

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7618287号
(P7618287)

(45)発行日 令和7年1月21日(2025.1.21)

(24)登録日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 15/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/53	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z Z N A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

請求項の数 8 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-127560(P2023-127560)	(73)特許権者	522229949 北京中因科技有限公司 中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ぺキン, チャンピン ディストリクト, ライフ サ イエンス パーク, ライフ ガーデン ロ ード, ナンバー 2 7 , ビルディング 1 Building 1, No. 2 7 , L ife Garden Road, Lif e Science Park, Chan gping District, Bei jing 1 0 2 2 0 6 , China
(22)出願日	令和5年8月4日(2023.8.4)	(74)代理人	110000914 弁理士法人WisePlus
(62)分割の表示	特願2022-535530(P2022-535530)の分割	(72)発明者	ヤン, リーピン 中華人民共和国 1 0 0 1 9 1 ぺキン, 最終頁に続く
原出願日	令和2年7月16日(2020.7.16)		
(65)公開番号	特開2023-139317(P2023-139317 A)		
(43)公開日	令和5年10月3日(2023.10.3)		
審査請求日	令和5年8月4日(2023.8.4)		
(31)優先権主張番号	201911255192.X		
(32)優先日	令和1年12月9日(2019.12.9)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		

(54)【発明の名称】 医薬の製造におけるCYP4V2およびRdCVFの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

5'から3'の方向で順に、プロモーター、CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、およびポリアデニレーションシグナル部位を含むベクターであって、前記プロモーターは、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結され、CAGプロモーターであり、前記CAGプロモーターはSEQ ID NO: 4に示されるポリヌクレオチド配列を含み、前記CYP4V2のアミノ酸配列はSEQ ID NO: 76に示されるアミノ酸配列を含み、前記ベクターはAAV2/8である、ベクター。

【請求項2】

前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 62に示される核酸配列又はそれと少なくとも95%の同一性のポリヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載のベクター。

【請求項3】

前記ポリアデニレーションシグナル部位は、SEQ ID NO: 17~21に示される核酸配列を含む、請求項1に記載のベクター。

【請求項4】

請求項1~3のいずれかに記載のベクターを含む、細胞。

【請求項5】

請求項1~3のいずれかに記載のベクターおよび/または請求項4に記載の細胞、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 6】

被験者の網膜色素上皮（RPE）萎縮に関連する疾患または状態の治療、緩和および/または予防のための、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記疾患または状態は、結晶性網膜変性である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記被験者は、ヒトである、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は生物医薬分野に関し、具体的には医薬の製造における CYP4V2 および RdCVF の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

結晶性網膜変性（Bietti's crystalline dystrophy, BCD）は、角膜の結晶（透明カパー）、網膜の光感受性組織に沈着した微細、黄色、または白色の結晶質の沈着、および網膜、脈絡膜毛細血管、および脈絡膜の進行性萎縮を特徴とする網膜変性のまれな疾患である。沈着物によって網膜が損傷され、視力が徐々に失われる。結晶性網膜変性の人は、典型的には 10 代から 20 代の間に視力障害を感じ始め、それぞれの眼の視力障害が異なるペースで悪化することがある。症状の重症度や進行は、同じ家族内でも個人によって大きく異なるが、ほとんどの人は 40 歳または 50 歳までに失明する。世界中で 67,000 人に 1 人が結晶性網膜変性を有すると推定され、東アジア人、特に中国人と日本人で多くみられる。

【0003】

現在の研究により、BCD は常染色体劣性遺伝疾患であり、しかも CYP4V2 遺伝子の突然変異による引き起こし、現在国内外の BCD 患者の遺伝子研究にすでに CYP4V2 の多数の遺伝子突然変異部位を発見した。CYP4V2 遺伝子はシトクロム P450 スーパーファミリー中の蛋白質の一つであり、CYP4V2 遺伝子コード蛋白は脂肪酸代謝の過程に参与し、結晶性網膜変性中の CYP4V2 遺伝子突然変異は脂肪酸代謝に参与する酵素機能を破壊し、それによる脂質の分解に影響したと思われる。しかしながら CYP4V2 がどのように BCD の特異的な徴候および症状を引き起こすかは不明である。現在 BCD の治療は主に網膜色素変性（RP）の治療方法を参考し、CYP4V2 遺伝子突然変異の研究が未来の遺伝子治療に可能を提供したが、現在まだ有効な治療方法がない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本願は、網膜色素上皮（RPE）萎縮に関連する疾患または状態の治療、緩和および/または予防のための医薬の製造における、CYP4V2 および RdCVF の使用を提供する。

【0005】

いくつかの実施形態では、前記疾患または状態は結晶性網膜変性を含む。

【0006】

いくつかの実施形態では、CYP4V2 はヒト CYP4V2 である。

【0007】

いくつかの実施形態では、CYP4V2 は、SEQ ID NO: 76 ~ 82 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、CYP4V2 をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 62 ~ 68 のいずれかに示される核酸配列を含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、RdCVF はヒト RdCVF である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、R d C V F は、S E Q I D N O : 8 3 ~ 8 9 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、前記 R d C V F をコードするポリヌクレオチドは、S E Q I D N O : 6 9 ~ 7 5 のいずれかに示される核酸配列を含む。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、前記医薬は、前記 C Y P 4 V 2 をコードするポリヌクレオチドおよび前記 R d C V F をコードするポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、前記 C Y P 4 V 2 をコードするポリヌクレオチドおよび前記 R d C V F をコードするポリヌクレオチドは異なるベクターに位置する。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、前記 C Y P 4 V 2 をコードするポリヌクレオチドおよび前記 R d C V F をコードするポリヌクレオチドは同一のベクターに位置する。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはウイルスベクターを含む。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはウイルスベクターであり、前記ウイルスベクターは A A V ベクターを含む。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態では、前記ベクターは、さらに、C Y P 4 V 2 をコードするポリヌクレオチドの 5 ' 端に位置し、かつ C Y P 4 V 2 をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態では、前記ベクターは、さらに、R d C V F をコードするポリヌクレオチドの 5 ' 端に位置し、かつ R d C V F をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、S E Q I D N O : 1 ~ 1 2 のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはさらにポリアデニレーションシグナル部位を含み、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記 C Y P 4 V 2 をコードするポリヌクレオチドの 3 ' 端に位置する。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはさらにポリアデニレーションシグナル部位を含み、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記 R d C V F をコードするポリヌクレオチドの 3 ' 端に位置する。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはさらに自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは前記 C Y P 4 V 2 をコードするポリヌクレオチドと前記 R d C V F をコードするポリヌクレオチドとの間に位置する。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは P 2 A を含む。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、S E Q I D N O : 2 2 ~ 2 5 のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 5 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、前記ベクターは5'～3'方向で順に以下を含む：前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドおよび前記ポリアデニレーションシグナル部位。

【0026】

いくつかの実施形態では、前記ベクターは5'から3'方向で順に以下を含む：前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、および前記ポリアデニレーションシグナル部位；または、前記ベクターは5'から3'方向で順に以下を含む：前記プロモーター、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、および前記ポリアデニレーションシグナル部位。

10

【0027】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはイントロンをさらに含む。

【0028】

いくつかの実施形態では、前記イントロンは、SEQ ID NO：13～16のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0029】

いくつかの実施形態では、前記イントロンは、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド中に位置するか、または、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

【0030】

いくつかの実施形態では、前記イントロンは、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド中に位置するか、または、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはSEQ ID NO：90～116のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0032】

本願はまた、網膜色素上皮(RPE)萎縮に関連する疾患または状態の治療、緩和および/または予防のためのベクターの組み合わせを提供し、前記ベクターの組み合わせは第1ベクターと第2ベクターを含み、前記第1ベクターはCYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含み、前記第2ベクターはRdCVFをコードするポリヌクレオチドを含む。

30

【0033】

いくつかの実施形態では、前記疾患または状態は結晶性網膜変性を含む。

【0034】

いくつかの実施形態では、CYP4V2はヒトCYP4V2である。

【0035】

いくつかの実施形態では、CYP4V2は、SEQ ID NO：76～82のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、CYP4V2をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO：62～68のいずれかに示される核酸配列を含む。

40

【0037】

いくつかの実施形態では、RdCVFはヒトRdCVFである。

【0038】

いくつかの実施形態では、RdCVFは、SEQ ID NO：83～89のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、RdCVFをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO：69～75のいずれかに示される核酸配列を含む。

【0040】

50

いくつかの実施形態では、前記ベクターはウイルスベクターを含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはウイルスベクターであり、前記ウイルスベクターはAAVベクターを含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、前記第1のベクターは、さらに、CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置し、かつCYP4V2をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。

【0043】

いくつかの実施形態では、前記第2のベクターは、さらに、RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置し、かつRdCVFをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。

10

【0044】

いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 1~12のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0045】

いくつかの実施形態では、前記第一ベクターはさらにポリアデニレーションシグナル部位を含み、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの3'端に位置する。

【0046】

いくつかの実施形態では、前記第2ベクターはさらにポリアデニレーションシグナル部位を含み、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの3'端に位置する。

20

【0047】

いくつかの実施形態では、前記第1ベクターは5'から3'方向で順に以下を含む：前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、および前記ポリアデニレーションシグナル部位；および/または、前記第2ベクターは5'から3'方向で順に以下を含む：前記プロモーター、前記コードRdCVFのポリヌクレオチド、および前記ポリアデニレーションシグナル部位。

【0048】

いくつかの実施形態では、前記第1ベクターおよび/または前記第2ベクターはさらにイントロンを含む。

30

【0049】

いくつかの実施形態では、前記イントロンは、SEQ ID NO: 13~16のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0050】

いくつかの実施形態では、前記イントロンは、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド中に位置するか、または、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

【0051】

いくつかの実施形態では、前記イントロンは、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド中に位置するか、または、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

40

【0052】

いくつかの実施形態では、第1のベクターは、SEQ ID NO: 90~95のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含み、および/または、前記第2ベクターはSEQ ID NO: 96~100のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0053】

本願はまた、1種または多種の単離された核酸分子を提供し、該核酸分子はa) CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、およびb) RdCVFをコードするポリヌクレオチ

50

ドを含む。

【0054】

いくつかの実施形態では、CYP4V2はヒトCYP4V2である。

【0055】

いくつかの実施形態では、CYP4V2は、SEQ ID NO: 76 ~ 82のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、CYP4V2をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 62 ~ 68のいずれかに示される核酸配列を含む。

【0057】

いくつかの実施形態では、RdCVFはヒトRdCVFである。

【0058】

いくつかの実施形態では、RdCVFは、SEQ ID NO: 83 ~ 89のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。

【0059】

いくつかの実施形態では、RdCVFをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 69 ~ 75のいずれかに示される核酸配列を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、さらに、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'末端に位置し、かつ前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。

【0061】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、さらに、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'末端に位置し、かつ前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 1 ~ 12のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子はCYP4V2をコードするポリヌクレオチドおよびRdCVFをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0064】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子はさらに自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドと前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドとの間に位置する。

【0065】

いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドはP2Aを含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 22 ~ 25のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子はさらにポリアデニレーションシグナル部位を含み、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの3'端に位置する。

【0068】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子はさらにポリアデニレーションシグナル部位を含み、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの3'端に位置する。

【0069】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、5'から3'方向で順に以下を含む：前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドおよび前記ポリアデニレーションシグナル部位。

【0070】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、さらにイントロンを含む。

【0071】

いくつかの実施形態では、前記イントロンは、SEQ ID NO：13～16のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0072】

いくつかの実施形態では、イントロンは、CYP4V2をコードするポリヌクレオチド中に位置するか、またはCYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'末端に位置する。

【0073】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、SEQ ID NO：101～115のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0074】

本願は、さらに、本願に記載の単離された核酸分子を含むベクターを提供する。

【0075】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはウイルスベクターである。

【0076】

いくつかの実施形態では、前記ウイルスベクターはAAVベクターを含む。

【0077】

本願は、さらに、本願に記載の核酸分子または本願に記載のベクターを含む細胞を提供する。

【0078】

本願はまた医薬組成物を提供し、該医薬組成物は本願の前記核酸分子、本願の前記ベクターおよび/または本願の前記細胞を含む。

【0079】

本願はまた本願に記載する核酸分子、本願に記載するベクター、または本願に記載する細胞の、医薬の製造における使用を提供し、前記医薬は、網膜色素上皮(RPE)萎縮に関連する疾患または状態の治療、緩和および/または予防に用いる。

【0080】

いくつかの実施形態では、前記疾患または状態は結晶性網膜変性を含む。

【0081】

当業者は、本願の他の態様及び利点について、以下の詳細な説明から容易に洞察することができる。以下の詳細な説明では、本願の例示的な実施形態のみを示し、説明する。当業者が認識するであろうように、本願の内容は、当業者が、本願に係る発明の精神及び範囲を逸脱することなく、開示された特定の実施形態に変更を加えることを可能にするものである。したがって、本願の添付図面及び明細書の記載は単なる例示であり、限定的なものではない。

【0082】

本願に係る発明の具体的な特徴は、特許請求の範囲に記載のとおりである。本願で詳細に説明される例示的な実施形態及び添付図面を参照することによって、本願に係る発明の特徴及び利点をよりよく理解することができる。添付図面の概略説明は以下のとおりである。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】本願における異なるCYP4V2プロモーターの発現効果を示す。

【図2】本願におけるCAG、EF1a、OPEFSおよびEFSプロモーターの発現効果を示す。

【図3】本願におけるプロモーター後結合イントロンの発現増強作用を示す。

10

20

30

40

50

【図 4】本願におけるプロモーター後結合イントロンの発現増強作用を示す。

【図 5】本願中の発現ベクターの異なる P o l y A シグナル部位の選択による目的遺伝子発現への影響を示す。

【図 6】本願の C Y P 4 V 2、R d C V F 遺伝子を含む発現ベクターの 2 9 3 T 細胞における発現を示す。

【図 7】本願の C Y P 4 V 2、R d C V F 遺伝子を含む発現ベクターの A R P E - 1 9 細胞での発現を示す。

【図 8】本願における異なる血清型の A A V ウイルスによるマウス網膜への感染を示し、両矢印は E G F P レポーター遺伝子の発現範囲を示す。

【図 9】本願の R P E 細胞の作製過程で蛍光顕微鏡で観察された腎上皮細胞、I P S C 細胞、R P E 細胞の形態を示す。

10

【図 10】1 0 A は、本願におけるウイルス力価がヒト i P S C から分化した R P E 細胞の死亡に与える影響を示し、1 0 B、1 0 C はそれぞれウイルス力価がヒト i P S C から分化した R P E 細胞における炎症性サイトカイン N L R P 3、T N F - の発現状況に与える影響を示し、1 0 D は異なるウイルス力価条件下でヒト i P S C から分化した R P E 細胞における目的遺伝子の発現状況を示した。

【図 11】ヒト i P S C から分化した R P E 細胞に本願の異なるウイルスを感染させた場合の C Y P 4 V 2、R d C V F の発現状況を示す。

【図 12】異なるプロモーターと C Y P 4 V 2 遺伝子を含むウイルス処理の B C D マウスの眼底結晶沈着に及ぼす影響を示す。

20

【図 13】異なるプロモーターと C Y P 4 V 2 遺伝子を含むウイルス処理の B C D マウスの眼底結晶沈着に及ぼす影響の統計的結果を示す。

【図 14】異なるプロモーターと C Y P 4 V 2 遺伝子を含むウイルス処理の B C D マウスにおける C Y P 4 V 2 免疫蛍光染色の結果を示す。

【図 15】本願において C Y P 4 V 2 遺伝子を含む異なる用量のウイルスで B C D マウスを処理した後の眼底結晶沈着状況に対する影響を示す。

【図 16】本願において C Y P 4 V 2 遺伝子を含む異なる用量のウイルスで B C D マウスを処理した後の眼底結晶沈着状況に対する影響の統計結果を示す。

【図 17】本願において C Y P 4 V 2 遺伝子を含む異なる用量のウイルスで B C D マウスを処理した後の炎症性サイトカイン T N F - 、I F N - 、N L R P 3 の発現レベルに対する影響を示す。

30

【図 18】本願において B C D マウスを異なるウイルスで処理した後の眼底結晶沈着状況への影響を示す。

【図 19】本願において B C D マウスを異なるウイルスで処理した後の眼底結晶沈着状況への影響の統計的結果を示す。

【図 20】本願において異なるウイルスで B C D マウスを処理した後の網膜機能（網膜電図検査（E R G））への影響を示す。

【図 21】本願において異なるウイルスで B C D マウスを処理した後の C Y P 4 V 2、R d C V F の免疫蛍光染色結果を示す。

【図 22】本願において異なるウイルスで B C D マウスを処理した後の R P E 細胞の数および形態への影響を示す。

40

【図 23】本願において異なるウイルスで B C D マウスを処理した後の R P E 細胞数への影響の統計結果を示す。

【図 24】本願においてプロモーター後にイントロンを含まない異なるウイルスで B C D マウスを処理した後の網膜機能（網膜電図検査（E R G））への影響を示す。

【図 25】本願において p 1 プロモーターの異なるウイルスで B C D マウスを処理した後の網膜機能（網膜電図検査（E R G））への影響を示す。

【図 26】本願において W P R E - S V 4 0 p o l y A シグナル部位の異なるウイルスで B C D マウスを処理した後の網膜機能（網膜電図検査（E R G））への影響を示す。

