

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6317440号
(P6317440)

(45) 発行日 平成30年4月25日(2018.4.25)

(24) 登録日 平成30年4月6日(2018.4.6)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 48/00	(2006.01) A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 38/17	(2006.01) A 6 1 K 38/17
A 6 1 K 38/44	(2006.01) A 6 1 K 38/44
A 6 1 P 27/02	(2006.01) A 6 1 P 27/02

請求項の数 35 (全 63 頁)

(21) 出願番号	特願2016-526853 (P2016-526853)
(86) (22) 出願日	平成26年10月29日(2014.10.29)
(65) 公表番号	特表2016-535034 (P2016-535034A)
(43) 公表日	平成28年11月10日(2016.11.10)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/062917
(87) 國際公開番号	W02015/066190
(87) 國際公開日	平成27年5月7日(2015.5.7)
審査請求日	平成28年11月11日(2016.11.11)
(31) 優先権主張番号	61/896,805
(32) 優先日	平成25年10月29日(2013.10.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	507044516 プレジデント アンド フェローズ オブ ハーバード カレッジ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 138, ケンブリッジ, クインシー ストリート 17
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者	セブコ, コンスタンス エル. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 461, ニュートン, キングストン ロード 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】酸化ストレスを阻害するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

網膜障害によって損なわれた光受容体細胞の酸化ストレスを阻害するための組成物であって、核因子赤血球由来2様2(Nrf2)をコードする核酸分子を含む、組成物。

【請求項 2】

網膜障害によって損なわれた光受容体細胞の生存性を延長させるための組成物であって、核因子赤血球由来2様2(Nrf2)をコードする核酸分子を含む、組成物。

【請求項 3】

被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための組成物であって、核因子赤血球由来2様2(Nrf2)をコードする核酸分子を含む、組成物。 10

【請求項 4】

前記光受容体細胞が、錐体および/または杆体細胞である、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 5】

前記網膜障害が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、錐体杆体ジストロフィーおよび杆体錐体ジストロフィーからなる群より選択される、請求項1、2および4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記網膜障害が、錐体細胞の生存性減少および/または杆体細胞の生存性減少に関連する、請求項1、2および4のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 7】

前記網膜障害が、遺伝的障害である、請求項 1、2 および 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記網膜障害が、血管漏出および / または成長に関連しない、請求項 1、2 および 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記核酸分子がさらに、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (SOD2) およびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター 1 - アルファ (PGC1) ならびにこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される抗酸化防御遺伝子をコードする、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。10

【請求項 10】

前記核酸分子が、ベクター内に含有される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス / レトロウイルスキメラベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、単純ヘルペスウイルス I ベクターまたは単純ヘルペスウイルス II ベクター、パルボウイルスベクター、細網内皮症ウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群より選択される、請求項 1_0 に記載の組成物。20

【請求項 12】

前記ベクターが、AAV ベクターである、請求項 1_1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 AAV ベクターが、AAV 2 / 5 ベクターまたは AAV 2 / 8 ベクターである、請求項 1_2 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記組成物が、眼内投与に適している、請求項 1 から 1_3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記眼内投与が、硝子体内投与、網膜下投与、結膜下投与、テノン下投与、眼周囲投与、眼球後投与、脈絡膜上投与および強膜内投与からなる群より選択される、請求項 1_4 に記載の組成物。30

【請求項 16】

被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための組成物であって、核因子赤血球由来 2 様 2 (Nr f 2) をコードする単離された核酸分子を含み、前記組成物は、前記被験体に投与され、これにより、前記被験体における網膜色素変性症を処置または予防することを特徴とする、組成物。

【請求項 17】

被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための組成物であって、核因子赤血球由来 2 様 2 (Nr f 2) をコードする単離された核酸分子および PGC1 をコードする単離された核酸分子を含み、前記組成物は、前記被験体に投与され、これにより、前記被験体における網膜色素変性症を処置または予防することを特徴とする、組成物。40

【請求項 18】

前記核酸分子が、ベクター内に含有される、請求項 1_6 または 1_7 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス / レトロウイルスキメラベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、単純ヘルペスウイルス I ベクターまたは単純ヘルペスウイルス II ベクター、パルボウイルスベクター、細網内皮症ウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、パピローマウイルスベクタ50

一、ワクシニアウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群より選択される、請求項1 8に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記ベクターが、AAVベクターである、請求項1 9に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記AAVベクターが、AAV2/5ベクターまたはAAV2/8ベクターである、請求項2 0に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記投与が、眼内投与である、請求項1 6から2 1のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記眼内投与が、硝子体内投与、網膜下投与、結膜下投与、テノン下投与、眼周囲投与、眼球後投与、脈絡膜上投与および強膜内投与からなる群より選択される、請求項2 2に記載の組成物。

【請求項 2 4】

核因子赤血球由来2様2(Nrf2)をコードする単離された核酸分子を含む、被験体において網膜色素変性症を処置または予防するための、眼内投与に適した医薬組成物。

【請求項 2 5】

核因子赤血球由来2様2(Nrf2)をコードする単離された核酸分子と、PGC1をコードする単離された核酸分子とを含む、被験体において網膜色素変性症を処置または予防するための、眼内投与に適した医薬組成物。

【請求項 2 6】

核因子赤血球由来2様2(Nrf2)をコードする核酸分子に作動可能に連結した網膜細胞型特異的プロモーターを含むウイルスベクターを含む、被験体において網膜色素変性症を処置または予防するための組成物。

【請求項 2 7】

核因子赤血球由来2様2(Nrf2)およびPGC1をコードする核酸分子に作動可能に連結した網膜細胞型特異的プロモーターを含むウイルスベクターを含む、被験体において網膜色素変性症を処置または予防するための組成物。

【請求項 2 8】

前記網膜細胞型特異的プロモーターが、杆体特異的プロモーターである、請求項2 6または2 7に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記網膜細胞型特異的プロモーターが、錐体特異的プロモーターである、請求項2 6または2 7に記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記網膜細胞型特異的プロモーターが、杆体および錐体特異的プロモーターである、請求項2 6または2 7に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記組成物が、眼内投与に適している、請求項2 6から3 0のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 2】

被験体において網膜色素変性症を処置または予防するための、核因子赤血球由来2様2(Nrf2)をコードする核酸分子を含む組換えAAVベクターを含む医薬組成物。

【請求項 3 3】

前記組換えAAVベクターが、組換えAAV8ベクターおよび組換えAAV2/8ベクターからなる群から選択される、請求項3 2に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

前記核酸分子がCMVプロモーターに作動可能に連結している、請求項3 2または3 3に記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

10

20

30

40

50

前記核酸分子が網膜細胞型特異的プロモーターに作動可能に連結している、請求項 3 2 または 3 3 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2013年10月29日に出願された米国仮特許出願第61/896,805号（この全体の内容は、参考として本明細書に援用される）に対する優先権の利益を主張する。

【0002】

10

連邦政府によって資金供与を受けた研究または開発に関する声明

この発明は、National Institutes of Healthによって付与された契約 EY023291-01 の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

細胞は、その機能不全および死をもたらす遺伝的および環境的要因によって損なわれ得る。例えば、網膜において、特殊化された感覚ニューロン、光受容体（杆体および錐体）と共に、網膜神経節細胞（RPG）、網膜の出力ニューロンは、遺伝的および／または環境的な理由によって機能不全となって死に、部分的または完全な視力喪失をもたらし得るニューロン細胞型である。

20

【0004】

網膜は、主要な2種類の感光性光受容体細胞、即ち、杆体細胞および錐体細胞を含有する。錐体細胞は、色覚に関与し、杆体細胞と比較して、機能するためにより明るい光を必要とする。長波長、中波長および短波長の光（それぞれ赤色、緑色および青色と称されることが多いが、感受性ピークは実際にはこれらの色ではない）に対し最大の感受性を有する、3種類の錐体が存在する。錐体は、大部分は、網膜中心窓およびその付近に集中している。ごく僅かなパーセンテージの光受容体が、網膜辺縁における錐体である。対象物を直接的に見る場合と同様に、対象物は、その像が錐体濃縮スポットに結ばれるときに、焦点において最もシャープに見られる。錐体細胞および杆体は、網膜における中間の細胞を通して視神経の神経線維に接続される。杆体および錐体が光によって刺激されると、神経は、これらの線維を通して脳へとインパルスを送る。

30

【0005】

錐体細胞の生存性の低下は、様々な網膜障害、特に、網膜色素変性症に関連する。網膜色素変性症は、現在不治であり、盲目となることが多い遺伝性網膜変性症（RD）のファミリーである。これは、3,000の個体のうちおよそ1の個体に罹患し、単一の疾患対立遺伝子に起因する最も蔓延した形態のRDである（RetNet、www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/）。その表現型は、杆体光受容体の機能不全および死による初期夜間視力喪失と、続く進行性錐体喪失によって特徴付けられる（Madraperla, S.A.ら（1990年）Arch Ophthalmol 108巻、358～61頁）。その上、網膜色素変性症は、例えば、夜盲症、進行性周辺視力喪失によってさらに特徴付けられ、最終的に全盲、暗いモザイク様網膜色素沈着からなる眼底検査上の変化、網膜血管の減弱、視神経乳頭の蝶様蒼白および進行型においては黄斑変性症をもたらす。錐体は、色および高い視力に関与するため、その喪失は、クオリティ・オブ・ライフの低下をもたらす。多くの事例において、疾患を引き起こす対立遺伝子は、杆体において排他的に発現される；にもかかわらず、錐体細胞死が、杆体細胞死に続いて起こる。実際に現在まで、ヒトまたはマウスにおいて、杆体が死滅して錐体が生存することが公知の形態のRDは存在しない。対照的に、錐体特異的遺伝子における変異は、錐体死のみを生じる。

40

【先行技術文献】

50

【非特許文献】**【0006】**

【非特許文献1】Madreperla, S. A.ら、Arch Ophthalmol (1990年) 108巻、358~61頁

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0007】**

よって、当技術分野において、網膜細胞機能の減少に起因する視力喪失を予防、処置、診断および予後診断するための療法の必要がある。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

本発明は、細胞、例えば、光受容体細胞における酸化ストレスを阻害するための方法と、酸化ストレス、例えば、光受容体細胞の酸化ストレスに関連する障害を処置または予防するための方法を対象とする。本発明は、少なくとも一部には、酸化ストレスを受ける光受容体細胞におけるある特定の遺伝子（抗酸化防御タンパク質をコードする遺伝子）の発現および／または活性の増大が、酸化と戦うおよび／またはフリーラジカルを解毒するために役立ち得るという発見に基づく。特に、酸化防止プログラムの全般的な上方調節に関与するタンパク質（例えば、転写因子）をコードする遺伝子の発現の増大と、フリーラジカルを解毒する抗酸化酵素をコードする遺伝子の発現の増大は、光受容体生存性を増大させることが示された。

10

20

【0009】

したがって、本発明は、例えば、スーパーオキシドジスムターゼ2（SOD2）、カタラーゼ、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター1-アルファ（PGC1）および核因子赤血球由来2様2（Nr f 2）を含む抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性を増大させることによる、光受容体細胞の酸化ストレスを阻害するための方法と、細胞酸化ストレスに関連する障害、例えば、網膜色素変性症の処置および／または予防のための方法を提供する。

【0010】

一態様において、本発明は、網膜障害によって損なわれた光受容体細胞の酸化ストレスを阻害するための方法を提供する。本方法は、細胞を抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性を増大させる薬剤と接触させ、これにより、光受容体細胞の酸化ストレスを阻害するステップを含む。

30

【0011】

別の態様において、本発明は、細胞の酸化ストレスを阻害するための方法を提供する。本方法は、カタラーゼ、SOD2、PGC1 および／またはNr f 2、またはこれらのいずれかの組合せもしくはサブコンビネーションをコードする核酸分子と細胞を接触させ、これにより、細胞における酸化ストレスを阻害するステップを含む。一部の実施形態において、細胞は、例えば、錐体および／または杆体細胞等、光受容体細胞である。一部の実施形態において、細胞は、ニューロン細胞である。ある特定の実施形態において、細胞は、これにおける欠損が神経学的障害を生じるニューロン細胞である。

40

【0012】

別の態様において、本発明は、網膜障害によって損なわれた光受容体細胞の生存性を延長させるための方法を提供する。本方法は、抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性を増大させる薬剤と細胞を接触させ、これにより、光受容体細胞の酸化ストレスを阻害するステップを含む。ある特定の実施形態において、光受容体細胞の生存性は、例えば、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、約3ヶ月間、約4ヶ月間、約5ヶ月間、約6ヶ月間、約7ヶ月間、約8ヶ月間、約9ヶ月間、約10ヶ月間、約11ヶ月間、約12ヶ月間、約2年間、約3年間、約4年間、約5年間、約10年間、約15年間、約20年間、約25年間、約30年間、約40年間、約50年間、約60年間、約70年間および約80年間延長される。

50

【 0 0 1 3 】

別の態様において、本発明は、被験体における網膜障害を処置または予防するための方法を提供する。本方法は、抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性を増大させる薬剤を被験体に投与し、これにより、眼障害を処置または予防するステップを含む。

【 0 0 1 4 】

さらに別の態様において、本発明は、被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための方法を提供する。本方法は、抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性を増大させる薬剤を被験体に投与し、これにより、被験体における網膜色素変性症を処置または予防するステップを含む。

【 0 0 1 5 】

さらなる態様において、本発明は、被験体における酸化ストレスに関連する障害を処置または予防するための方法を提供する。本方法は、カタラーゼ、SOD2、PGC1 および／またはNrf2をコードする1種または複数の核酸分子を被験体に投与し、これにより、被験体における酸化ストレスに関連する障害を処置または予防するステップを含む。一部の実施形態において、障害は、眼障害である。一部の実施形態において、障害は、神経学的障害、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病および筋萎縮性側索硬化症である。

【 0 0 1 6 】

本発明の前述の態様のいずれかにおいて、抗酸化防御タンパク質の発現の増大は、活性酸素種(ROS)のレベルを低下させる。ある特定の実施形態において、ROSは、例えば、フリーラジカル種を含む。一部の実施形態において、抗酸化防御タンパク質は、フリーラジカルと戦う。前述の方法のある特定の実施形態において、光受容体細胞は、錐体および／または杆体細胞である。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態において、眼障害は、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、錐体杆体ジストロフィー、杆体錐体ジストロフィーおよび緑内障からなる群より選択される。一実施形態において、眼障害は、網膜障害である。

【 0 0 1 8 】

前述の方法のある特定の実施形態において、眼障害は、錐体細胞の生存性減少および／または杆体細胞の生存性減少に関連する。一部の実施形態において、眼障害は、遺伝的障害である。他の実施形態において、眼障害は、血管漏出および／または成長に関連しない。ある特定の実施形態において、眼障害は、糖尿病および／または糖尿病性網膜症に関連しない。さらなる実施形態において、眼障害は、NARP(ニューロパチー、運動失調症および網膜色素変性症)ではない。

【 0 0 1 9 】

前述の方法の一実施形態において、薬剤は、抗酸化防御タンパク質をコードする核酸分子である。ある特定の実施形態において、核酸分子は、抗酸化防御遺伝子を含む。一部の実施形態において、抗酸化防御遺伝子は、転写因子または抗酸化酵素をコードする。特定の実施形態において、抗酸化防御遺伝子は、カタラーゼ、スーパーオキシドダムター-2(SOD2)、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター-1-アルファ(PGC1)、核因子赤血球由来2様2(Nrf2)およびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。

【 0 0 2 0 】

よって、本発明の方法において、抗酸化防御遺伝子の次の組合せのいずれかを使用することができる：カタラーゼ；SOD2；PGC1；nrf2；カタラーゼおよびSOD2；SOD2およびPGC1；PGC1 およびnrf2；カタラーゼおよびPGC1；カタラーゼおよびnrf2；SOD2およびnrf2；カタラーゼ、SOD2およびPGC1；SOD2、PGC1 およびnrf2；カタラーゼ、PGC1 およびnrf2；カタラーゼ、SOD2およびnrf2；またはカタラーゼ、SOD2、PGC1 およびnrf2。

10

20

30

40

50

【0021】

ある特定の実施形態において、核酸分子は、ベクター内に含有される。例示的な実施形態において、ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス/レトロウイルスキメラベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、単純ヘルペスウイルスIベクターまたは単純ヘルペスウイルスIIベクター、パルボウイルスベクター、細網内皮症ウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群より選択される。一実施形態において、ベクターは、AAVベクター、例えば、AAV2/5またはAAV2/8ベクターである。

【0022】

10

網膜障害または特に網膜色素変性症を処置または予防する前述の態様において、投与は、眼内投与である。例示的な実施形態において、眼内投与は、硝子体内、結膜下、テノン下(sub-tendon)、眼周囲、眼球後、脈絡膜上および強膜内投与からなる群より選択される。一実施形態において、眼内投与は、網膜下または硝子体内投与である。

【0023】

別の態様において、本発明は、被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための方法を提供する。本方法は、単離されたNr f 2核酸分子を被験体に投与し、これにより、被験体における網膜色素変性症を処置または予防するステップを含む。

【0024】

20

さらに別の態様において、本発明は、被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための方法を提供する。本方法は、単離されたNr f 2核酸分子および単離されたPGC1核酸分子を被験体に投与し、これにより、被験体における網膜色素変性症を処置または予防するステップを含む。

【0025】

30

一実施形態において、核酸分子は、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス/レトロウイルスキメラベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、単純ヘルペスウイルスIベクターまたは単純ヘルペスウイルスIIベクター、パルボウイルスベクター、細網内皮症ウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群より選択されるベクター等、ベクター内に含有される。一実施形態において、ベクターは、AAVベクター、例えば、AAV2/5またはAAV2/8ベクターである。

【0026】

一実施形態において、投与は、硝子体内投与、網膜下投与、結膜下投与、テノン下投与、眼周囲投与、眼球後投与、脈絡膜上投与および強膜内投与等、眼内投与である。特定の一実施形態において、眼内投与は、網膜下または硝子体内投与である。

【0027】

一態様において、本発明は、単離されたNr f 2核酸分子を含む、眼内投与に適した医薬組成物を提供する。

【0028】

40

別の態様において、本発明は、単離されたNr f 2核酸分子と、単離されたPGC1核酸分子とを含む、眼内投与に適した医薬組成物を提供する。

【0029】

一実施形態において、治療または予防有効量の核酸分子が、眼内投与に適した組成物に含有される。

【0030】

一態様において、本発明は、Nr f 2をコードする核酸分子に作動可能に連結した網膜細胞型特異的プロモーターを含むウイルスベクターを含む組成物を提供する。

【0031】

別の態様において、本発明は、PGC1をコードする核酸分子に作動可能に連結した網膜細胞型特異的プロモーターを含むウイルスベクターを含む組成物を提供する。

50

【 0 0 3 2 】

さらに別の態様において、本発明は、N r f 2 および P G C 1 をコードする核酸分子に作動可能に連結した網膜細胞型特異的プロモーターを含むウイルスベクターを含む組成物を提供する。

【 0 0 3 3 】

網膜細胞型特異的プロモーターは、杆体特異的プロモーター、錐体特異的プロモーターおよび / または杆体および錐体特異的プロモーターとなり得る。

【 0 0 3 4 】

一実施形態において、組成物は、眼内投与、例えば、網膜下または硝子体内投与に適している。

10

【 0 0 3 5 】

本発明の他の特色および利点は、次の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目 1)

網膜障害によって損なわれた光受容体細胞の酸化ストレスを阻害するための方法であって、前記細胞を、抗酸化防御タンパク質の発現および / または活性を増大させる薬剤と接触させ、これにより、前記光受容体細胞の酸化ストレスを阻害するステップを含む、方法。

(項目 2)

網膜障害によって損なわれた光受容体細胞の生存性を延長させるための方法であって、前記細胞を、抗酸化防御タンパク質の発現および / または活性を増大させる薬剤と接触させ、これにより、前記網膜障害によって損なわれた前記光受容体細胞の生存性を延長させるステップを含む、方法。

20

(項目 3)

被験体における網膜障害を処置または予防するための方法であって、前記被験体に、抗酸化防御タンパク質の発現および / または活性を増大させる薬剤を投与し、これにより、前記眼障害を処置または予防するステップを含む、方法。

(項目 4)

被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための方法であって、前記被験体に、抗酸化防御タンパク質の発現および / または活性を増大させる薬剤を投与し、これにより、前記被験体における網膜色素変性症を処置または予防するステップを含む、方法。

30

(項目 5)

前記抗酸化防御タンパク質が、活性酸素種 (ROS) のレベルを低下させる、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6)

前記光受容体細胞が、錐体および / または杆体細胞である、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記眼障害が、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、錐体杆体ジストロフィーおよび杆体錐体ジストロフィーからなる群より選択される、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 8)

前記眼障害が、錐体細胞の生存性減少および / または杆体細胞の生存性減少に関連する、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記眼障害が、遺伝的障害である、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 10)

前記眼障害が、血管漏出および / または成長に関連しない、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 1 1)

前記薬剤が、核酸分子である、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2)

前記核酸分子が、抗酸化防御遺伝子を含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記抗酸化防御遺伝子が、転写因子または抗酸化酵素をコードする、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記抗酸化防御遺伝子が、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターーゼ 2 (S O D 2) 、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター 1 - アルファ (P G C 1) および核因子赤血球由来 2 様 2 (n r f 2) ならびにこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される、項目 1 2 に記載の方法。

10

(項目 1 5)

前記核酸分子が、ベクター内に含有される、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス / レトロウイルスキメラベクター、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、単純ヘルペスウイルス I ベクターまたは単純ヘルペスウイルス I I ベクター、パルボウイルスベクター、細網内皮症ウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群より選択される、項目 1 5 に記載の方法。

20

(項目 1 7)

前記ベクターが、 A A V ベクターである、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記 A A V ベクターが、 A A V 2 / 5 ベクターまたは A A V 2 / 8 ベクターである、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記投与が、眼内投与である、項目 3 または 4 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記眼内投与が、硝子体内投与、網膜下投与、結膜下投与、テノン下投与、眼周囲投与、眼球後投与、脈絡膜上投与および強膜内投与からなる群より選択される、項目 1 9 に記載の方法。

30

(項目 2 1)

細胞における酸化ストレスを阻害するための方法であって、前記細胞を、カタラーゼ、 S O D 2 、 P G C 1 および / または N r f 2 を含む核酸分子と接触させ、これにより、細胞における酸化ストレスを阻害するステップを含む、方法。

(項目 2 2)

被験体における酸化ストレスに関連する障害を処置または予防するための方法であって、前記被験体に、カタラーゼ、 S O D 2 、 P G C 1 および / または N r f 2 を含む核酸分子を投与し、これにより、前記被験体における酸化ストレスに関連する障害を処置または予防するステップを含む、方法。

40

(項目 2 3)

前記核酸が、ベクター内に含有される、項目 2 1 または 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記細胞が、光受容体細胞である、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記障害が、眼障害である、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記眼障害が、網膜色素変性症である、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

50

被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための方法であって、前記被験体に、単離されたN r f 2核酸分子を投与し、これにより、前記被験体における網膜色素変性症を処置または予防するステップを含む、方法。

(項目28)

被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための方法であって、前記被験体に、単離されたN r f 2核酸分子および単離されたP G C 1核酸分子を投与し、これにより、前記被験体における網膜色素変性症を処置または予防するステップを含む、方法。

(項目29)

前記核酸分子が、ベクター内に含有される、項目27または28に記載の方法。

(項目30)

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス/レトロウイルスキメラベクター、アデノ随伴ウイルス(A A V)ベクター、単純ヘルペスウイルスIベクターまたは単純ヘルペスウイルスIIベクター、パルボウイルスベクター、細網内皮症ウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群より選択される、項目29に記載の方法。

10

(項目31)

前記ベクターが、A A Vベクターである、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記A A Vベクターが、A A V 2 / 5ベクターまたはA A V 2 / 8ベクターである、項目31に記載の方法。

20

(項目33)

前記投与が、眼内投与である、項目3または4に記載の方法。

(項目34)

前記眼内投与が、硝子体内投与、網膜下投与、結膜下投与、テノン下投与、眼周囲投与、眼球後投与、脈絡膜上投与および強膜内投与からなる群より選択される、項目33に記載の方法。

(項目35)

単離されたN r f 2核酸分子を含む、眼内投与に適した医薬組成物。

(項目36)

30

単離されたN r f 2核酸分子と、単離されたP G C 1核酸分子とを含む、眼内投与に適した医薬組成物。

(項目37)

N r f 2をコードする核酸分子に作動可能に連結した網膜細胞型特異的プロモーターを含むウイルスベクターを含む組成物。

(項目38)

P G C 1をコードする核酸分子に作動可能に連結した網膜細胞型特異的プロモーターを含むウイルスベクターを含む組成物。

(項目39)

N r f 2およびP G C 1をコードする核酸分子に作動可能に連結した網膜細胞型特異的プロモーターを含むウイルスベクターを含む組成物。

40

(項目40)

前記網膜細胞型特異的プロモーターが、杆体特異的プロモーターである、項目37から39のいずれか一項に記載の組成物。

(項目41)

前記網膜細胞型特異的プロモーターが、錐体特異的プロモーターである、項目37から39のいずれか一項に記載の組成物。

(項目42)

前記網膜細胞型特異的プロモーターが、杆体および錐体特異的プロモーターである、項目37から39のいずれか一項に記載の組成物。

50

(項目43)

眼内投与に適している、項目37から39のいずれか一項に記載の組成物。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1A～図1Fは、AAV-CMV-GFPによるWTおよびrd1網膜の感染を描写する。(A)WT(野生型)網膜をP0にてAAVCMV-GFPに感染させ、P30にて収集した。凍結切片の低拡大率像は、網膜の至るところに及ぶ感染の広範な拡散を示す。(B)錐体が十分に感染し、高レベルのGFPを発現することを示す、Aにおける外顆粒層のより高い拡大率の視野(抗GFPは薄灰色、PNA(錐体マーカー)は中程度の灰色)。角括弧は錐体の全体を示し、上矢印は錐体外節(OS)を(中程度の灰色のPNA染色)、中央矢印は錐体内節(IS)を、下矢印は錐体細胞体を指す。(C)rd1網膜を感染させた以外はAに同じ。(D)Cのより高い拡大率の視野であり、P30にて残る錐体は、抗GFP(薄灰色)およびPNA(中程度の灰色)で十分に染色された。矢印は、単一の錐体を指し、角括弧は、錐体細胞体の層を示す。(E)感染したが、より低レベルで発現する(Bと比較、矢印は錐体を指す)ことを示すためのより長い露光によって可視化された、Aに示す網膜由来の杆体。(F)P0にてAAV-CMV-GFPに感染したrd1網膜のフラットマウント像。視神経頭の1mmから得た60×(250ミクロン平方面積)像であり、残る外顆粒層における焦点面を示し、実験用ウイルスに感染した網膜において行われた定量化の種類を表す。10

【図2】図2A～図2Dは、WT網膜における酸化防止酵素の内在性発現を描写する。WT P30網膜の凍結切片に抗血清をかけ(中程度の灰色)、抗PNAを使用して錐体OSを同定した(薄灰色)。(A)抗SOD2および抗PNA、(B)錐体OSにおける染色を強調するための抗SOD2、(C)抗Gpx1および抗PNA、(D)抗Gpx1のみ。矢印は錐体を示す。Dにおける上の角括弧はOSの区域を表示し、下の角括弧区域は錐体細胞体およびISを表示する。20

