

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6771474号  
(P6771474)

(45) 発行日 令和2年10月21日(2020.10.21)

(24) 登録日 令和2年10月1日(2020.10.1)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 19 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-544639 (P2017-544639)	(73) 特許権者	505367464
(86) (22) 出願日	平成28年2月19日 (2016.2.19)		ユーシーエル ビジネス リミテッド
(65) 公表番号	特表2018-506982 (P2018-506982A)		イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティ
(43) 公表日	平成30年3月15日 (2018.3.15)		ービー ロンドン, トッテンハム コート
(86) 国際出願番号	PCT/GB2016/050419		ロード 97, ザ ネットワーク ビ
(87) 国際公開番号	W02016/135457		ルディング
(87) 国際公開日	平成28年9月1日 (2016.9.1)	(74) 代理人	110002572
審査請求日	平成31年2月19日 (2019.2.19)		特許業務法人平木国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	1503008.3	(72) 発明者	リッツィ, マッテオ
(32) 優先日	平成27年2月23日 (2015.2.23)		イギリス国 イーシー1ブイ 9イーエル
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		ロンドン, パス ストリート 11-4
			3, ユーシーエル インスティテュート
			オブ オフサルモロジー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 視覚改善のための遺伝子治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光受容体細胞において内因性光感受性シグナリングをモジュレーションする及び／又は光感受性である遺伝子産物をコードする核酸を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを含む医薬組成物であって、

前記遺伝子産物が、ArchTまたはR9APであり、

AAVベクターのカプシドがAAV8由来であり、

患者の網膜における健常杆体光受容体内に前記核酸を導入し、そこで前記遺伝子産物を発現させて、それにより杆体光受容体が応答する光強度の範囲を拡張させ、および／または杆体光受容体が光に応答する速度を増加させることによる、錐体光受容体機能不全および／または変性を有する患者における視覚を改善する方法における使用のための、医薬組成物。

【請求項 2】

AAVベクターのゲノムがAAV2由来である、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項 3】

患者が黄斑変性、色盲またはレーバー先天性黒内障に罹患している、請求項1～2のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 4】

黄斑変性が加齢黄斑変性 (AMD)、遺伝性黄斑変性状態または遺伝性錐体ジストロフィーである、請求項3記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

AMDが滲出型もしくは新生血管AMDまたは地図状萎縮である、請求項4記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

杆体光受容体シグナリングが薄明視および/または明所視照明範囲まで拡張される、請求項1~5のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

杆体が、改善されたモジュレーション強度および/またはより迅速な活性化/不活性化速度を示す、請求項1~6のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

前記方法において、前記ベクターを杆体光受容体内にインビトロで導入し、ついで網膜内に移植する、請求項1~7のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

前記方法において、患者の薄明視および/または明所視が改善される、請求項1~8のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

前記核酸が、光受容体特異的プロモーターまたは光受容体優先型プロモーターの制御下で発現される、請求項1~9のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 【請求項 11】

前記光受容体特異的プロモーターまたは光受容体優先型プロモーターが杆体特異的プロモーターまたは杆体優先型プロモーターである、請求項10記載の医薬組成物。

## 【請求項 12】

前記核酸が、杆体特異的プロモーターの制御下で発現される、請求項1~11のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 【請求項 13】

前記核酸が、ロドプシン(Rho)、神経網膜特異的ロイシンジッパータンパク質(NRL)またはホスホジエステラーゼ6B(PDE6B)プロモーターの制御下で発現される、請求項10~12のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 【請求項 14】

杆体光受容体が応答する光強度の範囲を拡張させ、および/または杆体光受容体が光に  
応答する速度を増加させるように、光受容体細胞において内因性光感受性シグナリングを  
モジュレーションする及び/又は光感受性である遺伝子産物をコードする核酸を含むアデ  
ノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであって、

前記遺伝子産物がArchTまたはR9APであり、

AAVベクターのカプシドがAAV8由来であり、

前記核酸が光受容体特異的プロモーターまたは光受容体優先型プロモーターに機能的に連  
結されている、ベクター。

## 【請求項 15】

前記AAVベクターのゲノムが、AAV2に由来する、請求項14記載のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター。

## 【請求項 16】

前記核酸が、杆体特異的プロモーターの制御下で発現される、請求項14または15記載の  
アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター。

## 【請求項 17】

請求項14~16のいずれか1項記載のベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項 18】

視覚障害の治療または予防のための他の療法と組み合わせて使用するための、請求項1  
~13のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 【請求項 19】

請求項1または3~9のいずれか1項に定義されている視覚の改善のための医薬の製造にお

10

20

30

40

50

ける、請求項14～16のいずれか1項記載のベクターの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者において視覚を改善するための遺伝子治療ベクターの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

マウスおよびヒトを含む多数の哺乳動物種においては、薄暗い光のもとでの視覚を媒介する杆体光受容体の数は錐体光受容体の数より遥かに多い(Curcioら, 2000)。しかし、錐体が一日中働くことが照明によって可能となっている工業化社会においては、杆体媒介性視覚はそれほど重要ではない。生まれつき杆体機能を欠いている多数の患者は偶発的にしか発見されず、実際、自分の視覚異常を認識することができない(Dryja, 2000)。反対に、錐体機能不全が存在する場合には、患者は常に症候性であり、錐体機能不全の程度に応じた視覚障害を患うことが多い。しかし、一部の状態においては、錐体のみ(または大部分は錐体)が喪失し、または機能不全となっており、杆体は比較的維持されたままである。例えば、色盲は重度の遺伝性網膜ジストロフィーであり、生まれつき錐体機能を完全に欠いているが、おそらく、正常な杆体機能を有する(Hessら, 1986; Nishiguchiら, 2005)。CNGA3(Kohlら 1998)およびPDE6C(Changら, 2009; Thiadensら, 2009)を含む複数遺伝子における突然変異がこの疾患に関連づけられている。その疾患原因遺伝子のそれぞれは、光受容体細胞の過分極を引き起こすことにより光を電気信号に変換する錐体光伝達カスケードの必須成分をコードしている。加齢黄斑変性(AMD)においては、視覚障害は、主として、黄斑中心部における錐体に富む中心窩の変性によって引き起こされる。したがって、患者は中心視および明瞭度を喪失するが、しばしば、比較的よく維持された末梢黄斑を有し、したがって、中心窩の外側の錐体の不足によって限定されるある程度有用な残存視覚を有する。

【0003】

杆体は光に非常に感受性であり、これは、薄暗い条件で少量の光を杆体が感知することを可能にする。反対に、錐体はそれほど感受性ではないが、大量の光を処理し、日中に視覚的シグナルを連続的に伝達できる。この機能的相違は、部分的には、光シグナリングの不活性化装置、すなわち、RGS9、R9AP(RGS9BPとしても知られる)およびG 5から構成されるGTPアーゼ複合体の効率によるものである。RGS9は、Gタンパク質に結合したGTPを加水分解する触媒成分であり、一方、R9APおよびG 5は必須構成サブユニットである(Burnsら, 2009; Burnsら, 2010)。重要なことに、R9APは、光受容体外節(この部位において光伝達シグナリングも生じる)において、該複合体をディスク膜に繋ぎ止める(Baselerら, 2002)。R9APの発現はGTPアーゼ複合体のレベルを決定して、R9APより多く産生されたRGS9は迅速に分解されるようである(Martyemyanovら, 2009)。マウス杆体におけるR9APの過剰発現は、GTPアーゼ活性を増強するのに、そしてその不活性化速度を実質的に加速させるのに十分であり、これは単一細胞記録により実証されているとおりである(Krispelら, 2006)。錐体においては、RGS9発現は、杆体の場合より10倍以上高いと推定されている(Cowanら, 1998; Zhangら, 2003)。これは、錐体が光曝露から迅速に回復できる、そしてそれによって連続的光刺激に対する機能性を維持できる基礎となる。それはまた、より迅速な刺激に錐体が応答することを可能にする。実際、臨床的には、RGS9またはR9APにおける遺伝的欠損により引き起こされる光伝達カスケードの不活性化の遅延(遅視症)を伴う患者は、昼盲症および動体視認能力低下を含む錐体媒介性視覚の顕著な障害を有する(Nishiguchiら, 2004; Michaelidesら, 2010)。一方、杆体媒介性視覚は同じ突然変異によってはそれほど影響されない。

【0004】

幾つかの黄斑変性状態、例えば加齢黄斑変性(AMD)および遺伝性黄斑変性状態も錐体機能不全を示すが、正常な又はそれほど損なわれていない杆体機能を示す。黄斑変性は先進諸国における失明の主要原因であり、一生のうちの10年ごとにその罹患率は4倍になる

10

20

30

40

50

ため、平均寿命が増加するにつれてAMDの症例は今後何年間かで増加すると予想されている。AMDの治療薬は既に英国国民健康保険の全薬剤予算の1%以上を占める。進行したAMDを有する患者は中心窩外で固視するように訓練されうるが、杆体細胞の低い再生率および低い退色（bleaching）閾値が、生じる視覚の質を制限する。

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

##### 発明の概括

錐体機能が欠損したマウスを使用して、本発明者らは、光伝達カスケードの不活性化を媒介するGTPアーゼ複合体の決定的に重要な成分であるRgs9-アンカータンパク質（R9AP）のAAV媒介性過剰発現が杆体駆動性網膜電位図の脱感作および「明所視シフト」をもたらすことを実証した。該処理（治療）は、暗所視（より低い光レベル）機能を犠牲にして、未処理細胞より明るい光（およそ2.0 logまで）に杆体が応答することを可能にする。処理網膜を使用する多電極アレイ測定は、網膜神経節細胞が、明所視光レベルで段階的応答を示すことにより、杆体の「明所視シフト」を反映することを示した。回転正弦格子に

10

#### 【0006】

本発明者らはまた、杆体光受容体において、迅速光駆動性プロトンポンプArchT（Hanら，2011）を発現させた。ロドプシンプロモーター（Rho）の制御下でArchT-EGFPを担持するAAV8粒子を成体マウスに皮下注射した。Rho-ArchT-EGFPの発現は杆体光受容体の膜に限局されていた。ArchTの発現は極めて迅速な光応答を可能にし、一方、内因性杆体応答は、維持されており、非形質導入杆体光受容体において観察されるものと同等であった。総合すると、ArchT発現は、暗所視刺激に応答する杆体光受容体の能力を改変しなかったが、それは、より高いレベルの照明に対して迅速な非退色応答で応答する追加的能力を付与した。本発明者らはまた、形質導入杆体が、この迅速な「錐体様」伝達を確実に維持できることを見出した。すなわち、ArchT発現杆体は、錐体光受容体の場合に近い周波数および高い光強度で、網膜神経節細胞（RGC）スパイクの維持を駆動した。錐体媒介性視覚が欠損しているCNGA3-/-およびPDE6C-/-マウスにおけるRho-ArchT-EGFPの発現も明光刺激に対するこれらのマウスの感受性を増大させ、これらのマウスに迅速な視覚を付与した。ArchT発現マウスが追従できた刺激の最大周波数は錐体光受容体のものに類似していた。

20

30

#### 【0007】

総合すると、これらの結果は、錐体に特徴的な光感受性タンパク質をコードする遺伝子または内因性杆体シグナリング機構の速度を増加させる分子をコードする遺伝子で健常杆体光受容体がトランスダクション（形質導入、導入）された後、杆体はむしろ錐体のように挙動し、したがって錐体機能不全を補いつることを示している。これは、錐体機能は低減しているが少なくとも一部の健常杆体は残存している多数の視覚障害の治療にとって有意義である。これは、錐体における機能喪失を回復させることが目的であった従来のアプローチ（Busskampら，2010；米国特許公開第2012258530号）とは対照的である。錐体は機能不全であるが修復可能である状態（例えば、光受容体機能は喪失しているが光受容体-双極性シナプスは無傷でありうる、網膜変性の初期段階）は稀であり、一方、錐体機能不全がより重篤であり又は進行しており、修復され得ない状態、あるいは錐体は完全に喪失しているが、それでも少なくとも一部の健常杆体光受容体は残存している状態は一般的であり（前記を参照されたい）、本発明の方法での杆体における機能の改変はそのような状態において好都合である。更に、本発明は、中心窩錐体が喪失している又は機能不全である状態における視覚を改善する、錐体様杆体の小斑である「偽中心窩（pseudo-fovea）」の生成を可能にする。

40

#### 【0008】

したがって、本発明は、光受容体細胞において内因性光感受性シグナリングをモジュレ

50

ーションする及び／又は光感受性である遺伝子産物をコードする核酸を含むベクターであって、患者の網膜における健常杆体光受容体内に該核酸を導入し、そこで該遺伝子産物を発現させて、杆体光受容体が応答する光強度の範囲を拡張させ、および／または杆体光受容体が光に応答する速度を増加させることによる、錐体光受容体機能不全および／または変性を有する患者における視覚を改善する方法における使用のためのベクターを提供する。

【 0 0 0 9 】

本発明はまた、前記のベクター、該ベクターを含む宿主細胞、およびそのようなベクターを使用して実施される治療方法を提供する。

本発明は以下の実施形態にも関する。

10

項目 [ 1 ] 光受容体細胞において内因性光感受性シグナリングをモジュレーションする及び／又は光感受性である遺伝子産物をコードする核酸を含むベクターであって、患者の網膜における健常杆体光受容体内に前記核酸を導入し、そこで前記遺伝子産物を発現させて、それにより杆体光受容体が応答する光強度の範囲を拡張させ、および／または杆体光受容体が光に応答する速度を増加させることによる、錐体光受容体機能不全および／または変性を有する患者における視覚を改善する方法における使用のための、ベクター。

項目 [ 2 ] 前記核酸が、光刺激に際して杆体過分極（外向き電流）を引き起こすように膜コンダクタンスを変化させるタンパク質をコードする、項目 [1] 記載の使用のためのベクター。

項目 [ 3 ] 前記核酸が、（a）光感受性もしくは光ゲートG共役膜タンパク質、イオンチャネル、イオンポンプもしくはイオントランスポーター、（b）RGS9複合体のメンバー、または（c）内因性杆体シグナリング機構の速度を増加させる別のタンパク質をコードする、項目 [2] 記載の使用のためのベクター。

20

項目 [ 4 ] 光ゲート分子がArchT、Jaws（クルクスハロロドプシン（cruxhalorhodopsin））、iC1C2であるか、またはRGS9複合体のメンバーがR9APである、項目 [3] 記載の使用のためのベクター。

項目 [ 5 ] ウイルスベクターである、前記項目のいずれか記載の使用のためのベクター。

項目 [ 6 ] アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、項目 [5] 記載の使用のためのベクター。