【図 27】本願においてシグナル部位を含まない異なるウイルスで B C D マウスを処理し

50

た後の網膜機能（網膜電図検査（E R G））への影響を示す。

【発明を実施するための形態】

【0084】

以下では、特定の具体的な実施形態を用いて本願発明の実施形態を説明するが、当業者は、本願で開示されることにより、本願発明の他の利点及び効果を容易に理解され得る。

【0085】

以下では、本願についてさらに説明する：本発明において、特に明記されていない限り、本願で使用される科学技術用語は、当業者にとって一般的に理解され得る意味を有する。さらに、本明細書で使用されるタンパク質及び核酸化学、分子生物学、細胞及び組織培養、微生物学、免疫学に関する用語及び実験手順は、それぞれの分野で広く使用されている用語及び日常的な手順である。また、本発明をよりよく理解するために、関連する用語の定義及び説明を以下に示す。

10

【0086】

本願では、「単離された」という用語は、通常、自然の状態から人為的に得られたものを指す。もし自然界にある「単離」の物質或いは成分が出現すれば、それが置かれた自然環境に変化が発生したか、あるいは自然環境からその物質を単離したか、あるいはその両方が発生した可能性がある。例えば、ある生体動物体内にはある種の単離されていないポリヌクレオチドまたはポリペプチドが自然に存在し、この自然状態から単離された高純度の同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドを単離したと称する。「単離された」という用語は、人工または合成が混在する物質、または物質の活性に影響しないその他の不純物の存在を排除しない。

20

【0087】

本願では、「単離された核酸分子」という用語は、通常、ヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはリボヌクレオチドの任意の長さの単離形式、またはその自然環境から単離され、または人工的に合成された類似物を指す。

【0088】

本願では、「CYP4V2」という用語は、通常、チトクロームP450ファミリー4サブファミリーVメンバー2であるタンパク質を指す。シトクロームP450はcytochrome P450あるいはCYP450とも呼ばれ、通常に1種類の鉄ヘム蛋白ファミリーを指し、モノオキシゲナーゼの1種類に属し、内因性物質あるいは医薬、環境化合物を含む外因性物質の代謝に参与する。アミノ酸配列の同源程度によって、そのメンバーはファミリー、サブファミリーと酵素個体の三級に分けられる。チトクロームP450酵素系はCYPと略記することができ、その中、ファミリーはアラビア数字で表示され、サブファミリーは大文字の英字で表示され、酵素個体はアラビア数字で表示され、例えば、本願中のCYP4V2。ヒトCYP4V2遺伝子(HGNC::23198)は全長19.28 kbであり、4q35に位置し、11個のエクソンを有し、脂肪酸代謝において重要な役割を果たす(Kumar S., Bioinformatics, 2011, 7:360-365)。CYP4V2はほぼ全ての組織で発現するが、網膜および網膜色素上皮では高レベルで発現し、角膜、組織ではやや低レベルで発現する一方、CYP4V2遺伝子の変異はBCDを引き起こす可能性がある(Lira, Am J Hum Genet. 74:817-826, 2004)。

30

40

【0089】

本願では、用語「RdCVF」はまた杆体細胞性錐体細胞成長因子(Rod derived cone survival factor)と呼ばれ、通常、チオール酸化還元酵素活性がない切断型チオレドキシンを指す。RdCVFは、レチノイド1(nucleoredoxin-like 1, Nxn1)遺伝子のスプライス変異体であり、この遺伝子の追加スプライス産物は、RdCVFLであり、RdCVFLは、その結合リガンドである微小管関連タンパク質TAUを酸化および凝集から保護する、活性チオレドキシソである(Elachourira, 2015およびFridlichら, 2009)。Nxn1遺伝子欠損マウスは年齢依存性の桿体視細胞と錐体視細胞の機能喪失と錐体視細胞

50

の退行性変化を示すことができ、また桿体視細胞と錐体視細胞の酸化ストレスに対する過敏反応 (Croninら、2010) Nxn11の発現は桿体視細胞依存性であることができ、網膜色素変性 (RP) における桿体視細胞死後に有意に減少する (Delyferら、2011; Reichmanら、2010)。RdCVFは、いくつかの異なる遺伝子型 (Bymeら、2015; Le'veillardら、2004; Yangら、2009) の網膜色素変性 (RP) モデルにおいて錐体細胞機能を保護することができる。RdCVF分子は、光受容細胞によるグルコースの吸収を促進し、光受容細胞の生存を維持するシグナルペプチドとして細胞外に分泌される。1遺伝子はヒト、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、ラット、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、カエルで保存されている。ヒトではNxn11はTxn16とも呼ばれ、Nxn11は19 p13.1 1に位置し、2つのエクソンを含む。Nxn11は、水晶体、網膜、胃、腎臓、心臓、結腸、および脾臓などのヒト組織で普遍的に発現し、水晶体および網膜では比較的高いレベルで発現する。

【0090】

本願では、「プロモーター」という用語は、通常、特定の遺伝子を転写させるデオキシリボ核酸 (DNA) の配列を指す。プロモーターはRNAポリメラーゼによって認識され、RNAの転写合成を開始する。リボ核酸 (RNA) 合成においては、プロモーターは遺伝子転写を制御する転写因子と相互作用を起こし、遺伝子発現 (転写) の開始時期と発現の程度を制御する。プロモーターはコアプロモーター領域とコントロール領域を含み、遺伝子発現をコントロールするコントロール配列の中、遺伝子転写開始部位の上流 (DNAアンチセンス鎖の5'方向) に位置し、それ自身はコンパイル機能がない。その作用方式と機能によって三種類に分けられる：構成的プロモーター (ほとんどまたは全ての組織で持続的な活動を維持する)、特異的プロモーター (組織特異性または発生期特異性) と誘導性プロモーター (外界の化学的あるいは物理的な信号によって制御されている)。

【0091】

本願では、「作動可能に連結された」という用語は、一般に、符号化配列の表現を可能にするために、符号化配列の表現に必要な制御配列を、符号化配列に対して適切な位置に配置することを指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列との機能関係にあるとき、第1の核酸配列は第2の核酸配列に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、発現ベクター中のコード化配列および転写制御要素の配列を表すことができる。前記制御デバイスはプロモーター、増強子と終止デバイスを含む。Nxn11遺伝子はヒト、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、ラット、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、カエルで保存されている。いくつかの実施形態では、「作動可能に連結された」という用語は、さらに、ベクター内の転写および翻訳制御配列が目的遺伝子の転写および翻訳を調節する期待される機能を発揮するように、目的遺伝子がベクター内に連結されていることを指す場合がある。

【0092】

本願では、用語「自己切断ペプチド」は、2Aペプチド (2A self-cleaving peptides) と呼ばれ、通常18~22個アミノ酸残基のペプチド断片であり、細胞内に2Aペプチドを含む組換え蛋白の自己スプライシングを誘導できる。2Aペプチドは通常、ウイルスゲノムの2A領域に由来する。遺伝子操作において、2Aペプチドは一つのオープンリーディングフレーム (ORF) から翻訳したペプチド鎖をいくつかの独立したペプチド鎖に分けることができる。いくつかの実施形態では、2つのタンパク質を別々に発現させる必要がある場合 (例えば、1つのタンパク質が核に入り、もう1つのタンパク質が細胞質に発現する必要がある)、ベクター上に1つのオープンリーディングフレームのみを構築したい場合、それらのコード領域に1段の2Aペプチド配列を挿入することによって実現することができる。いくつかの実施形態では、2つの蛋白融合後の融合蛋白が機能しなければ、2つの蛋白のコード領域の中間に1段の2Aペプチドをコードする配列を挿入することができ、または結合ペプチドを2Aペプチドに取り替え、翻訳完成後の2つの蛋白を分離させ、独立に折り畳み、これによって2つの蛋白の機能を

10

20

30

40

50

回復させる可能性を提供する。2AペプチドはP2A、E2A、F2A、T2Aを含むことができ、それらはすべて起源のウイルスに命名される。その中のP2AはPorcine teschovirusの2Aペプチドから由来する。

【0093】

本願では、用語「ポリアデニレーションシグナル配列」は、ポリアデニレーションシグナルテール、Poly Aテールとも呼ばれ、通常、転写されたmRNAの3'端に数十から数百の単一アデニル酸鎖を加えたものを指す。ポリアデニル化は通常、核内でデオキシリボ核酸(DNA)がリボ核酸(RNA)に転写される過程と、その反応がポリアデニル酸ポリメラーゼによって完了する過程で起こる。真核生物の中で、ポリアデニル化は1種の機序で、mRNA分子をその3'端で中断させることができ、ポリアデニル酸配列はmRNAを核酸エキソヌクレアーゼの攻撃から保護することができ、しかもmRNAの細胞核の輸出、翻訳と安定性に対するすべて非常に重要である。

【0094】

本願では、用語「ポリアデニレーションシグナル部位」は通常、メッセンジャーRNA(mRNA)の3'端に位置するポリアデニル化関連切断因子に識別される塩基配列を指す。通常はmRNA上の順行性調節シグナルでもある。一般的に、尾を付ける過程(ポリアデニル化)は転写終了後から始まり、ポリアデニル化関連切断因子はポリアデニレーションシグナル部位のコントロール下で、mRNAの3'UTRの後に数十から数百個の単一アデニル酸を加える。一般的なテール信号には、SV40、BGH、HSV、TK信号などがある。前記ポリアデニル化関連分解因子は分解/ポリアデニル酸特異性因子(CPSF)、分解刺激因子(CstF)、分解因子I(CFI)、分解因子II(CFII)を含む。ポリアデニレーションシグナル部位は、典型的にはAAUAAA配列を含むことができるが、真核生物群間で異なる。例えば、ほとんどのヒトのポリアデニレーションシグナル部位はAAUAAA配列を含むが、この配列は植物や真菌では稀である。

【0095】

本願では、「イントロン」という用語は、RNA転写物から、配列(エクソン)の両端のいずれかの端をつなぎ合わせることによって取り除かれたDNA断片を含むことができる。イントロンは通常、遺伝子のタンパクコード領域内の干渉配列と考えられ、通常は遺伝子が産生するタンパクによって表される情報を含まない。

【0096】

本願では、「ベクター」という用語は、通常、タンパク質をコードするポリヌクレオチドが挿入され、その中でタンパク質が発現し得る核酸送達ビヒクルを指す。ベクターは形質転換、形質転換または宿主細胞へのトランスフェクションにより、宿主細胞内で遺伝子を発現させる。例えばベクターには次のようなものがある：プラスミド；バクテリオファージ；コスプラスミド；酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、P1由来の人工染色体(PAC)などの人工染色体；ファージはファージやM13ファージ、ウイルスベクターなどである。1種のベクターは多種の発現を制御する要素を含み、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択要素及びレポーター遺伝子を含む。また、ベクターは複製開始部位を含み得る。また、ベクターは、ウイルス粒子、リボソーム、タンパク質シェルなど、細胞への侵入を補助する成分を含み得るが、これらの物質だけに限定されるものではない。

【0097】

本願では、「ウイルスベクター」という用語は、一般に、遺伝子送達ベクターとして機能し、ウイルスカプシド内にパッケージングされた組換えウイルスゲノムを含む非野生型組換えウイルス粒子を指す。ベクターとして用いられる動物ウイルスの種類は逆転写酵素ウイルス(スローウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルス(例えば単純ヘルペスウイルス)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、乳頭腫ウイルス、乳頭腫空胞ウイルス(例えばSV40)を含むことができる。

【0098】

本願では、「AAVベクター」という用語は、アデノ随伴ウイルスベクターとも呼ばれ、

通常はアデノウイルス自体またはその誘導体を指す。アデノ随伴ウイルス (adenovirus, AAV) は通常微小ウイルス科に属する一本鎖 DNA ウイルスである。AAV ゲノムは DNA 鎖の両端の逆末端反復配列 (ITR) と 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF) を含むことができる。オープンリーディングボックスは、rep 及び cap を含むことができる。rep は AAV のライフサイクルに必要な Rep 蛋白質をコードする複数の重複遺伝子からなり、VP1、VP2 および VP3 を含むことができるカプシド蛋白質をコードする重複ヌクレオチド配列を含む。前記カプシド蛋白質は相互作用してカプシドを形成する。アシスタントウイルスが欠如している場合、AAV は、潜伏状態からアシスタントウイルス (Kotinら、1990) が救済されるまで、ヒト第 19 染色体の特定の座位 (AAVS 部位) にそのゲノムを統合することができる。一般に AAV は不整合の形が主体と考えられている。AAV の部位特異性の整合能力、その自然欠陥及びその免疫原性が低いため、理想的な遺伝子治療ベクターになる。AAV には多くの一般的な血清型があり、100 種類以上のウイルスの変種がある。本願では、AAV カプラ、ITR および他の選択された AAV コンポーネントは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV8bp、AAV7M8 および AAVAnc80、既知または言及されている AAV の任意の変種、または発見されていない AAV またはその変種または混合物を含むがこれらに限定されない任意の AAV から選択される。

10

【0099】

本願では、用語「細胞」は、通常、核酸分子またはベクターの受容体であるか、あるいはすでにある単一の細胞、細胞株、または細胞培養である。細胞は、本願に記載の核酸分子または本発明に記載のベクターを含むことができる。細胞は単一細胞の子孫を含み得る。自然突然変異、偶発突然変異、または意図的突然変異のために、子孫が必ずしも始原母細胞と同一でなくてもよい (全 DNA 相互補体の形態学的またはゲノムの)。細胞は、本願に記載のベクターを用いて *in vitro* でトランスフェクトされた細胞を含み得る。細胞は細菌細胞 (例えば、大腸菌)、酵母細胞あるいは他の真核細胞、例えば COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa 細胞、HEK293 細胞、COS-1 細胞、NS0 細胞あるいは骨髄腫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は HEK293T 細胞である。

20

【0100】

本願では、「医薬組成物」という用語は、通常、人のような患者に投与するのに適した組成物に関する。例えば、本願に記載された医薬組成物は、本願に記載された核酸分子、本願に記載されたベクターおよび/または本願に記載された細胞、および任意に選択された薬学的に許容されるアジュバントを含むことができる。そのほか、前記医薬組成物はまた 1 種または多種 (薬学的に有効な) のベクター、安定剤、賦形剤、希釈剤、可溶化剤、界面活性剤、乳化剤および/または防腐剤の適当な製剤を含むことができる。組成物の受容可能な成分は使用量と濃度でレシピエントに無毒である。本発明の医薬組成物は液体、冷凍と凍結乾燥組成物を含むがこれに限定されない。

30

【0101】

本願では、「予防」という用語は、一般に、ある疾患又は状態の発生を予防するために、健康な被験者に対して予防的に投与される組合せを意味する。それは、さらに、治療対象のアレルギー疾患の前段階にある患者への予防的投与の組み合わせを含むことができる。「予防」は、疾病又は障害の発生の可能性を 100% 排除する必要はなく、言い換えれば、「予防」は、通常、前記投与の組み合わせの存在下で疾病又は障害の発生の可能性が低下することを意味する。

40

【0102】

本願では、「緩解する」という用語は、特定の病状、疾患、状態、または表現型の減少、縮小、または遅滞を意味する。前記病状、疾病、病状または表現型は被験者が主観的に感じる例えば疼痛、眩暈またはその他の生理性障害、または医学的に検出できる指標、例えば医学検査手段によって検出される病巣状況を含むことができる。

50

【0103】

本願では、「治療」という用語は、臨床病理学的過程において、処置された個人または細胞の自然経過を変化させるために用いられる臨床的介入を一般的に指す。病状の改善、病変の消失、または予後の改善が含まれることがある。

【0104】

本願では、「網膜色素上皮(RPE)」という用語は、通常、網膜感覚神経の外側に付着している色素細胞の層を指す。網膜色素上皮は単層の六角形細胞からなり、内部には色素顆粒が密集している。網膜色素上皮(RPE)はその下の脈絡膜とその上の網膜神経細胞と緊密に連結し、その主要な機能は以下を含む：網膜下隙間の液体と栄養を制御し、血液-網膜関門の機能を果たす。合成成長因子による局所構造の調整；光を吸収し、電気バランスを調整する；視物質の再生と合成；光受容器の外節の貪食と消化；網膜の付着を維持する；損傷後の再生と修復。RPEは光受容体機能を維持する重要な組織であり、同時に脈絡膜と網膜の多くの病変に影響される。

10

【0105】

本願では、「網膜色素上皮(RPE)萎縮」という用語は通常、細胞死または機能不全を示す網膜色素上皮(RPE)の変性変化を指す。加齢黄斑変性または網膜色素変性(RP)は、しばしば網膜色素上皮の萎縮を伴う。網膜色素変性(Retinitis Pigmentosa, RP)は網膜色素病変とも呼ばれ、通常遺伝性眼科疾患を指す。遺伝形式は常染色体劣性、優性、X連鎖の3つであり、二遺伝子型およびミトコンドリア型も存在する。初期によくみられる徴候は、夜盲症、視野の狭小化、正面の景色が見え、左右にわずかに偏位した視野が見えなくなることなどである。RPには、単眼性の原発性網膜色素変性、象限性の原発性網膜色素変性、中心性または傍中心性の原発性網膜色素変性、無色素性網膜色素変性による白色点状網膜変性、結晶性網膜変性、静脈内の肥厚性網膜色素変性、細動脈の傍色素上皮の保持性網膜色素変性、Leber先天性黒内障およびその他の症候群における網膜色素変性などがある。

20

【0106】

本願では、「結晶性網膜変性」という用語は、通常、1937年にイタリアの眼科医GB Bietti博士によって最初に記述された常染色体劣性眼疾患を指す。主な症状には、角膜内の結晶(透明カパー)、網膜の感光性組織内に沈着した小さく黄色または白色の結晶性の沈着、網膜、脈絡膜毛細血管、および脈絡膜の進行性萎縮などがある。結晶性網膜変性には、CYP4V2遺伝子の突然変異に起因する疾患が含まれることがある。

