、眼疾患を引き起こすか、または悪化させる。一部の実施形態では、核酸は、野生型タンパク質をコードし、その変異型は、遺伝性失明障害を引き起こすか、または一因となる。一部の実施形態では、核酸は、野生型タンパク質をコードし、その変異型は、網膜色素変性症を引き起こすか、または重症度に寄与する。図3～5に、網膜色素変性症において変異しているいくつかの遺伝子を示す。一部の実施形態では、治療される眼疾患は後天性であり、一部は遺伝性である。

10

#### 【0015】

本明細書で使用される場合、「非外科的」な眼核酸送達法は、全身麻酔および/または球後麻酔（球後ブロックとも呼ばれる）を必要としない核酸送達法を指す。あるいは、またはさらに、「非外科的」な眼核酸送達方法は、28ゲージ以下の直径を有する器具を用いて行われる。あるいは、またはさらに、「非外科的」な眼核酸送達方法は、シャントまたはカニューレを介した眼核酸送達に典型的に必要とされるガイダンス機構を必要としない。

20

#### 【0016】

本明細書に記載の非外科的眼障害の治療法は、眼の後部領域、例えば、網膜脈絡膜組織、黄斑、網膜色素上皮（RPE）および後眼部の視神経、への核酸の局所送達に特に有用である。別の実施形態では、本明細書で提供される非外科的方法およびマイクロニードルを使用して、眼内または隣接組織内の特定の後眼部組織または領域への核酸送達をターゲティングすることができる。一実施形態では、本明細書に記載の方法は、強膜、脈絡膜、ブルッフ膜、網膜色素上皮、網膜下腔、網膜、黄斑、視神経乳頭、視神経、毛様体、線維柱帯網、眼房水、硝子体液、および/または治療を必要とするヒト対象の眼のその他の眼組織または隣接組織へ、特異的に核酸を送達する。一実施形態では、この方法を使用して、眼内または隣接組織内の特定の後眼部組織または領域への核酸の送達をターゲティングすることができる。

30

#### 【0017】

一実施形態では、有効量の核酸をSCSに投与することで、同一の用量を硝子体内、局所的、前房内、非経口的または経口的に投与する場合の核酸の治療効果と比較して、核酸のより高い治療効果が得られる。一実施形態では、本明細書に記載されるマイクロニードル核酸送達方法は、治療を必要とする後眼部組織近傍への引き続く局所送達のために、核酸をSCSに正確に送達する。核酸は、非外科的核酸投与が完了した後、注入された製剤またはナノ粒子から、例えば、数時間または数日または数週間または数か月の長期間にわたって、眼組織に放出されてもよい。これは、有益なことに、例えば、眼組織表面への核酸製剤の局所適用による送達と比べて、核酸の生物学的利用率を増加させ、または同じ核酸投与量の経口、非経口の硝子体内投与と比較して、生物学的利用率を増加させ得る。

40

#### 【0018】

本明細書に記載の方法とマイクロニードルデバイスを使用すると、SCS核酸導入法により、眼組織への挿入深度の正確な制御が有利に可能となり、マイクロニードル先端を眼に配置することで、核酸製剤が上脈絡膜腔に、一部の実施形態ではSCS周囲の後眼部組織に流入する。一実施形態では、マイクロニードルの挿入は眼の強膜中である。一実施形態では、SCSへの核酸の流入は、脈絡膜や網膜組織などの基底の組織にマイクロニード

50

ルを接触させることなく達成される。

【0019】

本明細書で提供される方法は、一実施形態では、核酸が上脈絡膜腔に導入され、それによって、局所、非経口、前房内、または硝子体内の核酸送達では得られないような、核酸の後眼部組織への到達を可能にする。本明細書で提供される方法は、後眼部障害または脈絡膜疾患の治療のために後眼部組織に核酸を送達することから、本明細書で提供される方法を用いて治療されるヒト対象において治療反応を達成するのに十分な脈絡膜上の核酸投与量は、同じまたは実質的に同じ治療反応を引き出すのに十分な硝子体内、局所、非経口または経口の核酸投与量よりも少ない。一実施形態では、本明細書に記載のSCS送達方法は、同じまたは実質的に同じ治療反応を引き出すのに十分な硝子体内、局所、前房内、非経口または経口の核酸投与量と比較して、後眼部障害を治療する核酸または脈絡膜疾患を治療する核酸の、核酸投与量を減少させることを可能にする。さらなる実施形態では、治療反応を誘発するのに十分な上脈絡膜の核酸投与量は、治療反応を誘発するのに十分な硝子体内、局所、非経口または経口核酸用量より75%以下、または50%以下、または25%以下である。一実施形態では、治療反応は、患者が治療を受けている後眼部障害および脈絡膜疾患にかかわらず、眼障害の症状/臨床徴候の重症度の低下であり、または、患者が治療を受けている後眼部障害および脈絡膜疾患の症状(複数可)/臨床徴候(複数可)の数の減少である。

10

【0020】

用語「上脈絡膜腔(suprachoroidal space)」は、suprachoroidal、SCS、suprachoroidおよびsuprachoroidiaと交換可能に使用され、強膜と脈絡膜の間に配置された眼の領域における潜在的な空間を意味する。この領域は主に、2つの隣接する組織のそれぞれに由来する長い色素突起の密に詰まった層で構成されているが、上脈絡膜腔および隣接する組織に液体またはその他の物質が蓄積した結果として、この領域に空間が形成され得る。「上毛様体腔(supraciliary space)」は、SCSによって覆われ、毛様体、線維柱帯網および角膜縁に隣接するSCSの最も前側の部分を指す。当業者は、眼の上脈絡膜腔が、眼のいくつかの病状、または何らかの外傷もしくは外科的介入の結果としての体液の蓄積によって、しばしば拡大することを理解するであろう。ただし、本記載では、核酸製剤の上脈絡膜への注入による上脈絡膜腔(核酸製剤で満たされる)の生成によって、液体の蓄積が意図的に作り出される。理論に縛られないことを望むとして、SCS領域は、ぶどう膜強膜流出(すなわち、眼のある領域から他方の領域へ液体を移動させる眼の自然なプロセス)のための経路として機能し、強膜からの脈絡膜剥離の例では、実際の空間になると考えられている。

20

30

【0021】

本明細書で使用される場合、「眼組織」および「眼」は、前眼部(すなわち、水晶体の前の眼の部分)と後眼部(すなわち、水晶体の後ろの眼の部分)の両方を含む。前眼部は、角膜と水晶体で囲まれ、後眼部は強膜と水晶体で囲まれている。前眼部はさらに、虹彩と角膜の間の前眼房と、水晶体と虹彩の間の後眼房に細分化される。前眼部の強膜の露出部分は、結膜と呼ばれる透明な膜によって保護されている。強膜の基底には、脈絡膜および網膜があり、網膜脈絡膜組織と総称されている。脈絡膜と強膜の間の疎性結合組織または潜在的な空間は、上脈絡膜腔(SCS)と呼ばれる。角膜は、上皮、ボウマン層、角膜実質、デスメ膜、および内皮から構成されている。周囲のテノン嚢または結膜、上脈絡膜腔、脈絡膜、および網膜を有する強膜は、それぞれ上脈絡膜腔内に流体が存在しない場合と存在する場合の両方で。

40

【0022】

本明細書で提供される方法で、有用なデバイスおよび投与方法は、当該技術分野において既知であり、例えば、WO2017/192565、WO2014/179698、WO2014/074823、WO2011/139713、WO2007/131050、およびWO2007/004874が挙げられ、あらゆる目的のために、その各々の全

50

体が参照により本明細書に組み込まれる。この方法は、例えば、硬質マイクロニードルなどの中空または中実マイクロニードルで行ってもよい。用語「マイクロニードル」は、強膜もしくはその他の眼組織への挿入に適した基部、シャフト、および先端を有し、かつ本明細書に記載の低侵襲での挿入や核酸製剤の注入に適した寸法を有する導管本体を意味するもので、WO 2017/192565、WO 2014/179698、WO 2014/074823、WO 2011/139713、WO 2007/131050、WO 2007/004874に記載されている通りであり、その各々の全体が、あらゆる目的のために、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、マイクロニードルの長さまたは有効長は、約2000ミクロンを超えず、および直径は、約600ミクロンを超えない。マイクロニードルの「長さ」および「有効長」は両方とも、マイクロニードルのシャフトの長さおよびマイクロニードルのベベル高を包含する。

10

#### 【0023】

用語「中空」とは、マイクロニードルの中心を通る単一のストレートボア、ならびに複数のボア（ボア（複数可）からの複数の入口や出口点、およびボアの交差またはネットワークなどマイクロニードルを通る複雑な流路をたどるボア）を指す。すなわち、中空マイクロニードルは、マイクロニードルの基部から、シャフトの出口点（開口部）および/または基部に対して遠位のマイクロニードルの先端部分への、1つ以上の連続経路を含む構造を有する。

#### 【0024】

マイクロニードルデバイスは、例えば、溶液または懸濁液としての核酸製剤を含むための流体リザーバをさらに含んでもよく、核酸リザーバは、マイクロニードルの先端に対して遠位の位置でマイクロニードルのボアと動作可能的に連絡している。流体リザーバは、マイクロニードルと一体であるか、細長い本体と一体であるか、またはマイクロニードルと細長い本体の両方から分離されていてもよい。

20

#### 【0025】

マイクロニードルは、金属、ガラス、半導体材料、セラミック、ポリマーなど、異なった生体適合性材料で形成/構築可能である。好適な金属の例としては、医薬品グレードのステンレス鋼、金、チタン、ニッケル、鉄、金、スズ、クロム、銅、およびそれらの合金が挙げられる。ポリマーは、生分解性または非生分解性であり得る。好適な生体適合性、生分解性ポリマーの例としては、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリラクチド-コ-グリコリド（PLGA）、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリエーテルエステル、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリウレタン、およびそれらのコポリマーとブレンドが挙げられる。代表的な非生分解性ポリマーには、医療用デバイスの製作で知られているさまざまな熱可塑性物質または他の高分子構造材料が含まれる。例としては、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリレート、エチレンビニルアセテートのポリマーおよび他のアシル置換セルロースアセテート、非分解性ポリウレタン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニル、ポリ（ビニルイミダゾール）、クロロスルホン化ポリオレフィン、ポリエチレンオキシド、ブレンドおよびそれらのコポリマーが挙げられる。生分解性マイクロニードルは、非生分解性マイクロニードルと比較して安全性のレベルを高めることができるため、偶発的に眼組織に折れ込んでも、本質的に無害である。

30

40

#### 【0026】

マイクロニードルは、当該技術分野で既知のさまざまな方法によって、または以下の例に記載されているように製造することができる。一実施形態では、中空マイクロニードルは、レーザーまたは類似の光エネルギー源を使用して製造される。一例では、マイクロカニューレは、所望のマイクロニードルの長さを表すためにレーザーを使用して切断してもよい。また、レーザーを、単一または複数のチップの開口部を成形するために使用してもよい。単一または複数の切断を単一のマイクロカニューレで行って、所望のマイクロニードル構造を形作ることができる。一例では、マイクロカニューレは、ステンレス鋼などの金属で作製することができ、光スペクトルの赤外領域の波長（例えば、約0.7~約30

50

0 μm) を有するレーザーを使用して切断してもよい。当業者によく知られている金属電解研磨技術を使用して、さらに改良することができる。別の実施形態において、マイクロニードルの長さおよび任意のベベルは、例えば、移動する研磨面に対して金属カニューレを研削することを含み得る、物理的な研削プロセスによって形成される。製造プロセスはさらに、精密研削、マイクロビーズジェットブラストおよび超音波洗浄を含み、マイクロニードルの所望の正確な先端の形状を形成することができる。

#### 【0027】

可能な製造技術のさらなる詳細については、例えば、米国特許出願公開第2006/0086689号、米国特許出願公開第2006/0084942号、米国特許出願公開第2005/0209565号、米国特許出願公開第2002/0082543号、米国特許第6,334,856号、米国特許第6,611,707号、米国特許第6,743,211号に記載されており、これらすべてについて、その全体が、あらゆる目的のために、参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0028】

本明細書で提供される方法は、上脈絡膜への核酸送達、他の非外科的（例えば、従来の針）および外科的アプローチよりも優れた低侵襲性の非外科的な様式で達成されることを可能にする。例えば、一実施形態では、本明細書で提供される方法は、1つ以上のマイクロニードルの使用を介して実行される。一実施形態では、マイクロニードルは、垂直に、または約80度～約100度の角度で、眼中、例えば強膜中に挿入され、短い貫通距離で上脈絡膜腔に到達する。これとは対照的に、長い従来の針やカニューレは急角度で上脈絡膜腔に接近しなければならず、強膜やその他の眼組織を通るより長い貫通経路を取り、方法の侵襲性を高め、針跡のサイズや、結果的に、感染および/または血管破裂のリスクを増大させる。そのような長い針では、本明細書に記載のマイクロニードルのアプローチと比較して、刺入深度を正確に制御する能力が低下する。

20

#### 【0029】

一実施形態では、マイクロニードルは、2つ以上のマイクロニードルのアレイの一部であり、この方法は、さらに、強膜を貫通することなく、少なくとも第2のマイクロニードルを強膜に挿入することを含む。一実施形態では、2つ以上のマイクロニードルのアレイが眼組織に挿入される場合、2つ以上のマイクロニードルのそれぞれの核酸製剤は、核酸、製剤、核酸製剤の容量/量、またはこれらのパラメータの組み合わせにおいて、互いに同じまたは異なっているもよい。ある場合では、異なるタイプの核酸製剤が、1つ以上のマイクロニードルを介して注入されてもよい。例えば、第2の核酸製剤を含む第2の中空マイクロニードルを眼組織に挿入すると、第2の核酸製剤が眼組織に送達される。

