(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7707081号
(P7707081)

(45)発行日　令和7年7月14日(2025.7.14)

(24)登録日　令和7年7月4日(2025.7.4)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	48/00
Ａ６１Ｋ　35/76　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/76
Ａ６１Ｐ　27/02　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	27/02
Ａ６１Ｐ　27/12　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	27/12
Ａ６１Ｐ　27/06　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	27/06

ＦＩ

請求項の数　13　（全40頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-568813(P2021-568813)
(86)(22)出願日　令和2年4月15日(2020.4.15)
(65)公表番号　特表2022-533983(P2022-533983A)
(43)公表日　令和4年7月27日(2022.7.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/028352
(87)国際公開番号　WO2020/236352
(87)国際公開日　令和2年11月26日(2020.11.26)
審査請求日　令和5年4月17日(2023.4.17)
(31)優先権主張番号　62/849,794
(32)優先日　令和1年5月17日(2019.5.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　515289842
リサーチ インスティチュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０５，コロンバス， チルドレンズ ドライブ ７００， ルーム ダブリュー１７２
(73)特許権者　518167446
サンフォード リサーチ
アメリカ合衆国、サウス ダコタ州 ５７１０４、スー フォールズ、イースト ６０番 ストリート ノース ２３０１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　網膜細胞を標的とした最適化された遺伝子治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

導入遺伝子を対象の網膜細胞に送達するための組成物であって、前記組成物が前記導入遺伝子をコードするＡＡＶ９またはＡｎｃ８０遺伝子治療ベクターを含み、前記組成物が、髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、組成物。

【請求項２】

前記網膜細胞が、双極細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、神経節細胞、ミュラーグリア細胞、ミクログリア細胞、水平細胞またはアマクリン細胞である、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記対象が視覚機能障害または視力関連障害に罹患している、請求項１に記載の組成物。

【請求項４】

前記視力関連障害が、バッテン病、先天性白内障、先天性緑内障、網膜変性症、視神経萎縮、眼奇形、斜視、眼球のずれ、緑内障、湿性加齢性黄斑変性症、乾性加齢性黄斑変性症、網膜色素変性症、全脈絡膜萎縮、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経症、早期発症網膜ジストロフィー、色覚異常、ｘ連鎖網膜分離症、アッシャー症候群１Ｂ、新生血管の加齢性黄斑変性症、シュタルガルト病の黄斑変性症、糖尿病性黄斑変性症、または糖尿病性黄斑浮腫である、請求項３に記載の組成物。

【請求項５】

前記視力関連障害がバッテン病であるか、または前記視覚機能障害がバッテン病の症状であり、必要に応じて、前記バッテン病が、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬ

Ｎ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である、請求項３または４に記載の組成物。
【請求項６】
前記導入遺伝子が、ＣＬＮポリペプチド、ＲＰＥ６５、ＲＰＧＲ、ＯＲＦ１５、ＣＮＧＡ３、ＣＭＨ、ＮＤ４、ＰＤＥ６Ｂ、ＣｈＲ２、ＭＥＲＴＫ、ｈＲＳ１、ｈＭＹＯＪＡ、ｈＡＢＣＡ４、ＣＤ５９、抗ｈＶＥＧＦ抗体、エンドスタチン－アンギオスタチン、ｓＦＬＴ０１、またはｓＦＬＴ－１をコードする、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
前記導入遺伝子が、ｍｉＲＮＡ、ＲＴＰ８０１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦＲ－１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦに対するｓｉＲＮＡ、またはＡＤＲＢ２に対するｓｉＲＮＡである、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記ＣＬＮポリペプチドが、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８である、請求項６に記載の組成物。
【請求項９】
前記対象がバッテン病に罹患している、請求項１に記載の組成物。
【請求項１０】
前記バッテン病が、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記導入遺伝子がＣＬＮポリペプチドをコードする、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記ＣＬＮポリペプチドが、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８である、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記対象が前記遺伝子治療ベクターの投与後にトレンデレンブルグ体位に置かれる、請求項１～１２のいずれか一項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１７年５月１７日に出願された米国仮特許出願第６２／８４９，７９４号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
電子的に提出された資料の参照による組み込み
本開示の一部である配列表を明細書と同時にテキストファイルとして提出する。配列表を含むテキストファイルの名称は、「５３９５３＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ」であり、これは２０２０年４月１４日に作成され、サイズは１５．４２９バイトである。配列表の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
本開示は、最適化された遺伝子治療ベクターを使用して網膜内の特定の細胞型を標的とする方法に関する。特に、本開示は、網膜細胞を特異的に標的とする遺伝子治療ベクター、ならびに視覚機能障害、網膜変性症、およびＣＬＮ病などの視力関連障害を治療する方法を提供する。
【背景技術】
【０００４】
遺伝子治療ベクターの眼への投与は、眼の解剖学的構造が明確であるため、多くの利点がある。特に、目の容易なアクセスは、迅速で進歩的な検査を可能にする。眼の比較的密閉された構造および小さなサイズは、送達のために低用量のベクターを必要とする。血液

網膜関門は、体循環へのベクターの漏出を防ぎ、比較的免疫特権のある環境を維持する。特定の眼障害に主にまたは部分的に関与する個々のまたは複数の遺伝子が同定されている。

【０００５】

遺伝子治療ベクターの眼への投与は、いくつかの有望な結果を示している。現在、視力喪失関連疾患を対象とした臨床遺伝子治療試験が数多くあり、これらの試験は主に遺伝性網膜疾患を対象としている。例えば、臨床試験では、レーバー先天性黒内障（ＬＣＡ）、レーバー遺伝性視神経症、および網膜色素変性症が試験されている。今日まで、ＡＡＶベクター、特にＡＡＶ２血清型は、眼の遺伝子治療で最も一般的に使用されてきた。Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ ｒｅｔｉｎａｌ ａｎｄ ｅｙｅ ｒｅｓｅａｒｃｈ ６８：３１－５３，２０１９を参照。

【０００６】

神経セロイドリポフスチン症（ＮＣＬ）は、まとめてバッテン病と称される一群の重度の神経変性障害である。これらの障害は神経系に影響を及ぼし、典型的には、例えば、移動、視力および思考能力に関する問題を悪化させる。異なるＮＣＬは、それらの遺伝学的原因によって区別される。バッテン病の小児期の患者では、部分的または完全な視力の喪失がしばしば発症する。特にバッテン病を患っている人では、リポフスチンは脳および網膜などの細胞内に蓄積する。リポフスチンの蓄積は、網膜、視神経、および視力を処理する脳の領域の光受容体に損傷を与える。

現在、網膜の特定の細胞型を標的とする改善された遺伝子治療法が必要とされている。さらに、バッテン病の症状を改善することができる治療はない。したがって、バッテン病の治療に対する当該技術分野における必要性が残っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【文献】Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ ｒｅｔｉｎａｌ ａｎｄ ｅｙｅ ｒｅｓｅａｒｃｈ ６８：３１－５３，２０１９

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本開示は、網膜の特定の細胞型を標的とする最適化された遺伝子治療ベクターを提供する。これらの最適化された遺伝子治療ベクターは、特定の網膜細胞に導入遺伝子を送達するのに有用である。本開示は、局所静脈内（ＩＶ）送達、網膜下送達、硝子体内送達、脳室内送達、実質内送達または髄腔内送達を使用して最適化された遺伝子治療ベクターを投与することを含む、視力関連障害を治療する方法を提供する。特定の細胞型を標的とする遺伝子治療法は、視力喪失関連疾患の治療に利点がある。

【０００９】

本開示は、対象の網膜細胞に導入遺伝子を送達する方法であって、導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを対象に投与することを含み、遺伝子治療ベクターが、局所静脈内（ＩＶ）送達、網膜下送達、硝子体内送達、脳室内送達、実質内送達または髄腔内送達を使用して対象に投与される、方法を提供する。例えば、開示された方法は、双極細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、神経節細胞、ミュラーグリア細胞、ミクログリア細胞、水平細胞および／またはアマクリン細胞を含むがこれらに限定されないすべての網膜細胞に導入遺伝子を送達することをもたらす。

【００１０】

本開示はまた、導入遺伝子を対象の網膜細胞に送達するための組成物であって、組成物が、導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを含み、組成物が、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、組成物を提供する。

【００１１】

別の実施形態では、本開示は、導入遺伝子を対象の網膜細胞に送達するための薬剤の調

製のための遺伝子治療ベクターの使用であって、薬剤が、導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを含み、薬剤が、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、使用を提供する。

【００１２】

本開示はまた、対象の視覚機能障害、網膜変性症または視力関連障害を治療する方法であって、導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを対象に投与することを含み、遺伝子治療ベクターが、局所静脈内（ＩＶ）送達、網膜下送達、硝子体内送達、脳室内送達、実質内送達または髄腔内送達を使用して投与される、方法を提供する。

【００１３】

本開示はまた、対象の視覚機能障害または視力関連障害を治療するための組成物であって、組成物が対象への導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを含み、組成物が、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、組成物を提供する。

【００１４】

追加の実施形態では、本開示は、対象の視覚機能障害または視力関連障害を治療するための薬剤の調製のための遺伝子治療ベクターの使用であって、薬剤が導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを含み、薬剤が、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、使用を提供する。

【００１５】

例えば、視力関連障害は、バッテン病、先天性白内障、先天性緑内障、網膜変性症、視神経萎縮、眼の奇形、斜視、眼球のずれ、緑内障、湿性加齢性黄斑変性症、乾性加齢性黄斑変性症、網膜色素変性症、全脈絡膜萎縮、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経症、早期発症網膜ジストロフィー、色覚異常、ｘ連鎖網膜分離症、アッシャー症候群１Ｂ、新生血管の加齢性黄斑変性症、シュタルガルト病の黄斑変性症、糖尿病性黄斑変性症、または糖尿病性黄斑浮腫である。特定の実施形態では、視力関連障害は、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病などのＣＬＮバッテン病である。

【００１６】

目的の任意の導入遺伝子を網膜細胞に送達するための、開示された方法、組成物および使用。導入遺伝子は、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であるか、あるいはｓｉＲＮＡもしくはｍｉＲＮＡなどの目的の遺伝子の発現を阻害、妨害、または沈静化する核酸である。例示的な導入遺伝子は、ＲＰＥ６５、ＲＰＧＲ、ＯＲＦ１５、ＣＮＧＡ３、ＣＭＨ、ＮＤ４、ＰＤＥ６Ｂ、ＣｈＲ２、ＭＥＲＴＫ、ｈＲＳ１、ｈＭＹＯＪＡ、ｈＡＢＣＡ４、ＣＤ５９、抗ｈＶＥＧＦ抗体、エンドスタチン－アンギオスタチン、ｓＦＬＴ０１、またはｓＦＬＴ－１をコードするポリヌクレオチドである。追加の例示的な導入遺伝子には、ＲＴＰ８０１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦＲ－１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦに対するｓｉＲＮＡ、またはＡＤＲＢ２に対するｓｉＲＮＡが含まれる。一実施形態では、導入遺伝子は、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８などのＣＬＮポリペプチドをコードする。

【００１７】

本開示はまた、対象のバッテン病を治療する方法であって、ＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子治療ベクターを対象に投与することを含み、遺伝子治療ベクターが、局所静脈内（ＩＶ）送達、網膜下送達、硝子体内送達、脳室内送達、実質内送達または髄腔内送達を使用して投与される、方法を提供する。

【００１８】

他の実施形態では、本開示は、対象のバッテン病を治療するための組成物であって、組成物が、ＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子治療ベクターを含み、組成物が、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、組成物を提供する。

【００１９】
追加の実施形態では、本開示は、対象のバッテン病を治療するための薬剤の調製のための遺伝子治療ベクターの使用であって、薬剤がＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子治療ベクターを含み、薬剤が、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、使用を提供する。
【００２０】
本開示の方法、組成物または使用のいずれかによって治療されるバッテン病は、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である。
【００２１】
開示された方法、組成物または使用のいずれかにおいて、導入遺伝子は、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８などのＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。バッテン病を治療するための方法、組成物または使用のいずれかにおいて、未治療のバッテン病患者と比較して、効果的な治療は、（ａ）視力の喪失、（ｂ）脳容積の損失、（ｃ）認知機能の喪失、および（ｄ）言語発達遅滞、から選択されるバッテン病の１つ以上の症状を減少させるかまたは遅延させる。症状は、統一バッテン病評価尺度（ＵＢＤＳ）またはハンブルク運動言語尺度を使用して評価することができる。
【００２２】
開示された方法、組成物または使用のいずれかにおいて、遺伝子治療ベクターは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶＲＨ１０、ＡＡＶＲＨ７４、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶＴＴまたはＡｎｃ８０、ＡＡＶ７ｍ８、およびそれらの誘導体である。
【００２３】
開示された方法、組成物または使用のいずれかにおいて、遺伝子治療ベクターは、ＣＭＶプロモーター、ｐ５４６、またはＣＢプロモーターを含む。
【００２４】
さらに、開示された方法、組成物または使用のいずれかにおいて、遺伝子治療ベクターは、髄腔内送達を使用して投与され、方法は、遺伝子治療ベクターの投与後に対象をトレンデレンブルグ体位に置くことをさらに含む。
本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。
（項目１）
対象の網膜細胞に導入遺伝子を送達する方法であって、前記導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを投与することを含み、前記遺伝子治療ベクターが、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して前記対象に投与される、方法。
（項目２）
前記網膜細胞が、双極細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、神経節細胞、ミュラーグリア細胞、ミクログリア細胞、水平細胞またはアマクリン細胞である、項目１に記載の方法。
（項目３）
対象の視覚機能障害または視力関連障害を治療する方法であって、導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを前記対象に投与することを含み、前記遺伝子治療ベクターが、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して投与される、方法。
（項目４）
前記視力関連障害が、バッテン病、先天性白内障、先天性緑内障、網膜変性症、視神経萎縮、眼奇形、斜視、眼球のずれ、緑内障、湿性加齢性黄斑変性症、乾性加齢性黄斑変性症、網膜色素変性症、全脈絡膜萎縮、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経症、早期発症網膜ジストロフィー、色覚異常、ｘ連鎖網膜分離症、アッシャー症候群１Ｂ、新生血管の加齢性黄斑変性症、シュタルガルト病の黄斑変性症、糖尿病性黄斑変性症、または糖尿病性黄斑浮腫である、項目３に記載の方法。

（項目５）
前記視力関連障害がバッテン病であるか、または前記視覚機能障害がバッテン病の症状である、項目３または４に記載の方法。
（項目６）
前記バッテン病が、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である、項目５に記載の方法。
（項目７）
前記導入遺伝子が、ＲＰＥ６５、ＲＰＧＲ、ＯＲＦ１５、ＣＮＧＡ３、ＣＭＨ、ＮＤ４、ＰＤＥ６Ｂ、ＣｈＲ２、ＭＥＲＴＫ、ｈＲＳ１、ｈＭＹＯＪＡ、ｈＡＢＣＡ４、ＣＤ５９、抗ｈＶＥＧＦ抗体、エンドスタチン－アンギオスタチン、ｓＦＬＴ０１、またはｓＦＬＴ－１をコードする、項目１～６のいずれか一項に記載の方法。
（項目８）
前記導入遺伝子が、ｍｉＲＮＡ、ＲＴＰ８０１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦＲ－１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦに対するｓｉＲＮＡ、またはＡＤＲＢ２に対するｓｉＲＮＡである、項目１～７のいずれか一項に記載の方法。
（項目９）
前記導入遺伝子がＣＬＮポリペプチドをコードする、項目１～８のいずれか一項に記載の方法。
（項目１０）
前記ＣＬＮポリペプチドが、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８である、項目９に記載の方法。
（項目１１）
対象のバッテン病を治療する方法であって、ＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子治療ベクターを前記対象に投与することを含み、前記遺伝子治療ベクターが、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して投与される、方法。
（項目１２）
前記バッテン病が、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である、項目１１に記載の方法。
（項目１３）
前記導入遺伝子がＣＬＮポリペプチドをコードする、項目１１または１２に記載の方法。
（項目１４）
前記ＣＬＮポリペプチドが、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８である、項目１３に記載の方法。
（項目１５）
前記治療が、未治療のバッテン病患者と比較して、
（ａ）視力の喪失、
（ｂ）脳容積の損失、
（ｃ）認知機能の喪失、および
（ｄ）言語発達遅滞
から選択されるバッテン病の１つ以上の症状を減少させるかまたは遅延させる、項目１１～１４のいずれか一項に記載の方法。
（項目１６）
前記遺伝子治療ベクターが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶＲＨ１０、ＡＡＶＲＨ７４、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶＴＴ、もしくはＡｎｃ８０、またはＡＡＶ７ｍ８である、項目１～１５のいずれか一項に記載の方法。
（項目１７）
前記ＡＡＶ９またはＡｎｃ８０が髄腔内送達を使用して投与され、前記方法が、前記遺伝子治療ベクターの投与後に前記対象をトレンデレンブルグ体位に置くことをさらに含む、項目１～１５のいずれか一項に記載の方法。