30

【0107】

本願では、「含む」又は「含む」という用語は、一般に、他の要素を除外することなく、明確に特定された特徴を含むことを意味する。

【0108】

本願では、「約」という用語は、通常、指定値以上0.5%~10%の範囲での変動を意味し、例えば、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、または10%の範囲での変動を指す。

【0109】

一方、本願はCYP4V2およびRdCVFの医薬の製造における使用を提供し、前記医薬は網膜色素上皮(RPE)萎縮に関連する疾患または状態の治療、緩和および/または予防に用いる。

40

【0110】

本願では、前記医薬は、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドおよび前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。例えば、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドおよび前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドは異なるベクターに位置する。例えば、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドおよび前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドは同一のベクターに位置する。

【0111】

50

一方、本願はまた網膜色素上皮（R P E）萎縮に関連する疾患または状態の治療、緩和および/または予防のためのベクターの組み合わせを提供し、それは第1ベクターと第2ベクターを含み、前記第1ベクターはC Y P 4 V 2をコードするポリヌクレオチドを含むことができ、前記第2ベクターはR d C V Fをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0112】

一方、本願は、C Y P 4 V 2をコードするポリヌクレオチドおよびR d C V Fをコードするポリヌクレオチドを含むことができる単離された核酸分子を提供する。

【0113】

一方、本願は、さらに、本願に記載された核酸分子または本願に記載されたベクターの組み合わせを含むことができる細胞を提供する。

10

【0114】

本願はまた医薬組成物を提供し、それは本願に記載する前記核酸分子、本願に記載するベクターの組み合わせおよび/または本願に記載する細胞を含むことができる。

【0115】

一方、本願はまた本願記載の核酸分子、本願記載のベクターの組み合わせ、本願記載の細胞および/または本願記載の医薬組成物の医薬の製造における使用を提供し、前記医薬は網膜色素上皮（R P E）萎縮に関連する疾患または状態の予防、緩和および/または治療に用いることができる。

【0116】

20

C Y P 4 V 2

本願では、C Y P 4 V 2は、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ニワトリ、ショウジョウバエ、線虫またはカエルのC Y P 4 V 2またはその機能的変異体を含むが、これらに限定されなく、機能障害を有するタンパク質、または結晶性網膜変性を引き起こす遺伝子変異をコードするタンパク質を含むことができる。

【0117】

例えば、C Y P 4 V 2は、ヒトC Y P 4 V 2を含むことができる。

【0118】

例えば、C Y P 4 V 2は、S E Q I D N O : 7 6 ~ 8 2のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むことができる。

30

【0119】

例えば、前記C Y P 4 V 2は、S E Q I D N O : 7 6で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0120】

例えば、前記C Y P 4 V 2はS E Q I D N O : 7 6 ~ 8 2で示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列、例えば少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性を有する任意のアミノ酸配列を含むことができ、かつ前記アミノ酸配列と本願の前記R d C V Fとの併用投与は網膜色素上皮（R P E）萎縮に関連する疾患または状態を改善することができる。

【0121】

40

本願では、C Y P 4 V 2をコードするポリヌクレオチドは、S E Q I D N O : 6 2 ~ 6 8のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

【0122】

例えば、C Y P 4 V 2をコードするポリヌクレオチドは、S E Q I D N O : 6 2で示される核酸配列を含むことができる。

【0123】

例えば、前記C Y P 4 V 2をコードするポリヌクレオチドはS E Q I D N O : 6 2 ~ 6 8に示す核酸配列と少なくとも90%の同一性のアミノ酸配列、例えば少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性の任意のポリヌクレオチド配列を含むことができ、かつ前記ヌクレオチド配列がコードす

50

るポリペプチドは本願の前記 R d C V F と併用して網膜色素上皮 (R P E) 萎縮と関係する疾患または状態を改善することができる。

【 0 1 2 4 】

R d C V F

本願では、前記 R d C V F は、杆体細胞から生成され、錐体細胞に有利なタンパク質を含むことができる。前記 R d C V F は人間、チンパンジー、ゴリラ、アカゲザル、犬、牛、ラット、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュとカエルの R d C V F またはその機能性変異体を含むが、それに限定されない。

【 0 1 2 5 】

例えば、R d C V F は、ヒト R d C V F を含むことができる。

10

【 0 1 2 6 】

例えば、R d C V F は、S E Q I D N O : 8 3 ~ 8 9 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【 0 1 2 7 】

例えば、前記 R d C V F は、S E Q I D N O : 8 3 で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【 0 1 2 8 】

例えば、前記 R d C V F は S E Q I D N O : 8 3 ~ 8 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一性のアミノ酸配列、例えば少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 同一性の任意のアミノ酸配列を含むことができ、かつ前記アミノ酸配列と本願の前記 C Y P 4 V 2 との連合使用は網膜色素上皮 (R P E) 萎縮に関連する疾患または状態を改善することができる。

20

【 0 1 2 9 】

本願では、前記 R d C V F をコードするポリヌクレオチドは、S E Q I D N O : 6 9 ~ 7 5 のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

【 0 1 3 0 】

例えば、R d C V F をコードするポリヌクレオチドは、S E Q I D N O : 6 9 で示される核酸配列を含むことができる。

【 0 1 3 1 】

例えば、前記 R d C V F をコードするポリヌクレオチドは S E Q I D N O : 6 9 ~ 7 5 に示す核酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性のアミノ酸配列、例えば少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % の同一性の任意のポリヌクレオチド配列を含むことができ、かつ前記ヌクレオチド配列がコードするポリペプチドと本願の前記 C Y P 4 V 2 との連合使用は網膜色素上皮 (R P E) 萎縮と関係する疾患または状態を改善することができる。

30

【 0 1 3 2 】

プロモーター

本願では、前記プロモーターは R P E 細胞特異的プロモーター、網膜細胞特異的プロモーター、角膜細胞特異的プロモーター、眼細胞特異的プロモーターまたは構成的プロモーターを含むことができる。前記プロモーターはまた哺乳動物 アクチンプロモーターまたはウイルスプロモーターを含むことができる。前記プロモーターはまた C A G プロモーター (C A G G S プロモーター、C B プロモーターまたは C B A プロモーターとしても知られるヘテロ接合 C M V 早期エンハンサー / ニワトリ アクチンプロモーター) 、人 アクチンプロモーター、小 C B A (s m C B A) プロモーター、C B S プロモーター或は C B h プロモーター、延伸因子 1 短 (E F S) プロモーター、延伸因子 1 (E F - 1) プロモーター、C M V プロモーター、P G K プロモーター、U B C プロモーター、G U S B プロモーター、U C O E プロモーター、V M D 2 (B E S T 1 と呼ばれる。) プロモーター、O P E F S プロモーター、C Y P 4 V 2 自身プロモーター、R P E 6 5 プロモーター或はそのヘテロ体或は誘導体を含むことができる。

40

【 0 1 3 3 】

50

例えば、前記プロモーターはCYP4V2自身プロモーターを含むことができ、前記CYP4V2自身プロモーターは前記コードCYP4V2のポリヌクレオチド上流の2000bpヌクレオチド配列の全部または一部を含むことができる。

【0134】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 1~12のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0135】

例えば、前記CYP4V2自己プロモーターは、CYP4V2-Pfプロモーター、CYP4V2-P1プロモーター、CYP4V2-P2プロモーター、CYP4V2-P3プロモーター、CYP4V2-P4プロモーター、CYP4V2-P5プロモーター、CYP4V2-P6プロモーターを含んでもよい。前記CYP4V2-PfプロモーターはSEQ ID NO: 6で示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2プロモーターはCYP4V2-Pf: 7で示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2-P1プロモーターはCYP4V2-P2: 8で示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2-P3プロモーターはCYP4V2-P4: 9で示される核酸配列を含むことができ、CYP4V2-P5プロモーターはCYP4V2-P6: 10で示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2-P5プロモーターはSEQ ID NO: 11で示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2-P1プロモーターはSEQ ID NO: 12で示される核酸配列を含むことができる。

【0136】

例えば、前記プロモーターはOPEFSであってもよく、SEQ ID NO: 1で示される核酸配列を含む。

【0137】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 2で示される核酸配列を含むEFSであってもよい。

【0138】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 3で示される核酸配列を含むEF1aであってもよい。

【0139】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 4で示される核酸配列を含むCAGであってもよい。

【0140】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 5で示される核酸配列を含むRPE65であってもよい。

【0141】

ポリアデニレーションシグナル部位

本願では、前記ポリアデニレーションシグナル部位はSV40シグナル部位、BGHシグナル部位、WPREシグナル部位、WPRE-SV40シグナル部位、WPRE-BGHシグナル部位或はその誘導体を含む。

【0142】

例えば、前記ポリアデニレーションシグナル部位はポリアデニル化相関分解因子に識別されて、SV40ポリアデニル酸配列、BGH信号ポリアデニル酸配列、HSV信号ポリアデニル酸配列、TK信号ポリアデニル酸配列、WPRE信号ポリアデニル酸配列などを産生する。

【0143】

例えば、ポリアデニレーションシグナル部位は、AAUAAAの配列を含むことができる。

【0144】

例えば、ポリアデニレーションシグナル部位は、SEQ ID NO: 17~21によって示される核酸配列を含むことができる。

【0145】

10

20

30

40

50

自己切断ペプチド

本願では、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドと前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドとの間に位置する。

【0146】

例えば、自己切断ペプチドは、T2A、P2A、E2A、またはF2Aを含むことができる。

【0147】

例えば、自己切断ペプチドは、P2Aを含むことができる。

【0148】

例えば、自己切断ペプチドは、SEQ ID NO: 26 ~ 29のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0149】

例えば、自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 22 ~ 25のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

【0150】

例えば、スプライシングペプチドのN末端は、GSG (Gly - Ser - Gly、グリシン、セリン、グリシン) 配列に連結されていてもよい。

【0151】

イントロン

本願では、前記イントロンは目的遺伝子の5'端または目的遺伝子のヌクレオチド配列に位置することができる。前記目的遺伝子はCYP4V2をコードするポリヌクレオチドまたはRdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。前記イントロンは前記目的遺伝子の発現を増強できる。例えば、イントロンは、ヒト - globinイントロン、SV40イントロン、ヘテロ合成CBA/MVMイントロン、または他の人工的に合成されたイントロンを含むことができる。

【0152】

例えば、前記イントロンは、SEQ ID NO: 13 ~ 16のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。

【0153】

単離された核酸分子

本願では、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順にCYP4V2をコードするポリヌクレオチド、RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0154】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順に前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62 ~ 68のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69 ~ 75のいずれかに示す核酸配列を含むことができる。

【0155】

本願では、前記分離された核酸分子は5'端から3'端まで順に前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0156】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順に前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69 ~ 75のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62 ~ 68のいずれかに示す核酸配列を含むことができる。

【0157】

10

20

30

40

50

本願では、前記分離された核酸分子はまた前記プロモーターを含むことができる。

【0158】

例えば、前記プロモーターは前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置し、かつ前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結される。

【0159】

例えば、前記プロモーターは前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置し、かつ前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結される。

【0160】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順に前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

10

【0161】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順に前記プロモーター、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0162】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 1~12のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 69~75のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 62~68のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

20

【0163】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順に前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記プロモーター、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0164】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順に前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記プロモーター、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0165】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 1~12のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 62~68のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 69~75のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

30

【0166】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順に前記プロモーター、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0167】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 1~12のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 69~75のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 62~68のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

40

【0168】

本願では、前記分離された核酸分子はまた前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0169】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順にプロモーター、CYP4V2

50

をコードするポリヌクレオチド、自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、R d C V Fをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0170】

例えば、前記プロモーターはSEQ ID NO: 1~12のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62~68のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 22~25のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記R d C V FをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69~75のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

【0171】

例えば、前記単離された核酸分子は5'端から3'端まで順にプロモーター、R d C V Fをコードするポリヌクレオチド、自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、CYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0172】

例えば、前記プロモーターはSEQ ID NO: 1~12のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記R d C V FをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69~75のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 22~25のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62~68のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

【0173】

例えば、分離された核酸分子は、SEQ ID NO: 101~105のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

【0174】

本願では、前記分離する核酸分子はまた前記ポリアデニレーションシグナル部位を含むことができ、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記コードCYP4V2のポリヌクレオチドの3'端に位置する。

【0175】

本願では、前記分離する核酸分子はまたポリアデニレーションシグナル部位を含むことができ、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記コードR d C V Fのポリヌクレオチドの3'端に位置する。

【0176】

例えば、前記単離された核酸分子は5'から3'方向から順に前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記R d C V Fをコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位を含むことができる。

【0177】

例えば、前記プロモーターはSEQ ID NO: 1~12のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記R d C V FをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69~75のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 22~25のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62~68のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記ポリアデニレーションシグナル部位はSEQ ID NO: 17~21のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0178】

本願では、前記分離する核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記R d C V Fをコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0179】

例えば、前記プロモーターはSEQ ID NO: 1~12のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69~75のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 22~25のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62~68のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記ポリアデニレーションシグナル部位はSEQ ID NO: 17~21のいずれかに示すヌクレオチド配列を含むことができる。

【0180】

例えば、分離された核酸分子は、SEQ ID NO: 106~108のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

10

【0181】

本願では、前記分離された核酸分子はまた前記イントロンを含むことができる。

【0182】

例えば、前記イントロンは、SEQ ID NO: 13~16のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0183】

例えば、前記イントロンは前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドに位置する、或は、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

20

【0184】

例えば、前記単離された核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記イントロン、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0185】

例えば、前記単離された核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記イントロンが挿入された前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

30

【0186】

例えば、前記プロモーターはSEQ ID NO: 1~12のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記イントロンはSEQ ID NO: 13~16のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62~68のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 22~25のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69~75のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

【0187】

例えば、前記分離する核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記イントロン、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位を含む。

40

【0188】

例えば、前記分離する核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記イントロンを挿入する前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位を含むことができる。

【0189】

例えば、前記プロモーターはSEQ ID NO: 1~12のいずれかに示す核酸配列を含

50

むことができ、前記イントロンはSEQ ID NO: 13 ~ 16のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62 ~ 68のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 22 ~ 25のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69 ~ 75のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記ポリアデニレーションシグナル部位はSEQ ID NO: 17 ~ 21のいずれかに示すヌクレオチド配列を含むことができる。

【0190】

例えば、前記CYP4V2をコードする前記イントロンが挿入されたポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 116に記載の核酸配列を含むことができる。

10

【0191】

例えば、前記イントロンは前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドに位置する、或は、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

【0192】

例えば、前記単離された核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記イントロン、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0193】

例えば、前記単離された核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記イントロンが挿入された前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

20

【0194】

例えば、前記プロモーターは、SEQ ID NO: 1 ~ 12のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記イントロンは、SEQ ID NO: 13 ~ 16のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 69 ~ 75のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 22 ~ 25のいずれかに示される核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 62 ~ 68のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

30

【0195】

例えば、前記分離する核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記イントロン、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位を含む。

【0196】

例えば、前記分離する核酸分子は5'から3'方向に順に前記プロモーター、前記イントロンを挿入する前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位を含むことができる。

40

【0197】

例えば、前記プロモーターはSEQ ID NO: 1 ~ 12のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記イントロンはSEQ ID NO: 13 ~ 16のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69 ~ 75のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 22 ~ 25のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62 ~ 68のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記ポリアデニレーションシグナ

50

ル部位はSEQ ID NO: 17 ~ 21のいずれかに示すヌクレオチド配列を含むことができる。

【0198】

例えば、前記単離された核酸分子はSEQ ID NO: 109 ~ 115のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0199】

ベクター

本願では、前記ベクターはプラスミド、ファージ、コスプラスミド、人工染色体例えば酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)またはP1由来の人工染色体(PAC)、ファージ例えばファージまたはM13ファージおよびウイルスベクターを含むことができる。

10

【0200】

例えば、前記ウイルスベクターは逆転写酵素ウイルス(スローウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAVベクター)、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルスのように)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、ヒトパピローマウイルス(例えばSV40)を含むことができる。

【0201】

例えば、前記アデノ随伴ウイルスベクター(AAVベクター)遺伝子は逆末端反復配列(ITR)、オープンリーディングフレーム(ORF)を含むことができ、前記オープンリーディングフレームはRep蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含むことができ、またカプシドをコードするポリヌクレオチドを含むこともできる。

20

【0202】

例えば、アデノ随伴ウイルスベクター(AAVベクター)は、組換えアデノ随伴ウイルスベクター(rAAVベクター)を含むこともできる。

【0203】

例えば、組換えアデノ随伴ウイルスベクター中のカプシド、ITRおよび他の選択されたAAVコンポーネントは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV8bp、AAV7M8およびAAVAnc80、DJ、DJ/8、Rh10を含むがこれらに限定されない任意のAAVから選択されてもよい。

30

【0204】

例えば、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV8bp、AAV7M8、AAVAnc80、DJ、DJ/8、Rh10のいずれであってもよい。

【0205】

例えば、AAVベクターは眼組織親和性AAVベクターであり、例えば、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV8、DJ/8又は任意のrAAVベクターである。

【0206】

例えば、AAVベクターは、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/8、またはAAV2/9とすることができる。

40

【0207】

例えば、ウイルスベクターは、pAAV-RC5-Amp、RC8-cap、AAV2/8、AAV-helper-Amp、AAV-helperを含むことができる。

【0208】

例えば、前記ウイルスベクターはSEQ ID NO: 133 ~ 137のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0209】