30

#### 【0030】

一部の実施形態では、ここで使用されるマイクロニードルデバイスは、流体、組織、または分子サンプルなどの物質を眼から除去するように適合させることができる。しかしながら、当業者は、他のタイプのマイクロニードル（例えば、中実マイクロニードル）および核酸製剤を上脈絡膜腔および後眼部組織に送達する他の方法が、送達方法の代わりにまたはそれと組み合わせて使用され得ることを理解するであろう。非限定的な例としては、少なくとも部分的に、マイクロニードルから核酸製剤のコーティングを溶解すること、少なくとも部分的に、マイクロニードルから核酸製剤のコーティングを剥離すること（例えば、実質的に無傷のスリーブとしてまたは断片として）、マイクロニードルをマイクロニードルが一体的に形成または連結されている基部から破壊または溶解すること、もしくはこれらの任意の組み合わせが含まれる。

40

#### 【0031】

治療される哺乳動物は、例えば、ウサギ、霊長類、有蹄動物、ウシ、ブタ、イヌ、またはヒトであり得る。治療されるヒト対象は、大人でも子供でもよい。本明細書に記載の方法で、後眼部障害や脈絡膜疾患などの広範囲の眼障害を治療することができる。当該方法による治療に適した後眼部障害の例としては、ぶどう膜炎、緑内障、黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜症、加齢性黄斑変性症（例えば、滲出型AMDまたは萎縮型AMD）、網

50

膜色素変性症、若年発症黄斑変性症、強膜炎、視神経変性、地図状萎縮、脈絡膜疾患、眼サルコイドーシス、視神経炎、脈絡膜血管新生、眼癌、遺伝性疾患（複数可）、後眼部に影響を与える自己免疫疾患、網膜炎（例えば、サイトメガロウイルス網膜炎）および角膜潰瘍が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の方法、デバイス、および核酸製剤による治療に適した後部眼障害は、急性または慢性であり得る。例えば、眼疾患は、急性または慢性ぶどう膜炎であり得る。ぶどう膜炎は、ウイルス、真菌、または寄生虫による感染、眼中の非感染性異物の存在、自己免疫疾患、または外科的もしくは外傷性の損傷によって引き起こされる可能性がある。ぶどう膜炎または他の種類の眼の炎症を引き起こす可能性のある病原性生物によって引き起こされる障害には、トキソプラズマ症、トキソカラ症、ヒストプラズマ症、単純ヘルペスまたは帯状疱疹感染、結核、梅毒、サルコイドーシス、フォークト・小柳・原田症候群、ベーチェット病、特発性網膜血管炎、フォークト・小柳・原田症候群、急性後部多巣性プラコイド色素上皮症（APMPPE）、推定眼ヒストプラズマ症候群（POHS）バードショット脈絡膜症（birdshot chroidopathy）、多発性硬化症、交感性眼炎、点状脈絡膜内層症、毛様体扁平部炎、または虹彩毛様体炎が挙げられるが、これらに限定されない。急性ぶどう膜炎は突然起こり、最長で約6週間続くことがある。慢性ぶどう膜炎は、ぶどう膜炎の一種であり、兆候および/または症状の発症が漸進的であり、症状は約6週間より長く続く。

#### 【0032】

ぶどう膜炎の兆候には、毛様体充血、房水フレア、眼科検査で目視可能な細胞の蓄積、例えば房水細胞、後水晶体細胞、硝子体細胞、角膜後面沈着物、および前房出血が含まれる。ぶどう膜炎の症状には、疼痛（毛様体けいれんなど）、発赤、羞明、流涙の増加、視力の低下などがある。後部ぶどう膜炎は、眼の後部または脈絡膜の部分に影響を与える。眼の脈絡膜部分の炎症は、脈絡膜炎とも呼ばれる。後部ぶどう膜炎は、網膜（網膜炎）または後眼部の血管（血管炎）で発生する炎症とも関連している可能性がある。一実施形態では、本明細書で提供される方法は、それを必要とするぶどう膜炎患者に、患者の眼のSCSにぶどう膜炎治療用核酸の有効量を非外科的に投与することを含む。さらなる実施形態では、ぶどう膜炎治療用核酸をSCSに投与した後、患者は症状の重症度の軽減を経験する。

#### 【0033】

一実施形態では、SCSに送達された核酸製剤により、患者において、炎症、神経保護、補体障害、ドルーゼン形成、瘢痕形成、および/または脈絡毛細管または脈絡膜血管新生の減少が見られる。

#### 【0034】

本明細書に記載の非外科的方法は、眼の後部領域、例えば網脈絡膜組織、黄斑および後眼部の視神経への核酸の局所送達に、特に有用である。一実施形態では、本明細書に記載の非外科的治療方法およびデバイスは、遺伝子ベースの治療用途に使用されてもよい。例えば、この方法は、一実施形態では、核酸製剤を上脈絡膜腔に投与して、選択されたDNA、RNA、またはオリゴヌクレオチドを標的組織に送達することを含む。

#### 【0035】

本明細書に記載の方法は、そのような治療を必要とする患者における脈絡膜疾患の治療に使用することができる。一実施形態では、脈絡膜疾患の治療を必要とする患者は、脈絡膜疾患を治療するための以前の非SCS法に無反応性であった。本明細書に記載の方法、デバイスおよび核酸製剤による治療に適した脈絡膜疾患の例には、脈絡膜血管新生、ポリープ状脈絡膜血管症、中心性漿液性脈絡膜症、多巣性脈絡膜症または脈絡膜ジストロフィー（例えば、中心性回状脈絡膜ジストロフィー、蛇行性脈絡膜ジストロフィーまたは全中心性脈絡膜萎縮症）が挙げられるが、これらに限定されない。脈絡膜疾患については、以下でさらに詳しく説明する。

#### 【0036】

一実施形態では、脈絡膜疾患治療用核酸は、そのような活性を有するタンパク質をコードすることにより、または反対の効果でタンパク質の合成を阻害することにより、血管新

10

20

30

40

50

生阻害剤、血管透過性阻害剤または抗炎症剤の効果を有する。血管新生阻害剤は、一実施形態では、血管内皮増殖因子（VEGF）モジュレーターまたは血小板由来増殖因子（PDGF）モジュレーターである。一実施形態では、脈絡膜疾患の治療方法は、マイクロニードルを介した治療を必要とする患者の片眼または両眼のSCSに核酸製剤を投与することを含む。さらなる実施形態では、マイクロニードルは、先端および開口部を有する中空のマイクロニードルであり、核酸製剤は、中空のマイクロニードルの先端を通して片眼または両眼のSCSに注入される。

#### 【0037】

好適な量の核酸製剤を送達するための所望の注入圧力は、マイクロニードルの挿入の深さおよび核酸製剤の組成によって影響を受ける可能性があることに注意すべきである。例えば、一実施形態では、眼への送達のための核酸製剤が、活性剤またはマイクロバブルをカプセル化するナノ粒子の形態であるか、またはそれを含み、より高い注入圧力が必要となる場合がある。一実施形態では、核酸製剤は、30 nm以下のD<sub>99</sub>を有する懸濁液中の核酸粒子を含む。一実施形態では、核酸製剤は、25 nm以下のD<sub>99</sub>を有する懸濁液中の核酸ナノ粒子を含む。別の実施形態では、核酸製剤は、20 nm以下のD<sub>99</sub>を有する懸濁液中の核酸粒子を含む。

10

#### 【0038】

一実施形態では、SCSに核酸を投与する非外科的方法は、マイクロニードルを眼に挿入した後、および上脈絡膜腔への核酸製剤の注入前および/または注入中に、中空マイクロニードルを部分的に後退させることをさらに含む。特定の実施形態では、マイクロニードルの部分的な後退は、核酸製剤を眼組織に注入するステップの前に行われる。この挿入/後退ステップは、ポケットを形成し、マイクロニードルの先端部分の開口部の眼組織によって妨げられずに、またはあまり妨げられずに、核酸製剤がマイクロニードルから流出することを有利にし得る。このポケットは、核酸製剤で満たすことができるが、核酸製剤が通る導管としても機能し、マイクロニードルからポケットを通過して上脈絡膜腔へと流れ得る。

20

#### 【0039】

核酸製剤をSCSおよび後眼部組織にターゲティングすることにより、核酸が前房の房水にはほとんどまたはまったく送達されることなく、高濃度の核酸を脈絡膜/強膜および網膜に送達することができる。さらに、本明細書で提供される方法は、他の核酸送達方法と比較して、眼内でのより大きな核酸保持を可能にするものであり、例えば、本明細書で提供される方法を介して送達される場合、同一の投与量が前房内、硝子体内、局所、非経口または経口の核酸送達方法を介して送達される場合と比較して、より多くの量の核酸が眼内に保持される。したがって、一実施形態では、本明細書に記載の方法を介して送達された場合の核酸の眼内排出半減期（ $t_{1/2}$ ）は、同じ核酸用量が、硝子体内、前房内、局所的、非経口的または経口的に投与される場合の核酸の眼内 $t_{1/2}$ よりも長くなる。別の実施形態では、核酸の眼内 $C_{max}$ は、本明細書に記載の方法を介して送達される場合、同じ核酸用量が硝子体内、前房内、局所的、非経口的または経口的に投与される場合の核酸の眼内 $C_{max}$ よりも大きい。別の実施形態では、本明細書に記載の方法を介してSCSに投与される場合の核酸の平均眼内曲線下面積（AUC<sub>0-t</sub>）は、硝子体内、前房内、局所的、非経口的または経口的に投与される場合の核酸の眼内AUC<sub>0-t</sub>よりも大きい。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の方法を介してSCSに投与された場合の核酸の眼内ピーク濃度到達時間（ $t_{max}$ ）は、同一の核酸用量が硝子体内、前房内、局所的、非経口的または経口的に投与される場合の核酸の眼内 $t_{max}$ よりも大きい。さらなる実施形態では、核酸は、血管新生阻害剤、抗炎症性核酸（例えば、非炎症性サイトカイン）、VEGFモジュレーター（例えば、VEGFアンタゴニスト）、PDGFモジュレーター（例えば、PDGFアンタゴニスト）、免疫抑制剤、または血管透過性阻害剤をコードする、またはその機能を提供する。

30

40

#### 【0040】

一実施形態では、本明細書で提供される非外科SCS核酸送達方法を介して投与される

50

場合の核酸の眼内  $t_{1/2}$  は、同一の用量が局所的、前房内、硝子体内、経口的または非経口的に投与される場合の核酸の眼内  $t_{1/2}$  よりも長い。さらなる実施形態では、本明細書で提供される非外科的 SCS 核酸送達方法を介して投与される場合の核酸の眼内  $t_{1/2}$  は、同一の用量が局所的、前房内、硝子体内、経口的または非経口的に投与される場合の核酸の眼内  $t_{1/2}$  よりも、約 1.1 倍～約 10 倍長く、または約 1.25 倍～約 10 倍長く、または約 1.5 倍～約 10 倍長く、または約 2 倍～約 5 倍長い。さらなる実施形態では、核酸は、血管新生阻害剤、抗炎症性核酸（例えば、非炎症性サイトカイン）、VEGF モジュレーター（例えば、VEGF アンタゴニスト）、PDGF モジュレーター（例えば、PDGF アンタゴニスト）、免疫抑制剤、または血管透過性阻害剤をコードする、またはその機能を提供する。

10

#### 【0041】

別の実施形態では、核酸の眼内  $C_{max}$  は、本明細書に記載の方法を介して送達される場合、同じ核酸用量が硝子体内、前房内、局所的、非経口的または経口的に投与される場合の核酸の眼内  $C_{max}$  よりも大きい。さらなる実施形態では、本明細書で提供される非外科的 SCS 核酸送達方法を介して投与される場合の核酸の眼内  $C_{max}$  は、同一の用量が局所的、前房内、硝子体内、経口的または非経口的に投与される場合の核酸の眼内  $C_{max}$  よりも、少なくとも 1.1 倍大きい、または少なくとも 1.25 倍大きい、または少なくとも 1.5 倍大きい、または少なくとも 2 倍大きい、または少なくとも 5 倍大きい。一実施形態では、本明細書で提供される非外科的 SCS 核酸送達方法を介して投与される場合の核酸の眼内  $C_{max}$  は、同一の用量が局所的、前房内、硝子体内、経口的または非経口的に投与される場合の核酸の眼内  $C_{max}$  よりも、約 1～約 2 倍大きい、または約 1.25～約 2 倍大きい、または約 1～約 5 倍大きい、または約 1～約 10 倍大きい、または約 2～約 5 倍大きい、または約 2～約 10 倍大きい。さらなる実施形態では、核酸は、血管新生阻害剤、抗炎症性核酸（例えば、非炎症性サイトカイン）、VEGF モジュレーター（例えば、VEGF アンタゴニスト）、PDGF モジュレーター（例えば、PDGF アンタゴニスト）、免疫抑制剤、または血管透過性阻害剤をコードする、またはその機能を提供する。