（項目１８）
導入遺伝子を対象の網膜細胞に送達するための組成物であって、前記組成物が前記導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを含み、前記組成物が、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、組成物。
（項目１９）
前記網膜細胞が、双極細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、神経節細胞、ミュラーグリア細胞、ミクログリア細胞、水平細胞またはアマクリン細胞である、項目１８に記載の組成物。
（項目２０）
対象の視覚機能障害または視力関連障害を治療するための組成物であって、前記組成物が、前記対象への導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを含み、前記組成物が、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、組成物。
（項目２１）
前記視力関連障害が、バッテン病、先天性白内障、先天性緑内障、網膜変性症、視神経萎縮、眼奇形、斜視、眼球のずれ、緑内障、湿性加齢性黄斑変性症、乾性加齢性黄斑変性症、網膜色素変性症、全脈絡膜萎縮、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経症、早期発症網膜ジストロフィー、色覚異常、ｘ連鎖網膜分離症、アッシャー症候群１Ｂ、新生血管の加齢性黄斑変性症、シュタルガルト病の黄斑変性症、糖尿病性黄斑変性症、または糖尿病性黄斑浮腫である、項目２０に記載の組成物。
（項目２２）
前記視力関連障害がバッテン病であるか、または前記視覚機能障害がバッテン病の症状である、項目２０または２１に記載の組成物。
（項目２３）
前記バッテン病が、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である、項目２２に記載の組成物。
（項目２４）
前記導入遺伝子が、ＲＰＥ６５、ＲＰＧＲ、ＯＲＦ１５、ＣＮＧＡ３、ＣＭＨ、ＮＤ４、ＰＤＥ６Ｂ、ＣｈＲ２、ＭＥＲＴＫ、ｈＲＳ１、ｈＭＹＯＪＡ、ｈＡＢＣＡ４、ＣＤ５９、抗ｈＶＥＧＦ抗体、エンドスタチン－アンギオスタチン、ｓＦＬＴ０１、またはｓＦＬＴ－１をコードする、項目１８～２１のいずれか一項に記載の組成物。
（項目２５）
前記導入遺伝子が、ｍｉＲＮＡ、ＲＴＰ８０１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦＲ－１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦに対するｓｉＲＮＡ、またはＡＤＲＢ２に対するｓｉＲＮＡである、項目１８～２１のいずれか一項に記載の組成物。
（項目２６）
前記導入遺伝子がＣＬＮポリペプチドをコードする、項目１８～２３のいずれか一項に記載の組成物。
（項目２７）
前記ＣＬＮポリペプチドが、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８である、項目２６に記載の組成物。
（項目２８）
対象のバッテン病を治療するための組成物であって、前記組成物が、ＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子治療ベクターを含み、前記組成物が、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、組成物。
（項目２９）
前記バッテン病が、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である、項目２８に記載の組成物。
（項目３０）

前記導入遺伝子がＣＬＮポリペプチドをコードする、項目２８または２９に記載の組成物。
（項目３１）
前記ＣＬＮポリペプチドが、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８である、項目３０に記載の組成物。
（項目３２）
前記治療が、未治療のバッテン病患者と比較して、
（ａ）視力の喪失、
（ｂ）脳容積の損失、
（ｃ）認知機能の喪失、および
（ｄ）言語発達遅滞
から選択されるバッテン病の１つ以上の症状を減少させるかまたは遅延させる、項目２８～３１のいずれか一項に記載の組成物。
（項目３３）
前記遺伝子治療ベクターが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶＲＨ１０、ＡＡＶＲＨ７４、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶＴＴ、もしくはＡｎｃ８０、またはＡＡＶ７ｍ８である、項目１８～３２のいずれか一項に記載の組成物。
（項目３４）
前記遺伝子治療ベクターがＡＡＶ９またはＡｎｃ８０であり、前記組成物が髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療を投与するために配合され、前記対象が前記遺伝子治療ベクターの投与後にトレンデレンブルグ体位に置かれる、項目１８～３２のいずれか一項に記載の組成物。
（項目３５）
対象の網膜細胞に導入遺伝子を送達するための薬剤の調製のための遺伝子治療の使用であって、前記薬剤が前記導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを含み、前記薬剤が、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、使用。
（項目３６）
前記網膜細胞が、双極細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、神経節細胞、ミュラーグリア細胞、ミクログリア細胞、水平細胞またはアマクリン細胞である、項目３５に記載の使用。
（項目３７）
対象の視覚機能障害または視力関連障害を治療するための薬剤の調製のための遺伝子治療ベクターの使用であって、前記薬剤が導入遺伝子をコードする遺伝子治療ベクターを含み、前記薬剤が、局所静脈内送達、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、使用。
（項目３８）
前記視力関連障害が、バッテン病、先天性白内障、先天性緑内障、網膜変性症、視神経萎縮、眼奇形、斜視、眼球のずれ、緑内障、湿性加齢性黄斑変性症、乾性加齢性黄斑変性症、網膜色素変性症、全脈絡膜萎縮、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経症、早期発症網膜ジストロフィー、色覚異常、ｘ連鎖網膜分離症、アッシャー症候群１Ｂ、新生血管の加齢性黄斑変性症、シュタルガルト病の黄斑変性症、糖尿病性黄斑変性症、または糖尿病性黄斑浮腫である、項目３７に記載の使用。
（項目３９）
前記視力関連障害がバッテン病であるか、または前記視覚機能障害がバッテン病の症状である、項目３７または３８に記載の使用。
（項目４０）
前記バッテン病が、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である、項目３９に記載の使用。
（項目４１）

前記導入遺伝子が、ＲＰＥ６５、ＲＰＧＲ、ＯＲＦ１５、ＣＮＧＡ３、ＣＭＨ、ＮＤ４、ＰＤＥ６Ｂ、ＣｈＲ２、ＭＥＲＴＫ、ｈＲＳ１、ｈＭＹＯＪＡ、ｈＡＢＣＡ４、ＣＤ５９、抗ｈＶＥＧＦ抗体、エンドスタチン－アンギオスタチン、ｓＦＬＴ０１、またはｓＦＬＴ－１をコードする、項目３５～４０のいずれか一項に記載の使用。

（項目４２）

前記導入遺伝子が、ｍｉＲＮＡ、ＲＴＰ８０１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦＲ－１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦに対するｓｉＲＮＡ、またはＡＤＲＢ２に対するｓｉＲＮＡである、項目３５～４０のいずれか一項に記載の使用。

（項目４３）

前記導入遺伝子がＣＬＮポリペプチドをコードする、項目３５～４０のいずれか一項に記載の使用。

（項目４４）

前記ＣＬＮポリペプチドが、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８である、項目４３に記載の使用。

（項目４５）

対象のバッテン病を治療するための薬剤の調製のための遺伝子治療ベクターの使用であって、前記薬剤が、ＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子治療ベクターを含み、前記薬剤が、網膜下送達、硝子体内送達または髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療ベクターを投与するために配合される、使用。

（項目４６）

前記バッテン病が、ＣＬＮ１病、ＣＬＮ２病、ＣＬＮ３病、ＣＬＮ４病、ＣＬＮ５病、ＣＬＮ６病またはＣＬＮ８病である、項目４５に記載の使用。

（項目４７）

前記導入遺伝子がＣＬＮポリペプチドをコードする、項目４５または４６に記載の使用。

（項目４８）

前記ＣＬＮポリペプチドが、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８である、項目４７に記載の使用。

（項目４９）

前記治療が、未治療のバッテン病患者と比較して、

（ａ）視力の喪失、

（ｂ）脳容積の損失、

（ｃ）認知機能の喪失、および

（ｄ）言語発達遅滞

から選択されるバッテン病の１つ以上の症状を減少させるかまたは遅延させる、項目３５～４８のいずれか一項に記載の使用。

（項目５０）

前記遺伝子治療ベクターが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶＲＨ１０、ＡＡＶＲＨ７４、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶＴＴ、またはＡｎｃ８０、またはＡＡＶ７ｍ８である、項目３５～４９のいずれか一項に記載の使用。

（項目５１）

前記遺伝子治療ベクターがＡＡＶ９またはＡｎｃ８０であり、前記薬剤が髄腔内送達を使用して前記遺伝子治療を投与するために配合され、前記対象が前記遺伝子治療ベクターの投与後にトレンデレンブルグ体位に置かれる、項目３５～４９のいずれか一項に記載の使用。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】本開示で試験されたベクターの概略図を提供する。

【図２Ａ】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。

【図２Ｂ】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。

【図２Ｃ】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図２Ｄ－１】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図２Ｄ－２】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図３Ａ】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図３Ｂ】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図３Ｃ】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図３Ｄ】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図３Ｅ】髄腔内投与後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図４Ａ】網膜下注射後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図４Ｂ】網膜下注射後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図４Ｃ】網膜下注射後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図５Ａ－１】網膜下送達後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図５Ａ－２】網膜下送達後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図５Ｂ】網膜下送達後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図５Ｃ】網膜下送達後のＧＦＰ導入遺伝子の網膜送達を示す。
【図６Ａ】２つの異なる共染色を使用して試験された４つのベクターすべてについて、網膜下送達後のすべての組織の合成を低倍率で提供する。
【図６Ｂ】２つの異なる共染色を使用して試験された４つのベクターすべてについて、網膜下送達後のすべての組織の合成を低倍率で提供する。
【図７】ＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰの１．２ｅ^{14}ｖｇを髄腔内注射した１０歳の非ヒト霊長類からのデータを提供する。網膜を、ミュラーグリア細胞マーカーであるＳｏｘ２で対比染色した。注射された霊長類では、ＧＦＰおよびＳｏｘ２の顕著な共局在が観察された。
【図８Ａ】硝子体内注射後の網膜におけるミュラーグリア細胞の形質導入を示す。ＧＣは神経節細胞層、ＩＮＬは内神経層、ＯＮＬは外神経層である。Ｓｏｘ２はミュラー細胞特異的マーカーである。
【図８Ｂ】硝子体内注射後の網膜におけるミュラーグリア細胞の形質導入を示す。ＧＣは神経節細胞層、ＩＮＬは内神経層、ＯＮＬは外神経層である。Ｓｏｘ２はミュラー細胞特異的マーカーである。
【図９Ａ】硝子体内注射後の網膜における双極細胞の形質導入を示す。Ｏｔｘ２は双極細胞特異的マーカーである。
【図９Ｂ】硝子体内注射後の網膜における双極細胞の形質導入を示す。Ｏｔｘ２は双極細胞特異的マーカーである。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
バッテン病などの視力関連障害を治療するために眼を標的とするためのＡＡＶ遺伝子治療の最適化には、さまざまな細胞型の特定の標的化が必要である。本開示は、マウスおよび非ヒト霊長類の網膜における特定の細胞型への導入遺伝子の送達を標的とするための最適な遺伝子治療ベクターを決定するために、異なる遺伝子治療ベクター、プロモーターおよび投与経路を比較する実験データを提供する。
【００２７】
データはＡＡＶ９およびＡｎｃ８０ベクターの投与に焦点を当てているが、本開示は、網膜細胞を特異的に標的とするプロモーターを含む任意の遺伝子治療ベクターの使用を企図しており、これらの最適化されたベクターは、局所静脈内（ＩＶ）送達、網膜下送達、硝子体内送達、脳室内送達、実質内送達または髄腔内送達を使用して投与される。例えば、データは、脳室内注射を介して脳脊髄液に直接注射されたＡＡＶ９が、網膜の双極細胞における導入遺伝子発現を標的とするのに効果的であることを示した。したがって、髄腔内注射は、遺伝子治療ベクターを眼に送達するために、そして特に遺伝子治療ベクターを双極細胞に送達するために使用することができる。
【００２８】
遺伝子治療ベクター

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖ＤＮＡゲノムは、２つの１４５個のヌクレオチドの逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む約４．７ｋｂの長さであり、ウイルス自体またはその誘導体を指すように使用することができる。この用語は、他に特定されない限り、すべてのサブタイプ、ならびに天然に存在する形態および組換え形態の両方を包含する。ＡＡＶの複数の血清型がある。ＡＡＶの血清型は、各々特定のクレードと関連しており、そのメンバーは血清学的および機能的類似性を共有している。したがって、ＡＡＶはまた、クレードによって称され得る。例えば、ＡＡＶ９配列は、「クレードＦ」配列と称される（Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７８：６３８１－６３８８（２００４））。本開示は、特定のクレード、例えばクレードＦ内の任意の配列の使用を企図する。ＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列は既知である。例えば、ＡＡＶ－１の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＣ＿００２０７７に提供されており、ＡＡＶ－２の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＣ＿００１４０１およびＳｒｉｖａｓｔａｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，４５：５５５－５６４（１９８３）に提供されており、ＡＡＶ－３の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＣ＿１８２９に提供されており、ＡＡＶ－４の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＣ＿００１８２９に提供されており、ＡＡＶ－５ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＦ０８５７１６に提供されており、ＡＡＶ－６の完全なゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＣ＿００　１８６２に提供されており、ＡＡＶ－７およびＡＡＶ－８ゲノムの少なくとも部分は、それぞれ、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ７５３２４６およびＡＸ７５３２４９に提供されており、ＡＡＶ－９ゲノムは、Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７８：６３８１－６３８８（２００４）に提供されており、ＡＡＶ－１０ゲノムは、Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１３（１）：６７－７６（２００６）に提供されており、ＡＡＶ－１１ゲノムは、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，３３０（２）：３７５－３８３（２００４）に提供されており、ＡＡＶ－１２ゲノムの部分は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＤＱ８１３６４７に提供されており、ＡＡＶ－１３ゲノムの部分は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＥＵ２８５５６２に提供されている。ＡＡＶ　ｒｈ．７４ゲノムの配列は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，４３４，９２８号に提供されている。ＡＡＶ－Ｂ１ゲノムの配列は、Ｃｈｏｕｄｈｕｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅ．，２４（７）：１２４７－１２５７（２０１６）に提供されている。Ａｎｃ８０は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ８、およびＡＡＶ９のＡＡＶベクターである。Ａｎｃ８０の配列は、両方とも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｚｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　１２：１０５６－１０６８，２０１５、Ｖａｎｄｅｎｂｅｒｇｈｅ　ｅｔ　ａｌ、ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６０１６３、およびＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＫＴ２３５８０４－ＫＴ２３５８１２に提供されている。

【００２９】

ウイルスＤＮＡ複製（ｒｅｐ）、キャプシド形成／パッケージング、および宿主細胞染色体組み込みを指示するＣｉｓ作用配列は、ＩＴＲ内に含有される。３つのＡＡＶプロモーター（それらの相対マップ位置に対してｐ５、ｐ１９、およびｐ４０と名付けられる）は、ｒｅｐおよびｃａｐ遺伝子をコードする２つのＡＡＶ内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。単一のＡＡＶイントロンの差異的スプライシング（ヌクレオチド２１０７および２２２７における）と相まって、２つのｒｅｐプロモーター（ｐ５およびｐ１９）により、ｒｅｐ遺伝子から４つのｒｅｐタンパク質（ｒｅｐ７８、ｒｅｐ６８、ｒｅｐ５２、およびｒｅｐ４０）が産生される。ｒｅｐタンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性を有する。ｃａｐ遺伝子は、ｐ４０プロモーターから発現され、３つのキャプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位は、３つの関連キャプシドタンパク質の産生に関与する。単一コンセンサスポリアデニル化部位は、ＡＡＶゲノムのマップ位置９５に位置する。ＡＡＶのライフサイクルおよび遺伝学は、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｔｏｐｉｃｓ　ｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１５８：９７－１２９（１９９２）に概説されている。

