

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7272795号

(P7272795)

(45)発行日 令和5年5月12日(2023.5.12)

(24)登録日 令和5年5月1日(2023.5.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 31/7088

請求項の数 54 (全44頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-545818(P2018-545818)

(86)(22)出願日 平成29年3月1日(2017.3.1)

(65)公表番号 特表2019-511216(P2019-511216
A)

(43)公表日 平成31年4月25日(2019.4.25)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/020289

(87)国際公開番号 WO2017/151823

(87)国際公開日 平成29年9月8日(2017.9.8)

審査請求日 令和2年2月26日(2020.2.26)

(31)優先権主張番号 62/398,451

(32)優先日 平成28年9月22日(2016.9.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/302,122

(32)優先日 平成28年3月1日(2016.3.1)

最終頁に続く

(73)特許権者 507371168

ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ
ファンデーション インコーポレーティ
ッドアメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビ
ル グリントー ホール 2 2 3

(73)特許権者 500429103

ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ ペンシルバニアアメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ
ニア州 フィラデルフィア シビック セ
ンター ブールバード 3 6 0 0 ナインス
フロア

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 優性網膜色素変性の治療のためのA A Vベクター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ロドプシンを標的とするRNAを含む合成リボ核酸(RNA)分子であって、ロドプシンを標的とするRNAが、配列GUGGCAUUCUACAUCUUCACA(配列番号7)からなるセンス鎖および配列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(配列番号8)からなるアンチセンス鎖からなる、合成リボ核酸(RNA)分子。

【請求項2】

合成RNA分子が低分子干渉RNA(sRNA)である、請求項1に記載の合成RNA分子。

【請求項3】

合成RNA分子が低分子ヘアピン型RNA(shRNA)である、請求項1に記載の合成RNA分子。

【請求項4】

shRNAが、配列UCAAGAG(配列番号9)のRNA、または配列UGUGCUU(配列番号10)のRNAを含むループを有する、請求項3に記載の合成RNA分子。

【請求項5】

合成RNA分子が人工マイクロRNA(miRNA)である、請求項1に記載の合成RNA分子。

【請求項6】

人工miRNAが配列UGCUGUUGACAGUGAGCGA(X)_nUAGUGA

10

20

A G C C A C A G A U G U A (Y)_n C U G C C U A C U G C C U C G G A (配列番号 19) の R N A を含み、(X)_n が配列番号 7 であり、(Y)_n が配列番号 8 である、請求項 5 に記載の合成 R N A 分子。

【請求項 7】

さらに 5' 末端および / または 3' 末端に不対合突出配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の合成 R N A 分子。

【請求項 8】

不対合突出配列が反復塩基配列を含む、請求項 7 に記載の合成 R N A 分子。

【請求項 9】

反復塩基配列が反復ウラシル (U) 塩基を含む、請求項 8 に記載の合成 R N A 分子。

10

【請求項 10】

不対合突出配列が U U である、請求項 9 に記載の合成 R N A 分子。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の合成 R N A 分子を含む組成物。

【請求項 12】

さらに 1 つ以上の生理学的に許容される担体および / または 1 つ以上の生理学的に許容されるアジュバントを含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

a) 請求項 3 もしくは 4 に記載の s h R N A ; または

b) 請求項 5 もしくは 6 に記載の人工 m i R N A

20

をコードするベクター。

【請求項 14】

s h R N A が配列番号 17 または 18 の R N A である、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 15】

ベクターが発現プラスミドである、請求項 13 または 14 に記載のベクター。

【請求項 16】

ベクターがウイルスベクターである、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 17】

ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項 16 に記載のウイルスベクター。

30

【請求項 18】

非ヒト対象における R H O 発現を低減させる方法であって、請求項 11 もしくは 12 の組成物、または、請求項 13 ~ 17 のいずれか一項に記載のベクターを対象に投与することを含む、方法。

【請求項 19】

非ヒト対象において網膜色素変性 (R P) を治療する方法であって、

a) 請求項 11 もしくは 12 の組成物、または、請求項 13 ~ 17 のいずれか一項に記載のベクター ; および

b) a) の組成物またはベクターの干渉 R N A が標的とする配列を含有しない、組換え r h o 遺伝子 ;

40

の両方を対象に投与することを含む、方法。

【請求項 20】

R P を治療することが、r h o 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子をサイレンシングすることを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

組換え r h o 遺伝子が r A A V を用いて送達される、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

干渉 R N A および組換え r h o 遺伝子が同一の r A A V を用いて送達される、請求項 2

50

1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

干渉 RNA および組換え rho 遺伝子が両方とも、単一のプロモーター配列の発現制御下にある、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

干渉 RNA および組換え rho 遺伝子がそれぞれ、別のプロモーター配列の発現制御下にある、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

干渉 RNA が shRNA であり、shRNA が RNA ポリメラーゼ III プロモーターの発現制御下にある、請求項 2 4 に記載の方法。

10

【請求項 2 6】

干渉 RNA が人工 miRNA であり、人工 miRNA が RNA ポリメラーゼ II プロモーターの発現制御下にある、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

組換え rho 遺伝子が構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターの発現制御下にある、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

非ヒト対象が哺乳動物である、請求項 1 9 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

哺乳動物がげっ歯類またはイヌである、請求項 2 8 に記載の方法。

20

【請求項 3 0】

組換え rho 遺伝子が配列番号 4 2 と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

組換え rho 遺伝子が配列番号 4 2 を含む、請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

RHO 発現を低減させるための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の合成 RNA 分子または請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のベクターを含む組成物。

30

【請求項 3 3】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の合成 RNA 分子または請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のベクターを含み、当該合成 RNA 分子またはベクターの干渉 RNA が標的とする配列を含有しない組換え rho 遺伝子と組み合わせ投与されることを特徴とする、網膜色素変性 (RP) を治療するための組成物。

【請求項 3 4】

RP を治療することが、rho 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子をサイレンシングすることを含む、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

組換え rho 遺伝子が rAAV を用いて送達される、請求項 3 3 または 3 4 に記載の組成物。

40

【請求項 3 6】

干渉 RNA および組換え rho 遺伝子が同一の rAAV を用いて送達される、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

干渉 RNA および組換え rho 遺伝子が両方とも、単一のプロモーター配列の発現制御下にある、請求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

干渉 RNA および組換え rho 遺伝子がそれぞれ、別のプロモーター配列の発現制御下にある、請求項 3 6 に記載の組成物。

50

【請求項 39】

干渉RNAがshRNAであり、shRNAがRNAポリメラーゼIIIプロモーターの発現制御下にある、請求項38に記載の組成物。

【請求項 40】

干渉RNAが人工miRNAであり、人工miRNAがRNAポリメラーゼIIIプロモーターの発現制御下にある、請求項38に記載の組成物。

【請求項 41】

組換えrho遺伝子が構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターの発現制御下にある、請求項39または40に記載の組成物。

【請求項 42】

組換えrho遺伝子が配列番号42を含む、請求項33~41のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 43】

RPが常染色体優性網膜色素変性(adRP)である、請求項33~42のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 44】

網膜色素変性(RP)を治療するための医薬の製造における、請求項1~10のいずれか一項に記載の合成RNA分子または請求項13~17のいずれか一項に記載のベクター、および、当該合成RNA分子またはベクターの干渉RNAが標的とする配列を含有しない組換えrho遺伝子の使用。

【請求項 45】

RPを治療することが、rho遺伝子の一方または両方の対立遺伝子をサイレンシングすることを含む、請求項44に記載の使用。

【請求項 46】

組換えrho遺伝子がrAAVを用いて送達される、請求項44または45に記載の使用。

【請求項 47】

干渉RNAおよび組換えrho遺伝子が同一のrAAVを用いて送達される、請求項46に記載の使用。

【請求項 48】

干渉RNAおよび組換えrho遺伝子が両方とも、単一のプロモーター配列の発現制御下にある、請求項47に記載の使用。

【請求項 49】

干渉RNAおよび組換えrho遺伝子がそれぞれ、別のプロモーター配列の発現制御下にある、請求項47に記載の使用。

【請求項 50】

干渉RNAがshRNAであり、shRNAがRNAポリメラーゼIIIプロモーターの発現制御下にある、請求項49に記載の使用。

【請求項 51】

干渉RNAが人工miRNAであり、人工miRNAがRNAポリメラーゼIIIプロモーターの発現制御下にある、請求項49に記載の使用。

【請求項 52】

組換えrho遺伝子が構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターの発現制御下にある、請求項50または51に記載の使用。

【請求項 53】

組換えrho遺伝子が配列番号42を含む、請求項44~52のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 54】

RPが常染色体優性網膜色素変性(adRP)である、請求項44~53のいずれか一項に記載の使用。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本出願は、2016年3月1日に出願された米国仮特許出願第62/302,122号、および2016年9月22日に出願された米国仮特許出願第62/398,451号の利益を主張するものであり、これらのそれぞれの内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の支援

本発明は、国立衛生研究所によって付与された補助金番号R24-EY022012による政府の支援によってなされた。

【背景技術】

【0003】

背景

常染色体優性網膜色素変性 (adRP) は、12,000人に1人に発症する失明に至る疾病である。これらの個体のうちかなりの割合が、網膜の光受容細胞の集光性色素タンパク質である、ロドプシンの遺伝子 (rho) に変異を有する。この疾患は、いずれかの親からの変異した遺伝子の遺伝が網膜の変性と最終的な失明につながるため、優性である。rhoで特定された100を超える異なる変異が、失明につながる。現在のところ、adRPに対する承認された薬物療法または遺伝子療法の治療はない。従って、adRPおよび関連する症状の、ありとあらゆる原因に関する、有効な治療選択肢が必要である。

【発明の概要】

【0004】

概要

本出願の局面は、対象における（例えば、ヒトにおける）網膜色素変性（例えば、優性網膜色素変性）を治療するための組成物および方法に関連する。いくつかの実施形態において、対象のロドプシン遺伝子 (rho 遺伝子) の対立遺伝子の一方または両方を、干渉RNA分子を対象（例えば、網膜色素変性を有する対象であって、例としては優性網膜色素変性を有するヒト）に投与することによりサイレンシングする。いくつかの実施形態において、置換rho遺伝子もまた対象に投与して、対象に光受容細胞の機能を回復させる、機能性RHOTANパク質を提供する。いくつかの実施形態において、置換rho遺伝子は、内在性遺伝子の対立遺伝子と比較して1つ以上のヌクレオチド置換を有しており、これが、該置換遺伝子を干渉RNAの効果に対して耐性にする。いくつかの実施形態において、置換rho遺伝子は、rho遺伝子を、干渉RNA分子により仲介される分解に対して耐性にする（「硬化する (hardened)」とも呼ばれる）、1つ以上の（例えば、1、2、3、4、5つ以上の）置換を含む、ヒトrho遺伝子（例えば、野生型ヒトrho遺伝子）である。いくつかの実施形態において、1つ以上のヌクレオチド置換は、rho遺伝子のコード配列に存在する。いくつかの実施形態において、1つ以上のヌクレオチド置換はサイレントである（例えば、RHOTANパク質のアミノ酸配列を変化させない）。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換はアミノ酸の変化を導入するが、結果として生じるRHOTANパク質は、（少なくとも部分的な視力または正常な視力を回復または維持するのに）治療的に有効であるために十分に機能する。

【0005】

いくつかの実施形態において、干渉RNAおよび/または置換遺伝子は、任意の好適な技術を用いて対象に送達され得る。いくつかの実施形態において、干渉RNAは、干渉RNAをコードする遺伝子の形態で対象に提供される。いくつかの実施形態において、干渉RNAをコードする遺伝子は、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) で対象に提供される。いくつかの実施形態において、置換遺伝子は、rAAVで対象に提供される。いくつかの実施形態において、干渉RNAと置換遺伝子とをコードする遺伝子は、同一のrAAV

10

20

30

40

50

Vで提供される（例としては、それらは両方とも、AAV逆位末端反復配列（ITR）が隣接する同一の組換えゲノム上にコードされている）。いくつかの実施形態において、両方の遺伝子は、同一のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、これらの遺伝子は、2つの異なるプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、干渉RNAと置換遺伝子とをコードする遺伝子は、異なるrAAVで提供される。

【0006】

いくつかの実施形態において、干渉RNAは：

- a) 配列CUGCCUACAUUUUCUGCU（配列番号1）のセンス鎖および配列AGCAGAAACAUGUAGGCAG（配列番号2）のアンチセンス鎖；
- b) 配列CCUACAUUUUCUGCUGAU（配列番号3）のセンス鎖および配列AUCAGCAGAAACAUGUAGG（配列番号4）のアンチセンス鎖；
- c) 配列GCAUGGUCAUCAUCAUGGU（配列番号5）のセンス鎖および配列ACCAUGAUGAUGACCAUGC（配列番号6）のアンチセンス鎖；または
- d) 配列GUGGC AUUCUACAUCUUCA（配列番号7）のセンス鎖および配列UGAAGAUGUAGA AUGCCAC（配列番号8）のアンチセンス鎖；

を含む、合成リボ核酸（RNA）分子である。

【0007】

いくつかの実施形態において、合成RNA分子は低分子干渉RNA（siRNA）である。いくつかの実施形態において、干渉RNAは低分子ヘアピン型RNA（shRNA）である。いくつかの実施形態において、shRNAは配列UCAAGAGのRNA（配列番号9）、または、配列UGUGCUUのRNA（配列番号10）を有するループを含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、合成RNA分子は、人工マイクロRNA（miRNA）である。いくつかの実施形態において、人工miRNAは、UGCUGUUGACAGUGAGCGA（X）_nUAGUGAAGCCACAGAUGUA（Y）_nCUGCCUACUGCCUCGGA（配列番号19）

のRNA配列を有し：

- a) （X）_nが配列番号1を含み、（Y）_nが配列番号2を含む；
- b) （X）_nが配列番号3を含み、（Y）_nが配列番号4を含む；
- c) （X）_nが配列番号5を含み、（Y）_nが配列番号6を含む；または
- d) （X）_nが配列番号7を含み、（Y）_nが配列番号8を含む。

【0009】

いくつかの実施形態において、上記または本明細書の他の箇所に記載された合成RNAは、さらに、5'末端および/または3'末端に不対合突出配列を含む。いくつかの実施形態において、不対合突出配列は反復塩基配列を含む。いくつかの実施形態において、反復塩基配列は反復ウラシル（U）塩基を含む。いくつかの実施形態において、不対合突出配列はUUである。

【0010】

いくつかの実施形態において、組成物（例えば、対象に投与するための組成物）は、上記または本明細書の他の箇所に記載された干渉RNA（例えば、合成RNA分子）の1つ以上（例えば、2、3、または4つ）を含む。いくつかの実施形態において、組成物（例えば、対象に投与するための組成物）は、上記または本明細書の他の箇所に記載された干渉RNA（例えば、合成RNA分子）の1つ以上（例えば、2、3、または4つ）をコードする核酸（例えば、DNA）を含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、組成物はまた、1つ以上の生理学的に許容される担体、および/または1つ以上の生理学的に許容されるアジュバントを含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、ベクターは、1つ以上の（1、2、3、または4つ以上の）、（例えば、上記または本明細書の他の箇所に記載される）shRNAおよび/また

10

20

30

40

50

は人工 *miRNA* をコードする。いくつかの実施形態において、*shRNA* は、配列番号 11 ~ 18 の 1 つ以上の配列を有する。

【0013】

いくつかの実施形態において、ベクターは置換 *rho* 遺伝子をコードする。

【0014】

いくつかの実施形態において、ベクターは、置換 *rho* 遺伝子、並びに / または、1 つ以上の、(例えば、上記または本明細書の他の箇所に記載される) *shRNA*、および / もしくは、人工 *miRNA* をコードする。

【0015】

いくつかの実施形態において、ベクターは発現プラスミドである。いくつかの実施形態において、ベクターは組換えウイルスゲノム (例えば、*rAAV* ゲノム) である。いくつかの実施形態において、ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは *rAAV* ゲノムを含む。

10

【0016】

いくつかの実施形態において、対象における *RHO* 発現を低減させる方法は、1 つ以上の干渉 *RNA*、および / または、上記または本明細書の他の箇所に記載される 1 つ以上の干渉 *RNA* をそれぞれコードする (例えば、発現することができる) 1 つ以上のベクターを、対象に投与することを含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、対象において網膜色素変性 (*RP*) を治療する方法は、干渉 *RNA* または干渉 *RNA* を発現するベクターを含む組成物と、組換え *rho* 遺伝子を含む組成物 (例としては、組換え *rho* 遺伝子をコードするベクター) とを、共に投与することを含み、ここで該 *rho* 遺伝子は該干渉 *RNA* による標的化に耐性がある。

20

【0018】

いくつかの実施形態において、組換え *rho* 遺伝子は、*rAAV* を用いて送達される。いくつかの実施形態において、干渉 *RNA* および組換え *rho* 遺伝子は、同一の *rAAV* を用いて送達される。いくつかの実施形態において、干渉 *RNA* および組換え *rho* 遺伝子が両方とも、単一のプロモーター配列の発現制御下にある。いくつかの実施形態において、干渉 *RNA* および組換え *rho* 遺伝子がそれぞれ、別のプロモーター配列 (例えば、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターのいずれか) の発現制御下にある。いくつかの実施形態において、干渉 *RNA* および / または改変 *rho* 遺伝子は、ヒトプロモーターまたは異なる種のプロモーター (例えば、ウイルスプロモーター、原核生物プロモーター、または真核生物プロモーター、例としては、非ヒト霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、ブタ、または他の種由来のプロモーター) の発現制御下にある (例えば、前記プロモーターに作動可能に連結されている)。いくつかの実施形態において、プロモーターは、*RNA* ポリメラーゼ *III* プロモーター (例えば、*H1 RNA* ポリメラーゼ *III* プロモーター) または、*RNA* ポリメラーゼ *II* プロモーター、または *RNA* ポリメラーゼ *I* プロモーターである。いくつかの実施形態において、干渉 *RNA* は *shRNA* であり、*shRNA* は *RNA* ポリメラーゼ *III* プロモーター (例えば、*H1 RNA* ポリメラーゼ *III* プロモーター) の発現制御下にある。いくつかの実施形態において、干渉 *RNA* は人工 *miRNA* であり、人工 *miRNA* は *RNA* ポリメラーゼ *II* プロモーターの発現制御下にある。いくつかの実施形態において、組換え *rho* 遺伝子は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター (例えば、ヒトプロモーター、眼特異的プロモーター) の発現制御下にある。いくつかの実施形態において、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターは、マウスプロモーター (例えば、マウスオプシン (*MOPs*) プロモーター) である。

