(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-523211
(P2023-523211A)
(43)公表日　令和5年6月2日(2023.6.2)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	45/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ　35/76　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/76		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ　27/02　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１０７	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全37頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-563882(P2022-563882)
(86)(22)出願日　令和3年4月23日(2021.4.23)
(85)翻訳文提出日　令和4年12月15日(2022.12.15)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/060647
(87)国際公開番号　WO2021/214282
(87)国際公開日　令和3年10月28日(2021.10.28)
(31)優先権主張番号　20315217.8
(32)優先日　令和2年4月24日(2020.4.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　20305407.7
(32)優先日　令和2年4月27日(2020.4.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　591100596
アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル
フランス国、エフ－７５０１３ パリ、リュ・ドゥ・トルビアック １０１
(71)出願人　503197304
ジェネトン
フランス・９１０００・エヴリ－クール・クーロンヌ・リュ・ドゥ・ランテルナシオナル１・ビス
(71)出願人　503119487
ユニヴェルシテ・デヴリ・ヴァル・デソンヌ
フランス・９１０００・エヴリ－クール・クーロンヌ・ブールヴァール・フランソ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　眼科遺伝子治療後の、導入遺伝子産物を発現する形質転換細胞に対する免疫応答の誘導を防止するための方法

(57)【要約】
眼の免疫特権状態にもかかわらず、ＡＡＶを用いて処置された幾人かの患者の二次的な視力喪失は、発明者らに、網膜下注入後のＡＡＶベクターの免疫原性に対する課題をもたらした。そして、本発明者らは、網膜下ＡＡＶ注入後の、その末梢において誘導される抗導入遺伝子応答及び抗カプシド免疫応答の特徴を明らかにした。ＨＹ雄性抗原と融合したレポータータンパク質をコードするＡＡＶ８の異なる用量を、０日目に、成体免疫適格性のＣ５７ＢＬ／６雌マウスの網膜下腔に注入した。網膜下ＡＡＶ注入は、用量依存的な導入遺伝子産物に対する炎症誘発性免疫応答を誘導し、局所的な導入遺伝子発現と相関した。網膜下関連免疫抑制（ＳＲＡII）機序を引き起こすために、０日目に、いくつかのマウスに、ＡＡＶとＨＹペプチドを網膜下に共注入した。興味深いことに、このＡＡＶ８と導入遺伝子産物のペプチドとの網膜下への共注入は、高用量のベクター（５．１０^{10}vg）であっても、抗導入遺伝子Ｔ細胞免疫応答を調節した。この免疫調節はまた、網膜変性の病態生理学的マウスモデルにおいても確認された。また、本発明者らは、網膜下腔中へのＡＡＶ８の注入が、導入遺伝子及びカプシドに対する炎症誘発性末梢免疫応答を誘導し、導入遺伝子ペプチドとの共注入によりこれを打ち消すことができることを実証した。したがって、本発明の目的は、眼科遺伝子治療後の、導入遺伝子産物及びＡＡＶカプシドに対する免疫応答の誘導を防止するための方法を提供することである。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
導入遺伝子を含有するベクターを用いて眼科遺伝子治療を受けた患者における、二次的な視力喪失を防止するための方法であって、その方法が、遺伝子治療と同時に、前記導入遺伝子産物又は前記ベクターに由来する少なくとも１つのペプチドを投与し、それにより、前記導入遺伝子産物を発現する前記形質転換細胞に対する免疫応答の誘導を防止することを含む、方法。
【請求項２】
前記免疫応答が、細胞毒性応答である、請求項１記載の方法。
【請求項３】
前記患者の網膜において、関心対象の導入遺伝子を発現させる方法であって、その方法が、前記関心対象の導入遺伝子を含有するある量のベクターを、前記導入遺伝子産物又はベクターに由来するある量の少なくとも１つのペプチドと組み合わせて、網膜下腔に注入することからなるステップを含む、方法。
【請求項４】
処置を必要とする患者における網膜疾患を処置する方法であって、前記関心対象の導入遺伝子を含むある量のベクターを、前記導入遺伝子産物又はベクターに由来するある量の少なくとも１つのペプチドと組み合わせて、網膜下腔に注入する、一般的なステップを含む、方法。
【請求項５】
前記患者が、加齢性黄斑変性症、及び糖尿病性網膜症のような黄斑変性症からなる群より選択される後天性網膜疾患に罹患している、請求項１から４のいずれか１項記載の方法。
【請求項６】
前記患者が、網膜色素変性症、レーバー先天性黒内障、Ｘ連鎖性網膜分離症からなる群より選択される遺伝性の網膜疾患に罹患している、請求項１から４のいずれか1項記載の方法であって、前記網膜疾患が、常染色体劣性重症早発型網膜変性症（レーバー先天性黒内障）、先天性色覚異常、シュタルガルト病、ベスト病、ドイン病、錐体ジストロフィー、網膜色素変性症、Ｘ連鎖性網膜分離症、アッシャー症候群、加齢性黄斑変性症、萎縮性の加齢性黄斑変性症、血管新生ＡＭＤ、糖尿病黄斑症、増殖性糖尿病網膜症（ＰＤＲ）、嚢胞状黄斑浮腫、中心性漿液性網膜症、網膜剥離、眼内炎症、緑内障、後部ぶどう膜炎、脈絡膜血症、及びレーバー遺伝性視神経症を含む、方法。
【請求項７】
前記導入遺伝子産物が、網膜細胞の機能を増強するポリペプチドである、請求項１から４のいずれか１項記載の方法。
【請求項８】
前記導入遺伝子産物が、遺伝子機能の部位特異的ノックダウンを提供するエンドヌクレアーゼである、請求項１から４のいずれか１項記載の方法。
【請求項９】
前記導入遺伝子を含有するベクターが、ウイルスベクター及び非ウイルスベクターからなる群より選択される、請求項１から４のいずれか１項記載の方法。
【請求項１０】
前記ベクターが、ＡＶＶベクターである、請求項９記載の方法。
【請求項１１】
前記ＡＡＶベクターが、ＡＡＶ８ベクターである、請求項１０記載の方法。
【請求項１２】
前記ペプチドが、前記導入遺伝子産物又はベクターに由来する、免疫優性ペプチドである、請求項１から４のいずれか１項記載の方法。
【請求項１３】
前記免疫優性ペプチドが、前記ウイルスベクターのカプシドタンパク質に由来する、請

求項１２記載の方法。
【請求項１４】
前記免疫優性ペプチドが、前記ＡＡＶベクターのＶＰ１、ＶＰ２、又はＶＰ３カプシドタンパク質に由来する、請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
前記免疫優性ペプチドが、前記導入遺伝子産物に由来する、請求項１２記載の方法。
【請求項１６】
前記ベクターが、２、３、４、５、６、８、９又は１０種類の免疫優性ペプチドと同時に、網膜下腔に注入される、請求項１から４のいずれか１項記載の方法。
【請求項１７】
前記ベクターが、ＭＨＣクラスI拘束性エピトープを含む少なくとも一つの免疫優性ペプチド及び／又はＭＨＣクラスII拘束性エピトープを含む少なくとも一つの免疫優性ペプチドと共に注入される、請求項１２記載の方法。
【請求項１８】
前記関心対象の導入遺伝子を含有するベクター、前記導入遺伝子産物又はベクターに由来する少なくとも１つのペプチド、及び薬学的に許容され得る担体、希釈剤、賦形剤、又は緩衝剤を含む医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、医薬及び具体的には遺伝子治療及び眼科の分野である。
【背景技術】
【０００２】
１９９６年に、Ａｌｉらは、光受容体及び網膜色素上皮細胞が、ＡＡＶ２ベクターにより効率的に形質導入され得ることを示すことにより、網膜におけるアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介性遺伝子導入への新たな道を開いた（Ali et al., 1996)。続く１０年間に、いくつかの研究が、いくつかのＡＡＶ血清型の網膜における向性の特徴を明らかにしようとした(Allocca et al., 2007; Auricchio et al., 2001; Lebherz et al., 2008; Weber et al., 2003)。ＡＡＶを用いた前臨床研究が、レーバー(Leber’s)先天性黒内障（ＬＣＡ）などの単一遺伝子性網膜ジストロフィーの処置を目的として、非ヒト霊長類（Jacobson et al., 2006a; Maclachlan et al., 2011; Ramachandran et al., 2016; Vandenberghe et al., 2013）及びイヌ(Acland et al., 2001, 2005; Jacobson et al., 2006b; Le Meur et al., 2007; Petit et al., 2012)において、実施された。２００７年には、Samuel Jacobson(NCT00481546), Robin Ali(NCT00643747）及びAlbert Maguire(NCT00516477)らの主導により、ＡＡＶ媒介性の眼科遺伝子導入によるＬＣＡの改善を目的とした最初の臨床試験が開始された。これら３つの試験のすぐ後に、ＬＣＡ（Timothy Stout NCT00749957, Michel Weber NCT01496040）、並びに全脈絡膜萎縮症（NCT01461213）及び加齢性黄斑変性（NCT01024998、NCT01494805）などの他の疾患に対するいくつかの他の試験が続いた。その後すぐに公表された予備的結果では、何人かの患者における視力改善に加えて、ＡＡＶベクターの安全性が報告された (Bainbridge et al., 2015; Hauswirth et al., 2008; Le Meur et al., 2017; Maguire et al., 2009)。
【０００３】
しかしながら、長期的には、何人かの患者が、治療を受けた眼の二次的な視力喪失を経験した(Bainbridge et al., 2015; Hauswirth et al., 2008; Le Meur et al., 2017; Maguire et al., 2009)。この現象は、何により説明できるのであろうか？いくつかの補完的な仮説が示唆され得る。１つは、進行中の変性プロセスであり、このプロセスは、機能の部分的な救済にもかかわらず、変性しつつある細胞のプログラムされた死につながる可能性がある(Cideciyan et al., 2013)。別の１つは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対して説明されているように、遺伝子発現の誘導又は転写後の調節機序の

可能性がある(Dupont et al., 2015）。３番目の仮説は、ベクターのカプシドタンパク質に対する免疫応答に加えて、ＡＡＶベクターにより移入される新生抗原である導入遺伝子産物を発現する形質転換細胞に対する免疫応答の誘導の関与を含む。

【０００４】

眼の免疫特権はよく知られているが、その結果、免疫応答の役割について、十分に考慮することが出来なかったと考えられる。いくつかの眼の特性は、炎症性免疫応答の誘導を制限し、かつ厳密に制御している。局所的には、血液網膜関門を構成するタイトジャンクションなどの物理的障壁が、生体と他の部分との交流を制限する(Rizzolo et al., 2011)。同時に、ＴＧＦ－βなどの抗炎症分子の大きなパネルの分泌(Stein-Streilein, 2013; Taylor et al., 1997)は、免疫応答を抑制する傾向がある。さらに、免疫調節機構は、眼の中への抗原の導入の後、その末梢に抗原特異的な免疫逸脱を誘導することができる；すなわち、前房又は網膜下腔への抗原の注入は、それぞれ、前房関連免疫偏位（ＡＣＡＩＤ）(Vendomele et al., 2017)又は網膜下関連免疫抑制（ＳＲＡＩＩ）(Vendomele et al., 2018)を誘導する。それにもかかわらず、眼は炎症を起こすプロセスに対して密閉されているわけではない。いくつかの眼の区画では、ウイルス及び細菌は、眼内炎やぶどう膜炎などの炎症を誘導することがある(Chan et al., 2017; Kurniawan et al., 2017)。ＡＡＶ媒介性眼科遺伝子治療の臨床試験では、眼科検査で、幾人かの患者において最初の数日間に、一過性の、時には無症候性の炎症が確認されているものの、適応免疫反応のレベルは極めて低いようである(NCT00643747, NCT01494805)。明らかな倫理的理由のために、これらの革新的なアプローチに関与する免疫学的機序の詳細な調査が不可能であったため、免疫モニタリングは、血液サンプルに対してのみ行われてきた。

【発明の概要】

【０００５】

クレームにより定義されているように、本発明は、眼科遺伝子治療後の前記導入遺伝子産物及び前記ＡＡＶカプシドに対する免疫応答の誘導を防止するための方法に関する。

発明の詳細な説明

【０００６】

１０年間にわたり、ＡＡＶ媒介性遺伝子導入は、眼疾患を処置するための臨床試験において試験されてきた。前記眼の免疫特権状態にもかかわらず、ＡＡＶを用いて処置された幾人かの患者の二次的な視力の喪失は、本発明者らに、網膜下に注入後のＡＡＶベクターの免疫原性に対する課題をもたらした。したがって、本発明者らは、網膜下ＡＡＶ注入後に、その末梢に誘導される、抗導入遺伝子及び抗カプシド免疫応答の特徴を明らかにすることを目指した。ＨＹ雄性抗原と融合したレポータータンパク質（ＧＦＰ又はＬｕｃ２）をコードするＡＡＶ８の異なる用量を、０日目に、成体免疫適格性Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスの網膜下腔に注入した。ＨＹ雄性抗原をコードする導入遺伝子は、ＭＨＣクラスI及びＭＨＣクラスII拘束性Ｔ細胞エピトープ（Ｈ－２ｂ雌マウスにおける免疫優性のＵＴＹ及びＤＢＹペプチド）を含み、ＰＧＫプロモーター下でＡＡＶ８にパッケージされていた。前記マウスを、１４日目に、ＨＹペプチドを用いて、又は用いずに、皮下に免疫し、２１日目にそれらの脾臓におけるＴ細胞免疫応答を、ＨＹペプチドを用いてインビトロで再刺激した後、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔアッセイにより分析した。導入遺伝子の発現を、生物発光イメージングを用いて経時的にモニターし、そして、全身性の抗導入遺伝子（ＨＹ）Ｔ細胞免疫応答と相関させた（図１）。データは、ＡＡＶ８の網膜下注入に続いて、導入遺伝子の発現レベルはＡＡＶ注入用量と相関し、２０日目まで維持されることを示した（図１Ａ及び１Ｂ）。網膜下ＡＡＶ注入は、導入遺伝子産物に対する用量依存的な炎症性免疫応答を誘導し、それは局所的な導入遺伝子発現と相関した（図１Ｃ）。網膜下関連免疫抑制（ＳＲＡＩＩ）の機序(Vendomele et al., 2018)を引き起こすために、いくつかのマウスにＡＡＶ及びＨＹペプチドを、０日目に網膜下に共注入した。興味深いことに、このＡＡＶ８と前記導入遺伝子産物のペプチドとの網膜下共注入は、ベクターが高用量（5.10^{10}vg）であっても、抗導入遺伝子Ｔ細胞炎症性免疫応答（図２）及びインビ

ボでの導入遺伝子特異的細胞毒性（図３）を調節した（少なくとも４０％の抑制）。

【０００７】

抗カプシドＴ細胞応答を調査する目的で、以前の実験において２１日目に採取した脾細胞を、ＡＡＶ８を用いたインビトロでの再刺激の後に、２１日目にＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔアッセイにより分析した。データは、ＡＡＶ８（５．１０^{10}ｖｇ）の網膜下注入が、抗ＡＡＶ８炎症性Ｔ細胞免疫応答を誘導することを示した（図４）。興味深いことに、ＡＡＶ８の、導入遺伝子産物のペプチドとの網膜下共注入は、抗カプシドＴ細胞免疫応答のバイスタンダー（bystander）調節（６８．９％抑制）を可能にした。まとめると、このデータは、網膜下腔におけるＡＡＶ８の注入が、導入遺伝子及びカプシドに対する炎症性末梢免疫応答を誘導し、それは、導入遺伝子ペプチドとの共注入により抑制することができることを実証する。

【０００８】

したがって、本発明の目的は、眼科遺伝子治療後の、導入遺伝子産物及びＡＡＶカプシドに対する免疫応答の誘導を防止するための方法を提供することである。

【０００９】

主要な定義

本明細書で使用されるとき、用語「患者」又は「それを必要とする患者」は、ヒト又は非ヒト哺乳類を対象としている。典型的には、前記患者は、網膜疾患を発症しているか、又は発症している可能性が高い。

【００１０】

本明細書で使用されるとき、用語「網膜」は、視覚系の高度に組織化されかつ複合的な多層構造のための一般的な略語である。前記網膜は、光受容体、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、及び神経節を含む少なくとも５つの異なる種類のニューロンを含む。用語「網膜」は、眼の硝子体に近接する網膜内層、ならびに脈絡膜（すなわち、眼の網膜と強膜との間の導管／結合層）に近接する網膜外層、及びその間の層を含む。これらの層のそれぞれは、視覚情報の処理に直接又は間接的に関与する１つ以上の細胞部分又はタイプを含む。最も外側の層から始まり、そして硝子体を内側に向かって進み、網膜は、少なくとも次の層を含む：