【図3】図3A～図3Dは、SOD2のノックダウンが、酸化産物を生じることを描写する。SOD2を指向するshRNAまたは無関係shRNAを、P0にエレクトロポレーションによりWT網膜へと送達した。エレクトロポレーションされた細胞の同定のために同時エレクトロポレーションされたプラスミドが含まれた(CAG-GFP)。(A)抗GFP(薄灰色)および酸化脂質の指標であるアクロレイン(中程度の灰色)で染色した、対照shRNAをエレクトロポレーションされたP30における網膜由来の凍結切片。(A')アクロレインを示し、陽性の細胞は存在しなかった。(B)抗GFPおよびアクロレインで染色したSOD2 shRNA。(B')アクロレイン陽性細胞は全てGFP+であった。矢印により2例を示す。上の角括弧はOSおよびISを表示し、下の角括弧は外顆粒層を表示する(杆体および錐体の細胞体)。30

【図4】図4A～図4Cは、Gpx1のノックダウンが、急速な細胞死をもたらすことを描写する。Gpx1を指向するshRNAを、P0にエレクトロポレーションによりWTマウスへと送達した。エレクトロポレーションされた細胞の同定のために同時エレクトロポレーションされたプラスミドが含まれた(CAG-GFP)。(A)DAPI(中程度の灰色区域)で染色したP30の網膜由来の低拡大率凍結切片、エレクトロポレーションされた領域を矢印で示す。(B)TUNEL染色は、エレクトロポレーションの区域における陽性細胞を明らかにした。(C)抗GFPは、エレクトロポレーションされた区域が、TUNEL+細胞を有する区域であることを示す。対照shRNAは、ごく僅かなTUNEL+細胞しか示さなかった(図示せず)。40

【図5】図5A～図5Cは、網膜におけるPGC1の内在性発現を描写する。WT成体網膜を抗PGC1で染色した。大部分の核が陽性であり、錐体において杆体よりも高い発現が見られた。(A)大部分の網膜細胞における核局在を示す中程度の灰色の抗PGC1(パネルAにおける矢印、環状の中程度の灰色染色)。(B)抗PNAを使用して錐体における発現(薄灰色、例えば、パネルB上部の薄い鉛直線)および核(暗灰色、DAPI、例えば、矢印が置かれた大きい区域)を示す以外は(A)と同じ切片。矢印は錐体50

核を示す。(C)抗錐体アレスチン(薄灰色)および抗PGC1による異なる切片の染色も、錐体染色を示す。矢印は、二重染色された錐体の例を示す。

【図6】図6A～図6Cは、WT、rd10およびrho-/-網膜におけるNr f 2の内在性発現を描写する。Nr f 2タンパク質の抗血清を、WT P30網膜の凍結切片にかけ(中程度の灰色)、抗PNAを使用して、錐体OS(薄灰色)を同定した。WT網膜(A)のIS、外顆粒層(ONL)および内顆粒層(INL)において低レベルのNr f 2(灰色)が発現される。rd10 P18網膜(B)およびrho-/-P30網膜(C)の錐体(杆体よりも高い)においてNr f 2レベル(中程度の灰色)が上昇する。矢印は、より高レベルのNr f 2タンパク質を有する錐体細胞体を指す。BおよびCにおける角括弧は、ONL層を表示する。10

【図7】図7は、高力価AAVベクターの同時注射が、多くの細胞に同時感染をもたらすことを描写する。P0 WT網膜に、一方はGFP(薄灰色)をコードし、もう一方はtdTomato(明るい薄灰色)をコードする、2種のAAVベクターの混合物を注射した。矢印は、二重感染した錐体の例を示す。2個の網膜にわたる200個の細胞の定量化は、PNA染色によって同定された錐体の100%が同時感染し、全光受容体の85%が同時感染したことを示した。

【図8】図8は、感染に使用したAAV2/8ベクターゲノムの模式図を提示する。これらは、酸化防止遺伝子と共に構築されたCMVプロモーターおよびベータ-グロビンイントロンを含む。感染細胞の追跡を可能にするために、AAV-CMV-GFPを、抗酸化遺伝子を発現するAAVベクターと共に混合した。20

【図9】図9A～図9Dは、rd1網膜におけるAAVベクターによる抗酸化酵素SOD2およびカタラーゼの発現を描写する。抗酸化酵素の抗血清(中程度の灰色、A'～D')を、rd1 P60網膜の凍結切片にかけ、GFP発現(薄灰色、A～D)を使用して、残る錐体を追跡した。AAV-CMV-GFPのみを感染した対照rd1網膜は、SOD2(A、A')およびカタラーゼ(C、C')発現を殆ど示さなかつたが、3種のウイルスの混合物に感染した網膜において、高レベルのSOD2(B、B')およびカタラーゼ(D、D')発現が明らかであった。

【図10】図10A～図10Dは、AAVによる酸化防止酵素遺伝子の送達が、錐体生存を促進することを描写する。P0 rd1網膜を、AAV-CMV-GFP、AAV-CMV-SOD2-およびAAV-CMV-カタラーゼ(図8に示すベクター)により網膜下に同時感染させた。対照rd1網膜を、AAV-CMV-GFPに感染させた。P50において、凍結切片を調製し、網膜中心を通る切片のGFP(薄灰色、B、D)を撮像した。対照ウイルスに感染した網膜切片(A、B)。網膜中心におけるGFP+細胞の非存在に留意(B)。酸化防止ウイルスに感染した網膜切片(C、D)。錐体細胞体を示す強膜位置における網膜中心(矢印、D)にGFP+細胞が存在することに留意(例えば、図1Dを参照)。30

【図11】図11は、過剰発現SOD2およびカタラーゼが、錐体生存を延長することを実証する。SOD2およびカタラーゼを発現するAAVベクターに感染したWTおよびrd1網膜における平均錐体密度を示した。各網膜の視神経頭の中心から1.5mm背側、腹側、鼻側および側頭における4個の250μm×250μmの正方形における錐体密度を定量化し、時点当たり群当たり20個前後の網膜を解析した。成体WT網膜は、一定の錐体密度を有する(0.0625mm²当たりほぼ350個の錐体)。平均(±SEM)錐体密度は、P50、P60およびP70においてより大きく、AAV-CMV-GFP(暗灰色線)のみによる対照網膜と比較して、AAV-CMV-GFP、AAV-CMV-SOD2およびAAV-CMV-カタラーゼ(中程度の灰色線)で処置したrd1網膜におけるP50において有意により大きかった(p<0.05)。40

【図12】図12A～図12Dは、SOD2およびカタラーゼの過剰発現が、錐体の外節(OS)および内節(IS)を保存することを実証する。SOD2およびカタラーゼを発現するAAVベクターに感染した、フラットマウントしたP60 WTおよびrd1網膜の高拡大率像。網膜を抗PNA(中程度の灰色、A、B'、C')で染色して、錐体OS50

および I S を示す。長い O S および I S (A) が、W T 網膜に存在したが、r d 1 P 6 0 網膜における残る錐体 (G F P でマーク、薄灰色、 B) は、 O S および I S を欠く (B ') 。 S O D 2 およびカタラーゼの過剰発現は、r d 1 P 6 0 網膜における錐体 O S および I S (C および C ') をレスキューした。 P N A 染色により錐体のパーセンテージを計数することにより表現型を定量化した。数値は、平均 ± s . d . として示した。1群当たり n = 3 網膜。

【図 13】図 13 A ~ 図 13 B は、S O D 2 およびカタラーゼの過剰発現が、視運動アッセイによって測定される光受容体機能を保存することを実証する。r d 1 0 マウスの非注射左眼 (中程度の灰色) および A A V ベクター注射右眼 (薄灰色) の視力を示す。 A A V - C M V - G F P (マウス I D 1 ~ 5 、 n = 5) による対照処置マウスおよび A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - S O D 2 + A A V - C M V - カタラーゼ処置マウス (マウス I D 6 ~ 1 0 、 n = 5) を P 4 0 (A) および P 5 0 (B) に検査した。 P 4 0 および P 5 0 に、検査した大部分の抗酸化処置マウスは、左よりも高い右眼視力を有したが、大部分の対照処置マウスは、同様の左および右眼応答を有した。2群 (対照処置 v s 抗酸化 A A V 処置マウス) の間の左および右眼の差は、 P 5 0 において有意であった (P < 0 . 0 5) (B) 。

【図 14】図 14 は、S O D 2 およびカタラーゼの過剰発現が、光誘発神経節細胞活性によって測定される光受容体機能を保存することを実証する。グラフの左側は、神経節細胞活性記録のために P 7 0 に収集した、 A A V - C M V - G F P および A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - S O D 2 + A A V - C M V - カタラーゼで処置した r d 1 0 マウス由来の網膜の結果を示す。提示されているデータは、3個の対照処置網膜由来の総計 3 5 個の神経節細胞および 3 個の抗酸化 A A V ベクター処置網膜由来の総計 2 6 個の細胞に由来する。グラフの右側は、この実験のために P 1 0 0 に収集した r h o - / - マウスの A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - N r f 2 を注射した網膜由来の結果を示す。各網膜から 1 0 個の神経節細胞を光誘発活性に関して測定した。各神経節細胞のピーカー発火率 (p e a k f i r i n g r a t e) (スパイク / 秒) は、1秒間の光刺激 (波長 : 3 5 6 n m + 5 0 5 n m 、光強度 : 1 0 1 0 光子 c m - 2 s - 1) の 2 0 回の試行にわたり平均した。O N 、 O F F および O N / O F F 神経節細胞がこの解析のために含まれた。抗酸化 A A V ベクター処置網膜の平均ピーカー発火率 (白線) は、対照処置網膜と比較してより高く、その差は統計的に有意である (p < 0 . 0 5) 。

【図 15】図 15 A ~ 図 15 B は、P G C 1 および N r f 2 の過剰発現が、網膜中心および中央における錐体光受容体を守ることを実証する顕微鏡写真である。対照群 (A ; A A V - C M V - G F P 処置) および抗酸化転写因子群 (B ; A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - P G C 1 + A A V - C M V - N r f 2 処置) 由来の代表的なフラットマウントした r d 1 P 5 0 網膜を示す。錐体光受容体を G F P (緑色) によって追跡した。A および B の右のボックスは、視神経頭から 1 . 5 m m 背側の区域の拡大図である。対照動物 (A) の網膜中心および中央 (四角で強調) における G F P の非存在に留意されたい。多くの G F P 陽性細胞が、抗酸化転写因子 A A V 処置網膜 (B) において明らかである。

【図 16】図 16 は、P G C 1 および N r f 2 の過剰発現が、錐体生存を延長することを実証する。P 3 0 、 P 5 0 および P 8 0 に A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - P G C 1 + A A V - C M V - N r f 2 ベクターで処置した r d 1 網膜の平均 (± S E M) 錐体密度を示す (薄灰色線) 。平均 (± S E M) 錐体密度は、 A A V - C M V - G F P による対照網膜と比較して、S O D 2 およびカタラーゼを過剰発現する網膜において P 5 0 にて有意により大きかった (p < 0 . 0 0 1) 。 P G C 1 および N r f 2 処置網膜の平均錐体密度は、 P 5 0 における対照網膜 (p < 0 . 0 0 1) ならびに S O D 2 およびカタラーゼ処置網膜 (p < 0 . 0 0 1) よりも有意に大きく、 P 8 0 における対照網膜 (p < 0 . 0 5) よりも依然として有意に大きかった。

【図 17】図 17 A ~ 図 17 B は、P G C 1 および N r f 2 の過剰発現が、網膜中心における錐体の外節 (O S) および内節 (I S) を保存することを実証する。P G C 1 a お

10

20

30

40

50

およびN r f 2 (A、A') を発現する A A V ベクターに感染した、フラットマウントした P 3 0 WT および r d 1 網膜の中央背側領域の高拡大率像。網膜を抗 P N A (A' 、 B') で染色して、錐体外節 (O S) および内節 (I S) を示し、より多くの O S および I S が、 P G C 1 a および N r f 2 過剰発現 (A、A') で処置した網膜に存在し、対照 r d 1 網膜は、 O S および I S (B、B') を欠いた。

【図 18】図 18 A ~ 図 18 D は、 N r f 2 および P G C 1 の過剰発現が、錐体外節 (O S) を保存することを実証する。 A および B は、 A A V - G F P + N R F 2 + P G C 1 に感染した外節の顕微鏡写真であり、 C および D は、 A A V - G F P に感染した外節の顕微鏡写真である。 A および C は、 G F P および赤色 / 緑色オプシンが染色され、 B および D は、赤色 / 緑色オプシンが染色される。 A および B に示す通り、赤色 / 緑色オプシンタンパク質は、残る錐体外節構造に局在したが、対照網膜における細胞体の細胞質に誤って局在した。矢印は、錐体外節の例を示す。
10

【図 19】図 19 は、 N r f 2 単独の過剰発現が、錐体生存を延長することを実証するグラフである。 G F P + P G C 1 a (下の線) 、 G F P + N r f 2 (上の線) および G F P + P G C 1 a + N r f 2 (中央線) を発現する A A V ベクターに感染した r d 1 網膜における平均錐体密度を示す。 P 5 0 での平均錐体密度は、 A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - N r f 2 で処置した網膜において、 A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - P G C 1 + A A V - C M V - N r f 2 を発現する A A V ベクターで処置したものよりも大きかった。

【図 20】図 20 は、 N r f 2 の過剰発現が、錐体外節を保存することを実証するグラフである。 P N A 染色を有する錐体のパーセンテージを計数することにより、表現型を定量化した。 P 5 0 網膜の中央背側領域を定量化のために選んだ。数値を平均 ± S E M として示す。
20

【図 21】図 21 A ~ 図 21 D は、 N r f 2 の処置が、スーパーオキシドレベルを低下させることを実証する顕微鏡写真である。出生後日数 (P) 4 5 に、 A A V - C M V - G F P で処置した r d 1 0 マウスまたは A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - N r f 2 で処置した r d 1 0 マウスへとヒドロエチジン (D H E) を腹腔内注射した。 18 時間後にマウスを安樂死させ、網膜を収集した。 A A V - C M V - G F P 注射網膜 (C) におけるより強い蛍光は、より高レベルのスーパーオキシド種の産生を実証する。最小蛍光は、 A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - N r f 2 で処置した網膜 (A) に存在した。 B および D は、 A および C における網膜の G F P 緑色蛍光を示す。
30

【図 22】図 22 A ~ 図 22 F は、 N r f 2 の過剰発現が、錐体における脂質酸化を低下させることを実証する顕微鏡写真である。 P 3 0 r d 1 網膜を収集し、アクロレイン修飾タンパク質に対し免疫染色した。アクロレインは、脂質過酸化の代謝物であり、タンパク質と反応することができる。 A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - N r f 2 に感染した網膜 (D ~ F) は、低下したレベルの抗アクロレイン染色を有し、 A A V - C M V - G F P に感染した対照網膜 (A ~ C) と比較してより低レベルの脂質酸化を実証する。

【図 23】図 23 A ~ 図 23 B は、 N r f 2 の過剰発現が、視運動アッセイによって示されるより優れた視力をもたらすことを実証するグラフである。 r d 1 0 マウスの右眼に A A V ベクター注射を与えた一方、左眼は注射せず、動物内対照とした。 P 5 0 r d 1 0 マウスの右および左眼を別々に検査し、視力を (A) に示す。 A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - N r f 2 処置を与えた右眼の平均視力 (± S E M) は、 A A V - C M V - G F P 処置を与えた右眼よりも高い。各動物の右眼 / 左眼視力の比を使用して、処置なし動物間の変動を最小化した。 A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - N r f 2 処置網膜の R / L 比は、 A A V - C M V - G F P 処置網膜よりも有意に高かった (p < 0 . 0 5) (B) 。
40

【図 24】図 24 A ~ 図 24 C は、 N r f 2 の過剰発現が、明所視網膜電図検査 (E R G) によって評価されるより優れた視覚的機能をもたらすことを実証する。 P 4 0 r d 1 0 マウスを、明所視 E R G により錐体惹起電気的シグナルに関して検査した。代表的な波形を (A ~ B) に示す。 A A V - C M G - G F P + A A V - C M V - N r f 2 処置マウス

の右眼は、実質的により優れた波形を有した。右眼 / 左眼 b - 波振幅の比は、A A V - C M V - G F P + A A V - C M V - N r f 2 処置マウスにおいて、対照マウスよりも有意に高かった (C)。

【図25】図25A～図25Bは、SOD2およびカタラーゼの過剰発現が、ロドプシンヌルマウス (r h o - / -) の網膜における錐体の外節を保存することを実証する。6ヶ月齢のr h o - / - マウスの網膜を、SOD2およびカタラーゼを発現するAAVベクターに感染させた。網膜を抗PNAで染色して、錐体外節 (OS) を示した。Aは、PNAおよびGFP染色を示す。Bは、PNA染色を示す。

【図26】図26Aおよび図26Bは、野生型マウスにおける視神経挫傷後の網膜神経節細胞生存 (A) および軸索再生 (B) に対するNrf2およびSod2の発現増大の効果を描写するグラフである。
10

【発明を実施するための形態】

【0037】

本発明は、少なくとも一部には、酸化ストレスを受ける光受容体細胞における抗酸化防御タンパク質（複数可）をコードする遺伝子の発現および／または活性の増大が、罹患細胞における酸化ストレスを阻害することができるという発見に基づく。杆体は、外顆粒層 (ONL) における主要な細胞型であるため、錐体は、杆体死の後に大いに変更された環境を経験する。錐体外節 (OS) が崩壊すると、これは、網膜色素上皮 (RPE) との密接な関連を失い、よって、その核酸、タンパク質および脂質のより大規模な酸化によって証明される通り、過酸素環境に曝露される。よって、RPのマウスモデルにおける錐体細胞が、酸化の徴候を示すことが発見された。したがって、抗酸化酵素および酸化防止プログラムを全般的に上方調節する転写因子を含む抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性の増大は、細胞酸化ストレスの阻害に役立ち、よって、光受容体生存性を増大させることができる。したがって、本発明は、少なくとも1種の抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性を増大させることにより、光受容体の酸化ストレスを阻害するための方法と、細胞酸化ストレスに関連する障害、例えば、網膜色素変性症の処置および／または予防のための方法を提供する。
20

【0038】

冠詞「a」および「an」は、該冠詞の文法上の目的語の1個または2個以上（即ち、少なくとも1個）を指すように本明細書において使用されている。例として、「エレメント (an element)」は、1個のエレメントまたは2個以上のエレメント、例えば、複数のエレメントを意味する。
30

【0039】

用語「含む」は、語句「が挙げられるがこれらに限定されない」を意味するように本明細書において使用されており、これと互換的に使用されている。

【0040】

用語「または」は、文脈がそれ以外の事柄を明らかに示さない限り、用語「および／または」を意味するように本明細書において使用されており、これと互換的に使用されている。

【0041】

本明細書において、用語「酸化ストレスを阻害する」および「酸化ストレスの阻害」は、酸化ストレスの防止と共に、その寛解、減少または低下を指す。
40

【0042】

本明細書において、用語「抗酸化防御タンパク質」は、分子の酸化を阻害するいずれかのタンパク質を含む。より具体的には、「抗酸化防御タンパク質」は、酸化防止プログラムに関与するいずれかの上流エレメント（例えば、転写因子）と、上流エレメントの増強の結果として活性化され得るいずれかの下流エレメント（例えば、抗酸化酵素）とを包含する。例示的な抗酸化防御タンパク質は、スーパーオキシドジスマスター2 (SOD2) 、カタラーゼ、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター1 - アルファ (PGC1) および核因子赤血球由来2様2 (Nrf2) を含む。
50

【0043】

本明細書において、用語「酸化ストレス」は、例えば、DNA損傷、脂質過酸化およびタンパク質の酸化を含む細胞損傷を生じる活性酸素種(ROS)のレベルの増大をもたらす、光受容体細胞の正常な還元-酸化状態におけるいずれかの不均衡を指す。

【0044】

本明細書において、用語「抗酸化酵素」および「酵素スカベンジャー」は、フリーラジカル、即ち、活性酸素種(ROS)を解毒または寛解することができる抗酸化タンパク質を指すよう互換的に使用されている。その例として、アルファ-1-ミクログロブリン、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼおよびペルオキシレドキシンが挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0045】

本明細書において、用語「ROSのレベルを低下させる」は、ROSのレベルを生理学的に許容される無毒性レベルへと減少させることと共に、ROSのさらなる生成を防止することを指す。

【0046】

本発明の一実施形態において、本方法における使用に適した細胞は、光受容体細胞、即ち、網膜に存在する特殊化された細胞である。網膜は、約1億2千万個の別々の杆体細胞(夜間視力)および7百万個の錐体細胞(昼間視力および色覚)ならびに数百万個の他の構造支持および相互接続細胞を含有する薄い透明な組織である。光受容体細胞は、網膜の感光性細胞である「杆体」および「錐体」からなる。杆体は、杆体感光色素であるロドブシンを含有し、錐体は、光に応答し、最終的に網膜の出力細胞、神経節細胞における神経放電の引き金を引く他の別個の感光色素を含有する。最終的に、このシグナルは、脳の視覚野および他の標的位置における視覚的刺激として登録される。網膜色素上皮(RPE)細胞は、光受容体の正常機能および生存に関与する種々の因子を産生、貯蔵および輸送する。光を感じることもできる網膜細胞は、感光性神経節細胞からなる。メラノブシン神経節細胞として公知のこのような細胞は、網膜内層に存在し、視蓋前野(中脳)、視床下部における視交叉上核および外側膝状体(視床)へと突出する樹状突起および長い軸索を有する。一実施形態において、光受容体細胞は、杆体である。一部の実施形態において、光受容体細胞は、視神経とは別個のものである。一実施形態において、光受容体細胞は、錐体である。一実施形態において、感光性細胞は、メラノブシン神経節細胞である。

20

【0047】

本明細書において、用語「網膜障害」は、網膜の障害を一般に指す。一実施形態において、網膜障害は、錐体細胞および/または杆体細胞の酸化ストレス、生存性減少、例えば、死に関連する。さらに、特定の実施形態において、網膜障害は、例えば、糖尿病性網膜症の場合のような血管漏出および/または成長に関連しないが、その代わりに、錐体細胞および/または杆体細胞の生存性低下によって主に特徴付けられる。ある特定の実施形態において、網膜障害は、遺伝的障害である。特定の実施形態において、網膜障害は、網膜色素変性症である。別の実施形態において、網膜障害は、加齢性黄斑変性症である。別の実施形態において、網膜障害は、錐体杆体ジストロフィーである。別の実施形態において、網膜障害は、杆体錐体ジストロフィーである。他の実施形態において、網膜障害は、血管漏出および/または成長に関連しない。ある特定の実施形態において、網膜障害は、糖尿病および/または糖尿病性網膜症に関連しない。さらなる実施形態において、網膜障害は、NARP(ニューロパチー、運動失調症、および網膜色素変性症)ではない。さらに別の実施形態において、網膜障害は、神経学的障害ではない。ある特定の実施形態において、網膜障害は、損なわれた視神経および/または脳の障害に関連する障害ではない。前述の実施形態において、網膜障害は、損なわれた光受容体細胞に関連し、神経学的障害ではない。

40

【0048】

本明細書において、用語「網膜色素変性症」または「RPE」は、当技術分野において公知であり、杆体および錐体の遺伝的障害の異種群を包含する。網膜色素変性症は、多くの

50

場合次の症状発現によって特徴付けられる網膜変性症を一般に指す：夜盲症、進行性周辺視力喪失、最終的に全盲をもたらす；暗いモザイク様網膜色素沈着、網膜血管の減弱、視神経乳頭の蝶様蒼白および進行型黄斑変性症に存する眼底検査上の変化。一部の事例において、色素沈着が欠如し得る。網膜色素変性症は、硝子体の変性性混濁および白内障に関連し得る。家族歴は、網膜色素変性症において顕著である；遺伝のパターンは、常染色体劣性、常染色体優性またはX連鎖となり得る；常染色体劣性型は、最も一般的であり、散発的に起こり得る。

【0049】

本明細書において、用語「錐体杆体ジストロフィー」または「C R D」および「杆体錐体ジストロフィー」または「R C D」は、錐体および杆体光受容体細胞の悪化を引き起こし、多くの場合盲目をもたらす、当技術分野において認められている遺伝性進行性疾患を指す。C R Dは、錐体細胞の生存性低下または死と、続く杆体細胞の生存性低下または死によって特徴付けられる。対照的に、R C Dは、杆体細胞の生存性低下または死と、続く錐体細胞の生存性低下または死によって特徴付けられる。

【0050】

本明細書において、用語「加齢性黄斑変性症」は、「黄斑変性症」または「A M D」とも称され、高齢個体の間に盲目を引き起こす当技術分野において認められている病態を指す。加齢性黄斑変性症は、湿潤型および乾燥型のA R M Dの両方を含む。全症例の約90パーセントを占める乾燥型のA R M Dは、萎縮性、非滲出性またはドルーゼノイド（d r u s e n o i d）（加齢性）黄斑変性症としても公知である。乾燥型のA R M Dにより、ドルーゼンは、ブルッフ膜の下／内にある網膜色素上皮（R P E）組織に典型的に蓄積する。続いて、ドルーゼンが、黄斑における光受容体の機能に干渉すると、視力喪失が起こり得る。乾燥型のA R M Dは、長年にわたり漸進的な視力喪失を生じる。乾燥型のA R M Dは、湿潤型のA R M Dをもたらし得る。滲出性または血管新生（加齢性）黄斑変性症としても公知の湿潤型のA R M Dは、急速に進行し、中心視力に重度の損傷を引き起こし得る。黄斑ジストロフィーは、最も頻繁に遭遇する若年性発病型の黄斑ジストロフィーである、スタルガルト黄斑ジストロフィーまたは黄色斑眼底としても公知のスタルガルト病を含む。

【0051】

本明細書において、用語「神経学的障害」は、神経変性障害および脱髓性障害を包含する。一部の実施形態において、本発明の組成物は、パーキンソン病、タウオパチー、アルツハイマー病、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、核上性まひ、進行性、T D P - 4 3 タンパク質症、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、前頭側頭葉変性症（Fronto temporal Lobar Degeneration）、レビー小体病、A I D S認知症複合、失語症、原発性進行性、原発性進行性非流暢失語症、認知症、血管性、C A D A S I L、認知症、多発梗塞性（Multi - lnfarct）、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、前頭側頭葉変性症、前頭側頭認知症、原発性進行性非流暢失語症、クリューバー・ビューシー症候群、ピック病、運動ニューロン疾患、球まひ、進行性、筋萎縮、脊髄性、多系統萎縮症、オリーブ橋小脳萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群、線条体黒質変性症（Striatonigral Degeneration）、オリーブ橋小脳萎縮症、新生物隨伴症候群、神経系、ランバート・イートン筋無力症候群、辺縁系脳炎、脊髄炎、横行、オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群、傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍隨伴性多発ニューロパチー、ポリオ後症候群、プリオン病、脳症、牛海綿状、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー疾患、不眠症、致死性家族性、クールー、スクレイピー、消耗病、慢性、クロイツフェルト・ヤコブ（Creutzfeldt - Jakob）症候群、シャイ・ドレーガー症候群、亜急性連合変性症、遺伝性変性障害（H ereditary degenerative Disorder）、神経系、アレキサンダー病、アミロイドニューロパチー、家族性、延髓脊髄性萎縮、X連鎖、カナバン病、コケーン症候群、変形性筋失調症、ゲルストマン・ストロイスラー（Straussier）・シャインカー疾患、肝レンズ核変性症、遺伝性中枢神経系脱髓性疾患、遺伝性感覺性自律性ニューロ