30

項目 [ 7 ] そのカプシドがAAV8由来である、項目 [6] 記載の使用のためのAAVベクター。

項目 [ 8 ] そのゲノムがAAV2由来である、項目 [6] または [7] 記載の使用のためのAAVベクター。

項目 [ 9 ] 患者が黄斑変性、色盲またはレーバー先天性黒内障に罹患している、前記項目のいずれか記載の使用のためのベクター。

項目 [ 1 0 ] 黄斑変性が加齢黄斑変性（AMD）、遺伝性黄斑変性状態または遺伝性錐体ジストロフィーである、項目 [9] 記載の使用のためのベクター。

項目 [ 1 1 ] AMDが滲出型もしくは新生血管AMDまたは地図状萎縮である、項目 [10] 記載の使用のためのベクター。

項目 [ 1 2 ] 杆体光受容体シグナリングが薄明視および／または明所視照明範囲まで拡張される、前記項目のいずれか記載の使用のためのベクター。

40

項目 [ 1 3 ] 杆体が、改善されたモジュレーション強度および／またはより迅速な活性化／不活性化速度を示す、前記項目のいずれか記載の使用のためのベクター。

項目 [ 1 4 ] 前記ベクターを杆体光受容体内にインビトロで導入し、ついで網膜内に移植する、前記項目のいずれか記載の使用のためのベクター。

項目 [ 1 5 ] 患者の薄明視および／または明所視が改善される、前記項目のいずれか記載の使用のためのベクター。

項目 [ 1 6 ] 光受容体特異的プロモーターまたは光受容体優先型プロモーターの制御下で前記核酸が発現される、前記項目のいずれか記載の使用のためのベクター。

項目 [ 1 7 ] 前記光受容体特異的プロモーターまたは光受容体優先型プロモーターが杆

50

体特異的プロモーターまたは杆体優先型プロモーターである、項目[16]記載の使用のためのベクター。

項目[18] ロドプシン(Rho)、神経網膜特異的ロイシンジッパータンパク質(NRL)またはホスホジエステラーゼ6B(PDE6B)プロモーターの制御下で前記核酸が発現される、項目[17]記載の使用のためのベクター。

項目[19] 項目[17]または[18]記載の杆体特異的プロモーターまたは杆体優先型プロモーターに機能的に連結された項目[1]~[4]のいずれか記載の核酸を含む発現カセット。

項目[20] 項目[19]記載の発現カセットを含むベクター。

項目[21] 項目[5]~[8]のいずれかに定義されているウイルスベクターである、項目[20]記載のベクター。

項目[22] 項目[20]または[21]記載のベクターを含む宿主細胞。

項目[23] 項目[1]または[9]~[15]のいずれかに定義されている視覚の改善のための医薬の製造における、項目[1]~[8]、[16]、[17]、[19]または[20]のいずれか記載のベクターの使用。

項目[24] 光感受性遺伝子産物をコードする核酸を患者の網膜における健常杆体光受容体内に導入し、そこで前記遺伝子産物を発現させて、それにより杆体光受容体が応答する光強度の範囲を拡張させ、および/または杆体光受容体が光に応答する速度を増加させることによる、錐体光受容体機能不全を有する患者における視覚を改善する方法。

項目[25] ベクターが項目[1]~[8]、[16]、[17]、[19]または[20]のいずれかに定義されているものである、項目[24]記載の方法。

項目[26] 項目[1]または[9]~[15]のいずれかに定義されているようにして視覚が改善される、項目[23]または[24]記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】杆体光受容体におけるArchTの発現は迅速光駆動電流をもたらす。(a)上パネル：ロドプシンプロモーターの制御下のArchT-EGFP(緑色、左パネルを参照されたい)のAAV8媒介性トランスダクション。錐体では重複は観察されない(紫色：錐体アレスチン、中央パネルを参照されたい、白：DAPI、右パネルを参照されたい)。下パネル：シナプスのレベルでも発現の特異性が観察できる。(b)ArchT-EGFPは、内節および外節を含む杆体光受容体の膜に局限している。(c)ArchT-EGFP発現杆体末端(緑色、左ピーク)および錐体アレスチン陽性錐体末端(紫色、右ピーク)における蛍光の定量は、それぞれ杆体および錐体シナプスが局在している下層に対応する2つの異なるバンドを示している( $n = 2$ )。(d)ArchT発現杆体光受容体の細胞体からの単一細胞(single-cell)記録。10msの530nm光パルス(緑色、垂直棒線を参照されたい)に応答して内因性杆体光伝達によりもたらされる電流(上トレース)は維持された。ArchT生成電流はより速かった(下トレース)。スケールバー：(a)上パネル：50  $\mu\text{m}$ ；(a)下パネルおよび(b)：10  $\mu\text{m}$ 。

【図2-1】ArchT発現は杆体における高頻度応答および網膜神経節細胞への迅速伝達を駆動する。(a)未注射C57BL/6網膜における内因性杆体光誘発性電流。(b)ArchT媒介性電流は遥かに高い刺激周波数に追従できる。(c)応答は刺激提示(緑色垂直棒線)に対して時限化(time-locked)されている。(d)ArchT発現杆体は、減衰を伴うことなく80Hzまでの周波数刺激に応答するが、内因性杆体応答はおよそ20Hzで下落する。

【図2-2】ArchT発現は杆体における高頻度応答および網膜神経節細胞への迅速伝達を駆動する。(e)ArchT発現は杆体光受容体の内因性応答を変化させず、一方、ArchT応答はより明るい光レベルにおいて開始することを示す要約データ。(f)PDE6C<sup>-/-</sup> ArchT発現網膜からの多電極アレイ記録。内因性杆体応答は、20Hz超で、確実な網膜神経節細胞スパイクを誘発しなかった。反対に、ArchT媒介性杆体活性化は、錐体光受容体と同等のレベルへ、網膜神経節細胞の迅速スパイクを駆動した。

【図3-1】杆体のArchT媒介性活性化は迅速高光強度刺激に対する挙動応答を駆動する。(a)上パネル：恐怖条件づけ挙動の概要図。簡潔に説明すると、視覚的刺激をショックと組み合わせた。24時間後、新たな状況において凍り付き(freezing)

10

20

30

40

50

挙動を試験した。下パネル：未注射Cnga3<sup>-/-</sup>およびPDE6C<sup>-/-</sup>マウスは課題を習得しなかった（各グラフにおける左の棒グラフの組合せ）。しかし、ArchT発現はマウスにおける凍り付き挙動を成功裏に駆動した（各グラフにおける右の棒グラフの組合せ）。

【図3-2】杆体のArchT媒介性活性化は迅速高光強度刺激に対する挙動応答を駆動する。（b）視運動試験。ArchT発現マウスは、錐体によって確実に追従されたのと同様の周波数における刺激に追従できる。

【図4】A. Cnga3<sup>-/-</sup>マウスにおける杆体におけるAAV媒介性R9AP過剰発現およびa波不活性化の加速。rAAV2/8.Rho.mR9apで処理されたCnga3<sup>-/-</sup>の眼におけるRGS9発現の増強。R9APの過剰発現は、処理眼（左）においては、未処理眼（右）と比較して、光受容体層全体にわたるRGS9（赤色）に対する免疫反応性の増強をもたらす。ウエスタンブロットは、R9APを発現する眼において、網膜および網膜色素上皮（RPE）の両方において、RGS9の発現の増強を示す（下）。処理眼のRPEにおいて、少量のRGS9タンパク質も検出された。これは、貪食されたディスク膜内に含まれる過剰タンパク質の「流出（spill over）」を反映している可能性がある。スケールバーは25 μmを示す。B. rAAV2/8.Rho.mR9apおよびrAAV2/8.CMV.mR9apで処理されたCnga3<sup>-/-</sup>眼におけるa波振幅回復の速度の増加。同じ動物の処理眼（上）および未処理眼（下）からの、プローブフラッシュ（黒色トレース、時間経過の中央部にピークを伴うトレースを参照されたい）、および2秒の刺激間隔（ISI）で示されている第2フラッシュ（赤色トレース）に関する代表的ERGトレーシング。第2フラッシュが与える小さなa波（矢印）は処理眼においては明らかに視認可能であるが、a波は未処理の他方の眼においては視認できない（矢印）ことに注目されたい。処理眼および未処理眼における種々のISIにおけるa波回復のプロット。rAAV2/8.CMV.mR9ap（n = 5）またはrAAV2/8.Rho.mR9ap（n = 7）が注射された眼は、より短いISIで最も視認可能である未処理眼（n = 5）より速い回復速度を示す。データは平均 ± 標準誤差として示されている。O E：過剰発現。

【図5】Cnga3<sup>-/-</sup>マウスにおけるR9APの過剰発現による杆体による明所視機能の獲得。A. Cnga3<sup>-/-</sup>マウスの杆体におけるR9APの過剰発現による6Hz ERGの応答閾値の上昇および明所視シフト。一方の眼はrAAV2/8.CMV.mR9apで処理され、他方の眼は未処理のままであったCnga3<sup>-/-</sup>マウスからの代表的な6Hz ERGトレース（上パネル）。最高から最低まで0.5 log cd.s/m<sup>2</sup>毎の最も暗いフラッシュ（-6.0 log cd.s/m<sup>2</sup>）から最も明るいフラッシュ（2.0 log cd.s/m<sup>2</sup>；下）までに対する応答から、ERGトレースが整列されている。応答が出現する、より低い閾値フラッシュ強度が増加し、これは、より明るいフラッシュへの応答閾値の上昇と共に生じていることに注目されたい。これは、rAAV2/8.CMV.mR9apで処理された眼における網膜機能の「明所視シフト（photopic shift）」を引き起こす。rAAV2/8.CMV.mR9apまたはrAAV2/8.Rho.mR9apで処理された後の網膜機能の明所視シフトを示す、6Hz ERGの結果の要約（下パネル）。杆体機能が欠損したGnat1<sup>-/-</sup>マウスからのERG応答は錐体媒介性機能を表す。一方、C57BL6マウスからの応答は杆体および錐体の両方の光受容体に由来する。データは最大応答に対する振幅%として示されており、平均 ± 標準誤差として示されている。rAAV2/8.CMV.mR9apで処置されたCnga3<sup>-/-</sup>マウス（Cnga3<sup>-/-</sup> CMV.R9ap; N = 8）、rAAV2/8.Rho.mR9apで処理されたCnga3<sup>-/-</sup>マウス（Cnga3<sup>-/-</sup> Rho.R9ap; N = 6）、未処理のCnga3<sup>-/-</sup>マウス（Cnga3<sup>-/-</sup>未処理; N = 8）、未処理のGnat1<sup>-/-</sup>マウス（Gnat1<sup>-/-</sup>未処理; N = 6）、および未処理のC57BL6マウス（C57BL6未処理; N = 6）からERGを記録した。B. rAAV2/8.CMV.mR9apで処理されたCnga3<sup>-/-</sup>眼における長いフラッシュに対する網膜応答の増強。白長方形はフラッシュの持続時間を示す。rAAV2/8.CMV.mR9apで処理された眼においては、増加した光刺激持続時間で応答が検出可能であることに注目されたい。逆に、反対側の未処理眼は、同一条件で同時に記録された場合、応答をほとんど又は全く示さない。C. rAAV2/8.CMV.mR9apで処理されたCnga3<sup>-/-</sup>眼における明所視条件下の網膜機能の獲得。処理眼は明所視記録条件（20 cd/m<sup>2</sup>の白色背景光）下で応答を示すが、同時に記録された反対側の未処理眼は無応答のままであったことに注目されたい。

【図6】R9APを過剰発現する眼における双極細胞への改変光受容体シグナルの効率的伝達。A. 代表的ERGトレース。飽和フラッシュ（1.9 log cd.s/m<sup>2</sup>）を使用して、Cnga3<sup>-/-</sup>マ

10

20

30

40

50

ウスにおいて rAAV2/8.CMV.mR9ap 注射の後で ERG を記録した (赤色トレース、下トレース)。反対側の眼を未処理対照として用いた (黒色トレース、上トレース)。B. フラッシュに対する双極細胞の活性化の遅延。処理眼および未処理眼において、飽和フラッシュ ( $1.9 \log \text{ cd.s/m}^2$ ) に対する ERG 応答から、a 波および b 波潜時を測定した。C. 一方の眼は rAAV2/8.CMV.mR9ap で処理され (赤色曲線)、他方の眼は未処理のまま (黒色曲線) であった Cnga3<sup>-/-</sup> マウス (N = 5) から記録された a 波および b 波増幅に関する強度応答曲線。全てのデータは平均 ± 標準誤差として示されている。OE: 過剰発現。

【図 7】Cnga3<sup>-/-</sup> マウスにおける R9AP 過剰発現の後の持続可能な視覚認知の獲得。A. 視動性応答により測定されたコントラスト感度関数の改善。左眼において rAAV2/8.Rho.mR9ap で処理された Cnga3<sup>-/-</sup> マウスにおいて、正弦格子に対する時計回り (処理された左目を表す) および反時計回り (未処理の右眼を表す) のヘッドトラッキング運動に関してコントラスト感度関数 (CSF) を別個に測定した。処理眼 (赤色曲線) の CSF は未処理眼 (青色曲線) のものよりも良好であり、それは未接触 Cnga3<sup>-/-</sup> マウス (黒色曲線; 両眼の平均) のものに類似していた。処理眼の CSF は、未接触野生型対照の場合 (緑色; 両眼の平均) と比べて、若干良好とはいわないまでも、同等であったことに注目されたい。全ての群において N = 5。全てのデータは平均 ± 標準誤差として示されている。OE: 過剰発現。B. 視運動試験への長期曝露の後の持続的ロドプシンレベル。走査型分光光度計を使用した眼サンプルの光吸収の代表的記録 (緑色破線枠内の左パネル)。完全光退色の前に測定された眼サンプルの吸収 (赤色トレース) から、完全光退色の後で測定された眼サンプルの吸収 (青色トレース、300 ~ 400nm の上トレース) を差し引くことにより、サンプル中の退色性ロドプシンの量に相当するおよそ 500nm でピークとなる max と関連した、放出光産物に対応するおよそ 380nm でピークとなる min が示された (緑色破線枠内の右パネル)。7.0mW の白色光への 5 分間の曝露の後、Cnga3<sup>-/-</sup> マウスにおける rAAV2/8.Rho.mR9ap で処理された又は未処理の完全散大眼における差スペクトル (max) を測定することにより、ロドプシン退色速度を評価した (左下; 平均 ± 標準誤差)。また、rAAV2/8.Rho.mR9ap の片側注射の後の視運動試験への 120 分までの曝露の後、Cnga3<sup>-/-</sup> マウスのロドプシンレベルを測定した (右下; 各時点に関して N = 3)。灰色領域は、一晩の暗順応の後に未接触 Cnga3<sup>-/-</sup> マウス (N = 8) から記録されたロドプシンレベルを示す (平均 ± 標準偏差)。点線は平均を示す。Cnga3<sup>-/-</sup> マウスの未処理眼および rAAV2/8.Rho.mR9ap で処理された眼の両方において、ロドプシンのレベルは少なくとも 2 時間安定したままであることに注目されたい。エラーバーを伴うデータは平均 ± 標準誤差として示されている。

【図 8】R9AP の過剰発現は Pde6c<sup>-/-</sup> マウスにおける杆体光応答の回復速度を増加させる。a 波振幅の 50% 回復に関する時定数 ( ) は、AAV2/8.CMV.mR9ap で注射された Pde6c<sup>-/-</sup> の眼 ( = およそ 5.75 秒) においては、反対側の未処理眼 ( = およそ 11.46 秒) と比較して 50% 減少した。これは処理後の光伝達の不活性化の加速と合致している。N = 6。エラーバーを伴うデータは平均 ± 標準誤差として示されている。