30

40

【0019】

いくつかの実施形態において、対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物はげっ歯類またはイヌである。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒト (例えば、網膜色素変性、例としては優性網膜色素変性を有する、または有することが知られているヒト、例としては有すると診断されたヒト) である。これらの、および他の局面

50

は、以下の図面、実施例、および特許請求の範囲に記載されている。

【図面の簡単な説明】

【0020】

図面および以下の簡単な説明は、本明細書に記載される組成物および方法の局面の非限定的な例を提供する。

【0021】

【図1】図1A～図1Cは、FACS（蛍光標識細胞分取）により測定される、GFP標識したヒトロドプシンのノックダウンを示す。本実験は、293T細胞において、3回の生物学的反復試験（biological replicates）で行った。500ngのGFP標識したヒトRHODNAを、異なるsiRNAと同時トランスフェクトした。トランスフェクションは、LIPOFECTAMINE（登録商標）2000トランスフェクション試薬を用いて実施した。コントロールは、Dharmaconより購入した非ターゲティングsiRNAとした。サンプルを72時間インキュベートし、その後フローサイトメトリーで解析し、最初に前方散乱および側方散乱についてゲーティングして生育不能な粒子を除外し、次に、自己蛍光を超えるGFP発現についてゲーティングした。コントロールsiRNAで処理したGFP陽性細胞の数を100%に設定した。

10

【図2】図2は、shRNAによるRHOのノックダウンを示す。本実験は、293T細胞において、3回の生物学的反復試験で行った。200ngのGFP標識したヒトロドプシンを、H1プロモーターにより駆動されるshRNA131、765、または820のいずれかを含むpUC57と同時トランスフェクトした。サンプルを72時間インキュベートし、図1と同様に、RHOノックダウンをフローサイトメトリーで測定した。

20

【図3】図3は、shRNAが、変異および野生型RHO RNAの両方を切断することを示す。本実験は、293T細胞において2回の生物学的反復試験で、および3回のqRT-PCR反復試験でおこなった。200ngのGFP標識したヒトロドプシン（WT、T17MまたはP23H）を、LIPOFECTAMINE（登録商標）2000を用いて、rAAV-H1-shRNAプラスミド（131（配列番号11）、765（配列番号15）、または820（配列番号17））と同時トランスフェクトした。非ターゲティングshRNAは、無関係の光伝達タンパク質、桿体環状GMP感受性イオンチャネルのサブユニットを分解するように、設計した。サンプルを48時間インキュベートし、その後、qRT-PCR解析のために処理した。

30

【図4】図4は、miR30（配列番号28）の配列構成中の、siRNA131センス鎖（配列番号1）およびアンチセンス鎖（配列番号2）を示す。RNAポリメラーゼIIプロモーターから発現させた後、siRNAは前駆体から酵素Droshaによって核内で切り出され、Dicerによって細胞質内で切り出される。

【図5】図5A～図5Cは、イヌの網膜のブレブ（bleb）および非ブレブ領域から取得した生検パンチにおける、ロドプシンの免疫プロットを示す（図5A）。図5Bは、ヒストンに標準化された、ロドプシンモノマー量の定量化を示す。図5Cは、標準化された量を示す表である。

【図6】図6A～図6Bは、イヌのRHO RNAの絶対数を示す。図6Aは、イヌのRHO RNAの絶対数のプロットである。図6Bは、RNAの絶対数を示す表である。

40

【図7】図7A～図7Cは、イヌの網膜のブレブおよび非ブレブ領域から取得した生検パンチにおける、ロドプシンの免疫プロットを示す（図7A）。図7Bは、ヒストンに標準化された、ロドプシンモノマー量の定量化を示す。図7Cは、標準化された量を示す表である。

【図8】図8A～図8Bは、イヌのRHO RNAの絶対数を示す。図8Aは、イヌのRHO RNAの絶対数のプロットである。図8Bは、RNAの絶対数を示す表である。

【図9】図9は、shRNAと、内在性ヒトRHOMRNAまたは、硬化RHOMRNAの標的配列との間に生じる例示的な塩基対形成を表す。全てのshRNAは、イヌのRHOMRNAの標的配列と、完全に塩基対を形成する。白四角：shRNAと、内在性イヌRHOMRNA並びに硬化RHOMRNAとの間のミスマッチ。濃灰色四角：RNAのグ

50

アノシンとウラシルとの間に生じる弱いゆらぎ塩基対形成。薄灰色四角：shRNAと硬化RHOMRNAとの間のみのミスマッチ。配列はそれぞれ、配列番号29-37に上から下に対応する。

【図10】図10は、shRNA134と、内在性ヒトRHO131mRNAまたは、硬化RHO131mRNAの標的配列との間に生じる例示的な塩基対形成を表す。shRNA131および134の標的配列の近接(proximity)は、同じ硬化RHO131を使用することを可能にする。濃灰色四角：RNAのグアノシンとウラシルとの間に生じる弱いゆらぎ塩基対形成。薄灰色四角：shRNAと硬化RHOMRNAとの間のみのミスマッチ。配列はそれぞれ、配列番号38-40に上から下に対応する。

【図11】図11は、GFP標識したヒトRHOをコードするプラスミドの例示的なマップを表す。

10

【図12】図12A~図12Cは、siRNAをコードするプラスミド(図12Aおよび図12B)と、ヒトRHOをコードするプラスミド(図12C)のマップの非限定的な例を示す。

【図13】図13A~図13Eは、野生型RHO^{+/+}イヌにおける、網膜下に注射された異なるウイルス力価のAAV2/5-sc-H1-shRNA820による、ロドプシンノックダウンのRNAおよびタンパク質の解析を示す。図13Aは、ウェスタンブロット解析およびRNA定量に使用された生検パンチの位置を示す網膜地図を示す。対になった、濃灰色、灰色、ドットの丸は、ウェスタンブロットの各複製のためのプレブ/処理および非プレブ処理領域における、生検パンチの位置を示しており、一方で、黒丸は、RNA定量のための生検パンチの位置を示す。図13Bは、同じ網膜の非処理領域で測定されたレベルのパーセンテージとして、処理領域内に残存するイヌのロドプシンRNAを示す棒グラフを示す。図13Cは、イヌの網膜の処理(Tx)および非処理(Untx)領域から取得した生検パンチにおけるロドプシンの量を示す免疫プロットを示す。ヒストンH3を標準化のために用いた。棒グラフは、同じ網膜の非処理領域で測定されたレベルのパーセンテージとして、残存するイヌのロドプシンタンパク質を示す。図13Dは、RNAまたはタンパク質の残存率として報告された各実験の数値を示す表である。図13Eは、RNAまたはタンパク質のノックダウン率として報告された各実験の数値を示す別の表である。

20

【図14】図14A~図14Dは、野生型イヌにおける、異なる力価のAAV2/5-sc-H1-shRNA820の網膜下注射後の、ONLおよびELM/IS/OS完全性の評価を示す。図14Aは、ONLの厚さの図を示す。；図14Bは、ELM/IS/OSの標準化強度の図を示す；図14Cは、ONLの厚さの値を示す；および、図14Dは、ELM/IS/OS層の標準化強度の値を示す。

30

【図15】図15A~図15Eは、変異RHO^{T4R/+}イヌにおける、網膜下に注射された異なるウイルス力価のAAV2/5-sc-H1-shRNA820による、ロドプシンノックダウンのRNAおよびタンパク質の解析を示す。図15Aは、ウェスタンブロット解析およびRNA定量に使用された生検パンチの位置を示す網膜地図を示す。対になった、濃灰色、灰色およびドットの丸は、ウェスタンブロットの各複製のためのプレブおよび非プレブ領域における、生検パンチの位置を示しており、一方で、黒丸は、RNA定量のための生検パンチの位置を示す。図15Bは、同じ網膜の非処理領域で測定されたレベルのパーセンテージとして、残存するイヌのロドプシンRNA量を示す棒グラフである。図15Cは、イヌの網膜の処理(Tx)および非処理(Untx)領域から取得した生検パンチにおけるイヌのロドプシンの量を示す免疫プロットである。ヒストンH3を標準化のために用いた。棒グラフは、同じ網膜の非処理領域で測定されたレベルのパーセンテージとして、残存するイヌのロドプシンタンパク質量を示す。図15Dは、RNAまたはタンパク質の残存率として報告された各実験の数値を示す表である。図15Eは、RNAまたはタンパク質のノックダウン率として報告された各実験の数値を示す別の表である。

40

【図16】図16A~図16Dは、変異RHO^{T4R/+}イヌにおいて急性網膜変性を引き起こす短時間の光照射に暴露してから2週間後の、RHO^{T4R/+}イヌの、(異なるウイ

50

ルス力価の AAV2/5 - sc - H1 - shRNA820 による) 処理網膜領域および非処理網膜領域を含む OCT B スキャンを示す。(図 16A) 1×10^{12} vg/ml で処理したイヌの OCT スキャン。(図 16B) 5×10^{11} vg/ml で処理したイヌの OCT スキャン。(図 16C) 2.5×10^{11} vg/ml で処理したイヌの OCT スキャン。(図 16D) 1×10^{11} vg/ml で処理したイヌの OCT スキャン。

【図 17】図 17A - 図 17B は、光誘発性網膜変性からの防御を示す、AAV2/5 - sc - H1 - shRNA820 で処理した RHO^{T4R/+} 由来の、ONL の厚さの組織分布図を示す。(図 17A) 非処理の野生型コントロールイヌの ONL の厚さの図(左図)、および、 5×10^{11} vg/ml で AAV2/5 - sc - H1 - shRNA820 により処理した EM411 - OS の ONL の厚さの図であり、光誘発性ダメージ後数週間は、処理/ブレイブ領域において ONL の厚さが保存されることを示す。白黒曲線は、網膜下注射直後に見られるブレイブの境界を示す。下のパネルは、視覚化のために、ONL が濃灰色で色付けされた(中間のバンド) OCT B スキャンを示す。(図 17B) ブレイブの外側および内側の部位を、ONL の厚さ測定のために選択した。

【図 18】図 18 は、異なるウイルス力価の AAV2/5 - sc - H1 - shRNA820 を網膜下注射した、変異 RHO^{T4R/+} 網膜の処理(Tx)および非処理(UnTx)領域における、組織学(HE 染色)および免疫組織化学を示す(ロドプシンは緑に染色され、図 18 の下図では薄い染色として現れている; ヒト錐体アレスチンは赤に染色され、図 18 の下図では灰色の染色として現れている)。

【図 19】図 19A ~ 図 19F は、変異 RHO^{T4R/+} イヌにおける、 5×10^{11} vg/ml の力価で網膜下に注射された AAV2/5 - sc - HOP - RHO820 - H1 - shRNA820 による、ロドプシンのノックダウンおよび置換の RNA およびタンパク質の解析を示す。図 19A は、ウェスタンブロット解析および RNA 定量に使用された生検パンチの位置を示す網膜地図を示す。対になった、濃灰色、灰色、ドットの丸は、ウェスタンブロットの各複製のための処理(Tx)および非処理(UnTx)領域における、生検パンチの位置を示しており、一方で、黒丸は、RNA 定量のための生検パンチの位置を示す。図 19B は、イヌの網膜の処理(Tx)および非処理(UnTx)領域から取得した生検パンチにおける総ロドプシン量(イヌ + ヒト RHO820)を示す免疫プロットを示す。ヒストン H3 を標準化のために用いた。棒グラフは、処理および非処理領域におけるイヌのロドプシンタンパク質の残存率を示す。EM424 - OD および EM425 - OD の処理領域におけるより低い分子量のバンド(変異 T4R RHO タンパク質に対応する)の消失に留意されたい。図 19C は、タンパク質定量のために用いられるパンチの各対に対する数値を示す表である。図 19D は、非処理領域で測定されるイヌの RHO RNA のパーセンテージとして、処理領域における残存するイヌのロドプシン RNA を示す棒グラフである。図 19E は、非処理領域で測定されるイヌの RHO RNA のパーセンテージとして、処理領域におけるヒト RHO820 を示す棒グラフである。図 19F は、RNA 定量のために用いられるパンチの各対に対する数値を示す表である。

【図 20】図 20A ~ 図 20C は、 5×10^{11} / vg/ml の力価で、AAV2/5 - sc - HOP - RHO820 - H1 - shRNA820 により処理した、変異 RHO^{T4R/+} 網膜の領域における、光誘発性網膜変性からの防御を示す、インビボ網膜イメージングを示す。図 20A は、光照射の 2 週間後の、変性から防御された網膜領域(白矢印によって区切られた境界)を示す、正面の(en face) cSLO 合成画像を示す。薄灰色矢印は、図 20B で示された OCT B スキャンの処理領域の範囲内の位置を示し、濃灰色矢印は、図 20C で示された OCT B スキャンの非処理領域の範囲内の位置を示す。図 20B は、注射前、注射の 11 週間後、および注射の 13 週間後/光照射の 2 週間後の、処理領域の範囲内の OCT B スキャンを示す。ONL の厚さは、ウイルスベクター注射後の両方の時点における処理領域全体に渡って、保存されている。図 20B および図 30V は、注射前、注射の 11 週間後、および注射の 13 週間後/光照射の 2 週間後の、非処理領域の範囲内の OCT B スキャンを示す。ONL は、注射の 11 週間後まで保存されているが、光照射の 2 週間後には完全に失われている。

10

20

30

40

50

【図 2 1】図 2 1 は、光誘発性網膜変性からの防御を示す、 $5 \times 10^{11} / \text{vg} / \text{ml}$ の力価で AAV2/5 - sc - HOP - RHO820 - H1 - shRNA820 により処理した 2 つの RHO^{T4R/+} 由来の、ONL の厚さの組織分布図を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、 $5 \times 10^{11} / \text{vg} / \text{ml}$ の力価で、AAV2/5 - sc - HOP - RHO820 - H1 - shRNA820 を網膜下に注射した、変異 RHO^{T4R/+} 網膜の処理、移行ゾーン、および非処理領域における、免疫組織化学を示す（ロドプシンは緑に染色され、図 2 2 の図では薄い染色として現れている；ヒト錐体アレスチンは赤に染色され、図 2 2 の図では灰色の染色として現れている）。

【発明を実施するための形態】

【0022】

10

詳細な説明

本出願の局面は、対象において（例えば、優性網膜色素変性を有する対象において）、網膜色素変性を治療するために有用な方法および組成物を提供する。

【0023】

いくつかの実施形態において、（例えば、変異のまたは正常な）内在性ロドプシンの発現を、RNA 干渉を用いて減少させるか、または、抑制して、失われたタンパク質を、RNA 阻害物質の標的部位を除去するように操作された正常タンパク質の遺伝子を送達することによって置換する。

【0024】

いくつかの実施形態において、単一のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターが、RNA 物質（例えば、低分子ヘアピン型 RNA または人工 microRNA）および組換え rho 遺伝子の両方を送達するために用いられる。

20

【0025】

いくつかの実施形態において、低分子ヘアピン型 RNA、人工 microRNA（amiR）および/または RNA 酵素（リボザイム）は、マウス、ヒト、およびイヌに共通の配列を標的とすることによってロドプシン mRNA を分解するように設計することができる。これらの分子は、ヒト患者で機能し得る阻害物質を開発するために、細胞培養、マウス、および/またはイヌにおいて阻害を試験するのに有用であり得る。

【0026】

いくつかの実施形態において、ヒトおよびイヌの両方のロドプシン mRNA を標的とする低分子干渉核酸（例えば、RNA）が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトおよびイヌのロドプシン（RHO）mRNA を消化する 4 つの低分子干渉 RNA が、ヒトおよび動物において内因的に生成されるロドプシンを枯渇させる目的で提供される。いくつかの実施形態において、これらの干渉 RNA は、RHO の変異によって引き起こされる、網膜色素変性の優性遺伝型を有する対象において、ロドプシンの発現を標的とする。これらの変異のいくつかは、有毒な形態のタンパク質をもたらす、その合成は網膜の変性を防ぐためにサイレンシングされなければならない。

30

【0027】

いくつかの実施形態において、干渉核酸（例えば、RNA）は、変異 rho 遺伝子に特異的な配列を標的とするように設計される（例えば、干渉核酸は、変異 rho 遺伝子に存在し、野生型 rho 遺伝子に存在しない配列に相補的である）。しかし、いくつかの実施形態において、干渉核酸は、（例えば、干渉核酸により標的とされない他の位置に 1 つ以上の変異を有する）変異内在性 rho 遺伝子の野生型配列を標的とするように設計される。さらなる実施形態において、干渉核酸に耐性である機能的（例えば、野生型）rho 遺伝子が、対象における RHO 活性を回復させ、それによって、干渉核酸が標的とする変異内在性 rho 対立遺伝子に関連する疾患または障害の 1 つ以上の症状を治療するために、提供される。

40

【0028】

いくつかの実施形態において、1 つ以上の干渉 RNA は、プロモーター（例えば、RNA ポリメラーゼ III プロモーター、または、他の好適な構成的プロモーターもしくは誘

50

導性プロモーター)により駆動される低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、または、プロモーター(例えば、RNAポリメラーゼIIプロモーター、または、他の好適な構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーター)により駆動される人工microRNA (miRNA)のいずれかとして、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて送達され得る。

【0029】

いくつかの実施形態において、同じベクターが、正常なロドプシンをコードするが、ウイルスにより発現されたsiRNAの作用に対して耐性がある、遺伝子(cDNA)を発現する。

【0030】

干渉RNAの非限定的な例を、表1～4に提示する。

【表1】

表1：低分子干渉RNA (siRNA)

配列番号	名称	RNA配列
1	RH0131-S	CUGCCUACAUGUUUCUGCU
2	RH0131-A	AGCAGAAACAUGUAGGCAG
3	RH0134-S	CCUACAUGUUUCUGCUGAU
4	RH0134-A	AUCAGCAGAAACAUGUAGG
5	RH0765-S	GCAUGGUCAUCAUCAUGGU
6	RH0765-A	ACCAUGAUGAUGACCAUGC
7	RH0820-S	GUGGCAUUCUACAUCUUCA
8	RH0820-A	UGAAGAUGUAGAAUGCCAC