【００３０】
ＡＡＶは、例えば、遺伝子治療において、外来ＤＮＡを細胞に送達するためのベクターとしてそれを魅力的にする固有の特徴を有する。培養中の細胞のＡＡＶ感染は非細胞変性であり、ヒトおよび他の動物の自然感染はサイレントかつ無症候性である。さらに、ＡＡＶは、多くの哺乳動物細胞を感染させ、インビボで多くの異なる組織を標的とする可能性を可能にする。さらに、ＡＡＶは、緩徐に分裂する細胞および非分裂細胞を形質導入し、転写的に活性な核エピソーム（染色体外要素）として本質的にそれらの細胞の寿命にわたって存続し得る。天然のＡＡＶプロウイルスゲノムは、組換えゲノムの構築を実現可能にするプラスミド中のクローン化ＤＮＡとして感染性である。さらに、ＡＡＶ複製、ゲノムキャプシド形成および組み込みを指示するシグナルがＡＡＶゲノムのＩＴＲ内に含有されるので、ゲノムの内部約４．３ｋｂ（複製および構造キャプシドタンパク質、ｒｅｐ－ｃａｐをコードする）のいくつかまたはすべては、プロモーター、目的のＤＮＡおよびポリアデニル化シグナルを含有する遺伝子カセットのような外来ＤＮＡと置き換えられ得る。場合によっては、ｒｅｐおよびｃａｐタンパク質は、トランスで提供される。ＡＡＶの別の重要な特徴は、それが極めて安定かつ頑健なウイルスであることである。これは、アデノウイルスを不活性化するために使用される条件（５６℃～６５℃で数時間）に容易に耐え、ＡＡＶの低温保存の重要性を低くする。ＡＡＶは、凍結乾燥され得る。最後に、ＡＡＶ感染細胞は、重複感染に耐性を示さない。

【００３１】
本明細書で使用される「ＡＡＶ」という用語は、野生型ＡＡＶウイルスまたはウイルス粒子を指す。「ＡＡＶ」、「ＡＡＶウイルス」、および「ＡＡＶウイルス粒子」という用語は、本明細書では交換的に使用される。「ｒＡＡＶ」という用語は、組換えＡＡＶウイルス、または組換え感染性のカプセル化ウイルス粒子を指す。「ｒＡＡＶ」、「ｒＡＡＶウイルス」、および「ｒＡＡＶウイルス粒子」という用語は、本明細書では交換的に使用される。

【００３２】
「ｒＡＡＶゲノム」という用語は、修飾されている天然のＡＡＶゲノムに由来するポリヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、天然のｃａｐおよびｒｅｐ遺伝子を除去するために修飾されている。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは内因性５’および３’逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶゲノムが由来するＡＡＶ血清型とは異なるＡＡＶ血清型からのＩＴＲを含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、逆方向末端反復（ＩＴＲ）によって５’末端および３’末端に隣接した目的の導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、「遺伝子カセット」を含む。

【００３３】
「ｓｃＡＡＶ」という用語は、自己相補的ゲノムを含むｒＡＡＶウイルスまたはｒＡＡＶウイルス粒子を指す。「ｓｓＡＡＶ」という用語は、一本鎖ゲノムを含むｒＡＡＶウイルスまたはｒＡＡＶウイルス粒子を指す。

【００３４】
本明細書に提供されるｒＡＡＶゲノムは、いくつかの実施形態では、導入遺伝子ポリヌクレオチド配列に隣接する１つ以上のＡＡＶ　ＩＴＲを含む。導入遺伝子ポリヌクレオチド配列は、遺伝子カセットを形成するために標的細胞内で機能的である転写制御要素（プロモーター、エンハンサーおよび／またはポリアデニル化シグナル配列を含むが、これらに限定されない）に作動可能に連結されている。プロモーターの例は、ＣＭＶプロモーター、ニワトリβアクチンプロモーター（ＣＢ）およびＰ５４６プロモーターである。シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）長い末端反復（ＬＴＲ）プロモーター、ＭｏＭｕＬＶプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタインバールウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびにヒト遺伝子プロモーター（例えば、限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子－１ａプ

ロモーター、ヘモグロビンプロモーター、クレアチンキナーゼプロモーターなど）を含むが、これらに限定されない追加のプロモーターが、本明細書で企図される。

【００３５】

本明細書では、配列番号８の核酸配列、および配列番号３のヌクレオチド配列と少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるプロモーター配列であって、転写促進活性を有するプロモーター配列を含む、ＣＭＶプロモーター配列がさらに提供される。本明細書では、配列番号７の核酸配列、および転写促進活性を有する、配列番号７のヌクレオチド配列と少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるプロモーター配列を含む、ＣＢプロモーター配列がさらに提供される。本明細書では、配列番号９の核酸配列、および転写促進活性を有する、配列番号９のヌクレオチド配列と少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるプロモーター配列を含むＰ５４６プロモーター配列がさらに提供される。転写制御要素の他の例は、組織特異的制御要素、例えば、ニューロン内での特異的発現を可能にするか、または星状細胞内での特異的発現を可能にするプロモーターである。例としては、ニューロン特異的エノラーゼおよびグリア線維性酸性タンパク質プロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターもまた、企図される。誘導性プロモーターの非限定的な例としては、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリン調節プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子カセットはまた、哺乳動物細胞中で発現されたときに導入遺伝子ＲＮＡ転写物のプロセシングを容易にするためのイントロン配列を含んでもよい。このようなイントロンの一例は、ＳＶ４０イントロンである。

【００３６】

「パッケージング」とは、ＡＡＶ粒子の組み立ておよびキャプシド形成をもたらす一連の細胞内事象を指す。「産生」という用語は、パッケージング細胞によるｒＡＡＶ（感染性のカプセル化されたｒＡＡＶ粒子）を産生するプロセスを指す。

【００３７】

ＡＡＶ「ｒｅｐ」および「ｃａｐ」遺伝子は、それぞれアデノ随伴ウイルスの複製タンパク質およびキャプシド形成タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を指す。ＡＡＶ　ｒｅｐおよびｃａｐは、本明細書においてＡＡＶ「パッケージング遺伝子」と称される。

【００３８】

ＡＡＶについての「ヘルパーウイルス」は、ＡＡＶ（例えば、野生型ＡＡＶ）が哺乳動物細胞によって複製およびパッケージングされることを可能にするウイルスを指す。アデノウイルス、ヘルペスウイルス、およびワクシニアなどのポックスウイルスを含む、ＡＡＶに対する様々なこのようなヘルパーウイルスは、当該技術分野において既知である。アデノウイルスは、多数の異なるサブグループを包含し得るが、サブグループＣのアデノウイルス５型が最も一般的に使用される。ヒト、非ヒト哺乳動物、およびトリ起源の多数のアデノウイルスが既知であり、ＡＴＣＣなどの寄託機関から入手可能である。ヘルペス科のウイルスには、例えば、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）およびエプスタイン－バールウイルス（ＥＢＶ）、ならびにサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）および偽狂犬病ウイルス（ＰＲＶ）が含まれ、これらはＡＴＣＣなどの寄託機関からも入手可能である。

【００３９】

「ヘルパーウイルス機能」とは、（本明細書に記載の複製およびパッケージングのための他の要件と併せて）ＡＡＶ複製およびパッケージングを可能にするヘルパーウイルスゲノムにコードされている機能を指す。本明細書中に記載されるように、「ヘルパーウイル

ス機能」は、ヘルパーウイルスを提供すること、または例えば必要な機能をコードするポリヌクレオチド配列をトランスでプロデューサー細胞に提供することによることを含む多数の方法で提供され得る。

【００４０】

本明細書で提供されるｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶ　ｒｅｐおよびｃａｐ　ＤＮＡを欠く。本明細書に企図されるｒＡＡＶゲノム（例えば、ＩＴＲ）内のＡＡＶ　ＤＮＡは、ＡＡＶ血清型Ａｎｃ８０、ＡＡＶ－１、ＡＡＶ－２、ＡＡＶ－３、ＡＡＶ－４、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－６、ＡＡＶ－７、ＡＡＶ－８、ＡＡＶ－９、ＡＡＶ－１０、ＡＡＶ－１１、ＡＡＶ－１２、ＡＡＶ－１３、ＡＡＶ　ｒｈ．７４、およびＡＡＶ－Ｂ１を含むが、これらに限定されない、組換えウイルスを導出するのに好適な任意のＡＡＶ血清型からであり得る。上記されるように、様々なＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当該技術分野において既知である。キャプシド変異を有するｒＡＡＶもまた企図される。例えば、Ｍａｒｓｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，２２（１１）：１９００－１９０９（２０１４）を参照されたい。本明細書中の修飾キャプシドもまた企図され、グリコシル化および脱アミド化などの種々の翻訳後修飾を有するキャプシドを含む。アスパラギンまたはグルタミン側鎖を脱アミド化してアスパラギン残基をアスパラギン酸残基またはイソアスパラギン酸残基に変換すること、およびグルタミンをグルタミン酸またはイソグルタミン酸に変換することは、本明細書に提供されるｒＡＡＶキャプシドにおいて企図される。例えば、Ｇｉｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，２６（１２）：２８４８－２８６２（２０１８）を参照されたい。本明細書中の修飾キャプシドもまた、治療を必要とする罹患組織および臓器にｒＡＡＶを指向させる標的化配列を含むと企図される。

【００４１】

本明細書で提供されるＤＮＡプラスミドは、本明細書に記載されるｒＡＡＶゲノムを含む。ＤＮＡプラスミドは、ＡＡＶ９キャプシドタンパク質を用いて感染性ウイルス粒子中にｒＡＡＶゲノムを組み立てるために、ＡＡＶのヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、Ｅ１欠損アデノウイルス、またはヘルペスウイルス）による感染を許容することができる細胞に導入され得る。パッケージングされるべきｒＡＡＶゲノム、ｒｅｐおよびｃａｐ遺伝子、およびヘルパーウイルス機能が細胞に提供されるｒＡＡＶを産生する技術は、当該技術分野において標準的である。ｒＡＡＶ粒子の産生は、以下の成分、ｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムから分離した（すなわち、その中に存在しない）ＡＡＶ　ｒｅｐおよびｃａｐ遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が、単一細胞（本明細書でパッケージング細胞と表される）内に存在することを必要とする。ＡＡＶ　ｒｅｐおよびｃａｐ遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来してもよく、ｒＡＡＶゲノムＩＴＲとは異なるＡＡＶ血清型に由来してもよい。偽型ｒＡＡＶの産生は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ０１／８３６９２に開示される。様々な実施形態では、ＡＡＶキャプシドタンパク質は、組換えｒＡＡＶの送達を増強するために修飾され得る。キャプシドタンパク質に対する修飾は、一般的に当該技術分野において既知である。例えば、その開示全体が参照により本明細書に組み入れられる、ＵＳ２００５／００５３９２２およびＵＳ２００９／０２０２４９０を参照されたい。

【００４２】

パッケージング細胞を生成する方法は、ｒＡＡＶの産生に必要な成分をすべて安定して発現する細胞株を作製することである。例えば、ＡＡＶ　ｒｅｐおよびｃａｐ遺伝子を欠くｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムから分離したＡＡＶ　ｒｅｐおよびｃａｐ遺伝子、およびネオマイシン耐性遺伝子などの選択可能なマーカーを含むプラスミド（または複数のプラスミド）は、細胞のゲノムに組み込まれてもよい。ｒＡＡＶゲノムは、ＧＣテーリング（Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９８２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓ６．ＵＳＡ，７９：２０７７－２０８１）、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含有する合成リンカーの付加（Ｌａｕｇｈｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８３，Ｇｅｎｅ，２３：６５－７３）、または直接平滑末端ライゲーション（Ｓｅｎａｐａｔｈｙ＆Ｃａｒｔｅｒ，１９８

４，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５９：４６６１－４６６６）などの手順により細菌プラスミドに導入されてもよい。その後、パッケージング細胞株は、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスで感染させられ得る。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、ｒＡＡＶの大規模産生に好適であることである。好適な方法の他の非限定的な例は、ｒＡＡＶゲノムならびに／またはｒｅｐおよびｃａｐ遺伝子をパッケージング細胞に導入するためにプラスミドではなくアデノウイルスまたはバキュロウイルスを用いる。

【００４３】

ｒＡＡＶ粒子産生の一般的原理は、例えば、Ｃａｒｔｅｒ，１９９２，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１５３３－５３９、およびＭｕｚｙｃｚｋａ，１９９２，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ．ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５８：９７－１２９）に概説されている。様々なアプローチは、Ｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２（１９８４）、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６４６６（１９８４）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏ１．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１（１９８５）、ＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６２：１９６３（１９８８）、およびＬｅｂｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，１９８８ Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，７：３４９（１９８８）に記載されている。Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６３：３８２２－３８２８）、米国特許第５，１７３，４１４号、ＷＯ９５／１３３６５および対応する米国特許第５，６５８，７７６号、ＷＯ９５／１３３９２、ＷＯ９６／１７９４７、ＰＣＴ／ＵＳ９８／１８６００、ＷＯ９７／０９４４１（ＰＣＴ／ＵＳ９６／１４４２３）、ＷＯ９７／０８２９８（ＰＣＴ／ＵＳ９６／１３８７２）、ＷＯ９７／２１８２５（ＰＣＴ／ＵＳ９６／２０７７７）、ＷＯ９７／０６２４３（ＰＣＴ／ＦＲ９６／０１０６４）、ＷＯ９９／１１７６４、Ｐｅｒｒｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｖａｃｃｉｎｅ １３：１２４４－１２５０、Ｐａｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：６０９－６１５、Ｃｌａｒｋ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：１１２４－１１３２、米国特許第５，７８６，２１１号、米国特許第５，８７１，９８２号、および米国特許第６，２５８，５９５号に記載されている。前述の文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、ｒＡＡＶ粒子産生に関する文書の部分を特に強調する。

【００４４】

感染性ｒＡＡＶ粒子を産生するパッケージング細胞が、本明細書でさらに提供される。一実施形態では、パッケージング細胞は、ＨｅＬａ細胞、２９３細胞、およびＰｅｒＣ．６細胞（同種２９３株）などの安定して形質転換されたがん細胞であり得る。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換されたがん細胞ではない細胞、例えば、低継代２９３細胞（アデノウイルスのＥ１で形質転換されたヒト胎児腎細胞）、ＭＲＣ－５細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、ＷＩ－３８細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、Ｖｅｒｏ細胞（サル腎細胞）、およびＦＲｈＬ－２細胞（アカゲザル胎児肺細胞）であり得る。

【００４５】

本開示のｒＡＡＶゲノムを含むｒＡＡＶ（例えば、感染性キャプシド形成したｒＡＡＶ粒子）も本明細書で提供される。ｒＡＡＶのゲノムは、ＡＡＶのｒｅｐおよびｃａｐ ＤＮＡを欠いており、すなわち、ｒＡＡＶのゲノムのＩＴＲ間にＡＡＶのｒｅｐまたはｃａｐ ＤＮＡが存在しない。ｒＡＡＶゲノムは自己相補的（ｓｃ）ゲノムであり得る。ｓｃゲノムを有するｒＡＡＶは、本明細書中でｓｃＡＡＶと称される。ｒＡＡＶゲノムは一本鎖（ｓｓ）ゲノムであり得る。一本鎖ゲノムを有するｒＡＡＶは、本明細書中でｓｓＡＡＶと称される。

【００４６】

ｒＡＡＶは、当該技術分野で標準的な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配によって精製され得る。ヘルパーウイルスからｒＡＡＶベクターを精製するための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｃｌａｒｋ ｅｔ ａｌ

．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，１０（６）：１０３１－１０３９（１９９９）、Ｓｃｈｅｎｐｐ ａｎｄ Ｃｌａｒｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，６９ ４２７－４４３（２００２）、米国特許第６，５６６，１１８号、およびＷＯ９８／０９６５７に開示される方法を含み得る。

【００４７】

ｒＡＡＶを含む組成物もまた提供される。組成物は、ＣＬＮ６ポリペプチドをコードするｒＡＡＶを含む。組成物は、目的とする異なったポリペプチドをコードする２つ以上のｒＡＡＶを含み得る。いくつかの態様では、ｒＡＡＶはｓｃＡＡＶまたはｓｓＡＡＶである。