10

20

30

40

50

パチー、遺伝性感覚性運動性ニューロパチー、ハンチントン病、ラフォーラ病、レッシュ・ナイハン症候群、メンケス縮れ毛症候群、先天性ミオトニー、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、神経セロイドリポフスチン症、視神経萎縮、遺伝性、バントテン酸キナーゼ関連神経変性症、レット症候群、小児期の脊髄性筋萎縮、脊髄小脳変性症、トウレット症候群、結節性硬化症、ウンフェルリヒト・ルントボルク症候群その他等が挙げられるがこれらに限定されない神経学的障害の処置と共に、アルツハイマー病および関連する認知症の処置に有用である。一実施形態において、神経学的疾患は、パーキンソン病ではない。

【0052】

本明細書において、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えば、mRNA）ならびにヌクレオチドアナログを使用して生成されるDNAまたはRNAのアナログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよいが、好ましくは、二本鎖DNAである。本発明の方法において使用される核酸分子は、標準分子生物学技法を使用して単離することができる。目的の核酸配列の全体または一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、標準ハイブリダイゼーションおよびクローニング技法を使用して核酸分子を単離することができる（例えば、Sambrook, J.、Fritsch, E. F. およびManiatis, T.、Molecular Cloning. A Laboratory Manual.、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989年に記載）。

【0053】

「単離された」核酸分子は、該核酸の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子である。例えば、ゲノムDNAに関して、用語「単離された」は、該ゲノムDNAが天然に関連する染色体から分離された核酸分子を含む。好ましくは、「単離された」核酸分子は、該核酸分子が由来する生物のゲノムDNAにおいて該核酸分子に天然に隣接する配列（即ち、該核酸分子の5'および3'末端に位置する配列）を含まない。

【0054】

本発明の方法における使用のための核酸分子は、目的の核酸分子の配列に基づき設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって単離することもできる。本発明の方法において使用される核酸分子は、標準PCR増幅技法に従って、鑄型としてのcDNA、mRNAあるいはゲノムDNAと、適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅することができる。さらに、目的のヌクレオチド配列に相当するオリゴヌクレオチドは、標準合成技法により、例えば、自動DNA合成機を使用して調製することができる。

【0055】

本発明の方法における使用のための核酸は、例えば、標準組換えDNA技法により調製することもできる。本発明の核酸は、標準技法を使用して化学合成することもできる。ポリデオキシヌクレオチドを化学合成する様々な方法は公知であり、市販のDNA合成機において自動化された固相合成を含む（例えば、参照により本明細書に援用されるItakuraら、米国特許第4,598,049号；Caruthersら、米国特許第4,458,066号；ならびにItakura、米国特許第4,401,796号および同第4,373,071号を参照）。

【0056】

本明細書において、「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸と相補的な、例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖と相補的な、mRNA配列と相補的な、または遺伝子のコード鎖と相補的なヌクレオチド配列を含む。したがって、アンチセンス核酸は、センス核酸と水素結合することができる。

【0057】

一実施形態において、本発明の核酸分子は、siRNA分子である。別の実施形態にお

いて、本発明の核酸分子は、*s h RNA*分子である。一実施形態において、本発明の核酸分子は、*RNAi*を媒介する。

【0058】

別の実施形態において、本発明の核酸分子は、翻訳阻害を媒介する。*RNA干渉*(*RNAi*)は、*d s RNA*と同じ配列を含有するメッセンジャー*RNA*(*mRNA*)を分解するための二本鎖*RNA*(*d s RNA*)を使用する、転写後標的化遺伝子サイレンシング技法である(Sharp, P.A.およびZamore, P.D., 287巻、2431~2432頁(2000年); Zamore, P.D.ら、Cell 101巻、25~33頁(2000年)。Tuschl, T.ら、Genes Dev. 13巻、3191~3197頁(1999年); Cottrell TRおよびDoering T L.、2003年、Trends Microbiol.、11巻:37~43頁; Bushman F.、2003年、Mol Therapy.、7巻:9~10頁; McM anus MTおよびSharp PA.、2002年、Nat Rev Genet. 3巻:737~47頁)。この過程は、内在性リボヌクレアーゼが、より長い*d s RNA*をより短い、例えば、低分子干渉*RNA*または*siRNA*と命名される21または22ヌクレオチド長*RNA*へと切断すると行われる。次に、このより小型の*RNA*セグメントは、標的*mRNA*の分解を媒介する。*RNAi*の合成のためのキットは、例えば、New England BiolabsまたはAmbionから市販されている。一実施形態において、アンチセンス*RNA*における使用について本明細書に記載されている化学のうち1種または複数を、*RNAi*を媒介する分子において用いることができる。

10

20

【0059】

本明細書において、用語「ベクター」は、それに連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの1種類は、追加的な*DNA*セグメントをそれにライゲーションすることができる環状二本鎖*DNA*ループを指す「プラスミド」である。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、追加的な*DNA*セグメントをウイルスゲノムにライゲーションすることができる。ある特定のベクターは、それが導入された宿主細胞において自律複製することができる(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、これにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、それが動作可能に連結された遺伝子または核酸分子の発現を導くことができ、「発現ベクター」または「組換え発現ベクター」または単純に「発現ベクター」と称される。原核生物における発現に必要な核酸配列は通常、プロモーター、オペレーター(任意選択の)およびリボソーム結合部位を、多くの場合他の配列と共に含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサーならびに終結およびポリアデニル化シグナルを利用することができる。一部の実施形態において、「発現ベクター」は、ウイルスエンベローピタンパク質のシードタイピングを可能にするために使用される。

30

【0060】

発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。本明細書において、プラスミドは、最も一般的に使用される形態のベクターであるため、「プラスミド」および「ベクター」は、互換的に使用することができる。しかし、本発明は、等価な機能を果たすウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス)等、その他の形態の発現ベクターを含むことが意図される。

40

【0061】

本明細書において、用語「レトロウイルス」は、その複製サイクルにおいて逆転写酵素を利用する*RNA*ウイルスに関連して使用されている。レトロウイルスゲノム*RNA*は、逆転写酵素によって二本鎖*DNA*に変換される。この二本鎖*DNA*型のウイルスは、感染した細胞の染色体に組み込まれることが可能である;組み込まれると、これは「プロウイルス」と称される。プロウイルスは、*RNA*ポリメラーゼIIの鑄型として機能し、新たなウイルス粒子の產生に必要とされる構造タンパク質および酵素をコードする*RNA*分子

50

の発現を導く。プロウイルスの各末端は、「長い末端反復」または「LTR」と呼ばれる構造である。LTRは、転写制御エレメント、ポリアデニル化シグナルならびにウイルスゲノムの複製および組み込みに必要とされる配列を含む、多数の調節シグナルを含有する。LTRは、数百塩基対の長さとなり得る。

【0062】

用語「AAVベクター」は、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5またはAAVX7を限定することなく含む、アデノ随伴ウイルス血清型に由来するベクターを指す。「rAAVベクター」は、AAVヌクレオチド配列と共に異種ヌクレオチド配列を含むベクターを指す。rAAVベクターは、ウイルスの生成に、シスで145塩基末端反復のみを必要とする。他のあらゆるウイルス配列は不必要であり、トランスで供給され得る(Muzyczka(1992年)Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158巻:97頁)。典型的には、rAAVベクターゲノムは、ベクターによって効率的にパッケージングされ得る導入遺伝子のサイズを最大化するために、逆方向末端反復(ITR)配列のみを保持する。ITRは、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的レスキュー、複製およびパッケージングをもたらす限りにおいて、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換により変更されていてよい。特定の実施形態において、AAVベクターは、AAV2/5またはAAV2/8ベクターである。適したAAVベクターは、例えば、参照により本明細書にその内容全体が援用される米国特許第7,056,502号およびYanら(2002年)J. Virol. 76巻(5号):2043~2053頁に記載されている。

10

20

【0063】

本明細書において、用語「レンチウイルス」は、ゆっくり発症する疾患を生じるレトロウイルスの群(または属)を指す。この群内に含まれるウイルスは、HIV(ヒト免疫不全ウイルス; HIV1型およびHIV2型等が挙げられるがこれらに限定されない)、ヒト後天性免疫不全症候群(AIDS)の病原因子; ヒツジにおける脳炎(ビスナ)または肺炎(マエディ)の原因となるビスナ-マエディ; ヤギにおける免疫不全、関節炎および脳症の原因となるヤギ関節炎・脳炎ウイルス; ウマにおける自己免疫性溶血性貧血および脳症の原因となるウマ感染性貧血ウイルス(EIAV); ネコにおける免疫不全の原因となるネコ免疫不全ウイルス(FIV); ウシ類におけるリンパ節症、リンパ球増加症およびおそらく中枢神経系感染症の原因となるウシ免疫不全ウイルス(BIV); ならびに類人霊長類における免疫不全および脳症の原因となるサル免疫不全ウイルス(SIV)を含む。これらのウイルスによって引き起こされる疾患は、長いインキュベーション期間および長引く経過によって特徴付けられる。通常、このウイルスは、単球およびマクロファージに潜在的に感染して、そこから他の細胞へと拡散する。HIV、FIVおよびSIVは、Tリンパ球(即ち、T細胞)にも容易に感染する。本発明の一実施形態において、レンチウイルスは、HIVではない。

30

【0064】

用語「プロモーター」は、本明細書において、RNAポリメラーゼが結合するDNA鎖の認識部位を指す。プロモーターは、RNAポリメラーゼと開始複合体を形成して、転写活性を開始および駆動する。この複合体は、「エンハンサー」と命名された活性化配列または「サイレンサー」と命名された阻害配列により修飾され得る。

40

【0065】

用語「形質転換」、「トランスフェクション」および「形質導入」は、レシピエント細胞への核酸、例えば、ウイルスベクターの導入を指す。

【0066】

本明細書において、用語「被験体」は、温血動物、好ましくは、ヒトを含む哺乳動物を含む。好ましい実施形態において、被験体は、霊長類である。さらにより好ましい実施形態において、霊長類は、ヒトである。

【0067】

本明細書において、様々な形態の用語「モジュレートする」は、刺激(例えば、特定の

50

応答または活性の増大または上方調節)および阻害(例えば、特定の応答または活性の減少または下方調節)を含むことが意図される。

【0068】

本明細書において、用語「接触」(即ち、薬剤と細胞との接触)は、薬剤および細胞を *in vitro* で共にインキュベートする(例えば、薬剤を培養中の細胞に添加する)または薬剤および被験体の細胞が *in vivo* で接触されるように薬剤を被験体に投与することを含むことが意図される。用語「接触」は、被験体において天然に生じ得る薬剤への細胞の曝露(即ち、天然の生理学的過程の結果として生じ得る曝露)を含むとは意図されない。

【0069】

本明細書において、用語、被験体への「投与」は、眼内投与または静脈内投与による送達を含む、被験体における所望の位置への組成物の送達のためのいずれか適した経路による、被験体への例えば酸化ストレスを阻害することができる本発明の組成物の分配、送達または適用を含む。それに代えてまたはそれと組み合わせて、送達は、局所的、非経口的または経口経路、脳内注射、筋肉内注射、皮下/皮内注射、静脈内注射、頸側投与、経皮送達、および直腸、結腸、膣内、鼻内または気道経路による投与によるものである。

【0070】

本発明の方法の様々な追加的な態様は、次のサブセクションにさらに詳細に記載されている。

【0071】

本発明の方法

本発明は、光受容体細胞を、抗酸化防御タンパク質の発現および/または活性を増大させる薬剤と接触させるステップを一般に含む、光受容体細胞の酸化ストレスを阻害するための方法を提供する。

【0072】

本発明は、また、被験体における網膜障害、例えば、光受容体細胞の酸化ストレスに関連する網膜障害を処置または予防するための方法を提供する。本方法は、被験体に、抗酸化防御タンパク質の発現および/または活性を増大させる薬剤を投与するステップを一般に含む。

【0073】

別の態様において、本発明は、被験体における網膜色素変性症を処置または予防するための方法を提供する。このような方法は、被験体に、抗酸化防御タンパク質の発現および/または活性を増大させる薬剤を投与するステップを一般に含む。

【0074】

本発明は、光受容体細胞、例えば、酸化ストレスに関連する障害によって損なわれた光受容体細胞の生存性を延長するための方法をさらに提供する。本方法は、細胞を、抗酸化防御タンパク質の発現および/または活性を増大させる薬剤と接触させるステップを一般に含む。

【0075】

本発明の方法において、細胞は、単一の抗酸化防御遺伝子または抗酸化防御タンパク質の組合せと接触させることができる、または被験体にこれを投与することができる。適した抗酸化防御遺伝子は、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ2(SOD2)、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター1-アルファ(PGC1)、核因子赤血球由来2様2(nrfl)を含む。本発明の方法における使用のための抗酸化防御遺伝子の適した組合せは、カタラーゼ; SOD2; PGC1; nrfl; カタラーゼおよびSOD2; SOD2およびPGC1; PGC1 およびnrfl; カタラーゼおよびPGC1; カタラーゼおよびnrfl; SOD2およびnrfl; カタラーゼ、SOD2およびPGC1; SOD2、PGC1 およびnrfl; カタラーゼ、PGC1 およびnrfl; カタラーゼ、SOD2およびnrfl; またはカタラーゼ、SOD2、PGC1 およびnrflを含む。

10

20

30

40

50

【0076】

一実施形態において、本明細書に記載されている方法は、*in vitro*で行うことができる。例えば、一実施形態において、抗酸化防御タンパク質（例えば、カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または Nrf2）の細胞内レベルを細胞において *in vitro* でモジュレートすることができ、次に、処置された細胞を被験体に投与または再投与することができる。一実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である。方法を *in vitro* で実施するために、標準方法によって被験体から細胞を得て、抗酸化防御タンパク質（例えば、カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または Nrf2）の細胞内レベルを刺激する薬剤と共に *in vitro* でインキュベート（例えば、培養）することができる。細胞を単離するための方法は、当技術分野において周知である。細胞は、同じ被験体に、あるいは細胞のドナーと適合性の別の被験体に再投与することができる。10

【0077】

被験体への細胞の投与のため、被験体に投与する前に、細胞から培養物における残留薬剤を先ず除去することが好ましくなり得る。これは、例えば、細胞の勾配遠心分離によりまたは組織の洗浄により行うことができる。細胞の *ex vivo* 遺伝子修飾と続く被験体への再投与のための方法は、当技術分野において周知であり、例えば、参照により本明細書にその内容全体が援用される米国特許第5,399,346号に記載されている。

【0078】

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載されている治療有効量の薬剤を被験体に投与することによる、*in vivo* における抗酸化防御タンパク質（譬如、カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または Nrf2）の細胞内レベルのモジュレーションのための方法を提供する。例えば、カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または Nrf2 の細胞内レベルは、光受容体細胞の細胞酸化ストレスに関連する網膜障害等、網膜障害を処置または予防するようにモジュレートすることができる。20

【0079】

特許請求されているモジュレーション方法は、天然に存在する事象を含むことを意図しない。例えば、用語「薬剤」または「モジュレーター」は、被験体の細胞によって產生される内在性メディエーターを包括することを意図しない。

【0080】

障害の処置および / または予防のための本発明の方法の適用は、長期または短期で、障害の治癒、障害に伴う少なくとも 1 種の症状の減少、または単純に被験体への一過性の有益な効果をもたらすことができる。したがって、本明細書において、用語「処置する」、「処置」および「処置すること」は、このような状態またはこの状態の少なくとも 1 種の症状を治癒、癒す、緩和、軽減、変更、矯正、寛解、改善または影響を与える目的で、例えば、光受容体細胞の酸化ストレスに関連する網膜障害を患う、またはこのような状態に対し感受性の被験体への、本明細書に記載されている薬剤の適用または投与を含む。本明細書において、状態の再発が、低下される、遅らせる、遅延されるまたは予防される場合においても、状態は「処置される」。30

【0081】

本発明のレジメンを使用した処置に適した被験体は、酸化ストレスに関連する網膜障害となるべきであるまたはその発症に対し感受性である。例えば、被験体は、障害の発症に遺伝的に素因がある場合がある。あるいは、網膜色素変性症等の網膜障害に関連する、視力、錐体および / または 杆体細胞の死滅速度、夜間視力、周辺視力、網膜血管の減弱ならびに他の眼底検査上の因子等が挙げられるがこれらに限定されない因子の異常進行は、網膜障害の存在またはその素因を示すことができる。40

【0082】

本明細書に記載されている薬剤は、必要に応じて投与されて、所望の効果を達成することができ、状態の重症度、被験体の年齢および病歴、ならびに組成物の性質、例えば、遺伝子の正体または影響される生化学的経路等が挙げられるがこれらに限定されない、種々

10

20

30

40

50

の因子に依存する。様々な実施形態において、組成物は、1日に少なくとも2、3、4、5または6回投与することができる。その上、治療または予防レジメンは、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24週間の期間に及び得る。

【0083】

カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または nrf2 の細胞内レベルを上方調節する薬剤の能力は、本明細書に記載されている通りに、例えば、細胞生存性をモジュレートする薬剤の能力を決定することにより（例えば、アポトーシスのモジュレーション）、ラミンAもしくはカスパーゼ3の切断；活性酸素種の産生；アクロレインの免疫組織化学的検出、および酸化剤（例えば、パラコート）への細胞の曝露後の網膜抽出物におけるカルボニル付加物のELISAを使用した酸化の評価；ならびに / または光受容体特異的オプシンの発現およびタンパク質合成により決定することができる。10

【0084】

様々な実施形態において、本発明の方法は、処置の有効性をモニターするステップをさらに含む。例えば、網膜色素変性症等の網膜障害に関連する、視力、錐体および / または杆体細胞の死滅速度、夜間視力、周辺視力、網膜血管の減弱ならびに他の眼底検査上の変化をモニターして、処置の有効性を評価することができる。その上、処置および / または予防の対象である特定の障害に関連する細胞の死滅速度をモニターすることができる。あるいは、例えば、リン脂質産生によって測定される、このような細胞の生存性をモニターすることができる。後述する実施例セクションに記載されているアッセイを使用して、処置の有効性をモニターすることもできる（例えば、網膜電図検査 - ERG）。20

【0085】

一実施形態において、本発明の方法における使用のための薬剤は、抗酸化防御タンパク質、例えば、スーパーオキシドジスマターゼ2 (SOD2)、カタラーゼ、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター1 - アルファ (PGC1) および核因子赤血球由来2様2 (nrf2)（またはこれらの組合せ）をコードする核酸分子である。

【0086】

一実施形態において、核酸分子は、スーパーオキシドジスマターゼ2 (SOD2) をコードする。SOD2は、鉄 / マンガンスーパーオキシドジスマターゼファミリーのメンバーである。これは、ホモ四量体を形成し、サブユニット当たり1個のマンガンイオンに結合するミトコンドリアタンパク質をコードする。このタンパク質は、酸化的リン酸化のスーパーオキシド副産物に結合し、これを過酸化水素および二原子酸素に変換する。SOD2には3種の選択的転写物が存在し、それらのアミノ酸配列は公知であり、例えば、GenBank受託番号GI:67782304、GI:67782306およびGI:67782308に見出すことができる。30

【0087】

別の実施形態において、核酸分子は、カタラーゼをコードする。カタラーゼは、ほぼ全て的好気性細胞のペルオキシソームに存在するヘム酵素である。カタラーゼは、活性酸素種過酸化水素を水および酸素に変換し、これにより、過酸化水素の毒性効果を和らげる。カタラーゼのアミノ酸配列は公知であり、例えば、GenBank受託番号GI:260436906に見出すことができる。40

【0088】

別の実施形態において、核酸分子は、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター1 - アルファ (PGC1) をコードする。PGC1は、エネルギー代謝に関する遺伝子を調節する転写コアクチベーターである。PGC1は、PPARガンマと相互作用し、これは、複数の転写因子とPGC1との相互作用を可能にする。PGC1は、cAMP応答エレメント結合タンパク質 (CREB) および核呼吸因子 (NRF) と相互作用し、その活性を調節することができる [核呼吸因子の維持に正確]。これは、外部生理学的刺激およびミトコンドリア生合成の調節の間に直接的なリンクをもた50

らす。PGC1のアミノ酸配列は公知であり、例えば、GenBank受託番号GI:116284374に見出すことができる。

【0089】

別の実施形態において、核酸分子は、塩基性ロイシンジッパー(bZIP)タンパク質の小ファミリーのメンバーの転写因子である、核因子(赤血球由来2)様2(nr f2)をコードする。コードされた転写因子は、そのプロモーターにおいて抗酸化応答エレメント(ARE)を含有する遺伝子を調節する。nr f2には3種の選択的転写物が存在し、それらのアミノ酸配列は公知であり、例えば、GenBank受託番号GI:372620347、GI:372620348およびGI:372620346に見出すことができる。

10

【0090】

一実施形態において、錐体細胞等、光受容体細胞の生存性または生存は、短期生存性、例えば、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、約3年間、約4年間、約5年間、約10年間、約15年間、約20年間、約25年間、約30年間、約40年間、約50年間、約60年間、約70年間および約80年間である。

【0091】

よって、上述の本発明の方法は、光受容体細胞の酸化ストレスおよび関連する障害の処置または予防に使用することができる。一実施形態において、障害は、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、錐体杆体ジストロフィーおよび杆体錐体ジストロフィー等が挙げられるがこれらに限定されない網膜障害である。他の実施形態において、網膜障害は、血管漏出および/または成長に関連しない。ある特定の実施形態において、網膜障害は、糖尿病に関連しない。別の実施形態において、網膜障害は、糖尿病性網膜症ではない。さらなる実施形態において、網膜障害は、NARP(ニューロパチー、運動失調症および網膜色素変性症)ではない。一実施形態において、障害は、錐体および/または杆体細胞の生存性減少に関連する網膜障害である。さらに別の実施形態において、障害は、遺伝的障害である。

20

【0092】

一実施形態において、本発明は、障害の発症に対し感受性の被験体を選択し、有効量の本発明の核酸分子、ベクターおよび/または組成物を前記被験体に投与し、これにより、前記被験体における障害を処置または予防することによる、被験体における光受容体細胞の酸化ストレスに関連する網膜障害、例えば網膜色素変性症等、網膜障害を処置または予防する方法を対象とする。

30

【0093】

酸化ストレスの結果としての活性酸素種への曝露による変性から光受容体細胞を救うための全体的な戦略は、例えば、抗酸化防御タンパク質(複数可)の発現および/または活性を増大させることにより活性酸素種を阻害および/または除去することにより、過酸素環境を低下または排除させる遺伝子を該細胞に供給することである。

【0094】

一般に、本発明の核酸分子および/またはベクターは、所望の効果を誘発するため、例えば、光受容体細胞における酸化ストレスを阻害するための治療有効量で提供される。投与される核酸分子および/またはベクターの量は、処置の回数および量の両方に従って、処置される被験体の臨床状態、年齢および体重ならびに障害の重症度等の因子にも依存するであろう。投与に必要とされる活性成分の正確な量は、遺伝子療法専門家の判断に依存し、個々の患者それぞれに特定のものとなる。例えば、本発明の核酸分子を含むウイルスベクターは、1ml当たり約 1×10^5 ～約 1×10^9 コロニー形成単位(cfu)に及ぶ力値で投与されるが、範囲は変動し得る。好ましい力値は、約 1×10^6 ～約 1×10^8 cfu/mlに及ぶ。

40

【0095】

治療有効量(即ち、有効投薬量)の本発明の核酸分子および/またはベクターは、約0

50

. 001 ~ 30 mg / kg 体重、好ましくは、約 0 . 01 ~ 25 mg / kg 体重、より好ましくは、約 0 . 1 ~ 20 mg / kg 体重、さらにより好ましくは、約 1 ~ 10 mg / kg、2 ~ 9 mg / kg、3 ~ 8 mg / kg、4 ~ 7 mg / kg または 5 ~ 6 mg / kg 体重に及び得る。当業者であれば、疾患または障害の重症度、以前の処置、被験体の一般的な健康状態および / または年齢ならびに存在する他の疾患等が挙げられるがこれらに限定されない、ある特定の因子が、被験体の有効な処置に必要とされる投薬量に影響し得ることを認めるであろう。さらに、治療有効量の本発明の核酸分子および / またはベクターによる被験体の処置は、単一の処置を含むことができる、あるいは好ましくは、一連の処置を含むことができる。処置に使用される有効投薬量が、特定の処置の経過にわたり増加または減少し得ることも認められるであろう。投薬量の変化は、本明細書に記載されている診断アッセイの結果に起因し得る。医薬組成物は、投与のための説明書と共に、容器、包装またはディスペンサーに含まれていてよい。

【 0096 】

用語「予防的」または「治療的」処置は、被験体への対象組成物のうち 1 種または複数の投与を指す。望まれない状態（例えば、宿主動物の疾患または他の望まれない状態）の臨床的な症状発現に先立ち投与される場合、処置は予防的である、即ち、望まれない状態の発症から宿主を保護する一方、望まれない状態の症状発現の後に投与される場合、処置は治療的である（即ち、現存する望まれない状態またはそれから生じる副作用を縮小、寛解または維持することが意図される）。

【 0097 】

「治療有効量」は、本明細書において、神経変性疾患を処置するために患者に投与される場合、疾患の処置をもたらすのに十分な（例えば、現存する疾患または疾患の 1 種もしくは複数の症状を縮小、寛解または維持することにより）、本発明の核酸分子および / またはベクターの量を含むことが意図される。「治療有効量」は、核酸分子、ペプチドおよび / またはベクター、核酸分子および / またはベクターが投与される方法、疾患およびその重症度、ならびに病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝的構成、神経変性疾患発現によって媒介される病理学的過程のステージ、あるとすれば先行するまたは同時的処置の種類、ならびに処置しようとする患者の他の個々の特徴に応じて変動し得る。

【 0098 】

「予防有効量」は、本明細書において、例えば網膜障害を未だ経験していないまたはその症状を呈していないが、該疾患の素因がある可能性がある被験体に投与される場合、疾患または疾患の 1 種もしくは複数の症状を予防または寛解するのに十分な、核酸分子および / またはベクターの量を含むことが意図される。疾患の寛解は、疾患の経過を遅らせる、または後に発症する疾患の重症度を低下させることを含む。「予防有効量」は、核酸分子および / またはベクター、核酸分子および / またはベクターが投与される方法、疾患リスクの程度、ならびに病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝的構成、あるとすれば先行するまたは同時的処置の種類、ならびに処置しようとする患者の他の個々の特徴に応じて変動し得る。

【 0099 】

「治療有効量」または「予防有効量」は、いずれかの処置に適用できる妥当な利益 / リスク比で、ある所望の局所または全身性効果を生じる核酸分子および / またはベクターの量も含む。本発明の方法において用いられる核酸分子および / またはベクターは、このような処置に適用できる妥当な利益 / リスク比を生じるために十分な量で投与することができる。

【 0100 】

「予防する」または「予防」は、疾患または障害を得るリスクの低下を指す（即ち、疾患に曝露され得るまたはその素因があるが、該疾患を未だ経験していないまたはその症状を呈していない患者において、該疾患の臨床症状のうち少なくとも 1 種を発症させない）。

【 0101 】

10

20

30

40

50

本明細書において、用語「処置する」または「処置」は、検出可能であれ検出不能であれ、1種または複数の症状の緩和または寛解、感染の程度の縮小、感染の安定化された（即ち、悪化していない）状態、感染性状態の寛解または抑止等が挙げられるがこれらに限定されない、有益なまたは所望の結果を指す。「処置」は、処置の非存在下で予想される生存と比較した生存の延長を意味することもできる。