【表2】

表2：ヘアピンループRNA

配列番号	RNA配列
9	UCAAGAG
10	UGUGCUU

【表3】

表3：低分子ヘアピン型RNA (shRNA)

配列番号	名称	RNA配列
11	RH0131-9	CUGCCUACAUGUUUCUGCUUCAAGAGAGCAGAAACAUGUAGGCAG
12	RH0131-10	CUGCCUACAUGUUUCUGCUUGUGCUUAGCAGAAACAUGUAGGCAG
13	RH0134-9	CCUACAUGUUUCUGCUGAUUCAAGAGAUCAAGCAGAAACAUGUAGG
14	RH0134-10	CCUACAUGUUUCUGCUGAUUGUGCUUAGCAGAAACAUGUAGG
15	RH0765-9	GCAUGGUCAUCAUCAUGGUUCAAGAGACCAUGAUGAUGACCAUGC
16	RH0765-10	GCAUGGUCAUCAUCAUGGUUGUGCUUACCAUGAUGAUGACCAUGC
17	RH0820-9	GUGGCAUUCUACAUCUUCAAGAGUGAAGAUGUAGAAUGCCAC
18	RH0820-10	GUGGCAUUCUACAUCUUGUGCUUUGAAGAUGUAGAAUGCCAC

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4: マイクロ RNA (miRNA)

配列番号	名称	RNA配列
19	miR30	UGCUGUUGACAGUGAGCGA (X) _n UAGUGAAGCCACAGAUGUA (Y) _n CUGCCUACUGCCUCGGA*
*XおよびYは、それぞれ、A、U、C、またはGから選択される任意の塩基である； (X) _n は、n 個の塩基のセンス鎖配列に対応し、(Y) _n は、n 個の塩基のアンチセンス鎖に対応する。		

【0031】

いくつかの実施形態において、硬化された、正常な（例えば、野生型の）ロドプシン（*rho*）遺伝子は、ヒト *rho* 遺伝子に基づく配列を有し得（例えば、アクセッション番号 NG_009115.1 で示される配列；配列番号 41 とともに示される配列を有する）、または、mRNA もしくはそのタンパク質コード部分（例えば、配列番号 41 の 9970 - 11706 に連結した 8895 - 9134 に連結した 8613 - 8778 に連結した 7238 - 7406 に連結したヌクレオチド 5001 - 5456 によってコードされる mRNA、またはそのタンパク質コード部分、例としては、配列番号 41 の 9970 - 10080 に連結した 8895 - 9134 に連結した 8613 - 8778 に連結した 7238 - 7406 に連結したヌクレオチド 5096 - 5456 からなるコード配列）に基づく配列を有し得る。いくつかの実施形態において、正常な *rho* 遺伝子の配列は、治療される対象における変異内在性 *rho* 遺伝子の発現を減少させるために、ノックダウン物質として用いられる 1 つ以上の干渉 RNA に対して、置換 *rho* 遺伝子を耐性にする 1 つ以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個以上の）変異を含むように、改変される。しかしながら、いくつかの実施形態において、改変されていない正常な（例えば、野生型の）配列を有する組換え *rho* 遺伝子が、治療される対象において標的とされる内在性 *rho* 遺伝子または対立遺伝子とは異なる配列を有する場合、および、用いられるノックダウン物質が、内在性 *rho* 遺伝子または対立遺伝子を標的とし提供される組換え *rho* 遺伝子を標的としないように設計されている場合に、改変されていない正常な（例えば、野生型の）配列を有する組換え *rho* 遺伝子が用いられ得る。いくつかの実施形態において、治療される対象とは異なる種由来の *rho* 遺伝子が用いられ得る。しかしながら、いくつかの実施形態において、*rho* 遺伝子（例えば、改変 *rho* 遺伝子）は、治療される対象と同じ種由来であり得る。いくつかの実施形態において、組換え *rho* 遺伝子における 1 つ以上の改変は、コード配列の核酸配列を変化させるが、コードされるタンパク質は変化させない（例えば、それらはサイレント変異であり、例としては、コードされるアミノ酸を変化させることなく、2 つ以上の異なるヌクレオチドのうちの 1 つを含み得る、コドンの第 3 の位置での変異である）。いくつかの実施形態において、組換え *rho* 遺伝子は、野生型 *rho* 遺伝子のイントロン配列を含まない。いくつかの実施形態において、組換え *rho* 遺伝子は、干渉 RNA に対して耐性があるように改変された *rho* 遺伝子の mRNA（またはそのタンパク質コード部分）をコードする。いくつかの実施形態において、組換え *rho* 遺伝子は、干渉 RNA に対して耐性があるように改変された野生型コード配列を含む。いくつかの実施形態において、改変された野生型コード配列は、野生型 *rho* mRNA に由来しない上流および/または下流の mRNA 配列と共に、提供される。いくつかの実施形態において、組換え置換 *rho* 遺伝子は配列番号 42 を含む。配列番号 42（以下に示す）は、820 と呼ばれる干渉 RNA の一例（本明細書に記載される siRNA 820 または shRNA 820）に、耐性がある。本明細書に記載される 820 干渉 RNA 配列は、図 9 に示すように内在性ヒト *rho* mRNA の対応する配列を標的とするが、配列番号 42 は、それを 820 干渉 RNA による標的化に耐性とする 4 つの置換（以下で下線および太字で示し、配列番号 41 の、位置 9014、9017、9020 および 9023 に対応する）を含む。配列番号 42 のコード配列は、配列番号 42 の位置 88 から開始する。いくつかの実施形態において、送達される組換え *rho* 遺伝子は、配列番

10

20

30

40

50

号 4 2 のコード配列を含み得る（例えば、配列番号 4 2 の位置 8 8 から開始する）が、異なる上流の mRNA 配列を伴うことができる。いくつかの実施形態において、組換え rho 遺伝子は 1 つ以上の他の配列の改変を（さらに、または、代替として）有して、さらなる、または、代替の干渉 RNA（例えば、本明細書において配列が提供されている他の干渉 RNA）に耐性となることができる。いくつかの実施形態において、対象における内在性 rho コード配列の異なる領域を標的とする 1 つ以上の干渉 RNA が用いられ得る。

【 0 0 3 2 】

配列番号 4 2（改変「硬化」組換えヒト rho 遺伝子の非限定的な例）

【表 5】

```
CCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGGAGCAGCCACGGGTCAGCCACAAGGGC
CACAGCCATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACGCAGCCCCTTCG
AGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCTACATGTTTCTGCTGATCGTGCTGGGC
TTCCCCATCAACTTCTCAGCTCTACGTACCGTCCAGCACAAGAAGCTGCGCACGCCTCTCAACTACATCCTGCTCAA
CCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCTTAGGTGGCTTACCAGCACCTCTACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTCT
TCGGGCCCCACAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCCTG
GCCATCGAGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGC
CTTCACCTGGGTGATGGCGCTGGCTGCGCCGACCCCCACTCGCCGGTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGT
GCTCGTGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTCTATCTACATGTTCTGTTCCAC
TTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTCTGCTATGGGCAGCTCGTCTTACCCTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCA
GGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAGGTCAACCGCATGGTTCATCATCATGGTTCATCGCTTTTCTGATCTGCT
GGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCTTTTATATATTTACCCACCAGGGCTCCAATTCGGTCCCATCTTCATGACCATCCC
AGCGTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCATCTACAACCTGTCTATATCATGATGAACAAGCAGTTCGGGAACGTCATGC
TCACCACCATCTGCTGCGGAAGAACCCTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAG
GTGGCCCCGGCCTAA
```

【 0 0 3 3 】

従って、本明細書の組成物は、治療を必要とする対象に投与することができる。いくつかの実施形態において、対象は、1 つ以上の脳および/または眼の症状、疾患、または障害を有するか、有することが疑われる。いくつかの実施形態において、対象は、本明細書に開示される症状、疾患、および障害の 1 つ以上を有するか、有することが疑われる。いくつかの実施形態において、対象は、（例えば、眼または網膜の疾患または障害に関連するか、それを引き起こす）1 つ以上の内在性変異 rho 対立遺伝子を有する。いくつかの実施形態において、対象は、（例えば、優性網膜色素変性を引き起こす）少なくとも 1 つの優性変異 rho 対立遺伝子を有する。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、対象は非ヒト霊長類である。非ヒト霊長類の対象の非限定的な例には、マカク（例えば、カニクイザルまたはアカゲザル）、マーモセット、タマリン、クモザル、ヨザル、サバンナモンキー、リスザル、ヒヒ、ゴリラ、チンパンジー、およびオランウータンが含まれる。他の例示的な対象には、イヌおよびネコなどの飼育慣らされた動物（domesticated animal）；ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギおよびニワトリなどの家畜；並びにマウス、ラット、モルモット、およびハムスターなどの他の動物が含まれる。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態において、細胞または対象に投与される rAAV 粒子の用量は、 $10^6 \sim 10^{14}$ 個の粒子/mL もしくは $10^3 \sim 10^{15}$ 個の粒子/mL の範囲のオーダーであってよく、または、いずれかの範囲の間の任意の値であってよく、例としては、約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、または 10^{14} 個の粒子/mL などである。一実施形態において、 10^{13} 個の粒子/mL よりも多い rAAV 粒子が投与される。いくつかの実施形態において、対象に投与される rAAV 粒子の用量は、 $10^6 \sim 10^{14}$ ベクターゲノム（vgs）/mL もしくは $10^3 \sim 10^{15}$ vgs/mL の範囲のオーダーであってよく、または、いずれかの範囲の間の任意の値であ

ってよく、例としては、約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、または 10^{14} vgs/mL などである。一実施形態において、 10^{13} vgs/mL よりも多い rAAV 粒子が投与される。rAAV 粒子は、治療される特定の疾患または障害の治療を達成するために必要とされ得るように、単回投与として投与され得るか、または 2 回以上の投与に分割され得る。いくつかの実施形態において、0.0001 mL ~ 10 mL (例えば、0.0001 mL、0.001 mL、0.01 mL、0.1 mL、1 mL、10 mL) が、1 回の投与で対象に送達される。

【0035】

いくつかの実施形態において、rAAV ウイルス力価は、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{13}$ vgs/mL の範囲である。いくつかの実施形態において、rAAV ウイルス力価は、 1×10^{10} 、 2.5×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 5×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2.5×10^{12} 、 5×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2.5×10^{13} 、または 5×10^{13} vgs/mL であり得る。いくつかの実施形態において、ウイルス力価は、 1×10^{10} vgs/mL 未満である。いくつかの実施形態において、rAAV ウイルス力価は、 1×10^{15} vgs/mL を超える。一実施形態において、rAAV 粒子は、 5×10^{13} vgs/mL を超える。いくつかの実施形態において、rAAV ウイルス力価は、本明細書にさらに記載される方法によって (例えば、網膜下に、または、硝子体内に) 投与される。

【0036】

rAAV 粒子は、治療される特定の疾患または障害の治療を達成するために必要とされ得るように、単回投与として投与され得るか、または 2 回以上の投与に分割され得る。いくつかの実施形態において、本出願で記載される組成物の 1 ~ 500 マイクロリットルが、対象の片眼または両眼に投与される。例としては、いくつかの実施形態において、約 1、約 10、約 50、約 100、約 200、約 300、約 400、または約 500 マイクロリットルが、各眼に投与され得る。しかしながら、いくつかの実施形態において、より少量またはより多量が投与され得ることが、理解されるべきである。

【0037】

いくつかの実施形態において、本開示は、単独で、または 1 つ以上の他の療法様式と組み合わせて、細胞または動物へ投与するための、特に、ヒト細胞、組織、およびヒトに発症する疾患を治療するための、薬学的に許容される溶液中の、本明細書に開示される 1 つ以上の rAAV ベースの組成物の製剤を提供する。

【0038】

必要であれば、rAAV 粒子または核酸ベクターは、例えば、タンパク質、またはポリペプチド、または様々な薬学的に活性な物質などの、他の物質と組み合わせて投与することもでき、治療的ポリペプチド、生理活性フラグメント、またはそれらの変異体の 1 つ以上の全身または局所投与を含む。実際、追加の物質が標的細胞または宿主組織との接触において重大な有害作用を引き起こさないと考えると、含まれ得る他の成分には、実質的に制限はない。従って、rAAV 粒子は、特定の場合に必要とされる様々な他の物質と共に、送達され得る。これらの組成物は、宿主細胞、または他の生物学的起源から精製され得るか、あるいは、本明細書に記載されるように化学的に合成され得る。

【0039】

例えば、経口、非経口、静脈内、鼻腔内、関節内および筋肉内投与、並びに製剤化を含む、様々な治療レジメンにおいて本明細書に記載される特定の組成物を使用するのに好適な投薬および治療レジメンの開発のように、薬学的に許容される賦形剤およびキャリア溶液の製剤化は、当業者に周知である。

【0040】

通常、活性成分のパーセンテージはもちろん変化してもよいが、これらの組成物は、治療物質 (例えば、rAAV 粒子または宿主細胞) の少なくとも約 0.1 % 以上を含有してもよく、好都合に、製剤全体の重量または用量の約 1 または 2 % ~ 約 70 % または 80 % 以上であってもよい。当然のことながら、各治療的に有用な組成物中における治療物質 (

10

20

30

40

50

例えば、r A A V 粒子)の量は、化合物の所与の単位用量において好適な投与量が得られるように調製されてもよい。溶解性、生物学的利用率、生物学的半減期、投与のルート、産物有効期間などのような要因ならびに他の薬理学的考慮は、これらの医薬製剤を調製する当業者によって企図されるであろうし、また、そのため、様々な投薬量および治療レジメンは望ましくてもよい。

【0041】

ある状況では、皮下に、眼内に、硝子体内に、非経口的に、皮下に、静脈内に、脳室内に、筋肉内に、髄腔内に、経口的に、腹腔内に、経口もしくは経鼻吸入により、または、1つ以上の細胞、組織、もしくは器官への直接注射により、本明細書に開示される好適に製剤化された薬学的組成物中のr A A V粒子または宿主細胞を送達することが望ましい。

10

【0042】

r A A V粒子または宿主細胞組成物の、注射用の使用のための好適な薬学的形態は、無菌水溶液または分散液を含む。いくつかの実施形態において、形態は無菌であり、容易な注射可能性(syringability)が存在する程度まで流動性である。いくつかの実施形態において、形態は、製造および保存の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物のコンタミネーション作用に対して守られる。キャリアは、例としては、水、生理食塩水、エタノール、ポリオール(たとえばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール、およびその他同種のもの)、それらの好適な混合物、並びに/または、植物油を含有する、溶媒または分散媒であることができる。適切な流動度は、例としては、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要とされる粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持されてもよい。

20

【0043】

「キャリア」という用語は、r A A V粒子または宿主細胞と共に投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。これらの薬学的キャリアは、水および油などの滅菌液であり得、油には、ミネラルオイルなどの石油、ピーナッツ油、大豆油、およびゴマ油などの植物油、動物油、または合成による油が含まれる。生理食塩水および水性デキストロスおよびグリセロール溶液も液体キャリアとして使用することができる。

【0044】

本開示の組成物は、治療される対象に、標準的なルートで投与され得、肺、鼻腔内、経口、吸入、非経口(例えば、静脈内、局所、経皮、皮内、経粘膜、腹腔内、筋肉内、関節内(intracapsular)、眼窩内、硝子体内、心臓内、経気管、皮下、表皮下、関節腔内(intraarticular)、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射)のルートを含むが、これらに限定されない。

30

【0045】

本開示の組成物は、様々なルートで眼に送達され得る。それらは、眼への局所的適用によって、または、眼内注射(例としては、硝子体(硝子体内注射)または網膜下(網膜下注射)の光受容細胞間隙(inter-photoreceptor space)への眼内注射)によって、眼内へ送達され得る。いくつかの実施形態において、それらは桿体光受容細胞に送達される。あるいは、それらは、眼の周囲の組織に挿入または注射することによって局所的に送達されてもよい。それらは、経口ルートまたは皮下、静脈内もしくは筋肉内注射によって全身的に送達されてもよい。あるいは、それらは、カテーテルまたはインプラントによって送達されてもよく、当該インプラントは、シラスティックメンブレンもしくはファイバーなどの膜、生分解性ポリマー、またはタンパク質性材料を含む、多孔質、非多孔質またはゼラチン状材料から作製される。それらは、症状の発生に先立って、その発症を予防するために、例としては、眼の手術中、または病的状態の発生直後、または急性もしくは長期の症状の発症中に投与することができる。

40

【0046】

注入可能な水溶液の投与のために、例としては、溶液は必要に応じて好適に緩衝されてよく、液体希釈剤は最初に十分な生理食塩水またはグルコースで等張にされてよい。これらの特定の水溶液は、特に、静脈内、筋肉内、硝子体内、皮下、および腹腔投与に好適で

50

ある。これに関連して、使用することができる滅菌水性溶媒は、本開示に照らして当業者に知られている。例としては、一投与量を、1 m l の等張性 N a C l 溶液に溶解して、1 0 0 0 m l の皮下点滴液に添加するか、または、提案された注入部位に注入する（例としては、“Remington's Pharmaceutical Sciences” 15th Editionの、1035-1038ページおよび1570-1580ページを参照されたい）。治療される対象の症状に応じて、投与量の多少の変動が必然的に生じるであろう。いずれにしても、投与担当者は、個々の対象に対する適切な投与量を決定するだろう。さらに、ヒト投与のためには、製剤は無菌性、発熱原性、並びに、一般的な安全性および純度の基準を満たさなければならない（例えば、FDA Office of Biologicsの基準に従う）。

【 0 0 4 7 】

10

滅菌注射溶液は、r A A V 粒子または宿主細胞を、必要に応じて上記に列挙したいくつかの他の成分と共に、適切な溶媒中に必要量加え、必要に応じてその後濾過滅菌することによって調製する。一般に、分散液は、種々の滅菌された活性成分を、塩基性分散媒および上記に列挙したものの以外の他の必要成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製する。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分と任意の追加の所望の成分とを、予め滅菌濾過したその溶液から産生する、真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【 0 0 4 8 】

r A A V 粒子、核酸ベクター、または宿主細胞組成物の量と、当該組成物の投与の時間は、本教示の利益を有する当業者の専門範囲内である。しかしながら、当該開示された組成物の治療的に有効な量の投与は、当該治療を受けている患者への単回投与によって、例としては治療上の利点を提供するのに十分な数の感染粒子の単回注射などによって、達成され得る。あるいは、いくつかの状況では、比較的短期間または比較的長期間にわたり、r A A V 粒子または宿主細胞組成物の複数回または連続的投与を提供することが望ましい場合があり、これはこれらの組成物の投与を監督する医師によって決定され得ることである。