【００４８】

本明細書で提供される組成物は、ｒＡＡＶおよび薬学的に許容される１つ以上の賦形剤を含む。許容される賦形剤は、レシピエントにとって非毒性であり、好ましくは、用いられる投薬量および濃度で不活性であり、リン酸塩［例えば、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）］、クエン酸塩、もしくは他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡなどのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；および／またはＴｗｅｅｎ（登録商標）などの非イオン性界面活性剤、ポロキサマー１８８、プルロニック（登録商標）（例えば、プルロニック（登録商標）Ｆ６８）もしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などのコポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で提供される組成物は、イオビトリドール、イオヘキソール、イオメプロール、イオパミドール、イオペントール、イオプロミド、イオベルソール、またはイオキシランなどの非イオン性低浸透圧性化合物を含有する薬学的に許容される水性賦形剤を含むことができ、非イオン性低浸透圧性化合物を含有する水性賦形剤は、以下の特性、約１８０ｍｇＩ／ｍＬ、約３２２ｍＯｓｍ／ｋｇ水の蒸気圧浸透圧法によるオスモル濃度、約２７３ｍＯｓｍ／Ｌのオスモル濃度、２０℃で約２．３ｃｐおよび３７℃で約１．５ｃｐの絶対粘度、ならびに３７℃で約１．１６４の比重、のうちの１つ以上を有することができる。例示的な組成物は、約２０～４０％の非イオン性低浸透圧性化合物、または約２５％～約３５％の非イオン性低浸透圧性化合物を含む。例示的な組成物は、２０ｍＭのトリス（ｐＨ８．０）、１ｍＭの$MgCl_2$、２００ｍＭのＮａＣｌ、０．００１％のポロキサマー１８８、および約２５％～約３５％の非イオン性の低浸透圧性化合物中に配合されたｓｃＡＡＶまたはｒＡＡＶウイルス粒子を含む。別の例示的組成物は、１×ＰＢＳおよび０．００１％プルロニック（登録商標）Ｆ６８中に配合されたｓｃＡＡＶを含む。

【００４９】

本開示の方法で投与されるｒＡＡＶの投薬量は、例えば、特定のｒＡＡＶ、投与モード、投与の時間、治療目標、個体、および標的とされる細胞型によって変動することになり、当該技術分野における標準の方法によって決定され得る。投薬量は、ウイルスゲノム（ｖｇ）の単位で表されてもよい。本明細書で企図される投薬量は、1×10^{7}、1×10^{8}、1×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、1×10^{11}、約1×10^{12}、約1×10^{13}、約1.1×10^{13}、約1.2×10^{13}、約1.3×10^{13}、約1.5×10^{13}、約2×10^{13}、約2.5×10^{13}、約3×10^{13}、約3.5×10^{13}、約4×10^{13}、約4.5×10^{13}、約5×10^{13}、約6×10^{13}、約1×10^{14}、約2×10^{14}、約3×10^{14}、約4×10^{14}、約5×10^{14}、約1×10^{15}、約1×10^{16}まで、またはそれ以上の総ウイルスゲノムを含む。約1×10^{9}～約1×10^{10}ｖｇ、約5×10^{9}～約5×10^{10}ｖｇ、約$1\times10_{10}$～約1×10^{11}ｖｇ、約1×10^{11}～約1×10^{15}ｖｇ、約1×10^{12}～約1×10^{15}ｖｇ、約1×10^{12}～約1×10^{14}ｖｇ、約1×10^{13}～約6×10^{14}ｖｇ、および約

６×１０^{13}～約１．０×１０^{14}ｖｇの投薬量も企図される。本明細書中に例示される１用量は、６×１０^{13}ｖｇである。本明細書に例示される他の用量は、１．５×１０^{13}ｖｇである。

【００５０】

ｒＡＡＶによって標的網膜細胞に形質導入する方法が提供されている。網膜細胞には、双極細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、神経節細胞、ミュラーグリア細胞、ミクログリア細胞、水平細胞またはアマクリン細胞が含まれる。

【００５１】

「形質導入」という用語は、レシピエント細胞による機能性ポリペプチドの発現をもたらす、本開示の複製欠損ｒＡＡＶを介した、インビボまたはインビトロのいずれかでの、標的細胞へのＣＬＮ６ポリヌクレオチドの投与／送達を指すように使用される。本開示のｒＡＡＶによる細胞の形質導入は、ｒＡＡＶによってコードされるポリペプチドまたはＲＮＡの持続的発現をもたらす。したがって、本開示は、髄腔内、局所ＩＶ送達、脳室内、網膜下注射、硝子体内送達もしくは実質内送達、またはそれらの任意の組み合わせによって、導入遺伝子によってコードされるポリペプチドをコードする対象ｒＡＡＶを投与／送達する方法を提供する。髄腔内送達は、脳または脊髄のくも膜の下の空間への送達を指す。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は槽内投与による。

【００５２】

導入遺伝子

目的の任意の導入遺伝子を網膜細胞に送達する開示された方法。導入遺伝子は、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であるか、あるいはｓｉＲＮＡもしくはｍｉＲＮＡなどの目的の遺伝子の発現を阻害、妨害、または沈静化する核酸である。

【００５３】

例示的な導入遺伝子は、ＲＰＥ６５、ＲＰＧＲ、ＯＲＦ１５、ＣＮＧＡ３、ＣＭＨ、ＮＤ４、ＰＤＥ６Ｂ、ＣｈＲ２、ＭＥＲＴＫ、ｈＲＳ１、ｈＭＹＯＪＡ、ｈＡＢＣＡ４、ＣＤ５９、抗ｈＶＥＧＦ抗体、エンドスタチン－アンギオスタチン、ｓＦＬＴ０１、またはｓＦＬＴ－１をコードするポリヌクレオチドである。一実施形態では、導入遺伝子は、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６またはＣＬＮ８などのＣＬＮポリペプチドをコードする。追加の例示的な導入遺伝子には、ＲＴＰ８０１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦＲ－１に対するｓｉＲＮＡ、ＶＥＧＦに対するｓｉＲＮＡ、またはＡＤＲＢ２に対するｓｉＲＮＡが含まれる。

【００５４】

網膜で発現されるｍｉＲＮＡは、開示された最適化された遺伝子治療ベクターに含まれる導入遺伝子として企図されている。ｍｉＲＮＡの例は、Ｋａｒａｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１６ Ｆｅｂ ２９；４４（４）：１５２５－１５４０に記載され、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【００５５】

本明細書で提供されるｒＡＡＶゲノムは、ＲＰＥ６５、ＲＰＧＲ、ＯＲＦ１５、ＣＮＧＡ３、ＣＭＨ、ＮＤ４、ＰＤＥ６Ｂ、ＣｈＲ２、ＭＥＲＴＫ、ｈＲＳ１、ｈＭＹＯＪＡ、ｈＡＢＣＡ４、ＣＤ５９、ＰＥＤＦ、エンドスタチン－アンギオスタチン遺伝子、ｓＦＬＴ－１、抗ｈＶＥＧＦ抗体をコードする遺伝子のうちのいずれか１つをコードするポリヌクレオチド配列を含む導入遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含み得る。例えば、導入遺伝子によってコードされるポリペプチドには、導入遺伝子配列によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドが含まれる。

【００５６】

本明細書で提供されるｒＡＡＶゲノムは、ＣＬＮ１、ＣＬＮ２、ＣＬＮ３、ＣＬＮ４、ＣＬＮ５、ＣＬＮ６およびＣＬＮ８などのＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ポリペプチドは、ＣＬＮポリペプチドアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一で

あるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み、ＣＬＮ活性（例えば、リソソーム自己蛍光貯蔵物質のクリアランスの増加、ＡＴＰシンターゼサブユニットＣのリソソーム蓄積の減少、ならびに例えば治療前の患者と比較して治療した場合の患者における星状細胞およびミクログリアの活性化の減少、のうちの少なくとも１つ）を有するポリペプチドをコードする。

【００５７】

本明細書で提供されるｒＡＡＶゲノムは、場合によっては、ＣＬＮポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはＣＬＮ活性（例えば、リソソーム自己蛍光貯蔵物質のクリアランスの増加、ＡＴＰシンターゼサブユニットＣのリソソーム蓄積の減少、ならびに例えば治療前の患者と比較して治療した場合の患者における星状細胞およびミクログリアの活性化の減少、のうちの少なくとも１つ）を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一であるポリヌクレオチドを含む。

【００５８】

本明細書に提供されるｒＡＡＶゲノムは、いくつかの実施形態では、所望の活性を有するポリペプチドをコードし、かつストリンジェントな条件下で目的の既知の導入遺伝子の核酸配列のいずれか１つまたはその相補体にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む。他の実施形態では、本明細書で提供されるｒＡＡＶゲノムは、ＣＬＮ活性を有するポリペプチドをコードし、かつストリンジェントな条件下でＣＬＮポリペプチドをコードする核酸配列のいずれか１つまたはその相補体にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド配列を含む。

【００５９】

以下は、視覚的要素に重点を置いて、各バッテン病サブタイプの疾患特性の概要を示している。「主要疾患網膜細胞」カラムに含まれるデータは、マウス網膜から編集された単一細胞ＲＮＡデータに基づいて決定された。このデータの調査はまだ進行中である。

【表１】

バッテン病	疾患遺伝子	提案された遺伝子機能	発病	視力の喪失の発症	主要疾患網膜細胞
CLN1	PPT1	リソソーム酵素	6~24ヶ月	2年	ミュラーグリア、神経節、水平、アマクリン
CLN2	TPP1	リソソーム酵素	2~4年	4~6年	ミュラーグリア
CLN3	CLN3	膜貫通タンパク質	4~8年	初期症状	ミュラーグリア
CLN4	DNAJC5	細胞質タンパク質	約30年	珍しい	すべての細胞型で幅広い[高]発現
CLN5	CLN5	可溶性リソソームタンパク質	4.5~7年	5~11年	ミュラーグリア
CLN6	CLN6	膜貫通タンパク質	18ヶ月~8年	初期症状	錐体および桿体双極子
CLN7	MFSD8	膜貫通タンパク質	2~7年	初期症状	すべての細胞型で幅広い[低]発現
CLN8	CLN8	膜貫通タンパク質	2~6年	2~10年	ミュラーグリア
CLN9	未知	未知	4~10年	初期症状	未知
CLN10	CTSD	リソソーム酵素	出生時	早期死亡のために特徴付けられていない	すべての細胞型で幅広い[高]発現
CLN11	GRN	分泌経路タンパク質	15~50年	初期症状	ミュラーグリア、ミクログリア
CLN12	ATP13A2	膜貫通タンパク質	約8年	なし	すべての細胞型で幅広い[中高]発現
CLN13	CTSF	リソソーム酵素	約30年	視力の喪失なし	すべての細胞型で幅広い[高]発現
CLN14	KCTD7	細胞質タンパク質	8~24ヶ月	変動する、約4年	すべての細胞型で幅広い[低]発現

【００６０】

「ストリンジェントな」という用語は、ストリンジェントとして当該技術分野において一般に理解される条件を指すために使用される。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドなどの変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のためのストリンジェントな条件の例は、６５～６８℃での０．０１５Ｍの塩化ナトリウム、０．０００１５Ｍのクエン酸ナトリウム、または４２℃での０．０１５Ｍの塩化ナトリウム、０．０００１５Ｍのクエン酸ナトリウム、

および５０％ホルムアミドである。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ　Ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．１９８９）を参照されたい。

【００６１】

投与方法

髄腔内投与が本明細書に例示される。これらの方法は、本明細書に記載の１つ以上のｒＡＡＶで標的細胞を形質導入することを含む。いくつかの実施形態では、導入遺伝子を含むｒＡＡＶウイルス粒子は、患者の眼、脳および／または脊髄に投与もしくは送達される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、脳に送達される。送達が企図される脳の領域としては、運動皮質、視覚野、小脳、および脳幹が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、脊髄に送達される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、下位運動ニューロンに送達される。ポリヌクレオチドは、双極細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、神経節細胞、ミュラーグリア細胞、ミクログリア細胞、水平細胞またはアマクリン細胞などの網膜細胞に送達され得る。

【００６２】

本明細書で提供される方法のいくつかの実施形態では、患者は、ｒＡＡＶの投与後（例えば、約５分間、約１０分間、約１５分間または約２０分間）、トレンデレンベルク体位（頭低位）に保持される。例えば、患者は、頭低位で、約１度～約３０度、約１５～約３０度、約３０～約６０度、約６０～約９０度、または約９０～約１８０度）傾けられてもよい。

【００６３】

網膜下投与の場合、眼の赤道またはその後方に、３０Ｇ針などの針で小さな強膜切開を行う。ウイルスまたはビヒクルは、切開部、例えば、ハミルトン注射器にチューブで取り付けられた細いガラスピペットを介して、または３０Ｇ針およびハミルトン注射器を介して、網膜下に送達される。例えば、網膜下投与は、当技術分野で知られている方法を使用して、臨床的に訓練された外科医によって実施される。

【００６４】

脳室内注射の場合、針が頭蓋骨に挿入され、液体が脳脊髄液を含有する空洞に注射される。例えば、脳室内注射は、当技術分野で知られている方法を使用して、臨床的に訓練された外科医によって実施される。

【００６５】

本明細書で提供される方法は、本明細書で提供されるｒＡＡＶを含む組成物の有効用量または有効複数用量を、それを必要とする対象（例えば、ヒト患者を含むが、これに限定されない動物）に投与するステップを含む。用量が視力関連障害の症状の発症前に投与される場合、投与は予防的である。用量が視力関連障害の症状の発症後に投与される場合、投与は治療的である。有効用量は、視力関連障害に関連する少なくとも１つの症状を緩和（排除または低減）する用量であり、障害の進行を遅延させるかまたは予防する用量であり、障害の範囲を縮小する用量であり、障害の寛解（部分的または完全な）をもたらす用量であり、かつ／または生存および／もしくは視力を長引かせる用量である。治療前の対象と比較して、または未治療の対象と比較して、本明細書で提供される方法は、安定化、視力の喪失もしくは網膜変性症の進行の減少、または視力もしくは黄斑変性症の改善をもたらす。

【００６６】

視力関連障害がＣＬＮバッテン病である場合、治療前の対象と比較して、または未治療の対象と比較して、本明細書で提供される方法は、ＣＬＮバッテン病の進行および／または改善を評価するために使用される尺度、例えば、統一バッテン病評価システム（ＵＢＤＲＳ）、またはハンブルク運動言語尺度、のうちの１つ以上の安定化、進行の減少、または改善をもたらす。ＵＢＤＲＳ評価尺度（Ｍａｒｓｈａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ．２００５　６５（２）：２７５－２７９に記載される）［ＣＬＮバッテン病の進

行および／または改善を評価するために使用されるＵＢＤＲＳ身体の１つ以上の尺度、例えば、統一バッテン病評価システム（ＵＢＤＲＳ）、またはハンブルク運動言語尺度を含む］。ＵＢＤＲＳ評価尺度（Ｍａｒｓｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ．２００５ ６５（２）：２７５－２７９に記載される）［ＵＢＤＲＳ身体評価尺度、ＵＢＤＲＳ発作評価尺度、ＵＢＤＲＳ行動評価尺度、ＵＢＤＲＳ能力評価尺度、ＵＢＤＲＳ症状発症の順序、およびＵＢＤＲＳ臨床全般印象（ＣＧＩ）を含む］、小児のＱＯＬ尺度（Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ Ｑｕａｌｉｔｙ ｏｆ Ｌｉｆｅ Ｓｃａｌｅ）（ＰＥＤＳＱＯＬ）尺度、運動機能、言語機能、認知機能、および生存。治療前の対象と比較して、または未治療の対象と比較して、本明細書で提供される方法は、以下、自己蛍光貯蔵物質のリソソーム蓄積の減少または遅延、ＡＴＰシンターゼサブユニットＣのリソソーム蓄積の減少または遅延、グリア活性化（星状細胞および／またはミクログリア）活性化の減少または遅延、星状細胞増加症の減少または遅延、およびＭＲＩによって測定された脳容積損失の減少または遅れ、のうちの１つ以上をもたらし得る。

【実施例】

【００６７】

以下の実施例により特定の実施形態を説明するが、当業者には変形および修飾が発生するであろうことが理解される。したがって、請求項に見られるそのような制限のみが、本発明に課せられるべきである。