例えば、前記ベクターは、SEQ ID NO: 90 ~ 115のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むこともできる。

【0210】

50

例えば、前記ベクターは、SEQ ID NO: 117 ~ 121のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むこともできる。

【0211】

例えば、ベクターは、SEQ ID NO: 122 ~ 132のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0212】

本願では、前記ベクターは、本願に記載の単離された核酸分子を含むことができる。

【0213】

例えば、ベクターは、SEQ ID NO: 101 ~ 115のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0214】

本願では、前記ベクターは、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドまたは前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0215】

例えば、前記ベクターは、さらに、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置し、かつ前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含むことができる。

【0216】

例えば、前記ベクターは、さらに、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置し、かつ前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含むことができる。

【0217】

例えば、前記ベクターはまたポリアデニレーションシグナル部位を含む、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記コードCYP4V2のポリヌクレオチドの3'端に位置する。

【0218】

例えば、前記ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位。

【0219】

例えば、前記ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：SEQ ID NO: 1 ~ 12のいずれかに示すプロモーター配列、SEQ ID NO: 62 ~ 68のいずれかに示すCYP4V2をコードするポリヌクレオチド配列、SEQ ID NO: 17 ~ 21のいずれかに示すポリアデニレーションシグナル部位配列。

【0220】

例えば、前記ベクターはSEQ ID NO: 90 ~ 92のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0221】

例えば、前記ベクターはまたポリアデニレーションシグナル部位を含む、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記コードRdCVFのポリヌクレオチドの3'端に位置する。

【0222】

例えば、前記ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：前記プロモーター、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位。

【0223】

例えば、前記ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：SEQ ID NO: 1 ~ 12の任意の項目に示すようなプロモーター配列、SEQ ID NO: 69 ~ 75の任意の項目に示すようなRdCVFをコードするポリヌクレオチド配列、SEQ ID NO: 17 ~ 21の任意の項目に示すようなポリアデニレーションシグナル部位配列。

【0224】

10

20

30

40

50

例えば、ベクターは、SEQ ID NO: 96 ~ 98のいずれかに示される核酸配列を含むことができる。

【0225】

例えば、前記ベクターはまたイントロンを含むことができる。

【0226】

例えば、前記イントロンは前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドに位置し、または、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

【0227】

例えば、前記イントロンは前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドに位置し、または、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

10

【0228】

例えば、前記ベクターは5' ~ 3'方向で順に以下を含むことができる：前記プロモーター、前記イントロン、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドまたは前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド。

【0229】

例えば、前記ベクターは5'乃至3'方向で順に以下を含むことができる：前記プロモーター、前記イントロンを挿入する前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドまたは前記イントロンを挿入する前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド。

【0230】

例えば、前記ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：前記プロモーター、前記イントロン、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドまたは前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位。

20

【0231】

例えば、前記ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：前記プロモーター、前記イントロンを挿入する前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドまたは前記イントロンを挿入する前記RdCVFをコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位。

【0232】

例えば、前記プロモーターはSEQ ID NO: 1 ~ 12のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記イントロンはSEQ ID NO: 13 ~ 16のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 62 ~ 68のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 69 ~ 75のいずれかに示す核酸配列を含むことができ、前記ポリアデニレーションシグナル部位はSEQ ID NO: 17 ~ 21のいずれかに示すヌクレオチド配列を含むことができる。

30

【0233】

例えば、前記CYP4V2をコードする前記イントロンが挿入されたポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 116に記載の核酸配列を含むことができる。

【0234】

例えば、前記ベクターはSEQ ID NO: 93 ~ 95および99 ~ 100のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

40

【0235】

ベクターの組合せ

本願はまた網膜色素上皮(RPE)萎縮に関連する疾患または状態の治療、緩和および/または予防のためのベクターの組み合わせを提供し、それは第1ベクターと第2ベクターを含み、前記第1ベクターはCYP4V2をコードするポリヌクレオチドを含むことができ、前記第2ベクターはRdCVFをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【0236】

例えば、前記第1ベクターは、CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置し、かつ前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結されたプロモ

50

ーターをさらに含むことができる。

【0237】

例えば、前記第1ベクターは、5'～3'方向に、SEQ ID NO: 1～12のいずれかに示すようなプロモーター配列、SEQ ID NO: 62～68のいずれかに示すようなCYP4V2をコードするポリヌクレオチド配列を、順次含んでもよい。

【0238】

例えば、第1のベクターは、SEQ ID NO: 117で示されるポリヌクレオチド配列を含むことができる。

【0239】

例えば、前記第2ベクターは、RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置し、かつRdCVFをコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結されたプロモーターをさらに含むことができる。

10

【0240】

例えば、前記第2のベクターは、SEQ ID NO: 120で示されるポリヌクレオチド配列を含むことができる。

【0241】

例えば、前記第1ベクターは、5'～3'方向に、順に、SEQ ID NO: 1～12のいずれかに示されるプロモーター配列、SEQ ID NO: 69～75のいずれかに示されるRdCVFをコードするポリヌクレオチド配列を含むことができる。

【0242】

例えば、前記第一ベクターはまたポリアデニレーションシグナル部位を含む、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記コードCYP4V2のポリヌクレオチドの3'端に位置する。

20

【0243】

例えば、前記第2ベクターはまたポリアデニレーションシグナル部位を含む、前記ポリアデニレーションシグナル部位は前記コードRdCVFのポリヌクレオチドの3'端に位置する。

【0244】

例えば、前記第1ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：前記プロモーター、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位；および/または、前記第2ベクターは5'～3'方向で順に以下を含む：前記プロモーター、前記エンコードRdCVFのポリヌクレオチド、前記ポリアデニレーションシグナル部位。

30

【0245】

例えば、前記第1ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：SEQ ID NO: 1～12の任意の項目に示すようなプロモーター配列、SEQ ID NO: 62～68の任意の項目に示すようなCYP4V2をコードするポリヌクレオチド配列、SEQ ID NO: 17～21の任意の項目に示すようなポリアデニレーションシグナル部位配列。

【0246】

例えば、前記第1のベクターは、SEQ ID NO: 90～92のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

40

【0247】

例えば、前記第2ベクターは5'から3'方向で順に以下を含むことができる：SEQ ID NO: 1～12の任意の項目に示すプロモーター配列、SEQ ID NO: 69～75の任意の項目に示すRdCVFをコードするポリヌクレオチド配列、SEQ ID NO: 17～21の任意の項目に示すポリアデニレーションシグナル部位配列。

【0248】

例えば、前記第2のベクターは、SEQ ID NO: 96～98のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

50

【0249】

例えば、前記第1ベクターおよび/または前記第2ベクターはまたイントロンを含むことができる。

【0250】

例えば、前記イントロンは前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドに位置し、または、前記CYP4V2をコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

【0251】

例えば、前記イントロンは前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドに位置し、または、前記RdCVFをコードするポリヌクレオチドの5'端に位置する。

【0252】

例えば、前記第1のベクターは、SEQ ID NO: 93~95のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。および/または、前記第2ベクターは、SEQ ID NO: 99~100のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0253】

例えば、第1のベクターは、SEQ ID NO: 118~119のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。および/または、前記第2ベクターはSEQ ID NO: 121のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0254】

細胞

本願は、さらに、本願に記載の核酸分子または本願に記載のベクターの組み合わせを含むことができる細胞を提供する。

【0255】

例えば、前記細胞は前記核酸分子をその中に発現させる細胞である。

【0256】

例えば、前記細胞は単一細胞の子孫を含むことができる。子孫は必ずしも始原母細胞と同一でなくてもよい(全DNA相互補体の形態学的またはゲノムの)。

【0257】

例えば、前記細胞は、本発明に記載のベクターで*in vitro*でトランスフェクトされた細胞をさらに含むことができる。

【0258】

例えば、前記細胞は細菌細胞(例えば、大腸菌)、酵母細胞または他の真核細胞、例えば、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、HEK293細胞、COS-1細胞、NS0細胞または骨髓腫細胞、293T細胞を含むことができる。

【0259】

例えば、前記細胞は結晶性網膜変性患者からの細胞である。

【0260】

例えば、前記細胞は体細胞または幹細胞を含むことができる。

【0261】

例えば、前記細胞は網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、水晶体細胞、神経細胞、RPE細胞、幹細胞を含むことができ、前記幹細胞は誘導性多能性幹細胞(iPSC)、胚性幹細胞(ESC)、間葉系幹細胞(MSC)、成体幹細胞または幹細胞から由来する任意の細胞を含むことができる。

【0262】

例えば、前記網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、水晶体細胞、神経細胞、RPE細胞は前記幹細胞から分化を誘導することができる。

【0263】

例えば、前記細胞はARPE-19細胞、ヒトiPSC誘導RPE細胞を含むことができる。

【0264】

10

20

30

40

50

医薬組成物

本願はまた医薬組成物を提供し、それは本願に記載する前記核酸分子、本願に記載するベクターの組み合わせおよび/または本願に記載する細胞を含むことができる。

【0265】

例えば、前記医薬組成物はまた任意に薬学上受け入れ可能な補助剤を含むことができる。

【0266】

例えば、前記医薬組成物はまた1種または多種(薬学的に有効な)のベクター、安定剤、賦形剤、希釈剤、可溶化剤、界面活性剤、乳化剤および/または防腐剤の適当な製剤を含むことができる。

【0267】

例えば、前記組成物の受容可能成分は使用用量と濃度で受信者に無毒である。

【0268】

例えば、前記医薬組成物は液体、冷凍と凍結乾燥組成物を含むが、それに限定されない。

【0269】

例えば、前記薬学的に受け入れ可能な補助剤は、医薬投与と適合する任意およびすべての溶剤、分散媒体、コーティング、等張剤および吸収遅延剤を含み、通常は安全であり、無毒であり、かつ生物学的にも他の態様でも望ましくない。

【0270】

例えば、前記医薬組成物は胃腸外、経皮、腔内、動脈内、髄腔内と/または眼内投与または直接組織に注射することを含む。

【0271】

例えば、前記医薬組成物は点滴、点滴または注射によって患者または被験者に投与できる。

【0272】

例えば、前記医薬組成物は間断なく(または連続)使用できる。

【0273】

例えば、ノンストップ(または連続)投与は、W02015/036583で説明されているように、患者の体内に流れ込む治療薬を測定するために患者が装着する小さなポンプシステムによって行うことができる。

【0274】

本願では、前記被験者は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことができる。例えば、被験者は、猫、犬、馬、豚、乳牛、羊、ウサギ、マウス、ラットまたはサルを含むことができるが、これらに限定されない。

【0275】

網膜色素上皮(RPE)萎縮に関連する疾患または状態

本願では、前記網膜色素上皮(RPE)萎縮に関連する疾患または状態は加齢黄斑変性または網膜色素変性(RP)を含むことができる。

【0276】

例えば、前記網膜色素変性は単眼性原発性網膜色素変性、象限性原発性網膜色素変性、中心性或いは傍中心性原発性網膜色素変性、無色素性網膜色素変性白点状網膜変性、結晶性網膜変性、静脈脂肪色素性網膜色素変性、小動脈傍色素上皮保留型網膜色素変性、Leber先天性黒内障と他の症候群の網膜色素変性を含む。

【0277】

例えば、前記網膜色素変性は結晶性網膜変性を含むことができる。

【0278】

例えば、結晶性網膜変性は、CYP4V2遺伝子の変異によって引き起こされる疾患を含むことができる。

【0279】

例えば、CYP4V2遺伝子変異には、ミスセンス変異、複製エラー、スプライス部位エラー、フレームシフト、塩基欠損または挿入、ナンセンス変異、多型(例えば、一塩基多型)、早期終了、CYP4V2部分的または全遺伝子欠失、および未同定の結晶性網膜変

10

20

30

40

50

性に関連する CYP4V2 遺伝子変異が含まれるが、これらに限定されない。

【0280】

例えば、CYP4V2 遺伝子変異は、表1に示す変異を含んでもよい。

【0281】

【表A-1】

表1 CYP4V2 遺伝子変異部分型

エクソンまたはイントロンの位置	核酸改変	タンパクの変化を予測する
1	c. 31C>T	p. Q11X
1	c. 64C>G	p. L22V
1	c. 71T>C	p. L24P
1	c. 77G>A	p. G26D
1	c. 130T>A	p. W44R
1	c. 134A>C	p. Q45P
1	c. 181G>A	p. G61S
1	c. 197T>G	p. M66R
IVS1	c. 214+1G>A	エクソン1 除去
IVS1	c. 214+25delT	不明
IVS1	c. 215-2A>G	エクソン2 除去
IVS1	c. 215-1G>A	エクソン2 除去
2	c. 219T>A	p. F73L
2	c. 237G>T	p. E79D
2	c. 253C>T	p. R85C
2	c. 277T>C	p. W93R
2	c. 283G>A	p. G95R
2	c. 327G>A	不明
IVS2	c. 327+1G>A	p. E72Gfs*5
IVS2	c. 327+11G>C	不明
3	c. 332T>C	p. I111T
3	c. 335T>G	p. L112*
3	c. 367A>G	p. M123V

10

20

30

40

50

【表 A - 2】

3	c. 400G>T	p. G134*
3	c. 413+2T>G	せん断受容体
4	c. 518T>G	p. L173W
5	c. 637_641delAGTAA	p. S213*
5	c. 655T>C	p. Y219H
6	c. 677T>A	p. M226K
6	c. 694C>T	p. R232*
6	c. 724delG	p. D242Ifs*35
6	c. 732G>A	p. W244*
6	c. 761A>G	p. H254R
6	c. 772C>T	p. L258F
6	c. 791ddT	削除
7	c. 802-8_806del113	エキソン 7 除去
7	c. 802-8_810del117insGC	エキソン 7 除去
7	c. 810del1T	p. (N271Rfs*34)
7	c. 838G>T	p. E280*
7	c. 958C>T	p. R320*
7	c. 971A>T	p. D324V
7	c. 974C>T	p. T325I
IVS7	c. 985+3A>G	不明
8	c. 992A>C	p. H331P
8	c. 998C>A	p. T333K
8	c. 1020G>A	p. W340*
8	c. 1021T>C	p. S341P
8	c. 1027T>G	p. Y343D
8	c. 1062dupA	p. V355Sfs*4
IVS8	c. 1091-2A>G	エキソン 9 除去
9	c. 1157A>C	p. K386T
9	c. 1168C>T	p. R390C
9	c. 1169G>A	p. R390H

10

20

30

40

50

【表 A - 3】

9	c. 11780T	p. P393L
9	c. 11870T	p. P396L
9	c. 1198C>T	p. R400C
9	c. 11990A	p. R400H
9	c. 1219G>T	p. E407*
9	c. 1225+1G>A	p. (G364_V408del)
10	c. 1226-6_1235del116	エキソン 10 除去
10	c. 1328G>A	p. R443Q
10	c. 13480T	p. Q450*
10	c. 1355G>A	p. R452H
10	c. 1372G>A	p. V458M
10	c. 1393A>G	p. R465G
10	c. 1396A>G	p. N466D
10	c. 1399T>C	p. C467R
10	c. 1441delT	p. (S481Rfs*4)
10	c. 1445C>T	p. S482*
11	c. 1523G>A	p. R508H
11	c. 1526C>T	p. P509L

10

20

30

【0282】

表 1 に示されている CYP4V2 遺伝子変異体は、データベース [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CYP4V2\[gene\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CYP4V2[gene]) から得られる。

【0283】

いかなる理論によっても限定されることを意図するものではなく、以下の実施形態は、本願の発明の範囲を限定するものではなく、本願の核酸分子、製造方法および使用等を説明するためのものである。実施形態は、ベクター及びプラスミドを構築する方法、そのようなベクター及びプラスミドにタンパク質をコードする遺伝子を挿入する方法、またはプラスミドを宿主細胞に導入する方法など、従来の方法の詳細な説明を含まない。このような方法は、当業者にはよく知られており、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning* を含む多くの出版物に記載されている: *A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press*。記載されていない化学薬品はすべて通常の商業ルートで購入することができる。

40

【実施例】

【0284】

実施例 1 . CYP4V2 の表現によるプロモーター強度の検証

(1) 全長 CYP4V2 プロモーター配列は人源ゲノム CYP4V2 (HGNC: 231

50

98) コード領域の2000bp上流で、蘇州金唯智会社によって合成された。

【0285】

(2) 異なる長さのプロモーターCYP4V2 - Pf、CYP4V2 - P1、CYP4V2 - P2、CYP4V2 - P3、CYP4V2 - P4、CYP4V2 - P5、CYP4V2 - P6のプライマー配列を設計し、ステップ(1)で得られた核酸分子を鋳型としてPCR増幅を行い、ゲル電気泳動で増幅産物を回収した。引用配列をSEQ ID NO: 30~37に示す。

【0286】

【表B】

PCR反応系(50 μ l)は以下の通りである。

H ₂ O (Invitrogen, 10977015)	20 μ l
Primer F (10pmol/ μ l)	2 μ l
Primer R (10pmol/ μ l)	2 μ l
primeSTAR MAX (Takara, R045R)	25 μ l
CYP4V2-pro-2000bp	5ng

表2 PCR反応条件

温度	時間	サイクル数
95° C	5min	1
98° C	10s	30
55-60° C	15s	
72° C	20s	
72° C	10min	1
16° C	∞	1

【0287】

(3) pAV - CAG - CYP4V2 - P2A - EGFPベクター(山東維真生物科技有限公司から購入)をCAGプロモーターの両端からそれぞれ増幅し、ゲル電気泳動により増幅産物を回収した。引用配列をSEQ ID NO: 38~39に示す。PCR反応系(50 μ l)は以下の通りである。