20

#### 【0042】

別の実施形態では、本明細書に記載の方法を介して SCS に投与される場合の核酸の平均眼内曲線下面積 ( $AUC_{0-t}$ ) は、硝子体内、前房内、局所的、非経口的または経口的に投与される場合の核酸の眼内  $AUC_{0-t}$  よりも大きい。さらなる実施形態では、本明細書で提供される非外科的 SCS 核酸送達方法を介して投与される場合の核酸の眼内  $AUC_{0-t}$  は、同一の用量が局所的、前房内、硝子体内、経口的または非経口的に投与される場合の核酸の眼内  $AUC_{0-t}$  よりも、少なくとも 1.1 倍大きい、または少なくとも 1.25 倍大きい、または少なくとも 1.5 倍大きい、または少なくとも 2 倍大きい、または少なくとも 5 倍大きい。一実施形態では、本明細書で提供される非外科的 SCS 核酸送達方法を介して投与される場合の核酸の眼内  $AUC_{0-t}$  は、同一の用量が局所的、前房内、硝子体内、経口的または非経口的に投与される場合の核酸の眼内  $AUC_{0-t}$  よりも、約 1～約 2 倍大きい、または約 1.25～約 2 倍大きい、または約 1～約 5 倍大きい、または約 1～約 10 倍大きい、または約 2～約 5 倍大きい、または約 2～約 10 倍大きい。さらなる実施形態では、核酸は、血管新生阻害剤、抗炎症性核酸（例えば、非炎症性サイトカイン）、VEGF モジュレーター（例えば、VEGF アンタゴニスト）、PDGF モジュレーター（例えば、PDGF アンタゴニスト）、免疫抑制剤、または血管透過性阻害剤をコードする、またはその機能を提供する。

30

40

#### 【0043】

一実施形態では、有効量の核酸を含む核酸製剤は、SCS に送達されると、ある期間にわたって実質的に SCS 内に保持される。例えば、一実施形態では、核酸製剤の約 80% が SCS に約 30 分、または約 1 時間、または約 4 時間、または約 24 時間、または約 48 時間、または約 72 時間保持される。これに関して、核酸の貯蔵所が SCS および/または周囲組織に形成され、一定期間にわたる核酸の徐放および/または細胞取り込みを可能にする。

50

## 【 0 0 4 4 】

一実施形態では、上脈絡膜腔は、核酸（例えば、核酸ナノ粒子）を装填されると、ある期間にわたって網膜または他の後眼部組織に核酸の徐放を提供する。本明細書に記載の方法による後眼部組織への核酸のターゲティングは、1つ以上の後部眼障害または脈絡膜疾患（例えば、PCV）の治療において、同一の核酸用量の硝子体内、前房内、経口、非経口および局所的送達など、同一の核酸用量の他の投与方法と比較して、より大きな治療効果を可能にする。さらなる実施形態では、SCSに送達される核酸の治療効果は、ヒト対象において同じ治療効果を達成するのに十分な硝子体内、前房内、局所、非経口または経口用量よりも低い用量で達成される。さらに、理論に縛られないことを望んで、本明細書で提供される方法で達成可能なより低い用量は、より高い核酸の用量または上脈絡膜以外の投与経路（例えば、硝子体内、前房内、局所、非経口、経口）を介してヒト患者に送達される同じ核酸の用量と比較して、核酸の副作用の数の減少、および/または1つ以上の副作用（複数可）の重症度の減少をもたらす。例えば、本明細書で提供される方法は、同じ用量の同じ核酸の経口、局所、前房内、非経口または硝子体内投与と比較して、副作用の数の減少、または1つ以上の副作用の重症度もしくは臨床徴候の減少を提供する。一実施形態では、治療される患者において軽減される副作用または臨床徴候は、網膜下滲出および/または網膜下出血である。

10

## 【 0 0 4 5 】

一実施形態では、本明細書で提供される非外科的上脈絡膜核酸送達方法は、同一または類似の核酸用量の経口、非経口および/または硝子体内核酸送達方法と比較して、治療効果の増加および/または治療反応の改善をもたらす。一実施形態では、治療反応を提供するのに十分なSCS核酸用量は、同じまたは実質的に同じ治療反応を提供するのに十分な硝子体内、前房内、局所、経口または非経口の核酸用量の、約90%、または約75%、または約半分（例えば、約半分またはそれ以下）である。別の実施形態では、治療反応を提供するのに十分なSCS用量は、同じまたは実質的に同じ治療反応を提供するのに十分な硝子体内、前房内、局所、経口または非経口核酸用量の約4分の1である。さらに別の実施形態では、治療反応を提供するのに十分なSCS用量は、同じまたは実質的に同じ治療反応を提供するのに十分な硝子体内、前房内、局所、経口または非経口核酸用量の10分の1である。一実施形態では、治療反応は、当業者に既知の方法によって測定されるように、炎症の減少である。別の実施形態では、治療反応は、眼病変の数の減少、または眼病変サイズの減少である。

20

30

## 【 0 0 4 6 】

一実施形態では、圧縮される核酸は、好適なオリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド剤）、ポリヌクレオチド（例えば、治療用DNA）、リボザイム、dsRNA、siRNA、RNAi、遺伝子治療ベクターおよび/またはワクチンから選択される。さらなる実施形態では、核酸はアプタマー（例えば、特異的な標的分子に結合するオリゴヌクレオチドまたはペプチド分子）である。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を介して送達される核酸製剤は、内在性タンパク質もしくはその断片、または内在性ペプチドもしくはその断片をコードする。一実施形態では、本明細書に記載の非外科的治療方法およびデバイスは、遺伝子ベースの治療用途に使用されてもよい。例えば、一実施形態では、方法は、流体核酸製剤を上脈絡膜腔に投与して、選択されたDNA、RNA、またはオリゴヌクレオチドを標的眼組織に送達することを含む。

40

## 【 0 0 4 7 】

一実施形態では、圧縮された核酸は、脈絡膜疾患の治療に有用である。さらなる実施形態では、脈絡膜疾患治療用核酸は、遺伝子発現を阻害するために投与される核酸である。例えば、核酸は、一実施形態では、血管新生に関与する遺伝子を標的とするマイクロRNA（microRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピンRNA（shRNA）または二本鎖RNA（dsRNA）である。一実施形態では、脈絡膜疾患を治療するために本明細書で提供される方法は、それを必要とする患者のSCSにRNA分子を投与することを含む。さらなる実施形態では、RNA分子は、本明細書に記載のマイ

50

クロニードルの1つを介してSCSに送達される。一実施形態において、患者は、PCVの治療を受けており、RNA分子が、HTRA1、CFH、エラスチンまたはARMS2を標的とすることで、RNAの投与時に、患者において標的遺伝子の発現が下方制御される。さらなる実施形態では、標的遺伝子はCFHであり、RNA分子は、rs3753394、rs800292、rs3753394、rs6680396、rs1410996、84664、rs1329428、およびrs1065489から選択される多型を標的とする。別の実施形態では、患者は脈絡膜ジストロフィーの治療を受けており、RNA分子はPRPH2遺伝子を標的とする。さらなる実施形態では、RNA分子は、PRPH2遺伝子における変異を標的とする。

#### 【0048】

本明細書に記載の非外科的方法を介して上脈絡膜腔に送達される核酸は、核酸製剤として存在する。一実施形態における「核酸製剤」は、水溶液または懸濁液であり、有効量の核酸を含む。したがって、一部の実施形態では、核酸製剤は、流体核酸製剤である。「核酸製剤」は、核酸の製剤であり、典型的には、当技術分野で既知の1つ以上の薬学的に許容される賦形剤材料を含む。用語「賦形剤」は、核酸の取り扱い、安定性、分散性、水和性、放出動態、および/または注入を容易にすることを意図した、製剤の任意の非活性成分を意味する。一実施形態では、賦形剤は、水または生理食塩水を含むか、またはそれからなってもよい。

#### 【0049】

核酸製剤（例えば、流体核酸製剤）は、ただ1つの核酸分子を含むナノ粒子を含む。望ましくは、ナノ粒子は、上脈絡膜腔および周囲の後眼部組織への核酸の放出を提供する。「ナノ粒子」は、約1nm～約100nmの平均直径を有する粒子である。別の実施形態では、核酸製剤中の粒子のD<sub>50</sub>は、約100nm以下である。別の実施形態では、核酸製剤中の粒子のD<sub>50</sub>は、約15nm～約30nm、好ましくは20nm以下である。

#### 【0050】

ナノ粒子は、球形であっても、そうでなくてもよい。それらは、例えば、楕円体またはロッド状であり得る。核酸含有ナノ粒子は、水性または非水性液体溶媒に懸濁され得る。液体溶媒は、薬学的に許容される水溶液であってもよく、さらに任意選択的に界面活性剤を含んでいてもよい。核酸のナノ粒子自体は、粒子からの核酸放出の動態を制御するための当技術分野で既知の、ポリマー、多糖、界面活性剤などの賦形剤材料を含むことができる。

#### 【0051】

上記の開示は、本発明を一般的に説明している。本明細書中に開示されるすべての参考文献は、参照により明示的に組み込まれる。以下の具体的な実施例を参照することにより、より完全な理解を得ることができるが、これらの実施例は、例示のみを目的として本明細書に提供されるのであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0052】

##### 実施例1

本発明は、以下の実施例を参照することによりさらに説明される。しかしながら、これらの実施例は、上述の実施形態と同様に、例示的であり、決して本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではないことに留意されたい。

#### 【0053】

##### 材料および方法

特に明記しない限り、中空マイクロニードルは、以前に記載されているようにハウケイ酸マイクロピペットチューブ(Sutter Instrument、Novato、Calif.)から作製された(J. Jiang, et al., Pharm. Res. 26: 395-403 (2009))。マイクロニードルを配置し、その長さを正確に調整できるように、ねじ付きキャップを備えたカスタムのペン状のデバイスを作製した。このデバイスは、注入圧力を加えるために炭酸ガスシリンダーに接続されたチューブを備えた

10

20

30

40

50

マイクロピペットホルダー (MMP - KIT、World Precision Instruments, Sarasota, Fla.) に取り付けられた。ホルダーは、マイクロマニピュレーター (KITE、World Precision Instruments) に取り付けられ、強膜へのマイクロニードルの挿入を制御するために使用された。

#### 【0054】

眼全体にフィットするように成形されたカスタムのアクリルモールドを、眼を固定するために構築して、すべての実験に使用した。カテーテルを、視神経を通して硝子体に挿入し、ある高さまで上げた BSS Plus のボトルに接続して、内部眼圧 (18 または 36 mmHg) を生成した。モールド内のチャンネルに吸引を適用して、マイクロニードルの挿入および操作中に眼の外表面を固定した。各マイクロニードルは、注入される材料の所望の量で事前に充填された。マイクロニードルを、設定されたマイクロニードルの長さでデバイスホルダーに配置し、マイクロマニピュレーターに取り付け、定圧源に接続した。次に、マイクロニードルを、縁から 5 ~ 7 mm 後方の強膜組織に垂直に挿入した。注入を誘発するために設定圧力を加えた。溶液の注入が開始されたかどうかを確認するために 30 秒待った。注入が起きた場合、指定された量の注入と同時に加圧を止めた。注入された物質の眼視観察により上脈絡膜腔に局在が示された場合、注入が成功したものと見なした。その時間枠内に注入が開始されなかった場合、適用されていた圧力を止め、ニードルを後退させた。この場合、送達が失敗したものと見なした。

#### 【0055】

送達完了してから数分以内に、セットアップから眼を離し、顕微鏡を使用して撮像した。眼を、ドライアイスまたは液体窒素上に保ったアセトンまたはイソペンタンに入れ、配置後数分以内に眼を完全に凍結させた。凍結した眼を液体から取り出し、かみそりの刃を使用して眼の一部をハンドカットし、注射された物質をイメージングした。イメージングは、明視野と蛍光光学系を使用した実体顕微鏡を使用して行った (model SZX 12, Olympus America, Center Valley, Pa.)。強膜、脈絡膜および網膜を含む部分を、Optimal Cutting Temperature メディア (Sakura Finetek, Torrance, Calif.) に入れ、ドライアイスまたは液体窒素下で凍結した。これらのサンプルを 10 ~ 30 μm 厚で凍結切片化し (Microm Cryo - Star HM 560MV, Walldorf, Germany)、明視野および蛍光顕微鏡法 (Nikon E600, Melville, N. Y.) でイメージングして、眼に注入された物質の位置を決定した。Adobe Photoshop ソフトウェア (Adobe Systems, San Jose, Calif.) を使用して、必要に応じて画像をカラージュした。

#### 【0056】

##### 実施例 2

ウサギにおける非ウイルス性ナノ粒子の上脈絡膜 (SC) 送達後の安全性、忍容性、および遺伝子導入試験

目的：安全性、忍容性、および、2 種類のレポーター遺伝子をコードする非ウイルス性ナノ粒子の送達経路として上脈絡膜投与後の短期 (1 週間) 研究で、ナノ粒子送達後にトランスフェクトされた網膜細胞タイプを評価する。

動物：種 / 系統：ウサギ / ニュージーランドホワイト、成体、雄

数：24

規制状況：非 GLP

#### 【0057】

処置：

試験物質：試験物質 (TA) は、ルシフェラーゼまたは eGFP レポーター遺伝子のいずれかをコードする、非ウイルス性の楕円体状またはロッド状の DNA ナノ粒子からなる。

#### 【0058】

コントロールは、溶媒を注射した眼、注射していない眼、およびポジティブコントロールであった。

【0059】

投薬：

群1のウサギは、上脈絡膜（SC）経路を介して溶媒コントロール（生理食塩水）100μLの単回注射を受けた。群2～5のウサギは、SC経路を介してTA100μLの単回注射を受けた。群6～7のウサギは、ポジティブコントロールとして使用され、網膜下（SR）経路を介してTA50μLの注射を受けた。すべての処置は、OSへの投与であった。ODは未処置のままとした。