網膜の最も外側の層は、他の網膜層に極めて重要な代謝サポートを提供するが、視覚刺激を神経性シグナルにコードすることに直接関与せず、かつ光に応答しない網膜色素上皮（「ＲＰＥ」）である。ＲＰＥ細胞は、暗色の色素を持ち、眼内の光散乱の原因となる迷光を吸収する。網膜の次の数層は、光受容体細胞、すなわち、夜間視力のための桿体細胞及び昼間視力のための錐体細胞の層を含む、様々な細胞体又は部分に関する。光受容体は、光を受け取り、処理するために視覚情報シグナルを伝達する細胞である。光受容体は、体内のいかなる細胞よりも高い代謝率を有する。これらの細胞の代謝要求は、脈絡膜の血液供給の近くに位置するこれらの細胞を有することにより調節される。光受容体の外面は外節と呼ばれる識別可能な層である。この層は、光を吸収し、それを電気シグナルに変換する光色素を含有する。網膜の次の層は、光受容体の内側の部分であり、多くの光受容体の非核細胞小器官を含有する。外境界膜（「ＯＬＭ」）は、網膜グリア細胞（別名ミュラー（Muller）細胞）を相互連結するプロセスにより形成され、光受容細胞の内側部分をその核から分離する。光受容体の核は、外核層（「ＯＮＬ」）と呼ばれる次の識別可能な網膜層を形成する。続いて、内側に向けて、その次の網膜層は、双極層及び水平層の樹状突起、光受容体のシナプス末端、及びその他のシナプスを含む、相対しているシナプス構造の最初の層を含む外側の網状層（「ＯＰＬ」）である。その内側の核層（「ＩＮＬ」）は、次の網膜層であり、双極細胞及び水平細胞の細胞体、ならびに様々なタイプのアマクリン細胞の細胞体を含む。その次の層は、双極細胞、水平細胞、及びアマクリン細胞のシナプスを含む内網状層（「ＩＰＬ」）である。最も内側の細胞体層は、約８０％のパルボ（又はミゼット）細胞、約１０％のパラソル又はマクロ細胞、及びその他の神経節細胞から構成される神経節細胞層（「ＧＣＬ」）である。網膜の次の層である神経線維層（「ＮＦＬ」）は、神経節細胞の軸索を含む。これらの神経は、眼内では有髄ではないが、眼か

ら離れ視神経を形成するにつれて有髄となる。網膜の最内層は、内境界膜（ＩＬＭ）であり、網膜を硝子体から分離している。

【００１１】

本明細書で使用されるとき、用語「網膜細胞」は、本明細書で、網膜の神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞、双極細胞、及び桿と錐を含む光受容体細胞、ミュラーグリア細胞、及び網膜色素上皮などの、網膜を含むいずれの細胞型も指すことができる。

【００１２】

本明細書で使用されるとき、用語「網膜下腔」は、網膜における光受容細胞と網膜色素上皮細胞の間の位置を指す。前記網膜下腔は、網膜下に液体を注入する前などに、注入可能な腔であり得る。網膜下腔はまた、注入可能な腔に注入される液体を含有し得る。この場合、前記液体は「網膜下腔と接触している」。「網膜下腔に接している」細胞は、ＲＰＥ及び光受容細胞などの、網膜下腔に接する細胞を含む。

【００１３】

本明細書で使用されるとき、用語「ブレブ（bleb）」は、眼の網膜下腔内の液体腔を指す。本発明のブレブは、単一の腔への単一の液体の注入により、同一の腔への１種以上の液体の複数の注入により、又は複数の腔への複数の注入により作成されてもよく、再配置されると、網膜下腔の所望の部分に渡って治療効果を達成するために有用な、全体的な液体腔が作成される。

【００１４】

本明細書で使用されるとき、用語「網膜疾患」は、例えば、光受容体；神経節又は視神経；若しくは血管新生の損傷又は変性により、網膜の機能が影響を受ける幅広いクラスの疾患を指す。当業者は、遺伝性網膜疾患と後天性網膜疾患を識別することができる。後天性網膜疾患の代表的な例は、加齢性黄斑変性症、及び糖尿病性網膜症などの黄斑変性症を含むが、これらに限定されない。遺伝性網膜疾患の例は、網膜色素変性症、レーバー（Leber’s）先天性黒内障、Ｘ連鎖性網膜分離症を含むが、これらに限定されない。例えば、網膜疾患の非限定的な例は、常染色体劣性重症早発型網膜変性症（レーバー先天性黒内障）、先天性色覚異常、シュタルガルト（Stargardt's）病、ベスト（Best's）病、ドイン（Doyne's）病、ベスト（Best's）病、ドイン（Doyne's）病、錐体ジストロフィー、網膜色素変性症、Ｘ連鎖性網膜分離症、アッシャー（Usher's）症候群、加齢性黄斑変性、萎縮性の加齢性黄斑変性症、血管新生ＡＭＤ、糖尿病黄斑症、増殖性糖尿病網膜症（ＰＤＲ）、嚢胞様黄斑浮腫、中心性漿液性網膜症、網膜剥離、眼内炎症、緑内障、後部ぶどう膜炎、脈絡膜血症、及びレーバー遺伝性視神経症を含む。

【００１５】

本明細書で使用されるとき、用語「視力喪失（vision loss）」は、視力の低下を指し、視力の部分的及び完全な喪失又は低下を含む。用語「二次的な視力喪失」は、処置の初期段階でいくつかの臨床的改善が観察されたにもかかわらず、しばらくの後に眼科遺伝子治療に続いて起こる視力喪失を表す。視力喪失を評価する方法は、当該技術分野で公知であり、客観的測定、ならびに主観的（例えば、被験体が報告した）測定を含む。例えば、被験体の視機能に対する処置の有効性を測定するために、以下のうちの１つ以上が評価され得る：被験体の主観的な視力の質又は改善された中心視力機能（例えば、被験体の流暢に読む能力及び顔を認識できる能力の改善）、被験体の視覚運動性（例えば、迷路を進むのに必要な時間の減少）、視力（visual acuity）（例えば、被験体のＬｏｇＭＡＲスコアの改善）、微小視野測定（microperimetry）（例えば、被験体のｄＢスコアの改善）、暗順応視野測定（例えば、被験体のｄＢスコアの改善）、ファインマトリックスマッピング（例えば、被験体のｄＢスコアの改善）、ゴールドマン視野測定（例えば、：縮小された暗点領域の大きさ（すなわち、視覚消失の範囲）及びより小さな対象を解明する能力の改善）、明滅（flicker）感度（例えば、ヘルツの改善）、自己蛍光、及び電気生理学的測定（例えばＥＲＧの改善）。

【００１６】

本明細書で使用されるとき、用語「処置」又は「処置する」は、予防的又は防止的な処

置、ならびに治癒的又は疾患修飾的処置の両方を指し、疾患にかかるリスクのある又は疾患にかかったと疑われる患者、ならびに、病気であるか、あるいは疾患に罹患しているか又は病状に苦しんでいると診断された患者の処置を含み、そして臨床的な再発の抑制を含む。１つ以上の障害又は再発した障害の病状を、予防、治癒、遅延、その重症度を軽減、又は改善するために、或いは、そのような処置が無いときに期待される範囲を超えて患者の生存期間を延ばすために、医学的な障害を有する患者又は最終的にその障害を獲得し得る患者に対して、前記処置は施され得る。「治療レジメン」とは、病気の処置のパターン、例えば、治療中に使用される投与量のパターンを意味する。治療レジメンは、導入レジメン及び維持レジメンを含み得る。「導入レジメン」又は「導入期間」は、疾患の最初の処置に使用される治療レジメン（又は治療レジメンの一部）を指す。導入レジメンの一般的な目標は、処置レジメンの最初の期間中に、患者に高レベルの薬物を提供することである。導入レジメンは、「負荷レジメン」を（部分的又は全体的に）用いてもよく、これは、維持レジメン中に医師が用いるよりも多い投与量の薬物を投与すること、維持レジメン中に医師が薬物を投与するよりも頻繁に薬物を投与すること、又はその両方を含み得る。「維持レジメン」又は「維持期間」は、病気の処置中に患者の維持のために、例えば患者を長期間（数ヶ月又は数年）寛解状態に維持するために使用される治療レジメン（又は治療レジメンの一部）を指す。維持レジメンは、持続的な治療（例えば、週１回、月１回、年１回など、一定の間隔で薬物を投与すること）又は間欠的な治療（例えば、中断した処置、間欠的な処置、再発時の処置、又は具体的な所定の基準［例えば、疼痛、疾患の兆候など］に到達した上での処置）を用い得る。

【００１７】

本明細書で使用されるとき、用語「遺伝子治療」は、遺伝子及び／又は遺伝子の発現を復元、修正、又は修飾する細胞のゲノムへのポリヌクレオチドの導入を指す。したがって、用語「眼科遺伝子治療」は、具体的に網膜細胞中に導入遺伝子産物を発現させるために、眼球に適用される遺伝子治療を指す。

【００１８】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書で、いずれかの長さのアミノ酸のポリマーを指すために、互換的に使用される。前記用語はまた、修飾されたアミノ酸ポリマー、例えば、ジスルフィド結合を形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、標識成分と結合したアミノ酸ポリマーも包含する。遺伝子治療の文脈中で議論される場合のポリペプチドは、それぞれの無傷のポリペプチド、又はそのいずれかの断片もしくは遺伝子的に改変された誘導体を指し、無傷なタンパク質の所望の生化学的機能を保持する。

【００１９】

本明細書で使用されるとき、用語「に由来する」は、第１の成分（例えば、最初のポリペプチド）、又はその第１の成分からの情報を使用して、別の第２の成分（例えば、最初のものとは異なる２番目のポリペプチド）を分離、誘導、又は作成するプロセスを指す。

【００２０】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド、又はその類似体を含む、いずれかの長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの、修飾されたヌクレオチドを含み、そして非ヌクレオチド成分により中断され得る。存在する場合は、ポリマーの組み立ての前又は後に、ヌクレオチド構造に対する修飾が付与され得る。用語ポリヌクレオチドは、本明細書で使用されるとき、二本鎖及び一本鎖の分子を互換的に指す。特に明記又は要求されない限り、本明細書に記載される本発明のいずれかの実施態様は、ポリヌクレオチドである本発明の実施態様は、二本鎖形態及び、二本鎖形態を形成することが公知であるか若しくは予測されている２つのそれぞれの相補的一本鎖形態を包含する。

【００２１】

本明細書で使用されるとき、用語「導入遺伝子」は、組織又は臓器の細胞に導入され、

かつ適切な条件下で発現することができる、又はそうでなければ細胞に有益な特性を付与することができるポリヌクレオチドを指す。導入遺伝子は、所望の治療結果に基づいて選択される。

【００２２】

本明細書で使用されるとき、用語「導入遺伝子産物」は、導入遺伝子によりコードされ、かつ細胞に有益な特性、又は所望の治療結果を付与するいずれかの分子を指す。典型的には、前記導入遺伝子産物はポリペプチドである。

【００２３】

本明細書で使用されるとき、用語「治療レベル」は、導入遺伝子を受け取る宿主において、その治療的又は有益な効果を付与するのに十分な、導入遺伝子産物の量又は導入遺伝子産物の活性のレベルを指す。導入遺伝子の発現レベル又は導入遺伝子産物の活性のレベルは、当該技術分野で公知の方法を使用して、タンパク質又はｍＲＮＡレベルで測定することができる。

【００２４】

本明細書で使用されるとき、用語「ベクター」は、導入遺伝子を宿主細胞に送達しかつ発現させることができる物質を指す。前記ベクターは、染色体外（例えば、エピゾーム）か又は統合型（宿主の染色体に組み込まれるため）か、自律的に複製するか否か、マルチコピーか又は低コピーか、二本鎖か又は一本鎖か、単体（naked）か又は他の分子と複合体化したベクター（例えば、脂質又はポリマーと複合体して、リポソーム、リポプレックス又はナノ粒子などの微粒子構造を形成するベクター、ウイルスのカプシド中にパッケージされたベクター、及び固相粒子上に固定化されたベクターなど）であり得る。用語「ベクター」の定義はまた、特定の宿主細胞への優先的な標的化を可能にするように修飾されたベクターも包含する。標的化ベクターの特徴は、組織特異的マーカー又は細胞特異的マーカーなどの細胞及び表面に露出した成分を認識しかつ結合することができるリガンドがその表面に存在することである。

【００２５】

本明細書で使用されるとき、用語「ウイルスベクター」は、ベクターＤＮＡならびにそれから生成されるウイルス粒子を包含する。ウイルスベクターは、複製可能（replication-competent）であることができるか、又は複製欠損又は複製障害となるように遺伝子的に無効化されることができる。用語「複製可能な」は、本明細書で使用されるとき、特定の宿主細胞（例えば、腫瘍性細胞）においてより良く又は選択的に複製するように改変された、複製選択性及び条件付き複製性ウイルスベクターを包含する。

【００２６】

本明細書で使用されるとき、用語「ＡＡＶ」は、当該技術分野において一般的な意味を有し、かつアデノ随伴ウイルスを指し、そしてウイルス自体又はその誘導体を指すために使用され得る。前記用語は、自然に発生した形態及び人工的に改変された形態の両方のすべての血清型と変異体型を範囲に含む。用語「ＡＡＶ」は、ＡＡＶ１型（ＡＡＶ－１）、ＡＡＶ２型（ＡＡＶ－２）、ＡＡＶ３型（ＡＡＶ－３）、ＡＡＶ４型（ＡＡＶ－４）、ＡＡＶ５型（ＡＡＶ－５）、ＡＡＶ６型（ＡＡＶ－６）、ＡＡＶ７型（ＡＡＶ－７）、及びＡＡＶ８（ＡＡＶ－８）及びＡＡＶ９型（ＡＡＶ９）を含むが、これらに限定されない。ＡＡＶの様々な血清型のゲノム配列、ならびにネイティブ末端反復配列（ＴＲｓ）、Ｒｅｐタンパク質、及びカプシドサブユニットの配列は、当該技術分野で公知である。そのような配列は文献又はＧｅｎＢａｎｋなどの公的データベースで見出だし得る。例えば、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＣ＿００２０７７（ＡＡＶ－１）、ＡＦ０６３４９７（ＡＡＶ－１）、ＮＣ＿００１４０１（ＡＡＶ－２）、ＡＦ０４３３０３（ＡＡＶ－２）、ＮＣ＿００１７２９（ＡＡＶ－３）、ＮＣ＿００１８２９（ＡＡＶ－４）、Ｕ８９７９０（ＡＡＶ－４）、ＮＣ＿００６１５２（ＡＡＶ－５）、ＡＦ５１３８５１（ＡＡＶ－７）、ＡＦ５１３８５２（ＡＡＶ－８）、及びＮＣ＿００６２６１（ＡＡＶ－８）を参照のこと。

【００２７】

本明細書で使用されるとき、用語「ｒＡＡＶ」は、組換えアデノ随伴ウイルスを指し、組換えＡＡＶベクター（又は「ｒＡＡＶベクター」）とも呼ばれる。したがって、前記用語は、細胞の遺伝子変換のための、関心対象の導入遺伝子を含むＡＡＶベクターを指す。一般に、前記ｒＡＡＶベクターは、５’及び３’アデノ随伴ウイルス末端逆位反復配列（ＩＴＲ）、及び標的細胞におけるその発現を調節する配列に機能的に連結された、関心対象の導入遺伝子を含有する。

【００２８】

本明細書で使用されるとき、用語「疑似型ＡＡＶベクター」は、ｒＡＡＶベクターゲノム及びＡＡＶＲｅｐタンパク質を含むネイティブＡＡＶカプシドから構成されるベクター粒子を指し、ここで、ベクターゲノムのＣａｐ、Ｒｅｐ及びＩＴＲは、少なくとも２つの異なるＡＡＶ血清型に由来する。

【００２９】

本明細書で使用されるとき、用語「カプシド」は、ウイルス又はウイルスベクターのタンパク質コートを指す。ＡＡＶ（例えば、ＡＡＶ２、ＡＡＶｒｈ８Ｒなど）のカプシドは、ＶＰ１，ＶＰ２、及びＶＰ３の、３つのカプシドタンパク質を含むことが知られている。これらのタンパク質は、かなりの量の重複アミノ酸配列及び固有のＮ末端配列を含有する。ＡＡＶ２カプシドは、正二十面体対称に配列した６０個のサブユニットを含む（Xie, Q., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99(16):10405-10）。ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３は、１：１：１０の比率で存在することが見出されている。

【００３０】

本明細書で使用されるとき、用語「非ウイルスベクター」は、特にプラスミド起源のベクターを指し、任意選択的に、前記ベクターのトランスフェクション効率及び／又は安定性、及び／又は前記ベクターの保護を改善する１つ以上の物質と組み合わせたようなベクターを指す。