【００６８】

実施例１．ｓｃＡＡＶ９．ＧＦＰおよびＡｎｃ８０．ＧＦＰの産生

ヒトＧＦＰ ｃＤＮＡクローンは、Ｏｒｉｇｅｎｅ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤから入手した。ＧＦＰ ｃＤＮＡを、ハイブリッドニワトリβ－アクチンプロモーター（ＣＢ）、ＣＭＶエンハンサープロモーター、またはＰ５４６プロモーターの下で自己相補的ＡＡＶ９ゲノムまたはＡｎｃ８０ゲノムにさらにサブクローニングし、インビトロおよびインビボで試験した。ＡＡＶ２ ＩＴＲ間に挿入されたＧＦＰ ｃＤＮＡを示すプラスミド構築物の概略図を図１に提供する。プラスミド構築物はまた、ＣＢプロモーター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）キメライントロンなどのイントロン、およびウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナル（ＢＧＨ ＰｏｌｙＡ）のうちの１つ以上を含んでいた。図１の構築物は、ＡＡＶ９ゲノムまたはＡｎｃ８０ゲノム（総称して「ＡＡＶ」と呼ばれる）のいずれかにパッケージングされた。

【００６９】

実施例２．ＩＣＶ送達後のマウス網膜の形質導入

ｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰは、生後０日目～２日目に１回の脳室内（ＩＣＶ）注射によりマウスに投与され、２ケ月にわたってさまざまな時点で発現がモニターされた。マウスに５ｅ１０ ｖｇのｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰを注射した。ｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰを、１×ＰＢＳおよび０．００１％プルロニック（登録商標）Ｆ６８（ＰＢＳ／Ｆ６８と示す）中に配合した。

【００７０】

導入遺伝子の網膜発現を調べるために、免疫組織化学分析を行ってＧＦＰタンパク質を視覚化した。ｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰを注射したマウスを使用した。網膜組織は、ＧＦＰ（上段）、桿体双極細胞のマーカーであるＰＫＣα（中段）、および核対比染色を提供するＤｒａｑ５（下段）で染色された。図２Ａに示すように、桿体双極細胞は、ｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰのＩＣＶ投与後に導入遺伝子ＧＦＰを発現した。

【００７１】

Ｐａｘ６はアマクリン／前駆細胞のマーカーである。図２Ｂに示すように、５ｅ１０ ｖｇの用量でｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰをＩＣＶ投与すると、桿体双極細胞（中央の列を参照）およびアマクリン／前駆細胞（左および右の列を参照）でＧＦＰが発現した。図２Ｃに示すように、５ｅ１０ ｖｇの用量でｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰをＩＣＶ投与した後、桿体双極細胞（中央および右の列）およびアマクリン／前駆細胞（右の列）の形質導入も観察された。図２Ｄは、ｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰのＩＣＶ投与後のすべての組

織の合成を示している。

【００７２】

カルレチニン（Ｃｙ３）は網膜の水平細胞のマーカー（赤い染色）であり、Ｉｂａ１（紫色の染色）は網膜のミクログリア細胞のマーカーである。図３Ａに示すように、ＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０．ＣＢ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０．ＣＢ．ＧＦＰ、およびｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶのＩＣＶ投与により、導入遺伝子がミクログリア細胞および水平細胞に送達された。Ｐ５４６プロモーターを含む遺伝子治療ベクターは、ＣＭＶおよびＣＢプロモーターよりも遅い速度で導入遺伝子を送達した。

【００７３】

Ｏｔｘ２はすべての双極細胞の核マーカー（緑色の染色）であり、Ｉｂａ１（赤色の染色）は網膜のミクログリア細胞のマーカーである。図３Ｂに示すように、ｓｃＡｎｃ８０．Ｐ５４６．ＧＦＰ、ＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０．ＣＢ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ、およびＡＡＶ９．Ｐ５４６．ＧＦＰのＩＣＶ投与により、導入遺伝子が双極細胞およびミクログリア細胞に送達された。Ｏｔｘ２（赤色の双極核）およびＩｂａ１（紫色）染色の合成を図３Ｃに示す。

【００７４】

Ｓｏｘ２は、網膜のミュラーグリア細胞のメーカー（緑色の染色）である。これらの細胞はＣＬＮ３病に関与している。図３Ｄに示すように、ＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０．ＣＢ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ．ＧＦＰ、およびＡＡＶ９．Ｐ５４６．ＧＦＰのＩＣＶ投与により、導入遺伝子がミュラーグリア細胞に送達された。Ａｎｃ８０ベクターを含む遺伝子治療ベクターは、ＡＡＶ９ベクターよりも遅い速度で導入遺伝子を送達した。Ｓｏｘ２染色の合成を図３Ｅに示す。

【００７５】

この実験は、ＡＡＶのＩＣＶ投与が、網膜内の桿体双極細胞およびアマクリン／前駆細胞へのＧＦＰ導入遺伝子の送達をもたらしたことを示している。ＩＣＶ送達が導入遺伝子を網膜細胞に送達するのに非常に効率的であったことは驚くべきことである。

【００７６】

実施例３．網膜下および髄腔内送達後のマウス網膜の形質導入

標準的な手順に従って、マウスをイソフルランまたはキシラゼン／ケタミン混合物で麻酔した。トロピカミドを一滴垂らして瞳孔を拡張させた。４．０縫合糸を使用して、目の周りに繊細に巻き付けられた小さなループを形成することにより、目を前方に保持し、切開および注射方法の動きを減らした。網膜下注射の場合、３０Ｇ針で赤道またはその後方に小さな強膜切開を行った。ウイルスまたはビヒクルは、ハミルトン注射器にチューブで取り付けられた細いガラスピペットを使用して切開するか、または３０Ｇ針およびハミルトン注射器を介して網膜下に送達された。必要に応じて、１０．０本の縫合糸を使用して縫合を行った。注射の前後に、オプテインおよびベトロポリシンを局所的に適用し、マウスを標準治療（回復のための加熱ケージ、ケージの底の食物、長いシッパーチューブ）を介して回復させ、安定するまでモニターした。

【００７７】

ｓｃＡＡＶ９．ＣＭＶ．ＧＦＰまたはｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ．ＧＦＰを１回の網膜下注射によりマウス（１～５ケ月齢）に投与し、２ケ月にわたってさまざまな時点で発現をモニターした。ＡＡＶおよびＡｎｃ８０を、9×10^{9}および3.2×10^{10}ｖｇを配合したＰＢＳ／Ｆ６８の範囲の用量で投与した。

【００７８】

導入遺伝子の網膜発現を調べるために、免疫組織化学分析を使用してＧＦＰタンパク質を視覚化した。ｓｃＡＡＶ９．ＣＭＶ．ＧＦＰまたはｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ．ＧＦＰを注射したマウスを使用した。網膜組織は、ＧＦＰ（上段）、マーカーまたはアマクリン／前駆細胞であるＰａｘ６（中段）、および核対比染色を提供するＤＡＰＩ（下段）で染色された。図４Ａに示すように、アマクリン／前駆細胞は、注射の約１週間後にｓｃＡＡＶ９．ＣＭＶ．ＧＦＰまたはｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ．ＧＦＰの網膜下注射後に導入遺伝子

ＧＦＰを発現した。

【００７９】

Ｏｔｘ２は、すべての網膜双極細胞の核マーカーである。網膜組織は、ＧＦＰ（上段）、Ｏｔｘ２（中段）、および核対比染色を提供するＤＡＰＩ（下段）でも染色された。図４Ｂに示すように、双極細胞は、注射の約１週間後にｓｃＡＡＶ９．ＣＭＶ．ＧＦＰまたはｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ．ＧＦＰの網膜下注射後に導入遺伝子ＧＦＰを発現した。

【００８０】

網膜組織は、ＧＦＰ（上段）、桿体双極細胞のマーカーであるＰＫＣα（中段）、および核対比染色を提供するＤＡＰＩ（下段）でも染色された。図４Ｃに示すように、桿体双極細胞は、注射の約１週間後に、網膜下注射またはｓｃＡＡＶ９．ＣＭＶ．ＧＦＰもしくはｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ．ＧＦＰの後に導入遺伝子ＧＦＰを発現した。図５Ａ～Ｃは、ｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰ、ｓｃＡＡＶ９．ＣＭＶ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０．ＣＢ．ＧＦＰ、またはｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ．ＧＦＰの網膜下送達後のすべての組織の合成を提供する。図５Ａは、試験した４つのベクターすべての低倍率での染色を示している。図５Ｂは高倍率での染色を示し、図５Ｃは高倍率での染色を示しているが、共染色は異なっている。双極細胞における導入遺伝子の発現（ＯｔｘおよびＰＫＣα染色）は、以下のベクター、ｓｃＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０ＣＭＶ．ＧＦＰ、ｓｃＡｎｃ８０．ＣＢ．ＧＦＰまたはｓｃＡｎｃ８０．ＣＭＶ．ＧＦＰの網膜下注射の４週間後に検出可能であった。図６は、２つの異なる共染色を使用して試験された４つのベクターすべてについて、低倍率で網膜下送達した後のすべての組織の合成を示している。

【００８１】

１０歳の非ヒト霊長類に１ｅ１４　ｖｇのＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰを髄腔内注射した。網膜は、ミュラーグリア細胞マーカーであるＳｏｘ２で対比染色された。図７は、ＡＡＶ９．ＣＢ．ＧＦＰを注射した霊長類におけるＧＦＰおよびＳｏｘ２の顕著な共局在を示している。

【００８２】

実施例４．硝子体内送達後のマウス網膜の形質導入

マウスは、上記のように硝子体内注射のために麻酔された。３０Ｇの針で輪部と強膜との間に小さな切開を行った。ウイルスまたはビヒクルは、ハミルトン注射器にチューブで取り付けられた細いガラスピペットを使用して切開するか、または３０Ｇ針およびハミルトン注射器を介して硝子体腔に送達される。注射の前後に、オプテインおよびベトロポリシンを局所的に適用し、マウスを標準治療（回復のための加熱ケージ、ケージの底の食物、長いシッパーチューブ）を介して回復させ、安定するまでモニターする。

【００８３】

ＣＢ（プロモーター１）またはＰ５４６（プロモーター２）の制御下にあるｓｃＡＡＶ９．ＧＦＰまたはｓｃＡＮＣ８０．ＧＦＰを１回の硝子体内注射でマウス（１～５ケ月齢）に投与し、２月のコースにわたってさまざまな時点で発現をモニターした。ＡＡＶおよびＡｎｃ８０を、２×１０^{10}ｖｐを配合したＰＢＳ／Ｆ６８の用量で投与した。次の表は、この研究で使用された細胞マーカーの指針を提供する。

【表２】

網膜細胞型	網膜層	抗体
双極細胞(すべて)	内顆粒層(INL)	Otx2
双極細胞(桿体)	内顆粒層	PKCα
ミュラーグリア	INL 内の核を含むすべて	Sox2
光受容体細胞(桿体)	外顆粒層	ロドプシン
アマクリン	内顆粒層	Pax6
水平	内顆粒層	カルレチニン
ミクログリア	内顆粒層	Iba1

【００８４】

図８に示すように、試験したベクターのうちのいずれかの硝子体内注射により、内顆粒層（ＩＮＬ）を標的とするＧＦＰ発現をもたらした。網膜組織は、ＧＦＰ、およびＩＮＬ内のミュラー細胞に特異的なマーカーであるＳｏｘ２で染色された。図８Ａに示すように、ＡＡＶ９およびＡｎｃ８０は、網膜の内層および外層を標的とするための候補ベクターである。図８Ｂは、ＧＰＦ陽性ミュラーグリアの定量的測定を提供する（Ｓｏｘ２染色）。この測定は、試験されたすべてのベクターが、ＣＢＡプロモーターよりもＰ５４６プロモーターで得られたＧＦＰ陽性細胞の数が多いミュラーグリアを形質導入したことを示している。この違いは、ミュラーグリア細胞内のこれらのプロモーターの発現の違いに起因し得る。それでもなお、ＡＡＶ９ベクターとＡｎｃ８０ベクターとの間で同等の数の細胞が形質導入されているため、ＡＡＶ９には、網膜発現だけでなくＣＮＳ発現にも利用できるという追加の利点がある。ただし、Ａｎｃ８０ベクターは、ＡＡＶ９と比較してより多くのミュラーグリアを形質導入した。

【００８５】

網膜組織は、双極細胞特異的マーカーであるＯｔｘ２でも染色された。図９Ａに示すように、硝子体内注射によって送達された場合、ＣＢまたはＰ５４６のいずれかの制御下にあるＡＡＶ９．ＧＦＰおよびＡｎｃ８０．ＧＦＰは双極細胞を形質導入した。定量的測定では、すべてのベクターを試験した場合、ＧＦＰ陽性双極細胞の割合が低いことが示されている（図９Ｂ）。ＡＡＶ９およびＡｎｃ８０ベクターは、双極細胞で同様の形質導入率を示し、一方、Ｐ５４６プロモーターは、ＣＢプロモーターと比較して双極細胞でより良いＧＦＰ発現を可能にした。

【００８６】

本明細書では本発明の好ましい実施形態を示し、記載してきたが、そのような実施形態が例としてのみ提供されていることは当業者には明らかであろう。当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変形、変更、および置換を思い付くであろう。本明細書に記載の実施形態に対する様々な代替形態を採用してもよいことを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造ならびにそれらの同等物がそれによって包含されることが意図される。

【００８７】

本出願で参照されるすべての文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００８８】

参考文献

Ａｒｓｏｖ，Ｔ．，Ｓｍｉｔｈ，Ｋ．Ｒ．，Ｄａｍｉａｎｏ，Ｊ．，Ｆｒａｎｃｅｓｃｈｅｔｔｉ，Ｓ．，Ｃａｎａｆｏｇｌｉａ，Ｌ．，Ｂｒｏｍｈｅａｄ，Ｃ．Ｊ．，…Ｂｅｒｋｏｖｉｃ，Ｓ．Ｆ．（２０１１）．Ｋｕｆｓ ｄｉｓｅａｓｅ，ｔｈｅ ｍａｊｏｒ ａｄｕｌｔ ｆｏｒｍ ｏｆ ｎｅｕｒｏｎａｌ ｃｅｒｏｉｄ ｌｉｐｏｆｕｓｃｉｎｏｓｉｓ，ｃａｕｓｅｄ ｂｙ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ＣＬＮ６．Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，８８（５），５６６－５７３．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ａｊｈｇ．２０１１．０４．００４

【００８９】

Ｂｒａｓ，Ｊ．，Ｖｅｒｌｏｅｓ，Ａ．，Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ，Ｓ．Ａ．，Ｍｏｌｅ，Ｓ．Ｅ．，＆Ｇｕｅｒｒｅｉｒｏ，Ｒ．Ｊ．（２０１２）．Ｍｕｔａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｐａｒｋｉｎｓｏｎｉｓｍ ｇｅｎｅ ＡＴＰ１３Ａ２ ｃａｕｓｅｓ ｎｅｕｒｏｎａｌ ｃｅｒｏｉｄ－ｌｉｐｏｆｕｓｃｉｎｏｓｉｓ．Ｈｕｍａｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２１（１２），２６４６－２６５０．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０９３／ｈｍｇ／ｄｄｓ０８９

【００９０】

Ｃａｎａｆｏｇｌｉａ，Ｌ．，Ｍｏｒｂｉｎ，Ｍ．，Ｓｃａｉｏｌｉ，Ｖ．，Ｐａｒｅｙｓｏｎ，Ｄ．，Ｄ’Ｉｎｃｅｒｔｉ，Ｌ．，Ｆｕｇｎａｎｅｓｉ，Ｖ．，…Ｆｒａｎｃｅｓｃｈｅｔｔｉ，Ｓ．（２０１４）．Ｒｅｃｕｒｒｅｎｔ ｇｅｎｅｒａｌｉｚｅｄ ｓｅ

izures, visual loss, and palinopsia as phenotypic features of neuronal ceroid lipofuscinosis due to progranulin gene mutation. Epilepsia, 55(6), e56-e59. https://doi.org/10.1111/epi.12632

【0091】

Cannelli, N., Cassandrini, D., Bertini, E., Striano, P., Fusco, L., Gaggero, R., …Santorelli, F. M. (2006). Novel mutations in CLN8 in Italian variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: another genetic hit in the Mediterranean. Neurogenetics, 7(2), 111-117. https://doi.org/10.1007/s10048-005-0024-y

【0092】

Estrada-Cuzcano, A., Martin, S., Chamova, T., Synofzik, M., Timmann, D., Holemans, T., …Schule, R. (2017). Loss-of-function mutations in the ATP13A2/PARK9 gene cause complicated hereditary spastic paraplegia (SPG78). Brain: A Journal of Neurology, 140(2), 287-305. https://doi.org/10.1093/brain/aww307

【0093】

Kniffin, C. (2016). OMIM Clinical Synopsis-%609055-CEROID LIPOFUSCINOSIS, NEURONAL, 9; CLN9. Retrieved March 19, 2019, from http://omim.org/clinicalSynopsis/609055