【0060】

実験計画

グループID	動物の数	被験物質/経路	エンドポイントパラメータ	安楽死の時間
1	4	OS：溶媒（100μL）/SC OD：なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ベースライン時、注射後24時間および採取時のOE。</li> <li>● ベースライン時、24時間後、毎週（採取まで）のIOP。</li> <li>● ベースライン時および採取時のERG。</li> <li>● eGFP IHCおよびルシフェラーゼ発現（スポンサーによる）</li> </ul>	1週間
2	4	OS：活性TA（楕円体ルシフェラーゼ）（100μL）/SC OD：なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ベースライン時、注射後24時間および採取時のOE。</li> <li>● ベースライン時、24時間後、および毎週（採取まで）のIOP。</li> <li>● ベースライン時および採取時のERG。</li> <li>● ルシフェラーゼ発現（スポンサーによる）</li> </ul>	
3	4	OS：活性TA（ロッドルシフェラーゼ）（100μL）/SC OD：なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ベースライン時、注射後24時間および採取時のOE。</li> <li>● ベースライン時、24時間後、および毎週（採取まで）のIOP。</li> <li>● ベースライン時および採取時のERG。</li> <li>● ルシフェラーゼ発現（スポンサーによる）</li> </ul>	1週間
4	4	OS：活性TA（楕円体eGFP）（100μL）/SC OD：なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ベースライン時、注射後24時間および採取時のOE。</li> <li>● ベースライン時、24時間後、および毎週（採取まで）のIOP。</li> <li>● ベースライン時および採取時のERG。</li> <li>● eGFP発現（IHCによる）</li> </ul>	

10

20

5	4	OS：活性TA（ロッドeGFP）（100μL）/SC OD：なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ベースライン時、注射後24時間および採取時のOE。</li> <li>● ベースライン時、24時間後、および毎週（採取まで）のIOP。</li> <li>● ベースライン時および採取時のERG。</li> <li>● eGFP発現（IHCによる）</li> </ul>	30
6	4	OS：ポジティブコントロール（ロッドルシフェラーゼ）（50μL） OD：なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ベースライン時、注射後24時間および採取時のOE。</li> <li>● ベースライン時、24時間後、毎週（採取まで）のIOP。</li> <li>● ベースライン時および採取時のERG。</li> <li>● ルシフェラーゼ発現（スポンサーによる）</li> </ul>	
7	4	OS：ポジティブコントロール（ロッドeGFP）（50μL）/SR OD：なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ベースライン時、注射後24時間および採取時のOE。</li> <li>● ベースライン時、24時間後、および毎週（採取まで）のIOP。</li> <li>● ベースライン時および採取時のERG。</li> <li>● eGFP発現（IHCによる）</li> </ul>	

30

40

50

## 試験システム：動物、ハウジング、環境条件

種/系統	ウサギ ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) /ニュージーランドホワイト
供給源	Covance, Denver, PA
初回投与時の年齢範囲	約4~6ヶ月
初回投与時の体重範囲	2-3 kg
識別	ケージカード
身体検査時間	馴化中
ケージング	ステンレス鋼、幅17インチx奥行27インチx高さ15インチ以上、スラット底。追加の床敷なし
ケージあたりの数	1
環境条件	光周期：明12時間/暗12時間 温度：68 ± 2°F

10

## 動物の餌と水：

給餌	タイプ	Hi Fiber Rabbit Diet
	名前	Hi Fiber Lab Rabbit Diet #5P25, Purina, St. Louis, MO
	利用	自由に
	汚染物質の分析	日常的には実施されない、コンタミネーションは想定されない
水	供給源	ダーラム市上水
	利用	先着付き給水瓶を介して自由に。
	汚染物質の分析	6か月毎、コンタミネーション無し

20

## 【0061】

## 動物の健康と馴化：

動物は、麻酔前の最低2週間、研究環境に馴らした。馴化期間の終了時に、各動物は、研究参加への適格性の決定のために実験動物技術者によって物理的に検査された。検査は、限定されないが、皮膚と外耳、眼、腹部、神経学的、行動、および全身状態を含んだ。健康であると判断された動物を研究用に解放した。

30

## 【0062】

## 無作為化と研究での識別：

動物は、標準操作手順書(SOP)に従って、試験群に割り当てられた。具体的には、各群の平均化された平均体重を得るために設計された層別無作為化スキームによって、動物を群に割り当てた。動物は、対応するケージカード番号と耳のタグ付けによって一意的に識別された。

## 【0063】

## 試験製剤と投薬：

試験物質(TA)は、ルシフェラーゼまたはeGFP遺伝子のいずれかをコードしている、楕円体またはロッド状のナノ粒子の非ウイルス性ベクターであった。ウサギに、ブプレノルフィン0.01~0.05 mg/kg SQを投与した。次に、注射のためにウサギを鎮静化し、局所5%ベタジン溶液を使用して眼を無菌状態で準備し、続いて滅菌眼洗浄剤ですすぎ、プロパラカインHCLとフェニレフリンHCLを1滴適用した。眼瞼の開瞼器を配置し、溶媒コントロールとTAを、長さが約1000 μmの30ゲージの針(Clearsideマイクロインジェクター)を使用した上脈絡膜(SC)注射によって投与した。ポジティブコントロール(ルシフェラーゼおよびeGFPロッドナノ粒子)のみ、50 μlの量で網膜下(SR)から注入された。注射手順の後、1滴のネオマイシンポリミキシンB硫酸グラミジジン点眼液を、眼の表面に局所的に適用した。

40

## 【0064】

## 測定するパラメータ：

50

## 試験：

獣医眼科医は細隙灯生体顕微鏡と倒像検眼鏡を使用して眼の精密検査を行い、注射前のすべての動物について眼の表面形態と前眼部の炎症を評価し、注射の24時間後と採取時にベースラインとして使用した。スコアリングには、HackettとMcDonaldの眼グレーディングシステムを使用した。試験のために動物を鎮静化させなかった(Hackett, R. B. and McDonald, T. O. Ophthalmic Toxicology and Assessing Ocular Irritation. Dermatotoxicology, Fifth Edition. Ed. F. N. Marzulli and H. I. Maibach. Washington, D. C.: Hemisphere Publishing Corporation. 1996; 299-305 and 557-566.)。

10

## 【0065】

## 眼圧測定：

眼圧(IOP)は、両眼について、注射24時間前(ベースライン)、その後採取するまで毎週測定した。局所麻酔剤を使わずに、Tonovetプローブ(iCare Tonometer, Espoo, Finland)を使用して測定を行った。Tonovetプローブの先端は、角膜中央に軽く接触するように向けられた。画面に表示される平均IOPを記録した。次に、この手順をさらに2回繰り返し、測定値を記録して平均化した。

## 【0066】

## 網膜電図検査(ERG)

ERGは、ベースライン時および安楽死前にウサギの両眼に対して行った。すべての動物は、ERGの前に、少なくとも15分間暗順応させた。ERGは、ミニGanzfeld光刺激装置(Roland Instruments, Wiesbaden, Germany)を用いて最大強度で送達された0.33Hzの短閃光によって誘発した。各動物について、20の反応を増幅、フィルタリング、および平均化した(Retipoint Electrophysiologic Diagnostic Systems, Roland Instruments, Wiesbaden, Germany)。

20

## 【0067】

## 眼の組織病理学：

注射後1週間で、OSとODを安楽死直後に摘出し、Davidson Fixativeで固定し、24時間後に組織を70%エタノールに移し、切片化のためにパラフィンに包埋した。切片をヘマトキシリンとエオシン(H&E)および抗eGFP抗体で染色した。

30

## 【0068】

## ルシフェラーゼアッセイのための眼の解剖：

注射後1週間で、OSおよびOD眼は安楽死直後に除核された。眼圧を下げるために房水を採取し、眼球を瞬間凍結した。凍結されたまま網膜と脈絡膜を各眼から解剖し、事前に秤量したチューブに入れた。次に、チューブの重量を測定して組織の重量を測定して、すぐにドライアイス上に置き、-80の冷凍庫に移した。ルシフェラーゼ活性についてアッセイするまで、凍結したサンプルを-80で保存した。

40

## 【0069】

## 正当化：

この研究は、TAのSCS送達後の短期および長期の忍容性を決定するために設計された。動物の数、データ収集の時点、および測定用のパラメータは、研究の目的を満たすために必要な最小数に基づいて選択された。

## 【0070】

## IACUCコンプライアンス/疼痛管理：

プロトコルは、Powered Research IACUCによって承認された。IACUCと施設のSOPによると、ケージ側の検査は、重度の眼瞼けいれん、重度の結膜充血、流涙症、過度の眼のこすり、不食などの明らかな不快感の兆候がないが、少なくとも

50

も 12 時間ごとに行った。これらの状態が 12 時間続く場合、ウサギは人道的に安楽死させた。

【 0 0 7 1 】

結果を図 1 ~ 2 に示す。

【 0 0 7 2 】

実施例 3

カニクイザルへのルシフェラーゼ - DNA 非ウイルス性ナノ粒子製剤の上脈絡膜投与後の 3 週間の眼遺伝子送達研究

【 0 0 7 3 】

目的

この研究の目的は、カニクイザルへのルシフェラーゼ DNA を含む非ウイルス性ナノ粒子製剤の上脈絡膜投与後の 3 週間の眼遺伝子送達を評価することである。

【 0 0 7 4 】

法規制コンプライアンス

この研究は、該当する標準操作手順書 (SOP) に従って実施される。この研究は、優良試験所基準 (Good Laboratory Practice Regulations) の範囲内であるとは見なされていない。プロトコルのすべての手順は、動物福祉法規則 (Animal Welfare Act Regulations、9 CFR 3) に準拠している。

【 0 0 7 5 】

必要に応じて、OSOD が実施した調査の一部は、該当する SOP、プロトコル、改定プロトコル、および研究に固有の手順に従う。

【 0 0 7 6 】

主要なコンピュータシステム

この研究で使用される検証済みの主要なコンピュータシステムには、以下が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

システム	機能	
Electronic Notes (eNotes)	研究固有の情報交換を文書化する	
Pristima	生データの直接オンラインキャプチャ	
Tox Reporting	レポートする目的でPristimaからのデータを転送する	
Debra	天びんからのデータの取込みのための自動データ収集および管理システム	
Documentum	研究関連文書および電子署名の生成のための文書管理システム	10
Metasys	動物施設の環境モニタリングシステム (EMS)	
REES	ストレージユニット用のEMS	
<b>試験物質製剤</b>		
試験物質：生理食塩水中のルシフェラーゼ楕円体ナノ粒子 (NP)		
保管条件：約5°C		20
試験物質：生理食塩水中のルシフェラーゼロッドNP		
保管条件：約5°C		
コントロール物質：生理食塩水		
保管条件：約5°C		
<b>【 0 0 7 7 】</b>		
<b>純度</b>		
製剤の化学的純度は、スポンサーによるものとする。		
<b>【 0 0 7 8 】</b>		30
<b>安定性</b>		
製剤の安定性は、スポンサーによるものとする。		
<b>【 0 0 7 9 】</b>		
<b>安全上の注意</b>		
担当者は、スポンサーが提供する安全データシートまたはその他の関連する安全情報を考慮して、C o v a n c e の方針および手順によって求められるすべての安全上の諸注意に従う。		

研究デザイン：

群	雌動物の数	投与経路	製剤	目標用量レベル (mg DNA/眼)	目標投与量 ( $\mu$ L/眼)	採取したサンプル
1	1	上脈絡膜	生理食塩水	NA	100	眼組織
2	4	上脈絡膜	ルシフェラーゼ 楕円体NP	0.4	100	眼組織
3	4	上脈絡膜	ルシフェラーゼ ゼロッドNP	0.4	100	眼組織

10

注：動物は両眼に単回投与を受けた。必要に応じて、誤投与やその他の予期せぬ出来事が発生した場合の代替として使用するために、追加の動物に投薬することができる。

#### 【0080】

動物と管理

種

霊長類

#### 【0081】

数と性別

雌9匹を試験

#### 【0082】

系統と供給源

Covance Research Products Inc. (テキサス州、アリス)の薬剤未投与のカニクイザル

#### 【0083】

馴化

到着時、SOPに従って、または動物福祉および比較医学部門 (Department of Animal Welfare and Comparative Medicine) の裁量により、動物の馴化、維持、および健康状態のモニターを行う。動物は、投与前の少なくとも1週間、研究室に馴らす。

30

#### 【0084】

用量投与時の体重

2 ~ 5 kg 以上

#### 【0085】

投与時の年齢

2 から 7 歳

#### 【0086】

ハウジング

馴化および試験期間中、動物はステンレス鋼のケージに収容される。

40

#### 【0087】

動物は、Covance SOPに従い、必要に応じて混合されるが、試験物質関連の影響をモニターできるようにするため、試験物質の投与後少なくとも24時間は動物を混合しない。動物は、研究関連の手順または行動または健康上の理由で個別収容される場合がある。

#### 【0088】

給餌

Certified Primate Diet #5048 (PMI, Inc.) または #5L4L (PMI, Inc.) は、SOPに従って提供される。

50

【 0 0 8 9 】

水

自由に、毎日新鮮なものを提供

【 0 0 9 0 】

汚染物質

この研究を妨げる既知の汚染物質は、餌や水に含まれない。

【 0 0 9 1 】

エンリッチメントおよびトリート

環境的および心理的エンリッチメントについては、適用可能なSOPに従って、さまざまなケージおよび/または食品エンリッチメント(分析を必要としない)が与えられる場合がある。Covance SOPに従って、食事には好適なトリート(分析を必要としない)を補充してもよい。