【００３１】

本明細書で使用されるとき、用語「形質転換細胞」は、遺伝子的に修飾された細胞、すなわち導入遺伝子が意図的に導入された細胞に関する。本明細書で提供される形質転換細胞は、本発明の導入遺伝子を含む。

【００３２】

本明細書で使用されるとき、用語「免疫応答」は、抗原特異的抗体の生成及び／又は細胞毒性応答を含む、宿主の体内における抗原に対する免疫系の反応を指す。最初の抗原曝露に対する免疫応答（一次免疫応答）は、典型的には、数日から２週間の遅滞期間の後に検出可能であり；同じ抗原によるその後の刺激に対する免疫応答（二次免疫応答）は、一次免疫応答の場合よりもより速い。導入遺伝子産物に対する免疫応答は、導入遺伝子によりコードされる免疫原性産物に誘発され得る体液性（例えば抗体応答）免疫応答及び細胞性（例えば細胞溶解性Ｔ細胞応答）免疫応答の両方を含み得る。免疫応答のレベルは、当該技術分野で公知の方法により（例えば、抗体価を測定することにより）測定することができる。

【００３３】

本明細書で使用されるとき、用語「エンドヌクレアーゼ」は、ポリヌクレオチド鎖内のリン酸ジエステル結合を切断する酵素を指す。デオキシリボヌクレアーゼＩのように、ＤＮＡを比較的非特異的に（配列に関係なく）切断するものもあれば、典型的に制限エンドヌクレアーゼ又は制限酵素と呼ばれ、非常に特異的なヌクレオチド配列でのみ切断するものもある。エンドヌクレアーゼベースのゲノム不活性化の背後にある機序は、一般的に、最初のステップであるＤＮＡの一本鎖又は二本鎖切断の後、ＤＮＡ修復のための２つの異なる細胞機序を引き起こし、これをＤＮＡ不活性化に利用することができる機序：エラー傾向のある非相同末端結合（ＮＨＥＪ）及び高精度の相同性指向性修復（ＨＤＲ）である。ＤＮＡを標的とするエンドヌクレアーゼは、自然に発生するエンドヌクレアーゼ（例えば、細菌のメガヌクレアーゼ）であるか、又は人工的に生成する（例えば、改変されたメガヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ、又はＺＦＮ等）ことができる。

【００３４】
本明細書で使用されるとき、用語「ＴＡＬＥＮ」は、当該技術分野における一般的な意味を有し、そして標的遺伝子を編集するために使用できる人工ヌクレアーゼである、転写アクチベーター様のエフェクターヌクレアーゼを指す。
【００３５】
本明細書で使用されるとき、用語「ＺＦＮ」又は「Ｚｎフィンガーヌクレアーゼ」は、当該技術分野における一般的な意味を有し、そして標的遺伝子を編集するために使用できる人工ヌクレアーゼであるＺｎフィンガーヌクレアーゼを指す。
【００３６】
本明細書で使用されるとき、用語「ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼ」は、当該技術分野における一般的な意味を有し、そして塩基の短い反復配列を含有する原核生物のＤＮＡのセグメントである、関連するクラスター化された規則的間隔の短い回文反復（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）を指す。
【００３７】
用語「免疫優性ペプチド」は、本明細書で使用されるとき、ベクター又は導入遺伝子産物に由来するＴ細胞エピトープを含有し、したがって免疫応答（体液性及び／又は細胞媒介性応答）を誘導することができるペプチドを指す。
【００３８】
本明細書で使用されるとき、用語「抗原提示細胞」又は「ＡＰＣ」は、主要な組織適合性複合体分子と結合しているときに抗原を認識する、Ｔリンパ球に対して抗原を提示することができる細胞のクラスを指す。
方法：
【００３９】
本発明の第１の目的は、導入遺伝子を含有するベクターを用いた眼科遺伝子治療を受けた患者における、二次的な視力喪失を防止するための方法であって、前記導入遺伝子産物又はベクターに由来する少なくとも１つのペプチドを、遺伝子治療と同時に投与し、それにより、導入遺伝子産物を発現する形質転換細胞に対する免疫応答の誘導を防止することを含む方法に関する。
【００４０】
より具体的な実施態様では、本発明は、導入遺伝子を含有するベクターを用いた眼科遺伝子治療を受けた患者における、二次的な視力喪失を防止するための方法であって、前記導入遺伝子産物又はベクターに由来する少なくとも１つのペプチドを、遺伝子治療と同時に投与し、それにより、導入遺伝子産物を発現する形質転換細胞に対する細胞毒性応答の誘導を防止することを含む方法に関する。
【００４１】
本発明の更なる目的は、関心対象の導入遺伝子を含有するある量のベクターを、前記導入遺伝子産物又はベクターに由来するある量の少なくとも１つのペプチドと組み合わせて、網膜下腔に注入することからなるステップを含む、患者の網膜における関心対象の導入遺伝子を発現させるための方法に関する。
【００４２】
本発明の方法は、具体的には、外網膜（光受容体及び網膜色素上皮）中に、関心対象の導入遺伝子を発現させることに関連する。
【００４３】
したがって、本発明は、関心対象の導入遺伝子を含有するある量のベクターを、導入遺伝子産物又はベクターに由来する、ある量の少なくとも１つのペプチドと組み合わせて、網膜下腔に注入する一般的なステップを含む、処置を必要とする患者における網膜疾患を処置するための方法を提供する。
【００４４】
したがって、本明細書で提供される教示を与えた場合、前記眼の多種多様な疾患が処置され得る。

【００４５】
例えば、本発明の方法は、黄斑変性症を治療又は予防するために実施される。簡単に説明すると、高齢者における視力低下（visual loss）の主要な原因は、米国において、社会的及び経済的影響がますます重要になっている黄斑変性症（ＭＤ）である。この国においては、高齢者人口の規模が増加しており、加齢性黄斑変性症（ＡＭＤ）は、糖尿病性網膜症及び緑内障の両方よりも失明のより一般的な原因となるであろう。レーザー処置は、疾患の「滲出型」又は血管新生型による広範な黄斑瘢痕化のリスクを低下させることが示されているが、現在、大多数のＭＤに罹患した患者のための有効な処置はない。
【００４６】
本発明の方法は、遺伝性網膜変性症を治療又は予防するために実施することもできる。最も一般的な遺伝性網膜変性症の１つは、網膜色素変性症（ＲＰ）であり、これは、光受容体細胞、及びＲＰＥの変性をもたらす。その他の遺伝性病態は、バルデ・ビードル（Bardet-Biedl）症候群（常染色体劣性遺伝）；バッセン・コーンツヴァイク（Bassen-Kornzweig）症候群、ベスト病、脈絡膜症、脳回転状萎縮症、レーバー先天性黒内障、レフサム症候群（Refsun syndrome）、シュタルガルト症；錐体又は錐体－桿体ジストロフィー（常染色体優性型及びＸ連鎖型）；先天性静止夜盲症（常染色体優性型、常染色体劣性型及びＸ連鎖型）；黄斑変性症（常染色体優性型及び常染色体劣性型）；視神経萎縮症（常染色体優性型及びＸ連鎖型）；網膜色素変性症（常染色体優性型、常染色体劣性型及びＸ連鎖型）；症候群性又は全身性網膜症（常染色体優性型、常染色体劣性型及びＸ連鎖型）；及びアッシャー症候群（常染色体劣性遺伝）を含む。
【００４７】
当業者は、その分野における科学文献の知識により、特定の網膜疾患を処置するのにより適切であり得る導入遺伝子を知っている。
【００４８】
いくつかの実施態様では、前記導入遺伝子産物は、網膜細胞の機能、例えば、桿体又は錐体光受容体細胞、網膜神経節細胞、ミュラー細胞、双極細胞、アマクリン細胞、水平細胞、又は網膜色素上皮細胞の機能を増強するポリペプチドである。関心対象のポリヌクレオチドの例は、神経保護ポリペプチド（例えば、ＧＤＮＦ、ＣＮＴＦ、ＮＴ４、ＮＧＦ、及びＮＴＮ）、抗血管新生ポリペプチド（例えば、可溶性血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）受容体；ＶＥＧＦ結合抗体；ＶＥＧＦ結合性抗体断片（例えば、単鎖抗ＶＥＧＦ抗体）；エンドスタチン；ツムスタチン；アンギオスタチン；可溶性Ｆｉｔポリペプチド(Lai et al. (2005) Mol. Ther. 12:659)；可溶性Ｆｉｔポリペプチド（例えば、Pechan et al. (2009) Gene Ther. 16: 10を参照のこと）を含むＦｃ融合タンパク質；色素上皮由来の因子（ＰＥＤＦ）；可溶性Ｔｉｅ－２受容体；など）；メタロプロテイナーゼ－３（ＴＩＭＰ－３）の組織抑制剤；光応答性オプシン、例えばロドプシン；抗アポトーシス性ポリペプチド（例えば、Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－Ｘｌ）などからなる群より選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むが、これらに限定されない。他の適切なポリペプチドは、例えば、グリア由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）；線維芽細胞増殖因子２；ニュールツリン（ＮＴＮ）；毛様体神経栄養因子（ＣＮＴＦ）；神経成長因子（ＮＧＦ）；ニューロトロフィン－４（ＮＴ４）；脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）；上皮成長因子；ロドプシン；アポトーシスのＸ連鎖抑制薬；及びソニックヘッジホッグを含むが、これらに限定されない。好適な光応答性オプシンは、例えば、米国公開公報第２００７／０２６１１２７号（例えば、：ＣｈＲ２；Ｃｈｏｐ２、ＣａＴＣｈ）；米国公開公報第２００１／００８６４２１号；米国公開公報第２０１０／００１５０９５号；及びDiester et al. (2011) Nat. Neurosci. 14:387.14:387に記載されている光応答性オプシン、又はハロロドプシン（例えば：ｅＮｐＨＲ）、又はその他の光ゲートイオンチャネル又はプロトンポンプを含む。好適なポリペプチドは、レチノシシンも含む。好適なポリペプチドは、例えば、網膜色素変性のＧＴＰａｓｅレギュレーター（ＲＧＰＲ）－相互作用タンパク質－１（例えば、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｑ９６ＫＮ７、Ｑ９ＥＰＱ２、及びＱ９ＧＬＭ３を参照のこと）；ペリフェリン－２（Ｐｒｐｈ２）（例えば、Ｇｅｎ

Ｂａｎｋアクセッション番号ＮＰ＿０００３１３；ペリフェリン；網膜タンパク質イソメラーゼ（ＲＰＥ６５）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋＡＡＣ３９６６０；及びMorimura et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3088；などを含む。好適なポリペプチドはまた、ＣＨＭ（コロイデレミア（Ｒａｂエスコートタンパク質１））、欠損又は喪失すると脈絡膜血症の原因となるポリペプチド（例えば、Donnelly et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 1017；及びvan Bokhoven et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 1041を参照のこと）；及びＣｒｕｍｂｓ相同体１（ＣＲＢ１）、欠損又は喪失すると、レーバー先天性黒内障及び網膜色素変性症の原因となるポリペプチド（例えば、den Hollander et al. (1999) Nat. Genet. 23:217；及びＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＣＡＭ２３３２８を参照のこと）を含む。好適なポリペプチドはまた、欠損又は喪失すると色覚異常につながるポリペプチドも含み、ここで、そのようなポリペプチドは、例えば、錐体光受容体ｃＧＭＰゲートチャネルサブユニットα（ＣＮＧＡ３）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＰ＿００１２８９；及びBooij et al. (2011) Ophthalmology 118: 160-167を参照のこと）；錐体光受容体ｃＧＭＰゲート陽イオンチャネルβサブユニット（ＣＮＧＢ３）（例えば、Kohl et al.(2005) Eur J Hum Genet. 13(3):302を参照のこと）；グアニンヌクレオチド結合タンパク質（Ｇタンパク質）、α形質転換活性ポリペプチド２（ＧＮＡＴ２）（ＡＣＨＭ４）；及びＡＣＨＭ５；及び欠損又は喪失すると、様々な形態の色覚異常をもたらすポリペプチド（例えば、Ｌ－オプシン、Ｍ－オプシン、Ｓ－オプシン）を含む。Mancuso et al. (2009) Nature 461(7265):784-787を参照のこと。ある特定の実施態様では、関心対象の導入遺伝子は、神経栄養因子をコードし得る。本明細書で使用されるとき、「神経栄養因子」は、神経細胞の生存及び維持、神経細胞分化の促進などの生理学的作用を有するタンパク質の総称である。神経栄養因子の例は、ｂＦＧＦ、ａＦＧＦ、ＢＤＮＦ、ＣＮＴＦ、ＩＬ－１β、ＮＴ－３、ＩＧＦ－II、ＧＤＮＦ、ＮＧＦ及びＲｄＣＶＦを含むが、これらに限定されない。

【００４９】

いくつかの実施態様では、関心対象の導入遺伝子産物は、例えば、そこでエンドヌクレアーゼが網膜疾患に関連する対立遺伝子をノックアウトする、遺伝子機能の部位特異的ノックダウンをもたらすエンドヌクレアーゼである。例えば、優性対立遺伝子が遺伝子の欠損したコピーをコードし、それが、野生型の場合、網膜の構造タンパク質であり、及び／又は正常な網膜機能を提供する場合、部位特異的エンドヌクレアーゼは欠損した対立遺伝子を標的化し、欠損した対立遺伝子をノックアウトすることができる。部位特異的ヌクレアーゼは、欠損した対立遺伝子をノックアウトすることに加えて、欠損した対立遺伝子がコードするタンパク質の機能的コピーをコードするドナーＤＮＡとの相同組換えを刺激するためにも使用できる。したがって、例えば、本発明の方法は、欠損した対立遺伝子をノックアウトする部位特異的エンドヌクレアーゼを送達すること、及び欠損した対立遺伝子の機能的コピーを送達することの両方に使用することができ、欠損した対立遺伝子の修復をもたらし、それにより、機能的な網膜タンパク質（例えば、機能性レチノシシン、機能性ＲＰＥ６５、機能性ペリフェリンなど）の産生をもたらすことができる。例えば、Li et al. (2011) Nature 475:217を参照のこと。

【００５０】

いくつかの実施態様では、ＤＮＡを標的とする本発明のエンドヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。ＴＡＬＥＮは、ＴＡＬエフェクター（「ＴＡＬＥ」）ＤＮＡ結合ドメイン、例えば１つ以上のＴＡＬＥ、例えば１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０個のＴＡＬＥを、ＤＮＡ修飾ドメイン、例えばＦｏｋＩヌクレアーゼドメインと融合させることにより、人工的に産生される。転写アクチベーター様エフェクター類（ＴＡＬＥｓ）は、いずれかのＤＮＡ配列に結合するように改変することができる(Zhang (2011), Nature Biotech. 29: 149-153)。改変されたＴＡＬＥをＤＮＡ切断ドメインと組み合わせることにより、いずれかの所望のＤＮＡ配列に特異的な制限酵素を産生することができる。したがって、ゲノム編集に利用可能なこれらを、細胞内に導入することができる(Boch

(2011) Nature Biotech. 29: 135-6; and Boch et al. (2009) Science 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) Science 326: 3501)。ＴＡＬＥは、キサントモナス属(Xanthomonas)細菌により分泌されるタンパク質である。このＤＮＡ結合ドメインは、１２番目及び１３番目のアミノ酸を除いて、高度に保存された３３～３４個のアミノ酸配列を繰り返し含有する。これらの２つの位置は非常に可変的であり、特定のヌクレオチド認識との強い相関を示す。したがって、これらは、所望のＤＮＡ配列に結合するように改変することができる(Zhang (2011), Nature Biotech. 29: 149-153)。ＴＡＬＥＮを産生するために、ＴＡＬＥタンパク質は、ヌクレアーゼ（Ｎ）、例えば野生型又は変異型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに融合される。ＦｏｋＩに対するいくつかの変異は、ＴＡＬＥＮ類における使用のために、作成されている；これらは、例えば、切断特異性又は活性を改善する(Cermak et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39: e82; Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) Nature Biotech. 29: 731-734; Wood et al. (2011) Science 333: 307; Doyon et al. (2010) Nature Methods 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) Nature Biotech. 25: 786-793; and Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 200: 96)。ＦｏｋＩドメインは、適切な方向及び間隔を有する標的ゲノム中の部位に対して、固有のＤＮＡ結合ドメインを有する２つの構築物を必要とする、二量体として機能する。ＴＡＬＥＤＮＡ結合ドメインとＦｏｋＩ切断ドメインの間のアミノ酸残基の数、及び２つの個々のＴＡＬＥＮ結合部位の間の塩基の数の両方が、高レベルの活性を達成するための重要なパラメーターであると考えられる(Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8)。ＴＡＬＥＮは、細胞内で、標的核酸（例えば遺伝子内の部位）における二本鎖切断を生成するために使用することができる。修復の機序が非相同末端結合を介して切断を不適切に修復する場合、切断部位で変異を導入することができる(Huertas, P., Nat. Struct. Mol. Biol. (2010) 17: 11-16)。たとえば、不適切な修復は、フレームシフト変異を導入し得る。あるいは、ＴＡＬＥＮと共に、外来ＤＮＡを細胞内に導入することもでき；外来ＤＮＡ及び染色体配列の配列に拠れば、このプロセスは、相同直接修復経路を介して標的遺伝子を修飾するために、例えば、標的遺伝子の欠損を修正して、それにより修復された標的遺伝子の発現を引き起こすか、又は、例えば、そのような欠損をｗｔ遺伝子に導入して、それにより標的遺伝子の発現を減少させるために使用することができる。