【0102】

本発明のある特定の実施形態において、薬剤、例えば、本発明の単離された核酸分子および／またはベクターは、追加的な治療剤または処置と組み合わせて投与される。組成物および追加的な治療剤は、同じ組成物において組み合わせて投与することができる、あるいは追加的な治療剤は、別々の組成物の一部としてまたは本明細書に記載されている別の方 10 法によって投与することができる。

【0103】

本発明の方法における使用に適した追加的な治療剤の例として、網膜色素変性症および加齢性黄斑変性症等、網膜障害を処置することが公知の薬剤が挙げられ、例えば、脂溶性ビタミン（例えば、ビタミンA、ビタミンEおよびアスコルビン酸）、カルシウムチャネル遮断薬（例えば、ジルチアゼム）、炭酸脱水酵素阻害剤（例えば、アセタゾールアミドおよびメタゾールアミド）、抗血管新生薬（例えば、抗VEGF抗体）、成長因子（例えば、杆体由来錐体生存因子（RD CVF）、BDNF、CNTF、bFGFおよびPDGF）、抗酸化剤、他の遺伝子療法剤（例えば、オプトジェネティクス遺伝子療法、例えば、チャネルロドシン、メラノロドシンおよびハロロドシン）および例えば、ミュラー細胞を光受容体前駆体に再プログラミングすることにより光受容体再生を駆動する化合物（例えば、アルファ-アミノアジペート）が挙げられる。本発明の処置方法と組み合わせた使用のための例示的な処置は、例えば、網膜および／または網膜色素上皮移植、幹細胞療法、網膜プロテーゼ、レーザー光凝固術、光ダイナミック療法、低視力者用補助器具植え込み、黄斑下外科手術ならびに網膜位置変更（retinal translocation）を含む。

【0104】

本発明の方法における使用のための薬剤

刺激性薬剤

本発明の方法は、細胞における抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性を増大させる刺激性薬剤を使用することができる。このような刺激性薬剤の例として、タンパク質、核酸分子、例えば、核酸分子を含む発現ベクター、ならびに細胞における抗酸化防御タンパク質の発現および／または活性を増大させるタンパク質の発現および／または活性を刺激する化学薬剤が挙げられる。

【0105】

好ましい刺激性薬剤は、目的のタンパク質をコードする核酸分子である。例えば、標準分子生物学技法を使用して、cDNA（全長または部分的cDNA配列）を組換え発現ベクターにクローニングし、このベクターを細胞にトランسفエクトする。cDNAは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用した增幅により、または適切なcDNAライブラリーのスクリーニングにより得ることができる。

【0106】

cDNAの単離または増幅後に、DNA断片を適した発現ベクターに導入する。例えば、宿主細胞におけるタンパク質の発現に適した形態の目的のタンパク質をコードする核酸分子は、目的のタンパク質をコードする核酸分子の核酸配列に基づくスクレオチド配列を使用して調製することができる。

【0107】

一実施形態において、刺激性薬剤は、誘導性構築物に存在することができる。別の実施形態において、刺激性薬剤は、構成的発現をもたらす構築物に存在することができる。

【0108】

一実施形態において、本発明の核酸分子は、ベクター、例えば、組換え発現ベクターに

10

20

30

40

50

おいて、細胞、例えば、光受容体細胞にまたは被験体に送達することができる。別の実施形態において、本発明の核酸分子は、ベクターの非存在下で、細胞、例えば、光受容体細胞にまたは被験体に送達することができる。

【0109】

本明細書において、用語「ベクター」は、それに連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの1種類は、追加的なDNAセグメントをそれにライゲーションし得る環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、追加的なDNAセグメントをウイルスゲノムにライゲーションし得る。ある特定のベクターは、それが導入された宿主細胞において自律複製することができる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入後に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、これにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、それに動作可能に連結された遺伝子の発現を導くことができる。このようなベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技法において有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、互換的に使用することができる。しかし、本発明は、等価な機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）等、その他の形態の発現ベクターを含むことが意図される。

【0110】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態の本発明の核酸を含み、これは、組換え発現ベクターが、発現しようとする核酸配列に動作可能に連結された、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択された1種または複数の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内において、「作動可能に連結した」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列（複数可）に連結されている（例えば、*in vitro* 転写 / 翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合は宿主細胞において）ことを意味することが意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。このような調節配列は、例えば、*Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185巻、Academic Press、San Diego、California (1990年) に記載されている。調節配列は、多くの種類の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を導く配列、構成的に活性を有する配列、誘導性の配列、およびある特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を導く配列（例えば、組織特異的調節配列）を含む。当業者であれば、発現ベクターの設計が、形質転換すべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルその他等の因子に依存し得ることを認められよう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入して、これにより、本明細書に記載されている核酸にコードされた、融合タンパク質またはその一部を含むタンパク質またはその一部を產生することができる。

【0111】

一実施形態において、抗酸化防御タンパク質をコードする核酸分子は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターの例として、pCDM8 (Seed, B. (1987年) Nature 329巻: 840頁) およびpMT2PC (Kaufmannら (1987年) EMBO J. 6巻: 187~195頁) が挙げられる。哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、多くの場合、ウイルス調節エレメントによってもたらされる。

【0112】

ある特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、ウイルスベクター内に含有され、細胞、例えば、光受容体細胞にまたは被験体に送達され得る。好ましくは、ウイルスベクターは、遺伝子療法のためのその使用が当技術分野において周知のベクターである。ベク

10

20

30

40

50

ターまたはビリオンの形成のための技法は、「Working Toward Human Gene Therapy」、Recombinant DNAの第28章、第2版、Watson, J. D. ら編、New York: Scientific American Books、567～581頁(1992年)に全般的に記載されている。適したウイルスベクターまたはビリオンの概説は、Wilson, J. M.、Clin. Exp. Immunol. 107巻(追補1号): 31～32頁(1997年)、ならびにNakanishi, M.、Crit. Rev. Therapeu. Drug Carrier Systems 12巻: 263～310頁(1995年); Robbins, P. D. ら、Trends Biotechnol. 16巻: 35～40頁(1998年); Zhang, J. ら、Cancer Metastasis Rev. 15巻: 385～401頁(1996年); およびKramm, C. M. ら、Brain Pathology 5巻: 345～381頁(1995年)に記されている。このようなベクターは、RNA(Ville, R. G. ら、Br. Med Bull. 51巻: 12～30頁(1995年))またはDNA(Ali M. ら、Gene Ther. 1巻: 367～384頁(1994年))を含有するウイルスに由来し得る。

【0113】

遺伝子療法技術分野において利用され、よって、本発明における使用に適したウイルスベクター系の例として、次のものが挙げられる: レトロウイルス(Ville, R. G. ら、上記参照; 米国特許第5,741,486号および同第5,763,242号); アデノウイルス(Brody, S. L. ら、Ann. N.Y. Acad. Sci. 716巻: 90～101頁(1994年); Heise, C. ら、Nat. Med. 3巻: 639～645頁(1997年)); アデノウイルス/レトロウイルスキメラ(Bilbao, G. ら、FASEB J. 11巻: 624～634頁(1997年); Feng, M. ら、Nat. Biotechnol. 15巻: 866～870頁(1997年)); アデノ隨伴ウイルス(Flotte, T. R. およびCarter, B. J.、Gene Ther. 2巻: 357～362頁(1995年); 米国特許第5,756,283号); 単純ヘルペスウイルスIまたはII(Latchman, D. S.、Mol. Biotechnol. 2巻: 179～195頁(1994年); 米国特許第5,763,217号; Chase, M. ら、Nature Biotechnol. 16巻: 444～448頁(1998年)); パルボウイルス(Shaugnessy, E. ら、Semin Oncol. 23巻: 159～171頁(1996年)); 細網内皮症ウイルス(Donburg, R.、Gene Therap. 2巻: 301～310頁(1995年))。本発明の遺伝子療法方法において、染色体外複製ベクターを使用することもできる。このようなベクターは、例えば、参照により本明細書にその内容全体が援用されるCalos, M. P. (1996年) Trends Genet. 12巻: 463～466頁に記載されている。遺伝子送達のためのベクターとして使用することができる他のウイルスは、ポリオウイルス、パピローマウイルス、ワクシニアウイルス、レンチウイルスと共に、2種またはそれを超えるウイルスの有利な側面を取り込むハイブリッドまたはキメラベクターを含む(Nakanishi, M. (1995年) Crit. Rev. Therapeu. Drug Carrier Systems 12巻: 263～310頁; Zhang, J. ら(1996年) Cancer Metastasis Rev. 15巻: 385～401頁; Jacoby, D. R. ら(1997年) Gene Therapy 4巻: 1281～1283頁)。

【0114】

本明細書において、用語「レトロウイルス」は、その複製サイクルにおいて逆転写酵素を利用するRNAウイルスに関連して使用されている。レトロウイルスゲノムRNAは、逆転写酵素によって二本鎖DNAに変換される。この二本鎖DNA型のウイルスは、感染した細胞の染色体に組み込まれることが可能である; 組み込まれると、これは「プロウイ

10

20

30

40

50

ルス」と称される。プロウイルスは、RNAポリメラーゼIIの鑄型として機能し、新たなウイルス粒子の產生に必要とされる構造タンパク質および酵素をコードするRNA分子の発現を導く。プロウイルスの各末端は、「長い末端反復」または「LTR」と呼ばれる構造である。LTRは、転写制御エレメント、ポリアデニル化シグナルならびにウイルスゲノムの複製および組み込みに必要とされる配列を含む、多数の調節シグナルを含有する。LTRは、数百塩基対の長さとなり得る。

【0115】

用語「AAVベクター」は、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5またはAAVX7を限定することなく含む、アデノ隨伴ウイルス血清型に由来するベクターを指す。「rAAVベクター」は、AAVヌクレオチド配列と共に異種ヌクレオチド配列を含むベクターを指す。rAAVベクターは、ウイルスの生成に、シスで145塩基末端反復のみを必要とする。他のあらゆるウイルス配列は不必要であり、トランスで供給され得る(Muzyczka(1992年)Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158巻:97頁)。典型的には、rAAVベクターゲノムは、ベクターによって効率的にパッケージングされ得る導入遺伝子のサイズを最大化するために、逆方向末端反復(ITR)配列のみを保持する。ITRは、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的レスキュー、複製およびパッケージングをもたらす限りにおいて、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換により変更されていてよい。特定の実施形態において、AAVベクターは、AAV2/5またはAAV2/8ベクターである。適したAAVベクターは、例えば、参照により本明細書にその内容全体が援用される米国特許第7,056,502号およびYanら(2002年)J. Virology 76巻(5号):2043~2053頁に記載されている。

【0116】

本明細書において、用語「レンチウイルス」は、ゆっくり発症する疾患を生じるレトロウイルスの群(または属)を指す。この群内に含まれるウイルスは、HIV(ヒト免疫不全ウイルス; HIV1型およびHIV2型等が挙げられるがこれらに限定されない)、ヒト後天性免疫不全症候群(AIDS)の病原因子; ヒツジにおける脳炎(ビスナ)または肺炎(マエディ)の原因となるビスナ-マエディ; ヤギにおける免疫不全、関節炎および脳症の原因となるヤギ関節炎-脳炎ウイルス; ウマにおける自己免疫性溶血性貧血および脳症の原因となるウマ感染性貧血ウイルス(EIAV); ネコにおける免疫不全の原因となるネコ免疫不全ウイルス(FIV); ウシ類におけるリンパ節症、リンパ球増加症およびおそらく中枢神経系感染症の原因となるウシ免疫不全ウイルス(BIV); ならびに類人霊長類における免疫不全および脳症の原因となるサル免疫不全ウイルス(SIV)を含む。これらのウイルスによって引き起こされる疾患は、長いインキュベーション期間および長引く経過によって特徴付けられる。通常、このウイルスは、単球およびマクロファージに潜在的に感染して、そこから他の細胞へと拡散する。HIV、FIVおよびSIVは、Tリンパ球(即ち、T細胞)にも容易に感染する。本発明の一実施形態において、レンチウイルスは、HIVではない。

【0117】

本明細書において、用語「アデノウイルス」(「Ad」)は、約36kbの直鎖状ゲノムを有する二本鎖DNAウイルスの群を指す。例えば、Berknerら、Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158巻:39~61頁(1992年)を参照されたい。一部の実施形態において、アデノウイルスに基づくベクターは、Ad-2またはAd-5に基づくベクターである。例えば、Muzyczka、Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158巻:97~123頁、1992年; Aliら、1994年、Gene Therapy 1巻:367~384頁; 米国特許第4,797,368号および同第5,399,346号を参照されたい。アデノウイルス株Ad5型d1324または他の株のアデノウイルス(例えば、Ad2、Ad3、Ad7等)に由来する適したアデノウイルスベクターは、当業者に周知である。組換えアデノウイルスは、有効な遺伝子送達ビヒクルとなるために分裂する細胞を必要と

10

20

30

40

50

しないという点において有利であり、多種多様な細胞型の感染に使用することができる。その上、導入されたアデノウイルスDNA（およびその中に含有される外来DNA）は、宿主細胞のゲノムに組み込まれず、エピソームのままであり、これにより、導入されたDNAが宿主ゲノムに組み込まれるようになる状況（例えば、レトロウイルスDNA）における挿入変異誘発の結果生じ得る潜在的な問題を回避する。さらに、外来DNAのためのアデノウイルスゲノムの運搬容量は、他の遺伝子送達ベクターと比べて大きい（最大8キロベース）（Haj-Ahmandら、J. Virology 57巻、267～273頁[1986年]）。

【0118】

一実施形態において、アデノウイルスは、複製欠損アデノウイルスである。現在使用されている大部分の複製欠損アデノウイルスベクターは、ウイルスE1およびE3遺伝子の全体または部分が欠失されているが、アデノウイルス遺伝物質の80%も保持する。全ウイルスコード領域を欠失したアデノウイルスベクターもKochanekらおよびChamberlainら（米国特許第5,985,846号および米国特許第6,083,750号）によって記載されている。このようなウイルスは、「ヘルパー」ウイルスと称される第2のウイルスによってもたらされるウイルス産物の非存在下では、ウイルスとして複製することができない。

【0119】

一実施形態において、アデノウイルスベクターは、「ガットレス(gutless)」ベクターである。このようなベクターは、最小量のアデノウイルスDNAを含有し、いかなるアデノウイルス抗原も発現することができない（そのため、用語「ガットレス」）。ガットレス複製欠損Adベクターは、ガットレス複製欠損Adベクターが遺伝子療法において使用される際に、ウイルスタンパク質に対し免疫学的応答を生じるアデノウイルス遺伝子を発現する問題を完全に排除しつつ、外来DNAの大型インサートを収容する顕著な利点をもたらす。ガットレス複製欠損Adベクターを产生するための方法は、例えば、Kochanekらに対する米国特許第5,981,225号、ならびにChamberlainらに対する米国特許第6,063,622号および同第6,451,596号；Parksl、PNAS 93巻：13565頁（1996年）およびLieberら、J. Virology 70巻：8944～8960頁（1996年）に記載されている。

【0120】

別の実施形態において、アデノウイルスベクターは、「条件的に複製型のアデノウイルス」（「CRAd」）である。CRAdは、（i）ウイルスプロモーターを組織特異的プロモーターに置き換えること、または（ii）標的細胞によってのみ補償される複製に重要なウイルス遺伝子の欠失のいずれかにより、特異的な細胞において優先的に複製するように遺伝子改変されている。当業者であれば、上皮細胞特異的プロモーターを同定することができよう。

【0121】

他の技術分野で公知のアデノウイルスベクターを本発明の方法において使用することができる。例として、修飾された指向性のための組換え線維タンパク質を有するAdベクター（例えば、van Beusechemら、2000年、Gene Ther. 7巻：1940～1946頁に記載）、プロテアーゼ前処理ウイルスベクター（例えば、Kuriyamaら、2000年、Hum. Gene Ther. 11巻：2219～2230頁に記載）、E2a温度感受性変異体Adベクター（例えば、Engelhardtら、1994年、Hum. Gene Ther. 5巻：1217～1229頁に記載）および「ガットレス」Adベクター（例えば、Armentanoら、1997年、J. Virology 71巻：2408～2416頁；Chenら、1997年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94巻：1645～1650頁；Schielerら、1998年、Nature Genetics 18巻：180～183頁に記載）が挙げられる。

【0122】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、本発明の方法における使用のためのウイルスベクターは、A A V ベクターである。特定の実施形態において、ウイルスベクターは、A A V 2 / 5 または A A V 2 / 8 ベクターである。このようなベクターは、例えば、参照により本明細書にその内容全体が援用される米国特許第 7 , 0 5 6 , 5 0 2 号に記載されている。別の実施形態において、本発明における使用に適したアデノウイルスベクターは、V 7 0 8 I 変異を有する A A V 2 バリアント等、硝子体内投与の際に全網膜細胞型に形質導入することができるアデノウイルスベクターを含むことができる。追加的な適したアデノウイルスベクターは、投与の際にウイルスカプシドに対し液性免疫応答を生じないアデノウイルスベクター（例えば、D a l k a r a ら、2 0 1 3 年、S c i T r a n s l M e d . 5 卷、1 8 9 r a 7 6 を参照）および例えば、A A V カプシドタンパク質におけるチロシン残基のリン酸化を防止する変異を有するベクター等、ベクターのユビキチン化およびプロテアソーム媒介性分解の低下により A A V ベクターの核輸送を容易にするアデノウイルスベクター（例えば、P a n g ら、2 0 1 0 年、T h e A m e r i c a n S o c i e t y o f G e n e & C e l l T h e r a p y . 、1 9 卷、2 号：2 3 4 ~ 2 4 2 頁に記載）である。
10

【 0 1 2 3 】

ベクターは、1種または複数のプロモーターまたはエンハンサーを含み、その選択は、当業者に公知であろう。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス 2 、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス 4 0 に由来する。適したプロモーターとして、レトロウイルスの長い末端反復（ L T R ）、S V 4 0 プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス（ C M V ）プロモーターならびに当業者に公知の他のウイルスおよび真核細胞プロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。原核および真核細胞の両方のための他の適した発現系に関して、S a m b r o o k , J . 、F r i t s h , E . F . およびM a n i a t i s , T . 、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l . 、第2版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y 、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s 、C o l d S p r i n g H a r b o r 、N . Y . 、1 9 8 9 年の第16および17章を参照されたい。
20

【 0 1 2 4 】

別の実施形態において、ウイルスベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を導くことができる（例えば、組織特異的調節エレメントが、核酸の発現に使用される）。組織特異的調節エレメントは、当技術分野において公知である。一実施形態において、本発明のベクターおよび方法における使用のための組織特異的プロモーターは、網膜細胞特異的プロモーターである。一実施形態において、網膜細胞特異的プロモーターは、杆体、錐体および双極細胞特異的プロモーターである。一実施形態において、網膜細胞特異的プロモーターは、杆体および錐体特異的プロモーターである。一実施形態において、網膜細胞特異的プロモーターは、杆体特異的プロモーターである。一実施形態において、網膜細胞特異的プロモーターは、錐体特異的プロモーターである。
30

【 0 1 2 5 】

適した網膜細胞特異的プロモーターは、当技術分野において公知であり、例えば、ロドプシン調節配列、N r l 1 、C r x 、R a x その他（M a t s u d a およびC e p k o (2 0 0 7 年) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 1 0 4 卷：1 0 2 7 頁）、オプシンプロモーター、例えば、錐体オプシン、光受容体間レチノイド結合タンパク質プロモーター（I R B P 1 5 6 ）、ロドプシンキナーゼ（R K ）プロモーター、神経ロイシンジッパー（N R L L ）プロモーター（例えば、S e m p l e - R o w l a n d ら（2 0 1 0 年 ）M o l e c V i s i o n 1 6 卷：9 1 6 頁を参照）またはこれらの組合せを含む。追加的な適したプロモーターは、錐体アレスチン、C a b p 5 、C r a l b p 、N d r g 4 、クラスタリン、H e s 1 、ビメンチンプロモーター、表面抗原分類（C D 4 4 ）プロモーターおよびグリア線維酸性タンパク質（G F A P ）プロモーターを含むことができる。
40
50

【0126】

遺伝子療法ベクターの構築および治療目的による罹患した動物へのその導入におけるガイダンスは、先述の刊行物と共に、参照により本明細書にその内容全体が援用される米国特許第5,631,236号、同第5,688,773号、同第5,691,177号、同第5,670,488号、同第5,529,774号、同第5,601,818号およびPCT公開第WO95/06486号において得ることができる。

【0127】

一般に、目的の細胞のトランスフェクションおよび形質転換のための方法は、当技術分野において公知である。例えば、ウイルスは、目的のニューロン細胞と接触させて置くことができる、あるいは、神経変性障害を患う被験体に注射することができる。

10

【0128】

本明細書において、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、外来核酸（例えば、DNA）を宿主細胞に導入するための種々の当技術分野において認められている技法を指すことが意図され、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション（例えば、LIPOFECTION（登録商標）（Invitrogen Corp.、San Diego、CA）、LIPOFFECTAMINE（登録商標）（Invitrogen）、FUGENE（登録商標）（Roche Applied Science、Basel、Switzerland）、JETPEI（商標）（Polyplus-transfection Inc.、New York、NY）、EFFEKTENE（登録商標）（Qiagen、Valencia、CA）、DREAMFECT（商標）（OZ Biosciences、France）その他等、例えば、市販の試薬を使用）またはエレクトロポレーション（例えば、in vivoエレクトロポレーション）を含む。宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションに適した方法は、Sambrookら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual.、第2版、Cold Spring harbor Laboratory、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989年）および他の研究室マニュアルに見出すことができる。

20

【0129】

上述の通り、本発明の核酸分子を、ベクターに挿入し、遺伝子療法ベクターとして使用することができる。遺伝子療法ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（例えば、米国特許第5,328,470号を参照）、定位的注射（例えば、Chenら（1994年）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、91巻：3054頁を参照）またはin vivoエレクトロポレーション（例えば、MatsudaおよびCepko（2007年）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、104巻：1027頁を参照）によって被験体に送達することができる。本明細書に記載されている核酸および/または遺伝子療法ベクターの局所投与は、当技術分野におけるいずれか適した方法によって為すことができ、例えば、注射（例えば、硝子体内または網膜下または硝子体下注射）、遺伝子銃、ゲル、油もしくはクリームにおける核酸の局所適用、エレクトロポレーション、脂質に基づくトランスフェクション試薬の使用、経強膜送達、強膜プラグもしくは薬物送達デバイスの植え込みまたは他のいずれかの適したトランスフェクション方法を含む。

30

【0130】

一実施形態において、パッケージング細胞株は、所望の核酸分子を運搬するレトロウイルスベクターにより形質導入されて、產生細胞株を形成する。パッケージング細胞は、例えば、エレクトロポレーション、CaPO₄沈殿またはリポソームの使用を含む、当技術分野において公知のいずれかの手段によって形質導入することができる。トランスフェクトすることができるパッケージング細胞の例として、BOSC23、Bing、PE501、PA317、.PSI.-2、.PSI.-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、.PSI.-CRE、.PSI.-CRIP、GP+E86、GP

40

50

+envAm12およびDAN細胞株が挙げられるがこれらに限定されない。レトロウイルス産生パッケージング細胞およびこれを構築する方法に関するガイダンスは、参照により本明細書にその内容全体が援用されるShortら、J. Neurosci. Res. 27巻：427～433頁(1990年)；Miller, A. D., Human Gene Ther. 1巻：5～14頁(1990年)；Danos, O「Construction of Retroviral Packaging Cell Lines」、Methods in Molecular Biology(M. Collins編)、8巻、The Humana Press Inc.、Clifton、N.J.、17～26頁(1991年)；Murdoch, B.ら、Gene Therapy 4巻：744～749頁(1997年)；ならびに米国特許第5,529,774号および同第5,591,624号に見出すことができる。10

【0131】

レトロウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)エンベロープ糖タンパク質Gによりパッケージングされていてもよい(「シードタイピング」)。このようなベクターは、より安定的であり、 10^9 cfu/mlに濃縮することができ、その直接的注射を可能にする(Burns, J. C.ら(1993年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻：8033～8037頁)。

【0132】

次に、產生細胞を所望の位置にまたはその付近に、例えば、眼内にグラフトすることができる。高力価レトロウイルス產生細胞の直接的注射(Murdoch, B.ら、Gene Ther. 4巻：744～749頁(1997年)；Onodera, M.ら、Hum Gene Ther. 8巻：1189～1194頁(1997年))は、レトロウイルス配列を用いた効率的in situ感染を可能にする(Rainov, N. G.ら、Cancer Gene Ther. 3巻：99～106頁(1996年)；Ram, Z.ら、Cancer Res. 53巻：83～88頁(1993年))。眼内に注射された產生細胞は、一般に、注射部位から遊走しない。さらに、これが宿主によって拒絶される場合もあるが、拒絶は5～10日間は起こらず、その期間までに、付近の細胞のレトロウイルス感染が行われている(Ram, Z.ら、J. Neurosurg. 79巻：400～407頁(1993年))。一般に、ベクター產生細胞(VPC)投薬量は、約 2.5×10^8 、約 1×10^8 、約 1.5×10^8 、約 2×10^8 、約 2.5×10^8 、約 3×10^8 、約 3.5×10^8 、約 4×10^8 、約 4.5×10^8 、約 5×10^8 、約 5.5×10^8 、約 6×10^8 、約 6.5×10^8 、約 7×10^8 、約 7.5×10^8 、約 8×10^8 、約 8.5×10^8 、約 9×10^8 、約 9.5×10^8 および約 1×10^9 VPCに及ぶ。產生細胞の正確な量は、利用できる注射可能容量、患者の臨床状態および障害の重症度等が挙げられるがこれらに限定されない多数の因子に基づき、当業者によって最終的に決定されるであろう。2030

【0133】

產生細胞の正確な量は、利用できる注射可能容量、患者の臨床状態および障害の重症度等が挙げられるがこれらに限定されない多数の因子に基づき、当業者によって最終的に決定されるであろう。40

【0134】

好ましくは、本発明において使用されるウイルスベクターのウイルスゲノムは、複製するその能力を除去または限定するように修飾されるべきであるが、ある特定の細胞を標的化することができる複製ベクターのように、複製条件的ウイルスも本発明において有用となる(例えば、Zhang, J.ら(1996年)Cancer Metastasis Rev. 15巻：385～401頁を参照)。

【0135】

核酸分子は、遺伝子移入のための非ウイルス方法、好ましくは、遺伝子療法におけるその使用が当技術分野において公知の方法を使用して送達することもできる(Nakanishi, M.、Crit. Rev. Therapeu. Drug Carri50e

r Systems 12巻：263～310頁(1995年)；Abdallah, B.ら、Biol Cell 85巻：1～7頁(1995年)；Zhang, J.ら、Cancer Metastasis Rev. 15巻：385～401頁(1996年)；Philips, S. C.、Biologicals 23巻：13～16頁(1995年)；Lee, R. J. および Huang, L.、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14巻：173～206頁(1997年))。遺伝子送達のためのこのような非ウイルスベクターの例として、原核生物ベクター、カチオン性リポソーム、DNA-タンパク質複合体、非ウイルスT7自己遺伝子ベクター(Chen, X. ら、Hum. Gene Ther. 9巻：729～736頁(1998年))、融合性リポソーム、核酸(「ネイキッドDNA」)の直接的注射、粒子または受容体媒介性遺伝子移入、DNA-アデノウイルスコンジュゲートまたは非ウイルスおよびウイルス構成成分に関する他の分子コンジュゲート等のハイブリッドベクター、スターバーストポリアミドアミンデンドリマー(Kukowska-Latallo, J. F. ら、Proc Natl Acad Sci USA 93巻：4897～4902頁(1996年))；Tang, M. X. ら、Bioconjug. Chem. 7巻：703～714頁(1996年))、カチオン性ペプチド(Wyman, T. B. ら、Biochemistry 36巻：3008～3017頁(1997年))ならびに哺乳動物人工染色体(Ascenzioni, F. ら、Cancer Lett. 118巻：135～142頁(1997年))が挙げられる。