10

【 0 0 9 2 】

環境

動物室の環境管理は、20~26の温度、50±20%の相対湿度、12時間/12時間の明暗サイクルを維持するように設定される。12時間の暗サイクルは、研究手順に対応するために中断されることがある。

【 0 0 9 3 】

動物の選択

動物は無作為化されない。必要に応じて、全体的な健康状態、体重、眼科検査の結果、またはその他の関連データに基づいて、試験で使用する動物を選択する。

20

【 0 0 9 4 】

識別

必要に応じて、動物は、個々のケージカード、耳タグ、入れ墨、および/または埋め込み型マイクロチップ識別デバイス(IMID)を介して識別される。

【 0 0 9 5 】

正当化

霊長類は視覚分布を評価するのに好適な種であり、このモデルは、定量的な視覚分布データも提供できる。動物の数は、科学的に有効な結果を得るため、および分析のための適したサンプルサイズを確保するために必要な最小数である。スポンサーおよび研究責任者の意見では、この研究は、以前の研究を不必要に複製するものではない。

30

【 0 0 9 6 】

獣医のケアと治療

動物保護法(Animal Welfare Act)、実験動物の管理と使用に関するガイドライン(the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)および実験動物福祉部門(Office of Laboratory Animal Welfare)に従って、安楽死を含む、容認できない痛みと苦しみを防ぐために必要な医療処置は、参加する実験動物獣医のみが責任を有する。裁量的医学的処置は、研究責任者と担当の実験動物の獣医師との間の合意に基づいて行われる場合がある。すべての獣医学的処置は、スポンサーに通知される。

40

【 0 0 9 7 】

投与経路の根拠

研究の目的は、ルシフェラーゼDNA製剤を含む非ウイルス性ナノ粒子の眼の遺伝子送達を評価することである。上脈絡膜注射は、ヒトにおいて意図される投与経路である。

【 0 0 9 8 】

用量の準備と分析

用量製剤は、スポンサーが提供する通り投与される。

【 0 0 9 9 】

動物に投与するための製剤を調製するには、バイアルを周囲温度になるようにして、ボルトックスせずに、チューブを軽く振って攪拌する。

50

## 【0100】

19 gの針が取り付けられたHamiltonシリンジ（スポンサー提供）に、滅菌層流バイオセーフティキャビネット内で、無菌条件下、約150 µLの製剤を充填した。この針は、製剤をシリンジに移すために使用されるもので、30ゲージのルアーロック針（700 µm）に交換され、針は、充填から3時間以内に使用するために、投与室に輸送する準備と蓋がされる。

## 【0101】

用量製剤の分析は、スポンサーに帰す。

## 【0102】

## 投与手順

投与の前に動物を絶食させない。

## 【0103】

## 眼の準備および/または投薬前後の鎮痛

鎮痛剤は、眼の準備および/または投与後に必要と考えられる場合に投与される。使用される化合物は、限定されないが、以下を含み得る：フルニキシメグルミンおよびブプレノルフィン。

## 【0104】

## 麻酔

動物は、ケタミンとデクスメドミジンの標準的なレジメンを使用して麻酔される。必要に応じて、吸入麻酔剤も投与される。追加（または代替）の麻酔剤と鎮痛剤は、獣医師の推奨により投与され得る。投与されたすべての麻酔剤および鎮痛剤がデータに記録される。

## 【0105】

## 眼の準備

局所麻酔剤を適用した後、眼をヨード溶液で約2分間すすぎ、生理食塩水ですすぐ。

## 【0106】

## 用量投与

注射部位の準備の後、研究固有の手順に従って、OSODの代表者により、各眼に、5～10秒間かけて100 µLの上脈絡膜単回注射（角膜縁から約4 mm上側象限）が投与される。注射後、針を、約10秒間眼内に保持した後、引き抜く。マイクロニードルを引き抜いて、先端が綿のアプリーケーター（CTA、ドーズワイプ）を約5秒間注射部位に配置し、ドーズワイプを廃棄する。最初に、右眼に投与され、総投与後時間は、第2の眼（左）の投与時間に基づく。

## 【0107】

投与観察が記録される。

## 【0108】

## 動物の観察

## 生前観察

到着日に、動物の死亡率および痛みと苦痛の兆候を少なくとも1回観察し、一般的な健康状態と外見についてケージサイドで観察する。到着の翌日から、動物の死亡率および痛みと苦痛の兆候を少なくとも1日2回（午前と午後）観察し、ケージサイドでの一般的な健康状態と外観の観察を1日1回行う。追加の観察が行われる場合があり、異常な知見はすべて、生データに記録される。

## 【0109】

## 体重

必要に応じて、体重は、到着後5日以内に測定し、馴化期間中は毎週行う。必要に応じて、動物の選択時、用量の投与日、および研究の残りの期間中は毎週、動物の体重を測定する。

## 【0110】

必要な場合、追加の体重測定を行う。

10

20

30

40

50

【0111】

研究活動

眼科観察：修正Hackett - McDonald (1ラウンド)

動物の数：すべて利用可能

頻度：投与前、投与後2～3時間、および試験8日目と22日目

研究責任者または獣医眼科医が必要と判断した場合、予定外の眼科検査を実施することがあり得る。

実施：獣医眼科医による

観察：両眼を散瞳剤で散大させ、次に細隙灯生体顕微鏡と倒像検眼鏡を使用して検査する。

両眼を全体的に検査して、修正Hackett - McDonaldスコアリングシステム(添付資料1に示す)を使用してグレーディングするが、次の評価は除外する。瞳孔対光反射および角膜フルオレセイン染色は、検査する獣医眼科医の裁量でのみ実行される。

異常または正常の兆候を記録する。獣医眼科医の裁量で、他の適切な器具を使用して眼を検査してもよい。

【0112】

サンプル採取

眼組織

群1の1匹の動物は、研究8日目に殺処理する。群2と3の2匹/群の動物は、研究8および22日目に殺処理する。動物は、ペントバルビタールナトリウムの過剰投与により、殺処理する。眼の採取を容易にするために心臓穿刺を介して血液を採取および廃棄し、血液の量は記録しない。殺処理時に、両眼を摘出して角膜上皮を採取し、房水を除去し(廃棄する)、液体窒素で15～20秒間急速冷凍する。摘出された眼をドライアイス上に置くか、または約-70℃で少なくとも2時間保存する。約5日以内に、凍結されたマトリックスを、各マトリックスの右眼と左眼として、リスト化されている特定のチューブタイプに回収される。

フレッシュコレクション

コレクションチューブの要件

角膜上皮

2mLポリプロピレンSarstedtチューブ

冷凍コレクション

脈絡膜網膜色素上皮 (RPE)

2mLポリプロピレンSarstedtチューブ

毛様体

2mLポリプロピレンSarstedtチューブ

虹彩

2mLポリプロピレンSarstedtチューブ

網膜<sup>A</sup>

2mLポリプロピレンSarstedtチューブ

a 網膜の採取には濾紙を使用する。

【0113】

眼組織を生理食塩水ですすぎ、必要に応じて拭き取って乾燥させ、秤量して、ドライアイス上に置く。すべての眼組織は、単一のサンプルとして回収する。残りの眼組織は廃棄する。

【0114】

サンプルの識別と保管

サンプルは、起源と採取時間を示すために一意的に識別する。サンプルの保管は、次の通り。

10

20

30

40

50

マトリックス	保管条件	コメント
眼組織	-70°C	-70°Cで保存されるまでドライアイス。

注：温度は概算であり、Covance SOPに従って維持およびモニターされる。

#### 【0115】

##### サンプル発送

眼組織のサンプルは、ドライアイス上で翌日配送によって、以下の住所に発送される。サンプルの発送は、最終的な採取の後に予定される。発送は、月曜日、火曜日、または水曜日に、休日以外にのみ予定される。スタディモニターと受取人には、各出荷時に電子メールで通知される。電子マニフェストは、出荷時に送信される。

10

#### 【0116】

行われ得るこれらのサンプルのさらなる分析は、この調査の範囲外であると判断された。これらの分析から生成されたデータは、この研究の結果の解釈には用いられず、この研究では報告されず、薬物の安全性評価の裏付けには使用されない。

#### 【0117】

##### データ分析

##### 統計分析

統計分析には、必要に応じて、平均値や標準偏差などのパラメータが含まれる場合がある。

20

#### 【0118】

##### 処分

##### 動物の処分

##### 予定

動物は、最終採取手順の一部として安楽殺される。死体は保持されない。

#### 【0119】

##### 予定外

必要に応じて、研究責任者または実験動物獣医の裁量で、Covance SOPで指定された適切な方法に従って動物を安楽死させる。

#### 【0120】

##### 用量製剤の処分

未使用の用量製剤（複数可）は、Covance SOPに従って維持される。

30

#### 【0121】

##### サンプルの処分

すべてのサンプルは、別の場所に発送され、Covanceにサンプルは残らない。

#### 【0122】

##### 修正Hackett - McDonaldスコアリングスケール

獣医眼科医が実施する。異常な変化は、以下のスケールで記録される。

#### 【0123】

##### 瞳孔対光反射

注：細隙灯での全照射を用いて、次のスケールを使用して瞳孔対光反射をスコアリングする。

40

スコア	説明
0	正常な瞳孔反射。
1	遅鈍な瞳孔反射。瞳孔は遅鈍な瞳孔反射で、比較的散大している。
2	瞳孔反射が最大に障害されている（つまり、固定されている）。瞳孔は完全に散大し、瞳孔反射がない。
3	縮瞳性瞳孔。

10

【 0 1 2 4 】

結膜のうっ血（充血）

注：眼の色素沈着の程度により、このパラメータの正確なスコアリングが妨げられる場合がある。

スコア 説明

0 正常。角膜縁周囲への注射がない場合、薄白から赤みを帯びたピンク色に見え（12：00および6：00の位置を除く）、眼瞼および眼球結膜の血管が容易に観察される。

1 一部の角膜縁周囲注射に伴う、主に眼球結膜に限定された紅潮した赤みを帯びた色。主に、4：00と7：00の位置から眼の下部、および11：00と1：00の位置から眼の上部に限定される。

20

2 角膜周囲領域の外周の少なくとも75%を覆う角膜縁周囲注射に伴う、眼球結膜および眼瞼結膜の鮮やかな赤色。

3 顕著な角膜縁周囲注射に伴う、眼球結膜および眼瞼結膜の充血を伴う濃い暗赤色。結膜に点状出血がみられることがある。一般に、点状出血は、瞬膜および上部眼瞼結膜に沿って主にみられる。

【 0 1 2 5 】

結膜腫脹（結膜浮腫）

スコア 説明

0 正常または腫脹のない結膜組織。

30

1 眼瞼の外反はないが正常よりも腫れている（上眼瞼と下眼瞼が正常の眼のように位置していることに注目することで容易に確認できる）。一般に、腫脹は内眼角近くの結膜嚢下部から始まり、細隙灯検査を必要とする。

2 下眼瞼と上眼瞼の正常な整合（approximation）のずれを伴う腫れで、主に、上眼瞼に限定されているため、初期段階では眼瞼の不整合（misapproximation）は上眼瞼の部分的な外反によって始まる。この段階では、腫脹は一般的に上眼瞼に限定されるが、下結膜嚢にも存在する（細隙灯で最もよく観察される）。

3 上眼瞼と下眼瞼の部分的な外反を伴う腫れは明確で、本質的に同等である。動物を正面から見て、眼瞼の位置に注目することで、これを簡単に確認できる；眼瞼縁が合わない場合は、外反が発生している。

40

4 上眼瞼の外反は顕著であり、下眼瞼の外反はそれほど顕著ではない。眼瞼を後退させて角膜縁周囲を観察することは難しい。

【 0 1 2 6 】

結膜分泌物

注：分泌物は、やや白い灰色、漿液性、化膿性、粘液様、および/または血性物質として定義される。通常の分泌物には、相当数の動物の眼の内眼角に見られる少量の透明または粘液様物質が含まれる場合がある。

スコア 説明

0 分泌物なし（上記を除く）。

1 分泌物は正常を上回り、眼の表面または内眼角に存在するが、眼瞼または眼瞼の

50

毛には存在しない。

- 2 分泌物が多く、容易に観察され、眼瞼や眼瞼の毛の周りに集まる。
- 3 眼の周りの皮膚の毛を実質的に濡らすように眼瞼に分泌物が流れる。

【0127】

角膜

角膜混濁のスコアには、通常2つの数値が必要である；最初の数値は角膜混濁の重症度を示し、2つ目の数値は関与の推定面積を示す。角膜混濁の重症度は次のようにグレーディングされる。

スコア 説明

0 正常な角膜。細隙灯を用いて、上皮表面に明るい灰色の線と、間質の大理石様の灰色の外観を伴った、内皮表面の明るい灰色の線が見える。 10

1 透明度がいくらか失われる。細隙灯の光学切片を観察すると、上皮および/または実質の前半分のみに影響している。散乱光を用いると、多少の曇りが見られる場合があり、下部の構造がはっきりと見える。

2 中程度の透明度の喪失。曇りは実質の前半分を越えて広がる。影響を受けた実質は、大理石様の外観を失い、均一に白色である。散乱光では、下部構造が見えるものの、一部の詳細が失われ得る。

3 実質全体の厚さに影響。光学切片では、内皮表面がまだ見えている。しかし、散乱光では、下部構造はほとんど見えない（観察者がフレアの評価、虹彩血管の充血、瞳孔反応の観察、および水晶体の変化をようやくグレーディングできる程度）。 20