【００５１】

いくつかの実施態様では、本発明の、ＤＮＡを標的とするエンドヌクレアーゼは、ＺＦＮである。ＴＡＬＥＮと同様に、ＺＦＮは、ＤＮＡ修飾ドメイン、例えば、ヌクレアーゼドメイン、例えば、ＤＮＡ結合ドメインに融合したＦｏｋＩヌクレアーゼドメイン（又はその誘導体）を含む。ＺＦＮの場合、ＤＮＡ結合ドメインは、１つ以上のＺｎフィンガー、例えば１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０個のＺｎフィンガーを含む(Carroll et al. (2011) Genetics Society of America 188: 773-782; and Kim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1156-1160)。Ｚｎフィンガーは、１つ以上の亜鉛イオンにより安定化された、小さなタンパク質構造モチーフである。Ｚｎフィンガーは、例えば、Ｃｙｓ２Ｈｉｓ２を含むことができ、約３ｂｐの配列を認識することができる。特異性が知られている様々なＺｎフィンガーを組み合わせて、約６、９、１２、１５、又は１８ｂｐの配列を認識するマルチフィンガーポリペプチドを産生することができる。ファージディスプレイ、酵母のワンハイブリッド系、細菌のワンハイブリッド系及びツーハイブリッド系、及び哺乳類細胞を含む、特定の配列を認識するＺｎフィンガー（及びその組み合わせ）を生成するために、様々な選択及びモジュラーアセンブリ技術が利用可能である。Ｚｎフィンガーは、所定の核酸配列に結合するように改変することができる。Ｚｎフィンガーを改変して、所定の核酸配列に結合させるための基準は、当該技術分野において公知である（Sera (2002), Biochemistry, 41:7074-7081; Liu (2008) Bioinformatics, 24:1850-1857)。ＦｏｋＩヌクレアーゼドメイン又は他の二量体ヌクレアーゼドメインを使用するＺＦＮは、二量体として機能する。したがって、非回文構造のＤＮＡ部位を標的とするためには、一対のＺＦＮが必要である。２つの個々

のＺＦＮは、それぞれのヌクレアーゼが適切な間隔を置いて、ＤＮＡの反対側の鎖と結合しなければならない(Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10570-5)。また、ＴＡＬＥＮと同様に、ＺＦＮは、ＤＮＡ中にＤＳＢを作ることができ、これは不適切に修復された場合に（例えば非相同末端結合を介して）、フレームシフト変異を作成することができ、これは、細胞中の標的遺伝子の発現の減少をもたらす。

【００５２】

いくつかの実施態様では、本発明の、ＤＮＡを標的とするエンドヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連のエンドヌクレアーゼである。細菌において、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ遺伝子座は、可動遺伝要素（ウイルス、転移性因子、及び接合性プラスミド）に対するＲＮＡ誘導適応免疫系をコードする。３つの型（Ｉ～ＶＩ）のＣＲＩＳＰＲ系が特定されている。ＣＲＩＳＰＲクラスターは、先行する可動要素を補完する配列であるスペーサーを含有する。ＣＲＩＳＰＲクラスターは、転写され、そして成熟ＣＲＩＳＰＲ（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に加工される。前記ＣＲＩＳＰＲ関連のエンドヌクレアーゼＣａｓ９及びＣｐｆ１は、II型及びＶ型のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に属し、標的ＤＮＡを切断する強力なエンドヌクレアーゼ活性を有する。Ｃａｓ９は、固有の標的配列（スペーサーと呼ばれる）の約２０個のヌクレオチド、及びｐｒｅ－ｃｒＲＮＡのリボヌクレアーゼの不適切な支援による処理（ribonuclease III-aided processing）のガイドとして機能するトランス活性化小ＲＮＡを含有する、成熟ｃｒＲＮＡによりガイドされる。ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖は、ｃｒＲＮＡ上のスペーサーと標的ＤＮＡ上の相補配列（プロトスペーサーと呼ばれる）との間の相補的な塩基対形成を介して、Ｃａｓ９を標的ＤＮＡに向かわせる。Ｃａｓ９は、トリヌクレオチド（ＮＧＧ）のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を認識して、切断部位（ＰＡＭから３番目又は４番目のヌクレオチド）を特定する。ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、別々に発現させるか、或いは、天然のｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖を模倣するために、合成ステムループを介して人工的な融合小ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に改変することができる。そのようなｓｇＲＮＡは、ｓｈＲＮＡと同様に、直接ＲＮＡトランスフェクションのために合成又はインビトロで転写するか、あるいはＵ６又はＨ１促進ＲＮＡ発現ベクターから発現することができる。

【００５３】

いくつかの実施態様では、前記ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９ヌクレアーゼである。Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、野生型のＡ群溶血レンサ球菌（Streptococcus pyrogenes）配列と同一のヌクレオチド配列を有することができる。いくつかの実施態様では、前記ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼは、例えばサーモフィルス菌（thermophilus）；緑膿菌（Pseudomona aeruginosa）；大腸菌（Escherichia coli）などの別のレンサ球菌（Streptococcus）種、又は他の配列決定された細菌ゲノム及び古細菌、又は他の原核微生物などの他の種由来の配列であることができる。あるいは、前記野生型のＡ群溶血レンサ球菌Ｃａｓ９配列は、修飾することができる。前記核酸配列は、哺乳類細胞における効率的な発現のためのコドン最適化、すなわち「ヒト化」することができる。ヒト化されたＣａｓ９ヌクレアーゼ配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＫＭ０９９２３１．１ ＧＬ６６９１９３７５７；ＫＭ０９９２３２．１ ＧＬ６６９１９３７６１；又はＫＭ０９９２３３．１ ＧＬ６６９１９３７６５に列挙されている発現ベクターのいずれかによりコードされるＣａｓ９ヌクレアーゼ配列であることができる。あるいは、前記Ｃａｓ９ヌクレアーゼ配列は、例えば、Ａｄｄｇｅｎｅ(Cambridge, MA)からのｐＸ３３０、ｐＸ２６０又はｐＭＪ９２０などの市販されているベクター中に含有される配列であることができる。いくつかの実施態様では、前記Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＫＭ０９９２３１．１ ＧＬ６６９１９３７５７；ＫＭ０９９２３２．１；ＧＬ６６９１９３７６１；又は、ＫＭ０９９２３３．１ ＧＬ６６９１９３７６５又はｐＸ３３０、ｐＸ２６０又はｐＭＪ９２０のＣａｓ９アミノ酸配列(Addgene, Cambridge, MA)のＣａｓ９エンドヌクレアーゼ配列のいずれかの変異型又は断片である、アミノ酸配列を有することができる。

【００５４】
いくつかの実施態様では、前記ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１ヌクレアーゼである。本明細書で使用されるとき、用語「Ｃｐｆ１タンパク質」は、Ｖ型のＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１系、Ｃｐｆ１タンパク質の修飾物、Ｃｐｆ１タンパク質の変異型、Ｃｐｆ１相同分子種、及びそれらの組み合わせに由来するＣｐｆ１野生型タンパク質を指す。前記ｃｐｆ１遺伝子は、Ｃａｓ９のそれぞれのドメインに相同であるＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを有するが、Ｃａｓ９タンパク質中に存在するＨＮＨヌクレアーゼドメインを持たないタンパク質Ｃｐｆ１をコードする。Ｖ型の系は、パルクバクテリア菌（Parcubacteria bacterium）ＧＷＣ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７（ＰｂＣｐｆ１）、ラクノスピラ科菌（Lachnospiraceae bacterium）ＭＣ２０１７（Ｌｂ３Ｃｐｆ１）、ブチリビブリオ プロテオグラスティカス（Butyrivibrio proteoclasticus）（ＢｐＣｐｆ１）、ペレグリニバクテリア菌（Peregrinibacteria bacterium）ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ３３＿１０（ＰｅＣｐｆ１）、アシダミノコッカス ｓｐｐ（Acidaminococcus spp.）ＢＶ３Ｌ６（ＡｓＣｐｆ１）、ポルフィロモナス・マカカエ（Porphyromonas macacae）（ＰｍＣｐｆ１）、ラクノスピラ科菌（Lachnospiraceae bacterium）ＮＤ２００６（ＬｂＣｐｆ１）、ポルフィロモナス クレビオリカニス(Porphyromonas crevioricanis)（ＰｃＣｐｆ１）、プレボテーラ・ディシエンス（Prevotella disiens）（ＰｄＣｐｆ１）、モラクセラ ボーボクリ（Moraxella bovoculi）２３７（ＭｂＣｐｆ１）、スミセラ ｓｐｐ.（Smithella spp.）ＳＣ＿Ｋ０８Ｄ１７（ＳｓＣｐｆ１）、レプトスピラ イナダイ（Leptospira inadai）（ＬｉＣｐｆ１），ラクノスピラ科菌（Lachnospiraceae bacterium） ＭＡ２０２０（Ｌｂ２Ｃｐｆ１）、フランシセラ ノビシダ（Francisciella novicida）Ｕ１１２（ＦｎＣｐｆ１）、キャンディデイタス メタノプラズマ テルミツム（Candidatus methanoplasma termitum）（ＣＭｔＣｐｆ１）、及びユウバクテリウム エリゲンス（Eubacterium eligens）（ＥｅＣｐｆ１）を含む、いくつかの細菌において特定されている。最近、Ｃｐｆ１も、ＲＮａｓｅ活性を有し、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ処理を担っていることが証明されている(Fonfara, I., et al., “The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA,” Nature 28; 532(7600):517-21 (2016))。

【００５５】
いくつかの実施態様では、導入遺伝子産物は、干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）である。典型的には、好適なＲＮＡｉは、細胞中のアポトーシス又は血管新生因子のレベルを低下させるＲＮＡｉを含む。例えば、ＲＮＡｉは、ｓｈＲＮＡ、又は細胞中でアポトーシスを誘導又は促進する導入遺伝子産物のレベルを低下させるｓｉＲＮＡである。導入遺伝子産物がアポトーシスを誘導又は促進する遺伝子は、本明細書で、「プロアポトティック遺伝子」と呼び、そしてそれらの遺伝子の産物（ｍＲＮＡ；タンパク質）を「プロアポトティック導入遺伝子産物」と呼ぶ。プロアポトティック導入遺伝子産物は、例えば、Ｂａｘ、Ｂｉｄ、Ｂａｋ、及びＢａｄ導入遺伝子産物を含む。例えば、米国特許第７，８４６，７３０号を参照のこと。干渉ＲＮＡはまた、例えば、ＶＥＧＦ（例えば、Ｃａｎｄ５；例えば、米国公開公報第２０１１／０１４３４００号；米国公開公報第２００８／０１８８４３７号；及びReich et al. (2003) Mol. Vis. 9:210を参照のこと）、ＶＥＧＦＲ１（例えば、Ｓｉｒｎａ－０２７；例えば、Kaiser et al. (2010) Am. J. Ophthalmol. 150:33;及び Shen et al. (2006) Gene Ther. 13:225を参照のこと）、又はＶＥＧＦＲ２(Kou et al. (2005) Biochem. 44: 15064)などの血管新生産物に対するものである可能性がある。米国特許第６，６４９，５９６号、第６，３９９，５８６号、第５，６６１，１３５号、第５，６３９，８７２号、及び第５，６３９，７３６号；及び米国特許第７，９４７，６５９号及び第７，９１９，４７３号も参照のこと。

【００５６】
いくつかの実施態様では、関心対象の導入遺伝子を含有する前記ベクターは、ウイルスベクター及び非ウイルスベクターからなる群より選択される。

【００５７】
典型的には、ウイルスベクターは、次のウイルス：レトロウイル（例えば、モロニーマウス白血病ウイルス及びレンチウイルス由来のベクターとしての）、ハーベイマウス肉腫ウイルス、マウス乳腺腫瘍ウイルス、及びラウス肉腫ウイルススなどのＲＮＡウイルス；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス；ＳＶ４０型ウイルス；ポリオーマウイルス；エプスタイン バー ウイルス；乳頭腫ウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス及びＡＡＶベクター由来であるが、これらに限定されない核酸配列を含む。好ましいウイルス遺伝子送達ベクターは、ｒＡＡＶベクターである。
【００５８】
いくつかの実施態様では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクターである。
【００５９】
いくつかの実施態様では、前記ウイルスベクターは、疑似型ＡＡＶベクターである。ＡＡＶのキメラベクターの例は、ＡＡＶ２／５、ＡＡＶ２／６、及びＡＡＶ２／８を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、ＡＡＶのキメラベクターは、米国特許第７，２８２，１９９号に記載されているＡＡＶ２／８であり、これは参照により本明細書に組み込まれる。
【００６０】
いくつかの実施態様では、前記ウイルスベクターは、改変されたＡＡＶベクターである。具体的には、改変されたＡＡＶベクターは、Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. 2009. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. PLoS One 4(10):e7467に記載されているＳＨ１０ベクターである。ＡＡＶ変異型ＳｈＨ１０は、ＡＡＶ血清型６（ＡＡＶ６）と密接に関係している。いくつかの実施態様では、前記ＡＡＶ改変ベクターは、変異型カプシド、具体的にはチロシン変異型カプシドを有する。いくつかの実施態様では、前記ＡＡＶ改変ベクターは、国際公開公報第２０１２１４５６０１号に記載されている１つであり、参照により本明細書得に組み込まれる。いくつかの実施態様では、前記ベクターは、変異型ＡＡＶカプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ビリオンであり、ここで、前記変異型ＡＡＶカプシドタンパク質は、対応する親ＡＡＶカプシドタンパク質に関連するカプシドタンパク質ＧＨループ中の約５アミノ酸から約１１アミノ酸の挿入を含み、かつここで、前記変異型カプシドタンパク質は、対応する親ＡＡＶカプシドタンパク質を含むＡＡＶビリオンによる網膜細胞の感染性と比較して、増加した網膜細胞の感染性を付与する。いくつかの実施態様では、前記ベクターは、国際公開公報第２０１２１４５６０１号、及びDalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, Flannery JG, Schaffer DV. In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. Sci Transl Med. 2013 Jun 12;5(189):189ra76に記載されているＡＡＶ２－７ｍ８である。その他の例は、下記に記載されているものを含む：

Kay CN, Ryals RC, Aslanidi GV, Min SH, Ruan Q, Sun J, Dyka FM, Kasuga D, Ayala AE, Van Vliet K, Agbandje-McKenna M, Hauswirth WW, Boye SL, Boye SE. Targeting photoreceptors via intravitreal delivery using novel, capsid-mutated AAV vectors. PLoS One. 2013 Apr 26;8(4):e62097. doi: 10.1371/journal.pone.0062097.

Dalkara D, Byrne LC, Lee T, Hoffmann NV, Schaffer DV, Flannery JG. Enhanced gene delivery to the neonatal retina through systemic administration of tyrosine-mutated AAV9. Gene Ther. 2012 Feb;19(2):176-81. doi: 10.1038/gt.2011.163. Epub 2011 Oct 20.

Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min SH, Chiodo V, Pang JJ, Zhong L, Zolotukhin S, Srivastava A, Lewin AS, Hauswirth WW. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vector

s. Mol Ther. 2009 Mar;17(3):463-71.
Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Deng WT, Pang JJ, Min SH, Chiodo V, Neeley AW, Govindasamy L, Bennett A, Agbandje-McKenna M, Zhong L, Li B, Jayandharan GR, Srivastava A, Lewin AS,Hauswirth WW. Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. Mol Ther. 2011 Feb;19(2):293-301. doi: 10.1038/mt.2010.234. Epub 2010 Nov 2.。

【００６１】

非ウイルスベクターは、当業者が入手可能な文献に広く記載されている（例えば、Feigner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121; Hodgson and Solaiman, 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654を参照のこと）。限定的でなく、例示として説明するが、非ウイルスベクターは、ポリマー、脂質、具体的には、カチオン性脂質、リポソーム、核タンパク質又は中性脂質であり得る。これらの物質は、単独で又は組み合わせて使用され得る。想定され得る組み合わせは、カチオン性脂質（ＤＯＧＳ、ＤＣ－ＣＨＯＬ、スペルミン コレステロール、スペルミジン コレステロールなど）及び中性脂質（ＤＯＰＥ）と組み合わせたプラスミド組換えベクターである。本発明の文脈で使用することができるプラスミドの選択は、広範囲に渡る。それらはクローニング及び／又は発現ベクターである。一般に、それらは当業者に公知であり、そしてその多くが市販されているが、遺伝子工学技術によりそれらを構築又は修飾することも可能である。例として、ｐＢＲ３２２（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、ｐＵＣ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ｐＲＥＰ４、ｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎｅ）又はｐＰｏｌｙ(Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201)に由来するプラスミドが挙げられる。好ましくは、本発明の文脈で使用されるプラスミドは、産生細胞及び／又は宿主細胞（例えば、大腸菌中で産生されることを意図したプラスミドのためには、ＣｏｌＥ１由来が選択され、哺乳類の宿主細胞中で自己複製することが所望される場合は、ｏｒｉＰ／ＥＢＮＡ１系が選択され得る：Lupton and Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542; Yates et al., Nature 313, 812-815）における複製の開始を確実にする複製開始点を含有する。前記プラスミドは、所定の細胞におけるその維持及び／又はその安定性を改善する追加の要素を含み得る（（cer sequence which promotes the monomeric maintenance of a plasmid (Summers and Sherrat, 1984, Cell 36, 1097-1103, sequences for integration into the cell genome））。

【００６２】

いくつかの実施態様では、前記ベクターはまた、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、内部リボソームエントリー部位（ＩＲＥＳ）、タンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）などをコードする配列のような、コードされたタンパク質の発現及び分泌を可能にする調節配列を含むこともできる。この点に関しては、前記ベクターは、感染した細胞中でタンパク質の発現を引き起こすか又は改善するために、関心対象の導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター領域を含む。そのようなプロモーターは、ユビキタス、組織特異的、強力、微弱、制御された、キメラ、誘導可能な、などであり、感染した組織におけるタンパク質の効率的かつ適切な産生を可能にし得る。前記プロモーターは、コードされたタンパク質に対して、相同であるか、又は細胞性、ウイルス性、真菌性、植物性、合成プロモーターを含む異種であり得る。本発明における使用のための最も好ましいプロモーターは、細胞又は網膜において機能的であるべきであり、より好ましくは、網膜の光受容体若しくは神経節細胞、又はＲＰＥの細胞において機能的であるべきである。このような制御されたプロモーターの例は、Ｔｅｔのオン／オフ要素を含むプロモーター、ラパマイシン誘導性プロモーター及びメタロチオネインのプロモーターを含むが、これらに限定されない。ユビキタスプロモーターの例は、ウイルスプロモーター、具体的には、ＣＭＶプロモーター、ＲＳＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーターなど、及びＰＧＫ（ホスホグリセリン酸キナーゼ）プロモーターなどの細胞プロモーターを含む。前記プロモーターはまた、シナプシン又はＮＳＥ（神経細胞特異的エノラーゼ（Neuron

Specific Enolase））プロモーター（又はユビキタスなＰＧＫプロモーターの上流に配置されたＮＲＳＥ（神経細胞選択的サイレンサー要素(Neuron restrictive silencer element)配列）などの神経細胞特異的プロモーター、あるいはＲＰＥ６５、ＶＭＤ２、ロドプシン又は錐体アレスチンプロモーターなどの様々な網膜細胞型に特異的なプロモーターであり得る。前記ベクターはまた、非所望の細胞における導入遺伝子発現の抑制を達成する、ｍｉＲＮＡの標的配列を含み得る。例えば、造血系における発現抑制（「脱標的化（de-targeting）」）は、導入遺伝子特異的免疫応答(Brown BD, Nature Medicine 2008)の発生率と程度を低下させることにより、形質転換細胞における安定した遺伝子導入を可能にする。ある特定の実施態様では、前記ベクターは、コードされたタンパク質の分泌を可能にするリーダー配列を含む。関心対象の導入遺伝子と分泌シグナルペプチド（通常、分泌されるポリペプチドのＮ末端に位置する）をコードする配列との融合により、形質転換細胞から分泌可能なで治療用タンパク質を産生することが可能になる。このようなシグナルペプチドの例は、アルブミン、β－グルクロニダーゼ、アルカリプロテアーゼ又はフィブロネクチン分泌シグナルペプチドを含む。最も好ましい実施態様では、前記プロモーターは、網膜の細胞において、具体的には、網膜の光受容体又は神経節細胞、あるいはＲＰＥにおいて、特異的又は機能的であり、すなわち、前記細胞における導入遺伝子の（優先的な）発現を可能にする。例えば、好適な光受容体特異的調節エレメントは、例えば、ロドプシンプロモーター；ロドプシンキナーゼプロモーター(Young et al. (2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076)；βホスホジエステラーゼ遺伝子プロモーター(Nicoud et al. (2007) J. Gene Med. 9: 1015)；網膜色素変性遺伝子プロモーター(上記Nicoud et al. (2007))；光受容体間レチノイド結合タンパク質（ＩＲＢＰ）遺伝子エンハンサー(上記Nicoud et al. (2007))；ＩＲＢＰ遺伝子プロモーター(Yokoyama et al. (1992) Exp Eye Res. 55:225)を含む。

【００６３】

いくつかの実施態様では、前記ペプチドは、導入遺伝子産物又はベクターに由来する免疫優性ペプチドである。

【００６４】

いくつかの実施態様では、免疫優性ペプチドは、抗原提示細胞（ＡＰＣ類）により提示されるその能力に対して選択される。ＡＰＣ類は、ＡＰＣの表面上の主要な組織適合性複合体分子（ＭＨＣ）と会合できる形態に抗原を処理することにより、特定の抗原に対するＴ細胞応答を誘発する。主要な組織適合性複合体分子（ＭＨＣ）クラスＩ及びクラスII分子は、実際に免疫系の適応枝において極めて重要な役割を果たす。免疫原性ペプチド－ＭＨＣクラスＩ（ｐＭＨＣＩ）複合体は、有核細胞上に存在し、そして細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞により認識される。一方、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞（ＤＣ）、マクロファージ、又はＢ細胞）によるｐＭＨＣIIの提示は、ＣＤ４＋Ｔ細胞を活性化し、エフェクター細胞の調整及び調節をもたらすことができる。いずれの場合も、所与のｐＭＨＣ複合体と相互作用するクローン型Ｔ細胞受容体であり、持続的な細胞：細胞接触形成及びＴ細胞活性化をもたらす可能性がある。したがって、いくつかの実施態様では、前記免疫優性ペプチドは、ＭＨＣクラスI拘束性エピトープ及び／又はＭＨＣクラスII拘束性エピトープを含む。いくつかの実施態様では、前記免疫優性ペプチドは、ＭＨＣクラスI拘束性エピトープ及びＭＨＣクラスII拘束性エピトープの両方を含む。

【００６５】

いくつかの実施態様では、前記免疫優性ペプチドは、ウイルスベクターのカプシドタンパク質に由来する。いくつかの実施態様では、前記免疫優性ペプチドは、ＡＡＶベクター（例えば、ＡＡＶ８ベクター）であるＶＰ１、ＶＰ２又はＶＰ３カプシドタンパク質に由来する。

【００６６】

いくつかの実施態様では、前記免疫優性ペプチドは、導入遺伝子産物に由来する。

【００６７】

いくつかの実施態様では、前記ベクターは、２、３、４、５、６、８、９又は１０種類

の免疫優性ペプチドと同時に網膜下腔に注入される。

【００６８】

いくつかの実施態様では、前記ベクターは、ＭＨＣクラスI拘束性エピトープを含む少なくとも１つの免疫優性ペプチド、及びＭＨＣクラスII拘束性エピトープを含む少なくとも１つの免疫優性ペプチドと共に注入される。

【００６９】

免疫優性ペプチドを特定し、特徴づけるための方法は、当該技術分野で周知である。典型的には、前記方法は、エピトープ予測アルゴリズム(Vita, Randi, et al. "The immune epitope database (IEDB) 3.0." Nucleic acids research 43.D1 (2015): D405-D412; Jorgensen, Kasper W., et al. "Net MHC stab-predicting stability of peptide-MHC-I complexes; impacts for cytotoxic T lymphocyte epitope discovery." Immunology 141.1 (2014): 18-26; Trolle, Thomas, et al. "Automated benchmarking of peptide-MHC class I binding predictions." Bioinformatics 31.13 (2015): 2174-2181; Rammensee, H-G., et al. "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics 50.3-4 (1999): 213-219; Duan, Fei, et al. "Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity." Journal of Experimental Medicine 211.11 (2014): 2231-2248; Zhang, Guang Lan, et al. "MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides." Nucleic acids research 33.suppl_2 (2005): W172-W179.; Schubert, Benjamin, et al. "EpiToolKit-a web-based workbench for vaccine design." Bioinformatics 31.13 (2015): 2211-2213.)、質量分析（ＭＳ）により特定されるＭＨＣ関連ペプチドーム(Abelin, Jennifer G., et al. "Mass spectrometry profiling of HLA-associated peptidomes in mono-allelic cells enables more accurate epitope prediction." Immunity 46.2 (2017): 315-326.; Bassani-Sternberg, Michal, and George Coukos. "Mass spectrometry-based antigen discovery for cancer immunotherapy." Current opinion in immunology 41 (2016): 9-17.; Hunt, Donald F., et al. "Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2. 1 by mass spectrometry." Science 255.5049 (1992): 1261-1263.)を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、免疫優性ペプチドは、潜在的に抗原領域を示していることが示されている、βターンの発生、親水性、表面確率、及び柔軟性などのいくつかのパラメータを参照することにより予測され得る。

【００７０】

網膜下への送達方法は当該技術分野で公知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開公報第２００９／１０５６９０を参照のこと。一般に、前記ベクター及び少なくとも１つの免疫優性ペプチドは、手術用顕微鏡を使用して、直接観察しながら、眼内（網膜下）に注入される組成物の形態で送達することができる。いくつかの実施態様では、前記ベクター及び少なくとも１つの免疫優性ペプチドを含有する組成物は、適切な孔径（bore size）のカニューレを利用することにより、網膜中心部の外側の網膜下腔に直接注入され、したがって、網膜下腔にブレブが作成される。いくつかの実施態様では、前記組成物の網膜下注入の前に、少容量（例えば、約０．１mL～約０．５mL）の適切な液体（生理食塩水又はリンゲル液など）を網膜中心外の網膜下腔に網膜下注入する。この網膜下腔への最初の注入は、網膜下腔内に最初の液体のブレブを確立し、最初のブレブの位置に局在性の網膜剥離を引き起こす。この最初のブレブは、組成物の網膜下腔への標的送達を容易にし、かつ脈絡膜への組成物の投与の可能性及び硝子体腔への注入又は逆流の可能性を最小限にすることができる。いくつかの実施態様では、この最初の液体ブレブには、同じ又は追加の微細な孔のカニューレのどちらかを用いる、最初の液体ブレブへの直接的な投与により、１つ以上の組成物及び／又は１つ以上の追加の治療薬を含む液

体を、さらに注入することができる。本発明のいくつかの実施態様では、網膜の網膜下腔に注入される組成物の容積は、約１μＬ、２μＬ、３μＬ、４μＬ、５μＬ、６μＬ、７μＬ、８μＬ、９μＬ、１０μＬ、１５μＬ、２０μＬ、２５μＬ、５０μＬ、７５μＬ、１００μＬ、２００μＬ、３００μＬ、４００μＬ、５００μＬ、６００μＬ、７００μＬ、８００μＬ、９００μＬ、又は１mＬのいずれかひとつ、又はこれらの間のいずれかの量よりも大きい。１つ又は複数（例えば、２、３、又はそれ以上）のブレブを作成できる。一般的に、作成されたブレブ又は複数のブレブの総容量は、眼の液体容量、たとえば、典型的なヒトの被験体では約４mＬを超えることはできない。網膜中心部の細胞型を露出させるに十分なサイズの網膜剥離を容易にし、そして最適な取り扱いに十分な依存性を持つブレブを作成するために、それぞれの個々のブレブの総容量は、少なくとも約０．３mＬ、又は少なくとも約０．５mＬであることができる。当業者は、本発明の方法に従ってブレブを作成する場合、眼構造への損傷を避けるために適切な眼圧を維持しなければならないことを理解するであろう。

【００７１】

ベクターの用量は、例えば、処置される網膜疾患、被験体（例えばその体重、代謝などに応じて）、処置スケジュールなどに応じて、当業者により容易に適応され得る。本発明の文脈における好ましい有効用量は、網膜細胞の最適な形質導入を可能にする用量である。典型的には、マウスにおいて、一用量あたり10^8から10^{12}、好ましくは、約10^9から10^{11}のウイルスゲノム（形質転換ユニット）が投与される。典型的には、ヒトに投与されるＡＡＶベクターの用量は、10^8から10^{12}、最も好ましくは、10^9から10^{11}の間の範囲で有り得る。

医薬組成物：

【００７２】

本発明はまた、関心対象の導入遺伝子を含むベクター、前記導入遺伝子産物又はベクターに由来する少なくとも１つのペプチド、及び薬学的に許容され得る担体、希釈剤、賦形剤、又は緩衝剤を含有する、医薬組成物を提供する。

【００７３】

本発明によれば、前記医薬組成物は網膜下注入に適合する。いくつかの実施態様では、薬学的に許容され得る担体、希釈剤、賦形剤、又は緩衝剤は、ヒトにおける使用に好適である。そのような賦形剤、担体、希釈剤、及び緩衝剤は、不適当な毒性なしで投与することができるいずれかの医薬品を含む。担体は、ｓｉＲＮＡの送達を強化するための合成ベクターとして、カチオン性脂質、非イオン性脂質及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む可能性がある。ｓｉＲＮＡは、粒子の親水性の内部に含有される可能性があり、又は、ポリエチレンイミン及びその誘導体は、直鎖及び分岐状のポリマー送達剤の両方を製造するために使用できる。直鎖又は分岐状の構造を有するカチオンポリマーは、その、核酸と結合しかつ縮合して、安定化したナノ粒子にする能力のために、効率的なトランスフェクション剤として役立つことができる。このような物質はまた、核酸取り込みを増強するために必要な、非特異的エンドサイトーシスならびにエンドソーム脱出を刺激することが示されている。薬学的に許容され得る賦形剤は、水、生理食塩水、グリセロール及びエタノールなどの液体を含むが、これらに限定されない。薬学的に許容され得る塩は、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの無機酸塩；及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸の塩を含むことができる。また、湿潤剤又は乳化剤、ｐＨ緩衝物質などの補助物質は、そのようなビヒクル中に存在し得る。多種多様な薬学的に許容され得る賦形剤は、当該技術分野で公知であり、本明細書において、詳細に議論する必要はない。医薬品として許容され得る賦形剤は、例えば、A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; and Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3 rd ed. Amer. Pharmaceutical Assocを含む様々な出

版物に、詳細に記載されている。

【００７４】

本発明は、以下の図及び例によりさらに説明される。ただし、これらの例及び図は、本発明の範囲を制限するものとして、何ら解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【００７５】

【図１】野生型Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおける眼の導入遺伝子発現レベル及び末梢の抗導入遺伝子Ｔ細胞免疫応答との間の相関分析。　ＰＢＳ、ＨＹペプチド、又は異なる用量（４．１０^{8}から１０^{11}vg）のＡＡＶ８－Ｌｕｃ２－ＨＹを、０日目に、Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスの網膜下（ＳＲ）腔に注入した。２週間後、ＰＢＳ：ＣＦＡ又はＨＹ：ＣＦＡのいずれかの皮下免疫（ＳＣ）により、免疫応答が誘導された。ＨＹペプチドによりインビトロで再刺激された全脾細胞の免疫応答を、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔにより、免疫の１週間後に評価した。並行して、３～４日ごとの生物発光イメージングで導入遺伝子発現レベルを監視した（５匹のマウス／１群）。（Ａ）２０日目の末梢における生物発光による、導入遺伝子発現のＡＡＶ用量依存性の定量化。（Ｂ）生物発光による局所領域導入遺伝子発現の速度論的研究。（Ｃ）インビトロでの抗ＨＹＴ細胞刺激後、２０日目の眼の導入遺伝子発現レベルと２１日目のＩＦＮ－γ分泌との相関。

【図２】野生型Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおける、ＨＹペプチドと、異なる用量のＡＡＶ８との、網膜下共注入による末梢の抗導入遺伝子Ｔ細胞炎症誘発性免疫応答の抑制。　ＰＢＳ、ＨＹペプチド、及びＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ又はＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ＋ＨＹペプチドの２つの用量（２．１０^{9}又は５．１０^{10}vg）を、０日目に、Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスの網膜下腔に注入した。２週間後、免疫応答が、ＰＢＳ：ＣＦＡ又はＨＹ：ＣＦＡのいずれかの皮下免疫により誘導された。ＨＹペプチドによりインビトロで再刺激された全脾細胞の免疫応答を、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔにより、免疫の１週間後に評価した。ＰＢＳを眼に受け、ＨＹペプチドで免疫したマウス（抗ＨＹ免疫応答のポジティブコントロール）のスポット形成ユニット（ＳＦＵ）の数を１００にインデックス化（index）し、そして他のマウスのＳＦＵを比例的に計算した。バーは、平均＋／－ＳＥＭに対応する。データは、９つの独立した実験から得た。