20

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態において、桿体細胞は、細胞のロドプシン遺伝子発現のサイレンシングの際に、構造的に無傷のままであり、および/または、生存可能である。いくつかの実施形態において、細胞のロドプシン遺伝子発現がサイレンシングされた桿体細胞は、正常にロドプシンを含有する短縮された外節を有する。いくつかの実施形態において、外節の長さは、維持されるか、発現が本出願に記載される組成物を用いたサイレンシングに耐性である、外因的に加えられた（硬化）ロドプシン遺伝子を用いて、（例えば、部分的または完全に）回復され得る。

30

【 0 0 5 0 】

組成物は、r A A V 粒子または宿主細胞を、単独で、または、天然のもしくは組換えの起源から得られ得るか、または、化学的に合成され得る、1つ以上のさらなる活性成分と組み合わせて、含むことができる。いくつかの実施形態において、r A A V 粒子は、同じ組成物で、または、同じ治療レジメンの一部として、ボルテゾミブまたはヒドロキシ尿素などのプロテアソーム阻害物質と組み合わせて、投与される。

40

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される場合、疾患を「治療する」とは、対象が経験する疾患または障害の少なくとも1つの徴候または症候の頻度または重症度を低減することを意味する。上記の組成物は、通常、有効量、すなわち、所望の結果を生み出すことができる量で、対象に投与される。所望の結果は、投与される活性物質に依存するであろう。例としては、r A A V 粒子の有効量は、異種核酸を、宿主の器官、組織、または細胞に移入することができる量であってよい。

【 0 0 5 2 】

本開示の方法において利用される組成物の毒性および有効性は、標準的な薬学的手順によって決定することができ、培養細胞または実験動物のいずれかを用いて、L D 5 0（集

50

団の50%に致命的な用量)を決定する。毒性と有効性との用量比は治療指数であり、 $LD50/ED50$ 比として表すことができる。大きな治療指数を示す組成物が好ましい。有毒な副作用を示すものが使用されることがあるが、これらの副作用の潜在的な損傷を最小限にする送達システムを設計するように注意すべきである。本明細書に記載される組成物の投与量は、一般的に、毒性がほとんどまたは全くないED50を含む範囲内にある。投与量は、用いられる投与形態および利用される投与ルートに応じて、この範囲内で変動し得る。

【0053】

本開示の局面は、目的の遺伝子を含む1つ以上の核酸ベクターを様々な組織、器官および/または細胞に送達するための組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子に関する。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、例えば、1つ以上のアミノ酸置換を含む、本明細書に記載されるrAAVカプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子は、目的のポリペプチドまたはタンパク質(例えば、治療的ポリペプチドまたはタンパク質)をコードする。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子は、目的のRNA(例えば、治療的mRNA、siRNA、shRNA、microRNA、アンチセンスRNA、tRNA、rRNA、またはリボザイム)をコードする。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子は置換遺伝子(例えば、眼特異的遺伝子、機能性遺伝子、機能性rho遺伝子)である。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子は、目的のRNA(例えば、microRNA、siRNA、shRNA)および目的の置換遺伝子(例えば、眼特異的遺伝子、機能性遺伝子、機能性rho遺伝子)を、含むか、コードする。いくつかの実施形態において、機能性rho遺伝子は、目的のRNA(例えば、microRNA、siRNA、shRNA)によって分解されないようにさせる、サイレントヌクレオチド置換を含むrho遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、目的のRNAおよび目的の置換遺伝子は、同一のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、目的のRNAおよび目的の置換遺伝子は、別のプロモーターの制御下にある。任意の好適なプロモーターを用いることができ、例としては、ウイルスプロモーター(例えば、CMVまたは他のウイルスプロモーター)、微生物(例えば、酵母または細菌)、または真核生物(例えば、哺乳動物)プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

組換えAAV(rAAV)粒子は、最低でも、(a)目的の遺伝子(例えば、目的のRNAおよび/または目的の置換遺伝子)をコードする配列を含む1つ以上の異種核酸領域、および(b)1つ以上の異種核酸領域に隣接する逆位末端反復(ITR)配列(例えば、野生型ITR配列、または操作されたITR配列)を含む1つ以上の領域を含み得る。いくつかの実施形態において、核酸ベクターは、4kb~5kbの大きさ(例えば、4.2~4.7kbの大きさ)である。当該核酸ベクターは、本明細書に記載される修飾カプシドタンパク質を含み得るウイルスカプシド、例えばAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、またはAAV5カプシドによってカプシド形成され得る。いくつかの実施形態において、核酸ベクターは環状である。いくつかの実施形態において、核酸ベクターは一本鎖である。いくつかの実施形態において、核酸ベクターは二本鎖である。いくつかの実施形態において、二本鎖核酸ベクターは、例としては、核酸ベクターの別の領域に相補的な核酸ベクターの領域を含有し、核酸ベクターの二本鎖の形成を開始させる、自己相補型ベクターであってよい。

【0055】

rAAV粒子は、任意の誘導体またはシュードタイプを含む、任意のAAV血清型(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、2/1、2/5、2/8、または2/9)であってよい。本明細書で用いられる場合、rAAVウイルスベクター(例えば、rAAV粒子)の血清型は、組換えウイルスのカプシドタンパク質の血清型を指す。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、AAV2ではない。いくつかの実施形態において、rAAV粒子はAAV2である。いくつかの実施形態において、rAAV粒子はA

AAV6である。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、本明細書に記載されるrAAVカプシドタンパク質を含むAAV6血清型である。誘導体およびシュードタイプの非限定的な例には、rAAV2/1、rAAV2/5、rAAV2/8、rAAV2/9、AAV2-AAV3ハイブリッド、AAVrh.10、AAVhu.14、AAV3a/3b、AAVrh32.33、AAV-HSC15、AAV-HSC17、AAVhu.37、AAVrh.8、CHT-P6、AAV2.5、AAV6.2、AAV2i8、AAV-HSC15/17、AAVM41、AAV9.45、AAV6(Y445F/Y731F)、AAV2.5T、AAV-HAE1/2、AAVクローン32/83、AAVShH10、AAV2(Y->F)、AAV8(Y733F)、AAV2.15、AAV2.4、AAVM41、およびAAVrh3.45が含まれる。これらのAAV血清型および誘導体/シュードタイプ、並びに、これらの誘導体/シュードタイプの生産方法は、当業界で知られている(例えば、Mol Ther. 2012 Apr;20(4):699-708. doi: 10.1038/mt.2011.287. Epub 2012 Jan 24. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. Asokan A1, Schaffer DV, Samulski RJ.を参照されたい)。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、(a)ある血清型(例えば、AAV2)由来のITRを含む核酸ベクター、および、(b)別の血清型(例えば、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9またはAAV10)由来のカプシドタンパク質からなるカプシドを含む、シュードタイプ化rAAV粒子である。シュードタイプ化rAAVベクターの生産および使用方法は、当業界で知られている(例えば、Duan et al., J. Virol., 75:7662-7671, 2001; Halbert et al., J. Virol., 74:1524-1532, 2000; Zolotukhin et al., Methods, 28:158-167, 2002; および Auricchio et al., Hum. Molec. Genet., 10:3075-3081, 2001を参照されたい)。

【0056】

rAAV粒子および核酸ベクターを生産する方法もまた、当業界で知られており、市販されている(例えば、Zolotukhin et al. 生産 and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. Methods 28 (2002) 158-167、米国特許出願公開第US20070015238号および第US20120322861号(これらは参照により本明細書に組み込まれる)、並びに、ATCCおよびCell Biolabs, Inc. から入手可能なプラスミドおよびキットを参照されたい)。例としては、当該核酸ベクターを含有するプラスミドは、例えば、rep遺伝子(例えば、Rep78、Rep68、Rep52およびRep40をコードする)およびcap遺伝子(例えば、本明細書に記載される改変VP3を含む、VP1、VP2、およびVP3をコードする)を含有する、1つ以上のヘルパープラスミドと組み合わせて、産生細胞株にトランスフェクトされてよく、それにより、rAAV粒子はパッケージされ、続いて精製できるようになる。

【0057】

いくつかの実施形態において、1つ以上のヘルパープラスミドは、rep遺伝子および(例えば、本明細書に記載されるrAAVカプシドタンパク質をコードする)cap遺伝子を含む第1のヘルパープラスミドと、E1a遺伝子、E1b遺伝子、E4遺伝子、E2a遺伝子、およびVA遺伝子を含む第2のヘルパープラスミドとを含む。いくつかの実施形態において、rep遺伝子は、AAV2またはAAV6に由来するrep遺伝子であり、cap遺伝子はAAV2またはAAV6に由来し、本明細書に記載される改変カプシドタンパク質を生産するために、遺伝子への改変を含むことができる。ヘルパープラスミドと、これらのプラスミドの作製方法は、当業界で知られており、市販されている(例えば、PlasmidFactory, Bielefeld, Germany のpDM、pDG、pDP1rs、pDP2rs、pDP3rs、pDP4rs、pDP5rs、pDP6rs、pDG(R484E/R585E)、およびpDP8.apeプラスミド、Vector Biolabs, Philadelphia, PA; Cellbiolabs, San Diego, CA; Agilent Technologies, Santa Clara, Ca; および Addgene, Cambridge, MAから入手可能な他の製品およびサービス、pxx6; Grimm et al. (1998), Novel Tools for production and Purification of Recombinant Ad

10

20

30

40

50

enoassociated Virus Vectors, Human Gene Therapy, Vol. 9, 2745-2760; Kern, A. et al. (2003), Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids, Journal of Virology, Vol. 77, 11072-11081.; Grimm et al. (2003), Helper Virus-Free, Optically Controllable, and Two-Plasmid-Based production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6, Molecular Therapy, Vol. 7, 839-850; Kronenberg et al. (2005), A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini, Journal of Virology, Vol. 79, 5296-5303;および Moullier, P. and Snyder, R.O. (2008), International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards, Molecular Therapy, Vol. 16, 1185-1188を参照されたい)。

10

【 0 0 5 8 】

例示的で、非限定的な、r A A V粒子の生産方法を、次に記載する。ネイティブプロモーターの転写制御下に、所望のA A V血清型のr e pおよびc a p O R F、並びに、アデノウイルスV A、E 2 A (D B P) および、E 4 遺伝子を含む、1つ以上のヘルパープラスミドを生産するか、得る。c a p O R Fはまた、本明細書に記載される改変カプシドタンパク質を生産するために1つ以上の改変を含む。H E K 2 9 3細胞(A T C C (登録商標) から入手可能)に、C a P O 4 媒介トランスフェクション、ポリエチレンイミン(P E I)などの脂質またはポリマー分子を介して、ヘルパープラスミドと、本明細書に記載される核酸ベクターを含有するプラスミドとを、トランスフェクトする。その後、H E K 2 9 3細胞を、少なくとも60時間培養して、A A V粒子の生産を可能にする。または、別の例では、S f 9 ベース安定産生細胞株を、核酸ベクターを含有する単一組換えバキュロウイルスに感染させる。さらに、別の例では、H E K 2 9 3またはB H K細胞株を、核酸ベクターを含有するH S V、並びに、場合により、ネイティブプロモーターの転写制御下に、本明細書に記載されるr e pおよびc a p O R Fと、アデノウイルスV A、E 2 A (D B P)、およびE 4 遺伝子とを含有する1つ以上のヘルパーH S Vに感染させる。その後、H E K 2 9 3、B H K、またはS f 9細胞を、少なくとも60時間培養して、r A A V粒子の生産を可能にする。その後、r A A V粒子は、当業界で知られるか、あるいは、本明細書に記載される任意の方法を用いて、例えば、イオジキサノールステップ勾配、C s C l 勾配、クロマトグラフィー、またはポリエチレングリコール(P E G)沈殿により、精製することができる。

20

30

【 0 0 5 9 】

本開示はまた、開示されるr A A V粒子または核酸ベクターの少なくとも1つを含む宿主細胞を企図している。これらの宿主細胞は、哺乳動物の宿主細胞、好ましくはヒト宿主細胞を含み、細胞培養または組織培養のいずれかで単離され得る。遺伝子組換え動物モデル(例えば、マウス)の場合、形質転換した宿主細胞は、非ヒト動物自体の体内に含まれ得る。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、C D 3 6 + 赤芽球バースト形成細胞(B F U - E)または赤芽球コロニー形成単位(C F U E - E)前駆細胞などの、赤血球系列の細胞である。

【 0 0 6 0 】

40

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物(例えば、目的のs i R N A、s h R N A、および/または置換遺伝子)は、ナノ粒子に製剤化される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物(例えば、目的のs i R N A、s h R N A、および/または置換遺伝子)は、脂質ナノ粒子に製剤化される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物(例えば、目的のs i R N A、s h R N A、および/または置換遺伝子は、脂質 - ポリカチオン複合体に製剤化され、カチオン性脂質ナノ粒子と呼ばれる。脂質ナノ粒子の形成は、当業界で知られる、および/または、米国特許出願公開第20120178702号(その全体が、参照により本明細書に組み込まれる)に記載される方法によって、達成され得る。非限定的な例として、ポリカチオンは、カチオン性ペプチドまたはポリペプチド(限定されないが、ポリリジン、ポリオルニチンお

50

および/またはポリアルギニンなど)、および、国際公開番号第WO2012013326号、または米国特許出願公開第US20130142818号(これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるカチオン性ペプチドを含んでよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物(例えば、目的のsiRNA、shRNA、および/または置換遺伝子)は、非カチオン性脂質(限定されないが、コレステロールまたはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)など)を含む脂質ナノ粒子に製剤化される。

【実施例】

【0061】

実施例1: RHOをロックダウンする低分子干渉RNA(sirNA)の特定

10

Khvorovovaらが記載した低分子干渉RNA(sirNA)の設計原理^{4, 5}を使用して、14個のsirNAを、イヌのsirNAを特異的に切断するように設計した。そのうち12個は、ロドプシンのヒトmRNAも標的とする。先に進む前に、NCBI Blastユーティリティ(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)を使用して、sirNAの2~19位をNCBIヒトRefSeqデータベースに対してスクリーニングした。潜在的sirNAのうち2つは、網膜で発現される可能性のある他の遺伝子とよく一致したため、除外した。10種類のsirNAのRNAバージョンを、コントロールとして使用する非ターゲティングsirNAと一緒に、GE Healthcare Dharmaconに注文した。これらを、緑色蛍光蛋白質と融合したヒトRHO(GFP、図11に例示的なプラスミドマップを表す)を発現する細胞において試験し、緑色蛍光細胞の減少を、蛍光標識細胞分取(FACS)で測定した。その原理は、RHO mRNAの切断がGFPの生産を減少させることであった。全てのsirNAはsirNAの最新の設計原理に基づいて設計されたが、試験した10個のうち3個のみが30%以上の減少に至った(図1A~C)。

20

【0062】

これらのsirNAがRNAポリメラーゼIIプロモーターから発現され、AAVによって送達される低分子ヘアピン型RNAとして有効であることを確認するために、shRNAのDNA配列をクローニングして3つのsirNAを発現させた(図2)。興味深いことに、sirNA131(配列番号1)が最も有効なsirNAであったが、試験した当該shRNAは最も効果が低かったため、sirNAを用いたRHOの相対的ロック

30

【0063】

shRNAが野生型(正常)および変異RHOの両方を切断するのに有効であることを確認するために、AAVベクターにクローニングした3個の同じshRNAを、野生型および2個の異なる変異RHO mRNAを消化する能力について、定量的逆転写PCR(qRT-PCR)をアッセイとして用いて、試験した(図3)。

【0064】

40

表5は、センス鎖、ループ、アンチセンス鎖および突出を含む、RHOを切断することができる特定されたshRNA配列に対応するRNA配列を示す。各配列には太字と下線で強調表示された2つの別のループ配列が表されており、イタリック体と下線で強調表示された突出が表されている。

【表 6】

表 5：低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)

配列番号：	名称	RNA 配列 (センス鎖-ループ-アンチセンス鎖-突出)
20	RH0131-9	CUGCCUACAUGUUUCUGCU <u>UCAAGAG</u> AGCAGAAACAUGUAGGCAG <u>UU</u>
21	RH0131-10	CUGCCUACAUGUUUCUGCU <u>UGUGCUU</u> AGCAGAAACAUGUAGGCAG <u>UU</u>
22	RH0134-9	CCUACAUGUUUCUGCUGAU <u>UCAAGAG</u> AUCAGCAGAAACAUGUAGG <u>UU</u>
23	RH0134-10	CCUACAUGUUUCUGCUGAU <u>UGUGCUU</u> AUCAGCAGAAACAUGUAGG <u>UU</u>
24	RH0765-9	GCAUGGUCAUCAUCAUGGU <u>UCAAGAG</u> ACCAUGAUGAUGACCAUGC <u>UU</u>
25	RH0765-10	GCAUGGUCAUCAUCAUGGU <u>UGUGCUU</u> ACCAUGAUGAUGACCAUGC <u>UU</u>
26	RH0820-9	GUGGCAUUCUACAUCUUC <u>UCAAGAG</u> UGAAGAUGAUGAUGCCAC <u>UU</u>
27	RH0820-10	GUGGCAUUCUACAUCUUC <u>UGUGCUU</u> UGAAGAUGAUGAUGCCAC <u>UU</u>

10

【0065】

siRNA はまた、例えば図 4 の構造の人工 microRNA⁷ として送達され得る。図 4 の例示的な microRNA は、RH0131 のセンス鎖 (100) およびアンチセンス (101) を含む (それぞれ、配列番号 1 および 2)。この発現様式の利点は、siRNA の生産が特定のプロモーター配列の使用によって細胞型特異的にされ得ることである。この場合、ヒトロドプシン遺伝子の近位プロモーターまたはヒトロドプシンキナーゼプロモーターは、光受容細胞への発現を制限するために使用されるであろう。