4 実質全体の厚さに影響。光学切片では、内皮がはっきり見えない。散乱光では、下部構造が見えず、房水フレア、虹彩血管の充血、瞳孔反応、および水晶体の変化の評価は不可能になる。

【0128】

角膜混濁の領域%

スコア	説明	
0	混濁のない正常な角膜。	
1	1~25%の領域の間質混濁。	30
2	26~50%の領域の間質混濁。	
3	51~75%の領域の間質混濁。	
4	76~100%の領域の間質混濁。	40

角膜血管新生

スコア	説明
0	角膜血管新生（パンヌス）なし。
1	血管新生が見られるが、血管は角膜周囲全体に侵入していない。局所的な血管侵入が発生した場合でも、2mmを超えて侵入していない。
2	血管の侵入は、1つ以上の領域で2mmを超えるか、または角膜周囲全体に見られる。

10

【0129】

房水フレア

注：細隙灯ビームが水晶体を通過するときに観察される通常のチンダル現象を前房で見られるものと比較することによって、チンダル現象（房水フレア）の強度がスコアリングされる。房水フレアの存在は、血液房水関門の破壊の推定証拠である。

スコア 説明

20

0 経験豊富な観察者が細隙灯生体顕微鏡を使用して、白色光の小さく明るい集束細隙灯ビームで高倍率で見たとき、前房にタンパク質は見えない。

0.5 前房で、微量のタンパク質が検出される。このタンパク質は、経験豊富な観察者が細隙灯生体顕微鏡を使用して、白色光の小さく明るい集束細隙灯ビームで、高倍率で、注意深く精査しなければ見えない。

1 前房で少量のタンパク質が検出される。前房内のタンパク質の存在は、細隙灯生体顕微鏡を用いて、白色光の小さく明るい集束細隙灯ビームで、高倍率で、経験豊富な観察者が観察するとすぐにわかるが、肉眼では、そのようなタンパク質は、白色光の小さく明るい集束細隙灯ビームで注意深く精査した場合にのみ検出される。

2 前房で中程度の量のタンパク質が検出される。これらのグレードは1+に似ているが、白色光の集束ビームの任意の光源を使用して、観察者が肉眼で容易に混濁を認めることができる。これは、中程度の不透明化の連続体で、2+であり、3+より明らかでない。

30

3 前房で中程度の量のタンパク質が検出される。これらのグレードは1+に似ているが、白色光の集束ビームの任意の光源を使用して、観察者が肉眼で混濁を容易に認めることができる。これは、中程度の混濁の連続体で、3+であり、2+よりも明らかである。

4 前房で多量（重度）のタンパク質が検出される。3+に似ているが、タンパク質の密度は水晶体のものに近づく。さらに、急性の場合、頻繁に明らかなフィブリン沈着が見られる。血液房水関門の部分的または完全な回復後、フィブリンが一定期間残存する可能性があるため、再吸収されているフィブリンには、フレアに対するより低い数値割り当てを行うことが可能である（例えば、1+フィブリンを伴うフレア）。

40

【0130】

眼房細胞

注：眼房または硝子体細胞のスコアリングは、2つの測定値として記録され、1つ目は可視の細胞数を測定し、2つ目は観察された細胞の色を記述する（必要に応じて）。眼房細胞と硝子体細胞の両方をスコアリングする場合、同じスコアリングシステムを使用する。

スコア 説明

0 集束細隙灯ビームの単一フィールドに細胞は見られない。前房を横切るように細隙灯ビームを透過させたときに、細胞は見られない。

0.5 集束細隙灯ビームの単一のフィールドで、まれに（1～5個）細胞が見られる

50

。装置を安定に保持したとき、すべての光学切片に、循環している細胞が含まれるわけではない。

1 集束細隙灯ビームの単一フィールドに、6～25個の細胞が見られる。装置を安定に保持したとき、前房の各光学切片について、循環している細胞が含まれる。

2 26～50個の細胞が、集束細隙灯ビームの単一フィールドに見られる。装置を安定に保持したとき、前房の各光学切片について、循環している細胞が含まれる。

3 集束細隙灯ビームの単一フィールドに51～100個の細胞が見られる。装置を安定に保持したとき、前房の各光学切片について、循環している細胞が含まれる。前水晶体嚢に角質沈着物または細胞沈着物が存在する場合がある。

4 集束細隙灯ビームの単一フィールドに、100個を超える細胞が見られる。装置を安定に保持したとき、前房の各光学切片について、循環している細胞が含まれる。前水晶体嚢に角質沈着物または細胞沈着物が存在する場合がある。フィブリン沈着物に関して、前房への細胞の活発な浸出が完全に減少または停止した後、前房蓄膿または細胞の塊がしばらく残る場合がある。したがって、再吸収されている前房蓄膿には、細胞に対するより低い数値割り当てを行うことが可能である（例えば、1+前房蓄膿を伴う細胞）。

10

#### 【0131】

眼房または硝子体細胞の色

眼房または硝子体細胞は、白または茶色として観察される場合があり、次の3つのカテゴリのいずれか一つとして記録される。主に茶色(>75%茶色)、主に白(>75%白)、または混合(他の比率の茶色と白)。細胞の色の種類はカウントされない。むしろ、眼科医は所見を主観的に分類する。

20

#### 【0132】

虹彩うっ血(充血)

注：次の定義では、一次、二次、および三次の血管は、虹彩充血の主観的な眼のスコアを決定するための補助として使用される。血管の充血が大きくなり、二次および三次血管がより多く関与するほど、虹彩の関与の強度が大きくなるという仮定がなされる。また、眼の色素沈着の程度は、このパラメータの正確なスコアリングを妨げる場合がある。

スコア 説明

0 虹彩血管の充血のない正常な虹彩。

1 二次血管の最小の充血、三次血管の充血はない。

2 三次血管の最小の充血、二次血管の最小から中等度の充血。

3 二次および三次血管の中等度の充血で、虹彩実質がわずかに膨らむ(これにより、虹彩の表面がわずかにしわのような外観になる。通常、3:00および9:00の位置付近で最も顕著である)。

30

4 二次および三次血管の顕著な充血で、虹彩実質の顕著な腫れを伴う。虹彩がしわのように見え、前房に出血(前房出血)を伴う場合がある。

#### 【0133】

フルオレセイン染色

注：フルオレセイン染色は、角膜上皮の損傷の兆候である。フルオレセイン染色のスコアは、2つのスコアとして記録され、最初の数値は染色の強度を示し、2番目の数値は関与の推定面積を示す。

40

スコア 説明

0 フルオレセイン染色なし。

1 わずかな多巣性の点状フルオレセイン染色。散乱光では、下部構造が容易に見える。(瞳孔縁の輪郭は、あたかもフルオレセイン染色がされていないように見える。)

2 小さな焦点に限定された中程度のフルオレセイン染色。散乱光では、下にある構造がはっきりと見えるが、一部の詳細が失われる。

3 フルオレセイン染色。角膜のより大きな部分で、染色がみられる可能性がある。散乱光では、下部構造がほとんど見えないが、完全に見えなくなるわけではない。

4 極度のフルオレセイン染色。散乱光では、下部構造が観察できない。

50

【0134】

フルオレセイン染色の領域%

スコア	説明
0	フルオレセイン染色の領域はない。
1	1～25%の領域のフルオレセイン染色。
2	26～50%の領域のフルオレセイン染色。
3	51～75%の領域のフルオレセイン染色。
4	76～100%の領域のフルオレセイン染色。

10

【0135】

注：存在し得るさまざまな強度に関係なく、染色を含む角膜の領域全体について、スコアリングされる。

【0136】

注：Kikkawa (1972) - 検査されるウサギの10～20%で、通常、巣状、点状のフルオレセイン染色が見られたことが報告されている。角膜全体に影響している場合や、病巣が1つの領域に限定されている場合がある。

20

【0137】

水晶体

水晶体は細隙灯生体顕微鏡を用いて容易に観察され、水晶体混濁の位置は直接照明および反帰光によって容易に識別できる。水晶体混濁の位置は、前囊から始まる以下の水晶体領域に任意に分割され得る。

前囊

前囊下

前皮質

赤道皮質

核

後皮質

後囊下

後囊

30

【0138】

水晶体は、眼の評価中に定期的に評価し、次のようにグレーディングする必要がある。

0 (正常) または水晶体混濁の存在を記述し、その場所を以下の定義に従って注記する必要がある。

40

不完全：びまん性の水晶体混濁で、倒像検眼鏡またはその他の集束光源および反帰光線法を用いた眼の全体的な検査で見える。眼底の視界が著しく損なわれているが、それでも赤色反射が得られる。細隙灯生体顕微鏡検査では、水晶体の複数の領域が不透明である。

完全：びまん性の水晶体混濁で、倒像検眼鏡またはその他の集束光源を用いた眼の全体的な検査で見える。眼底を見ることができず、赤反射が誘発されない。細隙灯生体顕微鏡検査では、水晶体全体が不透明である。

再吸収：びまん性の水晶体混濁で、倒像検眼鏡またはその他の集束光源を用いた眼の全体的な検査で見える。眼底は、見える場合と見えない場合があり、赤色反射は誘発される場合と誘発されない場合がある。水晶体包にしわが寄ることがあり、水晶体自体が脱水されて平らになっているまたは液状で、見た目が柔らかい。細隙灯生体顕微鏡検査では、水

50

晶体全体が不透明である。

点状：局在性または多巢性の離散した点状の水晶体混濁で、細隙灯生体顕微鏡を高倍率で使用して、熟練した観察者にのみ見える。

初発：局在性の水晶体混濁で、倒像検眼鏡または他の集束光源および反帰光線法を用いた眼の全体的な検査で見える。眼底の視界は、混濁によってほとんど障害されない。細隙灯生体顕微鏡検査では、混濁は水晶体の特定の領域に限定され、水晶体の他の領域は正常に見える。

【 0 1 3 9 】

硝子体細胞

硝子体細胞のスコアは、フィールドごとの細胞の以下の推定値を使用して割り当てられる。

10

スコア	説明
0	集束細隙灯ビームの単一のフィールドに、細胞が見られない。
0.5	集束細隙灯ビームの単一フィールドに、まれに(1~5個)細胞が見える。
1	集束細隙灯ビームの単一フィールドに6~25個の細胞が見える。
2	集束細隙灯ビームの単一フィールドに26~50個の細胞が見える。
3	集束細隙灯ビームの単一フィールドに51~100個の細胞が見える。
4	集束細隙灯ビームの単一フィールドに100個を超える細胞が見える。

20

【 0 1 4 0 】

網膜 / 眼底

異常な所見または正常な兆候 (スコア「 0 」) は、次のように記録される。

30

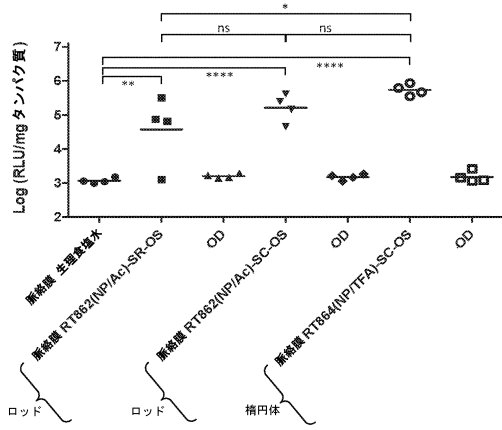
40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

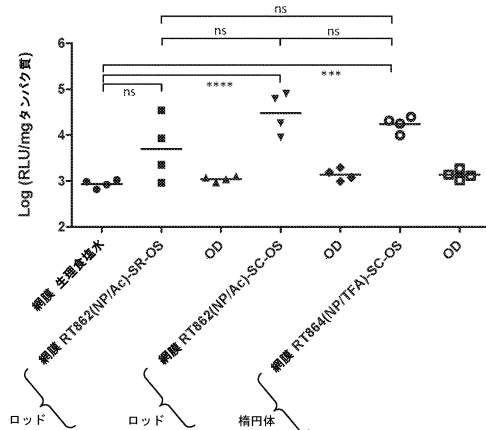
プロトコル 17-CLE-001  
ルシフェラーゼ活性分析 脈絡膜



一元配置分散分析,  $p < 0.0001$ .  
Bonferroniの多重比較検定: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$   
ns, 有意差なし

【 図 2 】

プロトコル 17-CLE-001  
ルシフェラーゼ活性分析 網膜



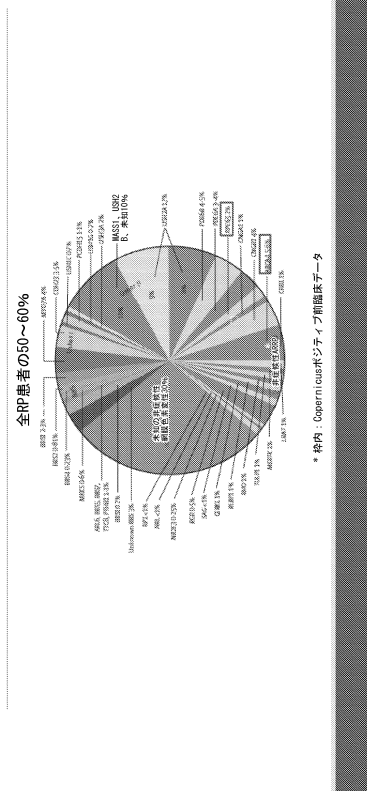
一元配置分散分析,  $p < 0.0001$ .  
Bonferroniの多重比較検定: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$   
ns, 有意差なし