【0094】

Moen, M. N., Fjaer, R., Hamdani, E. H., Laerdahl, J. K., Menchini, R. J., Vigeland, M. D., …Chaudhry, F. A. (2016). Pathogenic variants in KCTD7 perturb neuronal K^+ fluxes and glutamine transport. Brain, 139(12), 3109-3120. https://doi.org/10.1093/brain/aww244

【0095】

Mole, S. E., &Williams, R. E. (1993). Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses. GeneReviews登録商標. University of Washington, Seattle. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301601

【0096】

Noskova, L., Stranecky, V., Hartmannova, H., Pristoupilova, A., Baresova, V., Ivanek, R., …Kmoch, S. (2011). Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. American Journal of Human Genetics, 89(2), 241-252. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.07.003

【0097】

Roosing, S., van den Born, L. I., Sangermano, R., Banfi, S., Koenekoop, R. K., Zonneveld-Vrieling, M. N., …Hoyng, C. B. (2015). Mutations in MFSD8, Encoding a Lysosomal Membrane Protein, Are Associated with Nonsyndromic Autosomal Recessive Macular Dystrophy. Ophthalmology, 122 (1), 170-179. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.07.040

【0098】

Staropoli, J. F., Karaa, A., Lim, E. T., Kirby, A., Elbalalesy, N., Romansky, S. G., …Cotman, S. L. (2012). A homozygous mutation in KCTD7 links neuronal ceroid lipofuscinosis to the ubiquitin-proteasome system. American Journal of Human Genetics, 91 (1), 202-208. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.05.023

【0099】

Weizmann Institute of Science. (2019). Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal, 10 disease: Malacards-Research Articles, Drugs, Genes, Clinical Trials. Retrieved March 19, 2019, from https://www.malacards.org/card/ceroid_lipofuscinosis_neuronal_10_2

【0100】

Xin, W., Mullen, T. E., Kiely, R., Min, J., Feng, X., Cao, Y., …Sims, K. (2010). CLN5 mutations are frequent in juvenile and late-onset non-Finnish patients with NCL. Neurology, 74 (7), 565-571. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181cff70d

CLN3ヌクレオチド配列（配列番号１）

atgggaggct gtgcaggctc gcggcggcgc ttttcggatt ccgaggggga ggagaccgtc 60
ccggagcccc ggctccctct gttggaccat cagggcgcgc attggaagaa cgcggtgggc 120
ttctggctgc tgggcctttg caacaacttc tcttatgtgg tgatgctgag tgccgcccac 180
gacatcctta gccacaagag gacatcggga aaccagagcc atgtggaccc aggcccaacg 240
ccgatccccc acaacagctc atcacgattt gactgcaact ctgtctctac ggctgctgtg 300
ctcctggcgg acatcctccc cacactcgtc atcaaattgt tggctcctct tggccttcac 360
ctgctgccct acagcccccg ggttctcgtc agtgggattt gtgctgctgg aagcttcgtc 420
ctggttgccct tttctcattc tgtggggacc agcctgtgtg gtgtggtctt cgctagcatc 480
tcatcaggcc ttggggaggt caccttcctc tccctcactg ccttctaccc cagggccgtg 540
atctcctggt ggtcctcagg gactgggga gctgggct

gc tgggggccct gtcctacctg 600
ggcctcaccc aggccggcct ctcccctcag cagaccct
gc tgtccatgct gggtatccct 660
gccctgctgc tggccagcta tttcttgttg ctcacatc
tc ctgaggccca ggaccctgga 720
ggggaagaag aagcagagag cgcagcccgg cagcccct
ca taagaaccga ggccccggag 780
tcgaagccag gctccagctc cagcctctcc cttcggga
aa ggtggacagt gttcaagggt 840
ctgctgtggt acattgttcc cttggtcgta gtttactt
tg ccgagtattt cattaaccag 900
ggacttttg aactcctctt tttctggaac acttccct
ga gtcacgctca gcaataccgc 960
tggtaccaga tgctgtacca ggctggcgtc tttgcctc
cc gctcttctct ccgctgctgt 1020
cgcatccgtt tcacctgggc cctggccctg ctgcagtg
cc tcaacctggt gttcctgctg 1080
gcagacgtgt ggttcggctt tctgccaagc atctacct
cg tcttcctgat cattctgtat 1140
gaggggctcc tgggaggcgc agcctacgtg aacacctt
cc acaacatcgc cctggagacc 1200
agtgatgagc accgggagtt tgcaatggcg gccacctg
ca tctctgacac actggggatc 1260
tccctgtcgg ggctcctggc tttgcctctg catgactt
cc tctgccagct ctcctga 1317

CLN3アミノ酸配列（配列番号２）

Met Gly Gly Cys Ala Gly Ser Arg Arg Arg Phe
Ser Asp Ser Glu Gly
1 5 10 15
Glu Glu Thr Val Pro Glu Pro Arg Leu Pro Leu
Leu Asp His Gln Gly
20 25 30
Ala His Trp Lys Asn Ala Val Gly Phe Trp Leu
Leu Gly Leu Cys Asn
35 40 45
Asn Phe Ser Tyr Val Val Met Leu Ser Ala Ala
His Asp Ile Leu Ser
50 55 60
His Lys Arg Thr Ser Gly Asn Gln Ser His Val
Asp Pro Gly Pro Thr
65 70 75 80
Pro Ile Pro His Asn Ser Ser Ser Arg Phe Asp
Cys Asn Ser Val Ser
85 90 95
Thr Ala Ala Val Leu Leu Ala Asp Ile Leu Pro
Thr Leu Val Ile Lys
100 105 110
Leu Leu Ala Pro Leu Gly Leu His Leu Leu Pro
Tyr Ser Pro Arg Val
115 120 125

Leu Val Ser Gly Ile Cys Ala Ala Gly Ser Phe
Val Leu Val Ala Phe
130 135 140
Ser His Ser Val Gly Thr Ser Leu Cys Gly Val
Val Phe Ala Ser Ile
145 150 155 160
Ser Ser Gly Leu Gly Glu Val Thr Phe Leu Ser
Leu Thr Ala Phe Tyr
165 170 175
Pro Arg Ala Val Ile Ser Trp Trp Ser Ser Gly
Thr Gly Gly Ala Gly
180 185 190
Leu Leu Gly Ala Leu Ser Tyr Leu Gly Leu Thr
Gln Ala Gly Leu Ser
195 200 205
Pro Gln Gln Thr Leu Leu Ser Met Leu Gly Ile
Pro Ala Leu Leu Leu
210 215 220
Ala Ser Tyr Phe Leu Leu Leu Thr Ser Pro Glu
Ala Gln Asp Pro Gly
225 230 235 240
Gly Glu Glu Glu Ala Glu Ser Ala Ala Arg Gln
Pro Leu Ile Arg Thr
245 250 255
Glu Ala Pro Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser Ser
Ser Leu Ser Leu Arg
260 265 270
Glu Arg Trp Thr Val Phe Lys Gly Leu Leu Trp
Tyr Ile Val Pro Leu
275 280 285
Val Val Val Tyr Phe Ala Glu Tyr Phe Ile Asn
Gln Gly Leu Phe Glu
290 295 300
Leu Leu Phe Phe Trp Asn Thr Ser Leu Ser His
Ala Gln Gln Tyr Arg
305 310 315 320
Trp Tyr Gln Met Leu Tyr Gln Ala Gly Val Phe
Ala Ser Arg Ser Ser
325 330 335
Leu Arg Cys Cys Arg Ile Arg Phe Thr Trp Ala
Leu Ala Leu Leu Gln
340 345 350
Cys Leu Asn Leu Val Phe Leu Leu Ala Asp Val
Trp Phe Gly Phe Leu
355 360 365
Pro Ser Ile Tyr Leu Val Phe Leu Ile Ile Leu
Tyr Glu Gly Leu Leu
370 375 380
Gly Gly Ala Ala Tyr Val Asn Thr Phe His Asn
Ile Ala Leu Glu Thr

385 390 395 400
Ser Asp Glu His Arg Glu Phe Ala Met Ala Ala
Thr Cys Ile Ser Asp
405 410 415
Thr Leu Gly Ile Ser Leu Ser Gly Leu Leu Ala
Leu Pro Leu His Asp
420 425 430
Phe Leu Cys Gln Leu Ser
435

CLN6ヌクレオチド配列（配列番号３）

atggaggcga cgcggaggcg gcagcacctg ggagcgac
gg gcgggcccagg cgcgcagctg 60
ggcgcctcct tcctgcaggc caggcatggc tctgtgag
cg ctgatgaggc tgcccgcacg 120
gctccccttcc acctcgacct ctggttctac ttcacact
gc agaactgggt tctggacttt 180
gggcgtccca ttgccatgct ggtattccct ctcgagtg
gt ttccactcaa caagcccagt 240
gttggggact acttccacat ggcctacaac gtcatcac
gc cctttctctt gctcaagctc 300
atcgagcggt ccccccgcac cctgccacgc tccatcac
gt acgtgagcat catcatcttc 360
atcatgggtg ccagcatcca cctggtgggt gactctgt
ca accaccgcct gctcttcagt 420
ggctaccagc accacctgtc tgtccgtgag aaccccat
ca tcaagaatct caagccggag 480
acgctgatcg actcctttga gctgctctac tattatga
tg agtacctggg tcactgcatg 540
tggtacatcc ccttcttcct catcctcttc atgtactt
ca gcggctgctt tactgcctct 600
aaagctgaga gcttgattcc agggcctgcc ctgctcct
gg tggcacccag tggcctgtac 660
tactggtacc tggtcaccga gggccagatc ttcatcct
ct tcatcttcac cttcttcgcc 720
atgctggccc tcgtcctgca ccagaagcgc aagcgcct
ct tcctggacag caacggcctc 780
ttcctcttct cctccttcgc actgaccctc ttgcttgt
gg cgctctgggt cgcctggctg 840
tggaatgacc ctgttctcag gaagaagtac ccgggtgt
ca tctacgtccc tgagccctgg 900
gctttctaca cccttcacgt cagcagtcgg cactga 936

CLN6アミノ酸配列（配列番号４）：

Met Glu Ala Thr Arg Arg Arg Gln His Leu Gly
Ala Thr Gly Gly Pro
1 5 10 15
Gly Ala Gln Leu Gly Ala Ser Phe Leu Gln Ala
Arg His Gly Ser Val
20 25 30
Ser Ala Asp Glu Ala Ala Arg Thr Ala Pro Phe
His Leu Asp Leu Trp

35 40 45
Phe Tyr Phe Thr Leu Gln Asn Trp Val Leu Asp
Phe Gly Arg Pro Ile
50 55 60
Ala Met Leu Val Phe Pro Leu Glu Trp Phe Pro
Leu Asn Lys Pro Ser
65 70 75 80
Val Gly Asp Tyr Phe His Met Ala Tyr Asn Val
Ile Thr Pro Phe Leu
85 90 95
Leu Leu Lys Leu Ile Glu Arg Ser Pro Arg Thr
Leu Pro Arg Ser Ile
100 105 110
Thr Tyr Val Ser Ile Ile Ile Phe Ile Met Gly
Ala Ser Ile His Leu
115 120 125
Val Gly Asp Ser Val Asn His Arg Leu Leu Phe
Ser Gly Tyr Gln His
130 135 140
His Leu Ser Val Arg Glu Asn Pro Ile Ile Lys
Asn Leu Lys Pro Glu
145 150 155 160
Thr Leu Ile Asp Ser Phe Glu Leu Leu Tyr Tyr
Tyr Asp Glu Tyr Leu
165 170 175
Gly His Cys Met Trp Tyr Ile Pro Phe Phe Leu
Ile Leu Phe Met Tyr
180 185 190
Phe Ser Gly Cys Phe Thr Ala Ser Lys Ala Glu
Ser Leu Ile Pro Gly
195 200 205
Pro Ala Leu Leu Leu Val Ala Pro Ser Gly Leu
Tyr Tyr Trp Tyr Leu
210 215 220
Val Thr Glu Gly Gln Ile Phe Ile Leu Phe Ile
Phe Thr Phe Phe Ala
225 230 235 240
Met Leu Ala Leu Val Leu His Gln Lys Arg Lys
Arg Leu Phe Leu Asp
245 250 255
Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Ser Ser Phe Ala
Leu Thr Leu Leu Leu
260 265 270
Val Ala Leu Trp Val Ala Trp Leu Trp Asn Asp
Pro Val Leu Arg Lys
275 280 285
Lys Tyr Pro Gly Val Ile Tyr Val Pro Glu Pro
Trp Ala Phe Tyr Thr
290 295 300
Leu His Val Ser Ser Arg His

３０５　３１０
ＣＬＮ８ヌクレオチド配列（配列番号５）
atgaatcctg cgagcgatgg gggcacatca gagagcat
tt ttgacctgga ctatgcatcc 60
tgggggatcc gctccacgct gatggtcgct ggctttgt
ct tctacttggg cgtctttgtg 120
gtctgccacc agctgtcctc ttccctgaat gccactta
cc gttctttggt ggccagagag 180
aaggtcttct gggacctggc ggccacgcgt gcagtctt
tg gtgttcagag cacagccgca 240
ggcctgtggg ctctgctggg ggaccctgtg ctgcatgc
cg acaaggcgcg tggccagcag 300
aactggtgct ggtttcacat cacgacagca acgggatt
ct tttgctttga aaatgttgca 360
gtccacctgt ccaacttgat cttccggaca tttgactt
gt ttctggttat ccaccatctc 420
tttgcctttc ttgggtttct tggctgcttg gtcaatct
cc aagctggcca ctatctagct 480
atgaccacgt tgctcctgga gatgagcacg ccctttac
ct gcgtttcctg gatgctctta 540
aaggcgggct ggtccgagtc tctgttttgg aagctcaa
cc agtggctgat gattcacatg 600
tttcactgcc gcatggttct aacctaccac atgtggtg
gg tgtgtttctg gcactgggac 660
ggcctggtca gcagcctgta tctgcctcat ttgacact
gt tccttgtcgg actggctctg 720
cttacgctaa tcattaatcc atattggacc cataagaa
ga ctcagcagct tctcaatccg 780
gtggactgga acttcgcaca gccagaagcc aagagcag
gc cagaaggcaa cggggcagctg 840
ctgcggaaga agaggccata g 861
ＣＬＮ８アミノ酸配列（配列番号６）
Met Asn Pro Ala Ser Asp Gly Gly Thr Ser Glu
Ser Ile Phe Asp Leu
1 5 10 15
Asp Tyr Ala Ser Trp Gly Ile Arg Ser Thr Leu
Met Val Ala Gly Phe
20 25 30
Val Phe Tyr Leu Gly Val Phe Val Val Cys His
Gln Leu Ser Ser Ser
35 40 45
Leu Asn Ala Thr Tyr Arg Ser Leu Val Ala Arg
Glu Lys Val Phe Trp
50 55 60
Asp Leu Ala Ala Thr Arg Ala Val Phe Gly Val
Gln Ser Thr Ala Ala
65 70 75 80
Gly Leu Trp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Val Leu
His Ala Asp Lys Ala
85 90 95

Arg Gly Gln Gln Asn Trp Cys Trp Phe His Ile
Thr Thr Ala Thr Gly
100 105 110
Phe Phe Cys Phe Glu Asn Val Ala Val His Leu
Ser Asn Leu Ile Phe
115 120 125
Arg Thr Phe Asp Leu Phe Leu Val Ile His His
Leu Phe Ala Phe Leu
130 135 140
Gly Phe Leu Gly Cys Leu Val Asn Leu Gln Ala
Gly His Tyr Leu Ala
145 150 155 160
Met Thr Thr Leu Leu Leu Glu Met Ser Thr Pro
Phe Thr Cys Val Ser
165 170 175
Trp Met Leu Leu Lys Ala Gly Trp Ser Glu Ser
Leu Phe Trp Lys Leu
180 185 190
Asn Gln Trp Leu Met Ile His Met Phe His Cys
Arg Met Val Leu Thr
195 200 205
Tyr His Met Trp Trp Val Cys Phe Trp His Trp
Asp Gly Leu Val Ser
210 215 220
Ser Leu Tyr Leu Pro His Leu Thr Leu Phe Leu
Val Gly Leu Ala Leu
225 230 235 240
Leu Thr Leu Ile Ile Asn Pro Tyr Trp Thr His
Lys Lys Thr Gln Gln
245 250 255
Leu Leu Asn Pro Val Asp Trp Asn Phe Ala Gln
Pro Glu Ala Lys Ser
260 265 270
Arg Pro Glu Gly Asn Gly Gln Leu Leu Arg Lys
Lys Arg Pro
275 280 285