【0066】

実施例 2：RH0⁺/⁺ イヌにおける RH0 ノックダウン (KD) の解析

イヌ 2190 (rcd1 キャリア) は、表 6 に示した濃度で、AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho13 の網膜下注射を受けた。イヌは注射後 8 週間で 殺した。いくつかの 3 mm の神経網膜生検パンチを、それぞれの眼から、ブレブ (ブレブ) および非ブレブ領域の両方から回収した。

20

【表 7】

表 6：イヌ 2190

イヌ	遺伝子型	性別	生年月日	注射時の年齢	右眼 (OD)	左眼 (OS)
2190	rcd1 キャリア	M	8/11/14	1 歳	AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho131 Ω 4063 5E+12 vg/ml 150 μl SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho131 Ω 4063 1E+12 vg/ml 150 μl SR

30

【0067】

本明細書に記載される AAV2/5-sc-H1-shRNA 構築物の非限定的な例はまた、AAV2/5-sc-MOP500 rGFP-shRNA 構築物とも呼ばれ得る。AAV2/5 は、該 shRNA をコードする核酸が、AAV2 ITR に隣接しており、AAV5 カプシドタンパク質を含む rAAV 粒子で提供されることを指す。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される任意の干渉 RNA と、本明細書に記載される任意の組換え rho 遺伝子は、ある rAAV 粒子内 (例えば、AAV5 カプシドタンパク質を含む) の、同じ AAV 核酸上 (例えば、AAV2 ITR に隣接する) で提供され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される任意の干渉 RNA と、本明細書に記載される任意の組換え rho 遺伝子は、異なる rAAV 粒子でカプシド形成された (例えば、AAV5 カプシドタンパク質を含むもの、または、異なる AAV 血清型由来のカプシドタンパク質を有するもの)、異なる AAV 核酸上 (例えば、AAV2 ITR に隣接するもの、または、異なる AAV 血清型由来の ITR に隣接するもの) で提供され得る。

40

【0068】

50

ウェスタンブロット解析:

各眼の2つの生検パンチ（ブレブ領域または非ブレブ領域のいずれかを表す）を、50 μ lのLewin緩衝液A（プロテアーゼ阻害物質を含む）中で、氷上で15分間インキュベートした。サンプルを40%振幅、15秒/10秒オフ×8パルスで超音波処理した。次に、サンプルを遠心分離し、ペレットを廃棄した。上清中のタンパク質濃度をBradford法により測定した。総タンパク質のうち1 μ gをイムノブロットして、ロドプシンを可視化し（使用した抗体：Millipore MAB5356、ODYSSEY（登録商標）ブロッキングバッファーで1:1000に希釈）、抗ヒストン個抗体（Abcam ab1791、1:3000に希釈）をローディングコントロールとして用い（図5A）、シグナルを標準化した（図5B）。ブレブ領域と非ブレブ領域との間のRHOTanパク質量の比較は、実験デザインと一致しなかった（図5C）。

10

【0069】

イヌの網膜におけるイヌのロドプシンRNAの絶対定量:

リボザイム治療後の網膜に存在するロドプシンRNAの絶対量を定量するために、Q-PCR標準曲線法を用いて、絶対定量を行った。イヌのRHOC DNAの既知量の希釈系列を用いて、標準曲線を構築した。各サンプル中のイヌのRHORNAの総量を、この標準曲線に基づいて計算した（図6A）。

【0070】

イヌのRHOP部分的ノックダウンは、AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho131で見られる。使用した最高濃度では、タンパク質レベルは37%低下し、RNAはほぼ50%減少する（図6B）

20

【0071】

実施例：RHOP+/+イヌにおけるRHOPノックダウンのさらなる解析

イヌ2194（rcd1キャリア）は、表7に示した濃度で、AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho810の網膜下注射を受けた。イヌは注射後8週間で殺した。いくつかの3mmの神経網膜生検パンチを、それぞれの眼から、ブレブ（ブレブ）および非ブレブ領域の両方から回収した。

【表8】

表7：イヌ2194

イヌ	遺伝子型	性別	生年月日	注射時の年齢	右眼 (OD)	左眼 (OS)
2194	<i>rcd1</i> キャリア	F	8/11/14	1歳	AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho820 Q4064 5E+12 vg/ml 150 μ l SR 50 μ l 硝子体内	AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho820 Q4064 1E+12 vg/ml 小さなブレブ50 μ l SR 250 μ l 硝子体内

30

【0072】

ウェスタンブロット解析:

各眼の2つの生検パンチ（ブレブ領域または非ブレブ領域のいずれかを表す）を、50 μ lのLewin緩衝液A（プロテアーゼ阻害物質を含む）中で、氷上で15分間インキュベートした。サンプルを40%振幅、15秒/10秒オフ×8パルスで超音波処理した。次に、サンプルを遠心分離し、ペレットを廃棄した。上清中のタンパク質濃度をBradford法により測定した。総タンパク質のうち1 μ gをイムノブロットして、ロドプシンを可視化し（使用した抗体：Millipore MAB5356、ODYSSEY（登録商標）ブロッキングバッファーで1:1000に希釈）、抗ヒストン個抗体（Abcam ab1791、1:3000に希釈）をローディングコントロールとして用い（図7A）、シグナルを標準化した（図7B）。ブレブ領域と非ブレブ領域との間のRHOP

40

50

タンパク質量の比較は、実験デザインと一致しなかった（図 7 C）。

【 0 0 7 3 】

イヌの網膜におけるイヌのロドプシン R N A の絶対定量：

リボザイム治療後の網膜に存在するロドプシン R N A の絶対量を定量するために、Q - P C R 標準曲線法を用いて、絶対定量を行った。イヌの R H O c D N A の既知量の希釈系列を用いて、標準曲線を構築した。各サンプル中のイヌの R H O R N A の総量を、この標準曲線に基づいて計算した（図 8 A）。

【 0 0 7 4 】

イヌ R H O R N A およびタンパク質の完全なノックダウンが、 1×10^{12} v g / m l というより低用量でも、A A V 2 / 5 - s c - H 1 - s h R N A - R h o 8 2 0 で見られる（図 8 B）。

【 0 0 7 5 】

実施例 4：置換遺伝子の硬化 m R N A

いくつかの実施形態において、置換遺伝子（例えば、置換 R H O）の m R N A は、「硬化させる」（すなわち、s i R N A による分解に耐性を持たせる）ために、1 つ以上の位置で改変され得る。いくつかの実施形態において、1 つ以上のサイレントヌクレオチド置換が、内在性遺伝子（例えば、r h o 遺伝子）をノックダウンするために提供される s i R N A に関連する置換遺伝子に含まれ得る。図 9 および図 1 0 は、置換 R H O m R N A に導入され得るヌクレオチド置換の非限定的な例を提供する。置換 r h o 遺伝子は、これらの置換の 1 つ以上を含むことができることを理解されたい。

【 0 0 7 6 】

図 9 は、各 s h R N A と、内在性ヒト R H O m R N A または硬化 R H O m R N A の標的配列との間で生じる塩基対形成の描写を示す。全ての s h R N A は、イヌの R H O m R N A の標的配列と、完全に塩基対を形成する。白四角：s h R N A と、内在性イヌ R H O m R N A 並びに硬化 R H O m R N A との間のミスマッチ。濃灰色四角：R N A のグアノシンとウラシルとの間に生じる弱いゆらぎ塩基対形成。薄灰色四角：s h R N A と硬化 R H O m R N A との間のみのミスマッチ。

【 0 0 7 7 】

図 1 0 は、s h R N A 1 3 4 と、内在性ヒト R H O 1 3 1 m R N A または硬化 R H O 1 3 1 m R N A の標的配列との間で生じる塩基対形成の描写を示す。s h R N A 1 3 1 および 1 3 4 の標的配列の近接は、同じ硬化 R H O 1 3 1 を使用することを可能にする。濃灰色四角：R N A のグアノシンとウラシルとの間に生じる弱いゆらぎ塩基対形成。薄灰色四角：s h R N A と硬化 R H O m R N A との間のみのミスマッチ。

【 0 0 7 8 】

実施例 5：s i R N A と置換遺伝子のコード

いくつかの実施形態において、DNA ベクターにコードされた s i R N A を提供することが望ましい場合がある。図 1 2 A および図 1 2 B は、DNA ベクターにコードされた s i R N A（例えば、s h R N A）の非限定的な例を表す。いくつかの実施形態において、図 1 2 A および図 1 2 B に示す例示的なプラスミドマップにさらに表されているように、DNA ベクターはさらに、s i R N A（例えば s h R N A）に隣接する逆位末端反復（I T R）配列をコードし得る。いくつかの実施形態において、I T R 配列が隣接する s i R N A をコードする DNA ベクターは、s i R N A を含む組換え A A V 粒子の生産において用いられ得る。

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態において、DNA ベクターにコードされた置換 R H O m R N A を提供することが望ましい。図 1 2 C は、DNA ベクターにコードされた置換 R H O m R N A の非限定的な例を表す。いくつかの実施形態において、図 1 2 C に示す例示的なプラスミドマップにさらに表されているように、DNA ベクターはさらに、置換 R H O m R N A（例えば、ヒト R H O）に隣接する I T R 配列をコードし得る。いくつかの実施形態において、I T R 配列が隣接する置換 R H O m R N A をコードする DNA ベクターは、ヒト r h

10

20

30

40

50

oを含む組換えAAV粒子の生産において用いられ得る。いくつかの実施形態において、ITR配列に隣接する、置換rho遺伝子と1つ以上の干渉RNAをコードする1つ以上の配列とを共に含む同様のDNAベクターが、提供され得る。いくつかの実施形態において、干渉RNAおよび/または置換rho遺伝子は、プロモーター（例えば、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、またはH1RNAポリメラーゼIIIプロモーター、または本出願に記載される他のプロモーター）に作動可能に結合している。図12A～図12Cに表される干渉RNAおよび/または置換rho遺伝子は、H1RNAポリメラーゼIIIプロモーターの制御下にある。図12A～図12Cの構築物はまた、MOP500-rGFP（GFPの逆配列（rGFP、それゆえ発現されない）の上流の、マウス桿体オプシンプロモーター（MOP500）の-385/+86部分）を含み、H1構築物またはMOP500構築物とも呼ばれ得る。しかしながら、MOP500（例えば、MOP500-rGFP）部分は、必要ではない。従って、プラスミドまたはrAAV核酸は、本明細書に記載される干渉RNAおよび/または改変rho遺伝子を、それぞれ、同じ、または異なるプロモーター（例えば、H1プロモーター）の制御下で、マウスオプシンプロモーターを有さずに、および/または、任意のGFPコード配列を（いずれの向きでも）有さずに、コードすることができる。

【0080】

実施例6：野生型RHO^{+/+}イヌにおける、shRNA820でのRHOノックダウンの解析

実施例6は、野生型イヌにおいて網膜下注射後にロドプシン発現を効率的に抑制するshRNA820ノックダウン試薬を保有するAAV2/5のウイルス力価の特定、AAV2/5-sc-H1-shRNA820による網膜下注射後の、光受容細胞を含有する層（ONL）は保存されるが、ロドプシンを含有する層が減少することの、野生型イヌにおけるインビボ網膜イメージングによる証明、変異RHO^{T4R/+}イヌ、RHO-ADRPの自然発生モデルにおいて、網膜下注射後にロドプシン発現を効率的に抑制するshRNA820ノックダウン試薬を保有するAAV2/5のウイルス力価の特定、変異RHO^{T4R/+}イヌにおいて、光受容細胞に、光誘発性網膜変性からの防御を付与するAAV2/5-sc-H1-shRNA820のウイルス力価の特定、ロドプシン発現の効率的ノックダウンが桿体において外節の欠損を引き起こすという証明を含む。外節の保存は光伝達にとって重要であるため（桿体が光を電気信号に変換するメカニズム）、RHO-ADRPのための最適な治療は、天然のRHOを減少させるが、外節構造は保存するべきである。これらの結果は、ノックダウン手法が十分ではないことを実証しており、ノックダウンおよび置換戦略の組み合わせの使用を主張している。

【0081】

5匹の野生型RHO^{+/+}イヌは、以下の表8に示したように、 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{12}$ の範囲のウイルス濃度で、両眼にAAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho820の網膜下注射を受けた。

10

20

30

40

50

【表 9】

表 8：野生型 RHO^{+/+}イヌにおける shRNA820 による RHO ノックダウン

イヌ	遺伝子型	性別	生年月日	注射時の年齢	右眼 (OD)	左眼 (OS)
2194	<i>rcd1</i> キャリア	F	8/11/14	1 歳	AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho820 Ω 4064 5E+12 vg/ml 150 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA-Rho820 Ω 4064 1E+12 vg/ml 小さなブレブ 50 ul SR
BR442	<i>RPE65</i> キャリア	F	12/15/13	1 歳 11 カ月	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 1E+12 vg/ml 150 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 1E+12 vg/ml 150 ul SR
GSR2	<i>CNGB3</i> キャリア <i>rcd1</i> キャリア	M	8/19/2014	6 4 週	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 5E+11 vg/ml 150 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 5E+11 vg/ml 110 ul SR
P1474	<i>prcd</i> キャリア	M	9/30/08	3 9 2 週 / 7 歳	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 2.5E+11 vg/ml 150 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 2.5E+11 vg/ml 150 ul SR
N282	<i>WT</i>	M	9/6/2009	6 歳 2 カ月	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 1E+11 vg/ml 150 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 1E+11 vg/ml 160 ul SR

10

20

30

【0082】

注射の 6 ~ 8 週間後に、インビボ網膜イメージング (cSLO/OCT) を行い、次いで、イヌを 殺した。いくつかの 3 mm 神経網膜生検パンチを、両眼から (イヌ 2194) または OS 眼のみから (他のイヌ)、ブレブ / 処理および非ブレブ / 非処理領域の両方において回収して、ウェスタンブロットによりイヌのロドプシンの発現レベルを、qPCR 解析により RHO RNA の発現レベルを測定した。OD 眼を固定し、最適な切断温度の培地に包埋し、組織学および免疫組織化学染色のために処理した。

【0083】

ウェスタンブロット解析:

最大で 3 組の生検パンチ (ブレブ領域または非ブレブ領域のいずれかを表す) を、50 μl の Lewin 緩衝液 A (プロテアーゼ阻害物質を含有) 中で、氷上で 15 分間インキュベートした。サンプルを 40 % 振幅、15 秒 / 10 秒オフ × 8 パルスで超音波処理した。次に、サンプルを遠心分離し、ペレットを廃棄した。上清中のタンパク質濃度を Bradford 法により測定した。サンプルは、-20 °C で保管した。ロドプシンを可視化するために、総タンパク質のうち 1 μg をゲルにロードした (使用した抗体: Millipore MAB5356、ODYSSEY ブロッキングバッファーで 1:1000 に希釈)。抗ヒストン H3 抗体 (Abcam ab1791、1:3000 に希釈) を、ローディングコントロールとして用いて、シグナルを標準化した。

40

【0084】

イヌの網膜におけるイヌのロドプシン RNA の絶対定量:

50

s h R N A 8 2 0 治療後の網膜に存在するロドプシン R N A の絶対量を決定するために、Q - P C R 標準曲線法を用いて、絶対定量を行った。イヌの R H O c D N A の既知量の希釈系列を用いて、標準曲線を構築した。総 c D N A のうち 0 . 1 ナノグラムを定量に使用した。各サンプル中のイヌの R H O R N A の総量を、この標準曲線に基づいて計算した。

【 0 0 8 5 】

異なるウイルス力価の A A V 2 / 5 - s c - H 1 - s h R N A 8 2 0 を注射した野生型 R H O ⁺ / ⁺ イヌの目の網膜の完全性のインビボ網膜イメージングによる評価。

異なる力価の A A V 2 / 5 - s c - H 1 - s h R N A 8 2 0 の網膜下注射後 6 ~ 8 週間の、網膜の O N L の完全性を評価するのに、c S L O / O C T によるインビボ網膜イメージングを用いた。O N L の厚さの組織分布図は、すべての力価でのこの層の保存を示した。外境界膜 (E L M) 、内節 (I S) および外節 (O S) のセグメンテーションは、 1×10^{12} および 5×10^{12} v g / m l の力価を注射した眼のプレブ領域に対応する領域におけるシグナル強度の低下を明らかにした。これらの結果は、これらの結果は、R H O サイレングの結果としての光受容細胞 O S および I S の短縮を示唆し、インビボでの R H O ノックダウンの有効性を評価するために使用され得る。図 1 3 A ~ 図 1 3 E は、野生型 R H O ⁺ / ⁺ イヌにおける、網膜下に注射された異なるウイルス力価の A A V 2 / 5 - s c - H 1 - s h R N A 8 2 0 による、ロドプシンノックダウンの R N A およびタンパク質の解析を示す。図 1 3 A は、ウェスタンブロット解析および R N A 定量に使用された生検パンチの位置を示す網膜地図を示す。対になった、濃灰色、灰色、ドットの丸は、ウェスタンブロットの各複製のためのプレブ / 処理および非プレブ処理領域における、生検パンチの位置を示しており、一方で、黒丸は、R N A 定量のための生検パンチの位置を示す。図 1 3 B は、同じ網膜の非処理領域で測定されたレベルのパーセンテージとして、処理領域内に残存するイヌのロドプシン R N A を示す棒グラフを示す。図 1 3 C は、イヌの網膜の処理 (T x) および非処理 (U n T x) 領域から取得した生検パンチにおけるロドプシンの量を示す免疫プロットを示す。ヒストン H 3 を標準化のために用いた。棒グラフは、同じ網膜の非処理領域で測定されたレベルのパーセンテージとして、残存するイヌのロドプシンタンパク質を示す。図 1 3 D ~ 図 1 3 E は、各実験の数値を示す表を示す (R N A またはタンパク質の残存率、あるいは R N A またはタンパク質のノックダウン率として、それぞれ報告されている) 。

【 0 0 8 6 】

図 1 4 A ~ 図 1 4 D は、野生型イヌにおける、異なる力価の A A V 2 / 5 - s c - H 1 - s h R N A 8 2 0 の網膜下注射後の、O N L および E L M / I S / O S 完全性の評価を示す。図 1 4 A は、O N L の厚さの図を示す；図 1 4 B は、E L M / I S / O S の標準化強度の図を示す；図 1 4 C は、O N L の厚さの値を示す；および、図 1 4 D は、E L M / I S / O S 層の標準化強度の値を示す。これらの結果は、R H O サイレングの結果としての光受容細胞 O S および I S の短縮を示唆し、インビボでの R H O ノックダウンの有効性を評価するために使用され得る。