【0288】

10

20

30

40

50

【表 C】

H ₂ O (Invitrogen, 10977015)	20 μ l
Primer F (10pmol/ μ l)	2 μ l
Primer R (10pmol/ μ l)	2 μ l
primeSTAR MAX (Takara, R045R)	25 μ l
pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP	5ng

表 3 PCR 反応条件

温度	時間	サイクル数
95° C	5min	1
98° C	10s	30
55-60° C	15s	
72° C	20s	
72° C	10min	1
16° C	∞	1

10

20

【 0 2 8 9 】

(4) 工程(2)で得られた異なるCYP4V2プロモーター配列(例: SEQ ID NO: 6-12)を工程(3)で得られた直鎖状pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFPベクターに相動的に連結し、元のベクター中のCAGプロモーターを代替する。

【 0 2 9 0 】

連結系(氷上で実施)は以下のとおりである。

【 0 2 9 1 】

【表 D】

直鎖状 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP ベクター	1-2 μ l	30
CYP4V2-Pf/P1/P2/P3/P4/P5/P6 プロモーター断片	2-4 μ l	
Lightening Cloning Master Mix (ボロン BDIT0014-20)	5 μ l	
ddH ₂ O	x μ l	
Total	10 μ l	

【 0 2 9 2 】

連結系を50 μ lの水浴釜内で40分放置し、5 μ lの反応液を取ってtransStbl 3大腸菌のコンピテント細胞に転化し、細菌配列を測定し、抽出キット(Omega、D6915-04)を用いてプラスミドを抽出した。

40

【 0 2 9 3 】

(5) 1日目に293T細胞(ATCC、CRL-3216)を35mm細胞培養皿に分け、2日目から70%ぐらいまで、トランスフェクション体系を調製した: 100 μ l血清フリーDMEMにそれぞれ2 μ gステップ(4)で得たプラスミドを加え、3 μ l PEIを加え、均一に混合し、20分静止した。得られたトランスフェクション体系を細胞培地に加え、均等に振り混ぜ、CO₂培養箱に置き、6h後または一晩で液を交換した。

【 0 2 9 4 】

(6) RIPA溶解液(北京普瑞レC1053-100)は48時間後に細胞を溶解し

50

、タンパク質のゲル電気泳動を行った。Western blotはCYP4V2の発現を検出した。使用抗体：anti-CYP4V2 (Atlas、HPA029122)、anti-actin (Abclonal、AC026)、goat-anti-rabbit (Abclonal、AS014)。

【0295】

結果、図1に示すように、CYP4V2-PFプロモーター、CYP4V2-P1プロモーター、CYP4V2-P2プロモーター、CYP4V2-P3プロモーター、CYP4V2-P4プロモーター、CYP4V2-P5プロモーター、CYP4V2-P6プロモーターはすべてCYP4V2の発現を実現することができ、その中でCYP4V2-PFプロモーター、CYP4V2-P3プロモーター、CYP4V2-P4プロモーター、CYP4V2-P5プロモーターは比較的に良い発現効果があり、CYP4V2-P5配列は更に短く、優勢であった。

10

【0296】

実施例2．EGFPをレポーター遺伝子としてプロモーター強度を検証

(1) PCRによりプロモーターEF1a、EFS、OPEFSを増幅した。EF1aプライマー配列をSEQ ID NO: 40~41に、EFSプライマー配列をSEQ ID NO: 42~43に示した。OPEFSプロモーターは汎用プロモーターEFSをベースとし、プライマーの設計は二輪PCRを用いてEFSをOPEFSに改造した。第1回PCR反応に用いたプライマーはEFSフォワードプライマー(例: SEQ ID NO: 42)とOPEFS-overlapR1(例: SEQ ID NO: 44)、第2回PCR反応に用いたプライマーはEFSフォワードプライマー(SEQ ID NO: 42に示す)とOPEFS-overlapR2(例: SEQ ID NO: 45)であった。増幅産物はゲル電気泳動で回収した。PCR反応系(50 μl)は以下の通りである。

20

【0297】

【表E】

H2O (Invitrogen, 10977015)	20 μl
Primer F (10pmol/μl)	2 μl
Primer R (10pmol/μl)	2 μl
primeSTAR MAX (Takara, R045R)	25 μl
pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP	5ng

30

表4 PCR反応条件

温度	時間	サイクル数
95° C	5min	1
98° C	10s	30
55-60° C	15s	
72° C	20s	
72° C	10min	1
16° C	∞	1

40

【0298】

(2) ステップ(1)で得られた増幅産物(プロモーターOPEFS、EFS、EF1a核酸分子、配列はSEQ ID NO: 1~3に示す)の相同組換えを、実施例1のステップ(3)で得られた直鎖状pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFPに連結し、pAV-EF1a-CYP4V2-P2A-EGFP、pAV-EFS-CYP4V2-

50

P2A-EGFP、pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFPが得られる。
連結系（氷上で実施）は以下のとおりである。

【0299】

【表F】

直鎖状 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP ベクター	1-2 μ l	
EF1a、EFS、OPEFS フラグメント	2-4 μ l	
Lightening Cloning Master Mix (ボロン	5 μ l	
BDIT0014-20)		
ddH ₂ O	x μ l	10
Total	10 μ l	

【0300】

連結系を50 の水浴釜内で40分放置し、5 μ lの反応液を取ってtransStb1
3大腸菌のコンピテント細胞に転化し、細菌配列を測定し、抽出キット(Omega、D
6915-04)を用いてプラスミドを抽出した。

【0301】

(3)実施例1ステップ(5)の方法に従い、PEI(Polysciences 247
65-1)を利用して、それぞれpAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP、p
AV-EF1a-CYP4V2-P2A-EGFP、pAV-EFS-CYP4V2-P
2A-EGFPとpAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFPプラスミドを6
穴プレートに予め敷く293T細胞(ATCC、CRL-3216)にトランスフェクシ
ョンし、細胞密度は70%ぐらいだった。

【0302】

(4)24時間後蛍光顕微鏡(Life AMF4305)により蛍光シグナルを観察し
た。

【0303】

結果は図2に示すように、CAG、EF1a、OPEFSはEFSに比べてすべて比較的
に良い発現効果があり、その中でOPEFS序列は比較的短く、更に優位がある。

【0304】

実施例3 . イントロンの増強効果の検証

(I)イントロンを遺伝子5'非コード領域にクローニングした。

【0305】

(1)P5-intronのクローン。CYP4V2-P5プロモーター配列とヒト
-globinイントロンを基に、プライマーを設計し、overlap PCRで改造し
てP5-intronを得た。1)CYP4V2-P5プロモーター配列を鋳型として、
CYP4V2-P5フォワードプライマー(SEQ ID NO:46、CYP4V2-P
5F)とCYP4V2-P5(in)リバープライマー(SEQ ID NO:47)を
利用してPCR増幅を行う;2)ヒト-globinイントロンを鋳型として、
-globinイントロン(c)(SEQ ID NO:48)と-globinイントロン
リバープライマー(SEQ ID NO:49)を用いたPCR増幅;3)増幅産物をそ
れぞれ回収し、1)と2)で得られた目的産物を共通鋳型としてCYP4V2-P5フォ
ワードプライマー(SEQ ID NO:46、CYP4V2-P5F)と-CYP4V
2-P5イントロンリバープライマーを用いてSEQ ID NO PCR増幅を行
い、PCR増幅は実施例2ステップ(149)の体系と条件で行った。増幅したP5-i
ntron目的産物を回収した。

【0306】

(2)増幅して得られたP5-intron配列をシーケンシングし、その後、実施例
1のステップ(3)で得られた直鎖状pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP

10

20

30

40

50

に相同組換えを連結し、pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-EGFPを得る。連結系（氷上で実施）は以下のとおりである。

【0307】

【表G】

直鎖状 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP ベクター	1-2 μ l	
P5-intron フラグメント	2-4 μ l	
Lightening Cloning Master Mix (ボロン BDIT0014-20)	5 μ l	
ddH ₂ O	x μ l	10
Total	10 μ l	

【0308】

(3) 連結系を50 の水浴釜内で40分放置し、5 μ lの反応液を取ってtransS t b l 3大腸菌のコンピテント細胞に転化し、細菌配列を測定し、抽出キット(Omega、D6915-04)を用いてプラスミドを抽出した。

【0309】

(II)イントロンを遺伝子コード領域にクローニングした。

20

【0310】

(1) CYP4V2-CDSintronのクローンであり、このフラグメントでは、イントロンはCYP4V2の第1および第2エクソンの間に位置する。CYP4V2のCDS序列とヒト-globinイントロンを基礎にして、プライマーを設計して、overlap PCRを採用して改造してCDSintronを得た。

【0311】

1) CYP4V2のCDS配列を鋳型として、プライマーCYP4V2-Fpr/CYP4V2-E1-R(配列はそれぞれ、SEQ ID NO:50、51に示す)とCYP4V2-E2-F/CYP4V2-R(配列はそれぞれ、SEQ ID NO:52、53に示す)を用いてPCR増幅し、それぞれPCR産物CYP4V2-E1とCYP4V2-E2~11を得た。

30

【0312】

2) -globinイントロンを鋳型として、プライマーIntron-F/Intron-R(配列はそれぞれ、SEQ ID NO:54、55に示す)を用いてPCR増幅した。

【0313】

3) 増幅産物をそれぞれ回収し、1)得られた目的産物CYP4V2-E1と2)得られた目的産物を共通鋳型として、CYP4V2-CDSのフォワードプライマーCYP4V2-Fpr(配列は、CYP4V2-R:50に示す)と-globinイントロンリバースプライマーintron-R(配列はCYP4V2-E2:55に示す)を用いてPCR増幅し、PCR増幅は実施例2ステップ(1)の体系と条件で行った。増幅したCYP4V2-E1-intron目的産物を回収した。

40

【0314】

4) 3)で得られた目的産物CYP4V2-E1-intronと1)得られた目的産物CYP4V2-E2~11を共通鋳型として、CYP4V2-CDSフォワードプライマーCYP4V2-FprとCYP4V2-CDSリバースプライマーCYP4V2-Rを用いてPCR増幅を行い、PCR増幅は実施例2ステップ(1)の体系と条件で行った。

【0315】

(2) 増幅したCDSintron配列をシーケンシングした。

【0316】

50

(3) 37、2 hで酵素切断 pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFPして直鎖状ベクターを得て、ゲル電気泳動で回収した。酵素体系は以下の通りである。

【0317】

【表H】

pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP	2 μ l	
EcoRI (NEB, R3101S)	2 μ l	
MluI (NEB, R3198S)	2 μ l	
Cutsmart Buffer (NEB)	4 μ l	
H ₂ O (Invitrogen, 10977015)	to 40 μ l	10

【0318】

(4) CYP4V2-CDSintron相同組換えを直鎖状 pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP に連結し、pAV-p5-CDSintron-CYP4V2-P2A-EGFPを得た。連結系(氷上で実施)は以下のとおりである。

【0319】

【表I】

直鎖状 pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP ベクター	1-2 μ l	20
CYP4V2-CDSintron フラグメント	2-4 μ l	
Lightening Cloning Master Mix (ボロン BDIT0014-20)	5 μ l	
ddH ₂ O	x μ l	
Total	10 μ l	

【0320】

(5) 連結系を50 の水浴釜内で40分放置し、5 μ lの反応液を取ってtransStb13大腸菌のコンピテント細胞に転化し、細菌配列を測定し、抽出キット(Omega、D6915-04)を用いてプラスミドを抽出した。

30

【0321】

(III)イントロンが遺伝子5'非コード領域とコード領域に位置する時の増強効果の検証

(1) pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP、pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-EGFP、pAV-p5-CDSintron-CYP4V2-P2A-EGFPを、実施例1ステップ(5)の方法でPEI(Polysciences 24765-1)を用いて6ウェルプレートに予め敷き詰めた293T細胞(ATCC、CRL-3216)にトランスフェクトし、細胞密度は70%程度であった。

【0322】

(2) 24時間後蛍光顕微鏡(Life AMF4305)により蛍光シグナルを観察した。

40

【0323】

(3) RIPA溶解液(北京普瑞レC1053-100)は48時間後に細胞を溶解し、タンパク質のゲル電気泳動を行った。Western blotはCYP4V2の発現を検出した。使用抗体: anti-CYP4V2(Atlas、HPA029122)、anti-actin(Abcclonal、AC026)、goat-anti-rabbit(Abcclonal、AS014)。

【0324】

その結果、図3および図4に示すように、ヒト-globinイントロンに遺伝子5'非

50

コード領域とコード領域を挿入すると発現が増強した。

【0325】

実施例4．Poly Aシグナル部位の選択

(1)実施形態2で得られたpAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFPベクターのSV40は、SEQ ID NO: 19~21で示されるように、BGH、WPRE、WPRE-SV40、およびWPRE-BGHにそれぞれ置き換えられ、pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-BGH、pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-WPRE、pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-WPRE-SV40、pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-WPRE-BGHが得られた。この部分の遺伝子合成とサブクローニングの担当は北京Optimiko。

10

【0326】

(2)ステップ(1)で得られたベクターをシーケンシングして検証した後、抽出キット(Omega、D6915-04)を用いてプラスミドを抽出した。

【0327】

(3)実施例1ステップ(5)の方法でPEI(Polysciences 24765-1)を用いてそれぞれ本実施例ステップ(2)で得られたプラスミドを6ウェルプレートに予め敷いた293T細胞(ATCC、CRL-3216)にトランスフェクションし、細胞密度は70%程度であった。

【0328】

(4)24時間後蛍光顕微鏡(Life AMF4305)により蛍光シグナルを観察した。

20

【0329】

(5)RIPA溶解液(北京ブリーレC1053-100)は48時間後に細胞を溶解し、タンパク質のゲル電気泳動を行った。Western blotはCYP4V2の発現を検出した。使用抗体: anti-CYP4V2(Atlas、HPA029122)、anti-actin(Abcclonal、AC026)、goat-anti-rabbit(Abcclonal、AS014)。

【0330】

結果を図5に示す。ここで、M(mock)はブランクコントロール、SはSV40、BはBGH、WはWPRE、WSはWPRE-SV40、WBはWPRE-BGHである。各実験群は対照群と比較していずれもCYP4V2の発現を検出できた。

30

【0331】

実施例5．発現ベクターの構築

(1)pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH、pAV-OPEFS-RdCVF-BGH、pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH(カルナ抵抗性)の構築。pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-BGH中アンペンジル耐性遺伝子をカルナ耐性遺伝子に換え、蘇州金唯智がベクター改造を担当した。pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO: 90に示す)、pAV-OPEFS-RdCVF-BGH(発現配列はSEQ ID NO: 96に示す)、pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH(発現配列はSEQ ID NO: 106に示す)は蘇州金唯智が関連遺伝子の合成とベクター(カルナ抵抗性)を改造した。

40

【0332】

(2)pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO: 93に示す)、pAV-p5-intron-RdCVF-BGH(発現配列はSEQ ID NO: 99に示す)、pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH(表現順序はSEQ ID NO: 113に示す)(カルナ抵抗性)の構築。37でpAV-OPEFS-CYP4V2-BGH、pAV-OPEFS-RdCVF-BGH、pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH(カル

50

ナ抵抗性)を2時間酵素切断して直鎖状ベクターを得、ゲル電気泳動回収した。酵素体系は以下の通りである。

【0333】

【表J】

Vecter plasmid	2 μ g	
EcoRI (Takara D1040A)	2 μ l	
BamHI (Takara D1010A)	2 μ l	
10 x K Buffer (Takara)	4 μ l	
H ₂ O (Invitrogen, 10977015)	to 40 μ l	10

【0334】

(3) pAV - p5 - intron - CYP4V2 - P2A - EGFP から PCR 増幅により P5 - intron フラグメントを得、ゲル電気泳動により回収した。フォワードプライマーは SEQ ID NO: 46、リバープライマーは SEQ ID NO: 55 を用いた。

【0335】

(4) 酵素切断された回収ベクターとそれとの組換えを必要とする直鎖状断片を連結し、連結系(氷上で実施)は以下のとおりである。

20

【0336】

【表K】

ステップ(2)で得られた酵素切断ベクター	1-2 μ l	
P5-intron フラグメント	2-4 μ l	
Lightening Cloning Master Mix (ボロン BDIT0014-20)	5 μ l	
ddH ₂ O	x μ l	
Total	10 μ l	30

【0337】

連結系を50 の水浴釜内で40分放置し、5 μ lの反応液を取って transStbl3 大腸菌のコンピテント細胞に転化し、細菌配列を測定し、抽出キット(Omega、D6915-04)を用いてプラスミドを抽出した。

【0338】

実施例6. 293T細胞における発現ベクターの発現状況の検査

(1) 実施例5ステップ(1)改造で得られた pAV - OPEFS - CYP4V2 - BGH、pAV - OPEFS - RdCVF - BGH、pAV - OPEFS - CYP4V2 - P2A - RdCVF - BGH プラスミドを、実施例1ステップ(5)の方法で PEI (Polysciences 24765-1) を用いて6穴プレートにあらかじめ敷いておいた293T細胞(ATCC、CRL-3216)にトランスフェクションし、細胞密度は70%程度とした。

40

【0339】

(2) 細胞培養上清(sup)を48時間後に採取し、細胞をPBSで洗浄した後にRIPA溶解液(北京普里レC1053-100)を用いて細胞(lys)を溶解しWestern blotで、各群の上清または細胞溶解液(lys)中のCYP4V2および/またはRdCVFの発現を調べた。使用抗体: anti-CYP4V2 (Atlas、HPA029122)、anti-actin (Abclonal、AC026)、go