10

20

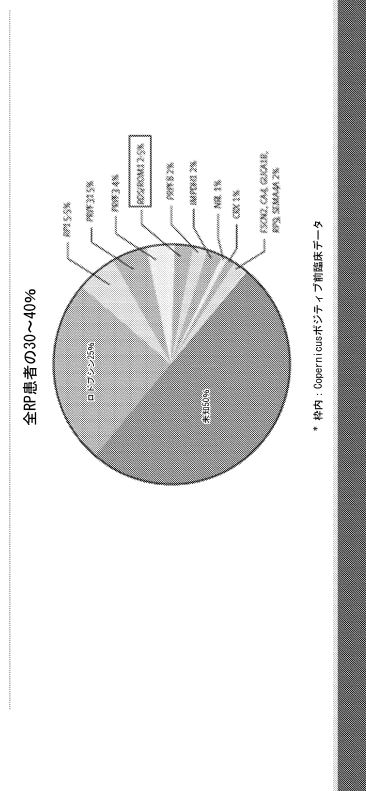
【 図 3 】

常染色体劣性RP変異



【 図 4 】

常染色体優性RP変異

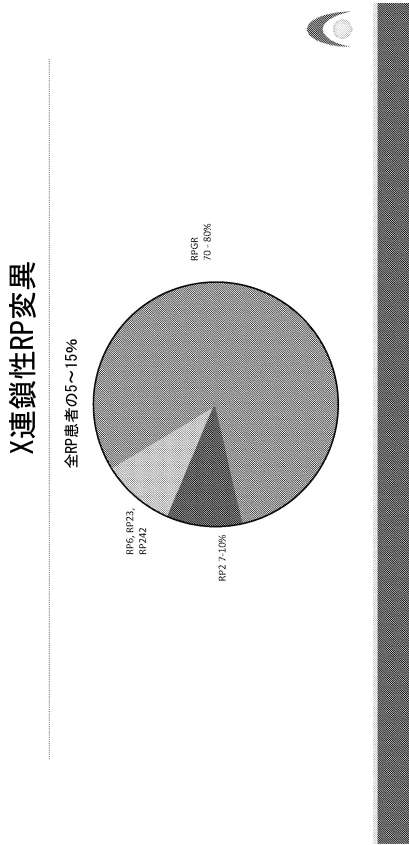


30

40

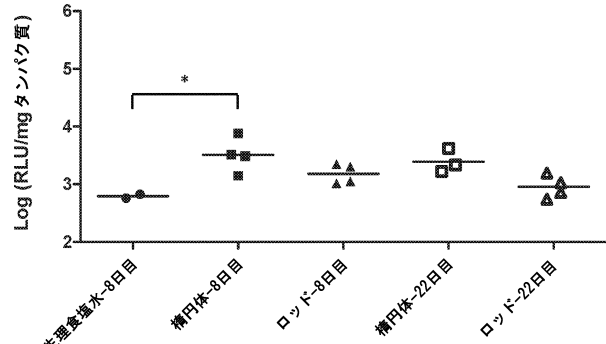
50

【 図 5 】



【 図 6 A 】

Covanceプロトコル #8386605  
ルシフェラーゼ活性分析 網膜  
2018年8月13日



一元配置分散分析,  $p=0.0088$ .  
Bonferroniの多重比較検定: \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$

10

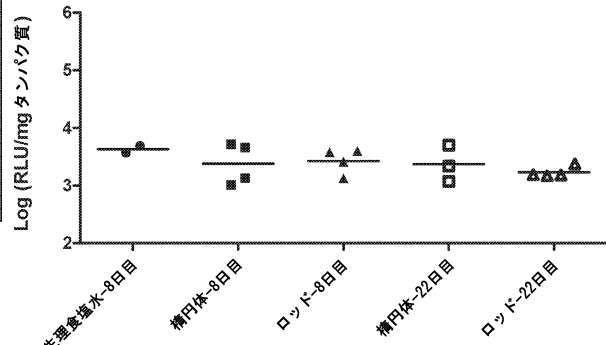
20

【 図 6 B 】

分析表	変換 RLU/mgタンパク質			
一元配置分散分析				
F値	0.0088			
F値サマリ	**			
平均値に有意差があるか? ( $P < 0.05$ )	有			
群の数	5			
F	0.616			
平方	0.6518			
分散分析表	SS	df	MS	
処理(カラム間)	1.052	4	0.2630	
残差(カラム内)	0.5615	12	0.04683	
総和	1.614	16		
Bonferroniの多重比較検定	平均値の差	t	有意? $P < 0.05?$	サマリ
生理食塩水-8日目対精肉-8日目	-0.7109	3.793	有	*
生理食塩水-8日目対ロッド-8日目	-0.3648	2.053	無	ns
生理食塩水-8日目対精肉-22日目	-0.3368	3.045	無	ns
生理食塩水-8日目対ロッド-22日目	-0.1604	0.8657	無	ns
精肉-8日目対ロッド-8日目	0.3261	2.131	無	ns
精肉-8日目対精肉-22日目	0.1153	0.6674	無	ns
精肉-8日目対ロッド-22日目	0.5555	3.586	有	*
ロッド-8日目対精肉-22日目	-0.2108	1.275	無	ns
ロッド-8日目対ロッド-22日目	0.2244	1.467	無	ns
精肉-22日目対ロッド-22日目	0.4352	2.633	無	ns

【 図 7 A 】

Covanceプロトコル #8386605  
ルシフェラーゼ活性分析 虹彩  
2018年8月13日



一元配置分散分析,  $p=0.5089$ .  
Bonferroniの多重比較検定: 全て有意差なし

30

40

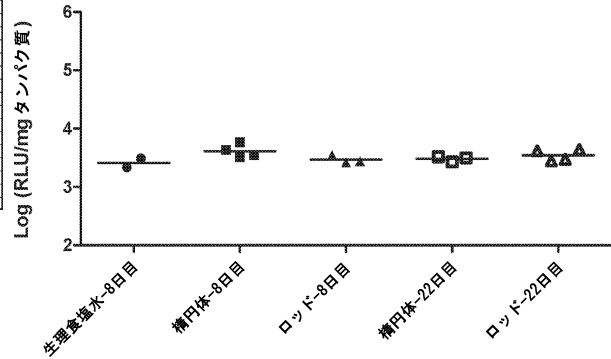
50

【 図 7 B 】

分析表	変換 RLU/mgタンパク質			
一元配置分散分析				
F値	0.5569			
F値サマリ	ns			
平均値に有意差があるか？ (P < 0.05)	無			
群の数	5			
F	0.8715			
R平方	0.2261			
分散分析 表	SS	df	MS	
処理(カラム間)	0.2236	4	0.05590	
残差(カラム内)	0.7696	12	0.06414	
総和	0.9932	16		
Bonferroniの多重比較検定	平均値の差	t	有意？ P < 0.05?	サマリ
生理食塩水-8日目対精肉体-8日目	0.2403	1.132	無	ns
生理食塩水-8日目対ロッド-8日目	0.2016	0.9192	無	ns
生理食塩水-8日目対精肉体-22日目	0.2572	1.113	無	ns
生理食塩水-8日目対ロッド-22日目	0.3995	1.822	無	ns
精肉体-8日目対ロッド-8日目	-0.04973	-0.2610	無	ns
精肉体-8日目対精肉体-22日目	0.008863	0.04452	無	ns
精肉体-8日目対ロッド-22日目	0.1512	0.8443	無	ns
ロッド-8日目対精肉体-22日目	0.06686	0.2874	無	ns
ロッド-8日目対ロッド-22日目	0.1979	1.105	無	ns
精肉体-22日目対ロッド-22日目	0.1423	0.7389	無	ns

【 図 8 A 】

Covanceプロトコル #8386605  
ルシフェラーゼ活性分析 角膜 上皮  
2018年8月13日



一元配置分散分析, p=0.1380.  
Bonferroniの多重比較検定: 全て有意差なし

10

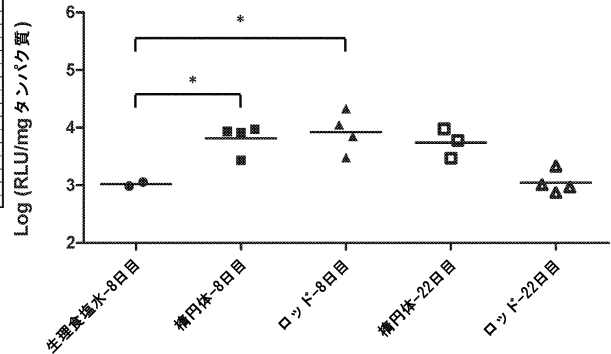
20

【 図 8 B 】

分析表	変換 RLU/mgタンパク質			
一元配置分散分析				
F値	0.1560			
F値サマリ	ns			
平均値に有意差があるか？ (P < 0.05)	無			
群の数	5			
F	2.183			
R平方	0.4428			
分散分析 表	SS	df	MS	
処理(カラム間)	0.07432	4	0.01858	
残差(カラム内)	0.09383	11	0.008511	
総和	0.1680	15		
Bonferroniの多重比較検定	平均値の差	t	有意？ P < 0.05?	サマリ
生理食塩水-8日目対精肉体-8日目	-0.2026	-2.536	無	ns
生理食塩水-8日目対ロッド-8日目	-0.05531	-0.6567	無	ns
生理食塩水-8日目対精肉体-22日目	-0.08820	-0.8216	無	ns
生理食塩水-8日目対ロッド-22日目	-0.1325	-1.555	無	ns
精肉体-8日目対ロッド-8日目	0.1479	1.681	無	ns
精肉体-8日目対精肉体-22日目	0.1334	1.684	無	ns
精肉体-8日目対ロッド-22日目	0.07034	1.078	無	ns
ロッド-8日目対精肉体-22日目	-0.01383	-0.1644	無	ns
ロッド-8日目対ロッド-22日目	-0.07687	-1.092	無	ns
精肉体-22日目対ロッド-22日目	-0.08309	-0.8853	無	ns

【 図 9 A 】

Covanceプロトコル #8386605  
ルシフェラーゼ活性分析 毛様体  
2018年8月13日



一元配置分散分析, p=0.0012.  
Bonferroniの多重比較検定: \* p<0.05, \*\* p<0.01

30

40

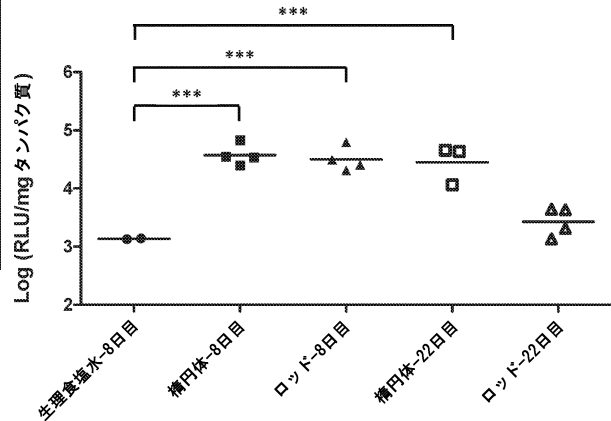
50

【 図 9 B 】

分析表	変換 RLU/mgタンパク質			
一元配置分散分析				
F値	0.6012			
F値サマリ	***			
平均値に有意差があるか？ (P < 0.05)	有			
群の数	5			
F	9.160			
R平方	0.7533			
分散分析表	SS	df	MS	
処理(カラム間)	2.532	4	0.6330	
残差(カラム内)	0.8283	12	0.06911	
総和	3.362	16		
Bonferroniの多重比較検定	平均値の差	t	有意？ P < 0.05?	サマリ
生理食塩水-8日目対ロッド-8日目	-0.7926	3.481	有	*
生理食塩水-8日目対橋円体-8日目	-0.9040	3.971	有	*
生理食塩水-8日目対橋円体-22日目	-0.7208	3.003	無	ns
生理食塩水-8日目対ロッド-22日目	-0.02349	0.1932	無	ns
橋円体-8日目対ロッド-8日目	-0.1115	0.5597	無	ns
橋円体-8日目対橋円体-22日目	0.07174	0.3573	無	ns
橋円体-8日目対ロッド-22日目	0.7690	4.137	有	*
ロッド-8日目対橋円体-22日目	0.1832	0.9124	無	ns
ロッド-8日目対ロッド-22日目	0.6605	4.737	有	**
橋円体-22日目対ロッド-22日目	0.6373	3.473	有	*

【 図 1 0 A 】

Covanceプロトコル #8386605  
 ルシフェラーゼ活性分析 脈絡膜-RPE  
 2018年8月13日



一元配置分散分析, p<0.0001.  
 Bonferroniの多重比較検定: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001

【 図 1 0 B 】

分析表	変換 RLU/mgタンパク質			
一元配置分散分析				
F値	< 0.0001			
F値サマリ	****			
平均値に有意差があるか？ (P < 0.05)	有			
群の数	5			
F	26.77			
R平方	0.8957			
分散分析表	SS	df	MS	
処理(カラム間)	5.458	4	1.362	
残差(カラム内)	0.6479	12	0.05399	
総和	6.214	16		
Bonferroniの多重比較検定	平均値の差	t	有意？ P < 0.05?	サマリ
生理食塩水-8日目対橋円体-8日目	-1.438	3.147	有	**
生理食塩水-8日目対ロッド-8日目	-1.363	3.774	有	**
生理食塩水-8日目対橋円体-22日目	-1.317	3.267	有	**
生理食塩水-8日目対ロッド-22日目	-0.2935	1.469	無	ns
橋円体-8日目対ロッド-8日目	0.67523	0.4579	無	ns
橋円体-8日目対橋円体-22日目	0.1217	0.6856	無	ns
橋円体-8日目対ロッド-22日目	1.145	3.967	有	**
ロッド-8日目対橋円体-22日目	0.64644	0.2517	無	ns
ロッド-8日目対ロッド-22日目	1.070	5.510	有	***
橋円体-22日目対ロッド-22日目	1.023	5.785	有	***