【 0 0 8 7 】

イヌの R H O R N A およびタンパク質の完全なノックダウンが、 1×10^{12} v g / m l の低さのウイルス力価で、A A V 2 / 5 - s c - H 1 - s h R N A 8 2 0 を網膜下に注射した野生型イヌで見られた。最も高いウイルス濃度であっても O N L の厚さの減少は見られず、ロドプシンのノックダウンが光受容細胞死を誘導しないことを示唆した。ロドプシンの 1 0 0 % K D を誘導する高いウイルス力価で注射した眼の処理 / プレブ領域において、E L M / I S / O S 層の O C T 反射率の減少が見られる。この知見は、これらの層の薄さに適合し、ノックダウン効率のインビボ結果測定として使用することができる。

【 0 0 8 8 】

実施例 7 : R H O ^{T 4 R} / ⁺ 変異イヌにおける、s h R N A 8 2 0 による R H O ノックダウンの解析

4 匹の R H O ^{T 4 R} / ⁺ イヌは、以下の表 9 に示したウイルス濃度で、両眼に A A V 2 /

5 - s c - H 1 - s h R N A - R h o 8 2 0 の網膜下注射を受けた。

【表 1 0】

表 9：RHO^{T4R/+}変異イヌにおける、s h R N A 8 2 0 による R H O ノックダウン

イヌ	遺伝子型	性別	生年月日	注射時の年齢	右眼 (OD)	左眼 (OS)
EM409	<i>T4R/+</i>	F	2/10/2015	40週	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 1E+12 vg/ml 150 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 1E+12 vg/ml 150 ul SR
EM411	<i>T4R/+</i>	F	2/10/2015	40週	AAV2/5-sc-H1-shRNA-820 Ω 4064 5E+11 vg/ml 160 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 5E+11 vg/ml 150 ul SR
EM413	<i>T4R/+</i>	F	2/10/2015	57週	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 2.5E+11 vg/ml 150 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 2.5E+11 vg/ml 150 ul SR
EM412	<i>T4R/+</i>	F	2/10/2015	40週	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 1E+11 vg/ml 150 ul SR	AAV2/5-sc-H1-shRNA820 Ω 4064 1E+11 vg/ml 150 ul SR

10

20

【 0 0 8 9】

注射の 8 週間後に、c S L O / O C T を実施し、光誘発性網膜変性を誘発するために、全てのイヌで O S 眼に対して光照射 (1 m W / c m ² で 1 分) を実施した。光照射の 2 週間後に全てのイヌについて c S L O / O C T を再度実施し、治療によって与えられたレスキュー効果を評価した。イヌを 殺し、いくつかの 3 m m 神経網膜生検パンチを、O D 眼から、ブレブ / 処理および非ブレブ / 非処理領域の両方から回収して、ウェスタンブロットによりイヌのロドプシンの発現レベルを、q P C R 解析により R H O R N A の発現レベルを測定した。O S 眼を固定して、最適な切断温度の培地に包埋し、組織学および免疫組織化学染色のために処理した。

30

【 0 0 9 0】

ウェスタンブロット解析:

各 O S 眼由来の、3 組の生検パンチ (ブレブ / 処理または非ブレブ / 非処理網膜領域のいずれかを表す) を、5 0 μ l の L e w i n 緩衝液 A (プロテアーゼ阻害物質を含有) 中で、氷上で 1 5 分間インキュベートした。サンプルを 4 0 % 振幅、1 5 秒 / 1 0 秒 オフ × 8 パルスで超音波処理した。次に、サンプルを遠心分離し、ペレットを廃棄した。上清中のタンパク質濃度を B r a d f o r d 法により測定した。サンプルは、- 2 0 で保管した。ロドプシンを可視化するために、総タンパク質のうち 1 μ g をゲルにロードした (使用した抗体: M i l l i p o r e M A B 5 3 5 6、O D Y S S E Y ブロッキングバッファで 1 : 1 0 0 0 に希釈)。抗ヒストン H 3 抗体 (A b c a m a b 1 7 9 1、1 : 3 0 0 0 に希釈) を、ローディングコントロールとして用いて、シグナルを標準化した。

40

【 0 0 9 1】

イヌの網膜におけるイヌのロドプシン R N A の絶対定量:

S h R N A 8 2 0 治療後の網膜に存在するロドプシン R N A の絶対量を決定するために、Q - P C R 標準曲線法を用いて、絶対定量を行った。イヌの R H O c D N A の既知量の希釈系列を用いて、標準曲線を構築した。総 c D N A のうち 0 . 1 ナノグラムを定量に使用

50

した。各サンプル中のイヌの RHO RNA の総量を、この標準曲線に基づいて計算した。

【0092】

異なるウイルス力価の AAV2/5 - shRNA820 を注射した変異 RHO^{T4R}/+ イヌの眼における、光誘発性ダメージからの光受容細胞レスキューの、インビボ網膜イメージングによる評価。

1×10^{12} から 1×10^{11} v g / m l の範囲のウイルス力価で、網膜下に注射した変異 RHO^{T4R}/+ イヌ由来の眼を、注射の 8 週間後（光照射前）に、cSLO/OCT イメージングにより調べた。ブレブ/処理領域における ONL の厚さは保存され、shRNA820 がその期間に光受容細胞の損失を引き起こさなかったことを示唆した。RHO^{T4R} 突然変異体において急性の網膜変性を引き起こすが、野生型イヌでは引き起こさないことが以前に示された強度（ $1 \text{ mW} / \text{cm}^2$ の角膜放射照度）での白色光の 1 分間の照射を、処理/ブレブ領域における AAV2/5 - sc - H1 - shRNA820 によって与えられる防御レベルを評価するために使用した。周囲の非ブレブ/非処理領域を、各眼に対する内部標準として使用した。光照射の 2 週間後、網膜を再度イメージングし、 1×10^{12} および 5×10^{11} v g / m l の力価で注射した眼のブレブ/処理領域において、ONL の厚さの良好な保存を示した。非常に緩やかなレスキューが 2.5×10^{11} v g / m l の力価において見られ、 1×10^{11} v g / m l の力価では見られなかった。

【0093】

図 15A ~ 図 15E は、変異 RHO^{T4R}/+ イヌにおける、網膜下に注射された異なるウイルス力価の AAV2/5 - sc - H1 - shRNA820 による、ロドプシンノックダウンの RNA およびタンパク質の解析を示す。図 15A は、ウェスタンブロット解析および RNA 定量に使用された生検パンチの位置を示す網膜地図を示す。対になった、濃灰色、灰色およびドットの丸は、ウェスタンブロットの各複製のためのブレブおよび非ブレブ領域における、生検パンチの位置を示しており、一方で、黒丸は、RNA 定量のための生検パンチの位置を示す。図 15B は、同じ網膜の非処理領域で測定されたレベルのパーセンテージとして、残存するイヌのロドプシン RNA 量を示す棒グラフである。図 15C は、イヌの網膜の処理（Tx）および非処理（Untx）領域から取得した生検パンチにおけるイヌのロドプシンの量を示す免疫プロットである。ヒストン H3 を標準化のために用いた。棒グラフは、同じ網膜の非処理領域で測定されたレベルのパーセンテージとして、残存するイヌのロドプシンタンパク質量を示す。図 15D ~ 図 15E は、各実験の数値を示す表である（RNA またはタンパク質の残存率、あるいは RNA またはタンパク質のノックダウン率として、それぞれ報告されている）。

【0094】

図 16A ~ 図 16D は、変異 RHO^{T4R}/+ イヌにおいて急性網膜変性を引き起こす短時間の光照射に暴露してから 2 週間後の、RHO^{T4R}/+ イヌの、（異なるウイルス力価の AAV2/5 - sc - H1 - shRNA820 による）処理網膜領域および非処理網膜領域を含む OCT B スキャンを示す。（図 16A） 1×10^{12} v g / m l で処理したイヌの OCT スキャン。（図 16B） 5×10^{11} v g / m l で処理したイヌの OCT スキャン。（図 16C） 2.5×10^{11} v g / m l で処理したイヌの OCT スキャン。（図 16D） 1×10^{11} v g / m l で処理したイヌの OCT スキャン。図 17A - 図 17B は、光誘発性網膜変性からの防御を示す、AAV2/5 - sc - shRNA820 で処理した RHO^{T4R}/+ 由来の、ONL の厚さの組織分布図を示す。（図 17A）非処理の野生型コントロールイヌの ONL の厚さの図（左図）、および、 $5 \text{ E} + 11 \text{ v g} / \text{m l}$ で AAV2/5 - sc - shRNA820 により処理した EM411 - OS の ONL の厚さの図であり、光誘発性ダメージ後数週間は、処理/ブレブ領域において ONL の厚さが保存されることを示す。白黒曲線は、網膜下注射直後に見られるブレブの境界を示す。下のパネルは、視覚化のために、ONL が濃灰色で色付けされた（中間のバンド）OCT B スキャンを示す。（図 17B）ブレブの外側および内側の部位を、ONL の厚さ測定のために選択した。

【0095】

イヌのRHORNAおよびタンパク質の完全なノックダウンが(ウェスタンブロットにより)、 1×10^{12} および 5×10^1 v g / m l のウイルス力価で、AAV2 / 5 - s h RNA - R h o 8 2 0 により、見られた。光受容細胞の細胞体を含む外顆粒層(ONL)の完全なレスキューは、 1×10^{12} および 5×10^{11} v g / m l のウイルス力価でAAV2 / 5 - s h RNA - R h o 8 2 0 により達成された。

【0096】

異なるウイルス力価のAAV2 / 5 - s c - H 1 - s h RNA 8 2 0 を注射した変異RHOT^{4R} / + イヌの眼における、光誘発性ダメージからの光受容細胞の防御の、組織学および免疫組織化学による評価。

1×10^{12} から 1×10^{11} v g / m l の範囲のウイルス力価で、網膜下に注射し、続いて、ある強度($1 \text{ mW} / \text{cm}^2$ の角膜放射照度)で、白色光により1分間光照射した(注射の8週間後)、上表に示した同一の変異RHOT^{4R} / + イヌ由来の眼を調べた。この照射量は、RHOT^{4R} 変異体において急性の網膜変性を引き起こすが、野生型イヌでは引き起こさないことが以前に示されている。組織学および免疫組織学を用いて、処理/ブレブ領域におけるAAV2 / 5 - s c - H 1 - s h RNA 8 2 0 によって与えられる防御レベルを評価した。周囲の非ブレブ/非処理領域を、各眼に対する内部標準として使用した。ロドプシン(RHO)およびヒト錐体アレスチン(hCA)に対する抗体を用いて、桿体外節および錐体の形態の完全性を評価した。図18は、異なるウイルス力価のAAV2 / 5 - s c - H 1 - s h RNA 8 2 0 を網膜下に注射した、変異RHOT^{4R} / + 網膜の処理(Tx)および非処理(UnTx)領域における、組織学(HE染色)および免疫組織化学を示す(ロドプシンは緑に染色され、図18の下図ではより薄い染色として現れている; ヒト錐体アレスチンは赤に染色され、図18の下図では灰色の染色として現れている)。光照射の2週間後、 1×10^{12} および 5×10^{11} v g / m l の力価で注射した眼のブレブ/処理領域において、ONLの厚さの良好な保存がみられたが、 2.5×10^{11} v g / m l ではONLの厚さはわずかに減少し、 1×10^{11} v g / m l の力価では防御が見られなかった。 1×10^{12} および 5×10^{11} v g / m l 力価でのロドプシン発現の非常に効率的なノックダウンと一致して、ロドプシン発現の減少と組み合わせて、桿体細胞OSの長さの減少がHE切片で見られた

【0097】

イヌのRHORNAおよびタンパク質の完全なノックダウンが(ウェスタンブロットにより)、 1×10^{12} および 5×10^1 v g / m l のウイルス力価で、AAV2 / 5 - s c - H 1 - s h RNA 8 2 0 により、見られた。光受容細胞の細胞体を含む外顆粒層(ONL)の完全な防御は、 1×10^{12} および 5×10^{11} v g / m l のウイルス力価でAAV2 / 5 - s c - H 1 - s h RNA 8 2 0 により達成された。効率的なRHONockダウンの結果としての桿体の外節構造の損失は、処理された桿体が外節を保持し、機能性を維持できるように、ノックダウンと置換戦略の組み合わせの必要性を主張する。

【0098】

実施例8

本実施例は、RHONADRPを用いた遺伝子療法をサポートするデータを提供する。s h RNA 8 2 0 ノックダウン試薬と置換試薬RHO820(=硬化ヒトRHOMRNA)の両方を組み合わせたAAV2 / 5 ベクター構築物(AAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H 1 - s h RNA 8 2 0)を、変異RHOT^{4R} / + イヌで試験すること、内在性のイヌのRHOの効率的ノックダウン、および、置換硬化ヒトRHO(RHO820)の効率的発現をもたらす、AAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H 1 - s h RNA 8 2 0 のウイルス力価を特定すること、AAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H 1 - s h RNA 8 2 0 が、変異RHOT^{4R} / + イヌにおける光受容細胞に光誘発性網膜変性からの防御を付与するという証明、およびAAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H 1 - s h RNA 8 2 0 で処理した網膜領域において桿体外節の保存が達成されているという証明を含む。

【0099】

RHO^{T4R/+}変異イヌにおける、shRNA820およびRHO820による、RHOノックダウンおよび置換の解析：

2匹のRHO^{T4R/+}イヌは、以下の表（表10）に示したウイルス濃度で、両眼にAAV2/5-sc-HOP-RHO820-H1-shRNA820の網膜下注射を受けた。

【表11】

表10

イヌ	遺伝子型	性別	生年月日	注射時の年齢	右眼 (OD)	左眼 (OS)
EM424	<i>T4R/+</i>	M	4/29/2016	27週	AAV2/5-sc-HOP- <i>RHO820-H1-shRNA820</i> P4337 5E+11 vg/ml 150 μ l SR	AAV2/5-sc-HOP- <i>RHO820-H1-shRNA820</i> P4337 5E+11 vg/ml 150 μ l SR
EM425	<i>T4R/+</i>	M	4/29/2016	27週	AAV2/5-sc-HOP- <i>RHO820-H1-shRNA820</i> P4337 5E+11 vg/ml 150 μ l SR	AAV2/5-sc-HOP- <i>RHO820-H1-shRNA820</i> P4337 5E+11 vg/ml 150 μ l SR

HOP：ヒトオペシンプロモーター；H1：H1 RNAポリメラーゼIIIプロモーター

【0100】

注射の11週間後に、インビボ網膜イメージング（cSLO/OCT）を実施し、光誘発性網膜変性を誘発するために、両方のイヌでOS眼に対して光照射（1mW/cm²で1分）を実施した。照射の2週間後に全てのイヌについてcSLO/OCTを再度実施し、治療によって与えられたレスキュー効果を評価した。イヌを殺し、いくつかの3mm神経網膜生検パンチを、OD眼から、ブレブ/処理および非ブレブ/非処理領域の両方から回収して、ウェスタンブロットによりロドプシンの発現レベルを、qPCR解析によりイヌおよびヒトのRHO RNAの発現レベルを測定した。OS眼を固定して、最適な切断温度の培地に包埋し、組織学および免疫組織化学染色のために処理した。

【0101】

ウェスタンブロット解析：

各OD眼由来の、3組の生検パンチ（ブレブ/処理または非ブレブ/非処理網膜領域のいずれかを表す）を、50 μ lのLewin緩衝液A（プロテアーゼ阻害物質を含む）中で、氷上で15分間インキュベートした。サンプルを40%振幅、15秒/10秒オフ×8パルスで超音波処理した。次に、サンプルを遠心分離し、ペレットを廃棄した。上清中のタンパク質濃度をBradford法により測定した。サンプルは、-20℃で保管した。ロドプシンを可視化するために、総タンパク質のうち1 μ gをゲルにロードした（使用した抗体：Millipore MAB5356、ODYSSEYブロッッキングバッファで1:1000に希釈）。該抗体は、イヌのRHOおよびヒトのRHOを共に検出することに留意されたい。Asn2でのグリコシル化の喪失のために、変異T4Rロドプシンは、免疫ブロットで検出できるより低い分子量（MW）を有するので、野生型の（イヌまたはヒトの）RHOタンパク質と区別することができる。従って、ヘテロ接合変異体RHO^{T4R/+}からのRHO免疫ブロットは、野生型（高分子量）RHOタンパク質および変異T4R（低分子量）RHOタンパク質に対応する2つのバンドを示す。抗ヒストンH3抗体（Abcam ab1791、1:3000に希釈）を、ローディングコントロールとして用いて、シグナルを標準化した。

【0102】

イヌの網膜におけるイヌおよびヒトのロドプシンRNAの絶対定量：

AAV2/5-sc-HOP-RHO820-H1-shRNA820による治療後の網膜に存在する、内在性のイヌのロドプシンRNAおよびヒトのRHO820RNAの絶対量を決定するために、Q-PCR標準曲線法を用いて、絶対定量を行った。イヌおよびヒトのRHOcDNAの既知量の希釈系列を用いて、標準曲線を構築した。総cDNAのうち0.1ナノグラムを定量に使用した。各サンプル中のイヌのRHOおよびヒトRHO820のRNAの総量を、この標準曲線に基づいて計算した。

【0103】

図19A～図19Fは、変異RHO^{T4R}/+イヌにおける、 5×10^{11} vg/mlの力価で網膜下に注射されたAAV2/5-sc-HOP-RHO820-H1-shRNA820による、ロドプシンのノックダウンおよび置換のRNAおよびタンパク質の解析を示す。対になった、濃灰色、灰色、ドットの丸は、ウェスタンブロットの各複製のための処理(Tx)および非処理(UnTx)領域における、生検パンチの位置を示しており、一方で、黒丸は、RNA定量のための生検パンチの位置を示す。図19Bは、イヌの網膜の処理(Tx)および非処理(UnTx)領域から取得した生検パンチにおける総ロドプシン量(イヌ+ヒトRHO820)を示す免疫ブロットを示す。ヒストンH3を標準化のために用いた。棒グラフは、処理および非処理領域におけるイヌのロドプシンタンパク質の残存率を示す。EM424-ODおよびEM425-ODの処理領域におけるより低い分子量のバンド(変異T4R RHOタンパク質に対応する)の消失に留意されたい。図19Cは、タンパク質定量のために用いられるパンチの各対に対する数値を示す表である。図19Dは、非処理領域で測定されるイヌのRHO RNAのパーセンテージとして、処理領域における残存するイヌのロドプシンRNAを示す棒グラフである。図19Eは、非処理領域で測定されるイヌのRHO RNAのパーセンテージとして、処理領域におけるヒトRHO820を示す棒グラフである。図19Fは、RNA定量のために用いられるパンチの各対に対する数値を示す表である。