【図 9】R9AP の過剰発現は Pde6c<sup>-/-</sup> マウスにおける強度応答曲線の「明所視シフト」をもたらす。Pde6c<sup>-/-</sup> マウス (N = 6) において、rAAV2/8.CMV.mR9ap で注射された眼は、反対側の未処理眼と比較して、漸増フラッシュ強度に対する 6Hz ERG 応答の明所視シフトを示した。データは最大応答に対する振幅%として示されており、平均 ± 標準誤差として示されている。

【図 10】Cnga3<sup>-/-</sup> マウスにおける rAAV2/8.CMV.mR9ap の注射の 5 カ月後の網膜変性の明らかな証拠を伴わない R9AP 過剰発現の持続的効果。最大振幅に対して正規化された応答プロファイルは 6Hz フラッシュに対する強度応答曲線の「明所視シフト」の存在を証明した。正規化を伴わない同じデータは処理眼における振幅の減少の証拠を示さなかった (下)。データは平均 ± 標準誤差として示されている。

【図 11】rAAV2/8.Rho.mR9ap での野生型マウスの処理は 6Hz ERG 強度応答曲線に対する明らかな効果を示さなかった。C57BL6 マウス (N = 5) において、rAAV2/8.Rho.mR9ap で処理された眼は、反対側の未処理眼の場合と比較して、6Hz ERG 強度応答曲線におけるシフトを示さなかった。データは平均 ± 標準誤差として示されている。



【図 1 2】C57BL6マウスにおけるR9AP過剰発現の後で視覚認知の獲得は無い。左眼のみに  
おいてrAAV2/8.Rho.mR9apで処理されたC57BL6マウスにおいて、回転正弦格子に対する時計  
回り（処理左眼を表す）および反時計回り（未処理右眼を表す）のヘッドトラッキング  
運動に関して、コントラスト感度関数（CSF）を別個に測定した。処理眼（桃色曲線）お  
よび未処理眼（薄青色曲線）の両方のCSFが類似の結果を示した。これは、未接触C57BL6  
マウスの場合（緑色曲線；両眼の平均）に類似していた。全ての群でN = 5。全てのデー  
タは平均 ± 標準誤差として示されている。OE：過剰発現。

【発明を実施するための形態】

【0011】

#### 発明の詳細な説明

本発明のベクターは、遺伝子産物（典型的にはタンパク質）を産生するように発現され  
ると本明細書に記載の眼病態の治療をもたらす核酸を含み、該核酸は、発現カセットを形  
成するようにプロモーターに機能的に連結されている。

【0012】

#### 核酸および遺伝子産物

本発明のベクターが含む核酸がコードする遺伝子産物は光感受性であり、および/または  
は光受容体における内因性光感受性シグナリングをモジュレーションし、本発明の核酸が  
導入された杆体を、むしろ錐体のように挙動させるが、これは、杆体光受容体が応答する  
光強度の範囲を拡張させることにより、および/または光に杆体光受容体が応答する速度  
を増加させることによってもたらされる。したがって、該タンパク質自体が直接的に光感  
受性でありうる。例えば、それは、光刺激の際に過分極（外向き電流）を引き起こすよう  
に杆体における膜コンダクタンスを変化させうる。そのようなタンパク質は、例えば、光  
感受性または光ゲートG共役膜タンパク質、イオンチャネル、イオンポンプまたはイオン  
トランスポーターである。好ましい光感受性タンパク質には、ArchT、Jaws（クルクスハ  
ロロドプシン（cruxhalorhodopsin））（Chuongら、2014）およびiC1C2が含まれる。ある  
いは、該タンパク質自体は直接的に光感受性でなくてもよいが、杆体光受容体細胞におけ  
る内因性光感受性シグナリングを間接的にモジュレーションしうる。そのようなタンパク  
質の例としては、RGS9複合体のメンバー、特にR9AP（RGS9BPとしても知られる）およびG

5が挙げられる。あるいは、該核酸は、内因性杆体シグナリング機構の速度を増加させ  
る任意の他の遺伝子産物をコードしうる。これらの場合の全てにおいて、該配列は、野生  
型タンパク質、または野生型タンパク質の活性を保持する突然変異体もしくは変異体もし  
くはトランケート化体をコードしうる。該核酸はまた、標的細胞型における発現に関して  
コドン最適化されうる。

【0013】

該遺伝子産物の発現の後、杆体は、通常の強度より高い強度の光刺激に対する、未形質  
導入杆体より強い及び/又はより速いモジュレーションを示す。具体例には、改善された  
モジュレーション強度および/またはより速い活性化/不活性化速度が含まれる。したが  
って、本発明に従い形質導入された杆体は、薄明視および/または明所視範囲の照明に対  
して、未形質導入杆体より強く及び/またはより迅速に反応する。好ましくは、暗所視照  
明条件に対する杆体の応答は影響されないか、または実質的には影響されない。すなわち  
、杆体は、薄明に反応する能力を失うことなく、より明るい光に対して強く及び/又は迅  
速に反応する能力を獲得する。

【0014】

#### プロモーターおよび他の調節要素

該発現構築物においては、該遺伝子産物をコードする核酸は、典型的には、プロモータ  
ーに機能的に連結されている。プロモーターは構成的でありうるが、好ましくは、光受容  
体特異的な、または光受容体優先型プロモーター、より好ましくは、杆体特異的な、また  
は杆体優先型プロモーター、例えばロドプシン（Rho）、神経網膜特異的ロイシンジッパ  
ータンパク質（NRL）またはホスホジエステラーゼ6B（PDE6B）プロモーターである。該発  
現カセット内に組込まれるプロモーター領域は任意の長さのものでありうるが、それは、

該遺伝子産物の発現、好ましくは、光受容体特異的な、または光受容体優先型発現、あるいは杆体特異的な、または杆体優先型発現を駆動するのに有効なものでなければならない。

【0015】

光受容体特異的プロモーターは、光受容体のみにおいて又は実質的に光受容体のみにおいて発現を駆動するプロモーターを意味し、例えば、光受容体において、他のあらゆる細胞型におけるより少なくとも100倍強力で発現を駆動するプロモーターを意味する。杆体特異的プロモーターは、光受容体のみにおいて又は実質的に光受容体のみにおいて発現を駆動するプロモーターを意味し、例えば、光受容体において、錐体を含む他のあらゆる細胞型におけるより少なくとも100倍強力で発現を駆動するプロモーターを意味する。光受容体優先型プロモーターは、光受容体において優先的に発現するが他の組織においても或る程度は発現を駆動するプロモーターを意味し、例えば、光受容体において、他のあらゆる細胞型におけるより少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍または少なくとも50倍強力で発現を駆動するプロモーターを意味する。杆体優先型プロモーターは、光受容体において優先的に発現するが他の組織においても或る程度は発現を駆動するプロモーターを意味し、例えば、光受容体において、錐体を含む他のあらゆる細胞型におけるより少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍または少なくとも50倍強力で発現を駆動するプロモーターを意味する。

10

【0016】

プロモーターに加えて1以上の他の調節要素、例えばエンハンサーも存在する。

20

【0017】

ベクター

本発明のベクターは任意のタイプのものであることが可能であり、例えば、それはプラスミドベクターまたは小環状DNAでありうる。

【0018】

しかし、典型的には、本発明のベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターは、例えば、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルスまたはレンチウイルスに基づくものでありうる。ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたはその誘導体でありうる。ウイルスベクター誘導体はキメラ、シャッフルまたはカプシド修飾誘導体でありうる。ウイルスベクターはAAVの天然由来血清型、分離体またはクレードからのAAVゲノムを含みうる。該血清型は例えばAAV2、AAV5またはAAV8でありうる。

30

【0019】

遺伝子治療の有効性は、一般に、供与DNAの適切かつ効率的な送達に依存する。このプロセスは、通常、ウイルスベクターにより媒介される。パルボウイルス科のメンバーであるアデノ随伴ウイルス(AAV)が遺伝子治療において一般に使用される。ウイルス遺伝子を含む野生型AAVはそのゲノム物質を宿主細胞の第19染色体内に挿入する。AAV一本鎖DNAゲノムは2つの逆方向末端反復(ITR)と、構造遺伝子(cap)およびパッケージング遺伝子(rep)を含む2つのオープンリーディングフレームとを含む。

【0020】

治療目的には、治療用遺伝子に加えて、シスで要求される唯一の配列はITRである。したがって、AAVウイルスを以下のように修飾する。すなわち、ウイルス遺伝子をゲノムから除去して組換えAAV(rAAV)を得る。これは治療用遺伝子、2個のITRのみを含む。ウイルス遺伝子の除去は、rAAVがそのゲノムを宿主細胞DNA内に能動的に挿入することを不可能にする。実際、rAAVゲノムはITRを介して融合して環状エピソーム構造を形成し、または既存染色体切断部内に挿入される。ウイルス産生のためには、そのようにrAAVから除去された構造遺伝子およびパッケージング遺伝子をヘルパープラスミドの形態でトランスで供給する。AAVは特に魅力的なベクターである。なぜなら、それは一般に非病原性であり、大多数の人々は、有害な影響を伴うことなく、一生の間にこのウイルスに感染しているからである。

40

【0021】

50

解剖学的バリアおよび免疫調節因子によってもたらされる眼組織の免疫特権は、他の組織においてはAAVにより誘発されうる有害な免疫応答を眼が受けることを回避する（Taylor 2009）。

【0022】

AAVベクターは約4.8kbの比較的小さなパッケージング能およびトランスダクション後の遅い発現開始によって制限される。これらの小さな欠点にもかかわらず、AAVは網膜遺伝子治療に最も一般的に使用されるウイルスベクターとなっている。

【0023】

ほとんどのベクター構築物はAAV血清型2（AAV2）に基づく。AAV2はヘアピン硫酸プロテオグリカン受容体を介して標的細胞に結合する。AAV2ゲノムは、全てのAAV血清型の場合と同様に、幾つかの異なるカプシドタンパク質中に封入されうる。AAV2はその天然AAV2カプシド内にパッケージングされることが可能であり（AAV2/2）、あるいはそれは他のカプシドで偽型化されうる（例えば、AAV1カプシド内のAAV2ゲノム；AAV2/1、AAV5カプシド内のAAV2ゲノム；AAV2/5、およびAAV8カプシド内のAAV2ゲノム；AAV2/8）。

【0024】

rAAVは血清型特異的受容体媒介性エンドサイトーシスにより細胞をトランスダクション（形質導入）する。rAAV導入遺伝子発現の速度に影響を及ぼす主要因は、エンドソーム内でウイルス粒子が脱殻する速度である。そしてこれは、遺伝物質を封入するカプシドのタイプに依存する（同誌）。脱殻後、線状一本鎖rAAVゲノムは、相補鎖のデノボ合成により二本鎖分子を形成することにより安定化される。自己相補的DNAの使用は、二本鎖導入遺伝子DNAを産生することにより、この段階を回避しうる。Natkunarahjahら（2008）は、自己相補的AAV2/8遺伝子発現が、一本鎖AAV2/8と比較して、より迅速な開始およびより高い許容度のものであることを見出した。したがって、第2鎖合成に関連した時間の遅れを回避することにより、標準的な一本鎖構築物からの導入遺伝子発現と比較して遺伝子発現レベルが上昇する。他のAAVシュードタイプ（例えば、AAV2/5）における自己相補的DNAの効果を調べた後の研究は類似結果を示している。この技術における1つの注意点は、AAVは約4.8kbのパッケージング能を有するため、自己相補的組換えゲノムは適切な大きさ（すなわち、2.3kb以下）でなければならないことである。

【0025】

パッケージング能を修飾することに加えて、AAV2ゲノムを他のAAVカプシドで偽型化することは細胞特異性および導入遺伝子発現の速度を改変しうる。AAV2/8はAAV2/2またはAAV2/5より効率的に光受容体をトランスダクションすると報告されている（Natkunarahjahら、2008）。

【0026】

したがって、本発明のベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ゲノムまたはその誘導体を含むうる。

【0027】

AAVゲノムは、AAVウイルス粒子の産生に必要な機能をコードするポリヌクレオチド配列である。これらの機能には、AAVウイルス粒子内へのAAVゲノムの封入（カプシド形成）を含む、宿主細胞におけるAAVの複製およびパッケージング周期において働く機能が含まれる。天然に存在するAAVウイルスは複製欠損型であり、複製およびパッケージング周期の完了のためのトランスでのヘルパー機能の提供に依存する。したがって、AAV repおよびcap遺伝子の追加的除去の存在下、本発明のベクターのAAVゲノムは複製欠損型である。

【0028】

AAVゲノムは一本鎖形態（プラスまたはマイナス鎖）または二本鎖形態でありうる。二本鎖形態の使用は標的細胞内のDNA複製段階の回避を可能にし、したがって、導入遺伝子発現を加速しうる。AAVゲノムはAAVの任意の天然由来血清型または分離体またはクレードからのものでありうる。当業者に公知のとおり、天然に存在するAAVウイルスは種々の生物学的体系に従い分類されうる。

【0029】

一般に、AAVウイルスはその血清型に関して命名される。血清型はAAVの変異体亜種に対応し、これは、そのカプシド表面抗原発現プロファイルゆえに、それを他の変異体亜種から識別するために用いられうる特有の反応性を有する。典型的には、個々のAAV血清型を有するウイルスは、いずれかの他のAAV血清型に特異的な中和抗体と効率的には交差反応しない。AAV血清型には、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10およびAAV11、また、組換え血清型、例えばRec2およびRec3（霊長類の脳から最近同定されたもの）が含まれる。本発明のベクターにおいては、ゲノムは任意のAAV血清型に由来しうる。カプシドも任意のAAV血清型に由来しうる。ゲノムおよびカプシドは同じ血清型または異なる血清型に由来しうる。

【0030】

10

本発明のベクターにおいては、ゲノムはAAV血清型2（AAV2）、AAV血清型4（AAV4）、AAV血清型5（AAV5）またはAAV血清型8（AAV8）に由来することが好ましい。ゲノムはAAV2に由来することが最も好ましいが、本発明の使用で特に関心が持たれる他の血清型にはAAV4、AAV5およびAAV8が含まれ、これらは眼内組織、例えば網膜色素上皮に効率的に形質導入する。カプシドはAAV5またはAAV8、特にAAV8に由来することが好ましい。

【0031】

AAV血清型の総説はChoiら（Curr Gene Ther. 2005; 5(3); 299-310）およびWuら（Molecular Therapy. 2006; 14(3), 316-327）において見出されうる。本発明において使用されるAAVゲノムの配列またはAAVゲノムの要素の配列、例えばITR配列、repまたはcap遺伝子はAAV全ゲノム配列に関する以下のアクセッション番号に由来しうる：アデノ随伴ウイルス1 NC\_002077、AF063497; アデノ随伴ウイルス2 NC\_001401; アデノ随伴ウイルス3 NC\_001729; アデノ随伴ウイルス3B NC\_001863; アデノ随伴ウイルス4 NC\_001829; アデノ随伴ウイルス5 Y18065、AF085716; アデノ随伴ウイルス6 NC\_001862; トリAAV ATCC VR-865 A Y186198、AY629583、NC\_004828; トリAAV株DA-1 NC\_006263、AY629583; ウシAAV NC\_005889、AY388617。