【図３】野生型Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおける、ＨＹペプチド及び高用量のＡＡＶ８の網膜下共注入による、インビボでの抗導入遺伝子細胞毒性の抑制。　ＰＢＳ、高用量（５．１０^{10}vg）のＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ単独、又はＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ＋ＨＹペプチドを、０日目に、Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスの網膜下腔に注入した。２週間後、ＨＹ：ＣＦＡによる皮下免疫により、免疫応答が誘導された。１７日目に、Ｃ５７ＢＬ／６野生型マウス由来の、３．１０^{6}ＣＤ４５．１$^{+}$ＣＤ４５．２$^{-}$ＣＴＶ^{low}雄及び３．１０^{6}ＣＤ４５．１$^{-}$ＣＤ４５．２$^{+}$ＣＴＶ^{high}雌の脾臓細胞の混合物を静脈内に注入した。２０日目に、血液を採取し、白血球を、フローサイトメトリーのために、抗ＣＤ４５．１－ＰＥｍＡｂで染色して、インビボでの雄の生存細胞を分析した。データは、１つの実験から得た。ＣＴＶ：Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔ。

【図４】野生型Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおける、ＨＹペプチドと高用量のＡＡＶ８との網膜下共注入による、末梢の抗ＡＡＶ８Ｔ細胞免疫応答の抑制。　ＰＢＳ（ネガティブコントロール）、ＨＹペプチド、及び５．１０^{10}vgのＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ又はＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ＋ＨＹペプチドを、０日目に、Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスの網膜下腔に注入した。２週間後、ＰＢＳ：ＣＦＡ（ネガティブコントロール）又はＨＹ：ＣＦＡのいずれかの皮下免疫により、免疫応答が誘導された。ＡＡＶ８カプシドによるインビトロで再刺激された全脾細胞の免疫応答を、免疫の１週間後に、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔにより評価し、１ウェルあたりのスポット形成ユニット（ＳＦＵ）の数として表示した。データは１つの実験から得た。

【図５】ｒｄ１０マウスにおける、ＨＹペプチドと、異なる用量のＡＡＶ８との網膜下共注入による、末梢の抗導入遺伝子Ｔ細胞免疫応答の抑制。　ＰＢＳ、ＨＹペプチド、及びＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ又はＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ＋ＨＹペプチドの２つの用量（２．

１０^{9}又は５．１０^{10}vg）を、０日目に、ｒｄ１０雌マウスの網膜下腔に注入した。２週間後、ＰＢＳ：ＣＦＡ又はＨＹ：ＣＦＡのいずれかの皮下免疫により、免疫応答が誘導された。ＨＹペプチドによるインビトロで再刺激された全脾細胞の免疫応答を、免疫の１週間後に、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔにより評価した。ＰＢＳを眼に受け、ＨＹペプチドで免疫したマウス（抗ＨＹ免疫応答のポジティブコントロール）のスポット形成ユニット（ＳＦＵ）の数を１００にインデックス化し、そして他のマウスのＳＦＵを比例的に計算した。バーは、平均＋／－ＳＥＭに対応する。データは、９つの独立した実験から得た。他のマウスのＳＦＵを比例的に計算した。バーは、平均＋／－ＳＥＭに対応する。データは、５つの独立した実験から得た。

【実施例】

【００７６】

材料及び方法

動物

【００７７】

野生型の６～８週齢のＣ５７ＢＬ／６雌マウス（Ｈ－２^{b}）は、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ (L’Arbresle, France)から購入した。動物は、ケタミン(Virbac, Carros, France) １２０mg/kg及びキシラジン(Bayer, Lyon, France) ６mg/kg（バイエル、リヨン、フランス）の腹腔内注入により、又はイソフルラン(Baxter, Guyancourt, France)の吸入により麻酔した。それらは、子宮頸管伸長により安楽死させた。すべてのマウスは、欧州連合のガイドライン及び地域の研究倫理委員会（ＣＥＥＡ－５１動物実験倫理委員会、Evry, France；認可番号２０１５１０２１１７５３９９４８）の承認に従って、収容、世話、及び処理された。

ＡＡＶベクター

【００７８】

ＡＡＶ８－ＰＧＫ－ＧＦＰ－ＨＹは、INSERM unit U1089 in Nantes, Franceにより製造された。彼らは、ＣＦ１０中で培養した２９３Ｔ細胞において、トリトランスフェクション技術を使用した。ＡＡＶ８－ＰＧＫ－Ｌｕｃ２－ＨＹは、Vector Core in Genethon, Evry, Franceにより製造された。彼らは、ローラーボトル中で培養した(Liu et al., 2003)２９３Ｔ細胞においてトリトランスフェクション技術を使用した。エンドトキシンのレベルは、６E.U/mL以下であった。

ペプチド

【００７９】

ＤＥＡＤＢｏｘポリペプチド３Ｙ連結（ＤＢＹ）及びユビキタス転写したテトラトリコペプチド反復遺伝子Ｙ連結（ＵＴＹ）ペプチド、ＮＡＧＦＮＳＮＲＡＮＳＳＲＳＳ及びＷＭＨＨＮＭＤＬＩは、それぞれGenepep (Montpellier, France)により合成され、そして９５％以上の純度であることが示された。

網膜下注入

【００８０】

顕微鏡下で、眼を突出させ、２７Ｇの面取り針を用いて穿孔した。１０μＬのハミルトン注入器にセットした３２Ｇのブラント針を穴に挿入し、２μＬのＰＢＳ又はＵＴＹ＋ＤＢＹ及び／又はＡＡＶベクターを網膜下腔に注入した。網膜の剥離を確認することにより注入の質を検証した。

皮下注入

【００８１】

ＰＢＳ又はＵＴＹ＋ＤＢＹを、Complete Freund’s Adjuvant (Sigma, Lyon, France)中に、１：１の比率で乳化し、その製剤 １００μＬ（２００μｇのＵＴＹ＋ＤＢＹ／マウス）を尾の付け根に注入した。

脾臓からの細胞抽出

【００８２】

安楽死後、脾臓を摘出し、２mLのＲＰＭＩ培地中、７０μｍフィルター上でシリンジ

プランジャーを用いて粉砕した。赤血球は、ＡＣＫ緩衝液（NH_4Cl ８．２９g/L、ＥＤＴＡ ０．０３７g/L、$KHCO_3$ １g/L）を１分間で加えることにより溶解した。完全ＲＰＭＩ培地（ＦＢＳ １０%、ペニシリン／ストレプトマイシン １%、グルタミン１%、β－メルカプトエタノール ５０μＭ）の添加により溶解を停止した。遠心分離後、細胞をカウントし、完全ＲＰＭＩ培地中で濃度を調整した。

【００８３】

２mLのＲＰＭＩ培地中で、シリンジプランジャーを用いて、鼠径リンパ節を破砕した。新しいチューブに上澄み液を移すことによりデブリを除去した。遠心分離後、細胞を計数し、完全ＲＰＭＩ培地中で濃度を調整した。

ＥＬＩＳｐｏｔアッセイ

【００８４】

ＩＦＮ－γ酵素結合免疫スポットプレート(MAHAS45, Millipore, Molsheim, France)を、＋４℃で一晩、抗ＩＦＮ－γ抗体(eBiosciences, San Diego, CA)でコーティングした。刺激媒体（完全ＲＰＭＩ、ＵＴＹ（２μg/mL）、ＤＢＹ（２μg/mL）、ＵＴＹ＋ＤＢＹ（２μg/mL）又はコンカナバリンA(Sigma, Lyon, France)（５μg/mL））をプレートに添加し、５．１０^5 脾細胞／ウェルを加えた。＋３７℃で、２４時間の培養の後、プレートを洗浄して、ビオチニル化した抗ＩＦＮ－γ抗体(eBiosciences)、ストレプト－アビジンアルカリホスファターゼ(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、及びＢＣＩＰ／ＮＢＴ(Mabtech, Les Ulis, France)を用いて、ＩＦＮ－γの分泌を明らかにした。スポットは、AID ELISpot iSpot Reader system ILF05及びAID ELISpot Reader v6.0 softwareを用いてカウントされた。

生物発光イメージング

【００８５】

マウスは、ルシフェリン（２５０mg／マウスのkg）を腹腔内注入し、イメージングのために、イソフルランを用いて麻酔した。ルシフェリン注入の１０分後、マウスを測定のためのイメージャーに入れた。画像処理には、ＩＶＩＳＬｕｍｉｎａ装置及びAID ELISpot Reader v6.0 softwareを使用した。

インビボ細胞毒性アッセイ

【００８６】

ＣＤ４５．１$^+$ＣＤ４５．２$^-$雄及びＣＤ４５．１$^-$ＣＤ４５．２$^+$雌のＣ５７ＢＬ／６野生型マウスから、脾臓細胞を上記のように採取し、ＰＢＳ中の異なる濃度で（雄の細胞は２μＭ、雌の細胞は２０μＭ）、Ｃｅｌｌ ＴｒａｃｅＶｉｏｌｅｔ 細胞増殖キット(Molecular Probes)を用いて、３７℃の暗所で、２０分間、染色した。反応を、１０%のＦＢＳを含む冷却した完全ＲＰＭＩ培地の添加によりクエンチした。細胞を完全ＲＰＭＩ培地中で、３７℃で５分間インキュベートし、次いでＰＢＳ１倍で洗浄した。実験した（ＣＤ４５．１$^-$ＣＤ４５．２$^+$）雌Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、雄の細胞 ３．１０^6 と同数の雌の細胞（２００μL中）の混合物を、プロトコール１７日目に静脈内注入した。注入の３日後に、血液を採取し、ＡＣＫ緩衝液を加えることにより赤血球を溶解し、ＰＢＳ１倍で洗浄し、白血球をフローサイトメトリーのために染色した。最初に、細胞を５０μLのＦｃブロック溶液(Pharmingen, BD Biosciences)に再懸濁し、ＢＳＡ １%を含有するＰＢＳを用いて、細胞が１．７μg/mLになるように希釈して、４℃で１０分間インキュベートした。次に、ＢＳＡ １%を含有するＰＢＳ中で、５μg/mLになる抗ＣＤ４５．１－ＰＥ(Pharmingen, BD Biosciences)の５０μLを加えた。次に、この細胞を４℃で２０分間インキュベートした。対照として、いくつかの細胞を、対応するアイソタイプ抗体：マウスＩｇＧ２ａ、κ－ＰＥ(Pharmingen, BD Biosciences)を用いて、同じ条件で染色した。データは、CytoFLEX LX flow cytometer (Beckman Coulter)により取得し、CytExpert software (Beckman Coulter)を用いて分析した。

統計分析

【００８７】

統計分析は、GraphPad Prism V6.0を用いて実施した。分散分析（ＡＮＯＶＡ）を行った後、チューキー検定（Tukey’s test）を行った。Ｐ値は、＜０．０５：＊、＜０．０１：＊＊、＜０．００１：＊＊＊、＜０．０００１：＊＊＊＊である。

【００８８】

結果

高用量の網膜下ＡＡＶ８ベクターは、導入遺伝子に対する炎症誘発性Ｔ細胞免疫応答を誘導する

【００８９】

ＡＡＶ８の網膜下注入が抗導入遺伝子細胞免疫応答を誘導する可能性を評価するために、野生型マウスに、ＰＢＳ、ＵＴＹ＋ＤＢＹ（ＨＹ）ペプチド、又はＨＹペプチドと融合したＧＦＰをコードするＡＡＶ８の異なった用量を注入した。２週間後、これらのマウスを、ＰＢＳ又はＨＹペプチドを用いて、皮下免疫した。２１日目に、脾臓細胞を採取し、そしてＨＹペプチドを用いて、インビトロで刺激して、ＨＹ特異的Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ分泌のＥＬＩＳｐｏｔ定量を行った（図１）。１４日目の誘導により、無症候性免疫応答又は免疫抑制の誘導を観察することが可能になる(Vendomele et al., 2018)。

【００９０】

抗ＨＹ免疫応答のポジティブコントロールとして、マウスは、０日目に、ＰＢＳを網膜下腔に、そして１４日目に、ＨＹペプチドを皮下に受けた。この場合、ＨＹペプチドに対応して、１５０から２５０のスポット形成ユニット（ＳＦＵ）が計数され、これはＩＦＮ－γ分泌脾臓細胞に対応する。様々な実験から得たデータを正規化するために、このポジティブコントロールのＩＦＮ－γ分泌のインデックス（index）を１００（図１黒線）とした。ネガティブコントロール（示されていない）として、いくつかのマウスは網膜下腔にＰＢＳを受け、そしてＰＢＳ：ＣＦＡによる皮下免疫により免疫応答が誘導された。このグループでは、有意なＩＦＮ－γ分泌は検出されなかった（２５ＳＦＵ／10^6細胞）。本発明者らは、ＨＹペプチドの網膜下注入が、Ｔ細胞免疫応答（増殖、分裂、及びサイトカイン分泌）の抑制を誘導することを以前に報告した(Vendomele et al., 2018)。したがって、次に、本発明者らが、０日目にＨＹペプチドを網膜下腔に注入し、１４日目に同じペプチドを用いて免疫したものを、免疫調節の対照として使用したところ、これらのマウスのＩＦＮ－γ分泌のインデックスは、ポジティブコントロールと比較して６５％（＋／－１３％）に抑制された。次に、本発明者らは、抗導入遺伝子免疫応答を誘導するため、広範囲の用量でのＡＡＶ８－ＰＧＫ－ＧＦＰ－ＨＹの能力を評価した。低用量及び中用量のＡＡＶ（10^3から２．10^9vg）は、ポジティブコントロールと同様のレベルのＩＦＮ－γ分泌を誘導した。しかしながら、高用量のＡＡＶ（10^{10}から５．10^{10}vg）は、ポジティブコントロールと比較して、２倍に増加したＩＦＮ－γの分泌を誘導した。まとめると、これらのデータは、網膜下腔に注入された低用量及び中用量のＡＡＶ８が、導入遺伝子産物に対応した免疫調節を誘導せず、またＴｈ１免疫応答も増加させなかったことを示す。逆に、網膜下に注入された高用量のＡＡＶ８（10^{10}から５．10^{10}vg）は、末梢で導入遺伝子に対する炎症誘発性Ｔ細胞免疫応答を誘導したことを示す。

【００９１】

末梢の抗導入遺伝子Ｔ細胞免疫応答は、局所領域の導入遺伝子発現レベルと密接に相関する。

高用量のＡＡＶ８の網膜下注入が、導入遺伝子産物に対する末梢のＴ細胞免疫応答を誘導することを実証した後、本発明者らは、導入遺伝子発現レベルが抗導入遺伝子免疫応答に及ぼす影響を評価した。マウスに、ＰＢＳ、ＨＹペプチド、又はＨＹペプチドと融合したルシフェラーゼ（Ｌｕｃ２）をコードする異なった用量のＡＡＶ８を注入した；２週間後、それらをＰＢＳ又はＨＹペプチドで皮下免疫した。２１日目に脾臓細胞を採取し、そしてインビトロでＨＹペプチドを用いて刺激して、ＨＹ特異的Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ分泌を、ＥＬＩＳｐｏｔを用いて定量した。並行して、３日ごとのマウスの生物発光イメージングにより、Ｌｕｃ２発現の検出が可能になった。本発明者らは、別報に記載されてい

るｌｕｍｉｎｏｓｃｏｒｅ法(Cosette et al., 2016)により、導入遺伝子（Ｌｕｃ２）の発現を定量した。それぞれのマウスについて、背側図と腹側図を取得し、それぞれの図について、２つの関心領域（ＲＯＩ）を描画した。局所領域（それぞれのマウスの頭部）の導入遺伝子発現は、$Head^{dorsalview}+Head^{ventralview}$（ｂｌｕｅＲＯＩ）として算出されたが、末梢の導入遺伝子発現は、（$Body^{dorsalview}+Body^{ventralview}$）－（$Head^{dorsalview}+Head^{ventralview}$）（ｒｅｄＲＯＩ－ｂｌｕｅＲＯＩ）として算出された。