【0104】

5×10^{11} vg/mlで、AAV2/5-sc-HOP-RHO820-H1-shRNA820を網膜下に注射した変異RHO^{T4R}/+イヌの眼における、光誘発性ダメージからの光受容細胞の防御の、インビボ網膜イメージングによる評価：

5×10^{11} vg/mlのウイルス力価で、網膜下に注射した2匹の変異RHO^{T4R}/+イヌ由来の眼を、注射前、注射の11週間後(光照射前)、および光ダメージの2週間後に、cSLO/OCTイメージングにより調べた。RHO^{T4R}突然変異体において急性の網膜変性を引き起こすが、野生型イヌでは引き起こさないことが以前に示された強度(1mW/cm²の角膜放射照度)での白色光の1分間の照射を、処理/プレブ領域におけるAAV2/5-sc-HOP-RHO820-H1-shRNA820ベクターによって与えられる防御レベルを評価するために使用した。プレブ/処理領域におけるONLの厚さは、注射後の全ての時点で保存され、当該ベクター構築物が毒性がないこと、および、その期間に光受容細胞の損失がないことを示唆した。周囲の非プレブ/非処理領域を、各眼に対する内部標準として使用した。光照射の2週間後、注射した両方の眼の、プレブ/処理領域において、ONLの厚さが完全に保存されていた。

【0105】

図20A～図20Cは、 5×10^{11} / vg/mlの力価で、AAV2/5-sc-HOP-RHO820-H1-shRNA820により処理した、変異RHO^{T4R}/+網膜の領域における、光誘発性網膜変性からの防御を示す、インビボ網膜イメージングを示す。図20Aは、光照射の2週間後の、変性から防御された網膜領域(白矢印によって区切られた境界)を示す、正面の(en face)cSLO合成画像を示す。薄灰色矢印は、図20Bで示されたOCT Bスキャンの処理領域の範囲内の位置を示し、濃灰色矢印は、図20Cで示されたOCT Bスキャンの非処理領域の範囲内の位置を示す。図20Bは、注射前、注射の11週間後、および注射の13週間後/光照射の2週間後の、処理領域の範囲内のOCT Bスキャンを示す。ONLの厚さは、ウイルスベクター注射後の両方の時点における処理領域全体に渡って、保存されている。図20Bおよび図30Vは

、注射前、注射の11週間後、および注射の13週間後/光照射の2週間後の、非処理領域の範囲内のOCT Bスキャンを示す。ONLは、注射の11週間後まで保存されているが、光照射の2週間後には完全に失われている。図21は、光誘発性網膜変性からの防御を示す、 5×10^{11} / v g / m l の力価でAAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820により処理した2つのRHO^{T4R} / + 由来の、ONLの厚さの組織分布図を示す。

【0106】

5×10^{11} v g / m l の力価で、AAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820を注射した変異RHO^{T4R} / + イヌの眼における、光誘発性ダメージからの光受容細胞の防御の、組織学および免疫組織化学による評価：

5×10^{11} / v g / m l の力価で、網膜下にAAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820を注射し、続いて、ある強度 ($1 \text{ mW} / \text{cm}^2$ の角膜放射照度) で、白色光により1分間光照射した (注射の11週間後)、上表に示した同一の変異RHO^{T4R} / + イヌ由来の眼を調べた。この照射量は、RHO^{T4R} 変異体において急性の網膜変性を引き起こすが、野生型イヌでは引き起こさないことが以前に示されている。

【0107】

免疫組織学を用いて、処理/ブレブ領域におけるAAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820によって与えられる防御レベルを評価した。周囲の非ブレブ/非処理領域を、各眼に対する内部標準として使用した。ロドプシン (RHO) およびヒト錐体アレスチン (hCA) に対する抗体を用いて、桿体外節および錐体の形態の完全性を評価した。光照射の2週間後、 5×10^{11} v g / m l の力価で注射した眼のブレブ/処理領域において、ONLの厚さの優れた保存が達成された。さらに、網膜をノックダウン試薬 s hRNA820 で処理した場合とは対照的に、AAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820 構築物では桿体外節の保存が達成された。

【0108】

図22は、 5×10^{11} / v g / m l の力価で、AAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820を網膜下に注射した、変異RHO^{T4R} / + 網膜の処理 (Tx)、移行ゾーン、および非処理 (Untx) 領域における、免疫組織化学を示す (ロドプシンは緑に染色され、図22の図ではより薄い染色として現れている；ヒト錐体アレスチンは赤に染色され、図22の図では灰色の染色として現れている)。処理領域では、外顆粒層 (ONL) の厚さ、および桿体外節 (OS) が完全に保存されているが、非処理領域では、全ての桿体が失われ、錐体細胞体は、一列に減少している。処理領域と非処理領域との間に、はっきりとした境界が、移行ゾーンで見られる。

【0109】

イヌのRHORNAおよびタンパク質の完全なノックダウンが (ウェスタンブロットにより)、ウイルス力価 5×10^{11} v g / m l でのAAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820により、達成されている。イヌの網膜における正常なRHOのレベルと比較した場合、硬化RHO820による効率的な置換は、mRNA (118 ~ 130%) およびタンパク質 (30 ~ 33%) のレベルの両方で達成される。光受容細胞の細胞体を含む外顆粒層 (ONL) の完全な防御は、ウイルス力価 5×10^{11} v g / m l でのAAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820により達成される。RHO820による効率的RHO置換の結果としての、桿体外節の完全な保存は、ウイルス力価 5×10^{11} v g / m l でのAAV2 / 5 - s c - HOP - RHO820 - H1 - s hRNA820により達成される。

【0110】

参考文献

1. Mao H, Gorbatyuk MS, Rossmiller B, Hauswirth WW, Lewin AS. Long-Term Rescue of Retinal Structure and Function by Rhodopsin RNA Replacement with a Single Adeno-Associated Viral Vector in P23H RHO Transgenic Mice. Hum G

10

20

30

40

50

ene Ther. 2012;23:356-366.

2.Rossmiller B, Mao H, Lewin AS. Gene therapy in animal models of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Mol Vis. 2012;18:2479-2496.

3.Gorbatyuk M, Justilien V, Liu J, Hauswirth WW, Lewin AS. Suppression of mouse rhodopsin expression in vivo by AAV mediated siRNA delivery. Vision Res. 2007;47:1202-1208.

4.Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 2003;115:209-216.

5. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. Nat Biotechnol. 2004;22:326-330.

6.Jensen SMR, Schmitz A, Pedersen FS, Kjems J+, Bramsen JB. Functional Selection of shRNA Loops from Randomized Retroviral Libraries. PLoS ONE. 2012;7:e43095.

7.Zhou H, Xia XG, Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. Nucleic Acids Res. 2005;33:e62-e70.

【0111】

均等物

本発明のいくつかの実施形態が本明細書に記載および例示される一方で、当業者は、本明細書に記載の機能を実行するための、および／または、結果および／または1つ以上の効果を得るための、様々な他の手段および／または構造を容易に想到することができる。また、これらの変形および／または改変は、本明細書に記載される発明の実施形態の範囲内であると見なされる。さらに通常は、当業者は本明細書に記載される全てのパラメータ、寸法、材料及び形態が例示的であること、及び、実際のパラメータ、寸法、材料および／または形態は、本発明の教示が用いられる特定の適用に基づいていることを容易に認識しているであろう。当業者は、本明細書に記載される特定の発明の実施形態の多くの均等物を理解するであろうし、あるいは、通常の実験のみを用いて確認することが可能である。したがって、前述の実施形態は単なる例として提示されていることが理解されるべきであり、また添付の請求の範囲及びその均等物の範囲内において、本発明の実施形態は、明細書に記載され、請求の範囲に記載された以外の方法で実施することが理解されるべきである。本開示の発明の実施形態は、本明細書に記載の個別の特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法を対象とするものである。さらに、これらの特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法の任意の組み合わせも本開示の発明の範囲内に含まれ、それは、特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法が互いに矛盾したものでない場合に限る。

【0112】

本明細書中で定義され用いられる全ての定義は、辞書の定義、参照することにより本明細書に組み込まれる文献中の定義、及び／又は定義された用語の普通の意味を制御すると理解されるべきである。

【0113】

本明細書中に開示された全ての参考文献、特許および特許出願は、それぞれが引用されている対象事項に関して参照により組み込まれ、場合によっては、その全体を含んでもよい。

【0114】

本明細書および請求の範囲において用いられる不定冠詞「a」および「an」は、明示的に反する記載がない限り、「少なくとも1つ」という意味に理解されるべきである。

【0115】

本明細書および特許請求の範囲において用いられる「および／または」という語句は、そのように結合された要素、すなわちある場合には結合的に (conjunctively) 存在し、他の場合には非結合的 (disjunctively) に存在する要素の、

「一方または両方」という意味に理解されるべきである。「および／または」と記載された複数の要素は、同じように、すなわち、そのように結合された要素の「1つ以上」と解釈されるべきである。具体的に特定された要素と関連するかどうかにかかわらず、「および／または」節によって具体的に特定された要素以外の他の要素が、場合により存在してもよい。したがって、非限定的な例として、「含む」のような非制限的(open-ended)言語と併せて使用される場合、「Aおよび／またはB」への言及は、一実施形態では、Aのみ(場合によりB以外の要素を含む)；別の実施形態では、Bのみ(場合により、A以外の要素を含む)；さらに別の実施形態では、AおよびBの両方(必要に応じて他の要素を含む)などを、指すことができる。

【0116】

本明細書および特許請求の範囲において用いられる場合、「または」は上記で定義した「および／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例として、リスト中の項目を分離する場合、「または」または「および／または」は包括的であると解釈されるべきであり、すなわち、いくつかの要素または要素のリストの少なくとも1つを含むが複数も含み、場合により追加のリストに示していない項目を含むと解釈されるべきである。明示的にこれと反する用語、例えば「1つだけ」もしくは「正確に1つ」、または、特許請求の範囲において使用される場合「～からなる」の用語のみが、いくつかの要素または要素のリストの正確に1つの要素を含むことを指すであろう。一般的に、本明細書で使用される「または」という用語は、「どちらか(either)」、「1つ(one of)」、「1つだけ(only one of)」、または「正確に1つ(exactly one of)」などの排他的な用語によって先行される場合にのみ、排他的な選択肢(すなわち、「どちらか一方であるが両方でない」)を示すと解釈されるであろう。特許請求の範囲において用いられる場合、「実質的に～からなる」は、特許法の分野で用いられる通常の意味有するであろう。

【0117】

本明細書および特許請求の範囲において用いられる場合、1つ以上の要素のリストを参照して「少なくとも1つの(at least one)」という語句は、要素のリスト内の1つ以上の任意の要素から選択される少なくとも1つの要素を意味すると理解されるべきであり、必ずしも要素のリスト内に具体的に列挙されたそれぞれの、および全ての要素の少なくとも1つを含む必要はなく、また、要素のリスト内の要素の任意の組み合わせを除外しない。この定義はまた、「少なくとも1つの」という語句が指し示す要素のリスト内で具体的に特定された要素以外の要素が、その具体的に特定された要素と関連するかどうかにかかわらず、場合により存在することを可能にする。従って、非限定的な例として、「AおよびBの少なくとも1つ」(または、同等であるが、「AまたはBの少なくとも1つ」または、同等であるが、「Aおよび／またはBの少なくとも1つ」)は、一実施形態において、少なくとも1つの(場合により2つ以上を含む)Aで、Bが存在しない(場合によりB以外の要素を含む)；別の実施形態では、少なくとも1つの(場合により2つ以上を含む)Bで、Aが存在しない(場合により、A以外の要素を含む)；さらに別の実施形態では、少なくとも1つの(場合により2つ以上を含む)A、および、少なくとも1つの(場合により2つ以上を含む)B(場合により他の要素を含む)などを指すことができる。

【0118】

明示的に反する記載がない限り、2つ以上のステップまたは作用を含む本明細書に記載される任意の方法において、本方法のステップまたは作用の順番は、本方法のステップまたは作用が列挙される順番に必ずしも限定されないこともまた、理解されるべきである。

【0119】

上記の明細書および請求の範囲において、全ての移行句は非制限的であると理解されるべきであり、移行句とは例えば、「含む」、「有する」、その他同種のものなどである。非制限的とはすなわち、それを含むがそれに限定されることはないということを意味する。「～からなる」および「実質的に～からなる」という移行句のみが、それぞれ制限的であ

10

20

30

40

50

るいは半制限的な移行句であり、特許審査手続の米国特許庁マニュアル第2111.03項に記載されている。別の実施形態では、非制限的移行句（例えば、「含む」）を使用してこの文書に記載された実施形態もまた、非制限的移行句によって記載された特徴「～からなる」および「実質的に～からなる」と考えられることが認められるべきである。例としては、本開示が「AおよびBを含む組成物」を記載する場合、本開示はまた、別の実施形態「AおよびBからなる組成物」および「実質的にAおよびBからなる組成物」を企図している。

【図面】

【図1】

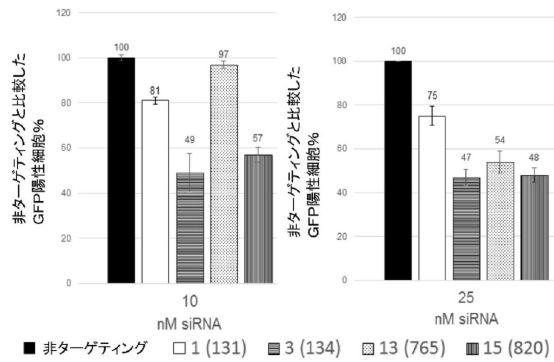


FIG. 1A

FIG. 1B

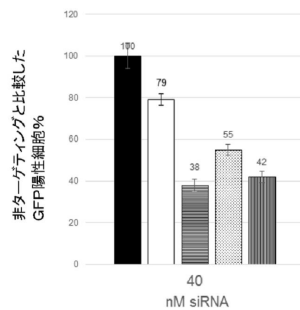


FIG. 1C

【図2】

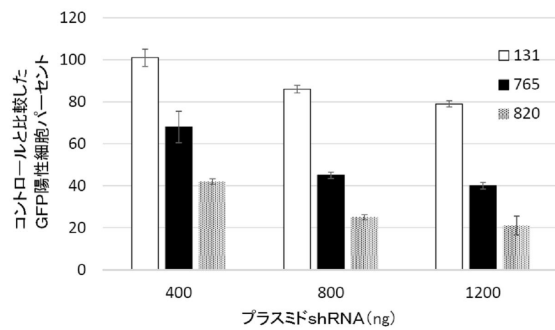


FIG. 2

【図3】

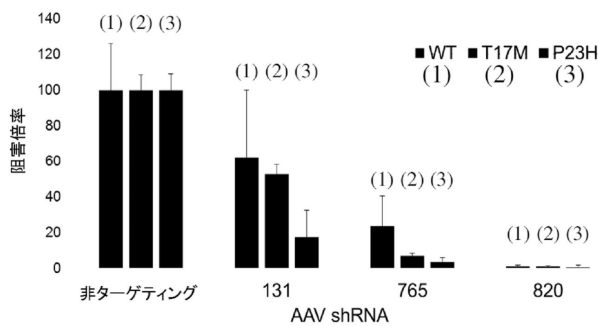


FIG. 3

【図4】

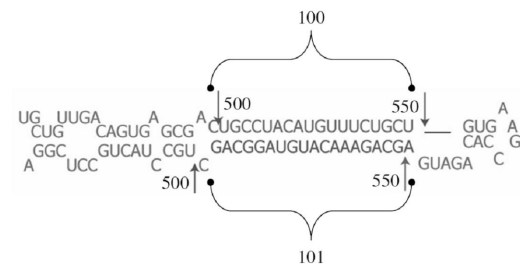


FIG. 4

10

20

30

40

50

【図 5】

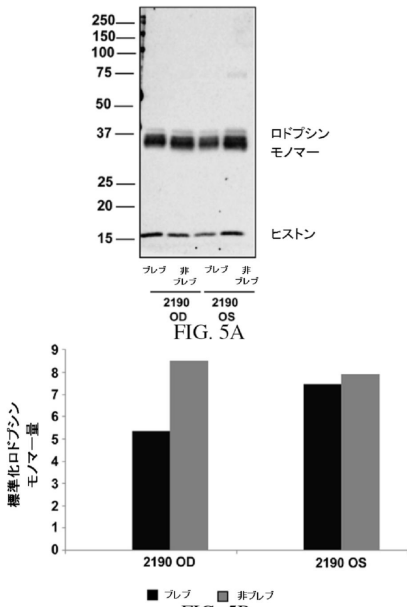


FIG. 5B

	ウイルスベクター	力価 (vg/ml, 150 ul)	標準化RHO量		% (プレブ/ 非プレブ)	% KD
			Bleb	Non-Bleb		
2190 OD	AAV2/5-sc-MOP500-rGFP-shRNA-Rho131	5 x 10 ¹²	5.36	8.51	62.98	37.02
2190 OS	AAV2/5-sc-MOP500-rGFP-shRNA-Rho131	1 x 10 ¹²	7.45	7.91	94.18	5.82

FIG. 5C

【図 6】

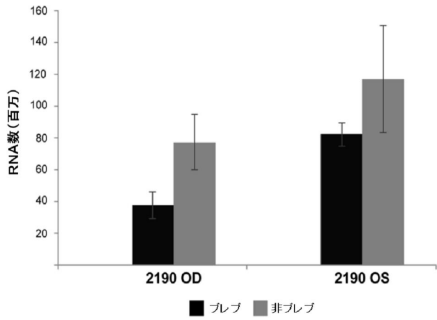


FIG. 6A

	ウイルスベクター	ウイルス力価 (vg/ml, 150 ul)	イタの総RHO RNA		% (プレブ/ 非プレブ)	% KD
			Bleb	Non-Bleb		
2190 OD	AAV2/5-sc-MOP500-rGFP-shRNA-Rho131	5 x 10 ¹²	37602197.0	77399793.0	48.58	51.42
2190 OS	AAV2/5-sc-MOP500-rGFP-shRNA-Rho131	1 x 10 ¹²	82161776.0	117083800.0	70.17	29.83