CBプロモーター（配列番号７）

ccacgttctg cttcactctc cccatctccc cccccctcc
cc acccccaatt ttgtatttat
ttatttttta attattttgt gcagcgatgg gggcgggg
gg gggggggggg cgcgcgccag
gcgggggcggg gcgggggcgag gggcgggggcg gggcgagg
cg gagaggtgcg gcgggcagcca
atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt ttatggcg
ag gcggcggcgg cggcggccct
ataaaaagcg aagcgcgcgg cggggcgggag

CMVプロモーター（配列番号８）

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgac
cg cccaacgacc cccgcccatt
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaa

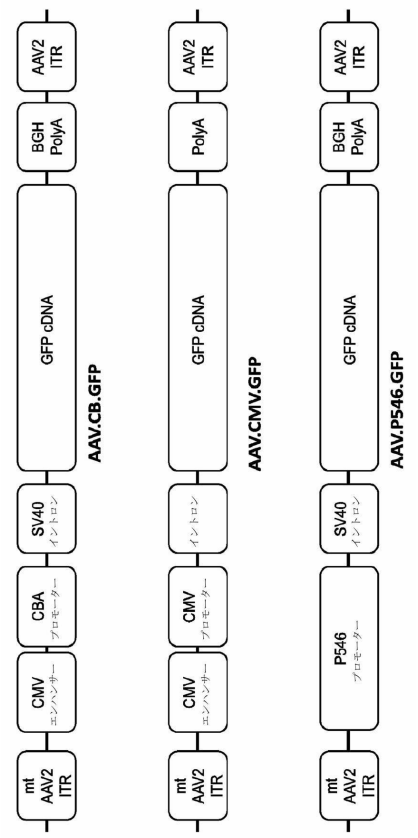
ｔａ ｇｇｇａｃｔｔｔｃｃ ａｔｔｇａｃｇｔｃａ
ａｔｇｇｇｔｇｇａｇ ｔａｔｔｔａｃｇｇｔ ａａａｃｔｇｃｃｃａ ｃｔｔｇｇｃａｇ
ｔａ ｃａｔｃａａｇｔｇｔ ａｔｃａｔａｔｇｃｃ
ａａｇｔａｃｇｃｃｃ ｃｃｔａｔｔｇａｃｇ ｔｃａａｔｇａｃｇｇ ｔａａａｔｇｇｃ
ｃｃ ｇｃｃｔｇｇｃａｔｔ ａｔｇｃｃｃａｇｔａ
ｃａｔｇａｃｃｔｔａ ｔｇｇｇａｃｔｔｔｃ ｃｔａｃｔｔｇｇｃａ ｇｔａｃａｔｃｔ
ａｃ

Ｐ５４６プロモーター（配列番号９）

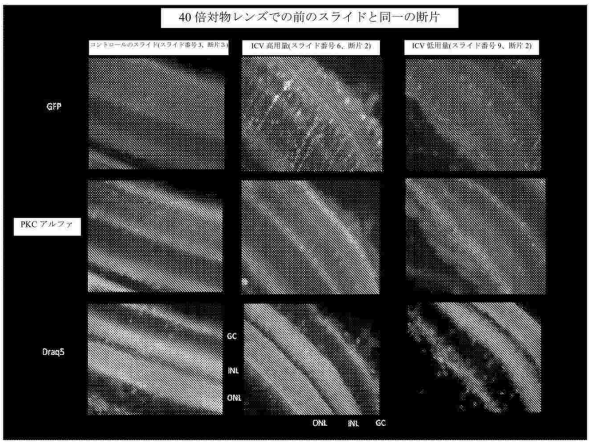
ｇａａｃａａｃｇｃｃａｇｇｃｔｃｃｔｃａａｃａｇｇｃａａｃｔｔｔｇｃｔａｃｔｔｃ
ｔａｃａｇａａａａｔｇａｔａａｔａａａｇ
ａａａｔｇｃｔｇｇｔｇａａｇｔｃａａａｔｇｃｔｔａｔｃａｃａａｔｇｇｔｇａａｃｔ
ａｃｔｃａｇｃａｇｇｇａｇｇｃｔｃｔａａ
ｔａｇｇｃｇｃｃａａｇａｇｃｃｔａｇａｃｔｔｃｃｔｔａａｇｃｇｃｃａｇａｇｔｃｃ
ａｃａａｇｇｇｃｃｃａｇｔｔａａｔｃｃｔ
ｃａａｃａｔｔｃａａａｔｇｃｔｇｃｃｃａｃａａａａｃｃａｇｃｃｃｃｔｃｔｇｔｇｃ
ｃｃｔａｇｃｃｇｃｃｔｃｔｔｔｔｔｔｃｃ
ａａｇｔｇａｃａｇｔａｇａａｃｔｃｃａｃｃａａｔｃｃｇｃａｇｃｔｇａａｔｇｇｇｇ
ｔｃｃｇｃｃｔｃｔｔｔｔｃｃｃｔｇｃｃｔ
ａａａｃａｇａｃａｇｇａａｃｔｃｃｔｇｃｃａａｔｔｇａｇｇｇｃｇｔｃａｃｃｇｃｔ
ａａｇｇｃｔｃｃｇｃｃｃｃａｇｃｃｔｇｇ
ｇｃｔｃｃａｃａａｃｃａａｔｇａａｇｇｇｔａａｔｃｔｃｇａｃａａａｇａｇｃａａｇ
ｇｇｇｔｇｇｇｇｃｇｃｇｇｇｃｇｃｇｃａ
ｇｇｔｇｃａｇｃａｇｃａｃａｃａｇｇｃｔｇｇｔｃｇｇｇａｇｇｇｃｇｇｇｇｃｇｃｇ
ａｃｇｔｃｔｇｃｃｇｔｇｃｇｇｇｇｔｃｃ
ｃｇｇｃａｔｃｇｇｔｔｇｃｇｃｇｃｇｃｇｃｔｃｃｃｔｃｃｔｃｔｃｇｇａｇａｇａｇ
ｇｇｃｔｇｔｇｇｔａａａａｃｃｃｇｔｃｃ
ｇｇａａａａ