【００９２】

対照マウス（ネガティブ、ポジティブ、及びＨＹ注入）を画像化したが、明らかに局所的にＬｕｃ２発現は検出されなかった。中用量（４．１０^{8}から２．１０^{9}ｖｇ）及び高用量（５．１０^{10}から１０^{11}ｖｇ）のＡＡＶ８は、注入後３日目から用量依存的な導入遺伝子発現を誘導した；この発現は３週間にわたって安定したままであった（図１Ａ）。高用量のＡＡＶ８は、３日目から導入遺伝子発現を誘導し、１３日目まで増加し、その後２０日目まで減少した（１３日目から２０日目のｐ値＜０．０１）（図１Ｂ）。導入遺伝子の局所領域発現は眼に限定されており、そしてＡＡＶの用量に関係なく、２１日間、同側の頸部リンパ節における発現の証拠はなかったことに留意のこと。２１日目に、インビトロでＨＹペプチドを用いて刺激した脾臓細胞に対して、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔアッセイを実施した。図１Ｃは、２０日目のそれぞれのマウスの導入遺伝子発現レベル及びそのＳＦＵ（ＥＬＩＳｐｏｔ）の数による、そのマウスのプロットを示す。結果は、ＩＦＮ－γの分泌は局所領域（頭部）導入遺伝子の発現と相関したことを示す（ｐ値＝０．００５６）。それにもかかわらず、決定係数（r^{2}＝０．５１２３）によれば、眼におけるこの導入遺伝子の発現は、免疫応答の５１％しか説明しない（図１Ｃ）。まとめると、これらのデータは、眼における導入遺伝子発現レベルが、網膜下に注入されたＡＡＶ８の用量、及び全身の抗導入遺伝子免疫応答に対して密接に相関していたことを示す。

【００９３】

高用量のＡＡＶを用いても、導入遺伝子産物由来のペプチド及びＡＡＶ８の網膜中への同時注入により、網膜下関連免疫抑制を誘導することができる。

本発明者らは、高用量のＡＡＶの網膜下注入が、低用量又は中用量では観察されない炎症誘発性の抗導入遺伝子免疫応答を誘導することを示した。本発明者らは、ＨＹペプチドの網膜下注入が、末梢の免疫抑制をもたらすことを、以前に指摘した(Vendomele et al., 2018)。したがって、本発明者らは、導入遺伝子由来のペプチド並びにＡＡＶを共注入することにより、網膜下のＡＡＶ遺伝子導入における免疫調節ツールとしてのこの機序を利用できる可能性を検証した。マウスに、ＰＢＳ、ＨＹペプチド、２．１０^{9}又は５．１０^{10}ｖｇのＡＡＶ８－ＰＧＫ－ＧＦＰ－ＨＹ、又は同じ容量のＡＡＶ８＋ＨＹを注入した。２週間後、マウスを、ＰＢＳ又はＨＹペプチドを用いて皮下免疫した。２１日目に、脾臓細胞を採取し、インビトロでＨＹペプチドを用いて刺激し、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔ法により、ＨＹ特異的Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ分泌を定量した（図２）。本発明者らの結果は、ＨＹペプチドを網膜下に受けたマウスにおいて、ポジティブコントロールと比較して、ＩＦＮ－γの分泌が４０．５％抑制されることを示した。興味深いことに、ＨＹペプチドを２．１０^{9}ｖｇのＡＡＶ８と共注入すると、２．１０^{9}ｖｇのＡＡＶ８単独の注入と比較して、ＩＦＮ－γの分泌が有意に（ｐ＝０．０００７）半減した。同様にして、ＨＹペプチドならびに高用量のＡＡＶ８の共注入は、ＨＹ特異的Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ分泌を５２．９％減少させた。まとめると、これらのデータは、導入遺伝子由来の免疫優性ペプチドの、異なる用量のＡＡＶ８との共注入は、導入遺伝子に応答して起こるＴ細胞の炎症誘発性サイトカイン分泌を抑制したことを示す。

【００９４】

導入遺伝子産物由来のペプチド及びＡＡＶ８の網膜中への同時注入により、遺伝子導入細胞に対する細胞毒性を抑制することができる。

本発明者らは、高用量での、ＡＡＶと導入遺伝子産物由来のペプチドとの、網膜下への共注入が、ＩＦＮγなどの炎症誘発性サイトカインのＴ細胞による分泌の末梢抑制をもた

らすことができることを実証しているため、導入遺伝子に対するインビボでの細胞毒性を抑制する可能性を検討した。ＰＢＳ、高用量（５．１０^{10}vg）のＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ単独、又はＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ＋ＨＹペプチドを、０日目に、Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスの網膜下腔に注入し、そして二週間後に、ＨＹ：ＣＦＡを用いた皮下免疫により、免疫応答を誘導した。１７日目に、Ｃ５７ＢＬ／６野生型マウス由来の３．１０^{6}のＣＤ４５．１$^{+}$ＣＤ４５．２$^{-}$ＣＴＶ^{low}雄の脾臓細胞、及び３．１０^{6} のＣＤ４５．１$^{-}$ＣＤ４５．２$^{+}$ＣＴＶ^{high}雌の脾臓細胞の混合物を静脈内に注入した。２０日目に、白血球分析は、ＰＢＳを注入した対照群では、同じ比率の雄のＨＹ$^{+}$（ＣＴＶ^{low}）細胞と雌のＨＹ$^{-}$（ＣＴＶ^{high}）細胞が生き残ったことを示した（図３Ａ、３Ｂ）。予想どおり、ＡＡＶ－ＧＦ－ＨＹを注入した群では、雄の細胞は殆ど生き残らなかったが（雄の細胞５．２％に対し、雌の細胞９４．８％）、ＡＡＶ＋ＨＹペプチド免疫調節群の（雄の細胞２６．４％に対し、雌の細胞７３．６％）とは対照的であった。したがって、導入遺伝子由来の免疫優性ペプチドならびに高用量のＡＡＶ８の共注入は、インビボでの遺伝子導入細胞に対する細胞毒性を抑制することができる。

【００９５】

末梢のＡＡＶ８カプシドＴ細胞免疫応答のバイスタンダー抑制は、導入遺伝子産物由来ペプチドとＡＡＶ８との網膜中への同時注入により得られる。

高用量のＡＡＶと導入遺伝子産物由来のペプチドとの同時網膜下注入は、Ｔ細胞による炎症誘発性サイトカイン分泌及び遺伝子導入細胞に対するインビボでの細胞毒性の末梢抑制につながる可能性があるため、本発明者らは、ＳＲＡＩＩもまた、通常ＡＡＶ注入により引き起こされる抗カプシド特異的Ｔ細胞免疫応答に影響を与えるのではないかと考えた。この目的のために、ＰＢＳ（ネガティブコントロール群）、ＨＹペプチド（ＳＲＡＩＩ対照群）、及び５．１０^{10}vgのＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ、又はＡＡＶ８－ＧＦＰ－ＨＹ＋ＨＹペプチドを、０日目に、Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスの網膜下腔に注入した。２週間後、免疫応答はＰＢＳ：ＣＦＡ（ネガティブコントロール群）又はＨＹ：ＣＦＡのいずれかの皮下免疫により誘導された。Ｔ細胞の免疫応答は、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔアッセイによる免疫の１週間後に、ＡＡＶ８カプシドを用いたインビトロでの再刺激により評価された（図４）。本発明者らの結果は、ＩＦＮγの分泌が、ＡＡＶ８＋ＨＹペプチドを網膜下に受けたマウスにおいて、ＡＡＶ８のみを注入したマウスと比較して、６８．９％抑制されたことを示す。興味深いことに、ＡＡＶ８カプシドは、ＨＹペプチドを含有しなかったために、抗導入遺伝子（ＨＹ）特異的Ｔ細胞活性化と同時に発生した抗カプシド（ＡＡＶ８）Ｔ細胞応答に対するバイスタンダー免疫抑制を示す。したがって、これらのデータは、導入遺伝子由来の免疫優性ペプチドならびに高用量のＡＡＶ８の共注入もまた、抗カプシド特異的Ｔ細胞炎症誘発性サイトカインの分泌を抑制できることを示す。

ディスカッション：

【００９６】

網膜におけるＡＡＶ媒介性遺伝子導入は、１９９６年の概念実証(Ali et al., 1996)から２０００年の臨床試験まで、この２０年間で非常に進歩した。当初は有望な結果が得られたにもかかわらず、いくつかの臨床試験での長期追跡調査では、最初のＡＡＶ誘導性の改善(Bainbridge et al., 2015; Jacobson et al., 2015)の後に、二次的な視力喪失が明らかになった。これにより、本発明者らは、無症候性の抗導入遺伝子免疫応答の可能性を調査することとなった。実際、臨床試験に登録された患者は、ＡＡＶ注入後の最初の数日間に、局所的及び／又は全身的に免疫抑制処置を受けたが、これはおそらく免疫応答の誘導を制限、遅延、又は覆い隠した。しかしながら、導入遺伝子発現は、処置後も発現し続けるため、導入遺伝子産物に対する免疫応答を長期にわたって誘導することができる。

【００９７】

いくつかの研究は、眼の免疫特権状態を強調してきた。遅延型過敏症の測定は、卵白アルブミンの網膜下注入が末梢でＴｈ１プロファイルの抑制を誘導することを示しており(Wenkel and Streilein, 1998）、ＭｃＰｈｅｒｓｏｎらは、網膜抗原に対して特異

的な制御性Ｔ細胞がそこで生成されることを示した(McPherson et al., 2011)。本発明者らはさらに、網膜下腔に関連する全身性免疫応答を特徴付け、そして雄性抗原であるＨＹの網膜下注入が、Ｔ細胞の増殖と分裂を抑制するＳＲＡIIを誘導することを示した(Vendomele et al., 2018)。

【００９８】

ワクチン又はＡＡＶベクターの研究が示してきたように、抗原の負荷は、免疫応答と密接に相関しており(Gu et al., 2018; Khabou et al., 2018)、そして免疫応答は、ＡＡＶの用量に依存している可能性が高いため(Ramachandran et al., 2016)、本発明者らは、免疫応答が、導入遺伝子の発現レベルとも相関しているのではないかと考えた。生物発光イメージングは、眼における用量依存的な導入遺伝子発現を明らかにした。それでもなお、導入遺伝子ペプチドもまた、網膜の抗原提示細胞（ミクログリアなど）によって処理され、次にそれが末梢（例えば、脾臓、頸部リンパ節）に移動して、全身の抗導入遺伝子免疫応答を引き起こす可能性があることに留意することが重要である。眼及びその末梢における導入遺伝子の発現レベルと免疫応答との間の関連性の存在を決定するために、局所的な免疫応答及び網膜構造の研究には、現在、大きな関心が寄せられている。さらに、眼のＡＡＶ媒介性臨床試験中の患者は、注入の前と注入後の数日間、局所及び／又は全身の免疫抑制処置（例えば、プレドニゾロン）を受けた。この種のアプローチは、免疫応答の非特異的抑制を可能にし、患者にとって有害となる可能性がある。さらに、その効果は一時的なものにすぎず、一方で導入遺伝子は、長期にわたって発現する。したがって、本発明者らは、ＳＲＡII機序を利用することにより、我々の文脈中で誘導される、抗導入遺伝子と抗カプシド免疫応答を部分的に抑制しようとした。導入遺伝子由来の免疫優性ペプチドと中用量のＡＡＶ８との共注入は、導入遺伝子産物とＡＡＶカプシドに対する免疫応答の両方の抑制を誘導した。本発明者らが、導入遺伝子由来の免疫優性ペプチドの共注入により研究を始めた、導入遺伝子及びバイスタンダーのカプシド特異的調節の役割は、さらなる研究において、より深く検討されるべきである。

【００９９】

本発明者らの研究におけるすべての実験は、野生型Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスにおいて実施され、それにより、本発明者らは、ＡＡＶ媒介性眼科遺伝子導入に関わる無症候性免疫機序を強調し、解読することができた。遺伝子治療への応用のためにさらに検討されるべき有用な課題は、これらの機序が、様々な眼の病状の存在によりどのように影響されるかである。いくつかの眼の病状は、血液網膜関門に影響を及ぼし(Milam et al., 1998; Vinores et al., 1995; Wang et al., 2011)、その局所環境は炎症性である(Chen and Xu, 2015; Yoshida et al., 2013)。特に、ｒｄ１０マウスなどの網膜変性モデルの使用は、新たな洞察を可能にするであろう。本発明者らが、炎症誘発性免疫応答もまた、その文脈の中で誘導されるとの仮説を立てることは可能であるが、共注入によるその調節の可能性は不明である。ＳＲＡII機序を誘導する可能性は、網膜変性の文脈の中で調査されるべきである（下記の実施例２と比較のこと）。

【０１００】

これらの結果は、長期的には、患者に対するＡＡＶ媒介性遺伝子導入の安全性と有効性の改善につながる可能性がある。本発明者らの研究は、ＡＡＶ媒介性網膜下遺伝子導入における免疫応答の分野における新たな研究の道を開き、そしてより大きな文脈における導入遺伝子及びカプシドの特異的免疫調節のための洞察を提供し得る。

【実施例】

【０１０１】

本クレームの病態生理学的文脈における関連性を確認するために、眼科遺伝子導入後の導入遺伝子産物に対するＴ細胞免疫応答の誘導を防ぐことを目的として、網膜変性のｒｄ１０マウスモデルにおいて実験を行った。ｒｄ１０マウスモデルは、Ｐｄｅ６ｂ（ｃＧＭＰホスホジエステラーゼ６Ｂ、桿体受容体、βポリペプチド）遺伝子における偶発性ミスセンス点変異であることにより特徴付けられる。ｒｄ１０表現型は、遅発性及び軽度の網膜変性を有し、網膜色素変性症に対する優れた実験的薬物治療モデルを提供する。

【０１０２】
ＨＹ雄性抗原と融合したＧＦＰレポータータンパク質をコードする、異なる用量（２．１０９又は５．１０１０vg）のＡＡＶ８を、ＰＧＫプロモーター下で、成体免疫適格性ｒｄ１０雌マウスの網膜下腔に、０日目に注入した。１４日目に、マウスを、ＨＹペプチドを用いて、又は用いずに、皮下免疫し、２１日目に、脾臓におけるＴ細胞免疫応答を、ＨＹペプチドを用いてインビトロで再刺激した後、ＩＦＮ－γＥＬＩＳｐｏｔアッセイにより分析した。データは、ＡＡＶ８の網膜下注入が、導入遺伝子に対する炎症誘発性Ｔ細胞免疫応答を誘導することを示した（図５）。ＡＡＶ８とＨＹペプチドを用いた、０日目の網膜下共注入は、高用量のベクター（５．１０^{10}vg）でさえ、導入遺伝子に対するＴ細胞免疫応答の調節（少なくとも５０％の抑制）につながった（図５）。

【０１０３】
まとめると、これ等データにより、ベクターと導入遺伝子産物のペプチドとの網膜下共注入は、病態生理学的条件においても、眼におけるＡＡＶ導入により誘導される導入遺伝子に対する炎症誘発性末梢免疫応答を打ち消すことができることが確証される。

参考資料：

【０１０４】
本出願全体を通して、様々な参考文献は、本発明が関係する最新技術を記述している。これらの参考文献の開示は、参照により本開示に組み込まれる。

Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nat. Genet. 28, 92-95.

Acland, G.M., Aguirre, G.D., Bennett, J., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Bennicelli, J., Dejneka, N.S., Pearce-Kelling, S.E., Maguire, A.M., Palczewski, K., et al. (2005). Long-Term Restoration of Rod and Cone Vision by Single Dose rAAV-Mediated Gene Transfer to the Retina in a Canine Model of Childhood Blindness. Mol. Ther. 12, 1072-1082.

Ali, R.R., Reichel, M.B., Thrasher, A.J., Levinsky, R.J., Kinnon, C., Kanuga, N., Hunt, D.M., and Bhattacharya, S.S. (1996). Gene Transfer into the Mouse Retina Mediated by an Adeno-Associated Viral Vector. Hum. Mol. Genet. 5, 591-594.

Allocca, M., Mussolino, C., Garcia-Hoyos, M., Sanges, D., Iodice, C., Petrillo, M., Vandenberghe, L.H., Wilson, J.M., Marigo, V., Surace, E.M., et al. (2007). Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. J. Virol. 81, 11372-11380.

Auricchio, A., Kobinger, G., Anand, V., Hildinger, M., O'Connor, E., Maguire, A.M., Wilson, J.M., and Bennett, J. (2001). Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. Hum. Mol. Genet. 10, 3075-3081.

Bainbridge, J.W.B., Mehat, M.S., Sundaram, V., Robbie, S.J., Barker, S.E., Ripamonti, C., Georgiadis, A., Mowat, F.M., Beattie, S.G., Gardner, P.J., et al. (2015). Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis. N. Engl. J. Med. 372, 1887-1897.

Chan, N.S.-W., Chee, S.-P., Caspers, L., and Bodaghi, B. (2017). Review for Disease of the Year: Clinic of Cytomegalovirus-Induced Anterior Uveitis. Ocul. Immunol. Inflamm. 1-9.

Chen, M., and Xu, H. (2015). Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. J. Leukoc. Biol. 98, 713-725.

Cideciyan, A.V., Jacobson, S.G., Beltran, W.A., Sumaroka, A., Swider, M., Iwabe, S., Roman, A.J., Olivares, M.B., Schwartz, S.B., Komaromy, A.