【0136】

10

アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスその他等が挙げられるがこれらに限定されない、核酸送達に使用可能いかなる適したウイルスを使用してもよい。例えば、LIAレトロウイルスを使用して、核酸を送達することができる(Cepkoら(1998年)Curr. Top. Dev. Biol. 36巻：51頁；DyerおよびCepko(2001年)J. Neurosci. 21巻：4259頁)。

【0137】

20

一実施形態において、単一のウイルスベクターを使用して、複数の核酸分子を運搬する。別の実施形態において、それぞれ1種または複数の目的の遺伝子を運搬する2種のウイルスベクターが使用される。2種のウイルスベクターが使用される場合、両者は、同じまたは異なる種類のウイルスに由来することができ、同時にまたは逐次的に(即ち、特異的な順序を考慮せず)投与することができる。

30

【0138】

遺伝子送達は、内部リボソーム進入部位(IRES)配列を含むことにより増強させて、バイシストロニックメッセージにおける複数の遺伝子の協調的発現を達成することができる。IRESは、ポリオおよび脳心筋炎ウイルス(EMCV)を含むピコルナウイルスの5'非形質導入領域に典型的な500～600bpを含有する配列である。例えば、Ghattas, I. R. ら、Molecular and Cellular Biology 11巻：5848～5859頁(1991年)；Morgan, R. A. ら、Nucleic Acids Research 20巻：1293～1299頁(1992年)を参照されたい。このアプローチは、インターロイキン-12の2種のサブユニットの効率的レトロウイルス同時発現のために使用されてきた(Tahara, H. ら、J. Immunol. 154巻：6466～6474頁(1995年))。同様に、ウイルス配列、ピコルナウイルス2A配列を使用して、2種以上のタンパク質をコードするmRNAを作製することができる。ウイルス2Aペプチドは、16～20アミノ酸であり、2種の目的のタンパク質の間に位置する切断ペプチドとして用いることができ、その2種の別々のタンパク質への切断を促進する(Furlerら、Gene Ther. 8巻：864～873頁(2001年))。別の代替物は、別個のプロモーターの制御下で複数の遺伝子を含有するベクターのためのものである。

40

【0139】

一般に、目的の細胞のウイルス感染のための方法は、当技術分野において公知である。

50

ウイルスは、目的のニューロン細胞と接触させて置くことができる、あるいは光受容体細胞酸化ストレスに関連する障害を患う被験体に注射することができる。

【0140】

本発明の一態様において、治療用核酸分子またはこれを含有するベクターは、薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物の形態となる。本明細書において、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性のありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張性および吸収遅延剤その他を含む。一実施形態において、担体は、眼内、非経口的、静脈内、腹腔内、局所的または筋肉内投与に適している。別の実施形態において、担体は、経口投与に適している。薬学的に許容される担体は、無菌水溶液または分散物および無菌注射用溶液または分散物の即時調製のための無菌粉末を含む。薬学的活性物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において周知である。いずれか従来の媒体または薬剤が、遺伝子療法ベクターと不適合性である場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるその使用が企図される。補足的活性化合物を組成物に取り込むこともできる。10

【0141】

特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、注射用組成物の形態で投与される。ベクターは、液体の溶液または懸濁液のいずれかとして、注射剤として調製することができる。調製物は、乳化されていてもよい。適した賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールその他およびこれらの組合せである。加えて、必要に応じて、調製物は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、アジュバントまたは免疫賦活薬等、少量の補助的物質を含有することができる。20

【0142】

特定の実施形態において、核酸分子および／またはベクターは、眼内投与に適した組成物に取り込まれる。例えば、組成物は、例えば、注射による、硝子体内、結膜下、テノン下、眼周囲、眼球後、脈絡膜上および／または強膜内投与のために設計して、網膜障害を有効に処置することができる。その上、縫合されたまたは詰め替え可能なドームを投与部位の上に置いて、好まれない方向における活性薬剤の「洗浄除去」、浸出および／または拡散を予防または低下させることができる。

【0143】

本明細書に記載されている比較的高い粘性の組成物を使用して、例えば、後眼部への注射により、核酸分子および／またはベクターの有効な、好ましくは、実質的に持続性の送達をもたらすことができる。粘性誘導薬剤は、望ましい懸濁液形態における核酸分子および／またはベクターの維持に役立ち、これにより、眼の底部表面における組成物の堆積を防止することができる。このような組成物は、これにより参照により本明細書にその内容全体が援用される米国特許第5,292,724号に記載されている通りに調製することができる。30

【0144】

一般に、核酸分子は、所望の効果、例えば、抗酸化防御タンパク質（例えば、カタラーゼ、SOD2、PGC1 および／またはnrf2）の発現および／または活性の増大を誘発するための治療有効量で提供される。処置の回数および量の両方に従って投与るべきベクターの量は、処置しようとする被験体の臨床状態、年齢および体重ならびに障害の重症度等の因子にも依存する。投与に必要とされる活性成分の正確な量は、遺伝子療法専門家の判断に依存し、個々の患者それぞれに特定のものとなる。一般に、ウイルスベクターは、 1mL 当たり約 1×10^5 、約 1.5×10^5 、約 2×10^5 、約 2.5×10^5 、約 3×10^5 、約 3.5×10^5 、約 4×10^5 、約 4.5×10^5 、約 5×10^5 、約 5.5×10^5 、約 6×10^5 、約 6.5×10^5 、約 7×10^5 、約 7.5×10^5 、約 8×10^5 、約 8.5×10^5 、約 9×10^5 、約 9.5×10^5 、約 1×10^6 、約 1.5×10^6 、約 2×10^6 、約 2.5×10^6 、約 3×10^6 、約 3.5×10^6 、約 4×10^6 、約 4.5×10^6 、約 5×10^6 、約 5.5×10^6 、約 6×10^6 、約 6.5×10^6 、約 7×10^6 、約 7.5×10^6 、約 8×10^6 、約 8.5×10^6 、約 9×10^6 、約 1×10^7 、約 1.5×10^7 、約 2×10^7 、約 2.5×10^7 、約 3×10^7 、約 3.5×10^7 、約 4×10^7 、約 4.5×10^7 、約 5×10^7 、約 5.5×10^7 、約 6×10^7 、約 6.5×10^7 、約 7×10^7 、約 7.5×10^7 、約 8×10^7 、約 8.5×10^7 、約 9×10^7 、約 1×10^8 、約 1.5×10^8 、約 2×10^8 、約 2.5×10^8 、約 3×10^8 、約 3.5×10^8 、約 4×10^8 、約 4.5×10^8 、約 5×10^8 、約 5.5×10^8 、約 6×10^8 、約 6.5×10^8 、約 7×10^8 、約 7.5×10^8 、約 8×10^8 、約 8.5×10^8 、約 9×10^8 、約 1×10^9 、約 1.5×10^9 、約 2×10^9 、約 2.5×10^9 、約 3×10^9 、約 3.5×10^9 、約 4×10^9 、約 4.5×10^9 、約 5×10^9 、約 5.5×10^9 、約 6×10^9 、約 6.5×10^9 、約 7×10^9 、約 7.5×10^9 、約 8×10^9 、約 8.5×10^9 、約 9×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1.5×10^{10} 、約 2×10^{10} 、約 2.5×10^{10} 、約 3×10^{10} 、約 3.5×10^{10} 、約 4×10^{10} 、約 4.5×10^{10} 、約 5×10^{10} 、約 5.5×10^{10} 、約 6×10^{10} 、約 6.5×10^{10} 、約 7×10^{10} 、約 7.5×10^{10} 、約 8×10^{10} 、約 8.5×10^{10} 、約 9×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1.5×10^{11} 、約 2×10^{11} 、約 2.5×10^{11} 、約 3×10^{11} 、約 3.5×10^{11} 、約 4×10^{11} 、約 4.5×10^{11} 、約 5×10^{11} 、約 5.5×10^{11} 、約 6×10^{11} 、約 6.5×10^{11} 、約 7×10^{11} 、約 7.5×10^{11} 、約 8×10^{11} 、約 8.5×10^{11} 、約 9×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1.5×10^{12} 、約 2×10^{12} 、約 2.5×10^{12} 、約 3×10^{12} 、約 3.5×10^{12} 、約 4×10^{12} 、約 4.5×10^{12} 、約 5×10^{12} 、約 5.5×10^{12} 、約 6×10^{12} 、約 6.5×10^{12} 、約 7×10^{12} 、約 7.5×10^{12} 、約 8×10^{12} 、約 8.5×10^{12} 、約 9×10^{12} 、約 1×10^{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 5.5×10^{13} 、約 6×10^{13} 、約 6.5×10^{13} 、約 7×10^{13} 、約 7.5×10^{13} 、約 8×10^{13} 、約 8.5×10^{13} 、約 9×10^{13} 、約 1×10^{14} 、約 1.5×10^{14} 、約 2×10^{14} 、約 2.5×10^{14} 、約 3×10^{14} 、約 3.5×10^{14} 、約 4×10^{14} 、約 4.5×10^{14} 、約 5×10^{14} 、約 5.5×10^{14} 、約 6×10^{14} 、約 6.5×10^{14} 、約 7×10^{14} 、約 7.5×10^{14} 、約 8×10^{14} 、約 8.5×10^{14} 、約 9×10^{14} 、約 1×10^{15} 、約 1.5×10^{15} 、約 2×10^{15} 、約 2.5×10^{15} 、約 3×10^{15} 、約 3.5×10^{15} 、約 4×10^{15} 、約 4.5×10^{15} 、約 5×10^{15} 、約 5.5×10^{15} 、約 6×10^{15} 、約 6.5×10^{15} 、約 7×10^{15} 、約 7.5×10^{15} 、約 8×10^{15} 、約 8.5×10^{15} 、約 9×10^{15} 、約 1×10^{16} 、約 1.5×10^{16} 、約 2×10^{16} 、約 2.5×10^{16} 、約 3×10^{16} 、約 3.5×10^{16} 、約 4×10^{16} 、約 4.5×10^{16} 、約 5×10^{16} 、約 5.5×10^{16} 、約 6×10^{16} 、約 6.5×10^{16} 、約 7×10^{16} 、約 7.5×10^{16} 、約 8×10^{16} 、約 8.5×10^{16} 、約 9×10^{16} 、約 1×10^{17} 、約 1.5×10^{17} 、約 2×10^{17} 、約 2.5×10^{17} 、約 3×10^{17} 、約 3.5×10^{17} 、約 4×10^{17} 、約 4.5×10^{17} 、約 5×10^{17} 、約 5.5×10^{17} 、約 6×10^{17} 、約 6.5×10^{17} 、約 7×10^{17} 、約 7.5×10^{17} 、約 8×10^{17} 、約 8.5×10^{17} 、約 9×10^{17} 、約 1×10^{18} 、約 1.5×10^{18} 、約 2×10^{18} 、約 2.5×10^{18} 、約 3×10^{18} 、約 3.5×10^{18} 、約 4×10^{18} 、約 4.5×10^{18} 、約 5×10^{18} 、約 5.5×10^{18} 、約 6×10^{18} 、約 6.5×10^{18} 、約 7×10^{18} 、約 7.5×10^{18} 、約 8×10^{18} 、約 8.5×10^{18} 、約 9×10^{18} 、約 1×10^{19} 、約 1.5×10^{19} 、約 2×10^{19} 、約 2.5×10^{19} 、約 3×10^{19} 、約 3.5×10^{19} 、約 4×10^{19} 、約 4.5×10^{19} 、約 5×10^{19} 、約 5.5×10^{19} 、約 6×10^{19} 、約 6.5×10^{19} 、約 7×10^{19} 、約 7.5×10^{19} 、約 8×10^{19} 、約 8.5×10^{19} 、約 9×10^{19} 、約 1×10^{20} 、約 1.5×10^{20} 、約 2×10^{20} 、約 2.5×10^{20} 、約 3×10^{20} 、約 3.5×10^{20} 、約 4×10^{20} 、約 4.5×10^{20} 、約 5×10^{20} 、約 5.5×10^{20} 、約 6×10^{20} 、約 6.5×10^{20} 、約 7×10^{20} 、約 7.5×10^{20} 、約 8×10^{20} 、約 8.5×10^{20} 、約 9×10^{20} 、約 1×10^{21} 、約 1.5×10^{21} 、約 2×10^{21} 、約 2.5×10^{21} 、約 3×10^{21} 、約 3.5×10^{21} 、約 4×10^{21} 、約 4.5×10^{21} 、約 5×10^{21} 、約 5.5×10^{21} 、約 6×10^{21} 、約 6.5×10^{21} 、約 7×10^{21} 、約 7.5×10^{21} 、約 8×10^{21} 、約 8.5×10^{21} 、約 9×10^{21} 、約 1×10^{22} 、約 1.5×10^{22} 、約 2×10^{22} 、約 2.5×10^{22} 、約 3×10^{22} 、約 3.5×10^{22} 、約 4×10^{22} 、約 4.5×10^{22} 、約 5×10^{22} 、約 5.5×10^{22} 、約 6×10^{22} 、約 6.5×10^{22} 、約 7×10^{22} 、約 7.5×10^{22} 、約 8×10^{22} 、約 8.5×10^{22} 、約 9×10^{22} 、約 1×10^{23} 、約 1.5×10^{23} 、約 2×10^{23} 、約 2.5×10^{23} 、約 3×10^{23} 、約 3.5×10^{23} 、約 4×10^{23} 、約 4.5×10^{23} 、約 5×10^{23} 、約 5.5×10^{23} 、約 6×10^{23} 、約 6.5×10^{23} 、約 7×10^{23} 、約 7.5×10^{23} 、約 8×10^{23} 、約 8.5×10^{23} 、約 9×10^{23} 、約 1×10^{24} 、約 1.5×10^{24} 、約 2×10^{24} 、約 2.5×10^{24} 、約 3×10^{24} 、約 3.5×10^{24} 、約 4×10^{24} 、約 4.5×10^{24} 、約 5×10^{24} 、約 5.5×10^{24} 、約 6×10^{24} 、約 6.5×10^{24} 、約 7×10^{24} 、約 7.5×10^{24} 、約 8×10^{24} 、約 8.5×10^{24} 、約 9×10^{24} 、約 1×10^{25} 、約 1.5×10^{25} 、約 2×10^{25} 、約 2.5×10^{25} 、約 3×10^{25} 、約 3.5×10^{25} 、約 4×10^{25} 、約 4.5×10^{25} 、約 5×10^{25} 、約 5.5×10^{25} 、約 6×10^{25} 、約 6.5×10^{25} 、約 7×10^{25} 、約 7.5×10^{25} 、約 8×10^{25} 、約 8.5×10^{25} 、約 9×10^{25} 、約 1×10^{26} 、約 1.5×10^{26} 、約 2×10^{26} 、約 2.5×10^{26} 、約 3×10^{26} 、約 3.5×10^{26} 、約 4×10^{26} 、約 4.5×10^{26} 、約 5×10^{26} 、約 5.5×10^{26} 、約 6×10^{26} 、約 6.5×10^{26} 、約 7×10^{26} 、約 7.5×10^{26} 、約 8×10^{26} 、約 8.5×10^{26} 、約 9×10^{26} 、約 1×10^{27} 、約 1.5×10^{27} 、約 2×10^{27} 、約 2.5×10^{27} 、約 3×10^{27} 、約 3.5×10^{27} 、約 4×10^{27} 、約 4.5×10^{27} 、約 5×10^{27} 、約 5.5×10^{27} 、約 6×10^{27} 、約 6.5×10^{27} 、約 7×10^{27} 、約 7.5×10^{27} 、約 8×10^{27} 、約 8.5×10^{27} 、約 9×10^{27} 、約 1×10^{28} 、約 1.5×10^{28} 、約 2×10^{28} 、約 2.5×10^{28} 、約 3×10^{28} 、約 3.5×10^{28} 、約 4×10^{28} 、約 4.5×10^{28} 、約 5×10^{28} 、約 5.5×10^{28} 、約 6×10^{28} 、約 6.5×10^{28} 、約 7×10^{28} 、約 7.5×10^{28} 、約 8×10^{28} 、約 8.5×10^{28} 、約 9×10^{28} 、約 1×10^{29} 、約 1.5×10^{29} 、約 2×10^{29} 、約 2.5×10^{29} 、約 3×10^{29} 、約 3.5×10^{29} 、約 4×10^{29} 、約 4.5×10^{29} 、約 5×10^{29} 、約 5.5×10^{29} 、約 6×10^{29} 、約 6.5×10^{29} 、約 7×10^{29} 、約 7.5×10^{29} 、約 8×10^{29} 、約 8.5×10^{29} 、約 9×10^{29} 、約 1×10^{30} 、約 1.5×10^{30} 、約 2×10^{30} 、約 2.5×10^{30} 、約 3×10^{30} 、約 3.5×10^{30} 、約 4×10^{30} 、約 4.5×10^{30} 、約 5×10^{30} 、約 5.5×10^{30} 、約 6×10^{30} 、約 6.5×10^{30} 、約 7×10^{30} 、約 7.5×10^{30} 、約 8×10^{30} 、約 8.5×10^{30} 、約 9×10^{30} 、約 1×10^{31} 、約 1.5×10^{31} 、約 2×10^{31} 、約 2.5×10^{31} 、約 3×10^{31} 、約 3.5×10^{31} 、約 4×10^{31} 、約 4.5×10^{31} 、約 5×10^{31} 、約 5.5×10^{31} 、約 6×10^{31} 、約 6.5×10^{31} 、約 7×10^{31} 、約 7.5×10^{31} 、約 8×10^{31} 、約 8.5×10^{31} 、約 9×10^{31} 、約 1×10^{32} 、約 1.5×10^{32} 、約 2×10^{32} 、約 2.5×10^{32} 、約 3×10^{32} 、約 3.5×10^{32} 、約 4×10^{32} 、約 4.5×10^{32} 、約 5×10^{32} 、約 5.5×10^{32} 、約 6×10^{32} 、約 6.5×10^{32} 、約 7×10^{32} 、約 7.5×10^{32} 、約 8×10^{32} 、約 8.5×10^{32} 、約 9×10^{32} 、約 1×10^{33} 、約 1.5×10^{33} 、約 2×10^{33} 、約 2.5×10^{33} 、約 3×10^{33} 、約 3.5×10^{33} 、約 4×10^{33} 、約 4.5×10^{33} 、約 5×10^{33} 、約 5.5×10^{33} 、約 6×10^{33} 、約 6.5×10^{33} 、約 7×10^{33} 、約 7.5×10^{33} 、約 8×10^{33} 、約 8.5×10^{33} 、約 9×10^{33} 、約 1×10^{34} 、約 1.5×10^{34} 、約 2×10^{34} 、約 2.5×10^{34} 、約 3×10^{34} 、約 3.5×10^{34} 、約 4×10^{34} 、約 4.5×10^{34} 、約 5×10^{34} 、約 5.5×10^{34} 、約 6×10^{34} 、約 6.5×10^{34} 、約 7×10^{34} 、約 7.5×10^{34} 、約 8×10^{34} 、約 8.5×10^{34} 、約 9×10^{34} 、約 1×10^{35} 、約 1.5×10^{35} 、約 2×10^{35} 、約 2.5×10^{35} 、約 3×10^{35} 、約 3.5×10^{35} 、約 4×10^{35} 、約 4.5×10^{35} 、約 5×10^{35} 、約 5.5×10^{35} 、約 6×10^{35} 、約 6.5×10^{35} 、約 7×10^{35} 、約 7.5×10^{35} 、約 8×10^{35} 、約 8.5×10^{35} 、約 9×10^{35} 、約 1×10^{36} 、約 1.5×10^{36} 、約 2×10^{36} 、約 2.5×10^{36} 、約 3×10^{36} 、約 3.5×10^{36} 、約 4×10^{36} 、約 4.5×10^{36} 、約 5×10^{36} 、約 5.5×10^{36} 、約 6×10^{36} 、約 6.5×10^{36

約 9×10^6 、約 9.5×10^6 、約 1×10^7 、約 1.5×10^7 、約 2×10^7 、約 2.5×10^7 、約 3×10^7 、約 3.5×10^7 、約 4×10^7 、約 4.5×10^7 、約 5×10^7 、約 5.5×10^7 、約 6×10^7 、約 6.5×10^7 、約 7×10^7 、約 7.5×10^7 、約 8×10^7 、約 8.5×10^7 、約 9×10^7 、約 9.5×10^7 、約 1×10^8 、約 1.5×10^8 、約 2×10^8 、約 2.5×10^8 、約 3×10^8 、約 3.5×10^8 、約 4×10^8 、約 4.5×10^8 、約 5×10^8 、約 5.5×10^8 、約 6×10^8 、約 6.5×10^8 、約 7×10^8 、約 7.5×10^8 、約 8×10^8 、約 8.5×10^8 、約 9×10^8 、約 9.5×10^8 および約 1×10^9 コロニー形成単位 (cfu) に及ぶ力値で投与されるが、範囲は変動し得る。好ましい力値は、約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 cfu / ml に及ぶ。

10

【0145】

細胞における抗酸化防御タンパク質（カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または nrf2）の発現および / または活性を増大させるための刺激性薬剤の他の例は、後述する小分子化合物、抗体または他のタンパク質である。

【0146】

阻害性薬剤

本発明の方法は、抗酸化防御タンパク質（カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または nrf2）の発現および / または活性の増大を相殺する負の調節因子を阻害する薬剤を使用することもできる。このような薬剤は、例えば、抗酸化防御タンパク質（カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または nrf2）の発現および / または活性の増大を相殺する負の調節因子の発現、プロセシング、翻訳後修飾または活性を特異的に阻害するように作用する細胞内結合分子となり得る。本明細書において、用語「細胞内結合分子」は、例えば、タンパク質または該タンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA 分子）に結合することにより、該タンパク質のプロセシング、発現または活性を阻害するよう細胞内で作用する分子を含むことが意図される。

20

【0147】

さらに詳細に後述する細胞内結合分子の例として、抗酸化防御タンパク質（カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または nrf2）の発現および / または活性の増大を相殺する負の調節因子の活性を特異的に阻害するアンチセンス核酸、細胞内抗体、ペプチド性化合物および化学薬剤が挙げられる。

30

【0148】

一実施形態において、このような薬剤は、抗酸化防御タンパク質（カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / または nrf2）の発現および / または活性の増大を相殺する負の調節因子をコードする遺伝子もしくは該遺伝子の一部に相補的なアンチセンス核酸分子、または該アンチセンス核酸分子をコードする組換え発現ベクターである。細胞における特定のタンパク質の発現を下方調節するためのアンチセンス核酸の使用は、当技術分野において周知である（例えば、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用される Weintraub, H.ら、Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics、1巻(1号) 1986年; Askari, F. K. および McDonnell, W. M. (1996年) N. Eng J. Med. 334巻: 316 ~ 318頁; Bennett, M. R. および Schwartz, S. M. (1995年) Circulation 92巻: 1981 ~ 1993頁; Mercola, D. および Cohen, J. S. (1995年) Cancer Gene Ther. __: 47 ~ 59頁; Rossi, J. J. (1995年) Br. Med. Bull. 51巻: 217 ~ 225頁; Wagner, R. W. (1994年) Nature 372巻: 333 ~ 335頁を参照）。アンチセンス核酸分子は、別の核酸分子のコード鎖に相補的なヌクレオチド配列（例えば、mRNA 配列）を含み、したがって、他の核酸分子のコード鎖と水素結合することができる。

40

【0149】

50

mRNAの配列に相補的なアンチセンス配列は、mRNAのコード領域、mRNAの5'もしくは3'非翻訳領域、またはコード領域および非翻訳領域にまたがる領域（例えば、5'非翻訳領域およびコード領域の接合部における）に存在する配列に相補的となり得る。さらに、アンチセンス核酸は、mRNAをコードする遺伝子の調節領域、例えば、転写開始配列または調節エレメントと配列が相補的となり得る。好ましくは、アンチセンス核酸は、コード鎖における開始コドンに先行するもしくはそれに及ぶ、またはmRNAの3'非翻訳領域における領域と相補的となるように設計される。

【0150】

本発明のアンチセンス核酸は、ワトソン・クリック塩基対形成の法則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、mRNAのコード領域全体に相補的となり得るが、より好ましくは、mRNAのコードまたは非コード領域の一部のみに対しアンチセンスである。10

【0151】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチドの長さとなり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野において公知の手順を使用した化学合成および酵素によるライゲーション反応を使用して構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増大させるように、もしくはアンチセンスおよびセンス核酸の間に形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された様々に修飾されたヌクレオチドを使用して化学合成することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる。アンチセンス核酸の作製に使用することができる修飾ヌクレオチドの例として、5'-フルオロウラシル、5'-プロモウラシル、5'-クロロウラシル、5'-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4'-アセチルシトシン、5'-（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5'-カルボキシメチルアミノメチル-2'-チオウリジン、5'-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルキューオシン（queosine）、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1'-メチルグアニン、1'-メチルイノシン、2',2'-ジメチルグアニン、2'-メチルアデニン、2'-メチルグアニン、3'-メチルシトシン、5'-メチルシトシン、N6-アデニン、7'-メチルグアニン、5'-メチルアミノメチルウラシル、5'-メトキシアミノメチル-2'-チオウラシル、ベータ-D-マンノシリルキューオシン（queosine）、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5'-メトキシウラシル、2'-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5'-オキシ酢酸（v）、ワイブトキソシン、シュードウラシル、キューオシン（queosine）、2'-チオシトシン、5'-メチル-2'-チオウラシル、2'-チオウラシル、4'-チオウラシル、5'-メチルウラシル、ウラシル-5'-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5'-オキシ酢酸（v）、5'-メチル-2'-チオウラシル、3'-（3'-アミノ-3'-N-2'-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp3）wおよび2',6'-ジアミノプリンが挙げられる。細胞における発現を阻害するために、1種または複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することができる。20

【0152】

あるいは、アンチセンス核酸は、cDNAの全体または一部がアンチセンス配向性でサブクローニングされた（即ち、挿入された核酸から転写される核酸が、目的の標的核酸に対しアンチセンス配向性のものである）発現ベクターを使用して、生物学的に產生することができる。目的の細胞においてアンチセンスRNA分子の発現を導く、アンチセンス配向性でクローニングされた核酸に動作可能に連結された調節配列を選ぶことができ、例えば、アンチセンスRNAの構成的、組織特異的または誘導性発現を導く、プロモーターおよび/またはエンハンサーまたは他の調節配列を選ぶことができる。アンチセンス発現ベクターは、cDNA（またはその一部）が、アンチセンス配向性でベクターにクローニングされることを除いて、組換え発現ベクターを構築するための標準組換えDNA方法に従って調製される。アンチセンス発現ベクターは、例えば、組換えプラスミド、ファージミ304050