50

at - anti - rabbit (Abclonal、AS014)、RdCVF Antibody (anti - CYP4V2、Atlas)。

【0340】

結果を図6に示す。ここで、M (mock) を空白コントロール、CをOPEFS - CYP4V2群、C - RをOPEFS - CYP4V2 - P2A - RdCVF群、RをOPEFS - RdCVF群とした。空白コントロール群M群細胞の溶解液 (lys) と細胞培地上清 (sup) にCYP4V2あるいはRdCVFの発現がなかった。pAV - OPEFS - CYP4V2 - BGHトランスフェクション細胞溶解液におけるCYP4V2の発現があり、pAV - OPEFS - RdCVF - BGHトランスフェクションした細胞上清と溶解液におけるRdCVFの発現があり、pAV - OPEFS - CYP4V2 - P2A - RdCVF - BGHトランスフェクションした細胞溶解液にはCYP4V2の発現があり、同時に細胞溶解液と上清にはRdCVFの発現があった。

10

【0341】

実施例7 . ARPE - 19細胞における発現ベクターの発現状況の検査

(1) 実施例5ステップ(1)改造で得られたpAV - OPEFS - CYP4V2 - BGH、pAV - OPEFS - RdCVF - BGH、pAV - OPEFS - CYP4V2 - P2A - RdCVF - BGHプラスミドを、実施例1ステップ(5)の方法でPEI (Polysciences 24765 - 1) を用いて6穴プレートにあらかじめ敷いておいたARPE - 19細胞 (ATCC、CRL - 2302) にトランスフェクションし、細胞密度は70%程度とした。

20

【0342】

(2) 細胞培養上清 (sup) を48時間後に採取し、細胞をPBSで洗浄した後にRIPA溶解液 (北京普里レC1053 - 100) を用いて細胞 (lys) を溶解しWestern blot、各群の上清または細胞溶解液 (lys) 中のCYP4V2および/またはRdCVFの発現を調べた。使用抗体: anti - CYP4V2 (Atlas、HPA029122)、anti - actin (Abclonal、AC026)、goat - anti - rabbit (Abclonal、AS014)、TXNL6 Antibody (anti - CYP4V2)。

【0343】

結果を図7に示す。ここで、M (mock) を空白コントロール、CをOPEFS - CYP4V2群、C - RをOPEFS - CYP4V2 - P2A - RdCVF群、RをOPEFS - RdCVF群とした。空白コントロール群mock群細胞の溶解液と細胞培地上清にCYP4V2またはRdCVFの発現がなかった。pAV - OPEFS - CYP4V2 - BGHトランスフェクション細胞溶解液におけるCYP4V2の発現があり、pAV - OPEFS - RdCVF - BGHトランスフェクション細胞上清および細胞溶解液におけるRdCVFの発現があり、pAV - OPEFS - CYP4V2 - P2A - RdCVF - BGH、トランスフェクションした細胞溶解液にはCYP4V2の発現があり、同時に上清と細胞溶解液にはRdCVFの発現があった。

30

【0344】

実施例8 . ウイルスベクター

(I) AAV血清型の選択: GFPレポーターを封入したAAV2/2、AAV2/5、AAV2/8、AAV2/9血清型ウイルス (山東維真生物科技有限公司から購入) を用いて、野生型マウスに網膜下注射を行った。1か月後に切片で網膜組織形態学的観察を行った。結果図8に示すように、両矢印はEGFPレポーター遺伝子の発現範囲を示し、網膜の嗜好性が比較的に良いAAV2/8血清型を選択した。

40

【0345】

AAV2/8ベクターの構築:

(1) pAAV - RC5 - Amp (北京西美傑科技有限公司から購入し、ベクター配列を以下に示す: SEQ ID NO: 133) をベースに改造した。PCRはAmp以外のpAAV - RC5配列を増幅し、用いたプライマーはSEQ ID NO: 56 ~ 57に示す

50

ようにRC5 - F / RC5 - Rであった。

【0346】

(2) Kana部分は、SEQ ID NO: 58 - 59に示すように、Kana - F / Kana - Rのプライマーを用いたPCR法によりpEGFP - N1から増幅された。

【0347】

(3) 以上のPCRにより得られた2種類のDNA断片を、相同組換え法を用いて得られたpAAV - RC5 - Kana。

【0348】

(4) pAAV - RC5 - Kanaをベースにして、PCR法を用いてRC5 - cap以外のpAAV - Kana配列を増幅し、用いたプライマーはSEQ ID NO: 60 - 61に示すように、RC5 - Kana - F / RC5 - Kana - Rである。

10

【0349】

(5) 遺伝子合成したRC8 - cap配列(Beijing Optimus、配列はSEQ ID NO: 134に示す)と、ステップ(4)で得られたpAAV - Kana直鎖状ベクターを相同組換えにより得られたpAAV - RC8 - Kana(つまりAAV2 / 8)を用いて、ベクター配列をSEQ ID NO: 135に示した。

【0350】

(II) AAV - helper選択: 汎用型AAV - helper補助プラスミドを選択し、抵抗性をアンモニアからカルナに変更した。具体的な改造プロセスは以下の通りである。

20

【0351】

1) pAAV - helper - Amp(北京西美傑科技有限公司から購入し、ベクター配列を以下に示す: SEQ ID NO: 136)をベースに改造。PCR法によりAmp以外のpAAV - helper配列を増幅し、用いたプライマーはSEQ ID NO: 56 - 57に示すように、RC5 - F / RC5 - Rであった。

【0352】

2) Kana部分はPCR法でpEGFP - N1から増幅して得られ、用いたプライマーはKana - F / Kana - Rであり、SEQ ID NO: 58 - 59で示した。

【0353】

3) 以上のPCRにより得られた2種類のDNA断片を、相同組換え法により得られたpAAV - helper - Kana(つまりAAV - helper)のベクター配列をSEQ ID NO: 137に示した。

30

【0354】

実施例9. ウイルスの包装と純化

(I) ウイルス包装

(1) 0日目: 細胞接種(接種数 1×10^7)、293T細胞を15cmのシャーレに接種した。

【0355】

(2) 第1日目: 293T細胞量が80%~90%の時、10%血清(上海吉泰依科賽、FSP500)を含む完全培地(Gibco、C11965500BT)20mlに換え、プラスミドトランスフェクションを行い、具体的なトランスフェクション体系は表5を参照。

40

【0356】

50

【表 L】

表 5 転写システム

システムコンポーネント	シャーレ 15 cm 毎
発現ベクター	15 μ g
AAV-helper	15 μ g
AAV2/8	15 μ g
プラスミド mix	45 μ g
無血清 DMEM (Gibco、 C11965500BT)	2000 μ l
プラスミドを加えてよく混ぜ、PEI を加える	
PEI (Poly sciences 24765-1)	135 μ l
PEI を加え、手で振り混ぜ(渦振動してはいけない)、室温で 20 min インキュベートした。	

10

20

【0357】

(3) 表 5 中の発現ベクターは、実施例 5 の方法に従って構築された発現ベクターである。
(3) 2 日目：トランスフェクション 12 - 18 時間後に新鮮完全培地 30 ml に交換した。

【0358】

(4) 3 日目：トランスフェクション 48 時間後に新鮮完全培地 30 ml に交換。

【0359】

(5) 4 日目：トランスフェクション 72 h 後に通常の方法で胰酵素で 293T 細胞を消化し、そして 50 ml の遠心管の中に収集し、PBS で 2 回洗い、1200 rpm で遠心 5 分、PBS を吸入し、-80 の冷蔵庫に保存した。

30

【0360】

(II) ウイルス精製

1) 本実施例のステップ (5) で得られた AAV 293T 細胞を 15 ~ 25 解凍した。

【0361】

2) 15 cm のシャーレ 1 つにつき 2 ml の細胞溶解液 (150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 8.5) で細胞を再懸濁した (50 ml の遠心管ごとに 15 cm のシャーレの細胞を 3 個採取し、3 個で 6 ml の細胞溶解液とした)。

【0362】

3) 遠心管内に細胞溶解液の半数体積 (3 ml) のクロロホルムを加え、管口を締め付け、水平を 37 のロッキングベッドに 250 rpm で置いて 30 分間振り混ぜた。

40

【0363】

4) 水相の 1/4 体積 (1.5 ml) 5 M の塩化ナトリウムを加えて、均一に混合した。高速遠心管に移し、11000 rpm で 25 分遠心した。

【0364】

5) 上層水相をとり、境界部の吸引しにくい部分を 1.5 ml 遠心管に移し、30 秒 12000 rpm 遠心し、上澄みを合わせ、上層水相にヌクレアーゼ (Benzonase) を最終濃度 50 U/ml まで加え、デオキシコール酸を最終濃度 0.4% まで加え、最終濃度 10 mM の MgCl₂、0.5 mM の CaCl₂、5 IU/ml の Turbo DNase I、25 μ g/ml の RNase A (貯留液濃度 10 mg/ml) を添加した。

【0365】

50

6) 37°C水浴30分。

【0366】

7) 水相1/4(2ml)の体積の50%PEG8000を加え、振り混ぜ、氷上で1hr、11000rpmで25分遠心した。

【0367】

8) 上清を吸引して廃棄し、再び1分遠心し、残りの上清を除去した。

【0368】

9) 最終溶解体積の需要によってPBSを加え、懸濁を吹き付け、1.5ml遠心管に移し、転移する時に小さい体積の移動液(<200μl)を入れ、沈殿の粘着によるウイルスの損失を避けた。

【0369】

10) クロロホルム500μlを加え、振り混ぜ、12000rpmで20分間遠心分離した。

【0370】

11) 無菌条件下で上清を吸引し、-80℃に分けて保存した。

【0371】

実施例10. ウイルス力価の測定

(I) 標品pAAV-EGFPの配合

1. ベルグラジエント: 1×10^8 コピー/5μl、 1×10^7 コピー/5μl、 1×10^6 コピー/5μl、 1×10^5 コピー/5μl、 1×10^4 コピー/5μl、 1×10^3 コピー/5μl、 1×10^2 コピー/5μl。

【0372】

2. 希釈手順:

a. 原液を10倍希釈してナノで定量し、その定量結果をもとに後続希釈を行った。

b. 定量した試料を1ng/μlに段階的に希釈した。

c. 1ng/μl試料を 1×10^8 コピー/μlに希釈した。

d. 希釈液 1×10^8 コピー/μlを5倍希釈して 1×10^8 コピー/5μlとした。

e. 10倍希釈して 1×10^2 コピー/5μlとした。

【0373】

(II) サンプルの処理と希釈

1. 17μl DNase 1+1ml 1x buffer (TransGen Biotech, GD-201-01) 50U/mlのbufferを調製した。

【0374】

2. 実施例9のステップ11)で得られたサンプル5μlを、ステップ1で調製したbufferで95μl希釈したサンプル(10倍希釈)に加えた。

【0375】

3. 均一に混合(渦振動5秒)し、PCR装置上で37℃で30分間放置; 75℃で15分間放置した。

【0376】

4. ステップ3の反応液を振り混ぜ、その中の50μlを吸い取り、450Mの脱リボザイム水を加え、第一希釈勾配(200倍希釈)とした。

【0377】

5. ステップ4で均一に混合した第1勾配反応液50μlを吸引し、450μlの脱リボザイム水を加え、第2希釈勾配(2000倍希釈)とした。

【0378】

6. ステップ5で均一に混合した第一勾配反応液50μlを吸引し、450μlの脱リボザイム水を加え、第三希釈勾配(2000倍希釈)とした。

【0379】

(III) 蛍光定量PCR

【0380】

10

20

30

40

50

【表M】

表6 蛍光定量PCR増幅システム:

SYBR Master Mix 2 x (ABI, 4472908)	10 μ l
0 μ M ITR-F (SEQ ID NO:154 に示す)	1 μ l
10 μ M ITR-R (SEQ ID NO:155 に示す)	1 μ l
被験試料	5 μ l
H2O	3 μ l
Total	20 μ l

10

【0381】

【表N】

表7 蛍光定量PCRの増幅条件(ABI7500リアルタイム蛍光定量PCR装置):

1 サイクル	1 サイクル	40 サイクル	
50° C	95° C	95° C	60° C
2 min	2 min	15 s	31s

20

【0382】

【表O】

表8 ウイルス力価の定量結果

名前	Sample Name	Qty	Qty x 希釈倍数	平均濃度 vg/ml
AAV-OPEFS-EGFP	E200	2.91E+08	1.16E+10	1.00E+13
	E2000	2.47E+07	9.89E+09	
	E20000	2.14E+06	8.56E+09	
AAV-OPEFS-CYP4V2	C200	8.75E+08	3.50E+10	3.06E+13
	C2000	1.35E+08	5.42E+10	
	C20000	6.51E+05	2.61E+09	

30

【0383】

検査・測定の結果表8はAAV-OPEFS-EGFP、AAV-OPEFS-CYP4V2ウイルス力価はそれぞれ1.00E+13vg/ml、3.06E+13vg/mlであり、後続の感染実験に用いることができることを示した。本願の実施例で用いた他のウイルスの力価測定は、いずれも本実施例の方法で行われた。

40

【0384】

実施例11.異なる投与量のウイルスはヒトiPSC分化のRPE細胞を感染
(1)ヒト誘導多能性幹細胞(iPSC)の調製。腎上皮細胞はUrineasy尿細胞分離キット(北京賽貝、CA3102500)を用いて尿から抽出し、増幅はUrineasy尿細胞増幅キット(北京賽貝CA3103200)を用いて培養し、3~4世代の融合度が70~80%に達した細胞を用いてリプログラミング実験を行った。リプログラ

50

ミング実験はhiPSCリプログラミングキット（北京賽貝、CA5002002）を用い、キットの説明書にある操作法に従って行い、次の細胞分化実験のためのヒトIPSCを得た。

【0385】

(2) RPE細胞の調製。文献(da Cruz, L., et al. (2018), Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration, Nat Biotechnol 36(4):328-337.)に記載された方法によってRPE細胞を作製した。3 * 10⁴ / cm²ヒトIPSCをT 25瓶のTESR-E8培地4ml (STEMCELL, CAT#05990, #05991)で培養し、5日後に20%血清置換物(Gibco, CAT#A3181502)6mlを含む培地(Gibco, CAT#10829018)に交換し、2日後に6ml無血清培地(Gibco, CAT#10829018)で約20週間培養を続けた。楕円形で濃色の分裂性細胞、すなわちRPE細胞が得られた。図9に蛍光顕微鏡(Life AMF4305)で白色光下にそれぞれ4、10、10倍鏡下に観察された腎上皮細胞、IPSC細胞、RPE細胞を示す。

10

【0386】

(3) 等量のヒトiPSC分化RPE細胞をpAV-OPEFS-EGFP-BGHまたはpAV-OPEFS-CYP4V2-BGHを含むラッピングウイルスに用量勾配(MOI = 0, 1 x 10³, 1 x 10⁴, 1 x 10⁵)を用いて感染させた。

20

【0387】

(4) 72h後に細胞を消化し、そして各群を三つに分け、一つはcell titer glow(Promega, G9241)による説明書による細胞の死亡状況を分析した。実施例6のステップ(2)の方法Western blotに従って、CYP4V2の表現を検出した。1部はRNAを抽出するために使用され、RT-qPCRは炎症性サイトカインのmRNAレベルを検出した: NLRP3、TNF、IFN。その中で、RNA抽出キット(天根DP430)を使って説明書どおりにRNAを抽出した; cDNAは逆転写キット(Takara, RR407A)を用いて説明書に従って逆転写した。RT-qPCR実施例10のステップ(水)の方法によって行い、RT-qPCRプライマーの配列をSEQ ID NO: 138~145に示す。

30

【0388】

結果は図10A-10Dのように、pAV-OPEFS-EGFP-BGHウイルス力価の増加に従い、EGFPの発現量は次第に増加し、炎症性サイトカインTNFとNLRP3の発現レベルは次第に増加し、細胞死亡率は次第に増加した。pAV-OPEFS-CYP4V2-BGHウイルス力価の増加に伴い、CYP4V2の発現量が増加し、炎症性サイトカインTNFとNLRP3の発現レベルが増加し、細胞死亡率が増加した。ヒトiPSCから分化したRPE細胞に対して、高力価のAAVウイルスが細胞毒性を有することから、1 x 10⁴以下の用量を選択して後続のヒトiPSCから分化したRPE細胞の実験に用いることが可能である。

40

【0389】

実施例12.異なるウイルス感染BCD患者iPSC分化RPE細胞の効果

(1) 実施例7の方法でウイルスを包装した。A: pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO: 93に示す); B: pAV-p5-intron-RdCVF-BGH(発現配列はSEQ ID NO: 99に示す); C: pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH(発現配列はSEQ ID NO: 113に示す); D: pAV-p5-intron-EGFP-BGH。

【0390】

(2) MOI = 1 x 10⁴のウイルスA、B、C、Dおよび1/2 MOIのウイルスA + 1/2 MOIのウイルスB(以下E群となる)を採用して等量BCD患者(遺伝子型

50

CYP4V2 : c . 8 0 2 - 8 _ _ 8 1 0 d e l 1 7 b p i n s G C (ホモ接合体変異) iPSC分化のRPE細胞を感染させ、RPE細胞の製造方法は実施例11を参照。BCD患者は2018年11月から2018年12月まで北京大学第三病院眼科で治療した患者である。北京大学第三病院倫理委員会は本研究のすべての側面を承認し、被験者(またはその法定後見人)から試料採取のインフォームドコンセントを得た。患者の尿試料は採取後1時間以内に実施例11の方法で操作した。