M., et al. (2013). Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, E517-E525.

Cosette, J., Ben Abdelwahed, R., Donnou-Triffault, S., Sautes-Fridman, C., Flaud, P., and Fisson, S. (2016). Bioluminescence-Based Tumor Quantification Method for Monitoring Tumor Progression and Treatment Effects in Mouse Lymphoma Models. J. Vis. Exp. JoVE.

Dupont, J.-B., Tournaire, B., Georger, C., Marolleau, B., Jeanson-Leh, L., Ledevin, M., Lindenbaum, P., Lecomte, E., Cogne, B., Dubreil, L., et al. (2015). Short-lived recombinant adeno-associated virus transgene expression in dystrophic muscle is associated with oxidative damage to transgene mRNA. Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 2, 15010.

Gu, H., Gao, Y., Zhou, S., Sun, F., Zhao, Z., Wang, K., Zhao, L., Zhang, P., Wang, Z., Zhang, S., et al. (2018). Bivalent vaccine platform based on ca influenza virus vaccine elicits protective immunity against human adenoviruses. Antiviral Res.

Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Wang, L., Conlon, T.J., Boye, S.L., Flotte, T.R., Byrne, B.J., et al. (2008). Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial. Hum. Gene Ther. 19, 979-990.

Jacobson, S.G., Boye, S.L., Aleman, T.S., Conlon, T.J., Zeiss, C.J., Roman, A.J., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Komaromy, A.M., Doobrajh, M., et al. (2006a). Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis. Hum. Gene Ther. 17, 845-858.

Jacobson, S.G., Acland, G.M., Aguirre, G.D., Aleman, T.S., Schwartz, S.B., Cideciyan, A.V., Zeiss, C.J., Komaromy, A.M., Kaushal, S., Roman, A.J., et al. (2006b). Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 13, 1074-1084.

Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Roman, A.J., Sumaroka, A., Schwartz, S.B., Heon, E., and Hauswirth, W.W. (2015). Improvement and Decline in Vision with Gene Therapy in Childhood Blindness. N. Engl. J. Med. 372, 1920-1926.

Khabou, H., Cordeau, C., Pacot, L., Fisson, S., and Dalkara, D. (2018). Dosage thresholds and influence of transgene cassette in AAV-related toxicity. Hum. Gene Ther.

Kurniawan, E.D., Rocke, J.R., Sandhu, S.S., and Allen, P.J. (2017). Predictors of visual outcome and the role of early vitrectomy in streptococcal endophthalmitis. Clin. Experiment. Ophthalmol.

Le Meur, G., Stieger, K., Smith, A.J., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Pereon, Y., Cherel, Y., et al. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. Gene Ther. 14, 292-303.

Le Meur, G., Lebranchu, P., Billaud, F., Adjali, O., Schmitt, S., Bezieau, S., Pereon, Y., Valabregue, R., Ivan, C., Darmon, C., et al. (2017). Safety and Long-Term Efficacy of AAV4 Gene Therapy in Patients with RPE65 Leber Congenital Amaurosis. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.

Lebherz, C., Maguire, A., Tang, W., Bennett, J., and Wilson, J.M. (2008). Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. J. Gene Med. 10, 375-382.

Liu, Y.L., Wagner, K., Robinson, N., Sabatino, D., Margaritis, P., Xiao, W., and Herzog, R.W. (2003). Optimized production of high-titer recombinant adeno-associated virus in roller bottles. BioTechniques 34, 184-189.

Maclachlan, T.K., Lukason, M., Collins, M., Munger, R., Isenberger, E., Rogers, C., Malatos, S., Dufresne, E., Morris, J., Calcedo, R., et al. (2011). Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- a gene therapy for age-related macular degeneration. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 19, 326-334.

Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bennicelli, J.L., Ying, G., Rossi, S., et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet Lond. Engl. 374, 1597.

McPherson, S.W., Heuss, N.D., Lehman, U., and Gregerson, D.S. (2011). Generation of Regulatory T Cells to Antigen Expressed in the Retina. Curr. Immunol. Rev. 7, 344-349.

Milam, A.H., Li, Z.Y., and Fariss, R.N. (1998). Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. Prog. Retin. Eye Res. 17, 175-205.

Petit, L., Lheriteau, E., Weber, M., Le Meur, G., Deschamps, J.-Y., Provost, N., Mendes-Madeira, A., Libeau, L., Guihal, C., Colle, M.-A., et al. (2012). Restoration of vision in the pde6β-deficient dog, a large animal model of rod-cone dystrophy. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 20, 2019-2030.

Ramachandran, P.S., Lee, V., Wei, Z., Song, J.Y., Casal, G., Cronin, T., Willett, K., Huckfeldt, R., Morgan, J.I.W., Aleman, T.S., et al. (2016). Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina. Hum. Gene Ther.

Rizzolo, L.J., Peng, S., Luo, Y., and Xiao, W. (2011). Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. Prog. Retin. Eye Res. 30, 296-323.

Stein-Streilein, J. (2013). Mechanisms of immune privilege in the posterior eye. Int. Rev. Immunol. 32, 42-56.

Taylor, A.W., Alard, P., Yee, D.G., and Streilein, J.W. (1997). Aqueous humor induces transforming growth factor-ss (TGF-ss)-producing regulatory T-cells. Curr. Eye Res. 16, 900-908.

Vandenberghe, L.H., Bell, P., Maguire, A.M., Xiao, R., Hopkins, T.B., Grant, R., Bennett, J., and Wilson, J.M. (2013). AAV9 targets cone photoreceptors in the nonhuman primate retina. PloS One 8, e53463.

Vendomele, J., Khebizi, Q., and Fisson, S. (2017). Cellular and Molecular Mechanisms of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): What We Have Learned from Knockout Mice. Front. Immunol. 8.

Vendomele, J., Dehmani, S., Khebizi, Q., Galy, A., and Fisson, S. (2018). Subretinal injection of HY peptides induces systemic antigen-specific inhibition of effector CD4+ and CD8+ T-cell responses. Front. Immunol. 9.

Vinores, S.A., Kuchle, M., Derevjanik, N.L., Henderer, J.D., Mahlow, J., Green, W.R., and Campochiaro, P.A. (1995). Blood-retinal barrier breakdown in retinitis pigmentosa: light and electron microscopic immunoloc

alization. Histol. Histopathol. 10, 913-923.

Wang, Q., Song, S.-K., Zhang, H., Berkowitz, B.A., Chen, S., Wickline, S.A., and Chen, J. (2011). Photoreceptor degeneration changes magnetic resonance imaging features in a mouse model of retinitis pigmentosa. Magn. Reson. Med. 65, 1793-1798.

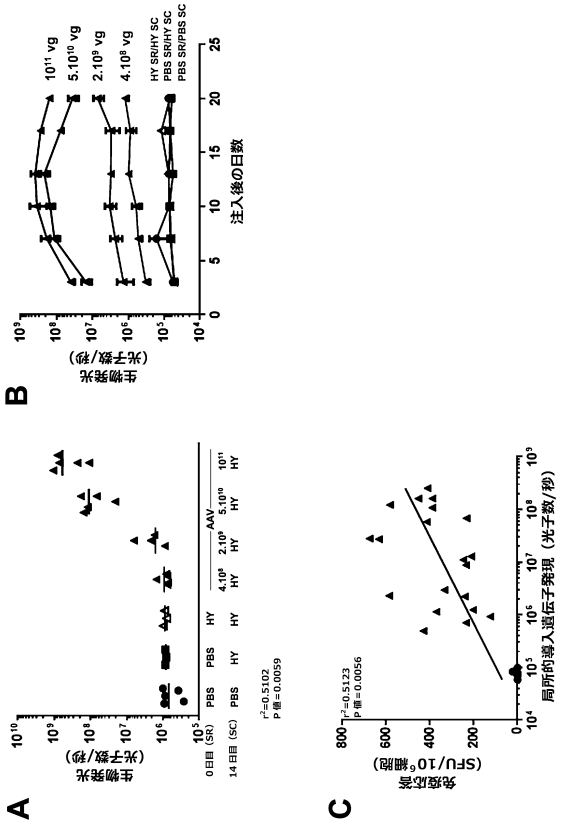
Weber, M., Rabinowitz, J., Provost, N., Conrath, H., Folliot, S., Briot, D., Cherel, Y., Chenuaud, P., Samulski, J., Moullier, P., et al. (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 7, 774-781.

Wenkel, H., and Streilein, J.W. (1998). Analysis of immune deviation elicited by antigens injected into the subretinal space. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 1823-1834.

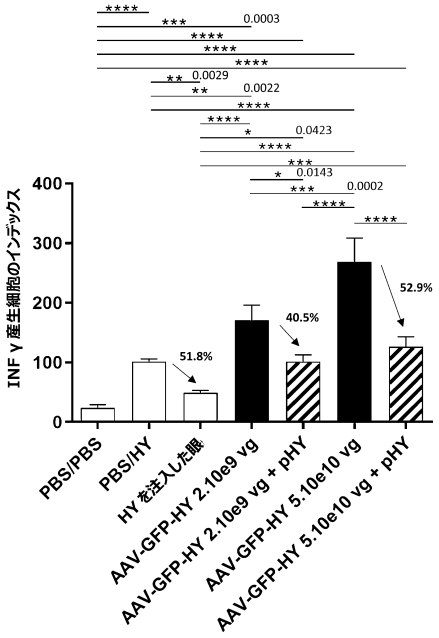
Yoshida, N., Ikeda, Y., Notomi, S., Ishikawa, K., Murakami, Y., Hisatomi, T., Enaida, H., and Ishibashi, T. (2013). Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. Ophthalmology 120, e5-12.

【図面】

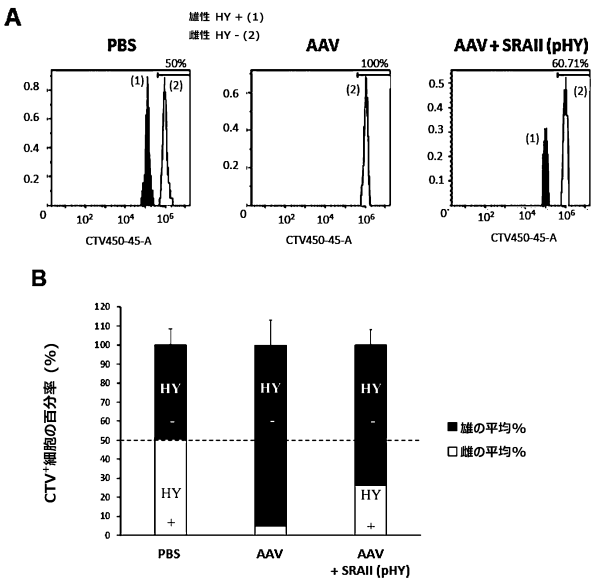
【図１】



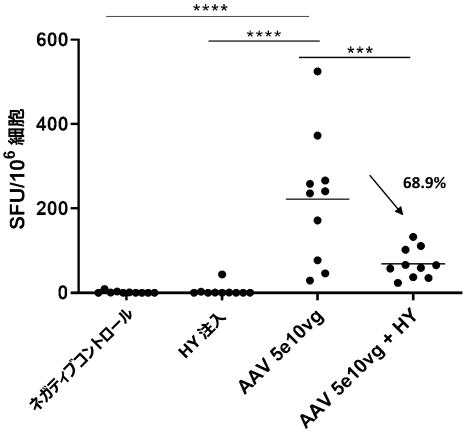
【図２】



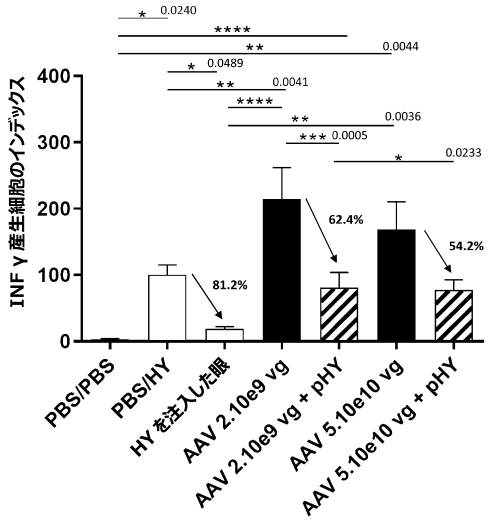
【図３】


A
雄性 HY + (1)
雌性 HY - (2)
PBS
AAV
AAV + SRAII (pHY)
50%
100%
60.71%
(1)
(2)
CTV450-45-A
B
CTV+細胞の百分率 (%)
HY
-
+
PBS
AAV
AAV
+ SRAII (pHY)
■雄の平均%
□雌の平均%

【図４】


SFU/10^6 細胞
****
****
***
68.9%
ネガティブコントロール
HY注入
AAV 5e10vg
AAV 5e10vg + HY

【図５】


INF γ 産生細胞のインデックス
0.0240
****
0.0044
0.0489
0.0041
****
0.0036
*** 0.0005
0.0233
81.2%
62.4%
54.2%
PBS/PBS
PBS/HY
HYを注入した脈
AAV 2.10e9 vg
AAV 2.10e9 vg + pHY
AAV 5.10e10 vg
AAV 5.10e10 vg + pHY

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/060647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K48/00 A61P27/02 A61K39/12 A61K39/39 C12N15/86
A61K38/00
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P C07K A61K C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MINGOZZI FEDERICO ET AL: "Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE (A A A S), US, vol. 5, no. 194, 17 July 2013 (2013-07-17) , XP009183093, ISSN: 1946-6242, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3005795	1-18
Y	abstract page 122, left-hand column, paragraph 1 - page 129, left-hand column, paragraph 1	1-18
	----- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 June 2021	05/07/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Camilleri, Alain

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/060647

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MINGOZZI FEDERICO ET AL: "Overcoming the Host Immune Response to Adeno-Associated Virus Gene Delivery Vectors: The Race Between Clearance, Tolerance, Neutralization, and Escape", ANNUAL REVIEW OF VIROLOGY,, vol. 4, no. 1, 29 September 2017 (2017-09-29), pages 511-534, XP009512397, ISSN: 2327-0578, DOI: 10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-101416-041936	1-18
Y	abstract page 511 - page 527	1-18

X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2012 (2012-11), MINGOZZI FEDERICO ET AL: "A Novel Strategy to Circumvent Pre-Existing Humoral Immunity to AAV", XP002800662, Database accession no. PREV201300230521	1-18
Y	abstract & BLOOD, vol. 120, no. 21, November 2012 (2012-11), page 2050, 54TH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 08 -11, 2012 ISSN: 0006-4971(print)	1-18

X	WO 2009/105690 A2 (TARGETED GENETICS CORP [US]; ALI ROBIN R [GB] ET AL.) 27 August 2009 (2009-08-27) cited in the application	1-18
Y	abstract page 1, paragraph 0002 - page 40, paragraph 0118 examples claims	1-18

Y	ANNA MAJOWICZ ET AL: "Therapeutic hFIX Activity Achieved after Single AAV5-hFIX Treatment in Hemophilia B Patients and NHPs with Pre-existing Anti-AAV5 NABs", MOLECULAR THERAPY - METHODS & CLINICAL DEVELOP, vol. 14, 28 May 2019 (2019-05-28), pages 27-36, XP055737681, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1016/j.omtm.2019.05.009 abstract	1-18

	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/060647

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	LEBORGNE CHRISTIAN ET AL: "IgG-cleaving endopeptidase enables in vivo gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies", NATURE MEDICINE, NATURE PUB. CO, NEW YORK, vol. 26, no. 7, 1 June 2020 (2020-06-01), pages 1096-1101, XP037191535, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/S41591-020-0911-7 [retrieved on 2020-06-01] abstract -----	1-18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/060647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009105690 A2	27-08-2009	US 2010081707 A1	01-04-2010
		WO 2009105690 A2	27-08-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*9/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ	*27/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/06	
Ａ６１Ｐ	*37/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｋ	*38/46 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/46	
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ	*15/864 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ
Ｃ１２Ｎ	*15/35 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/35	
Ｃ０７Ｋ	*14/015 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/015	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ワ・ミッテラン・２３

(74)代理人 110001508

弁理士法人 津国

(72)発明者 シルヴァン，フィソン

フランス国、９１００２ エヴリー・セデックス、リュ・ドゥ・ランテルナシオナル １ビス、ジェネトン－ユ９５１

Ｆターム（参考） 4C084 AA02 AA13 AA19 BA44 DC22 MA58 MA66 NA06 NA14 ZA011 ZA331 ZA361 ZB081 ZB111 ZB221 ZC191 ZC541

4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA08 MA02 MA58 MA66 NA06 NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZB11 ZB22 ZC19 ZC54

4H045 AA11 AA20 AA30 BA15 BA17 CA01 DA86 EA22 FA10