ドまたは弱毒化ウイルスの形態となり得る。アンチセンス発現ベクターは、標準トランスクレオチド法を使用して細胞に導入することができる。

【0153】

アンチセンス核酸分子は、典型的に、タンパク質をコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズまたはこれに結合して、これにより、例えば、転写および/または翻訳を阻害することにより、タンパク質の発現を阻害するように、被験体に投与される、またはin situで生成される。ハイブリダイゼーションは、従来の又クレオチドによって相補的に行って、安定的二重鎖を形成することができる、あるいは例えば、DNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的な相互作用による。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例として、組織部位における直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように修飾することができ、そこで全身性に投与される。例えば、全身性投与のため、アンチセンス分子は、例えば、アンチセンス核酸分子を細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することにより、選択された細胞表面上に発現される受容体または抗原に特異的に結合するよう修飾することができる。アンチセンス核酸分子は、本明細書に記載されているベクターを使用して、細胞に送達することもできる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が、強力なpol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれたベクター構築物が好まれる。

【0154】

さらに別の実施形態において、本発明の方法において使用することができるアンチセンス核酸分子は、-アノマー核酸分子である。-アノマー核酸分子は、通常の8ユニットとは対照的に、鎖が互いに平行となる相補的RNAと特異的二本鎖ハイブリッドを形成する（参照により本明細書に援用されるGaultierら（1987年）Nucleic Acids Res. 15巻：6625～6641頁）。アンチセンス核酸分子は、2'-o-メチルリボヌクレオチド（参照により本明細書に援用されるInoueら（1987年）Nucleic Acids Res. 15巻：6131～6148頁）またはキメラRNA-DNAアナログ（参照により本明細書に援用されるInoueら（1987年）FEBS Lett. 215巻：327～330頁）を含むこともできる。

【0155】

さらに別の実施形態において、本発明の方法において使用することができるアンチセンス核酸分子は、リボザイムである。リボザイムは、それに対する相補的領域を有するmRNA等、一本鎖核酸を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子である。よって、リボザイム（例えば、ハンマーヘッド型リボザイム（参照により本明細書に援用されるHaselhoffおよびGerlach（1988年）Nature 334巻：585～591頁に記載））を使用して、mRNA転写物を触媒的に切断して、これにより、mRNAの翻訳を阻害することができる。cDNAのヌクレオチド配列に基づき、目的のコード核酸分子に対し特異性を有するリボザイムを設計することができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、目的のコードmRNAにおける切断しようとするヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナ（Tetrahynena）L-19 IVS RNAの誘導体を構築することができる。例えば、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるCechら、米国特許第4,987,071号；Cechら、米国特許第5,116,742号を参照されたい。あるいは、目的のmRNAを使用して、RNA分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAを選択することができる。例えば、参照により本明細書に援用されるBartel, D. およびSzostak, J.W.（1993年）Science 261巻：1411～1418頁を参照されたい。

【0156】

別の実施形態において、RNAiを促進する薬剤を使用して、抗酸化防御タンパク質（カタラーゼ、SOD2、PGC1 および/またはnrf2）の発現および/または活性

10

20

30

40

50

の増大を相殺する負の調節因子の発現を阻害することができる。RNA干渉(RNAi)は、二本鎖RNA(dsRNA)を使用して、該dsRNAと同じ配列を含有するメッセンジャーRNA(mRNA)を分解する、転写後標的化遺伝子サイレンシング技法である(これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるSharp, P.A.およびZamore, P.D.、287巻、2431~2432頁(2000年); Zamoreら、Cell 101巻、25~33頁(2000年)、Tuschlら、Genes Dev. 13巻、3191~3197頁(1999年); Cottrell TRおよびDoeiring TL.、2003年、Trends Microbiol. 11巻: 37~43頁; Bushman F.、2003年、Mol Therapy. 7巻: 9~10頁; McManus MTおよびSharp PA.、2002年、Nat. Rev. Genet. 3巻: 737~47頁)。この過程は、内在性リボヌクレアーゼが、より長いdsRNAをより短く、例えば、21または22ヌクレオチド長RNAに切断すると起こり、低分子干渉RNAまたはsiRNAと命名される。次に、より小さいRNAセグメントが、標的mRNAの分解を媒介する。RNAiの合成のためのキットは、例えば、New England BiolabsまたはAmbionから市販されている。一実施形態において、アンチセンスRNAにおける使用について上述されている化学のうち1種または複数は、RNAiを媒介する分子において用いることができる。

【0157】

本発明の方法における薬剤として抗体を使用することもできる。一実施形態において、抗体は、タンパク質活性を阻害する細胞内抗体である。このような細胞内抗体は、当技術分野において周知の方法を使用して調製され、この方法は、細胞へのベクターの導入の際に、細胞の細胞内区画において抗体鎖が機能的な抗体として発現されるような形態で、抗体鎖をコードする組換え発現ベクターの調製に一般に関与する。

【0158】

本発明の阻害方法に従った転写因子活性の阻害のため、タンパク質に特異的に結合する細胞内抗体が、細胞の核内で発現される。細胞内抗体の核発現は、抗体軽鎖および重鎖遺伝子からN末端疎水性リーダー配列をコードするヌクレオチド配列を除去し、軽鎖および重鎖遺伝子のNまたはC末端のいずれかに核局在化シグナルをコードするヌクレオチド配列を付加することにより達成することができる(例えば、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるBioccaら(1990年)EMBO J.、9巻: 101~108頁; Mhashilkarら(1995年)EMBO J.、14巻: 1542~1551頁を参照)。細胞内抗体鎖の核標的化のための使用に好ましい核局在化シグナルは、SV40ラージT抗原の核局在化シグナルである(これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるBioccaら(1990年)EMBO J.、9巻: 101~108頁; Mhashilkarら(1995年)EMBO J.、14巻: 1542~1551頁を参照)。

【0159】

細胞内抗体発現ベクターを調製するために、目的の標的タンパク質に特異的な抗体鎖をコードする抗体軽鎖および重鎖cDNAは、典型的には、該タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマから単離される。抗体は、適した被験体(例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物)を例えば、タンパク質免疫原で免疫化することにより調製することができる。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換えにより発現されたタンパク質または化学合成されたペプチドを含有することができる。調製物は、フロイント完全もしくは不完全アジュvantまたは同様の免疫賦活性化合物等、アジュvantをさらに含むことができる。抗体産生細胞を被験体から得て、KohlerおよびMilstein(1975年、Nature 256巻: 495~497頁; 参照により本明細書に援用される)によって本来記載されたハイブリドーマ技法等、標準技法によるモノクローナル抗体の調製に使用することができる(これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるBrownら(1981年)J. Immunol. 127巻: 539~46頁; Brownら(1980年)J. Biol. Chem. 255巻: 4980~83頁

; Yehら(1976年)PNAS 76巻:2927~31頁; Yehら(1982年)Int. J. Cancer 29巻:269~75頁も参照されたい)。モノクローナル抗体ハイブリドーマを產生するための技術は周知である(全般的に、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるR. H. Kenneth Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses、Plenum Publishing Corp.、New York、New York(1980年); E. A. Lerner(1981年)Yale J. Biol. Med.、54巻:387~402頁; M. L. Gefterら(1977年)Somatic Cell Genet.、3巻:231~36頁を参照)。簡潔に説明すると、不死細胞株(典型的には骨髄腫)が、上述のタンパク質免疫原で免疫化した哺乳動物由来のリンパ球(典型的には脾細胞)に融合され、得られたハイブリドーマ細胞の培養上清が、スクリーニングされて、目的のタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを同定する。モノクローナル抗体を作製する目的のために、リンパ球(Iymphocyte)および不死化細胞株の融合に使用される多くの周知プロトコールのいずれかを適用してもよい(例えば、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるG. Galfreら(1977年)Nature 266巻:550~52頁; Gefterら、Somatic Cell Genet.、上記引用; Lerner, Yale J. Biol. Med.、上記引用; Kenneth Monoclonal Antibodies、上記引用を参照)。さらに、当業者であれば、同様に有用となり得るこのような方法の多くの変種が存在することを認められよう。

【0160】

典型的には、不死細胞株(例えば、骨髄腫細胞株)は、リンパ球(Iymphocyte)と同じ哺乳動物種に由来する。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫化したマウス由来のリンパ球(Iymphocyte)を不死化マウス細胞株と融合することにより作製することができる。好ましい不死細胞株は、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含有する培養培地(「HAT培地」)に対し感受性のマウス骨髄腫細胞株である。多数の骨髄腫細胞株のいずれかを標準技法に従って融合パートナーとして使用してもよく、例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653またはSp2/O-Ag14骨髄腫系列が挙げられる。これらの骨髄腫系列は、American Type Culture Collection(ATCC)、Rockville、Mdから入手できる。典型的には、HAT感受性マウス骨髄腫細胞は、ポリエチレン glycole(「PEG」)を使用して、マウス脾細胞に融合される。融合から得られるハイブリドーマ細胞は続いて、非融合および非生産的に融合された骨髄腫細胞を死滅させるHAT培地を使用して選択される(非融合脾細胞は、形質転換されていないため、数日後に死滅する)。タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準ELISAアッセイを使用して、このような抗体に関してハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることにより同定される。

【0161】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマ調製の代替として、タンパク質に結合するモノクローナル抗体は、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー(例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー)をタンパク質またはそのペプチドでスクリーニングすることにより同定および単離し、これにより、該タンパク質に特異的に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするためのキットは、市販されている(例えば、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるPharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01; およびStratagene SURJZAPTM Phage Display Kit、カタログ番号240612)。

【0162】

10

20

30

40

50

抗体ディスプレイライブラーの作製およびスクリーニングにおける使用に特に受け入れられる方法および化合物の例も、例えば、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるLadnerら、米国特許第5,223,409号；Kangら、国際公開第WO92/18619号；Dowerら、国際公開第WO91/17271号；Winterら、国際公開第WO92/20791号；Marklandら、国際公開第WO92/15679号；Breitlingら、国際公開第WO93/01288号；McCaffertyら、国際公開第WO92/01047号；Garrardら、国際公開第WO92/09690号；Fuchsら(1991年)Bio/Technology 9巻：1370～1372頁；Hayら(1992年)Hum Antibod Hybridomas 3巻：81～85頁；Huseら(1989年)Science 246巻：1275～1281頁；Grifethsら(1993年)EMBO J 12巻：725～734頁；Hawkinsら(1992年)J Mol Biol 226巻：889～896頁；Clarksonら(1991年)Nature 352巻：624～628頁；Gramら(1992年)PNAS 89巻：3576～3580頁；Garradら(1991年)Bio/Technology 9巻：1373～1377頁；Hoogenboomら(1991年)Nuc Acid Res 19巻：4133～4137頁；Barbassら(1991年)PNAS 88巻：7978～7982頁；McCaffertyら、Nature(1990年)348巻：552～554頁に見出すことができる。

【0163】

10

別の実施形態において、リボソームディスプレイを使用して、本発明の方法における使用のための抗体を同定するためのディスプレイプラットフォームとしてバクテリオファージを置き換えることができる(例えば、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるHanesら、2000年、Nat. Biotechnol. 18巻：1287頁；Wilsonら、2001年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98巻：3750頁；Irvingら、2001年、J. Immunol. Methods 248巻：31頁を参照)。さらに別の実施形態において、細胞表面ライブラーを抗体に関してスクリーニングすることができる(これらそれぞれ、参照により本明細書に援用されるBoderら、2000年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97巻：10701頁；Daughertyら、2000年、J. Immunol. Methods 243巻：211頁)。このような手順は、モノクローナル抗体の単離およびその後のクローニングのための伝統的ハイブリドーマ技法の代替法をもたらす。

20

【0164】

30

別の実施形態において、本発明の方法において使用することができる抗体は、内在性免疫グロブリン産生ができないトランスジェニック動物(例えば、マウス)において作製された実質的にヒトの抗体である(例えば、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用される米国特許第6,075,181号、同第5,939,598号、同第5,591,669号および同第5,589,369号を参照)。

【0165】

40

例えば、キメラおよび生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖連結領域のホモ接合型欠失が、内在性抗体産生の完全阻害をもたらすことが記載されてきた。このような生殖系列変異体マウスへのヒト免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原負荷の際にヒト抗体の産生をもたらす。SCIDマウスを使用してヒト抗体を作製する別の好ましい手段は、参照により本明細書に援用される米国特許第5,811,524号に開示されている。このようなヒト抗体に関連する遺伝物質を、本明細書に記載されている通りに単離および操作することもできることが認められよう。

【0166】

本発明の方法における使用のための組換え抗体を作製するためのさらに別の高度に効率的な手段は、参照により本明細書に援用されるNewman、Biotechnology

50

y、10巻：1455～1460頁（1992年）によって開示されている。具体的には、この技法は、サル可変ドメインおよびヒト定常配列を含有する靈長類化（primatized）抗体の作製をもたらす。この参考文献は、参照により本明細書にその内容全体が援用される。さらに、この技法は、これらそれぞれ、参照により本明細書に援用される米国特許第5,658,570号、同第5,693,780号および同第5,756,096号にも記載されている。

【0167】

モノクローナル抗体が同定されたら（例えば、ハイブリドーマ由来モノクローナル抗体またはコンビナトリアルライブラリー由来の組換え抗体のいずれかであり、既に当技術分野において公知のモノクローナル抗体を含む）、モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖をコードするDNAを標準分子生物学技法により単離する。ハイブリドーマ由来抗体のため、軽鎖および重鎖cDNAは、例えば、PCR增幅またはcDNAライブラリースクリーニングにより得ることができる。ファージディスプレイライブラリー由来等、組換え抗体のため、軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、ライブラリースクリーニングプロセスにおいて単離されたディスプレイパッケージ（例えば、ファージ）から回収することができる。PCRプライマーまたはcDNAライブラリープローブを調製することができる抗体軽鎖および重鎖遺伝子のスクレオチド配列は、当技術分野において公知である。例えば、多くのこのような配列は、Kabat, E.A.ら（1991年）Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242および「Vbase」ヒト生殖系列配列データベースに開示されている。
10

【0168】

得られたら、抗体軽鎖および重鎖配列を、標準方法を使用して組換え発現ベクターにクローニングする。上述の通り、軽鎖および重鎖の疎水性リーダーをコードする配列を除去し、核局在化シグナル（例えば、SV40ラージT抗原由来）をコードする配列を、軽鎖および重鎖の両方のアミノまたはカルボキシ末端のいずれかをコードする配列にインフレームで連結する。発現ベクターは、いくつかの異なる形態のうち1種における細胞内抗体をコードすることができる。例えば、一実施形態において、ベクターは、全長抗体が細胞内に発現されるように、全長抗体軽鎖および重鎖をコードする。別の実施形態において、ベクターは、Fab断片が細胞内に発現されるように、全長軽鎖をコードするが、重鎖のVH/CH1領域のみをコードする。
20

【0169】

別の実施形態において、本発明の方法における使用のための阻害性薬剤は、抗酸化防御タンパク質（カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / またはnrf2）の発現および / または活性の増大を相殺する負の調節因子のアミノ酸配列に由来するペプチド性化合物である。
30

【0170】

本発明の方法において有用なペプチド性化合物は、該ペプチドをコードする発現ベクターを細胞に導入することにより、細胞内に作製することができる。このような発現ベクターは、ペプチド性化合物のアミノ酸配列をコードするオリゴスクレオチドを使用した標準技法により作製することができる。ペプチドは、別のタンパク質またはペプチドとの融合体（例えば、GST融合体）として細胞内に発現させることができる。細胞におけるペプチドの組換え合成の代替として、ペプチドは、標準ペプチド合成技法を使用した化学合成によって作製することができる。
40

【0171】

次に、合成されたペプチドは、ペプチドを細胞に導入するための当技術分野において公知の種々の手段によって細胞に導入することができる（例えば、リポソームその他）。

【0172】

細胞における抗酸化防御タンパク質（カタラーゼ、SOD2、PGC1 および / また
50

は n r f 2) の発現および / または活性の増大を相殺する負の調節因子を阻害する別の形態の阻害性薬剤は、化学的小分子化合物である。

【 0 1 7 3 】

本発明の医薬組成物

本発明の一態様において、治療用核酸分子および / またはこれを含有するベクターは、薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物の形態となる。本明細書において、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性のありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張性および吸収遅延剤その他を含む。一実施形態において、薬学的に許容される担体は、リン酸緩衝食塩水 (P B S) ではない。一実施形態において、担体は、眼内、局所的、非経口的、静脈内、腹腔内または筋肉内投与に適している。別の実施形態において、担体は、経口投与に適している。薬学的に許容される担体は、無菌水溶液または分散物および無菌注射用溶液または分散物の即時調製のための無菌粉末を含む。薬学的活性物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において周知である。いずれか従来の媒体または薬剤が、遺伝子療法ベクターと不適合性である場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるその使用が企図される。補足的活性化合物を組成物に取り込むこともできる。

【 0 1 7 4 】

特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、注射用組成物の形態で投与される。組成物は、液体の溶液または懸濁液のいずれかとして、注射剤として調製することができる。調製物は、乳化されていてもよい。適した賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールその他およびこれらの組合せである。加えて、必要に応じて、調製物は、湿潤剤または乳化剤、p H 緩衝剤、アジュバントまたは免疫賦活薬等、少量の補助的物質を含有することができる。

【 0 1 7 5 】

特定の実施形態において、核酸分子および / またはベクターは、眼内投与に適した組成物に取り込まれる。例えば、組成物は、例えば、注射による、硝子体内、網膜下、結膜下、テノン下、眼周囲、眼球後、脈絡膜上および / または強膜内投与のために設計して、網膜障害を有效地に処置することができる。その上、縫合されたまたは詰め替え可能なドームを投与部位の上に置いて、好まれない方向における活性薬剤の「洗浄除去」、浸出および / または拡散を防止または低下させることができる。

【 0 1 7 6 】

本明細書に記載されている比較的高い粘性の組成物を使用して、例えば、後眼部への注射により、核酸分子および / またはベクターの有効な、好ましくは、実質的に持続性の送達をもたらすことができる。粘性誘導薬剤は、望ましい懸濁液形態における核酸分子および / またはベクターの維持に役立ち、これにより、眼の底部表面における組成物の堆積を防止することができる。このような組成物は、これにより参照により本明細書にその内容全体が援用される米国特許第 5 , 292 , 724 号に記載されている通りに調製することができる。

【 0 1 7 7 】

無菌注射用溶液は、必要に応じて上に列挙されている成分の 1 種または組合せと共に、適切な溶媒において必要とされる量で本発明の組成物を取り込むことにより調製し、続いて濾過滅菌することができる。一般に、分散物は、基本分散媒および上に列挙される成分由来の必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクリに活性化合物を取り込むことにより調製される。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分プラス以前に滅菌濾過されたその溶液由来のいずれか追加的な所望の成分の粉末を生じる真空乾燥およびフリーズドライである。

【 0 1 7 8 】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用担体を含む。これは、ゼラチンカプセルに封入または錠剤へと圧縮することができる。経口治療投与の目的のため、活性化合物は、賦形剤と共に取り込み、錠剤、トローチまたはカプセルの形態で使用することができ

10

20

30

40

50

る。経口組成物は、口腔洗浄薬としての使用のための流体担体を使用して調製することもでき、該流体担体における化合物は、経口適用され、すすいでから喀出または嚥下される。薬学的に適合性の結合剤および／またはアジュvant材料は、組成物の部分として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル、トローチその他は、次の成分または同様の性質の化合物のいずれかを含有することができる：微結晶性セルロース、トラガカント・ゴムもしくはゼラチン等、結合剤；デンプンもしくはラクトース等、賦形剤、アルギン酸、Primogelもしくはコーンスターーチ等、崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotes等、潤滑剤；コロイド性二酸化ケイ素等、流動促進剤；スクロースもしくはサッカリン等、甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジ香味料等、10 矯味矯臭剤。

【0179】

一実施形態において、本発明の組成物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む、放出制御製剤等、身体からの急速な排除から化合物を保護する担体と共に調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸等、生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤の調製のための方法は、当業者には明らかであろう。材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc から商業的に得ることもできる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染細胞に標的化されたリポソームを含む）を薬学的に許容される担体として使用することもできる。これは、当業者に公知の方法、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されている方法に従って調製することができる。20

【0180】

鼻用組成物は、一般に、点鼻薬（nasal spray）および吸入薬を含む。点鼻薬および吸入薬は、1種または複数の活性構成成分と、保存料、粘性修飾因子、乳化剤、緩衝剤その他等の賦形剤とを含有することができる。点鼻薬は、局所および／または全身性使用のために鼻腔に適用することができる。点鼻薬は、活性構成成分の定量の送達に適した非加圧式ディスペンサーにより分配することができる。鼻用吸入薬は、局所および／または全身性使用のための経口吸入による肺への送達のために企図される。鼻用吸入薬は、1種または複数の活性構成成分の定量の送達のための閉鎖容器系によって分配することができる。30

【0181】

一実施形態において、鼻用吸入薬は、エアロゾルと共に使用される。これは、化合物を含有する水性エアロゾル、リポソーム調製物または固体粒子を調製することにより達成される。非水性（例えば、フルオロカーボン噴霧体）懸濁液を使用することができる。音波ネブライザーを使用して、化合物の分解をもたらし得る剪断への薬剤の曝露を最小化することができる。

【0182】

通常、水性エアロゾルは、従来の薬学的に許容される担体および安定剤と共に、薬剤の水溶液または懸濁液を製剤化することにより作製される。担体および安定剤は、特定の化合物の要件と共に変動するが、典型的には、非イオン性界面活性剤（Tween、Pluronicsまたはポリエチレングリコール）、血清アルブミン等の無害タンパク質、ソルビタンエステル、オレイン酸、レシチン、グリシン等のアミノ酸、バッファー、塩、糖または糖アルコールを含む。エアロゾルは、一般に、等張性溶液から調製される。40

【0183】

全身性投与は、経粘膜的または経皮手段によるものとなることもできる。経粘膜的または経皮投与のため、透過すべき障壁に適切な浸透剤が、製剤において使用される。このような浸透剤は一般に、当技術分野において公知であり、例えば、経粘膜的投与のためには、洗剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜的投与は、点鼻薬または坐剤の使用により達成することができる。経皮投与のため、活性化合物は、一般に当技術分野において公知の通り、軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームに製剤化される。50

【 0 1 8 4 】

本発明の組成物は、直腸送達のために坐剤（例えば、カカオバターおよび他のグリセリド等、従来の坐剤基剤と共に）または停留かん腸の形態で調製することもできる。

【 0 1 8 5 】

投与および投薬量の均一性を容易にするための単位剤形（d o s a g e u n i t f o r m）で経口または非経口的組成物を製剤化することは、特に有利である。単位剤形は、本明細書において、処置しようとする被験体のための単位投薬量として適する物理的に別々の単位を指す；必要とされる医薬品担体に関連して所望の治療効果を生じるように計算された、所定量の活性化合物を含有する各単位。本発明の単位剤形の仕様は、活性化合物の特有の特徴および達成すべき特定の治療効果、および個体の処置のためのこのような活性化合物の配合技術分野に固有の限定によって指示され、これに直接的に依存する。10

【 0 1 8 6 】

本明細書に記載されている核酸分子の毒性および治療有効性は、例えば、LD₅₀（集団の50%に致死的な用量）およびED₅₀（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準製薬手順によって決定することができる。毒性および治療効果の間の用量比は、治療指数であり、比、LD₅₀ / ED₅₀として表現することができる。高い治療指数を示す化合物が好まれる。毒性副作用を示す化合物を使用することができるが、非感染細胞への潜在的な損傷を最小化し、これにより、副作用を低下させるために、罹患組織の部位へとこのような化合物を標的化する送達系の設計に注意を払うべきである。20

【 0 1 8 7 】

細胞培養アッセイおよび／または動物試験から得られるデータは、ヒトにおける使用のための投薬量の範囲を処方することにおいて使用することができる。投薬量は、典型的には、毒性が殆どないまたは全くないED₅₀を含む循環濃度の範囲内に収まる。投薬量は、用いた剤形および利用した投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本発明の方法において使用されるいづれかの化合物のため、治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初に推定することができる。動物モデルにおいて用量を処方して、細胞培養において決定されるIC₅₀（即ち、症状の最大半量阻害を達成する被験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成することができる。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。30

【 0 1 8 8 】

限定として解釈するべきではない次の実施例により、本発明をさらに説明する。本願と共に図面を通して引用されているあらゆる参考文献、特許および公開特許出願の内容は、これにより参照により援用される。

【 実施例 】**【 0 1 8 9 】****材料と方法****マウス系統**

網膜色素変性症（R P）の3匹のマウスマodel、rd1、rd10およびロドプシンノックアウト（r h o - / -）を次の試験のために選んだ。これらの動物は、ホスホジエステラーゼ6ベータ遺伝子rd1対立遺伝子のホモ接合性により、急速な杆体死と、その後に比較的急速な錐体死を示すので、F V B / N J バックグラウンドにおけるrd1対立遺伝子を選んだ。rd1と比較して、ホスホジエステラーゼ6ベータ遺伝子rd10対立遺伝子を保有するマウスの表現型は、網膜変性症の僅かにより後の発病によって特徴付けられる。これらの試験において使用したrd10マウスは、コンジェニックC57BL/6Jバックグラウンドにおけるものであり、よって、行動学的アッセイおよびERGアッセイに適した。40

【 0 1 9 0 】

これらの試験において使用したマウスの第3の系統は、L e m l a (P N A S 9 6 卷 (

50

2号) : 736~41頁、1999年)に記載されているロドプシン rh o ヌル対立遺伝子(rh o)を保有する。この系統は、中等度のスピードの変性を有する。加えて、ロドプシン遺伝子の変異は、ヒトにおける常染色体 R P に存在する最も一般的な変異である。

【0191】

感染プロトコール

一般に、P0新生仔を氷上で麻酔した。約0.3 μlのAAVウイルスを、細引きした(pull ed)ガラスピペットを使用して網膜下空間に導入した。盲目のための動物モデルのいくつかは、緩徐な変性を有するため、動物を1週間~1年間生存させた。この期間において、動物の視覚誘導行動を検査した。最後に、動物を安樂死させ、その眼を組織学的に検査した。

10

【0192】

実験ベクターのいくつかは、組織学的マーカーをコードしないため、ベクターを等しい力価のAAV - CMV - GFPと同時注射して、GFPの使用により感染の追跡を可能にした。この場合、実験用ウイルス注射と同じ最終力価の対照ベクター、AAV - CMV - GFPプラスAAV - CMV - t d Tomatoも注射した。GFPおよびt d Tomatoウイルスの組合せを注射し、錐体の100%が同時感染し、ONLにおける全細胞の85%が同時感染したことが示され、これは主に、杆体の同時感染率であった(図7)。細引きしたガラスピペットおよびEppendorf picospritzerを使用して、0.3マイクロリットルのウイルス懸濁液により、P0における網膜下空間への注射を行った。動物を離乳させ、後述するアッセイを行うまで標準固体飼料および12時間明/12時間暗で維持した。rd1マウスの解析の時点は、8週間(W)および12Wであった。rd1マウスにおける錐体死の動態の以前の記載に基づき、これらの時点を選んだが、これらは、網膜の中心50%に殆ど錐体が残らない(8W)ポイントであり、12Wには網膜のおよそ90%内の錐体が残らない。