20

【0032】

AAVウイルスはクレードまたはクローンに関しても命名されうる。これは天然由来AAVウイルスの系統学的関係、そして典型的には、共通の祖先に遡られうるAAVウイルスの系統学的群に関するものであり、その全ての後代を包含する。また、AAVウイルスは特定の分離体、すなわち、天然で見出される特定のAAVウイルスの遺伝的分離体に関して命名されうる。遺伝的分離体なる語は、天然に存在する他のAAVウイルスとの限定的な遺伝的混合を受けたAAVウイルスの集団を指し、それにより遺伝的レベルで認識可能に異なっている集団を定める。

30

【0033】

本発明において使用されうるAAVのクレードおよび分離体の例には以下のものが含まれる。

【0034】

クレードA: AAV1 NC\_002077、AF063497、AAV6 NC\_001862、Hu. 48 AY530611、Hu 43 AY530606、Hu 44 AY530607、Hu 46 AY530609。

【0035】

40

クレードB: Hu. 19 AY530584、Hu. 20 AY530586、Hu 23 AY530589、Hu22 AY530588、Hu 24 AY530590、Hu21 AY530587、Hu27 AY530592、Hu28 AY530593、Hu 29 AY530594、Hu63 AY530624、Hu64 AY530625、Hu13 AY530578、Hu56 AY530618、Hu57 AY530619、Hu49 AY530612、Hu58 AY530620、Hu34 AY530598、Hu35 AY530599、AAV2 NC\_001401、Hu45 AY530608、Hu47 AY530610、Hu51 AY530613、Hu52 AY530614、Hu T41 AY695378、Hu S17 AY695376、Hu T88 AY695375、Hu T71 AY695374、Hu T70 AY695373、Hu T40 AY695372、Hu T32 AY695371、Hu T17 AY695370、Hu LG15 AY695377。

【0036】

クレードC: Hu9 AY530629、Hu10 AY530576、Hu11 AY530577、Hu53 AY530615、Hu55 AY530617、Hu54 AY530616、Hu7 AY530628、Hu18 AY530583、Hu15 AY530580、Hu16 AY530581

50

、Hu25 AY530591、Hu60 AY530622、Ch5 AY243021、Hu3 AY530595、Hu1 AY530575、Hu4 AY530602 Hu2、AY530585、Hu61 AY530623。

【 0 0 3 7 】

クレードD: Rh62 AY530573、Rh48 AY530561、Rh54 AY530567、Rh55 AY530568、Cy2 AY243020、AAV7 AF513851、Rh35 AY243000、Rh37 AY242998、Rh36 AY242999、Cy6 AY243016、Cy4 AY243018、Cy3 AY243019、Cy5 AY243017、Rh13 AY243013。

【 0 0 3 8 】

クレードE: Rh38 AY530558、Hu66 AY530626、Hu42 AY530605、Hu67 AY530627、Hu40 AY530603、Hu41 AY530604、Hu37 AY530600、Rh40 AY530559、Rh2 AY243007、Bb1 AY243023、Bb2 AY243022、Rh10 AY243015、Hu17 AY530582、Hu6 AY530621、Rh25 AY530557、Pi2 AY530554、Pi1 AY530553、Pi3 AY530555、Rh57 AY530569、Rh50 AY530563、Rh49 AY530562、Hu39 AY530601、Rh58 AY530570、Rh61 AY530572、Rh52 AY530565、Rh53 AY530566、Rh51 AY530564、Rh64 AY530574、Rh43 AY530560、AAV8 AF513852、Rh8 AY242997、Rh1 AY530556。

【 0 0 3 9 】

クレードF: Hu14 (AAV9) AY530579、Hu31 AY530596、Hu32 AY530597、クローン分離体AV5 Y18065、AF085716、AAV 3 NC\_001729、AAV 3B NC\_001863、AAV4 NC\_001829、Rh34 AY243001、Rh33 AY243002、Rh32 AY243003/。

【 0 0 4 0 】

当業者は、本発明における使用のためのAAVの適当な血清型、クレード、クローンまたは分離体を、それらの一般的知識に基づいて選択しうる。しかし、本発明は、未だ特定または特徴づけされていないかもしれない他の血清型のAAVゲノムの使用を含むと理解されるべきである。AAV血清型はAAVウイルスの感染の組織特異性（指向性）を決定する。したがって、本発明に従い患者に投与されるAAVウイルスにおいて使用される好ましいAAV血清型は杆体光受容体に対する天然指向性または杆体光受容体の感染の高い効率を有するものである。

【 0 0 4 1 】

典型的には、AAVの天然由来血清型または分離体またはクレードのAAVゲノムは少なくとも1つの逆方向末端反復配列（ITR）を含む。本発明のベクターは、典型的には、2つのITR（好ましくは、ゲノムの各末端におけるもの）を含む。ITR配列はシスで作用して機能的複製起点を提供し、ベクターの組換えおよび細胞のゲノムからの切り出しを可能にする。好ましいITR配列はAAV2およびその変異体のものである。AAVゲノムは、典型的には、AAVウイルス粒子のパッケージング機能をコードするrepおよび/またはcap遺伝子のようなパッケージング遺伝子を含む。rep遺伝子はタンパク質Rep78、Rep68、Rep52およびRep40またはそれらの変異体の1以上をコードする。cap遺伝子は1以上のカプシドタンパク質、例えばVP1、VP2およびVP3またはそれらの変異体をコードする。これらのタンパク質はAAV1ウイルス粒子のカプシドを構成する。カプシド変異体は以下に記載されている。

【 0 0 4 2 】

好ましくは、AAVゲノムは患者への投与のために誘導体化される。そのような誘導体化は当技術分野において標準的であり、本発明はAAVゲノムの任意の公知誘導体、および当技術分野で公知の技術の適用により作製されうる誘導体の使用を含む。AAVゲノムおよびAAVカプシドの誘導体化は、例えば、前記のChoiら及びWuらの総説に記載されている。

【 0 0 4 3 】

AAVゲノムの誘導体化は、インビボでの本発明のベクターからのRep-1導入遺伝子の発現を可能にする、AAVゲノムの任意のランケット化または改変形態を含む。典型的には、前記機能を保持しながら最小ウイルス配列を含むように大幅にAAVゲノムをランケット化することが可能である。これは、野生型ウイルスとの該ベクターの組換えのリスクを低減するために、そしてまた、標的細胞内のウイルス遺伝子タンパク質の存在による細胞性免疫応答の誘発を回避するために、安全上の理由からも好ましい。

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

50

典型的には、誘導体は少なくとも1つの逆方向末端反復配列（ITR）、好ましくは、2以上のITR、例えば2個またはそれ以上のITRを含む。ITRの1以上は、異なる血清型を有するAAVゲノムに由来することが可能であり、あるいはキメラまたは突然変異ITRでありうる。好ましい突然変異ITRは、trs（末端レゾリューション部位（terminal resolution site））の欠失を有するものである。この欠失はゲノムの連続的複製を可能にして、コード配列および相補的配列の両方を含有する一本鎖ゲノム、すなわち、自己相補的AAVゲノムを与える。これは標的細胞におけるDNA複製の回避を可能にし、したがって、導入遺伝子発現の加速を可能にする。

【0045】

1以上のITRは、好ましくは、本発明の導入遺伝子およびプロモーターを含有する発現構築物カセットに隣接する。1以上のITRの含有は、ウイルス粒子内への本発明のベクターのパッケージングを補助するために好ましい。好ましい実施形態においては、ITR要素は、誘導体において天然AAVゲノムから保持されている唯一の配列である。したがって、誘導体は、好ましくは、天然ゲノムのrepおよび/またはcap遺伝子ならびに天然ゲノムの他のいずれの配列をも含まない。これは、前記の理由により、そしてまた、宿主細胞ゲノム内への該ベクターの組込みの可能性を低減するために好ましい。また、AAVゲノムのサイズの減少は、導入遺伝子に加えて他の配列要素（例えば、調節要素）をベクター内に組込む際の柔軟性の増加を可能にする。したがって、AAV2ゲノムに関しては、本発明の誘導体においては以下の部分が除去されうるのであろう：1つの逆方向末端反復（ITR）配列、複製（rep）およびカプシド（cap）遺伝子。しかし、インビトロ実施形態を含む幾つかの実施形態においては、誘導体は1以上のrepおよび/またはcap遺伝子、あるいはAAVゲノムの他のウイルス配列を更に含む。

【0046】

誘導体は1以上の天然に存在するAAVウイルスのキメラ、シャッフルまたはカプシド修飾誘導体でありうる。本発明は、AAVの、異なる血清型、クレード、クローンまたは分離体からのカプシドタンパク質配列の、同じベクター内の提供を含む。本発明は、別の血清型のカプシド内への1つの血清型のゲノムのパッケージング、すなわち、シュードタイピング（偽型化）を含む。

【0047】

キメラ、シャッフルまたはカプシド修飾誘導体は、典型的には、1以上の所望の機能がウイルスベクターにもたらされるように選択される。したがって、これらの誘導体は、天然に存在するAAVゲノム（例えば、AAV2のもの）を含むAAVウイルスベクターと比較して、遺伝子送達の効率の増加、免疫原性（体液性または細胞性）の減少、指向性範囲の変化および/または特定の細胞型への標的化の改善を示しうる。遺伝子送達の効率の増加は、細胞表面における受容体または共受容体結合の改善、インターナリゼーションの改善、細胞内および核内への輸送の改善、ウイルス粒子の脱殻の改善、ならびに一本鎖ゲノムから二本鎖形態への変換の改善により、もたらされうる。効率の増加は、それを必要としない組織への投与によりベクター用量が希釈されないように、指向性範囲の変化または特定の細胞集団への標的化にも関連する。

【0048】

キメラカプシドタンパク質には、天然に存在するAAV血清型のカプシドコード化配列の2以上の間の組換えにより作製されるものが含まれる。これは、例えば、マーカー・レスキュー・アプローチにより実施可能であり、該アプローチにおいては、1つの血清型の非感染性カプシド配列を異なる血清型のカプシド配列と共トランスフェクトし、定方向（directed）選択を用いて、所望の特性を有するカプシド配列を選択する。前記の異なる血清型のカプシド配列は、新規キメラカプシドタンパク質を産生させるために細胞内の相同組換えによって改変されうる。キメラカプシドタンパク質には、2以上のカプシドタンパク質の間、例えば、異なる血清型のカプシドタンパク質の2以上の間で、特定のカプシドタンパク質ドメイン、表面ループまたは特定のアミノ酸残基を転移させるようにカプシドタンパク質配列を操作することにより作製されるものも含まれる。

## 【0049】

シャッフルまたはキメラカプシドタンパク質はDNAシャッフリングまたはエラープロードンPCRによっても作製されうる。関連AAV遺伝子の配列（例えば、複数の異なる血清型のカプシドタンパク質をコードするもの）をランダムに断片化し、ついで自己プライミングポリメラーゼ反応（これは配列相同性の領域において乗換えをも引き起こしうる）において該断片を再集合させることにより、ハイブリッドAAVカプシド遺伝子が作製されうる。幾つかの血清型のカプシド遺伝子をシャッフリングすることによりこのようにして作製されたハイブリッドAAV遺伝子のライブラリーをスクリーニングして、所望の機能を有するウイルスクローンを特定することが可能である。同様に、エラープロードンPCRを用いてAAVカプシド遺伝子をランダムに突然変異させて、変異体の多様なライブラリーを作製し、ついでそれを所望の特性に関して選択することが可能である。

10

## 【0050】

天然野生型配列に対して特定の欠失、置換または挿入を導入するために、カプシド遺伝子の配列を遺伝的に改変することも可能である。特に、カプシドコード化配列のオープンリーディングフレーム内に、あるいはカプシドコード化配列のNおよび/またはC末端において、無関係なタンパク質またはペプチドの配列を挿入することにより、カプシド遺伝子を改変することが可能である。

## 【0051】

前記の無関係なタンパク質またはペプチドは、有利には、標的細胞への結合の改善をもたらされ、特定の細胞集団への該ベクターの標的化の特異性が改善されるよう、特定の細胞型に対するリガンドとして作用するものでありうる。

20

## 【0052】

前記の無関係なタンパク質は、製造プロセスの一部としての、ウイルス粒子の精製を補助するもの、すなわち、エピトープまたはアフィニティタグであってもよい。挿入部位は、典型的には、ウイルス粒子の他の機能、例えばウイルス粒子のインターナリゼーション、輸送を妨げないように選択される。当業者は、彼らの一般的知識に基づいて、挿入のための適当な部位を特定することが可能である。個々の部位はChoiら（前記）に開示されている。

## 【0053】

本発明はまた、天然AAVゲノムの場合とは異なる順序および配置のAAVゲノムの配列の提供を含む。本発明はまた、1以上のAAV配列または遺伝子の、別のウイルスからの配列による、または2以上のウイルスからの配列から構成されるキメラ遺伝子による置換を含む。そのようなキメラ遺伝子は、異なるウイルス種の関連ウイルスタンパク質の2以上からの配列から構成されうる。

30

## 【0054】

本発明のベクターは、本発明のプロモーターおよび発現構築物を含むウイルスベクターの形態をとる。

## 【0055】

本発明はまた、本発明のベクターを含むAAVウイルス粒子を提供する。本発明のAAV粒子はトランスカプシド（transcapsidated）形態を包含し、この場合、1つの血清型のITRを有するAAVゲノムまたは誘導体が、異なる血清型のカプシド内にパッケージングされている。本発明のAAV粒子はモザイク形態をも包含し、この場合、2以上の異なる血清型からの未修飾カプシドタンパク質の混合物がウイルスエンベロープを構成する。AAV粒子は、カプシド表面に吸着されたりガンドを含有する化学修飾形態をも包含する。例えば、そのようなリガンドは、特定の細胞表面受容体を標的化するための抗体を包含しうる。

40

## 【0056】

本発明はまた、本発明のベクターまたはAAVウイルス粒子を含む宿主細胞を提供する。

## 【0057】

本発明のベクターは、遺伝子治療用ベクターの提供のための当技術分野で公知の標準的な手段により製造されうる。したがって、十分に確立されたパブリックドメインのトラン

50

スフェクション、パッケージングおよび精製方法が、適当なベクター調製物を製造するために使用されうる。

【0058】

前記のとおり、本発明のベクターは、本発明のプロモーターまたはその変異体に加えて、天然に存在するAAVウイルスの完全ゲノムを含みうる。しかし、一般には、誘導体化ゲノムが使用され、例えば、少なくとも1つの逆方向末端反復配列（ITR）を有するが、いずれかのAAV遺伝子、例えばrepまたはcapを欠いていてもよい誘導体を使用される。

【0059】

そのような実施形態においては、AAVウイルス粒子への誘導体化ゲノムの集合をもたらすために、AAVおよび/またはヘルパーウイルス機能を付与する追加的な遺伝子構築物が該誘導体化ゲノムと共に宿主細胞において提供される。これらの追加的構築物は、典型的には、構造AAVカプシドタンパク質、すなわち、cap、VP1、VP2、VP3をコードする遺伝子、およびAAVのライフサイクルに要求される他の機能をコードする遺伝子、例えばrepを含む。該追加的構築物上に提供される構造カプシドタンパク質の選択がパッケージ化ウイルスベクターの血清型を決定する。