【0391】

(3) 72h後に顕微鏡下で脂質の堆積状況を観察した。

【0392】

(4) 細胞を採取し、培養上清(sup)を採取する;細胞をPBSで洗浄した後にRIPA溶解液(北京普利レC1053-100)で細胞を溶解し、細胞溶解液(lys)を得、westernで蛋白発現レベルを検査・測定した。使用抗体: anti-CYP4V2 (Atlas、HPA029122)、anti-actin (Abclonal、AC026)、goat-anti-rabbit (Abclonal、AS014)、TXNL6 Antibody (Atlas)。

10

【0393】

蛋白発現の結果は図11Aに示し、ウイルス感染がないブランクコントロールM(モック)群のBCD患者iPSC分化のRPE細胞はCYP4V2あるいはRdCVFの発現がなかった。ウイルスD群に感染したBCD患者iPSCから分化したRPE細胞はCYP4V2あるいはRdCVFの発現がなく、EGFPの発現があった。ウイルスA群に感染したBCD患者のiPSCから分化したRPE細胞溶解液で検出可能なCYP4V2発現があり、ウイルスB群に感染したBCD患者iPSCから分化したRPE細胞上清と細胞溶解液で検出できるRdCVF発現があり、ウイルスC群とE群に感染したBCD患者iPSCから分化したRPE細胞溶解液にCYP4V2発現を検出でき、同時に細胞上清と細胞溶解液にRdCVF発現を検出できた。

20

【0394】

脂質沈着所見は図11BのようにM群と比較してA群、C群、E群で改善した。D群はEGFP発現と脂質染色の蛍光が互いに感染するため、比較に入れなかった。

【0395】

実施例13. ウイルストランスフェクションBCDマウスのプロモーター選択

30

(1) 実施例7の方法でウイルスを包装した。A: pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO:93に示す); B: pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO:90に示す)。プロモーターA: p5-intron; プロモーターB: OPEFS。BCDマウス(北京百奥賽因遺伝子生物技術有限公司から購入したCyp4v3-/-)に1か月齢で網膜下腔注射を行い、両プロモーター・ウイルスをそれぞれ10匹のマウスに注入し、治療ベクター(pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO:93に示す)/pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO:90に示す))を両側眼球に注入し、注入後3か月観察した。

【0396】

40

網膜下腔注射方法:

1) 実験物を用意し、マウスを1%アトロピンで散瞳させ、その後、80mg/kgケタミン+8mg/kgトルチアジンを腹腔内注射した。

【0397】

2) 麻酔後再び1%アトロピンで散瞳し、マウスを眼外科手術顕微鏡(Topcon、OMS800)の動物実験プラットフォームの前に置き、マウスの眼球上に0.5%プロメカインの局所麻酔を点眼した。

【0398】

3) フルオレセインナトリウム: ウイルス = 100:1の濃度でフルオレセインナトリウム原液をウイルスに加え、ピペットで混合した。

50

【0399】

4) インスリン針でマウス眼球毛様体平坦部に1つの小孔をあらかじめ刺し、マイクロシリンジの針で前記小孔を貫通した後マウス眼球ガラス体腔に入り、この時マウス眼球に適量の2%ヒドロキシメチルセルロースを加えて鏡下でマウス眼底を見ることができるようにし、また針を続けて水晶体を避けて反対側周辺の網膜下に挿入し、ゆっくりフルオレセインナトリウムを持つウイルスを押し、各眼の注射量は10で、ウイルス濃度は 1×10^9 で、フルオレセインナトリウムを指示薬として網膜下腔に注射するかどうかを判断した。

【0400】

術後、眼球表面を生理食塩水で洗浄し、ケージに入れてマウスの覚醒を待った。

【0401】

(2) 眼底写真撮影で結晶性沈積状況を観察し、

1) ブランクコントロール(KO)を取り、プロモーターA: pAV - p5 - intron - CYP4V2 - BGH (発現配列はSEQ ID NO: 93に示す)、プロモーターB: pAV - OPEFS - CYP4V2 - BGH (発現配列はSEQ ID NO: 90に示す)を注射したマウスの眼球を1%アトロピンで散瞳し、80mg/kgケタミン+8mg/kgトルチアジンA腹腔内注射で麻酔した。

【0402】

2) 麻酔後のマウスをMicro I II小動物網膜画像システム(Phoenix Research Laboratory, Micro I II)の実験台に寝かせ、マウス眼球の上に適量の2%ヒドロキシメチルセルロースを滴下し、レンズと角膜の接触効果を改善した。

【0403】

3) 実験台を昇降、回転してマウスの目の位置を調整し、焦点距離と光強度を調整してマウスの眼底画像を得て、Micro I IIソフトで撮影した。

【0404】

4) 撮影後、GraphPad Prismソフトウェアを用いて結晶沈着の定量分析を行った。

【0405】

眼底撮影の結果は図12の通りである。図13は、マウスに異なるプロモーターを持つウイルスを注入した場合の眼底結晶数の統計結果である($n = 5$)。図12と13は異なるプロモーターを含むウイルスを注射した後に眼底結晶沈着が改善したことを示していた。

【0406】

(3) 網膜組織形態学観察:

1) 固定脱水: 頸椎脱臼でマウスを犠牲し、眼球を摘出し、マウスの眼球を1.5ml EP管内に入れ、1mlの4%パラホルムアルデヒドを加え、4で一晩過ごした。その後、1ml 30%ショ糖溶液を入れた1.5ml EPチューブに眼球を入れて脱水すると、眼球が沈んだ。

【0407】

2) マウスの眼球を冷凍包埋剤(OCT)の入った1.5ml EP管の中に入れて、ピンセットでマウスの目をまっすぐ前を見る方位にして、EP管をかぶせた後、液体窒素の中に入れて、完全に凍った後、凍結切片をして、切片の厚さは7 μ mとした。アセトン4で一晩固定した後、-80で保存した。

【0408】

3) スライスを取り出し、室温に戻した後、PBSで5分間、3回洗浄した。

【0409】

4) スライドガラスを無組織のところで拭き、それぞれの切片に40 μ lの閉鎖液(5%ロバ血清)を滴下し、室温で1h閉鎖した。

【0410】

5) 5%ロバ血清で一抗を希釈し、約40 μ lの抗体作動液を滴加し、マウス眼球組織を完全に覆い、4で一晩放置した。本実験に用いた1次抗体は: CYP4V2(1:50

10

20

30

40

50

、Sigmaから購入)。

【0411】

6) スライドガラスを取り出し、PBSで3回洗い、毎回5分であった。

【0412】

7) 2次抗体(Thermo Fisher Scientificから購入)をPBSで1:800に希釈し、左右の2次抗体作動液40 μ lを滴下し、マウス眼組織を完全に覆い、室温で1時間インキュベートした。

【0413】

8) PBSを3回洗浄した後、DAPI希釈液(1:5000)を滴下し、室温で15分インキュベートした。

【0414】

9) スライドガラスに蛍光消光防止カプセルを滴下し、カバーガラスを覆い、-20 $^{\circ}$ Cで遮光保存した。

【0415】

10) NIS-Elements Cソフトウェアを搭載したニコンA1レーザー共焦点顕微鏡で観察し、写真を撮った。

【0416】

図14の免疫蛍光の結果、プロモーターAウイルスとプロモーターBウイルスの両方を注入したBCDマウスはCYP4V2を発現できることが分かった(図中の二重矢印が範囲を示している)。

【0417】

実施例14. ウイルス感染BCDマウスの投与量選択

(1) 実施例13の方法に従ってウイルス量を検証した。BCDマウス(Cyp4v3-/-)は1か月齢で網膜下注入、治療ベクターpAV-OPEFS-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO:90に示す)の両側眼球注入、各眼に1E8vg、1E9vg、1E10vgウイルスを注入した。注射後3ヶ月観察した。

【0418】

結晶沈着状況は図15の撮影結果に示す通りである。図16は、1E8vgおよび1E9vgウイルスを注入したBCDマウスの眼底結晶化数を、ウイルスを注入しなかったBCDマウスと同じ面積で統計的に示したものである。1E8vg、1E9vgウイルスを注入したBCDマウスは、ウイルスを注入しなかったBCDマウスと比較して、結晶沈着数の減少を示し、1E9vgウイルスを注入したBCDマウスはより顕著であった。1E10vgウイルスを注入したBCDマウスは、結晶沈着の有意な改善を示さず、損傷が重度であった。

【0419】

(2) RPE細胞層を剥離し、RNAを抽出し、炎症性サイトカインTNF- α 、IFN- γ 、NLRP3の発現レベルを測定した。RNAおよび逆転写の抽出は、実施形態11のステップ(4)の方法で行われ、RT-qPCRは、実施形態10のステップ(3)の方法で行われた。qPCRプライマー配列をSEQ ID NO:146-153に示す。

【0420】

図17は1E10vgウイルスを注射することによる炎症性サイトカインTNF- α 、IFN- γ 、NLRP3の発現を上昇させ、1E10vgのウイルス剂量がBCDマウスに対する毒副作用を説明し、1E9vgは1E8vgより良かった。そこで、1E10vg以下のウイルス量でのフォローアップ実験を選択した。

【0421】

実施例15. 異なるウイルストランスフェクションBCDマウスの効果

(I) p5-intron BCDマウスにおけるプロモーターウイルス感染の効果

(1) 実施例7の方法でウイルスを包装した。A: pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO:93に示す); B: pAV-p5-intron-RdCVF-BGH(発現配列はSEQ ID NO:99に示す); C: pA

10

20

30

40

50

V - p 5 - i n t r o n - C Y P 4 V 2 - P 2 A - R d C V F - B G H (発現配列は S E Q I D N O : 1 1 3 に示す) 。

【 0 4 2 2 】

(2) 1 カ月齢の B C D マウス (C y p 4 v 3 - / -) を K O 群、 A 群、 B 群、 A + B 群、 C 群の 5 群に分け、 1 E 9 v g のウイルス A、 B、 C およびウイルス A + ウイルス B (A、 B はそれぞれ 5 E 8 v g) を用い、 K O 群はブランクコントロールとし無処置とした。網膜下注入は、実施例 1 3 の方法に従って行われた。

【 0 4 2 3 】

(3) 実施例 1 3 の方法によって眼底写真を撮って結晶性沈積状況を観察した。図 1 8 は、異なるウイルスを用いた網膜下注入療法後の B C D マウスの眼底撮影の結果が結晶沈着を示したものである。図 1 9 に異なるウイルスを用いた網膜下腔注入療法後の B C D マウスの眼底結晶数の統計結果 (n = 5) を示す。結果はウイルス A + B 群とウイルス C 群のマウスの結晶数の減少がもっと著しいことを表明した。ウイルス B 群のマウスの眼底結晶状況は明らかな改善が見られなかった。

10

【 0 4 2 4 】

(4) 体網膜機能検査：網膜電図検査 (E R G)

1) マウス暗順応：マウスを少なくとも 1 6 時間暗順応させ、その後全ての操作を暗赤色光下で行った。

【 0 4 2 5 】

2) マウス麻酔： 8 0 m g / k g ケタミン + 8 m g / k g トルチアジンを腹腔内注射した。

20

【 0 4 2 6 】

3) 麻酔終了後、マウスの眼を暗赤色光照明下で 1 % アトロピンで散瞳し、マウスを視覚電気生理学的手段 E s p i o n E 2 の動物実験プラットフォームの前にテープで固定し、両眼を一致させ、十分に曝露した。接地電極針をマウスの尾の根元に挿入し、参考電極針をマウスの下顎に挿入し、2つの金環記録電極を動物実験プラットフォームの電極ホルダに挟み、その角度を調整し、それぞれそれぞれが左右眼角膜の中心先端に軽く接触するようにし、適量の 2 % ヒドロキシメチルセルロースを滴加し、金環電極と角膜の接触効果を改善した。

【 0 4 2 7 】

4) コンピューター E s p i o n E 2 システムにマウス番号と月齢情報を入力し、プログラムを実行した。行別の暗順応フラッシュの強度は、 0 . 0 0 3、 0 . 0 1、 0 . 1、 1、 3、 1 0、 1 0 0 c d · s / m² (背景光度は 0 c d · s / m²、刺激間隔は 1 5 秒、3つの E R G 信号の平均値を記録した。) であった。明順応閃光強度は 3、 1 0、 3 0、 1 0 0 c d · s / m² (適応時間 5 分、背景光量 3 0 c d · s / m²、刺激間隔 1 5 秒、5つの E R G 信号の平均値を記録した) であった。プログラムの実行終了後に実行結果を自動的に保存し、 G r a p h P a d P r i s m を用いて結果を集計した。

30

【 0 4 2 8 】

図 2 0 は異なるウイルスで網膜下腔注射治療を行った B C D マウスの E R G 記録結果であり、結果によるウイルス B 群のマウスの E R G 波幅は明らかな変化がなく、ウイルス A 群、ウイルス A + B 群、ウイルス C 群のマウスの E R G 波幅はすべて増加し (p < 0 . 0 5)、しかもウイルス A + B 群とウイルス C 群はウイルス A 群より優れた (p < 0 . 0 5) 。

40

【 0 4 2 9 】

(5) 実施例 1 3 ステップ (3) の方法によって、 B C D マウス C Y P 4 V 2、 R d C V F の発現状況を検査した。 R d C V F (1 : 5 0、 H 0 0 1 1 5 8 6 1 - D 0 1 P) 。

【 0 4 3 0 】

図 2 1 は異なるウイルスを用いて網膜下腔注射治療後の B C D マウスの免疫蛍光染色図である。結果、ウイルス A 群マウスは C Y P 4 V 2 (二重矢印表示範囲) を発現し、ウイルス B 群マウスは R d C V F (単一矢印表示範囲) を発現し、ウイルス A + B 群とウイルス C 群の両方で C Y P 4 V 2 および R d C V F の発現が検出できた。

【 0 4 3 1 】

50

(6) マウス眼球 R P E 切片染色にて R P E 細胞数と形態を検査

1) 1.5 ml E P 管に予冷 P B S を入れ、マウスを犠牲した後マウス眼球を取り出し、P B S に 15 分浸漬した。

【0432】

2) マウスの眼球を 1 h 固定した 4 % パラホルムアルデヒド 1.5 ml の E P チューブに移した。

【0433】

3) 実体顕微鏡 (O l y m p u s、S Z 6 1 - S E T) 下でマウス眼球の前節を除去し、神経網膜層と R P E 層を分離し、R P E 層を 4 つに切り取った。

【0434】

4) R P E シートを予冷した P B S 中で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。

【0435】

5) R P E 切片を 0.1 % T r i t o n 中に 20 分間通し、その後 P B S で 3 回洗浄し、毎回 5 分であった。

【0436】

6) R P E 切片を 96 孔板の一つの孔内に入れ、1:200 の比率で P B S で希釈した P h a l l o i d i n 作動液を加え、室温で 1 h インキュベートした。

【0437】

7) P B S 3 回洗浄し、毎回 5 分で、R P E をスライドガラス上に平らに敷き、少量の錠剤を入れた後、カバーガラスで錠剤を包み、N i k o n 蛍光顕微鏡下で観察した。

【0438】

図 22 の P h a l l o i d i n 標識 F - a c t i n 染色の結果は、プロモーター A ウイルスとプロモーター B ウイルスを注入した B C D マウスは、ウイルスを注入しなかった B C D マウスと比較して、R P E 細胞の六角形の形態がより完全で、密に配置されていることを示している。

【0439】

図 22 の P h a l l o i d i n 標識 F - a c t i n 染色結果では、K O 群に対して B 群では有意な変化は認められず、ウイルス A + B 群および C 群は他の 3 群よりも R P E 細胞の六角形の形態が整っており、緊密に配置されていることが示され、図 23 では同じ面積を取って R P E 細胞数をカウントしていることが統計的に示されており、ウイルス A + B 群およびウイルス C 群の同じ面積内の R P E 細胞数はウイルス A 群よりも多いことが示されている (n = 5)。

【0440】

結晶性沈着、網膜電図 (E R G) と R P E 細胞数および形態を総合的に観察した結果、R d C V F (B 群) の単独発現は B C D マウスの結晶性沈着、網膜電図 (E R G) と R P E 細胞数および形態を改善しなかった。R d C V F と C Y P 4 V 2 の共発現 (A + B 群および C 群) は単独発現 C Y P 4 V 2 が B C D マウスの結晶性沈積、網膜電図 (E R G) と R P E 細胞数量と形態の改善状況に対する著しく高め、共発現 C Y P 4 V 2 および R d C V F は単独発現 C Y P 4 V 2 あるいは E R G より明らかな協同作用があることを表明した。

【0441】

(I I) プロモーター後のイントロンを含まないウイルス感染 B C D マウスにおける E R G 効果

(1) 実施例 7 の方法でウイルスを包装した。A : p A V - p 5 - C Y P 4 V 2 - B G H (発現配列は S E Q I D N O : 91 に示す) ; B : p A V - p 5 - R d C V F - B G H (発現配列は S E Q I D N O : 97 に示す) ; C : p A V - p 5 - C Y P 4 V 2 - P 2 A - R d C V F - B G H (発現配列は S E Q I D N O : 107 に示す)。

【0442】

(2) 1 カ月齢の B C D マウス (C y p 4 v 3 - / -) を K O 群、A 群、B 群、A + B 群、C 群の 5 群に分け、1 E 9 v g のウイルス A、B、C およびウイルス A + ウイルス B (A、B はそれぞれ 5 E 8 v g) を用い、K O 群はブランクコントロールとし無処置とした

10

20

30

40

50

。網膜下注入は、実施例 1 3 の方法に従って行われた。

【0443】

(3) 実施例(一)のステップ(4)の方法によって、網膜電図検査(ERG)を行う。図24は上述の異なるウイルスで網膜下腔注射治療を行った後にBCDマウスのERG記録結果であり、結果によるウイルスB群のマウスのERG波幅は明らかな変化がなく、ウイルスA群、ウイルスA+B群、ウイルスC群のマウスのERG波幅はすべて増加し($p < 0.05$)、しかもウイルスA+B群とウイルスC群はウイルスA群より優れた($p < 0.05$)。

【0444】

(III) p1プロモーター・ウイルス感染BCDマウスにおけるERG効果

10

(1) 実施例7の方法でウイルスを包装した。A: pAV-p1-CYP4V2-BGH(発現配列はSEQ ID NO:92に示す); B: pAV-p1-RdCVF-BGH(発現配列はSEQ ID NO:98に示す); C: pAV-p1-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH(発現配列はSEQ ID NO:108に示す)。

【0445】

(2) 1カ月齢のBCDマウス(Cyp4v3-/-)をKO群、A群、B群、A+B群、C群の5群に分け、1E9vgのウイルスA、B、CおよびウイルスA+ウイルスB(A、Bはそれぞれ5E8vg)を用い、KO群はブランクコントロールとし無処置とした。網膜下注入は、実施例13の方法に従って行われた。

【0446】

20

(3) 実施例(一)のステップ(4)の方法によって、網膜電図検査(ERG)を行う。図25は上述の異なるウイルスで網膜下腔注射治療を行った後にBCDマウスのERG記録結果であり、結果によるウイルスB群のマウスのERG波幅は明らかな変化がなく、ウイルスA群、ウイルスA+B群、ウイルスC群のマウスのERG波幅はすべて増加し($p < 0.05$)、しかもウイルスA+B群とウイルスC群はウイルスA群より優れた($p < 0.05$)。

【0447】

(IV) WPRESV40poly Aシグナル部位ウイルス感染BCDマウスにおけるERG効果

30

(1) 実施例7の方法でウイルスを包装した。A: pAV-p5-intron-CYP4V2-WPRE-SV40(発現配列はSEQ ID NO:94に示す); B: pAV-p5-intron-RdCVF-WPRE-SV40(SEQ ID NOのようなブレゼンテーション配列:(図100)); C: pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-RdCVF-WPRE-SV40(発現配列はSEQ ID NO:114に示す)。

【0448】

(2) 1カ月齢のBCDマウス(Cyp4v3-/-)をKO群、A群、B群、A+B群、C群の5群に分け、1E9vgのウイルスA、B、CおよびウイルスA+ウイルスB(A、Bはそれぞれ5E8vg)を用い、KO群はブランクコントロールとし無処置とした。網膜下注入は、実施例13の方法に従って行われた。

40

【0449】

(3) 実施例(一)のステップ(4)の方法によって、網膜電図検査(ERG)を行う。図26は上述の異なるウイルスで網膜下腔注射治療を行った後にBCDマウスのERG記録結果であり、結果によるウイルスB群のマウスのERG波幅は明らかな変化がなく、ウイルスA群、ウイルスA+B群、ウイルスC群のマウスのERG波幅はすべて増加し($p < 0.05$)、しかもウイルスA+B群とウイルスC群はウイルスA群より優れた($p < 0.05$)。

【0450】

(V) シグナル部位を含まないウイルス感染BCDマウスの効果

(1) 実施例7の方法でウイルスを包装した。A: pAV-p5-CYP4V2(SEQ

50

ID NO : 117に示す) ; B : pAV - p5 - RdCVF (SEQ ID NO : 120に示す) ; C : pAV - p5 - CYP4V2 - P2A - RdCV (SEQ ID NO : 122に示す)。

【0451】

(2) 1カ月齢のBCDマウス(Cyp4v3 - / -)をKO群、A群、B群、A+B群、C群の5群に分け、1E9vgのウイルスA、B、CおよびウイルスA+ウイルスB(A、Bはそれぞれ5E8vg)を用い、KO群はブランクコントロールとし無処置とした。網膜下注入は、実施例13の方法に従って行われた。

【0452】

(3) 実施例(一)のステップ(4)の方法によって、網膜電図検査(ERG)を行った。図27は上述の異なるウイルスを網膜下腔注射治療した後のBCDマウスのERG記録結果であり、対照と比べて、ウイルスB群のマウスのERG波幅は明らかな変化がなく、ウイルスA群、ウイルスA+B群、ウイルスC群のマウスのERG波幅はすべて増加し、しかもウイルスA+B群とウイルスC群はウイルスA群より優れた($p < 0.05$)。

【0453】

前述の詳細な説明は、説明および例として提供されるものであり、添付の請求項の範囲を限定することを意図するものではない。本明細書に記載された実施形態の様々な変更は、当業者には明白であり、添付の特許請求の範囲およびそれと同等の方法の範囲内にとどまる。

10

20

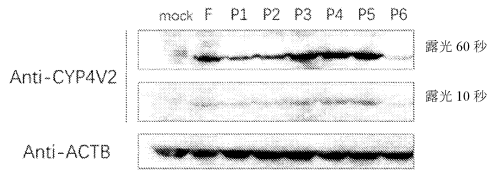
30

40

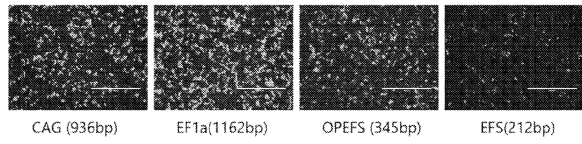
50

【図面】

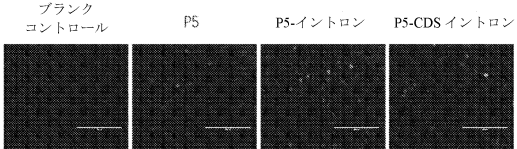
【図 1】



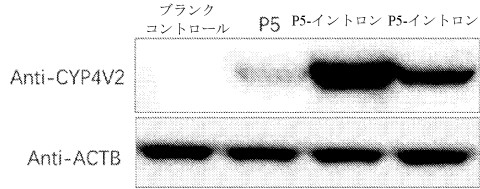
【図 2】



【図 3】

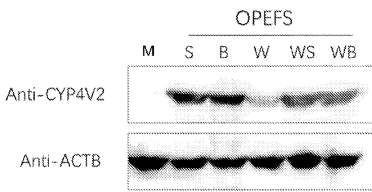


【図 4】

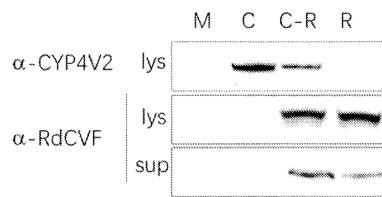


10

【図 5】

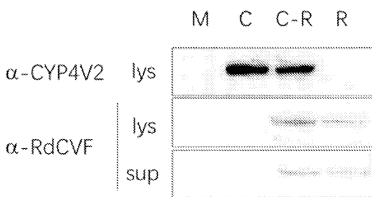


【図 6】

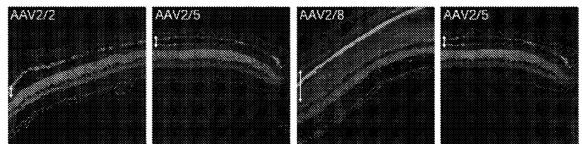


20

【図 7】



【図 8】

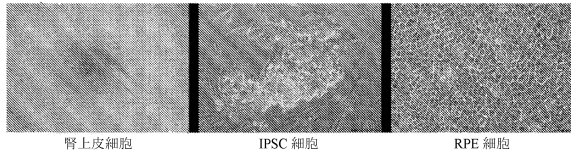


30

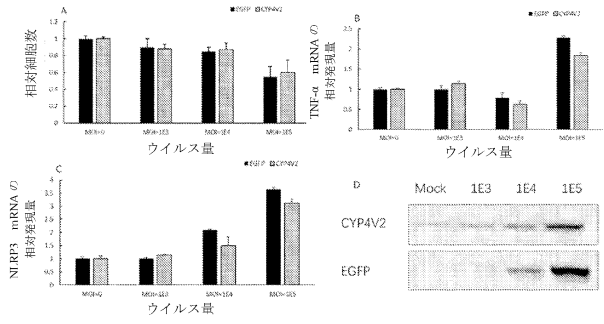
40

50

【図 9】

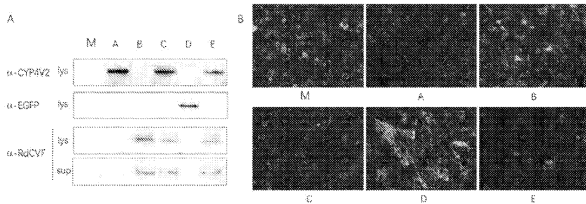


【図 10】

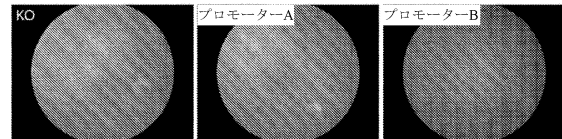


10

【図 11】

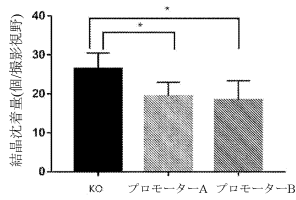


【図 12】

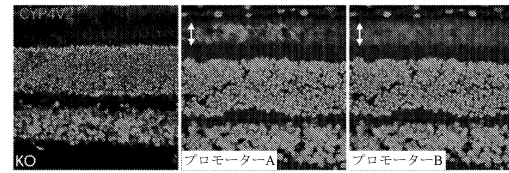


20

【図 13】

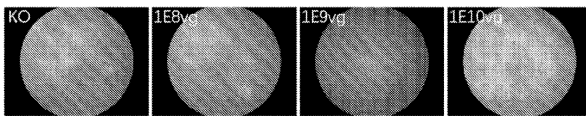


【図 14】

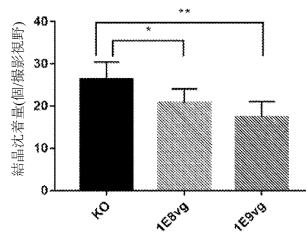


30

【図 15】



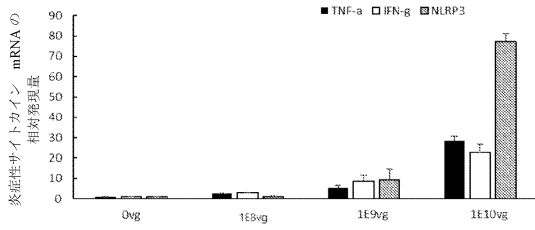
【図 16】



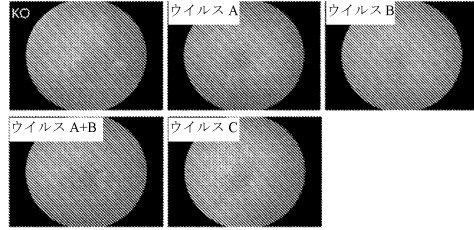
40

50

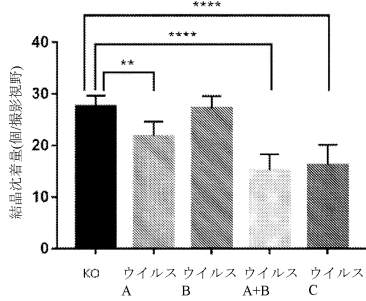
【図 17】



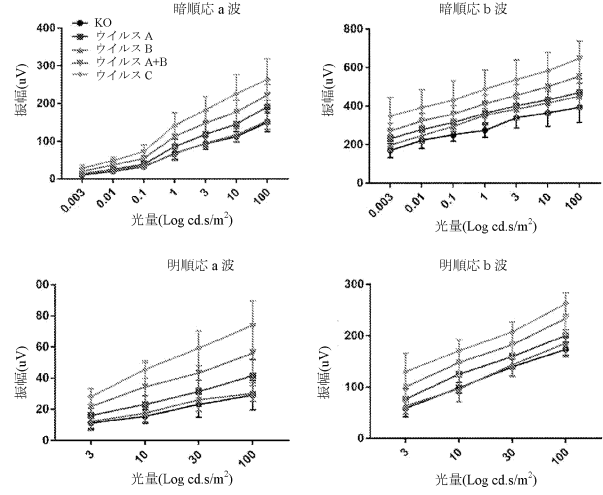
【図 18】



【図 19】



【図 20】



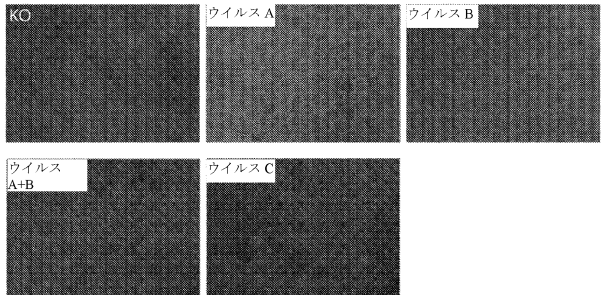
10

20

【図 21】



【図 22】

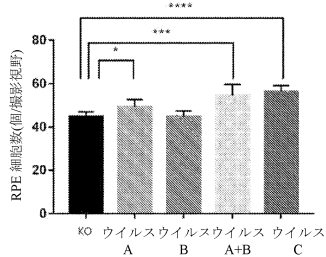


30

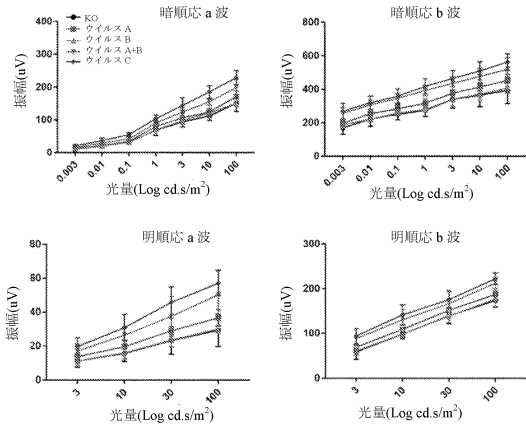
40

50

【 図 2 3 】

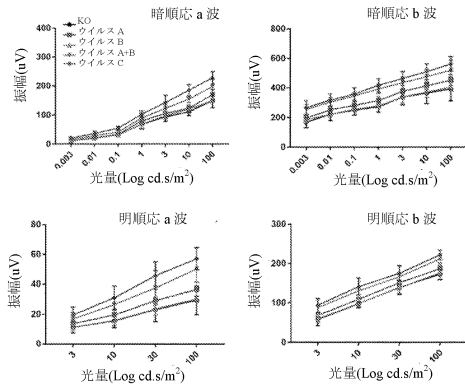


【 図 2 4 】

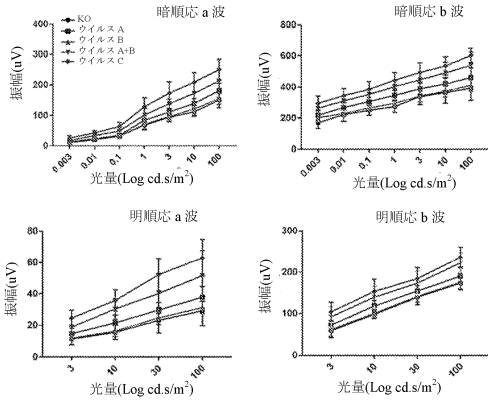


10

【 図 2 5 】



【 図 2 6 】




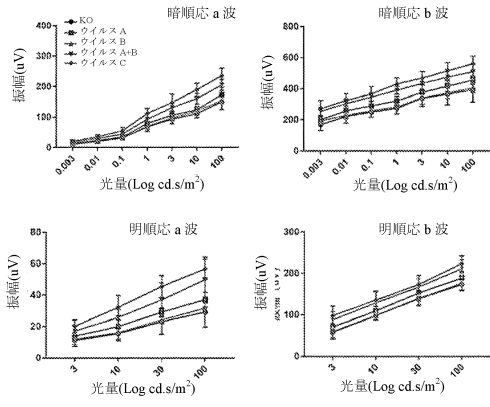
20

30

40

50

【 27】



10

【配列表】

[0007618287000001.xml](#)

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 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02

ハイディエン ディストリクト, ノース ガーデン ロード ナンバー 49

(72)発明者 チェン, シャオホン

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 ジャ, ルイシュエン

中華人民共和国 100191 ペキン, ハイディエン ディストリクト, ノース ガーデン ロード ナンバー 49

(72)発明者 ジャン, ティエンフー

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 ジャン, ファン

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 ゾン, チャオリ

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 フー, サイチャオ

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 シー, ティエンヨン

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 ハオ, ダンダン

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 ジャン, シャンウェイ

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 ペイ, ホンジェ

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 ワン, シュドン

中華人民共和国 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフサイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー 9, ビルディング 1, ブロック エス, ルーム 402

(72)発明者 ゾン, ルーイン

中華人民共和國 102206 ペキン, チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフ
サイエンス パーク, ライフ ロード, ナンバー9, ビルディング 1, ブロック エス, ルー
ム 402

審査官 田ノ上 拓自

- (56)参考文献 国際公開第2019/025984 (WO, A1)
中国特許出願公開第109136266 (CN, A)
特表2003-528568 (JP, A)
Gene Therapy, 2017年, Vol.24, pp.787-800, doi:10.1038/gt.2017.85
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C12N 5/10
A61K 48/00
A61K 35/76
A61K 35/12
A61P 27/02
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)