20

【0193】

発現および機能の検査

タンパク質発現および機能に関してベクターを最初に検査するために、これを野生型(WT)網膜においてアッセイした。P0 WTマウスを等しい比のAAV - CMV - GFPおよび抗酸化ベクターにより同時感染させ、P21に屠殺した。AAV8は、およそ1週間以内に発現することができ、感染細胞の大部分は杆体となる。CMVプロモーターは、錐体におけるほど杆体において強力ではないが、免疫組織化学的にGFP発見を見る(例えば、図1Eを参照)およびウエスタンプロット上では十分に強力である。タンパク質解析のために抽出物を調製し、ウエスタンプロットを行った。市販の抗血清を使用した(例えば、図2を参照)。対照網膜をAAV - CMV - GFP+/-AAV - CMV - t d Tomatoウイルスのみに感染させた。どの程度ベクターが発現しているか評価するために、GFPと比べた、および酸化防止遺伝子の内在性レベルと比べたAAV形質導入遺伝子のレベルを評価した。杆体は、網膜における細胞の70%であるため、このレベルは、プロットにおいて容易に目に見えた。

30

【0194】

組織切片におけるアクロレインの免疫組織化学的検出を使用した酸化の評価により、感染したマウスを酸化防止遺伝子の機能に関して評価した。図3に示す通り、アクロレイン染色のために切片を処理した。

40

【0195】

網膜電図検査(ERG)

Komeimara(PNAS、103巻(30号):11300~05頁、2006年)に従って明所視ERGを行った。一般に、より高いb-波を有するrd10マウスは、より高い錐体生存と相關する。

【0196】

マウスを一晩暗順応させ、麻酔し、両方の瞳孔を散大させた。Ganzfeldドームにおいて1分間の間隔で提示した白色光($1.37 \times 10^5 \text{ cd/m}^2$)の10 msec

50

閃光により、暗所で杆体支配的応答を誘発させた。明順応し、1 Hzで提示した同じ閃光($1.37 \times 10^5 \text{ cd/m}^2$)による 41 cd/m^2 杆体脱感作白バックグラウンドの存在下で錐体応答を誘発した。両眼からERGを同時にモニターし、錐体応答に対してシグナルを平均した。

【0197】

行動学的アッセイ

行動学的アッセイは、明および暗環境における移動運動検査(Collinsら、J of Neurosci Methods、60巻(1~2号):95~98頁、1995年; Legaliら、Nat Neurosci、11巻(6号):667~75頁、2008年を参照)、強制選択水泳(forced-choice swim)検査(Pruskyら、Vision Res、40巻(16号):2201~09頁、2000年; WongおよびBrown、Genes Brain & Behav、5巻(5号):389~403頁、2006年を参照)、視運動検査(Abdeljalilら、Vision Res、45巻(11号):1439~46頁、2005年; Legaliら、Nat Neurosci、11巻(6号):667~75頁、2008年; Pruskyら、Invest Ophthalm and Visual Sci、45巻(12号):4611~16頁、2004年を参照)および視覚性断崖(visual cliff)検査(Nagarら、Neurosci、160巻(2号):517~29頁、2009年を参照)を含む。10

【0198】

視運動デバイスは、中心にプラットフォームを備えた回転ドラムのように見える。覚醒したマウスをプラットフォームに置き、チャンバーに慣らした。これは、プラットフォームを飛び降りるか否かによって評価した。デバイスに動物を慣らすには、典型的に約5分間を要する。研究者は、動物を観察し、動物がプラットフォームに1~2分間残ったら、検査を始めた。運動をシミュレートするために、ドラムの内部表面にストライプを明滅させて投射した。ストライプの厚さ、閃光の頻度、コントラストおよび色を時間をわたって変更させて、視覚的性能を決定した。ビデオカメラをマウスに向けて、シミュレートされた運動に対するその応答を評価した。盲目マウスは応答せず；目の見えるマウスはその身体運動を増加させて、動きを追跡するかのようにその頭部も回した。各マウスを実験経過にわたり総計4~6回検査し、これを3週間~6ヶ月間持続した。視運動検査は、他の検査では容易に測定されない明瞭度および感度を測定することができるという利点を有する。実験の終結時に、屠殺前に動物をERGに関して検査した。20

【0199】

光誘発神経節細胞活性記録

動物を麻酔する前に一晩暗順応させた。可視光曝露を最小化するための赤外照明下において、網膜を解剖し、37度酸素付加リンゲル培地における濾紙片上に、神経節細胞の側を上にマウントした。 10^{10} 光子 $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ の強度の1秒間の可視光(365 nm + 505 nm)で網膜を刺激した。単一の神経節細胞の光誘発スパイクを電極により記録し、応答を20回の試行により平均した。30

【0200】

組織学的解析

眼球を除去し、PBS中4%ホルムアルデヒドに置き、その前眼部および水晶体を除去した。この固定液において30分間固定を続けた。固定された組織を30%スクロース/PBSに3時間または一晩浸漬し、ショック凍結し、上側-下側経線に沿って $20\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで切片作製した。ローダミン標識したピーナツ凝集素(PNA)、赤色/緑色オプシンおよび青色オプシン抗体を染色に使用した。染色された切片を共焦点レーザー走査顕微鏡において撮影した。定量的比較のため、励起エネルギーレベルおよび曝露持続時間に対する試料で同じに維持し、撮像して、本来のシグナル強度のダイナミックレンジを保存した。ImageJおよびImageJソフトウェアを使用して、画像データを定量的に解析した。40

【0201】

錐体の数を決定するための2種類のアッセイを使用して、網膜を組織学的に評価した。網膜全体のフラットマウントを作製し、各網膜の一貫した区域における明るいGFP細胞の数についてスコア化した。12時の位置における焼灼鉄によって付けられたマークに基づきフラットマウント網膜を方向づけ、4個の四分円にマークを付けた。Komeimara (PNAS 103巻(30号): 11300~05頁、2006年) に記載されている通りに、視神経頭から1.5mmの距離で、視神経頭および辺縁の間の線において、定量化のために各網膜四分円における1つの正方形を選んだ。図1Fに例証される通り、このような距離に位置する各四分円において、60×顕微鏡視野を撮影した。Imarisソフトウェアを使用して、明るいGFP+細胞の数を定量化した。網膜切片を調製し、抗GFPと共に抗錐体アレスチンおよび/またはPNA結合でも染色した(図1B)。切片は、網膜の50%において背腹軸に沿って、網膜の50%において前後軸に沿って作製した。切片全体を通して、錐体マーカーが陽性の細胞の数について視神経頭付近の2枚の切片を定量化した。共焦点イメージングおよびImarisソフトウェアをこの解析のために使用した。しかし、変性網膜において、非常に異形の錐体は、多くの場合、錐体アレスチンおよびPNAの定量化が困難であることが判明した。ウイルスのCMVプロモーターからの明るいGFPは、スコア化するより頑強な方式をもたらしたため、本発明者らは、抗GFPによっても染色した。

【0202】

(実施例1: 網膜色素変性症マウスモデルの錐体細胞死に対する抗酸化酵素スーパーオキシドジスマターゼ(SOD2)およびカタラーゼの効果) 20

錐体が、RPにおける酸化の徵候を示すことが一般に認識されている。例えば、錐体は、食餌に抗酸化剤を供給した、あるいは抗酸化遺伝子を過剰発現するように遺伝子導入により修飾したマウスにおいてより長く生存する。加えて、アデノウイルスペクターによりRPE細胞へと送達されたカタラーゼが、光損傷から隣接する光受容体を保護したことが示された(Rexら、Human Gene Therapy 15巻(10号): 960~67頁、2004年を参照)。続いて、錐体への直接的な抗酸化酵素のAAV媒介性送達は、錐体を保護することができ、加えて、全錐体が感染した訳ではない場合であっても、付近の非感染錐体に対する利益がある場合もある。

【0203】

rd1およびrd10ヌルマウスにおいて系統毎に少なくとも3回実験を行った。いずれかの系統特異的陰性応答が生じる場合は、より多くの成功の機会を得るために、異なる上流変異および変性の異なる動態を有するこれら2系統を検査した。いずれかの陽性の再現性ある組合せが、錐体特異的プロモーターを有するAAVベクターにおいて検査される。

【0204】

抗酸化防御遺伝子をコードするAAVベクター

抗酸化防御遺伝子、SOD2およびカタラーゼをコードする例示的なAAVベクターを図8に描寫する。SOD2、GPX4およびカタラーゼは、光受容体生存性に関係付けられていた(例えば、Usuiら、Mol Therap 17巻(5号): 778~86頁、2009年; Uetaら、JBC 287巻(10号): 7675~82頁、2012年を参照)。ペルオキシソーム標的化配列をオルニチントランスカルバミラーゼ由来のミトコンドリア標的化配列に置き換える、Usaiら(Mol Therap 17巻(5号): 778~86頁、2009年)による修飾を有するカタラーゼ対立遺伝子を作製した。この対立遺伝子は、有効であることが判明したが、正常ペルオキシソーム標的化バージョンは有効ではなかった。

【0205】

ウイルス調製物の感染力を増大する、C末端チロシンにチロシン変異を有する、AAVカプシド8型においてベクターをパッケージングした。部位特異的変異誘発を使用して、このカプシド対立遺伝子を作製した。イオジキサノール(Iodixinol)勾配遠心

10

20

30

40

50

分離と、続くイオン交換カラム精製を使用して、このようなベクターの產生および精製を行った。最終力価は、 $10^{12} \sim 10^{14}$ ウイルス粒子 ($v.p.$) / ml に及び、優れた感染力を有する(図1および図7)。

【0206】

結果

AAVベクター

例えば、レーバー先天黒内障患者におけるAAVベクターの使用に成功した。よって、RPE網膜への遺伝子の送達のために、これらのベクターを選んだ。AAVにより使用することができるプロモーターは、約4.7KbのDNAであるウイルスの幾分限定された容量のために、比較的小さくなる必要がある。CMVは、非常に広範に発現されるプロモーターではあるが、杆体よりも錐体において活性が高い(図1B、図1E)。加えて、CMVは、RPEにおいて高レベル発現を駆動することができる。RPEと共に網膜に過剰なフリーラジカルが存在する場合、これは、カタラーゼによるRPEの形質導入にアデノウイルスが使用された試験において観察された利益を有し得る(Rexら、Human Gene Therapy 15巻(10号): 960~67頁、2004年を参照)。よって、初期実験のためにCMVを選んだ。ウイルスが、網膜下空間に正確に送達される場合(動物の約2/3で起こる)、より高齢のステージではなくPOに注射することにより、網膜を通して実質的に全ての錐体が感染することが判明した(図1A~図1D)。ウイルスのこの広範な播種は、2種の原因によるものである可能性が高い。一方は、PO網膜の網膜下空間が、OSが存在する前のこの初期ステージにはOSおよびRPE接続を欠くため、比較的オーブンであること。よって、ウイルス接種材料は、接種部位から自由に拡散する。さらに、錐体は、網膜下空間の強膜側付近に位置し、ウイルス拡散および細胞への侵入に干渉し得るOSおよび内節(IS)の層は存在しない。よって、これは、ウイルス粒子によって容易にアクセスされる。実際に、この注射プロトコールは、非常に頑強であることが判明し、CMV-GFPは非常に明るいため、明るいGFP細胞の数を錐体生存の代理として使用することができる(図1F)。これは、被験遺伝子の送達後の錐体生存の比較的迅速な評価を可能にした。二次スクリーニングにおいて錐体マーカー、錐体アレスチンまたはPNAを染色することにより、このような結果を追跡調査した(図1B)。

【0207】

酸化防止酵素

変性の経過における野生型(WT)およびRPE網膜(rd、一般に)における抗酸化酵素の発現(図2)を検査した。酵素のフリーラジカルからH₂O₂への変換は、SOD酵素、SOD1~3によって行われる。この反応後に、H₂O₂は、カタラーゼまたはグルタチオンペルオキシダーゼによって水および酸素に変換される。ミトコンドリアにおける電子伝達鎖は、全細胞におけるフリーラジカルの主要な供給源であり、光受容体は、そのISにおける全細胞型の中で最高密度のミトコンドリアのうちの1つを有することが公知であるため、高レベルのGPX1およびSOD2が光受容体のISに見出されたことに驚きはない(図2A~図2D)。

【0208】

これらが観察された後に、杆体光受容体が、その生存のためにSOD2またはGPX1に依存したかどうかを決定した。この目的のため、POにエレクトロポレーションを使用して、低分子ヘアピン型(sh)RNAプラスミドをWT網膜に送達した(MatsudaおよびCepkko、PNAS 104巻(3号): 1027~32頁、2007年を参照)。この方法は、主に有糸分裂前駆細胞を標的化し、この細胞は、娘細胞にプラスミドを渡し、その80%は杆体である(錐体は、この時点では有糸分裂後であり、有效地にエレクトロポレーションされない)。遍在性CAGプロモーターにおいて、GFPを発現するプラスミドと共に、ヘアピンプラスミドを同時エレクトロポレーションした。SOD2ノックダウンによる網膜におけるアクロレイン染色によって明らかにされる通り、より高レベルの酸化脂質が存在した(図3)。TUNEL染色から分かるように、GPX1 sh

R N A によってエレクトロポレーションした杆体は死滅した(図4)。これらのデータは、光受容体細胞が、頑強な酸化防止能力を必要とするという仮説を支持する。死滅が、単一の酸化防止酵素の喪失後に非常に急速に起こったことは興味深く、これらの酵素が重複性ではないことを示唆する。G P X 4 は、脂質酸化においてより活性であるが、G P X 1 は、それが標的化する具体的な分子については何ら公知ではないため、この結果は、その異なる活性によるものである可能性がある。さらに、酸化防止酵素は、異なる区画、即ち、ミトコンドリア、細胞質またはペルオキシソームを標的化し得るため、酵素局在化が重要となり得る。

【0209】

よって、2セットのベクターを作製した。一方のセットにおいて、2種の酸化防止防御遺伝子が、同じA A Vベクターから発現された。このような感染を追跡するために、A A V - C M V - G F Pとの同時感染を使用した。図1に示す通り、A A V - C M V - G F Pは、錐体において非常に明るく、定量化を可能にし、図7に示す通り、同時感染率は高い。第2のセットのベクターにおいて、2種の酸化防止防御遺伝子が、2種の異なるA A Vベクターから発現され、G F Pは、このベクターのうち少なくとも一方に含まれた。2種の異なるベクターに遺伝子を有することの利点は、酸化防止遺伝子の様々な組合せの検査と、単一の遺伝子のみの検査が可能となることである。

【0210】

A A V - C M V - S O D 2 および A A V - C M V - カタラーゼによるP 0 r d 1網膜の同時感染のデータは、これらのベクターに同時感染したr d 1マウスのP 5 0においてより優れた錐体生存を示す(図10および図11)。網膜の中心部分を通じて採取された切片における網膜の強膜部分における明るいG F P細胞の数を定量化した。対照における明るいG F P + 細胞の数は、2 5 9 + / - 1 1 3錐体 / 切片であり、S O D 2 + カタラーゼ感染網膜における数は、3 4 2 + / - 2 9 . 3錐体 / 切片であった。

【0211】

その上、r d 1網膜におけるS O D 2 およびカタラーゼ同時過剰発現は、改善された錐体生存を示す。検査した全時点において(P 3 0、P 5 0、P 6 0 およびP 7 0)、S O D 2 + カタラーゼを過剰発現する網膜における錐体密度は、G F P過剰発現を有する網膜よりも高い。出生後日数5 0において、S O D 2 + カタラーゼを過剰発現する網膜における錐体密度は、およそ1.5倍高い(1 9 6 + / - 2 2 . 3錐体 / 0 . 0 6 2 5 mm² v s 1 3 3 + / - 6 0錐体 / 0 . 0 6 2 5 mm²、p値 < 0 . 0 2)(図11)。さらに、光伝達が行われ、錐体機能の重要な指標である錐体外節は、S O D 2 + カタラーゼ同時過剰発現の際にr d 網膜においてより良く保存されている(図12)。錐体外節は、出生後日数6 0においてr d 1網膜に含まれるが(図12B)、これらは、S O D 2 およびカタラーゼ過剰発現を有する網膜における大部分の残る錐体に存在する(図12C)。この表現型の定量化は、S O D 2 およびカタラーゼ過剰発現を有する網膜における明らかなP N A染色を有する、錐体のパーセンテージの大幅な増大を示した(図12D)。

【0212】

さらに、S O D 2 およびカタラーゼの両方を過剰発現するマウスは、視運動応答(図13)および光誘発神経節細胞活性(図14)によって評価される、より優れた全体的な光受容体機能を示した。視運動アッセイによって示される通り、S O D 2 およびカタラーゼをコードするA A Vベクターを注射された眼は、出生後日数4 0 および5 0において、非注射眼および対照注射眼の両方と比較してより高い視力を有する(図13)。出生後日数5 0において、左および右眼視力の差(右眼視力 - 左眼視力)は、対照群および抗酸化A A V処置群の間で統計的に有意である(0 . 0 0 4 4サイクル / 度 v s 0 . 0 8 3 4サイクル / 度、P < 0 . 0 2)(図13B)。加えて、S O D 2 およびカタラーゼを過剰発現する網膜は、神経節細胞の増大した光誘発活性を有した(図14、左側)。生存する錐体の光応答は、網膜から脳への出力シグナルである神経節細胞活性によって評価した。光刺激のパラメータ(波長および強度)は、錐体光受容体を活性化するが、本質的に感光性網膜神経節細胞(i p R G C)を活性化しないように選択した。ピーク発火率(スパイク /

10

20

30

40

50

秒)によって測定される平均神経節細胞活性は、SOD2およびカタラーゼ過剰発現を有する網膜において、対照網膜よりも高かった(106スパイク/秒 vs 38.7スパイク/秒、 $p < 0.005$) (図14)。抗酸化遺伝子療法を与えたマウスは、明・暗ボックニアッセイ、視覚性断崖アッセイおよび網膜電図検査を含む他の機能アッセイによりさらに検査される。

【0213】

6ヶ月齢 rhodopsin-/-マウス網膜をAAV-GFP+SOD2+カタラーゼで処置することにより、他の網膜変性症モデルにおける錐体をレスキューする抗酸化処置の能力を検査した。図25に示す結果は、抗酸化処置を使用して、盲目をもたらす複数の変異を処置することができることを実証する。

10

【0214】

(実施例2：網膜色素変性症のマウスモデルにおける錐体細胞死に対する転写因子PGC1およびNrfgの効果)

少なくとも1種の抗酸化酵素の発現の代わりにまたはこれと組み合わせて、酸化防止プログラムの全般的な上方調節は、より優れた錐体生存をもたらし得る(例えば、PGC1およびNrfgの発現および/または活性の上方調節により)。WT網膜における免疫組織化学を使用して、PGC1の発現を検査した(図5)。タンパク質は、全網膜ニューロンにおいて非常に高レベルで見出され、錐体において、杆体よりも高いレベルが見られた。

20

【0215】

代替主要調節因子は、Nrfg、塩基性ロイシン(leucine)ジッパー転写因子である。Nrfgは、内在性細胞ストレス防御機序の一部であり、酸化防止酵素の転写を調節することも示された。Nrfgは、通常、ユビキチン依存性分解を介したその細胞質結合パートナーKeilich様ECH関連タンパク質1(Keap1)タンパク質によって、健康細胞において低レベルで維持される。酸化剤による活性化により、Keap1媒介性Nrfgターンオーバーは、破壊され、Nrfgは、蓄積し、核にトランスロケーションし、そこで抗酸化応答エレメント(ARE)による小型のMafタンパク質による抗酸化遺伝子の転写をモジュレートする。AREは、多くの抗酸化遺伝子の5'領域に見出されるシス作用性エンハンサーである。

【0216】

30

マウスPGC1対立遺伝子のcDNA(2.4Kb)をAAV2/8ベクター系に挿入し、CMVプロモーターの制御下におけるPGC1タンパク質の発現を可能にした。トランスフェクトした培養細胞株のウエスタンプロットおよびP0のB16J網膜の感染の際の感染網膜における免疫組織化学の両方を使用して、AAV-CMV-PGC1からのPGC1発現をアッセイした。PGC1機能性を決定するために、半定量的RT/PCRを使用して、その公知標的遺伝子の一部の発現レベルをアッセイした。簡潔に説明すると、標準方法(RNAeasyキット、Qiagen)を使用して、P21における網膜RNA調製物を得て、SOD2、GPX1および4、カタラーゼならびに脱共役タンパク質(UCP)のレベルを対照感染およびPGC1感染網膜の間で比較する。パラコートによる負荷後に、上述の通り、より優れた酸化保護(アクロレインおよびカルボニル付加物のELISA)のためのアッセイも行う。

40

【0217】

AddgeneからマウスNrfg遺伝子の全長対立遺伝子を得た。CMVプロモーターによって駆動されるNrfgタンパク質を発現するAAV2/8ベクターを產生した。AAV-CMV-Nrfgプラスミドをトランスフェクトした培養細胞株におけるウエスタンプロットと、続く感染網膜における免疫組織化学により、その発現を確認した。数種類の標的遺伝子のRT/PCRを上述の通りに行った。

【0218】

結果

PGC1タンパク質は、大部分の網膜細胞型において発現され、錐体光受容体におい

50

て、杆体よりも高いレベルであった(図5)。PGC1は、分裂促進および抗酸化経路を正に調節するため、その発現パターンは、錐体のより優れた抗酸化能力のためのより高い代謝要求および要件を示す。Nr f 2は、他方では、正常網膜の光受容体および他の網膜細胞において非常に低レベルで発現される(図6A)。しかし、網膜変性症の杆体光受容体細胞死フェーズにおいて、免疫組織化学によって評価されるNr f 2タンパク質レベルは上昇した(図6B～図6C)。先に記載された通り、Nr f 2-Keap1系は、酸化剤の細胞センサーとして機能する。よって、上昇したNr f 2レベルは、杆体変性の際の錐体におけるより高い酸化ストレスおよび酸化剤に対処するより大きい必要を示唆する。網膜変性症における錐体におけるこのNr f 2タンパク質レベルの増大は、別個の遺伝的変異を有する2種の異なるrdマウスモデルにおいて観察され、錐体における増大する酸化ストレスが、網膜色素変性症を含む網膜変性症疾患の一般的な問題であることを示唆する。

【0219】

AAVベクターによるPGC1およびNr f 2の同時過剰発現は、P50のrd1網膜における錐体生存を延長する(図15)。変性は、rdマウス網膜における中心から辺縁へと進行するため、P50において、死滅した錐体光受容体の大部分は、網膜の中心区域に存在する(図15A)。PGC1およびNr f 2の過剰発現は、P50に網膜中心における錐体生存をレスキューした(図15B)。

【0220】

レスキュー表現型の定量化は、PGC1およびNr f 2過剰発現が、錐体生存をレスキューしたことを示し、処置網膜において、対照網膜よりも有意に高い錐体密度であった($273 + / - 6$ 錐体/ 0.0625 mm^2 vs $133 + / - 60$ 錐体/ 0.0625 mm^2 、 $p < 0.05$)(図16)。

【0221】

加えて、PGC1およびNr f 2同時過剰発現は、P50に、SOD2およびカタラーゼの同時過剰発現よりもよく錐体生存を促進した($p < 0.001$)。さらに、このレスキューは、P80に、対照網膜よりも依然として有意に高かった($p < 0.05$)(図16)。

【0222】

AAV-CMV-PGC1およびAAV-CMV-Nr f 2をトランスフェクトしたP30rd1網膜の同時感染のデータは、PGC1およびNr f 2同時過剰発現が、P30(図17および図18)、P40およびP50に、rd1網膜における錐体外節を保存することを示す。錐体外節の定量化は、Nr f 2過剰発現が、錐体外節を保存したことを示し、処置網膜において、対照網膜よりも有意に高いパーセンテージであった($p < 0.05$)(図20)。

【0223】

その上、Nr f 2単独の過剰発現は、P50にrd1網膜における錐体生存を延長した(図19)。P50において、Nr f 2を過剰発現する網膜における平均錐体密度は、PGC1単独またはNr f 2およびPGC1のいずれかによる網膜よりも高かった。さらに、Nr f 2の処置は、P45に、rd10マウスへのNr f 2の添加によりスーパー・オキシドレベルが低下したことを示し(図21)、Nr f 2の過剰発現は、P30のrd1マウスにおける錐体における脂質酸化を低下させた(図22)。

【0224】

さらに、Nr f 2を過剰発現するマウスは、視運動アッセイ(図23)、網膜電図検査(図24)および光誘発神経節細胞活性(図14、右側)によって評価される、より優れた全体的光受容体機能を示すことが示された。視運動アッセイによって示される通り、Nr f 2をコードするAAVベクターを注射された眼は、P50に、非注射眼および対照注射眼の両方と比較して、より高い視力を有する(図23)。各動物の右眼/左眼視力の比を使用して、処置なしの動物間の変動を最小化した。AAV-CMV-Nr f 2処置網膜のR/L比は、対照処置網膜よりも有意に高かった($p < 0.05$)。加えて、Nr f 2

10

20

30

40

50

を過剰発現する網膜は、網膜電図検査解析によって示される通り、実質的により優れた波形を有した。右眼 / 左眼 b - 波振幅の比は、Nrf2 处置マウスにおいて、対照マウスよりも有意に高かった（図 24）。

【0225】

Nrf2 を過剰発現する網膜は、神経節細胞の増大した光誘発活性も有した（図 14）。上述する神経節細胞活性により、生存する錐体の光応答を評価した。平均神経節細胞活性は、Nrf2 過剰発現を有する網膜において、対照網膜よりも高かった（図 14）。これらの機能アッセイの結果は、網膜色素変性症のマウスモデルにおける錐体機能が、Nrf2 处置により保存されたことを実証する。

【0226】

（実施例 3：網膜神経節細胞に対する転写因子 Nrf2 および抗酸化酵素スーパーオキシドジスムターゼ（SOD2）の効果）

網膜は、網膜神経節細胞（RGC）を脳内のその標的に接続する、1 個の白質路、視神経を有する構造である。周囲の灰白質からのこれらの軸索の単離は、神経の挫傷による純粋軸索傷害を作製して、緑内障のモデルとして使用する特有の機会を提供する（例えば、Templeton および Geisert（2012 年）Mol Vision 18 卷：2147～2152 頁を参照）。視神経挫傷（ONC）は、比較的軽度であり、眼血流を妨げないため、視神経離断等、他の方法を上回る利点を有する。ONC は、多数のマウス系統における神経節細胞傷害を検査するための単純な同調的アプローチとして、特に有用である。この実験モデルは、緑内障のマウスモデルにおいて起こる同じ分子変化による傷害（insult）を生じ、誘導されたおよび / または内因性の眼内圧上昇の両方が存在する。

【0227】

したがって、視神経挫傷後の RGC の生存に対する抗酸化防御タンパク質、Nrf2 および Sod2 の発現増大の効果を検査した。2 週間前にその一方の眼が AAV2 - GFP（n = 4）、AAV2 - Nrf2（n = 8）または AAV2 - Sod2（n = 8）に感染した野生型マウスを麻酔し、視神経を挫傷させた。挫傷 2 週間後に、動物を屠殺し、網膜のフラットマウントを調製し、RGC マーカー、ニューロンベータ III / チュープリンマーカー TUJ1 および 軸索再生マーカー、GAP43 による免疫組織化学的染色により、RGC の数を計数した。図 26 に実証されている通り、Nrf2 または Sod2 による処置は、軸索再生を増大させなかつたが（図 26B）、Nrf2 および Sod2 の両方は、AAV2 - GFP による処置と比較して、RGC 生存を有意に促進した（図 26A）。したがって、1 種または複数の抗酸化防御タンパク質の発現増大は、被験体における緑内障等、網膜障害の処置に有用である。

【0228】

均等物

当業者であれば、本明細書に記載されている本発明の特異的な実施形態の多くの均等物を認識できよう、あるいは単なるルーチン実験法を使用してそれを確かめることができる。このような均等物は、次の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