10

【0060】

本発明における使用のための特に好ましいパッケージ化ウイルスベクターは、AAV5またはAAV8カプシドタンパク質と組み合わせられたAAV2の誘導体化ゲノムを含む。前記のとおり、AAVウイルスは複製不全であり、したがって、AAV複製を可能にするために、典型的には、ヘルパーウイルス機能、好ましくはアデノウイルスヘルパー機能も1以上の追加的構築物上に提供される。

20

【0061】

前記の追加的構築物の全てはプラスミドまたは他のエピソーム要素として宿主細胞中に提供してもよく、あるいは1以上の構築物は宿主細胞のゲノム内に組み込まれてもよい。

【0062】

医薬組成物、投与量および治療

本発明のベクターは医薬組成物へと製剤化されうる。これらの組成物は、該ベクターに加えて、医薬上許容される賦形剤、担体、バッファー、安定化剤または当業者によく知られた他の物質を含みうる。そのような物質は無毒性であるべきであり、有効成分の有効性を阻害するものであるべきではない。担体または他の物質の厳密な性質は、投与経路（すなわち、本発明においては網膜、網膜下または硝子体内への直接注射）に応じて、熟練者によって決定されうる。

30

【0063】

医薬組成物は典型的には液体形態である。液体医薬組成物は一般には液体担体、例えば水、石油、動物または植物油、鉱油または合成油を含む。生理食塩水、塩化マグネシウム、デキストロースもしくは他の糖類溶液またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールも含まれうる。幾つかの場合には、界面活性剤、例えばプルロニック酸（PF68）0.001%が使用されうる。

【0064】

罹患部位における注射のためには、有効成分は、適当なpH、等張性および安定性を有する発熱物質非含有水溶液の形態となろう。当業者は、例えば、等張性ビヒクル、例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸加リンゲル注射液、ハルトマン液を使用して、適当な溶液を調製することが十分に可能である。必要に応じて、保存剤、安定化剤、バッファー、抗酸化剤および/または他の添加剤が配合されうる。

40

【0065】

遅延放出のためには、該ベクターは、当技術分野で公知の方法に従い徐放用に製剤化された医薬組成物（例えば、生体適合性ポリマーから形成されるマイクロカプセル、またはリポソーム担体系）中に含有されうる。本発明のベクターおよび/または医薬組成物はキット内に包装（パッケージ）されうる。

【0066】

50



一般に、網膜、網膜下または硝子体内への本発明のベクターの直接送達、典型的には注射による直接送達が好ましい。したがって、網膜、網膜下腔または硝子体内腔への送達が好ましい。また、ベクターは杆体光受容体内に導入され、ついでそれは細胞移植により網膜内に導入されうる。

#### 【0067】

本発明のベクターおよび/または医薬組成物はまた、視覚障害の治療または予防のためのいずれかの他の療法と組み合わせて使用されうる。例えば、それらは、VEGFアンタゴニスト、例えば抗VEGF抗体、例えばベバシズマブ (Bevacizumab) もしくはラニビズマブ (Ranibizumab) または可溶性受容体アンタゴニスト、例えばアフリベルセプト (Aflibercept) を使用する公知治療と組み合わせて、AMDまたは本明細書に記載されている他の眼障害

10

#### 【0068】

投与量および投与レジメンは、該組成物の投与に関する責任を有する医師の通常の技量の範囲内で決定されうる。本発明のベクターの用量は、種々のパラメータに従い、特に、治療される患者の年齢、体重および状態；投与経路；および要求されるレジメンに従い決定されうる。再び、医師は、いずれかの特定の患者に関する、要求される投与経路および投与量を決定することが可能である。

#### 【0069】

典型的な単回用量は、形質導入を要する網膜組織の量に応じて、 $10^{10} \sim 10^{12}$ 個のゲノム粒子である。ゲノム粒子は、本明細書においては、配列特異的方法（たとえば、リアルタイムPCR）で定量されうる一本鎖DNA分子を含有するAAVカプシドと定義される。その用量は単回用量として提供されうるが、多眼のために反復投与可能であり、あるいは、何らかの理由（例えば、手術合併症）でベクターが網膜の適切な領域を標的化しなかった可能性がある場合には、反復投与可能である。該治療は、好ましくは、各眼への1回の永久的治療であるが、例えば将来の及び/又は異なるAAV血清型での反復注射も考慮されうる。

20

#### 【0070】

##### 治療

本発明のベクターは、錐体の機能不全、変性または非存在が認められるが少なくとも幾つかの健常杆体が残存する任意の眼病態を治療するために使用されうる。錐体機能は完全または部分的に欠損していることがありうるが、例えば、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%またはそれ以上欠損していることがありうる。健常杆体は、暗所視レベルでの光の認知に関して、正常または部分的な杆体機能、例えば、正常な杆体機能の少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%または少なくとも90%を果たすことができる杆体である。

30

#### 【0071】

したがって、本発明のベクターを使用して治療されうる状態（病態）には、黄斑変性、色盲およびレーバー先天性黒内障が含まれる。黄斑変性は加齢黄斑変性 (AMD)、例えば滲出型もしくは新生血管AMDまたは地図状萎縮、遺伝性黄斑変性状態または遺伝性錐体ジストロフィーでありうる。一部の実施形態においては、本発明は、中心窩錐体が喪失している又は機能不全である状態において視覚を改善する錐体様杆体の小斑である「偽中心窩 (pseudo-fovea)」の生成を可能にする。一般に、本発明のベクターで治療される患者はヒト患者である。彼らは男性であっても女性であってもよく、あらゆる年齢の者でありうる。

40

#### 【0072】

以下の実施例は本発明を例示するものである。

#### 【実施例】

#### 【0073】

実施例1 - ArchT実験のための方法

動物

50

野生型マウス (C57BL/6J) を Harlan Laboratories (Blackthorn, UK) から購入した。CNGA3-/- および PDE6C-/- マウスを社内で飼育した。全てのマウスを周期的光 (12時間の明-暗) 条件下で維持した。檻の照明は明期中は7フットキャンドルであった。全ての実験は地域施設内動物管理使用委員会 (local Institutional Animal Care and Use Committees) (UCL, London, UK) により承認されており、北米神経科学学会 (Society for Neuroscience) および視覚と眼科学研究協会会議 (Association for Research in Vision and Ophthalmology) (Rockville, MD) によって採択された動物の管理および使用に関するガイドラインに合致している。

#### 【 0 0 7 4 】

##### プラスミド構築、ウイルス産生および注射方法

導入遺伝子構築物 (ArchT-EGFP) は Ed Boyden 教授 (MIT, USA) によって快く提供されたものであり、蛍光タンパク質EGFPに融合したArchT遺伝子のcDNA配列を含有する。当該プラスミドをAAV8内にパッケージングして組換えAAVウイルスベクターAAV8.hRho.ArchT-EGFPを得た。既に記載されている三重一過性トランスフェクション法により、組換えAAV8ベクターを生成した。そのプラスミド構築物、AAV血清型特異的パッケージングプラスミドおよびヘルパープラスミドをポリエチレンイミン (Polysciences Inc.) と混合してトランスフェクション複合体を形成し、ついでこれを293T細胞に加え、72時間放置した。該細胞を集め、濃縮し、細胞を溶解してベクターを遊離させた。AVBセファロースカラム (GE Healthcare) を使用してAAV8を精製した。両方を1×PBS中で洗浄し、100~150 μLの体積に濃縮した。明確なプラスミド対照および精製ウイルスストックから調製された比較用ドットプロットDNAによりウイルス粒子力価を決定した。全実験に用いた精製ベクター濃度は  $5 \times 10^{12}$  ウイルス粒子/mlであった。本発明者らのグループにより既に記載されているようにして網膜下注射を行った。その注射はそれぞれ2 μlの2回の注射からなるものであった。

#### 【 0 0 7 5 】

##### 免疫組織化学

動物を安楽死させ、眼球を摘出し、角膜、水晶体および虹彩を取り出した。網膜切片に関しては、眼杯を4% パラホルムアルデヒド (PFA) 中で室温で1時間固定した後、最適切断温度 (optimal cutting temperature) (OCT) メディウム中に包埋した。30 μmの凍結切片を矢状方向で切断し、PBSで洗浄し、10% 正常ヤギ血清 (NGS)、3% ウシ血清アルブミン (BSA) および0.1% Triton-X100中でブロックした。それぞれのサンプルを、ウサギ抗錐体アレステチン (1:500希釈) を使用して、ブロック溶液中で一次抗体と共に4で一晩インキュベートした。PBS洗浄後、ヤギ抗ウサギAlexa Fluor 546 (#A11035)、ヤギ抗マウスAlexa Fluor 633 (#A21052) およびストレプトアビジンAlexa Fluor 633 コンジュゲート (#S21375) を含む二次抗体 (全て1:500希釈, life technologies) のそれぞれの組合せを使用してサンプルを標識した後、これらをDAPIで対比染色し、DAKO蛍光マウンティングメディウム (DAKO, S3023, Denmark) でマウントした。共焦点顕微鏡法 (Leica DM5500Q) により画像を得た。

#### 【 0 0 7 6 】

##### 単一光受容体サクション記録

動物を実験開始前に12時間暗順応させた。末端手術面麻酔を誘導するために、ケタミン-ドルミトール麻酔薬混合物の過剰用量を腹腔内経路でマウスに投与した。ついでマウスを頸椎脱臼により犠死させ、眼球摘出した。眼を薄暗い遠赤色照明下で解剖した。単離された網膜を1% 低融点アガロース溶液中に包埋し、ついでビブロットム (vibrotome) (Leica) を使用して厚さ230 μmのエンフェース (en face) 切片へと切断した。切片を記録チャンパー内にマウントし、100 μm 9-シスレチナール (Sigma) および0.2% BSA (Sigma) を含有するカーボゲン (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) 飽和Amesメディウムで灌流した。フィードバック制御下のインライン発熱体 (Scientifica) を使用して灌流溶液の温度を37 °Cに維持した。Narishige PC-10パーチカルプラーを使用して、繊維ホウケイ酸ガラス毛細管 (Harvard Apparatus Ltd) から非常に低い抵抗 (1~2 MΩ) のパッチピペットを作製した。ピ

ペットを外液で満たし、ヘッドステージ上にマウントし、先端に小さな圧力（およそ30mbar）を加えた。可視化を補助するために赤外線照明および顕微鏡を使用して、該ピペットを、網膜の表面上に配置し、ついで光受容体セグメントが無傷できれいに並んで現れるまで該切片内へおよそ50  $\mu$ m下げた。ピペットの先端にわたって抵抗をモニターするために100ms、10mVの試験パルスを用いて、ピペットの先端が網膜組織を通してゆっくり進むにつれてピペットの先端に僅かな陰圧をかけた。抵抗がおよそ20~30Mに増加したら、光誘発性応答を試験した。液体ライトガイドに連結されたLED光源（ピーク波長530nm）からの光刺激を顕微鏡対物レンズ（Olympus）を通じて送達した。減光フィルターを使用して、光刺激の強度を厳密に制御した。光刺激は、P-Clampソフトウェア（Molecular Devices）を使用してプログラムされた矩形波パルスからなり、LEDドライバー（Thorlabs）と連動したDACボード（Axon Instruments）を介して伝達された。Multiclamp 700B増幅器（Molecular Devices）を使用して電気生理学的記録を行った。データを20kHzでデジタル化した。

#### 【0077】

##### MEA記録

実験開始前に動物を12時間暗順応させた。末端手術面麻酔を誘導するために、ケタミン-ドルミトール麻酔薬混合物の過剰用量を腹腔内経路でマウスに投与した。ついでマウスを頸椎脱臼により犠死させ、眼球除去した。カーボゲン（95% 酸素，5% 二酸化炭素）飽和Amesメディウム（Sigma）中、薄暗い赤色光下で眼を解剖した。可能な限り多くの硝子体を網膜表面から取り出すように留意しながら、角膜および水晶体を取り出した。RPEを網膜から分離し、直径1~3mmの平らなペタルを網膜「カップ」から切り取った。この網膜ペタルを神経節細胞側を下にして多電極アレイの表面上に配置し、無反応性白金線（Sigma）およびナイロンから構成される環状ハーム（harm）を使用して該ペタルを適切な位置に維持した。記録の初めから終わりまで、該組織をカーボゲン飽和Amesメディウム（Sigma）で灌流し、36.5 の温度で維持した。暗所視または薄明視条件を含む記録のために、灌流メディウムは0.2% BSA（Sigma）中の100  $\mu$ Mの濃度の9-シスレチナル（Sigma）を含むよう調製された。100  $\mu$ m間隔のタングステン電極からなる有孔性60-電極記録アレイ（Multi Channel Systems）を使用して、神経節細胞細胞外電位を記録した。電圧変化を増幅し、MC Rackソフトウェア（MultiChannel Systems）を使用してMC Cardシステムにより50 kHzでデジタル化した。

#### 【0078】

##### 電気生理学的データ分析

IgorPro 6における特注マクロを使用して電気生理学的データを分析した。振幅閾値アルゴリズムを使用してシナプス電流および電位を検出した。該アルゴリズムにおいては、事象検出に関する閾値はベースラインノイズ（典型的には約10pA）の標準偏差の2倍に設定された。全ての電気生理学的データの注意深い精査により、検出電流および電位を手作業で検証した。

#### 【0079】

##### 恐怖条件づけ

商業的に入手可能な恐怖条件づけシステム（Med Associates）を使用して、マウスを訓練し、試験した。盲検条件を確保するために、訓練および試験を行う実験者にはマウスの系統および処理条件に関して常に隠されていた。簡潔に説明すると、装置は、消音小室内に配置されたステンレス鋼格子床を有する条件づけチャンバー（20×30cm）からなるものであった。据え付けられた赤外線デジタルビデオカメラ（30フレーム/秒の取得速度）および赤外線照明を使用して、訓練および試験中にマウスの挙動を絶えずモニターした。ビデオ・フリーズ（Video Freeze）ソフトウェア（Med Associates）を使用して、光刺激およびショックの送出を制御した。光刺激は、条件づけチャンバーの側板上に位置するArduinoインターフェース（Arduino Software）を介して生じる単一LED（530nm, Thorlabs）5 Hz 50ms完全輝度点滅からなるものであった。訓練および試験が行われる状況が異なったものとなることを保証するために、床および曲面壁パネルを試験セッション用チャンバー

内に挿入した。杆体活性化の可能性を低減するために背景白色光を使用し、マウス網膜に到達する光の量を増加させるために瞳孔をトロピカミド点眼薬で散大させた。

#### 【0080】

マウスをチャンバー内に配置し、1回の条件づけセッション（これは、2秒間の0.65mAの足ショックと共に終結する5秒間の光刺激の6ペアリングからなる）に付した。試験と試験との間の間隔を疑似ランダム化した（平均間隔90秒）。訓練セッション後、マウスを収容檻に戻した。訓練の24時間後、視覚手がかり想起（visually cued memory recall）に関してマウスを試験した。マウスを試験チャンバー内に配置し、合計360秒間モニターした。条件づけ光刺激を試験セッションの最後の120秒間にわたって連続的に与えた。全データを取得し、VideoFreezeソフトウェア（Med Associates）により自動的にスコア化した。簡潔に説明すると、該ソフトウェアを較正した後、動物をチャンバー内に配置する。ついで該ソフトウェアが、各ビデオフレーム間で生じるピクセル変化を測定する。運動閾値を可能な限り低く（20運動指数単位）設定し、最も高感度な運動読出し（read-out of motion）が保証されるよう、凍り付きカウント（freezing count）をフレーム率に設定した。光手がかり想起（light cued memory recall）を評価するために、凍り付き挙動（freezing behaviour）の時間比率を光刺激開始の直前および後の2分間について平均した。統計的有意性を一元配置分散分析（ANOVA）で評価した。結果は平均±S.E.Mで示されている。