【図面】

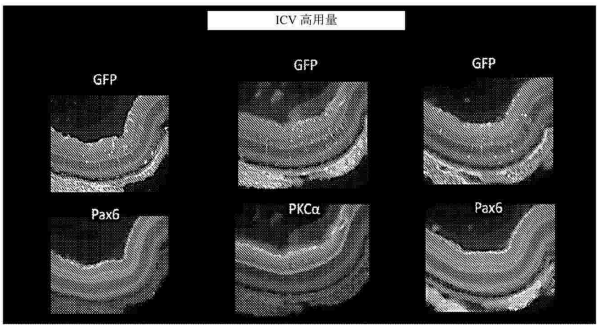
【図１】



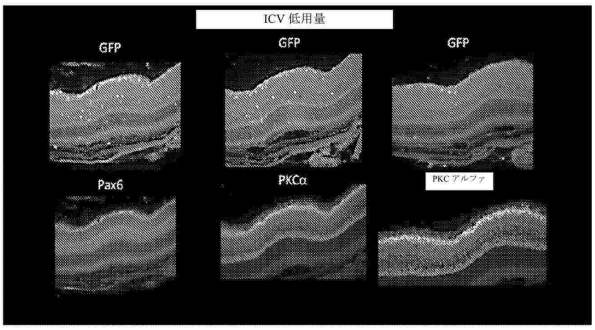
【図２Ａ】



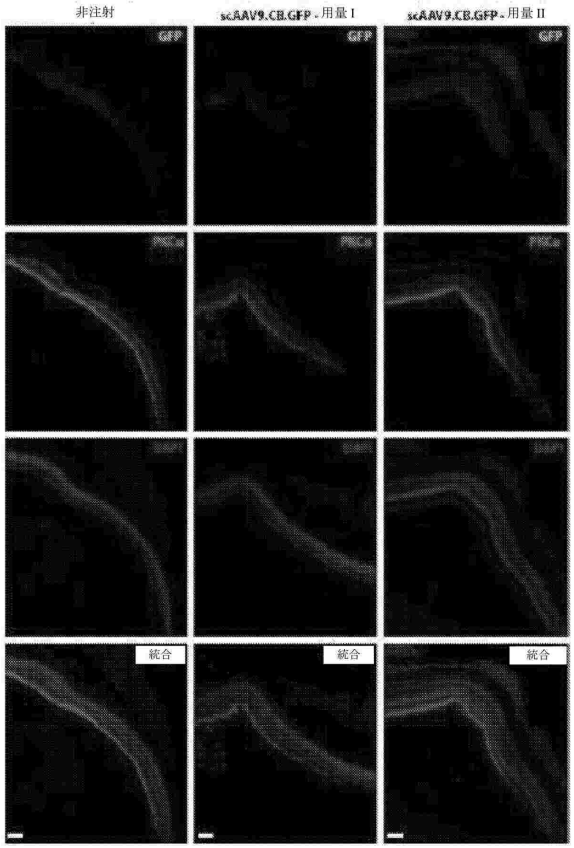
【図２Ｂ】



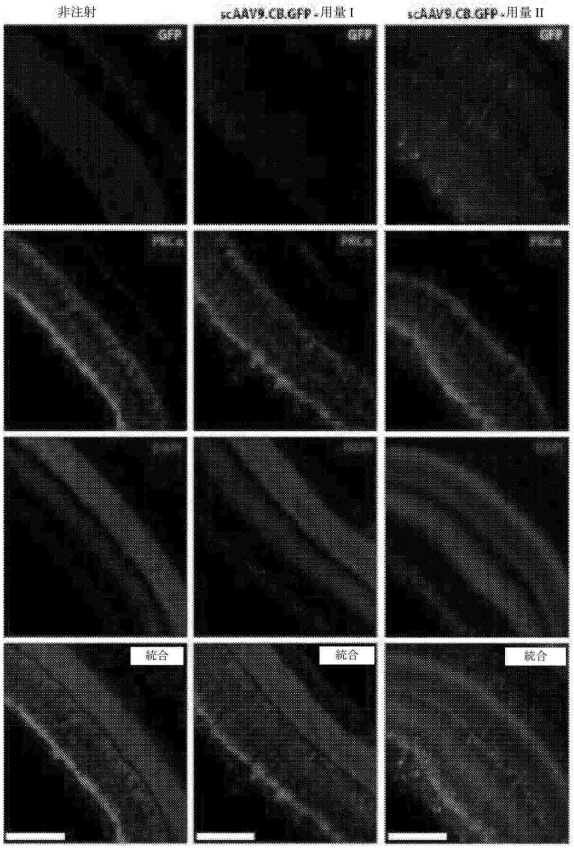
【図２Ｃ】



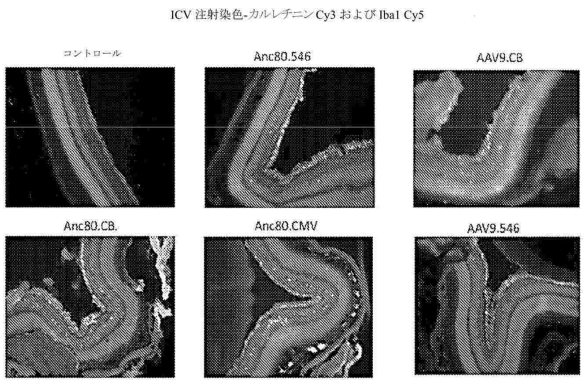
【図２Ｄ－１】



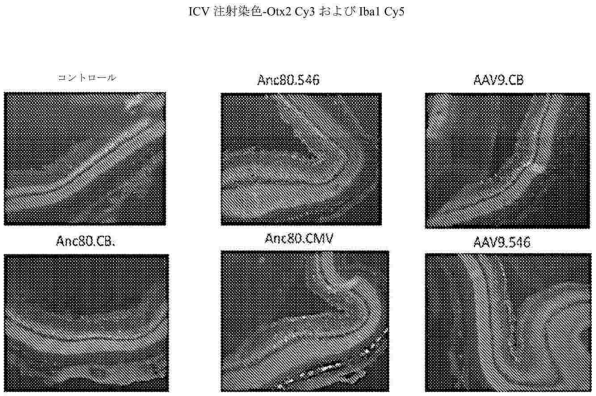
【図２Ｄ－２】



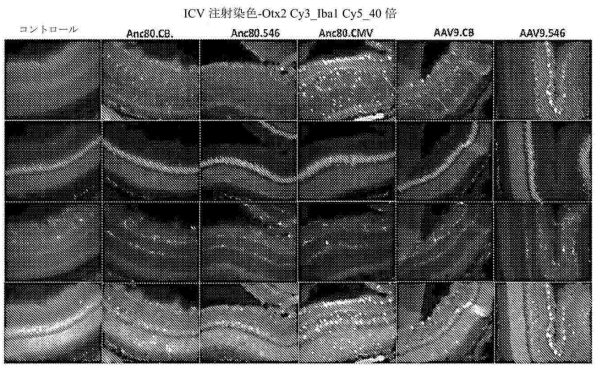
【図３Ａ】



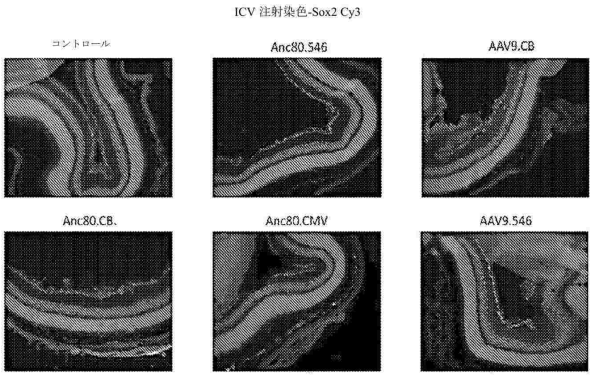
【図３Ｂ】



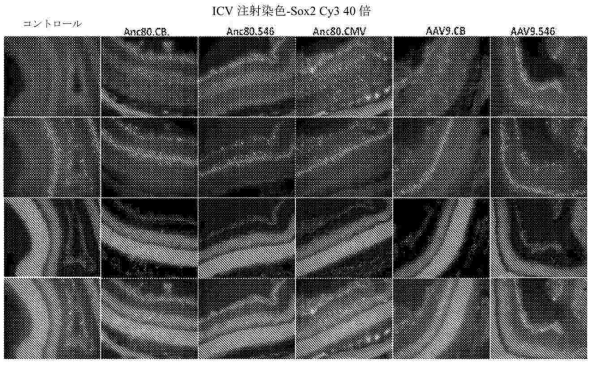
【図３Ｃ】



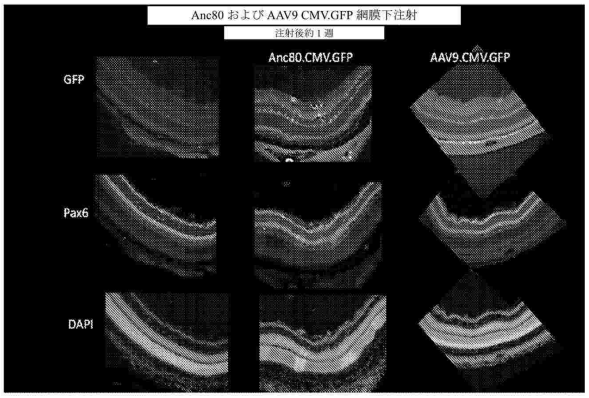
【図３Ｄ】



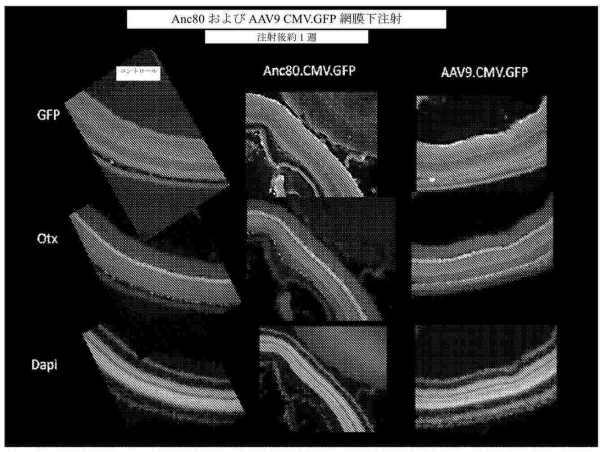
【図３Ｅ】



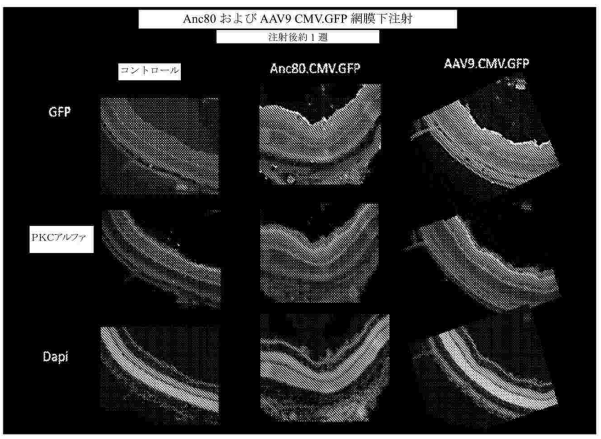
【図４Ａ】



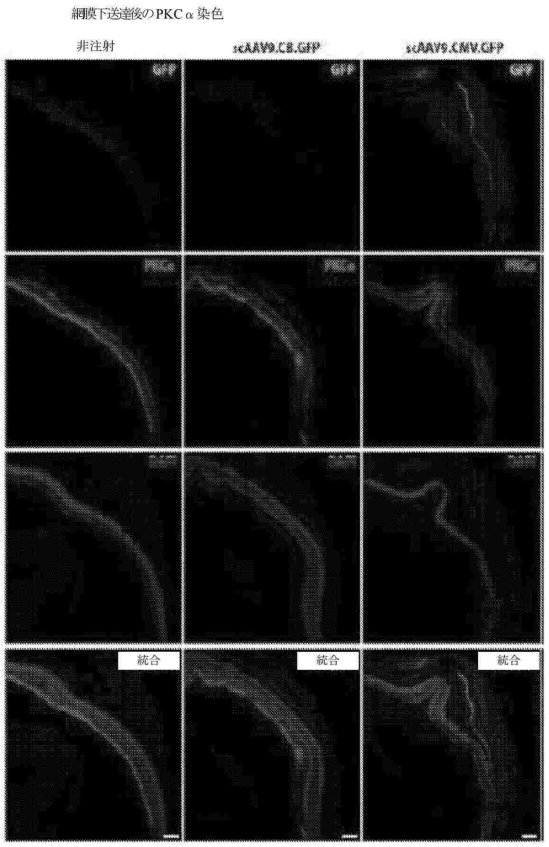
【図４Ｂ】



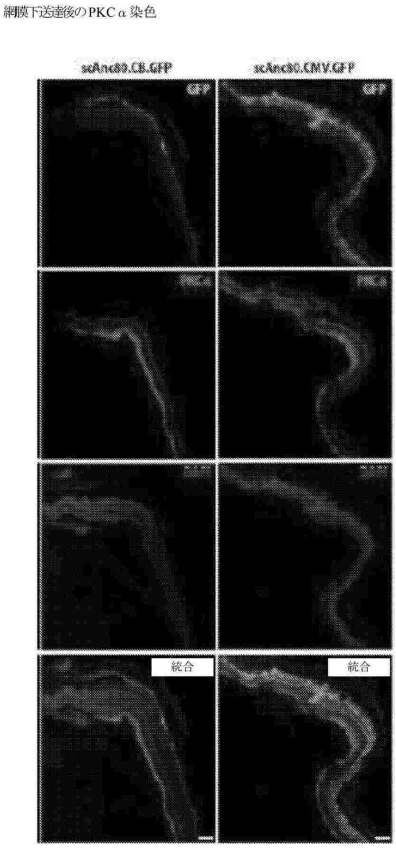
【図４Ｃ】



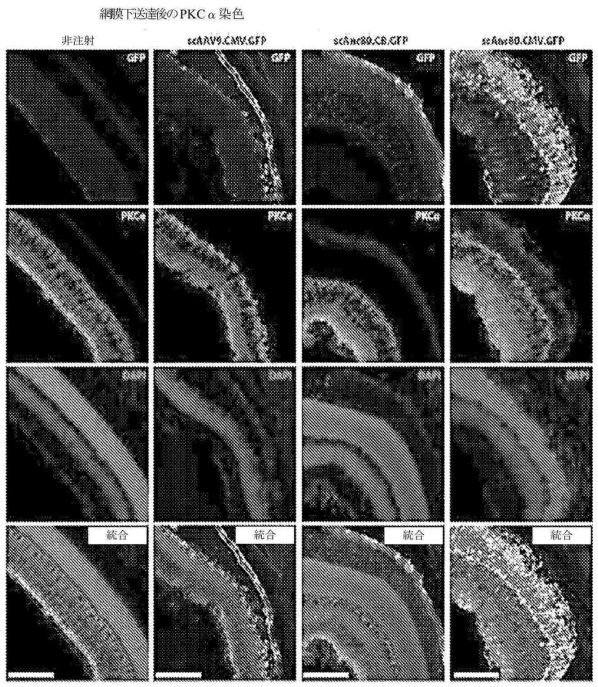
【図５Ａ－１】



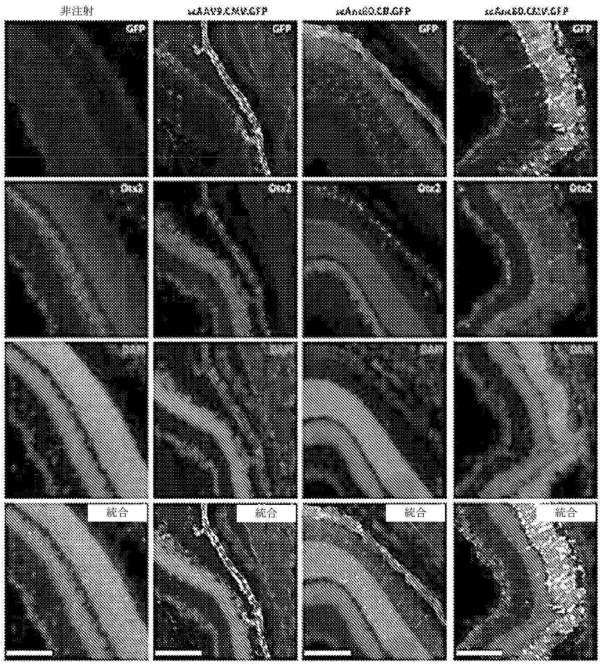
【図５Ａ－２】



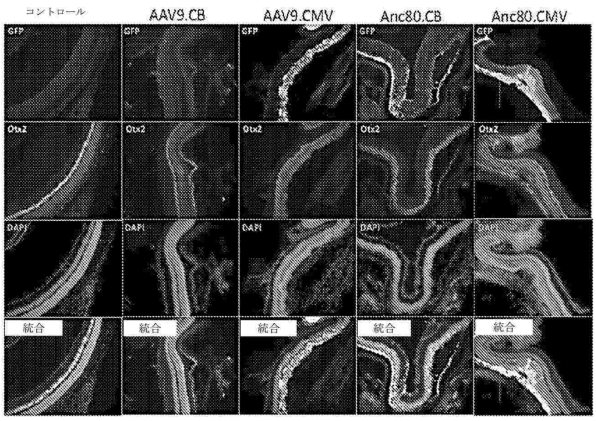
【図５Ｂ】



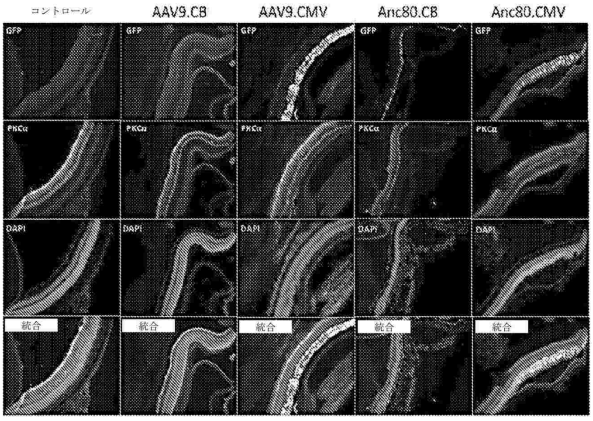
【図５Ｃ】



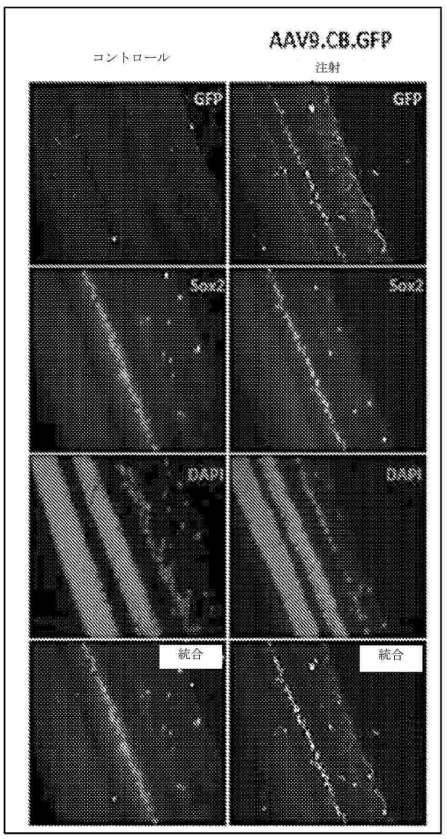
【図６Ａ】



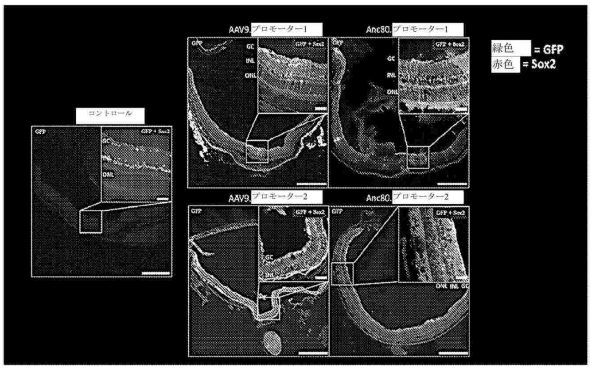
【図６Ｂ】



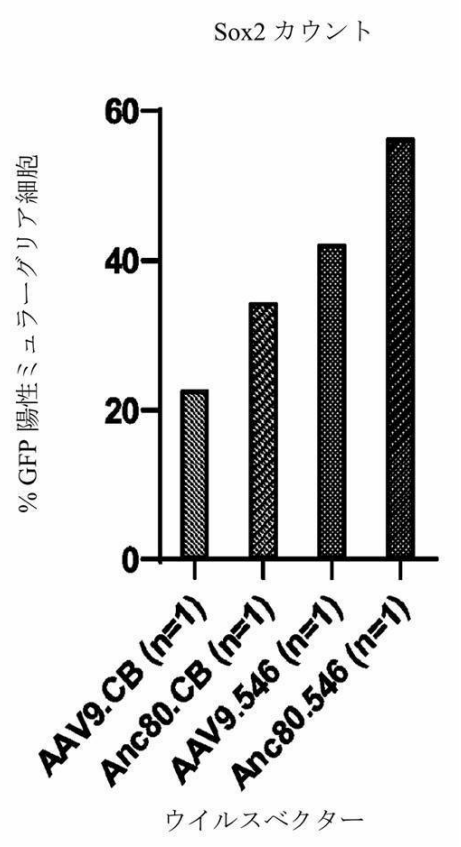
【図７】



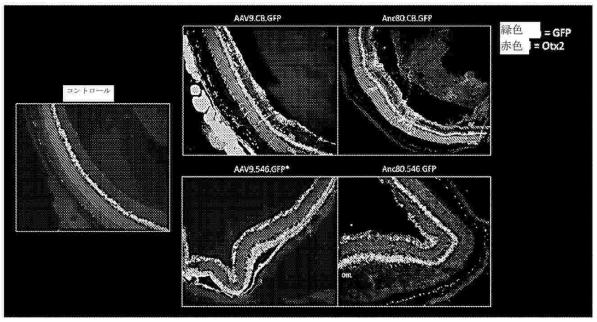
【図８Ａ】



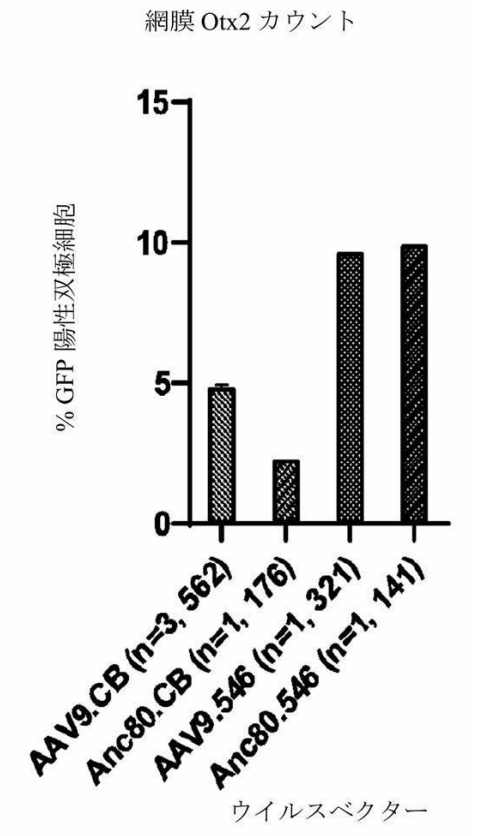
【図８Ｂ】


Sox2 カウント
% GFP 陽性ミュラーグリア細胞
60
40
20
0
AAV9.CB (n=1)
Anc80.CB (n=1)
AAV9.546 (n=1)
Anc80.546 (n=1)
ウイルスベクター

【図９Ａ】


AAV9.CB.GFP
Anc80.CB.GFP
緑色 = GFP
赤色 = Otx2
コントロール
AAV9.546.GFP*
Anc80.546.GFP
ONL

【図９Ｂ】


網膜 Otx2 カウント
% GFP 陽性双極細胞
15
10
5
0
AAV9.CB (n=3, 562)
Anc80.CB (n=1, 176)
AAV9.546 (n=1, 321)
Anc80.546 (n=1, 141)
ウイルスベクター

【配列表】
0007707081000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類
Ａ６１Ｋ　38/17　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　39/395(2006.01)
Ａ６１Ｋ　31/7105(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/47　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/864(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/113(2010.01)

ＦＩ
Ａ６１Ｋ　38/17
Ａ６１Ｋ　39/395　Ｄ
Ａ６１Ｋ　39/395　Ｎ
Ａ６１Ｋ　31/7105
Ｃ０７Ｋ　14/47
Ｃ１２Ｎ　15/864　１００Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/113　Ｚ ＺＮＡ

弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策
(72)発明者　メイヤー， キャスリン クリスティーン
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０４， コロンバス， ロモーナ プレイス １２０７
(72)発明者　リキッテ， シビ
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２１２， コロンバス， ジェラード アベニュー １５０１， アパートメント イー
(72)発明者　カスパー， ブライアン ケー．
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０６７， ランチョ サンタ フェ， ランチート デル リオ １７５８５
(72)発明者　ワイマー， ジル エム．
アメリカ合衆国 サウスダコタ ５７１０４， スー フォールズ， イー． ６０ティーエイチ ストリート エヌ ２３０１ 気付
審査官　六笠 紀子

(56)参考文献
国際公開第２０１７／２１８４５０（WO，Ａ１）
特表２０１５－５２５７８３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１８－５２１６７０（ＪＰ，Ａ）
特表２０１８－５００３１１（ＪＰ，Ａ）
特表２０１８－５３５９５５（ＪＰ，Ａ）
Molecular Therapy，2018年05月，26(5)，pp.1343-1353
NEUROLOGY，2019年03月，Vol.15，pp.161-178
Cell Reports，2015年，12，pp.1056-1068
Molecular Therapy，2015年，23(2)，pp.290-296，doi:10.1038/mt.2014.181
Experimental Eye Research，2011年，93，pp.491-502
Ophthamology，2003年，110(6)，pp.1241-1244
臨床眼科，2014年，68(5)，pp.661-664
Molecular Therapy，2017年，25(5), Suppl.1，p.106, Abstract Number: 223
Neuroscience，2018年，381，pp.1-10

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３８／００－３８／５８
Ａ６１Ｋ　４８／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）