FIG. 6B

【図 7】

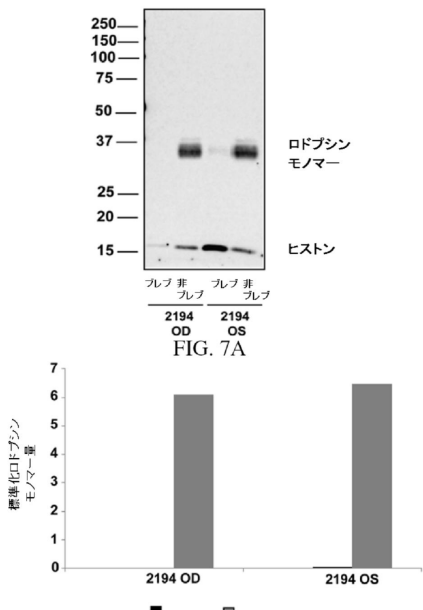


FIG. 7B

	ウイルスベクター	力価 (vg/ml,	標準化RHO量		(プレブ/ 非プレブ)	% KD
			プレブ	非プレブ		
2194 OD	AAV2/5-sc-MOP500-rGFP-shRNA-Rho131	5 x 10 ¹²	0.00	6.09	0.00	100.00
2194 OS	AAV2/5-sc-MOP500-rGFP-shRNA-Rho131	1 x 10 ¹²	0.05	6.46	0.77	99.23

FIG. 7C

【図 8】

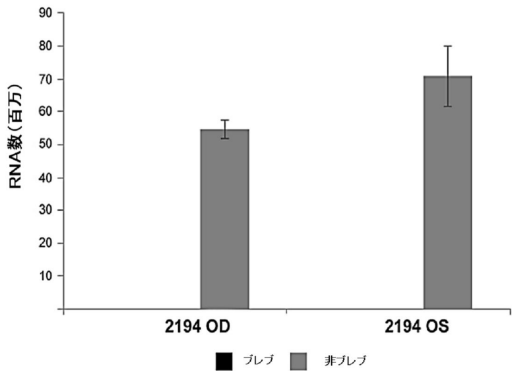


FIG. 8A

	ウイルスベクター	ウイルス力価 (vg/ml, 150 ul)	イタの総RHO RNA		% (プレブ/ 非プレブ)	% KD
			プレブ	非プレブ		
2194 OD	AAV2/5-sc-MOP500-rGFP-shRNA-Rho820	5 x 10 ¹²	31.4	54592300.0	0.00	100.00
2194 OS	AAV2/5-sc-MOP500-rGFP-shRNA-Rho820	1 x 10 ¹²	12.6	70759840.0	0.00	100.00

FIG. 8B

10

20

30

40

50

【図 9】

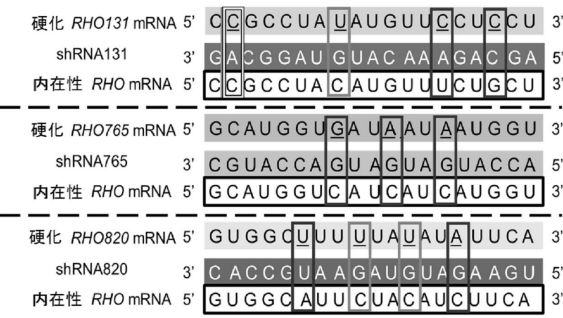


FIG. 9

【図 10】

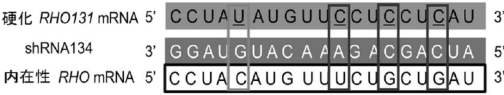


FIG. 10

【図 11】

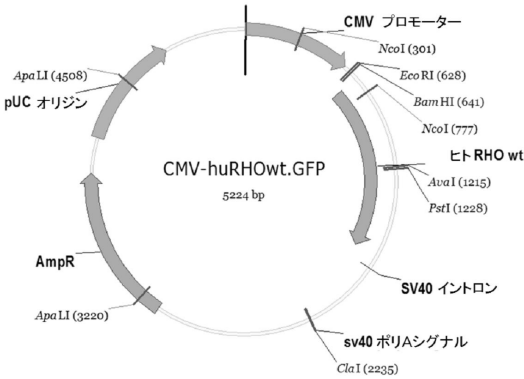


FIG. 11

【図 12 - 1】

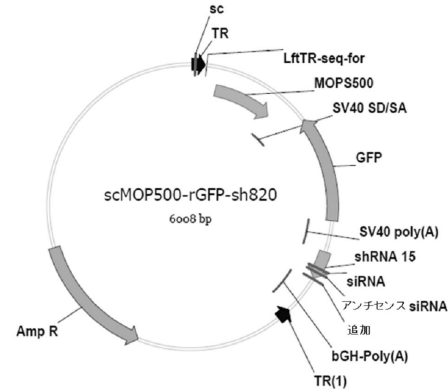


FIG. 12A

10

20

30

40

50

【 図 1 2 - 3 】

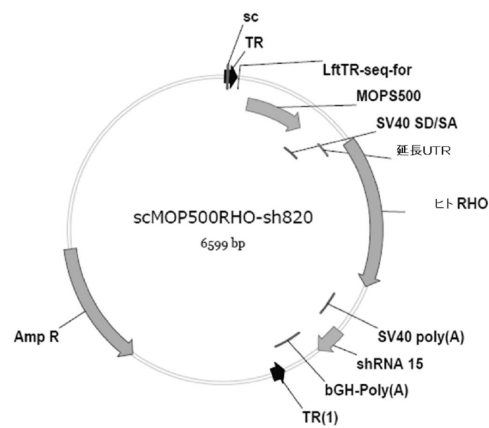


FIG. 12B

【 図 1 3 - 2 】

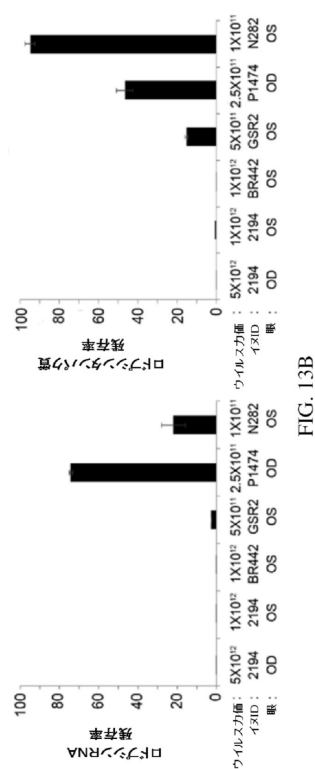
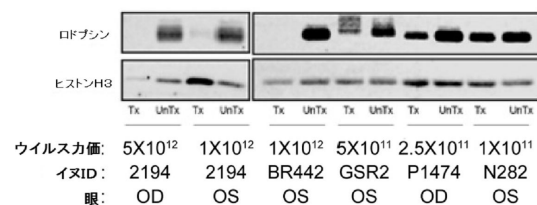


FIG. 13B



イスIDー 眼	ウィルスカ箱 (容量)	RHO RNA 残存率	反復試験	RHOタンパク質 残存率	RHOタンパク質の 平均残存率
2194-OD	5×10^{12} (150 ul)	0.0	Rep1	0.0 ●	
2194-OS	1×10^{12} (150 ul)	0.0	Rep1	0.8 ●	
BR442-OS	1×10^{12} (150 ul)	0.0	Rep1 Rep2 Rep3	0.0 ● 0.0 ● 0.0 ☺	0.0
GSR2-OS	5×10^{11} (110 ul)	2.6	Rep1 Rep2 Rep3	19.2 ● 15.7 ● 10.5 ☺	15.2
P1474-OD	2.5×10^{11} (150 ul)	74.3	Rep1 Rep2 Rep3	67.4 ● 38.5 ● 34.4 ☺	46.8
N282-OS	1×10^{11} (160 ul)	21.9	Rep1 Rep2 Rep3	75.2 ● 105.4 ● 104.6 ☺	95.1

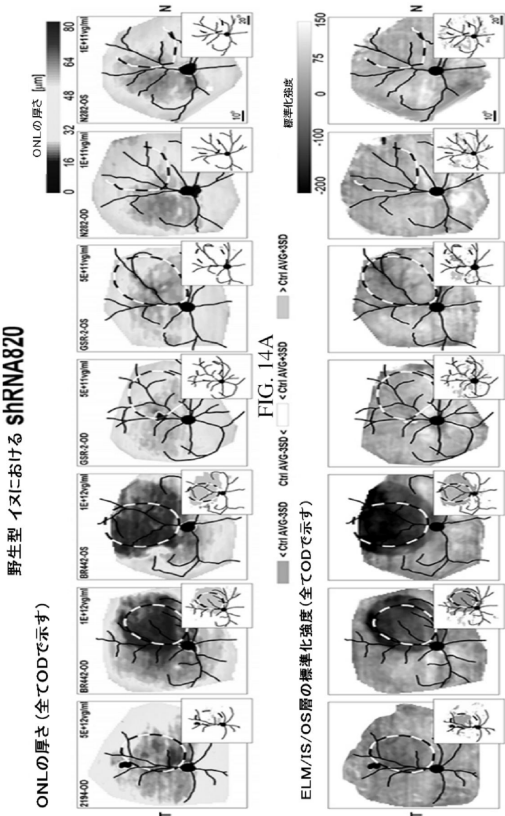
FIG. 13D

【図 13 - 3】

イヌ ID	ウイルスカド (容量)	RNA ノックダウン率	反復試験	タンパク質 ノックダウン率	タンパク質平均 ノックダウン率
2194 OD	5×10^{-2} (150 μ l)	100.0	—	100.0	—
2194 OS	1×10^{-2} (150 μ l)	100.0	—	99.2	—
BR442 OS	1×10^{-2} (150 μ l)	100.0	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	100.0 100.0 100.0	100.0
GSR2 OS	5×10^{-1} (110 μ l)	97.4	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	80.8 84.3 89.5	84.8
P1474 OD	2.5×10^{-1} (150 μ l)	25.7	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	32.7 38.5 34.4	53.3
N282 OS	1×10^{-1} (160 μ l)	78.1	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	24.8 -5.4 -4.6	4.9

FIG. 13E

【図 14 - 1】



10

20

【図 14 - 2】

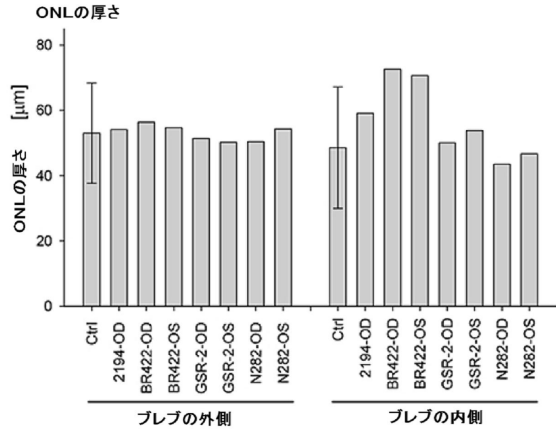
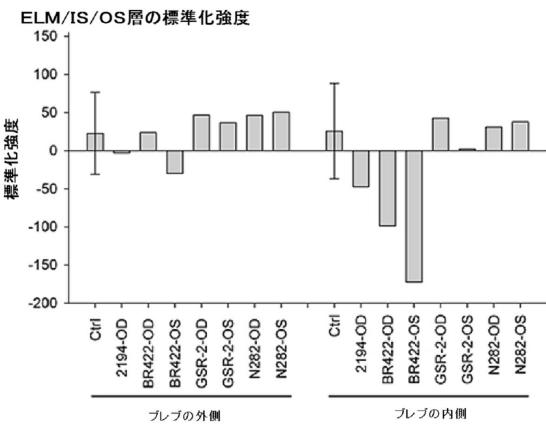


FIG. 14C

【図 14 - 3】

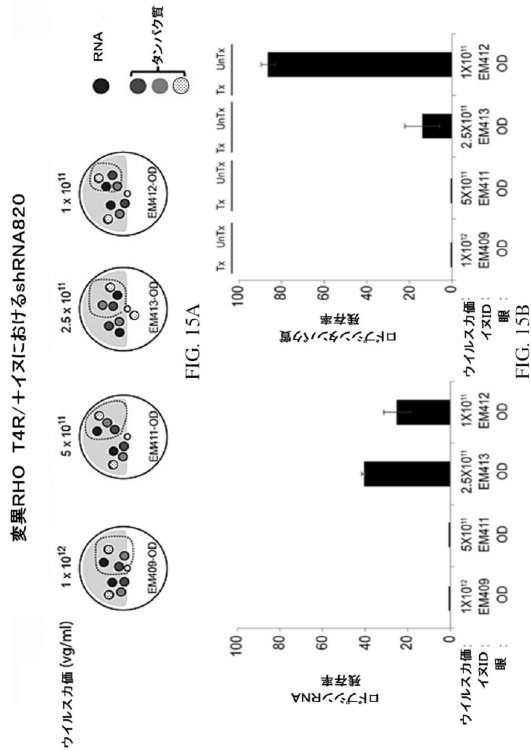


30

40

50

【図 15 - 1】



【図 15 - 2】

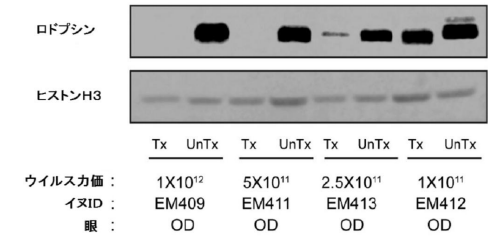


FIG. 15C

アイズID-眼	ウイルスカラム (容量)	RHO RNA 残存率	反復試験	RHO タンパク質 残存率	RHOタンパク質 平均残存率
EM409-OD	1x10 ¹² (150 µl)	0.0	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	0.0 0.0 0.0	0.0
EM411-OD	5x10 ¹¹ (150 µl)	0.1	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	0.0 0.0 0.0	0.0
EM413-OD	2.5x10 ¹¹ (150 µl)	40.9	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	10.1 8.4 23.5	14.0
EM412-OD	1x10 ¹¹ (150 µl)	25.1	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	87.5 89.0 82.8	86.4

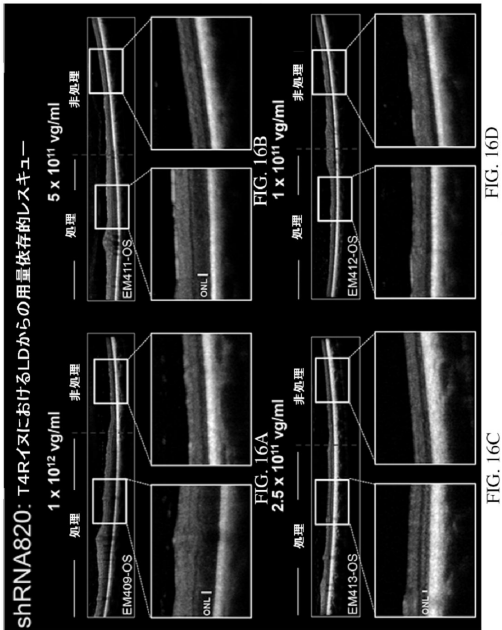
FIG. 15D

【図 15 - 3】

アイズID	ウイルスカラム (容量)	RNA ノックダウン率	反復試験	タンパク質 ノックダウン率	タンパク質平均 ノックダウン率
EM409 OD	1x10 ¹² (150 µl)	100.0	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	100.0 100.0 100.0	100.0
EM411 OD	5x10 ¹¹ (150 µl)	99.9	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	100.0 100.0 100.0	100.0
EM413 OD	2.5x10 ¹¹ (150 µl)	59.1	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	89.9 91.6 76.5	86.0
EM412 OD	1x10 ¹¹ (150 µl)	74.9	Rep1 ● Rep2 ● Rep3 ○	12.5 11.0 17.2	13.6

FIG. 15E

【図 16】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/02

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 Z Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 アルフレッド・エス・ルウィン

アメリカ合衆国 3 2 6 0 5 フロリダ州ゲインズビル、ノースウエスト・イレブンス・ロード 1 8 5
0 番

(72)発明者 ウィリアム・ダブリュー・ハウスワース

アメリカ合衆国 3 2 6 0 8 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト・エイティナインス・ストリ
ート 1 2 0 0 1 番

(72)発明者 マイケル・ティ・マッセンギル

アメリカ合衆国 3 2 6 0 1 - 6 2 1 9 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト・フィフス・テラ
ス 2 5 番、アパートメント 4 5 5 6

(72)発明者 ウィリアム・ベルトラン

アメリカ合衆国 1 9 1 4 7 ペンシルベニア州フィラデルフィア、サウス・セカンド・ストリート 5
3 0 番、アパートメント 8 1 1

(72)発明者 グスタボ・ディ・アギーレ

アメリカ合衆国 1 9 0 6 3 ペンシルベニア州メディア、ティンバー・ジャンプ・レイン 3 0 0 番

(72)発明者 アルトゥール・シデシヤン

アメリカ合衆国 1 9 4 4 4 ペンシルベニア州ラファイエット・ヒル、チェリーデイル・ドライブ 6
8 7 番

(72)発明者 サミュエル・ジェイコブソン

アメリカ合衆国 1 9 0 7 2 ペンシルベニア州ペン・バレー、センテニアル・ロード 1 2 2 9 番

審査官 上村 直子

(56)参考文献 中国特許出願公開第 1 0 2 0 6 1 3 0 5 (C N , A)

特表 2 0 0 6 - 5 2 3 4 6 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 4 3 4 1 8 (W O , A 2)

特表 2 0 0 7 - 5 3 0 4 3 1 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 5 9 1 7 1 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 6 4 8 1 5 (U S , A 1)

特表 2 0 1 0 - 5 1 8 8 2 1 (J P , A)

HUMAN GENE THERAPY, 2012年04月, Vol.23, pp.356-366

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q