【 図 1 1 - 1 】

ID	タグ	製剤	平均値 RLU	タンパク質(μg)
Un01	P0001-L	生理食塩水	73.57	2.728
Un02	P0001-R	生理食塩水	74.44	2.685
Un03	P0101-L	橋円体 NP	2057.938	3.024
Un04	P0101-R	橋円体 NP	1538.138	3.097
Un07	P0103-L	橋円体 NP	2552.558	3.634
Un08	P0103-R	橋円体 NP	5115.228	3.839
Un05	P0102-L	橋円体 NP	63.062	2.96
Un06	P0102-R	橋円体 NP	627.063	2.728
Un09	P0104-L	橋円体 NP	3329.965	3.844
Un10	P0104-R	橋円体 NP	3430.569	3.753
Un11	P0201-L	ロッド NP	987.998	2.437
Un12	P0201-R	ロッド NP	1975.926	3.196
Un13	P0202-L	ロッド NP	1886.702	3.707
Un14	P0202-R	ロッド NP	4597.467	3.707
Un15	P0203-L	ロッド NP	168.202	4.101
Un16	P0203-R	ロッド NP	98.876	3.65
Un17	P0204-L	ロッド NP	285.28	3.33
Un18	P0204-R	ロッド NP	356.72	4.071
網膜				
Un19	P0001-L	生理食塩水	50.689	4.38
Un20	P0001-R	生理食塩水	52.803	3.906
Un21	P0101-L	橋円体 NP	618.732	4.079
Un22	P0101-R	橋円体 NP	279.311	4.294
Un25	P0103-L	橋円体 NP	112.306	3.99
Un26	P0103-R	橋円体 NP	203.394	3.303
Un23	P0102-L	橋円体 NP	48.016	3.081
Un24	P0102-R	橋円体 NP	114.979	2.663
Un27	P0104-L	橋円体 NP	123.808	3.721
Un28	P0104-R	橋円体 NP	278.005	3.332
Un29	P0201-L	ロッド NP	143.829	3.526
Un30	P0201-R	ロッド NP	78.855	3.797
Un31	P0202-L	ロッド NP	88.865	3.948
Un32	P0202-R	ロッド NP	133.259	2.993

10

20

30

40

50

【 図 1 1 - 2 】

Un33	P0203-L	ロッド NP	45.031	4.084
Un34	P0203-R	ロッド NP	57.342	3.96
Un35	P0204-L	ロッド NP	117.715	3.743
Un36	P0204-R	ロッド NP	80.471	3.76
毛様体				
Un37	P0001-L	生理食塩水	77.114	3.978
Un38	P0001-R	生理食塩水	78.793	3.459
Un39	P0101-L	楕円体 NP	136.679	2.517
Un40	P0101-R	楕円体 NP	472.741	2.516
Un43	P0103-L	楕円体 NP	659.644	3.822
Un44	P0103-R	楕円体 NP	322.648	1.971
Un41	P0102-L	楕円体 NP	1373.991	2.999
Un42	P0102-R	楕円体 NP	152.72	2.578
Un45	P0104-L	楕円体 NP	480.389	4.015
Un46	P0104-R	楕円体 NP	611.208	3.214
Un47	P0201-L	ロッド NP	544.555	3.863
Un48	P0201-R	ロッド NP	204.886	3.407
Un49	P0202-L	ロッド NP	1078.465	4.838
Un50	P0202-R	ロッド NP	1916.858	4.501
Un51	P0203-L	ロッド NP	81.839	4.009
Un52	P0203-R	ロッド NP	60.326	4.053
Un53	P0204-L	ロッド NP	167.705	3.913
Un54	P0204-R	ロッド NP	71.269	3.837
角膜				
Un55	P0001-L	生理食塩水	61.197	0.984
Un56	P0001-R	生理食塩水	49.383	1.145
Un57	P0101-L	楕円体 NP	73.073	0.848
Un58	P0101-R	楕円体 NP	87.373	0.747
Un61	P0103-L	楕円体 NP	60.575	0.855
Un62	P0103-R	楕円体 NP	57.964	0.89
Un59	P0102-L	楕円体 NP	47.456	0.837
Un60	P0102-R	楕円体 NP	47.332	0.878
Un63	P0104-L	楕円体 NP	51.311	0.776
Un64	P0104-R	楕円体 NP	52.99	0.843
Un65	P0201-L	ロッド NP	53.86	0.766

【 図 1 1 - 3 】

Un66	P0201-R	ロッド NP	51.746	0.981
Un67	P0202-R	ロッド NP	45.218	0.824
Un68	P0203-L	ロッド NP	47.891	0.546
Un69	P0203-R	ロッド NP	50.503	0.9
Un70	P0204-L	ロッド NP	50.067	0.603
Un71	P0204-R	ロッド NP	44.223	0.743

角膜 P0202-L TissueLyser中にチューブ破損

虹彩				
Un72	P0001-L	生理食塩水	49.135	0.66
Un73	P0001-R	生理食塩水	52.43	0.537
Un74	P0101-L	楕円体 NP	49.881	0.476
Un75	P0101-R	楕円体 NP	44.347	0.482
Un78	P0103-L	楕円体 NP	72.886	3.545
Un79	P0103-R	楕円体 NP	49.073	1.814
Un76	P0102-L	楕円体 NP	48.389	1.135
Un77	P0102-R	楕円体 NP	45.715	0.453
Un80	P0104-L	楕円体 NP	45.155	1.037
Un81	P0104-R	楕円体 NP	48.451	2.031
Un82	P0201-L	ロッド NP	43.166	0.544
Un83	P0201-R	ロッド NP	49.508	0.655
Un84	P0202-L	ロッド NP	41.487	0.802
Un85	P0202-R	ロッド NP	55.663	2.092
Un86	P0203-L	ロッド NP	42.544	1.429
Un87	P0203-R	ロッド NP	41.736	0.879
Un88	P0204-L	ロッド NP	51.249	1.672
Un89	P0204-R	ロッド NP	43.414	1.412

10

20

【 図 1 1 - 4 】

タンパク質(mg/μl)	RLU/mgタンパク質	群	殺処理した日	OE
0.002728	1348	1	8	所見なし
0.002685	1386	1	8	所見なし
0.003024	34027	2	8	脈絡膜色素脱失
0.003097	24833	2	8	脈絡膜色素脱失
0.003634	35121	2	8	脈絡膜色素脱失
0.003839	66622	2	8	脈絡膜色素脱失
0.00296	1065	2	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.002728	11493	2	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.003844	43314	2	22	脈絡膜色素脱失
0.003753	45704	2	22	脈絡膜色素脱失
0.002437	20271	3	8	脈絡膜色素脱失
0.003196	30912	3	8	脈絡膜色素脱失
0.003707	25448	3	8	脈絡膜色素脱失
0.003707	62011	3	8	脈絡膜色素脱失
0.004101	2051	3	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.00365	1354	3	22	色素脱失なし
0.00333	4283	3	22	脈絡膜色素脱失
0.004071	4381	3	22	脈絡膜色素脱失
0.00438	579	1	8	所見なし
0.003906	676	1	8	所見なし
0.004079	7584	2	8	脈絡膜色素脱失
0.004294	3252	2	8	脈絡膜色素脱失
0.00399	1407	2	8	脈絡膜色素脱失
0.003303	3079	2	8	脈絡膜色素脱失
0.003081	779	2	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.002663	2159	2	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.003721	1664	2	22	脈絡膜色素脱失
0.003332	4172	2	22	脈絡膜色素脱失
0.003526	2040	3	8	脈絡膜色素脱失
0.003797	1038	3	8	脈絡膜色素脱失
0.003948	1125	3	8	脈絡膜色素脱失
0.002993	2226	3	8	脈絡膜色素脱失

【 図 1 1 - 5 】

0.004084	551	3	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.00396	724	3	22	色素脱失なし
0.003743	1572	3	22	脈絡膜色素脱失
0.00376	1070	3	22	脈絡膜色素脱失
0.003978	969	1	8	所見なし
0.003459	1139	1	8	所見なし
0.002517	2715	2	8	脈絡膜色素脱失
0.002516	9395	2	8	脈絡膜色素脱失
0.003822	8630	2	8	脈絡膜色素脱失
0.001971	8185	2	8	脈絡膜色素脱失
0.002999	22907	2	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.002578	2962	2	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.004015	5982	2	22	脈絡膜色素脱失
0.003214	9509	2	22	脈絡膜色素脱失
0.003863	7048	3	8	脈絡膜色素脱失
0.003407	3007	3	8	脈絡膜色素脱失
0.004838	11146	3	8	脈絡膜色素脱失
0.004501	21294	3	8	脈絡膜色素脱失
0.004009	1021	3	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.004053	744	3	22	色素脱失なし
0.003913	2143	3	22	脈絡膜色素脱失
0.003837	929	3	22	脈絡膜色素脱失
0.000984	3110	1	8	所見なし
0.001145	2156	1	8	所見なし
0.000848	4309	2	8	脈絡膜色素脱失
0.000747	5848	2	8	脈絡膜色素脱失
0.000855	3542	2	8	脈絡膜色素脱失
0.00089	3256	2	8	脈絡膜色素脱失
0.000837	2835	2	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.000878	2695	2	22	精子体細胞 色素脱失なし
0.000776	3306	2	22	脈絡膜色素脱失
0.000843	3143	2	22	脈絡膜色素脱失
0.000766	3516	3	8	脈絡膜色素脱失

30

40

50

【 図 1 1 - 6 】

0.000981	2637	3	8	脈絡膜色素脱失
0.000824	2744	3	8	脈絡膜色素脱失
0.000546	4386	3	22	硝子体細胞 色素脱失なし
0.0009	2806	3	22	色素脱失なし
0.000603	4151	3	22	脈絡膜色素脱失
0.000743	2976	3	22	脈絡膜色素脱失
0.00066	3722	1	8	所見なし
0.000537	4882	1	8	所見なし
0.000476	5240	2	8	脈絡膜色素脱失
0.000482	4600	2	8	脈絡膜色素脱失
0.003545	1028	2	8	脈絡膜色素脱失
0.001814	1353	2	8	脈絡膜色素脱失
0.001135	2132	2	22	硝子体細胞 色素脱失なし
0.000453	5046	2	22	硝子体細胞 色素脱失なし
0.001037	2177	2	22	脈絡膜色素脱失
0.002031	1193	2	22	脈絡膜色素脱失
0.000544	3967	3	8	脈絡膜色素脱失
0.000655	3779	3	8	脈絡膜色素脱失
0.000802	2586	3	8	脈絡膜色素脱失
0.002092	1330	3	8	脈絡膜色素脱失
0.001429	1489	3	22	硝子体細胞 色素脱失なし
0.000879	2374	3	22	色素脱失なし
0.001672	1533	3	22	脈絡膜色素脱失
0.001412	1537	3	22	脈絡膜色素脱失

10

20

\* カラムFの数式エラーを修正し、分母を5000ではなく1000とした (MJC, OSL)

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/06
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06

(31)優先権主張番号 62/748,788

(32)優先日 平成30年10月22日(2018.10.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(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 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 タラボレリ ドナ

アメリカ合衆国 3 0 0 0 5 ジョージア州 アルファレッタ ノース ポイント パークウェイ 9 0  
0 スイート 2 0 0 クリアサイド バイオメディカル内

(72)発明者 ユー ジェシー

アメリカ合衆国 3 0 0 0 5 ジョージア州 アルファレッタ ノース ポイント パークウェイ 9 0  
0 スイート 2 0 0 クリアサイド バイオメディカル内

(72)発明者 ノローニャ グレン

アメリカ合衆国 3 0 0 0 5 ジョージア州 アルファレッタ ノース ポイント パークウェイ 9 0  
0 スイート 2 0 0 クリアサイド バイオメディカル内

(72)発明者 クーパー マーク ジェイ .

アメリカ合衆国 4 4 1 0 6 オハイオ州 クリーブランド シダー アベニュー 1 1 0 0 0 スイ  
ート 1 4 5 コペルニクス セラピューティクス インコーポレーティッド内

(72)発明者 モーエン ロバート シー .

アメリカ合衆国 4 4 1 0 6 オハイオ州 クリーブランド シダー アベニュー 1 1 0 0 0 スイ  
ート 1 4 5 コペルニクス セラピューティクス インコーポレーティッド内

(72)発明者 ホワイト ダニエル

アメリカ合衆国 3 0 0 0 5 ジョージア州 アルファレッタ ノース ポイント パークウェイ 9 0  
0 スイート 2 0 0 クリアサイド バイオメディカル内

(72)発明者 マケレニー リック

アメリカ合衆国 3 0 0 0 5 ジョージア州 アルファレッタ ノース ポイント パークウェイ 9 0  
0 スイート 2 0 0 クリアサイド バイオメディカル内

## 合議体

審判長 原田 隆興

審判官 田中 耕一郎

審判官 淵野 留香

- 
- (56)参考文献 国際公開第2011/17313(WO,A1)  
特表2015-535293(JP,A)  
国際公開第2012/057363(WO,A1)  
Journal of Controlled Release 219(2015), 471-487  
日医大医学会誌、2012年、8巻2号、150~156頁
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
A61K 48/00  
A61P 27/02  
CAPLUS/BIOSIS/EMBASE/MEDLINE(STN)