10

#### 【0081】

オプトモトリー（Optomotry）

20

回転正弦格子（OptoMotry, Cerebral Mechanics）に対するマウスの視運動応答を観察することにより、視力を測定した。側頭部から鼻へ方向における運動のみがトラッキング（追跡）応答を生じさせるため、用いたプロトコールは、模様（パターン）回転に対する左右の眼の同等でない感度に基づいて、右眼および左眼の視力の、独立した尺度を与える。結果として、右眼および左眼は、それぞれ反時計回り（CCW）および時計回り（CW）の回転に最も高感度である。応答が存在する閾値を決定するために、異なる時間周波数の刺激を用いた。二重盲検二者択一強制選択法を用いた。該方法においては、模様回転の方向、それがArchTで処理された又は未処理のCNGA3-/-またはPDE6C-/-マウスまたは年齢がマッチした野生型対照動物（C57BL6）のいずれであるかは、観察者に隠されていた。4回の試験を別々の4日間で行った後、視力を、試験した動物の両眼において測定し、平均し、または各眼に関して別々に分析した。注射したマウスにおいて、年齢がマッチした同質遺伝子的対照と共に、処理の3～10週間後に測定を行った。

30

#### 【0082】

実施例2 - 杆体光受容体におけるArchT発現は、迅速な非退色応答で応答する能力を付与する

杆体媒介視は、単一光子検出を含む低い光レベルに関して最適化される。しかし、杆体は光に対する杆体応答の迅速な開始および回復に適合できない（Fuら，2007，Pughら，1999）。種々の環境における確実な視覚を保証するのに有用なこの機能的相違は、中心窩内の高密度錐体の変性し、加齢黄斑変性のような病態において錐体媒介性視覚が失われた場合には減弱する（de Jong 2006）。より迅速に杆体が刺激に対して応答し回復できるのであれば、これが、錐体の喪失によって引き起こされる機能的障害を軽減するのかどうかを調べた。

40

#### 【0083】

迅速光駆動性プロトンポンプ（ArchT）（Hanら，2011）を杆体光受容体において発現させた。ロドブシンプロモーター（Rho）の制御下でArchT-EGFPを含有するAAV8粒子を成体マウスの網膜下に注射した。Rho-ArchT-EGFPの発現は杆体光受容体の膜に局限していた（図1a～b）。Rho-ArchT-EGFPを発現する杆体、および錐体のシナプス終末は免疫組織化学検査後に容易に区別できた（図1c）。錐体の選別集団に対する定量的PCRが証明したところによると、Rho-ArchT-EGFP発現は杆体集団に特異的であり、毒性の明白な徴候はAAV8注射の6カ月後まで観察されなかった。ArchTの発現は極めて迅速な光応答を可能にし、一方

50

、内因性杆体応答は維持され、未形質導入杆体光受容体において観察されたものと同等であった（図1d）。ArchT発現杆体から記録された光誘発性電流は、試験した全てのマウスモデルにおいて、内因性杆体電流よりもかなり速い速度を示した（図2a～b）。これらの速度は、両方の杆体（これらはおよそ20Hzで低下した）（図2a～c）および錐体（Fuら，2007）の限界より遥かに高い80Hzまで光誘発性電流をモジュレーションすることを可能にした。

#### 【0084】

驚くべきことに、ArchT発現は杆体光受容体の特性を変化させない一方で、迅速非退色応答で応答する能力を付与した（図2e）。

#### 【0085】

実施例3 - ArchT発現杆体は、錐体光受容体のものに近い周波数および高い光強度で持続的RGCスパイクを駆動する

つぎに、杆体により駆動される回路網が、通常より迅速な杆体駆動性視覚に追従できるのかどうかを調べた。杆体および錐体経路は幾つかの類似性および幾つかの顕著な相違を示し、したがって、杆体回路網が迅速な「錐体様」伝達を確実に持続させることができるかどうかは明らかではない（Wassleら，2004）。杆体はOFF「錐体」双極細胞と直接接触することが示されており（Soucyら，1998およびHackら，1999）、ペア（paired）パルス刺激は、この代替経路が錐体～OFF-双極細胞と同じくらい迅速でありうることを示唆している（Liら，2010）。しかし、この応答をどのくらい持続できるのか、および杆体（ON）双極細胞が迅速な伝達を持続させることができるのかどうかは明らかではない。更に、杆体シナプス終末は錐体と比べて異なるサイズおよび超微細構造を有し、杆体双極細胞は網膜神経節細胞（RGC）に直接は接触せず、AIIアマクリン細胞を伴う経路を介してのみ接触する（Wassleら，2004）。杆体経路が達成できる最大速度を調べるために、杆体媒介性RGC出力を分離するために錐体機能を欠くマウスモデルにおけるRGCからの多電極記録を行った。未形質導入網膜におけるRGCにおける杆体駆動性応答は高い光レベルで退色し、およそ20Hzより高い刺激周波数に追従することができなかった（図2f）。

#### 【0086】

反対に、ArchT発現杆体は、錐体光受容体の場合に近い周波数および高い光強度で持続的RGCスパイクを駆動した。

#### 【0087】

実施例4 - Rho-ArchT-EGFPの発現は、錐体媒介性視覚を欠くマウスの、明光刺激に対する感受性を増大させた

正常より迅速なこの杆体視覚が有用であるためには、マウスは、ArchT媒介性電流を用いて明るく迅速な刺激に確実に応答することが可能であるはずだと判断された。錐体媒介性視覚を欠くCNGA3<sup>-/-</sup>およびPDE6C<sup>-/-</sup>マウス（Bielら，1999およびChangeら，2009）は、明光刺激が軽度の足ショックと組み合わせられておりそれと同時に終結する恐怖条件づけパラダイムの習得に失敗した（図3a）。しかし、Rho-ArchT-EGFPの発現は明光刺激に対するこれらのマウスの感受性を増大させて、視覚刺激とショックとの間の関連性の習得を可能にした（図3a）。最後に、ArchT発現が高速視覚をCNGA3<sup>-/-</sup>およびPDE6C<sup>-/-</sup>マウスに付与するかどうかを試験した。オプトモーター（Optomotor）試験（Uminoら，2008）による視覚の速度の評価は、ArchT発現マウスが、網膜下ウイルス注射を受けなかったマウスおよびGFPのみのベクターの投与を受けたマウスより迅速に刺激に追従できたことを示した（図3b）。ArchT発現マウスが追従可能であった刺激の最大周波数は錐体光受容体のものに類似していた（図3b）。

#### 【0088】

総合すると、これらの結果は、杆体が、その内因性光伝達カスケードによるものより迅速に駆動可能であること、および杆体駆動性回路網がより迅速なシグナリングを持続させることができることを示している。重要なことに、杆体からのシナプス放出は大きな電圧変動を要さないが、それよりむしろ、小さな電流が、そのシナプス伝達を有意に変化させるために十分な電圧変動を引き起こしうる（Cangianoら，2012）。これは、ほとんどの他

10

20

30

40

50

のニューロンにおける活性のオプトジェネティック操作に要求される平均光レベルより数倍低い光レベルへと、本発明の使用を拡張する (Hanら, 2011)。

#### 【0089】

##### 実施例5 - RPAP実験のための方法

##### 動物

C57BL6 (Harlan, UK)、Cnga3<sup>-/-</sup> (J.R. Heckenlively, University of Michigan)、Pde6c<sup>-/-</sup> (J.R. Heckenlively, University of Michigan, MI) (Changら, 2009)およびGnat1<sup>-/-</sup> (J. Lem, Tufts University School of Medicine, MA) (Calvertら, 2000) マウスをUniversity College Londonの動物施設内で維持した。成体雄および雌動物はウイルス注射の時点で6~12週齢であり、R9APの十分な発現を可能にするために注射の少なくとも2週間後に実験に使用された。使用した全てのマウスは2~6月齢であり、与えられた実験の群の間で年齢がマッチ (適合) していた。全ての実験は神経科学研究における動物およびヒトの使用に関する方針 (Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research) ならびに眼科および視覚研究における動物の使用のためのARVO声明 (ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) に従い実施されている。動物は標準的な12/12時間の明暗周期で維持された。

10

#### 【0090】

##### 組換えAAV8のプラスミド構築および産生

コード領域の全体を含むように設計されたプライマーを使用して、マウスR9ap cDNAをマウス網膜cDNAからPCR増幅した。プロモーター (CMVプロモーターまたはウシロドプシンプロモーター) とSV40ポリアデニル化部位との間にR9ap cDNAをクローニングした。これらのプラスミドを使用して、2つの偽型AAV2/8ウイルスベクター-rAAV2/8.CMV.mR9apおよびrAAV2/8.Rho.mR9apを後述のとおりに得た。

20

#### 【0091】

既に記載されているとおり (Gaoら, 2002)、三重一過性トランスフェクション法により組換えAAV2/8ベクターを得た。そのプラスミド構築物、AAV血清型特異的パッケージングプラスミドおよびヘルパープラスミドをポリエチレンジオキサンと混合してトランスフェクション複合体を形成し、ついでこれを293T細胞に加え、72時間放置した。該細胞を集め、濃縮し、細胞を溶解してベクターを遊離させた。AAV2/8をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、限外濾過カラム (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) を使用して濃縮し、PBS中で洗浄し、100~150  $\mu$ lの体積まで濃縮した。ウイルス粒子力価をドットプロットまたはリアルタイムPCRにより決定した。用いた精製ベクター濃度は $1 \sim 2 \times 10^{12}$  ウイルス粒子/mlであった。

30

#### 【0092】

##### 網膜電位図 (ERG)

商業的に入手可能なシステム (Espion E2, Diagnosys LLC, Lowell, MA) を使用して、マウスを一晩暗順応させた後、両眼からERGを記録した。塩酸メデトミジン (1mg/ml)、ケタミン (100mg/ml) および水の5:3:42の比の0.007ml/g混合物の腹腔内注射で該動物を麻酔した。2.5% フェニレフリンおよび1.0% トロピカミドを使用して、瞳孔を完全に散大させた。正中皮下接地 (ground) および口 (mouth) 参照電極をまず配置し、ついで、薄暗い赤色照明下で角膜の中央に軽く接触することを可能にした正の銀電極を配置した。ビスコティアーズ (Viscotears) 0.2% 液体ゲル (Robert Winzer博士, Pharma/OPD Laboratories, Watford, UK) の1滴を正電極上に配置して、記録中に角膜を湿潤状態に維持し、マウスを更に5分間暗順応させた。バンドパスフィルターカットオフ周波数は0.312Hzおよび1000Hzであった。光応答の回復速度を、ペア化 (paired) フラッシュパラダイムを用いて測定した。該パラダイムにおいては、種々の刺激間隔 (ISI (inter-stimulus interval); 0.5、1、2、4、8、16、32、64秒) で分けられた同一飽和強度 ( $1.8 \log \text{cd.s/m}^2$ ) を有するフラッシュのペアが与えられた。このパラダイムにおいては、第1フラッシュは、杆体機構の電氣的応答を完全に抑制し、それが異なるISIで第2フラッシュを与えることにより杆体機能の機能的回復の速度の観察を可能にする。第1フラッシュの完全な回復を

40

50

可能にするフラッシュのペアの間には十分な量の時間（150秒）が与えられた。ついで、観察されたa波振幅の回復は、錐体機能を欠く動物における杆体の不活性化の速度を反映するはずである。なぜなら、そのフラッシュはロドプシンの一部（0.02%）を退色するにすぎないはずだからである（Lyubarskyら，2004およびWeymouth, A.E.& Vingrys 2008）。暗所視6Hz明滅(flicker)強度系列は、既に報告されている方法（Seeligerら，2001）に若干の変更を加えて実施された。それぞれが0.5 log単位で区切られた-6~2 log.cd.s/m<sup>2</sup>の範囲の17段階のフラッシュ強度を用いた。各段階に関して、10秒間の順応の後、同じフラッシュ条件を用いて600ミリ秒のスイープの20回の平均を取った。全て83.3 cd/m<sup>2</sup>での20、100および200ミリ秒の持続時間のより長いフラッシュを用いて、暗所視応答の系列も得た。以下の漸増光強度で、暗順応動物から標準的な単一フラッシュ暗所視記録を得た：-6、-5、-4、-3、-2、-1、0、1.0、1.5および1.9 log.cd.s/m<sup>2</sup>。20 cd/m<sup>2</sup>の背景光強度（これは記録時間にわたる背景光としても用いられた）での5分間の光順応間隔の後、明所視フラッシュ記録を行った。用いた明所視光強度は-2、-1、0、1、1.5および1.9 log.cd.s/m<sup>2</sup>であった。

#### 【0093】

##### 組織学

rAAV2/8.Rho.mR9apの片側のみの網膜下注射の6週間後、Cnga3-/-マウスからの両方の眼を迅速に摘出し、液体窒素中で瞬間冷凍した。OCT（RA Lamb, Eastborne, UK）におけるその眼の低温包埋の後、眼を厚さ15 μmの横断切片として切断し、15~30分間風乾した。免疫組織学検査のために、抗RGS9抗体（1:500; Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz, CA）と共に室温で2時間インキュベートする1時間前に、正常ロバ血清（2%）、ウシ血清アルブミン（2%）含有するPBS中で切片を予めブロッキングした。PBSで洗浄（2×15分間）した後、切片を適当なAlexa 546タグ付き二次抗体（Invitrogen, Carlsbad, CA）と共に室温（RT）で2時間インキュベートし、洗浄し、Hoechst 33342（Sigma-Aldrich, Gillingham, UK）で対比染色した。網膜切片を共焦点顕微鏡（Leica TCS SP2, Leica Microsystems; Wetzlar, Germany）で観察した。

#### 【0094】

##### ウエスタンブロッティング

rAAV2/8.Rho.mR9apの片側のみの網膜下注射の4週間後、Cnga3-/-マウスからの眼を集めた。RPE / 脈絡膜 / 強膜複合体から神経網膜を分離した後、組織をRIPAバッファー中でホモジナイズし、氷上で20分間放置した。サンプルを16,000g、4℃で30分間遠心分離し、使用まで-20℃で保存した。公知プロトコルを用いてウエスタンブロッティングを行った。