10

20

30

【図1】

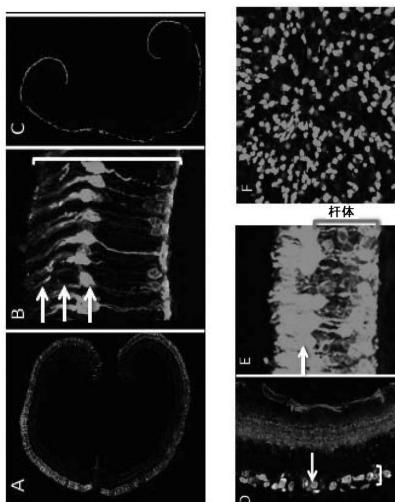
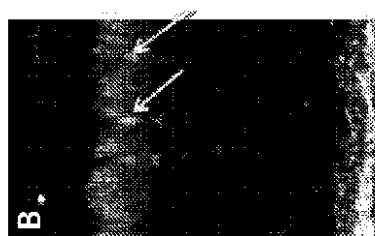


Figure 1

【図2 B】



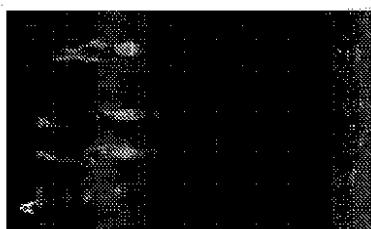
B

【図2 C】



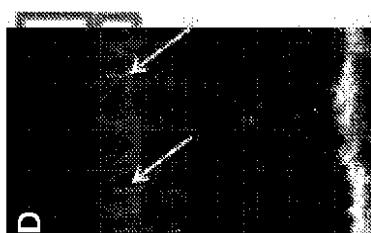
C

【図2 A】



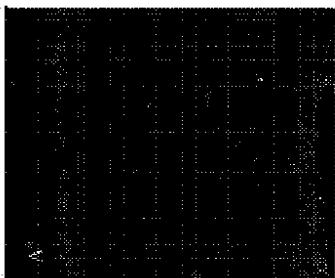
A

【図2 D】



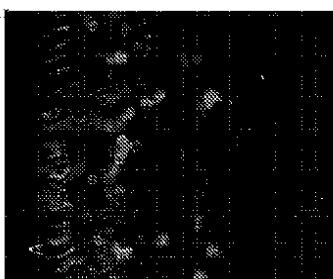
D

【図3 B】



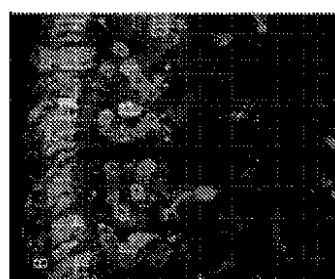
B

【図3 A】



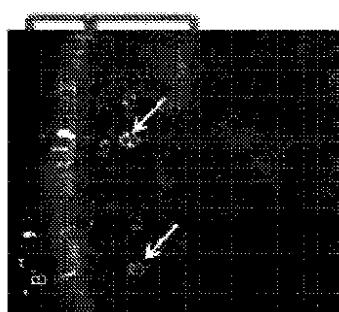
A

【図3 C】



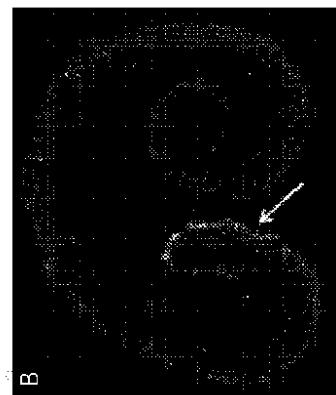
C

【図3D】



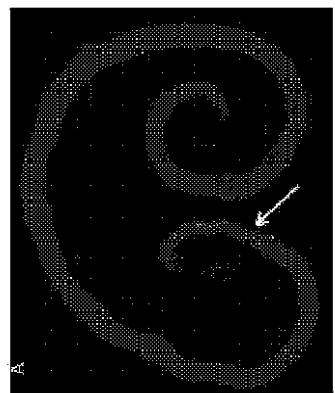
D

【図4B】



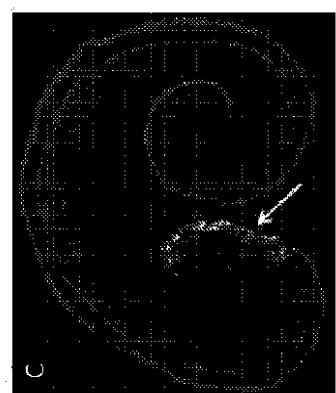
B

【図4A】



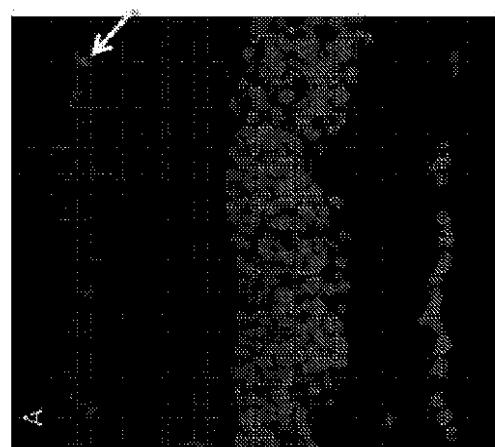
A

【図4C】



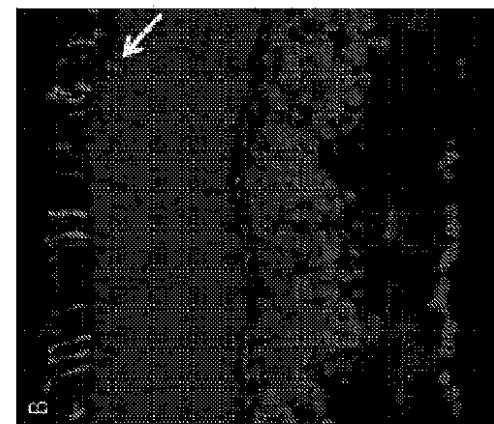
C

【図5A】



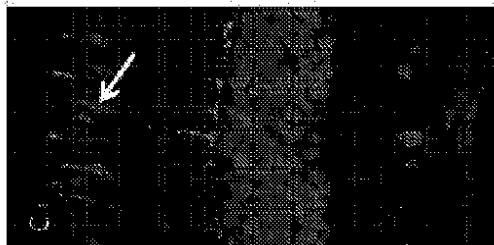
A

【図5B】



B

【図5C】

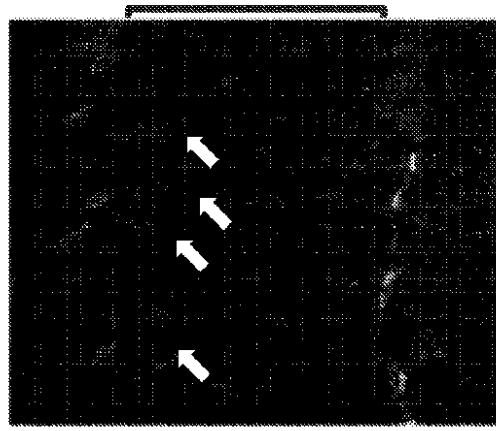


C

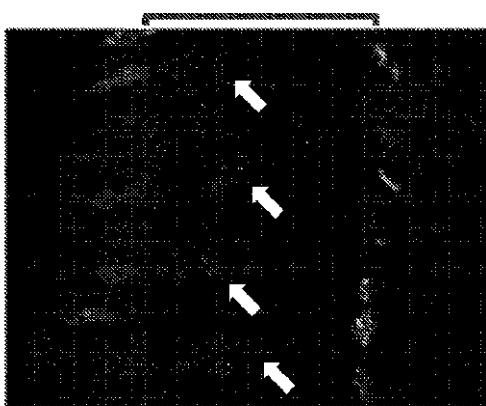
【図 6 A】

**A**

【図 6 B】

**B**

【図 6 C】

**C**

【図 7】



Figure 7

【図8】

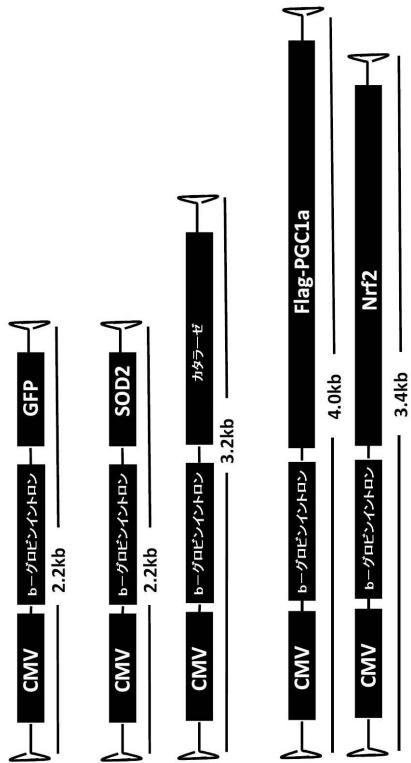


Figure 8

【図9】

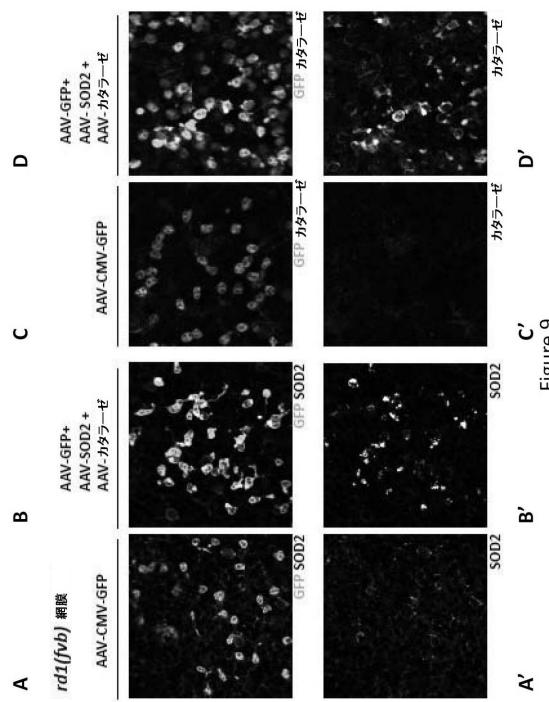
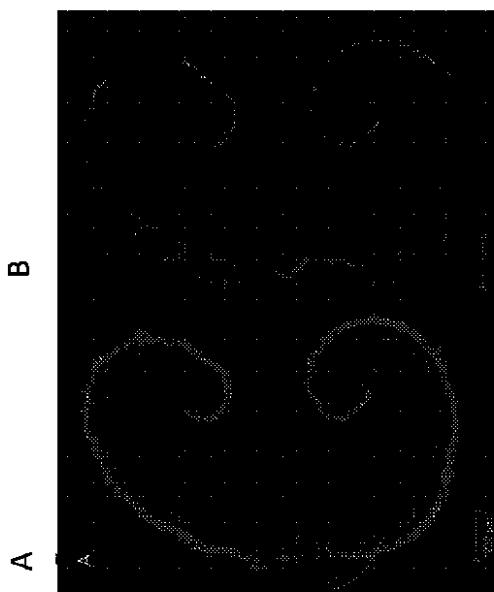
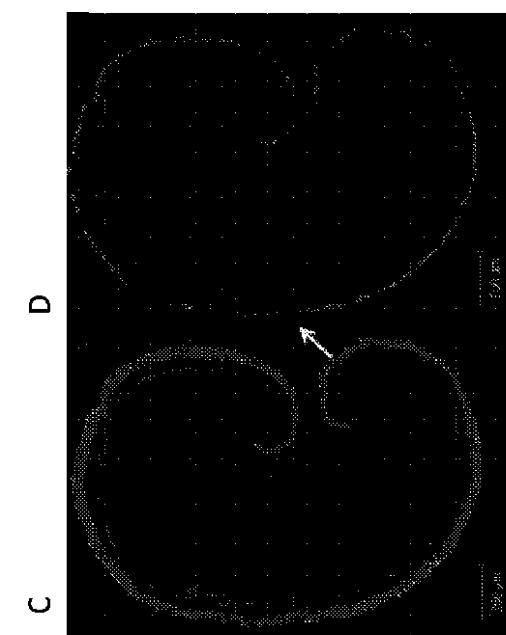


Figure 9

【図10 A B】



【図10 C D】



【図 1 1】

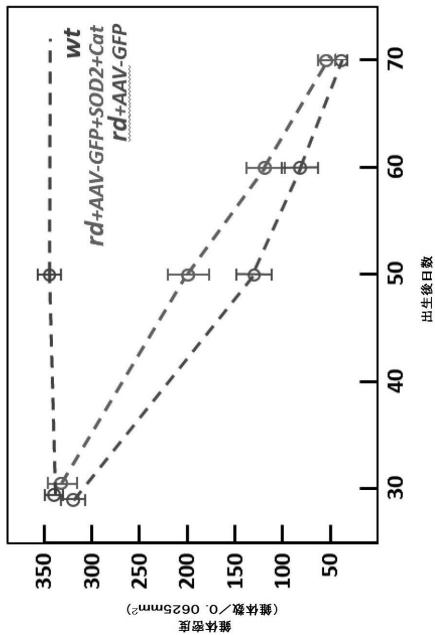


Figure 11

【図 1 2】

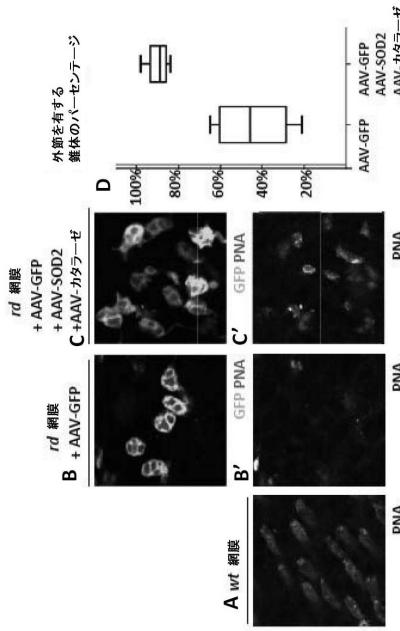


Figure 12

【図 1 3】

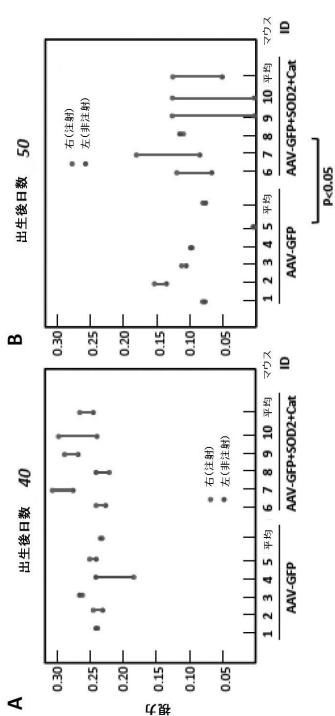


Figure 13

【図 1 4】

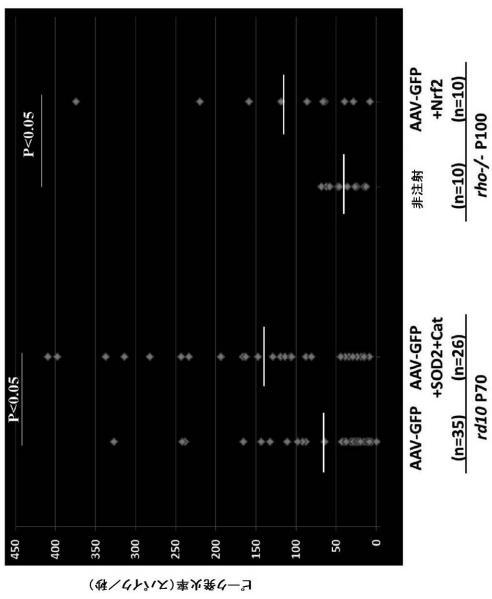
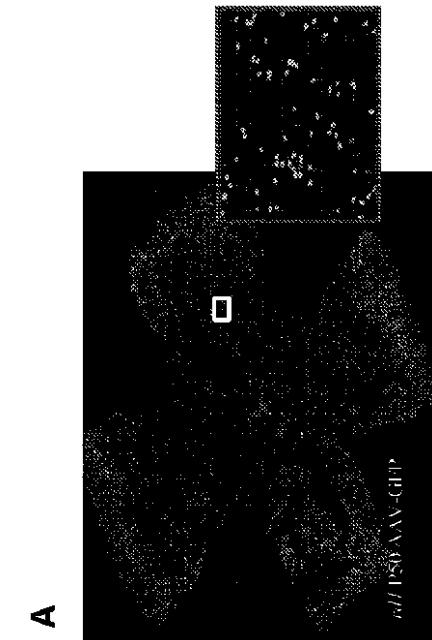
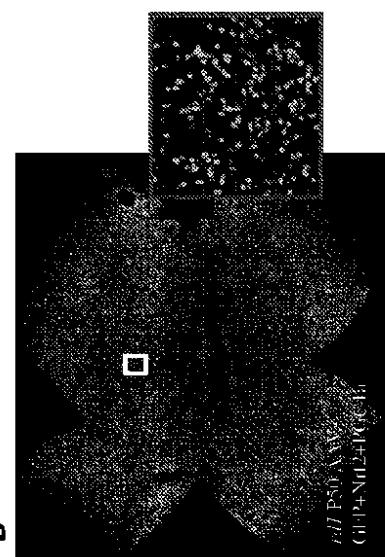


Figure 14

【図 15 A】



【図 15 B】



【図 16】

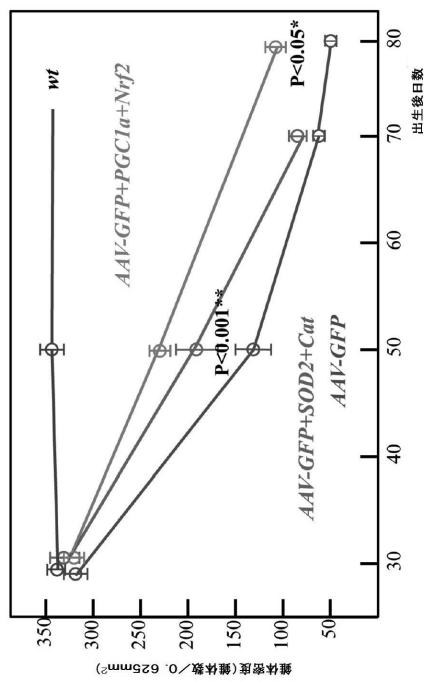


Figure 16

【図 17】

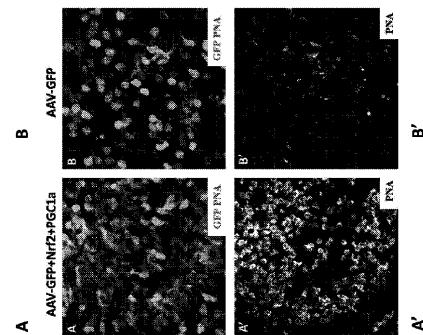
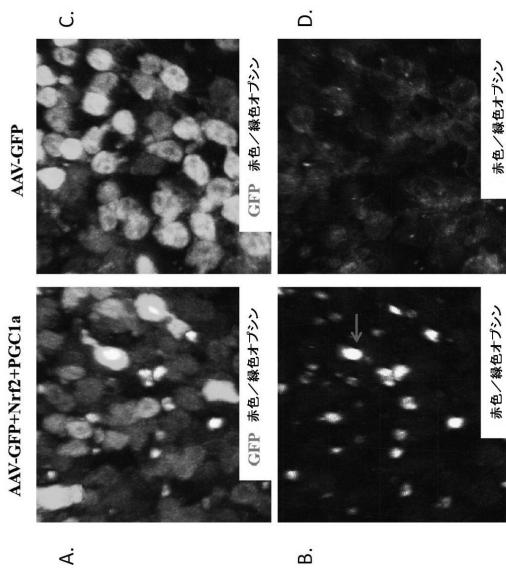


Figure 17

【図 18】



【図 19】

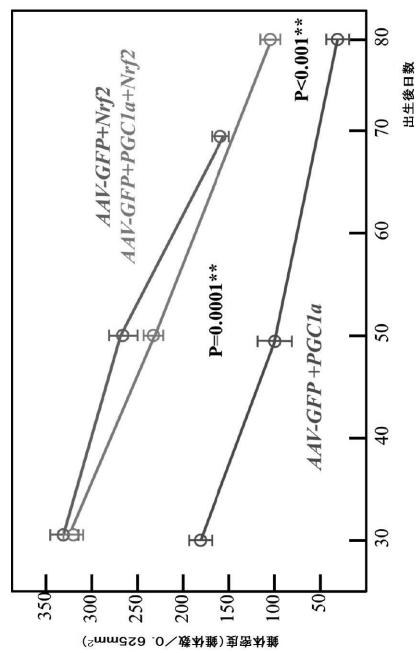


Figure 19

【図 20】

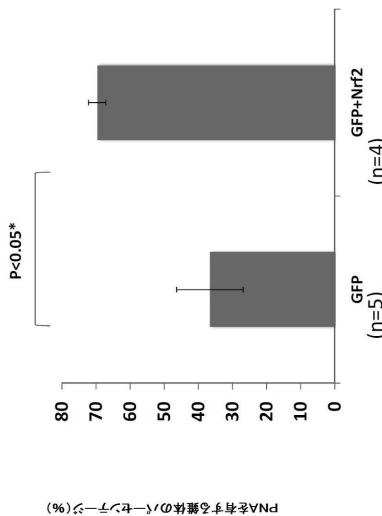


Figure 20

【図 21】

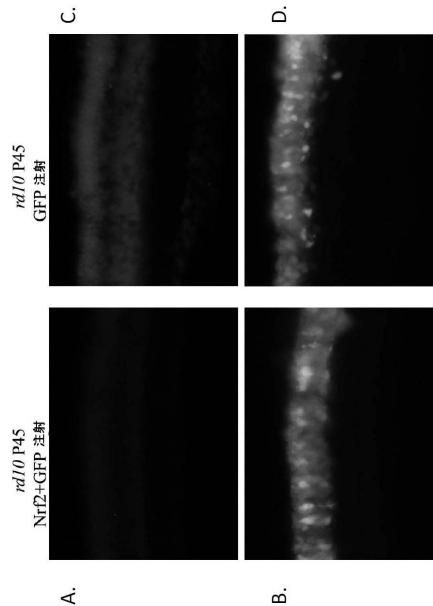


Figure 21

【図22】

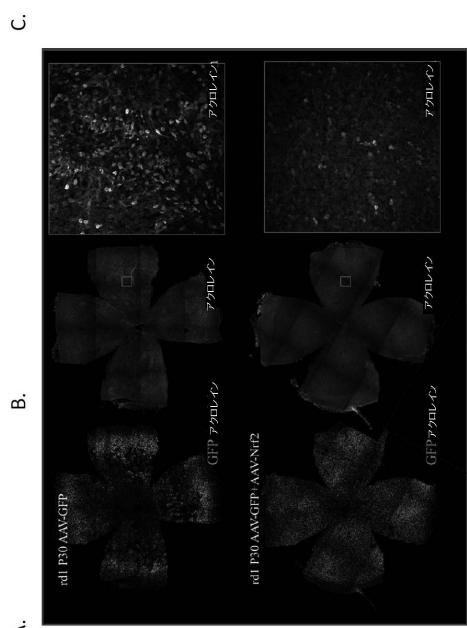
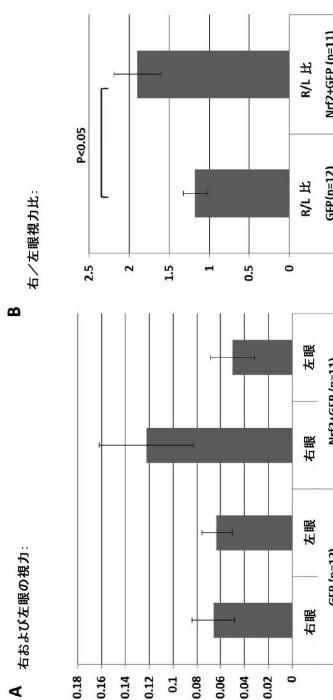


Figure 22

【図23】



右／左眼握力比:
GFP : 0.6
Nrf2+GFP : 1.0
Nrf2-GFP : 1.8

Figure 23

【図24】

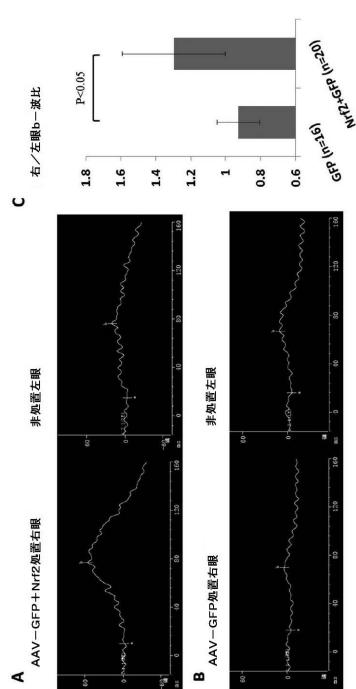


Figure 24

【図25】

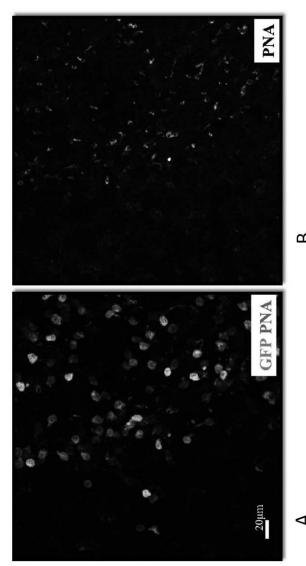


Figure 25

【図 26】

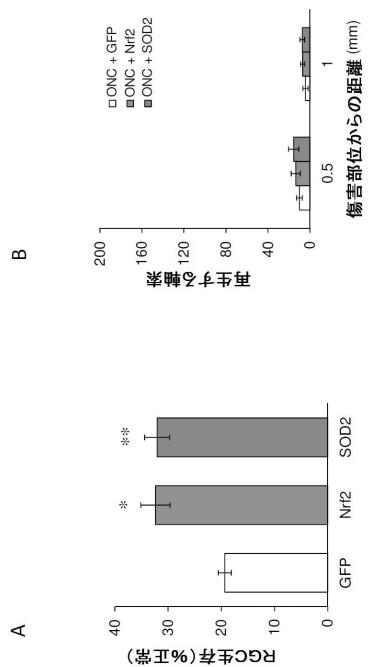


Figure 26

フロントページの続き

(72)発明者 シヨン， ウエンジュン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02215， ボストン， ブルックリン アベニュー 4
00， アパートメント ナンバー9イー

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 Hum Gene Ther , 2004年, Vol.15, No.10, p.960-967

J Biol Chem , 2012年, Vol.287, No.3, p.1642-1648

Free Radical Biology & Medicine , 2012年, Vol.52, p.909-915

Diabetes , 2010年, Vol.59, p.2315-2325

Molecular Therapy , 2009年, Vol.17, No.5, p.778-786

Gene Therapy , 2008年, Vol.15, p.463-467

J Neurochem , 2013年 6月, Vol.127, p.669-680

PLoS One , 2012年, Vol.7, e31272

J Nutr Biochem , 2012年, Vol.23, No.8, p.994-1006

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 48 / 00

A 61 K 38 / 00

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)