#### 【0095】

##### 視運動応答およびコントラスト感度関数

回転正弦格子（OptoMotry™, Cerebral Mechanics, Lethbridge, AB Canada）に対するマウスの視運動応答を観察することにより、処理眼および未処理眼のコントラスト感度および視力を測定した。用いたプロトコルは、模様回転に対する両眼の感度が等しくないことに基づいて、右眼および左眼の視力の独立した尺度を与える。右眼および左眼は、主として、それぞれ反時計回りおよび時計回りの回転により駆動される（Douglasら，2005）。62 cd/m<sup>2</sup>の平均照度を有する回転正弦格子を有する4個のモニターに囲まれた密閉空間内の床から隔離された小さな島状物上にマウスを配置した。二重盲検二者択一強制選択法を用いた。該方法においては、模様回転の方向、それが処理された又は未処理のCnga3-/-マウスまたは年齢がマッチした野生型対照動物（C57BL6）のいずれであるかは、観察者に隠されていた。6Hzで示された0.128、0.256、0.383、0.511サイクル/度で測定されたコントラスト感度は、閾値応答を与える最低コントラスト%により100を割り算したものと定義された。各マウスの両眼を独立した日に4回試験した。データをキャンベル-ロブソン・コントラスト感度チャート（Campbell-Robson Contrast Sensitivity Chart）上に、相対空間周波数を表す正弦格子とともに示した。

#### 【0096】

## ロドプシン測定

マウスを一晩にわたって完全に暗順応させた後、該マウスを麻酔し、瞳孔を完全に散大させて、視色素退色 (visual pigment bleaching) の速度を評価した。ついで該マウスを、光源 (7.0mW) を有するライトボックス内に配置して、眼を5分間にわたって直接照らした後、眼を集めた。もう1つの実験においては、コントラスト感度を測定するための条件と同じ条件に種々の持続時間 (0、30、60、120分) にわたってマウスをさらした。マウスの眼を各時点で摘出し、250  $\mu$ l のリン酸緩衝食塩水中に配置し、明るい密閉チューブ内で液体窒素中で瞬間冷凍し、-20℃で維持した。そのマウスの一晩の暗順応の後、赤色照明下、暗所で幾つかの眼を集めた。既に報告されている方法に若干の修飾を施したものにより (Douglasら, 1995)、ロドプシンの分光光度測定を行った。簡潔に説明すると、サンプルを室温で解凍し、ホモジナイズした。この操作および全ての後続操作は、視色素をごくわずかにしか退色させない薄暗い赤色照明下で行った。50マイクロリットルのn-ドデシル-D-マルトシド (200 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を各サンプルに加え、得られた混合物を室温で2時間回転させ、ついで4℃で10分間の遠心分離 (23,000g) を行った。上清を取り出し、島津 (Shimadzu) UV-2101PC分光光度計 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 内の石英キュベット内に配置した。300nm~700nmの未退色抽出物の初回スキャンの後、サンプルを単色光 (502nm) に3分間さらし [これは、ロドプシンを完全に退色 (bleach) させるのに十分であることが示されている (Longbottomら, 2009)]、再スキャンした。全ての吸収スペクトルは700nmにおいてゼロに設定された。退色前および後の曲線を用いて差スペクトルを構築し、抽出された視色素の量に相当する、およそ500nmにおける最大光学濃度を決定した。

【0097】

## 実施例6 - 杆体におけるR9AP過剰発現および光受容体不活性化の速度の増加

RGS9、G $\alpha$ 5およびR9APは調節性GTPアーゼ複合体の絶対的なメンバーである。杆体におけるGTPアーゼ複合体に対するAAV媒介性R9AP過剰発現の効果を研究するために、Cnga3 $^{-/-}$ マウスにおけるrAAV2/8.Rho.mR9apの網膜下注射の後、RGS9のレベルおよび分布を調べた。これらのマウスは正常な杆体機能を有するが、錐体機能を欠いており、色盲のモデルとして有用である。4週間後、処理された網膜は、未処理網膜と比較して、処理網膜における光受容体層の全体にわたってRGS9に対する免疫反応性の上昇を示した (図4A)。更に、ウェスタンブロット分析は処理網膜におけるRGS9タンパク質発現の増強を確認した (図4B)。

【0098】

次に、ペア化 (paired) フラッシュERG (LyubarskyおよびPugh 1996) を適用することにより、杆体光伝達に対するAAV2/8媒介性R9AP過剰発現の機能的効果を調べた。このパラダイムにおいては、同一フラッシュ強度のペアを種々の刺激間隔で送出し、第1応答に対する第2応答の回復を測定する。杆体光受容体経路においては、a波 (光受容体由来) の回復の速度は不活性化の速度に依存する。a波振幅の50% 回復に関する時間定数 (  $\tau$  ) は、rAAV2/8.CMV.mR9apが注射されたCnga3 $^{-/-}$ 眼 (  $\tau$  = およそ2.99秒 ) においては、未処理眼 (  $\tau$  = およそ7.38秒 ; 図4C ) と比較しておよそ60% 低下することが判明した。同様に、同じマウス系統 (Cnga3 $^{-/-}$ ) においてロドプシンプロモーター ( rAAV2/8.Rho.mR9ap ;  $\tau$  = およそ2.74秒 ; 図4C ) を使用して、あるいは別の錐体欠損マウス系統 (Pde6c $^{-/-}$  ; 図8) において同一ウイルス ( rAAV2/8.CMV.mR9ap ) を使用して、a波回復の速度の増加が観察された。これらの観察は、rAAV2/8.CMV.mR9apまたはrAAV2/8.Rho.mR9apの網膜下注射が、RGS9およびGTPアーゼ複合体のレベルを増加させることにより、杆体光伝達の不活性化速度を有意に増強できることを示した。

【0099】

## 実施例7 - R9APの過剰発現による杆体機能の「明所視シフト」

杆体におけるR9APおよびGTPアーゼ複合体の過剰発現により達成される不活性化速度の増加が、光受容体機能の作動範囲を変化させうるかどうかを調べるために、漸増フラッシュ



強度を用いて暗所視6Hz明滅ERGを記録した。rAAV2/8.CMV.mR9apまたはrAAV2/8.Rho.mR9apで処理された眼は、未処理眼と比較して、より明るいフラッシュに対する応答の増強を示した。これはおよそ2 log単位までの該応答の上限閾値の上昇をもたらした(図5A)、最大光応答にはほとんど影響を及ぼさなかった(処理眼においては $151 \pm 17 \mu V$ 、一方、未処理眼においては $162 \pm 29 \mu V$ ; 平均 $\pm$ 標準誤差)。予想どおり、杆体の作動範囲におけるこの「明所視シフト」はおよそ1.5 log単位までの該応答の下限閾値の相互(reciprocal)上昇を伴っていた。一方、野生型眼およびGnat1-/-眼(共に機能的錐体を有する)のERG応答の上限閾値は、未処理Cnga3-/-眼の場合と比較して、およそ4.0 log単位上昇した。rAAV2/8.Rho.mR9apをPde6c-/-マウスに注射した場合に類似結果が得られた(図9)。結果として、該処理は、より長い持続時間のフラッシュに対して(図5B)、および錐体分離背景照明下のフラッシュに対して(図5C)、杆体が応答することを可能にした。これらは、未処理杆体が応答を実質的に全く示さなかった条件を含む。

#### 【0100】

総合すると、これらの結果は、杆体におけるR9AP過剰発現がその脱感作をもたらした、暗所視機能の代わりに明所視機能を該細胞に付与することを立証している。杆体機能の「明所視シフト」のこの治療的誘導は、網膜変性の明白な証拠を伴うことなく、少なくとも5カ月間継続した(図10)。一方、同じウイルスベクターを使用する野生型マウスの処理は網膜機能における測定可能な変化を示さなかった(図11)。

#### 【0101】

実施例8 - 杆体双極経路は改変杆体機能の伝達に順応する

この研究は、杆体におけるR9APの過剰発現がより迅速な光受容体不活性化速度をもたらした、大量の光子にニューロンが応答することを可能にすることを立証した。一方、不活性化の加速はまた、光受容体シナプス終末において神経伝達物質遊離のより短い持続時間をもたらすはずである。したがって、下流杆体双極シグナリングが該処理によって影響を受けるかどうかを評価した。まず、ERGを用いてa波(光受容体由来)およびb波(双極細胞由来)の潜時および振幅を測定することにより、短い単一フラッシュに対する光受容体から双極細胞へのシグナルの伝達速度および度合を調べた(図6a)。総合すると、a波およびb波の両方において、処理眼および未処理眼に関して、若干小さいがほぼ同一の強度応答曲線が認められた。観察された僅かな相違は、加速された光受容体不活性化の真の結果、または網膜下注射により誘発された単なる神経損傷のいずれかを反映している可能性がある。a波潜時は、双極細胞駆動性b波が検出可能となる点を示す。本発明者らはまた、a波およびb波潜時における僅かな遅延を観察した。このことは、光受容体から双極細胞への神経シグナルの伝達において少しの遅延が存在することを示している。それでも、個体間のERG応答の比較的大きな変動は、杆体応答における僅かな遅延または低減が必ずしも視覚機能不全につながるとは限らないことを示している(BirchおよびAnderson 1992)。

#### 【0102】

したがって、これらの結果は、原則として、双極細胞が光受容体機能の変化にほぼ完全に順応し、重要なことには、適切な用量応答関係を示すことを示した。

#### 【0103】

実施例9 - R9ap過剰発現はコントラスト感度関数の改善をもたらす

次に、標準的なコンピュータモニターで可能な最も明るい記録条件( $62 \text{ cd/m}^2$ )下で回転正弦格子に対する視動性応答を測定することにより(Carvalhoら, 2011)、R9AP過剰発現による杆体機能の「明所視シフト」が、結果として、光下の視覚特性の改善につながるかどうかを調べた。この挙動試験の特有の利点は、各眼の視覚機能を別々に調べられることであり、右眼の機能は反時計回り(CCW)の格子に対する応答により、そして左眼は時計回り(CW)の刺激により調べられる(Douglasら, 2005)。空間コントラスト感度関数(CSF)を6.0Hzの一定時間周波数で調べたところ、Cnga3-/-マウスは、野生型マウスと比較して低いCSFを有することが判明した(図7)。コントラスト感度と視力の関数であるCSFは視覚認知の推定値範囲を示した(動物は、おそらく、曲線下の格子を認知可能であるが、曲線より上の格子を認知することはできなかった; 図7A)。興味深いことに、そ

れぞれ0.128および0.256サイクル/度 (c/d) の両方の格子を使用した場合の8.0倍 ( $P = 0.005$ ) および5.4倍 ( $P = 0.011$ ) の感度増加が、処理眼および未処理眼のコントラスト感度を比較した場合に観察された (図7A左パネル)。0.383 ( $P = 0.056$ ) および0.511 ( $P = 0.111$ ) c/dの格子に関しては、コントラスト感度の明らかな変化は認められなかった。興味深いことに、Cnga3-/-マウスにおける処理眼の平均感度は、正常錐体機能を有する野生型対照のものを上回った。しかし、野生型マウスを同じウイルス構築物で処理した場合には、処理眼と未処理眼との間でCSFは異ならなかった (図12)。

#### 【 0 1 0 4 】

R9AP過剰発現は、最高輝度モニター設定で見た場合、視覚特性の獲得をもたらすことが確認されたため、この視覚獲得が持続可能であるかどうかを判定することが求められた。杆体における視色素の再生が錐体の場合より相当遅いことが知られていることを考慮すると (WangおよびKefalov 2011)、これは妥当な関心事である。第1に、該処理が視色素退色の速度に変化をもたらすのかどうかを評価した。明るい光への処理眼および未処理眼の5分間の曝露は残存する退色性視色素のレベルに相違を全くもたらさないことが判明した (図7B左下パネル)。第2に、CSF測定で行ったのと同じ実験条件にCnga3-/-マウスを種々の時間にわたって曝露した後、眼における退色性ロドプシンの量を調べた。視色素レベルが、処理眼および未処理眼に関して同様に、視覚刺激への2時間の曝露全体を通じて減少の証拠を示すことなく安定したままであることを、その結果は示した (図7B右下パネル)。これらの結果は、処理したCnga3-/-マウスにおける視覚認知の獲得がロドプシン分子の十分な供給によって支持され、持続可能であることを示した。

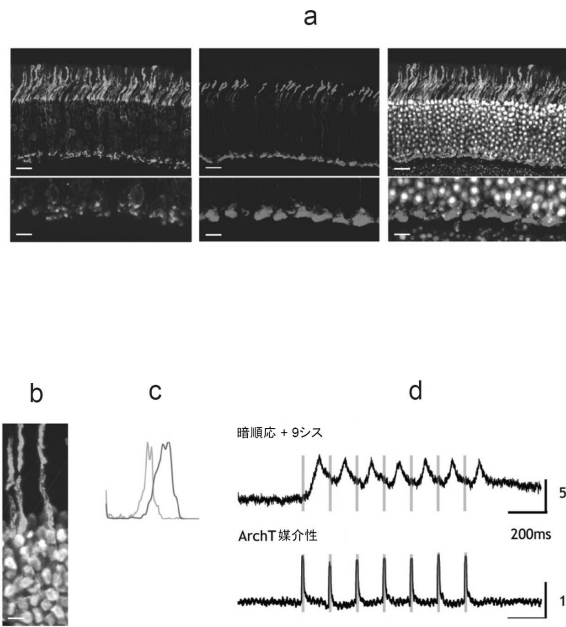
#### 【 0 1 0 5 】

##### 参考文献

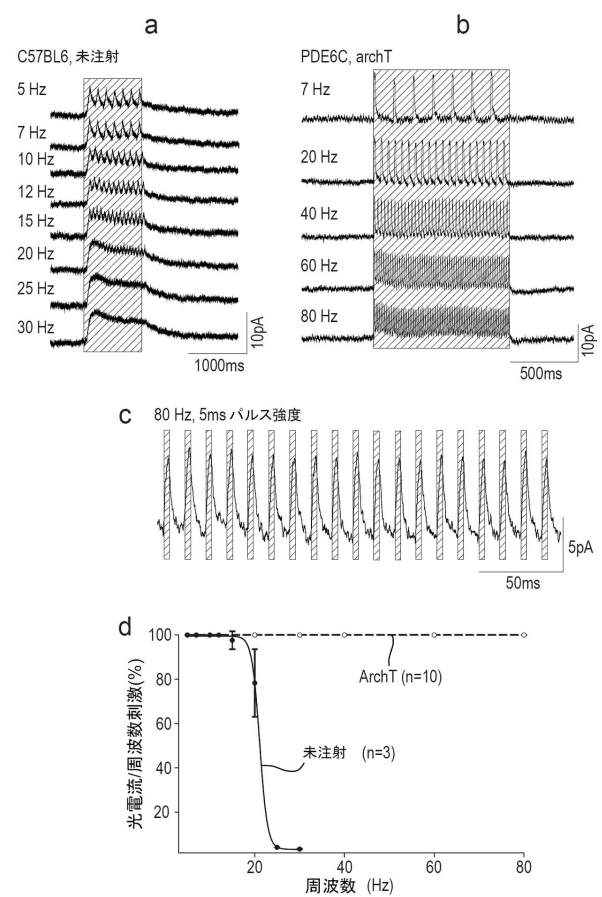
- Curcio, C.A.ら, The Journal of comparative neurology 292, 497-523 (1990).  
 Dryja, T.P. American journal of ophthalmology 130, 547-563 (2000).  
 Hess, R.F. & Nordby, K. The Journal of physiology 371, 365-385 (1986).  
 Nishiguchi, K.M.ら, Human mutation 25, 248-258 (2005).  
 Kohl, S.ら, Nature genetics 19, 257-259 (1998).  
 Chang, B.ら, P.N.A.S 106, 19581-19586 (2009).  
 Thiadens, A.A.ら, American journal of human genetics 85, 240-247 (2009).  
 Burns, M.E. & Pugh, E.N. Biophys J 97, 1538-1547 (2009).  
 Burns, M.E. & Pugh, E.N. Physiology 25, 72-84 (2010).  
 Baseler, H.A.ら, Nature neuroscience 5, 364-370 (2002).  
 Martemyanov, K.A. & Arshavsky, V.Y. Prog Mol Biol Transl 86, 205-227 (2009).  
 Krispel, C.M.ら, Neuron 51, 409-416 (2006).  
 Cowan, C.W.ら, P.N.A.S. 95, 5351-5356 (1998).  
 Zhang, X., Wensel, T.G. & Kraft, T.W. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 23, 1287-1297 (2003).  
 Nishiguchi, K.M.ら, Nature 427, 75-78 (2004).  
 Michaelides, M.ら, Ophthalmology 117, 120-127 e121 (2010).  
 Han, X.ら, Front Syst Neurosci. 5, 18 (2011).  
 Busskamp, V.ら, Science 329, 413-417 (2010).  
 Fu, Y., Yau, K.W. Pflugers Arch. 454, 805-819 (2007).  
 Pugh, E.N. Jrら, Curr Opin Neurobiol. 9, 410-418 (1999).  
 de Jong, P.V.T.M. N Engl J Med 355, 1474-1485 (2006).  
 Waessle, H. Nat Rev Neurosci. 5, 747-757 (2004).  
 Soucy, E.ら, Neuron 21, 481-493 (1998).  
 Hack, I.ら, P.N.A.S. 96, 14130-14135 (1999).  
 Li, W.ら, Nat Neurosci 13, 414-416 (2010).  
 Biel, M.ら, P.N.A.S. 96, 7553-7557 (1999).  
 Umino, Y.ら, J Neurosci 28, 189-198 (2008).

- Cangiano, L. ß, J Physiol. 590, 3841-3855 (2012).
- Berndt, A. ß, Science 344, 420-424 (2014).
- Wietek, J. ß, Science 344, 409-412 (2014).
- Calvert, P.D. ß, P.N.A.S 97, 13913-13918 (2000).
- Gao, G.P. ß, P.N.A.S 99, 11854-11859 (2002).
- Lyubarsky, A.L. ß, Vision research 44, 3235-3251 (2004).
- Weymouth, A.E. & Vingrys, A.J. Progress in retinal and eye research 27, 1-44 (2008).
- Seeliger, M.W. ß, Nature genetics 29, 70-74 (2001).
- Douglas, R.M. ß, Visual neuroscience 22, 677-684 (2005). 10
- Douglas, R.H. ß, Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology 177, 111-122 (1995).
- Longbottom, R. ß, P.N.A.S. 106, 18728-18733 (2009).
- Lyubarsky, A.L. & Pugh, E.N., Jr. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 16, 563-571 (1996).
- Birch, D.G. & Anderson, J.L. Archives of ophthalmology 110, 1571-1576 (1992).
- Carvalho, L.S. ß, Human molecular genetics 20, 3161-3175 (2011).
- Wang, J.S. & Kefalov, V.J. Progress in retinal and eye research 30, 115-128 (2011).
- Taylor, A. W., Ocular immune privilege, Eye, 23, 1885-1889 (2009). 20
- Natkunaratjah, M. ß, Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8, Gene Ther. 15, 463-467 (2008).
- Choi, V. W. ß, AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery, Curr. Gene Ther., 5, 299-310 (2005).
- Wu, Z. ß, Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy, Mol. Ther., 14, 316-327 (2006).
- Chuong, A.S. ß, Non-invasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin, Nat Neurosci., 17, 1123-1129 (2014).

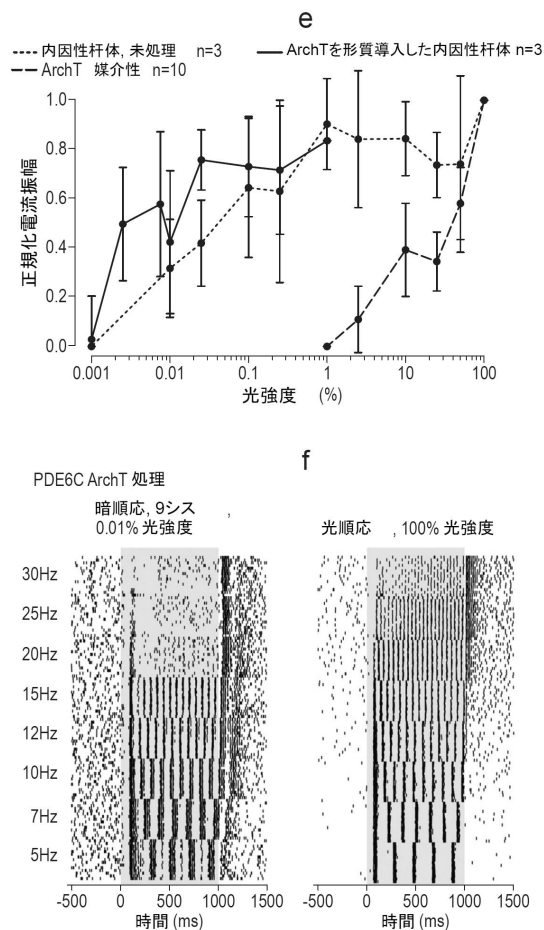
【図 1】



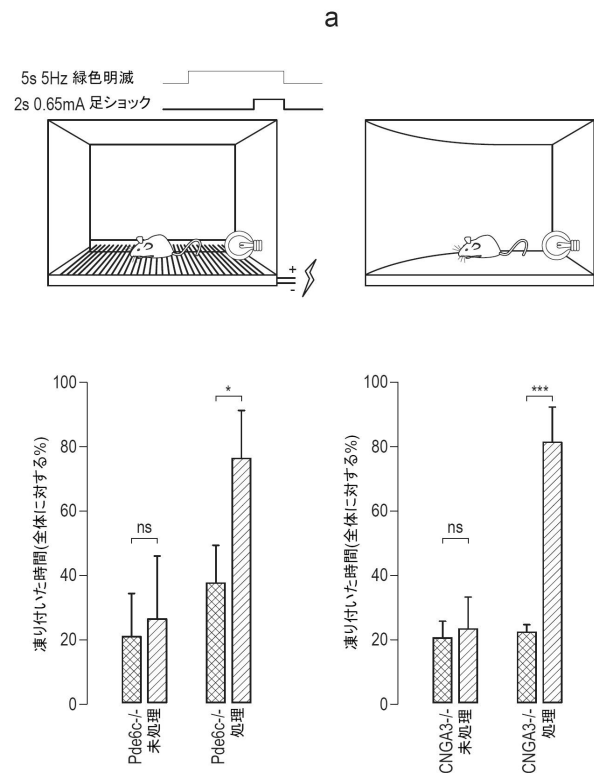
【図 2 - 1】



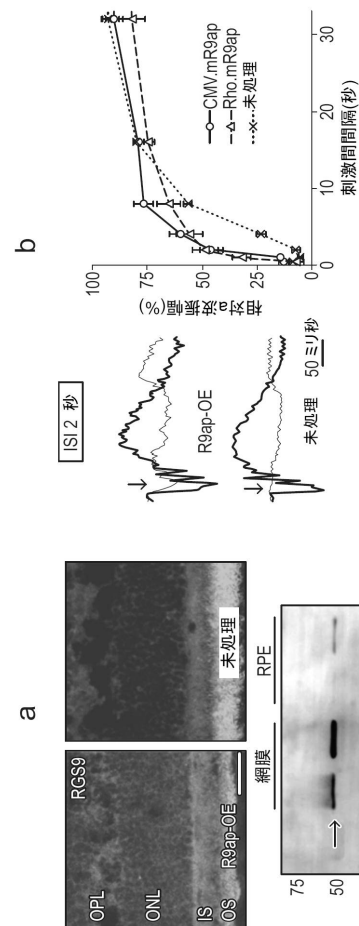
【図 2 - 2】



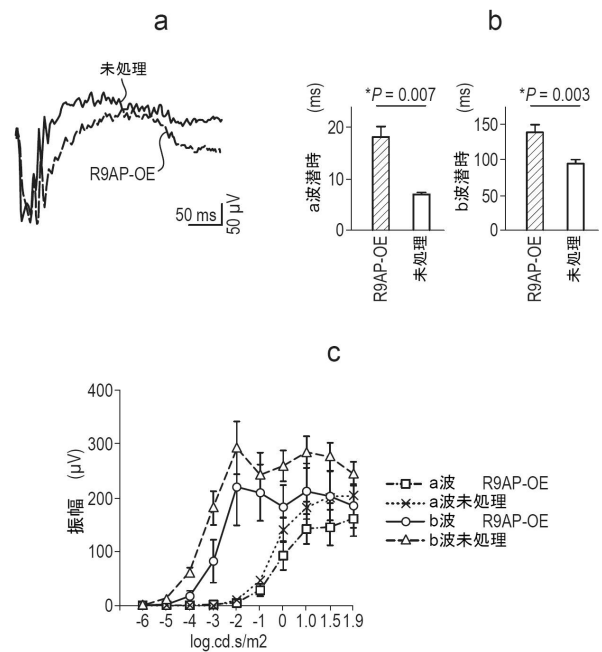
【図 3 - 1】



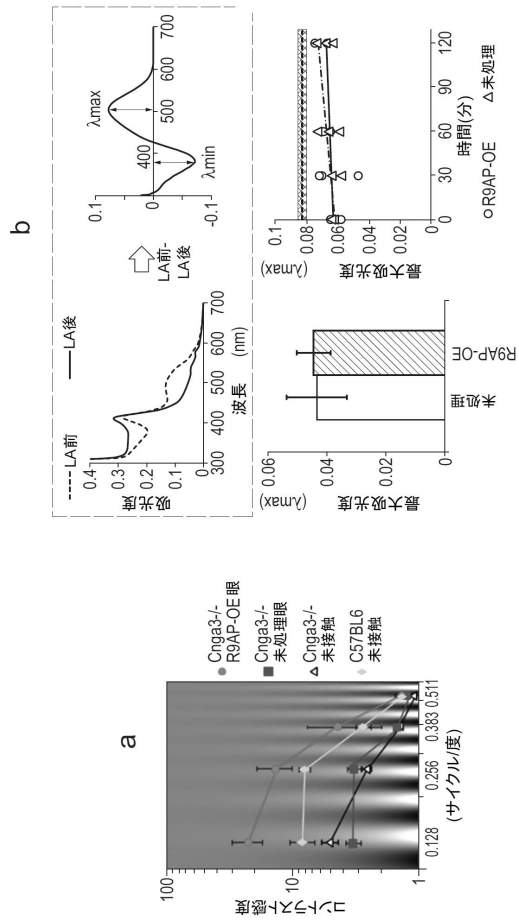
【 図 4 】



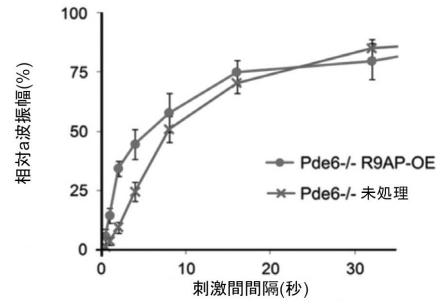
【 図 6 】



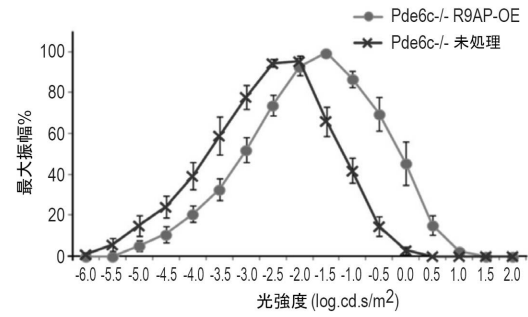
【図 7】



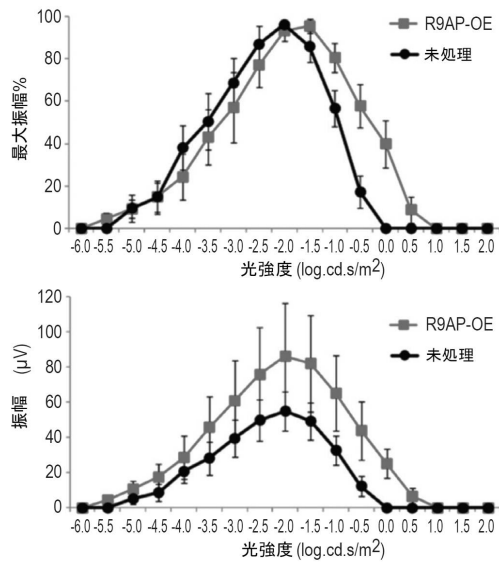
【図 8】



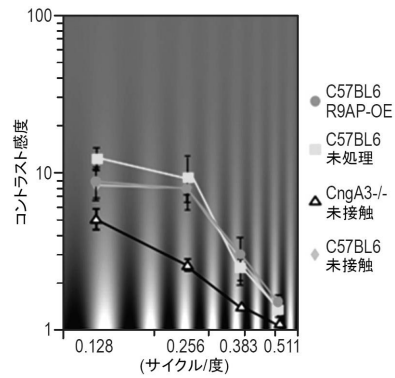
【図 9】



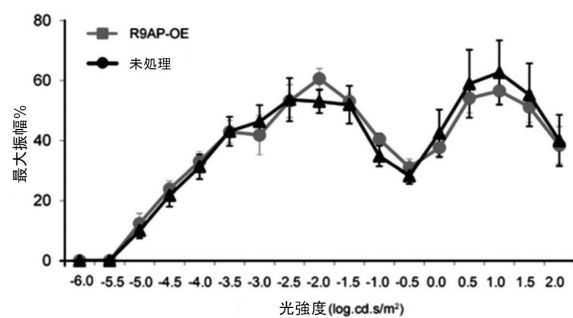
【図 10】



【図 12】



【図 11】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76

(72)発明者 アリ, ロビン  
イギリス国 イーシー１ブイ ９イーエル ロンドン, パス ストリート １１-４３, ユーシー  
エル インスティテュート オブ オフサルモロジー

(72)発明者 スミス, アレキサンダー  
イギリス国 イーシー１ブイ ９イーエル ロンドン, パス ストリート １１-４３, ユーシー  
エル インスティテュート オブ オフサルモロジー

(72)発明者 ニシグチ, コージ  
イギリス国 イーシー１ブイ ９イーエル ロンドン, パス ストリート １１-４３, ユーシー  
エル インスティテュート オブ オフサルモロジー

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特表２０１１-５１６０９１(ＪＰ, Ａ)  
国際公開第２０１３／１２４４７７(ＷＯ, Ａ１)  
Human Molecular Genetics, 2014, Vol.23, No.2, pp.514-523  
Nature, 2004, Vol.427, pp.75-78  
Doc. Ophthalmol., 2013, Vol.127, pp.18-19, OS6: Oral paper6

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8  
A 6 1 K 4 8 / 0 0  
A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8  
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )