

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6935049号
(P6935049)

(45) 発行日 令和3年9月15日(2021.9.15)

(24) 登録日 令和3年8月27日(2021.8.27)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/864	(2006.01)
A 61 K 35/76	(2015.01)
A 61 K 48/00	(2006.01)
A 61 P 27/02	(2006.01)
A 61 K 9/10	(2006.01)
C 12 N	15/864
A 61 K	35/76
A 61 K	48/00
A 61 P	27/02
A 61 K	9/10

請求項の数 15 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-547425 (P2017-547425)
(86) (22) 出願日	平成28年3月11日 (2016.3.11)
(65) 公表番号	特表2018-509154 (P2018-509154A)
(43) 公表日	平成30年4月5日 (2018.4.5)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/022072
(87) 國際公開番号	W02016/145345
(87) 國際公開日	平成28年9月15日 (2016.9.15)
審査請求日	平成31年3月7日 (2019.3.7)
(31) 優先権主張番号	62/131,661
(32) 優先日	平成27年3月11日 (2015.3.11)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	510002280 アメリカ合衆国
	アメリカ合衆国 メリーランド州 208 92-7660 ベトヘスダ エムエスシ -7660 スイテ325 エクエクトイ ブ ボウレバルド 6011 ナショナル インスティテュート オブ ヘルス オ フィス オブ テクノロジー トランسف ラー
(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宣
(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 X連鎖性網膜色素変性症の治療のためのR P 2及びR P G Rベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の成分 :

(a) R P 2 又はその機能的断片をコードするヌクレオチド配列であって、R P 2 の機能的断片は A D P リボシル化因子様 3 (A R L 3) のための G T P a s e 活性化タンパク質としてのその機能を維持するヌクレオチド配列 ;

(b) 第一の A A V 2 逆位末端反復配列 (I T R) 又はその機能的断片、及び第二の I T R 又はその機能的断片であって、第一及び第二の I T R の機能的断片はベクターの複製を可能にする能力を維持する A A V 2 I T R 又はその機能的断片 ;

(c) ヒト グロビン・ポリアデニル化シグナル、又はその機能的断片であって、当該機能的断片は R N A 切断複合体によって認識される能力を維持する、ヒト グロビン・ポリアデニル化シグナルの機能的断片 ;

(d) サイトメガロウイルス (C M V) / ヒト グロビン・イントロン ;

(e) 配列番号 10 のヌクレオチド配列を含むヒトロドブシン・キナーゼ・プロモーターであって； R P 2 をコードするヌクレオチド配列が又はその機能的断片が前記ロドブシン・キナーゼ・プロモーターの転写調節下にある、ヒトロドブシン・キナーゼ・プロモーター；

を含む核酸を含む、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであり、及び

ここでベクターの成分は 5' から 3' に：第一の I T R 又はその機能的断片、ヒトロドブシン・キナーゼ・プロモーター、 C M V / ヒト グロビン・イントロン、 R P 2 又はそ

10

20

の機能的断片をコードするヌクレオチド配列；ヒト グロビン・ポリアデニル化シグナル又はその機能的断片、及び第二の ITR 又はその機能的断片、の順序である、アデノ隨伴ウイルス (AAV) ベクター。

【請求項 2】

前記核酸が自己相補的である、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】

前記核酸が配列番号 1 4 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載のベクター。

【請求項 4】

前記ベクターが AAV 8 又は AAV 9 ベクターである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のベクター。 10

【請求項 5】

前記第一の AAV 2 逆位末端反復配列 (ITR) が、配列番号 1 2 と 1 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 6】

前記第二の AAV 2 逆位末端反復配列 (ITR) が、配列番号 1 2 と 1 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のベクターを含む、医薬組成物であって、医薬的に許容される担体をさらに含む、医薬組成物。 20

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のベクターを含む、その治療又は予防を必要とする哺乳動物における、X 連鎖性網膜色素変性症 (XLRP) を治療又は予防するための剤。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のベクターを含む、哺乳動物の網膜における光受容器数を増加させるための剤。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のベクターを含む、哺乳動物の視力を増加させるための剤。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のベクターを含む、哺乳動物における網膜剥離を低減するための剤。 30

【請求項 12】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のベクターを含む、哺乳動物における光受容器の電気的応答を増加させるための剤。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のベクターを含む、哺乳動物の網膜におけるタンパク質の発現を増加させるための剤であって、前記タンパク質が RP2、錐体オプシン又は錐体 PDE6 である、剤。

【請求項 14】

前記ベクターが、RP2 をコードするヌクレオチド配列を含み、5 × 10^6 ~ 5 × 10^{12} ベクター・ゲノム (vg) / 眼の投与量で投与される、請求項 8 ~ 13 のいずれか一項に記載の剤。 40

【請求項 15】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 8 ~ 14 のいずれか一項に記載の剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本特許出願は、2015年3月11日に出願された米国仮特許出願第62/131,661号の利

50

益を主張する。参照することにより、その全体が本明細書に援用される。

【0002】

電子的に提出された資料の参照による援用

本明細書と同時に提出され、コンピューターで読み取り可能な以下のヌクレオチド／アミノ酸配列表は、その全体が参照により、本明細書に援用される：2016年3月11日付けの「723551_ST25.txt」という名前の77,632バイトのASCII（テキスト）ファイル1件

【背景技術】

【0003】

X連鎖性網膜色素変性症（XLRP）は、X連鎖性であり、光受容器細胞の進行性喪失によって特徴づけられる遺伝性の網膜変性症であり、視力障害又は失明に繋がる。XLRPは、錐体細胞の死滅が後に続く、桿体光受容器の死滅を含んでも良い。結果として、XLRP患者は通常、夜盲症の早期発症を経験し、周辺の視野が徐々にではあるが進行的に喪失し、中心視野が最終的に喪失する。現在、XLRPの治療法はない。従って、XLRPを治療するための組成物や方法に対するニーズが存在する。

【発明の概要】

【0004】

発明の簡易な説明

本発明の一実施形態は、（a）RP2又はその機能的断片をコードするヌクレオチド配列及び（b）AAV2逆位末端反復配列（ITR）又はその機能的断片を含む、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを提供する。

【0005】

本発明の別の実施形態では、RPGR-ORF15又はその機能的断片若しくはその機能的変異体をコードするヌクレオチド配列を含むAAVベクターを提供し、ここで（i）前記ベクターは、CMV／ヒト グロビン・イントロン及び／又はヒト グロビン・ポリアデニル化シグナルをさらに含み；及び

（ii）RPGR-ORF15又はその機能的断片若しくはその機能的変異体をコードするヌクレオチド配列が、任意でロドプシン・キナーゼ・プロモーターの転写調節下にある。

【0006】

本発明の追加的な実施形態では、関連する医薬組成物、及びRPGR-ORF15又はその機能的断片若しくはその機能的変異体をコードするヌクレオチド配列を含むAAVベクターを作製する方法を提供する。

【0007】

本発明の別の実施形態では、治療又は予防を必要とする哺乳動物において、X連鎖性網膜色素変性症（XLRP）の治療又は予防方法を提供し、前記方法は、哺乳動物におけるXLRPを治療又は予防するための有効量で、本発明のベクター又は医薬組成物を、哺乳動物に投与することを含む。

【0008】

本発明のさらに別の実施形態では、哺乳動物の網膜における光受容器数を増加させる方法を提供し、前記方法は、哺乳動物の網膜における光受容器数を増加させるための有効量で、本発明のベクター又は医薬組成物を、哺乳動物に投与することを含む。

【発明を実施するための形態】

【0009】

発明の詳細な説明

本発明の実施態様によれば、RP2又はRPGR-ORF15をコードするヌクレオチド配列を含むAAVベクターは、XLRPのマウスモデルにおいて光受容器の機能及び生存（viability）を効果的に維持したことを発見している。

【0010】

XLRP患者の約15%が、網膜色素変性症2（RP2）遺伝子に変異を有する。ヒト

10

20

30

40

50

R P 2 遺伝子は 5 つのエキソンを有し、 3 5 0 アミノ酸残基のタンパク質をコードする。 R P 2 タンパク質は、 アルギニン・アデノシン - 5' - ジホスホリボシル化 (A D P リボシル化) 因子様 3 (A R L 3) 、 光受容器の結合纖毛に位置する微小管関連小 G T P アーゼにとての、 G T P アーゼ活性化タンパク質 (G A P) である。ヒト R P 2 タンパク質をコードする相補的 D N A (c D N A) の例は、 配列番号 1 のヌクレオチド配列である。ヒト R P 2 タンパク質をコードするタンパク質配列の例は、 配列番号 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 1 1 】

本発明の一実施形態は、 (a) R P 2 又はその機能的断片をコードするヌクレオチド配列、 及び (b) A A V 2 I T R 又はその機能的断片、 を含む核酸を含む A A V ベクターを提供する。 R P 2 をコードするヌクレオチド配列は、 任意の種に由来する R P 2 をコードする任意の適したヌクレオチド配列である場合がある。好ましい実施形態においては、 R P 2 はヒト R P 2 である。本発明の一実施形態においては、 ヒト R P 2 をコードするヌクレオチド配列は、 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、 ヒト R P 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。本発明の一実施形態においては、 ヒト R P 2 をコードするヌクレオチド配列は、 配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 2 】

X L R P 患者の約 7 5 % は、 網膜色素変性症 G T P アーゼ調節因子 (R P G R) 遺伝子に突然変異を有する。複数の R P G R 転写産物が、 網膜において検出されている。疾患を引き起こす変異の大部分は、 網膜において発現している R P G R - O R F 1 5 変異体アイソフォームにおいて、 検出されている。 R P G R - O R F 1 5 タンパク質は、 桿体及び錐体の光受容器の両方において、 中心体 - 纖毛タンパク質と相互作用し、 結合纖毛に局在する。野生型ヒト R P G R - O R F 1 5 タンパク質をコードする c D N A 配列の例は、 配列番号 2 7 のヌクレオチド配列である。野生型ヒト R P G R - O R F 1 5 タンパク質をコードするタンパク質配列の例は、 配列番号 4 のアミノ酸配列である。野生型ヒト R P G R - O R F 1 5 タンパク質の機能的変異体をコードする c D N A 配列の例は、 配列番号 3 のヌクレオチド配列である。野生型ヒト R P G R - O R F 1 5 タンパク質の機能的変異体をコードするタンパク質配列の例は、 配列番号 2 5 のアミノ酸配列である。

【 0 0 1 3 】

本発明の別の実施形態は、 R P G R - O R F 1 5 又はその機能的断片若しくはその機能的変異体をコードするヌクレオチド配列を含む、 核酸を含む、 A A V ベクターを提供し、 (i) 前記ベクターは、 C M V / ヒト グロビン・イントロン及び / 又はヒト グロビン・ポリアデニル化シグナルをさらに含み； 及び

(i i) R P G R - O R F 1 5 又はその機能的断片若しくはその機能的変異体をコードする前記ヌクレオチド配列は、 任意で、 ロドブシン・キナーゼ・プロモーターの転写調節下にある。本発明の一実施形態においては、 R P G R - O R F 1 5 又はその機能的断片若しくはその機能的変異体をコードするヌクレオチド配列を含む、 核酸を含む、 前記 A A V ベクターは、 (i) ヒト R P G R - O R F 1 5 又はその機能的断片若しくはその機能的変異体をコードする前記ヌクレオチド配列は、 ロドブシン・キナーゼ・プロモーターの転写調節下にあり、 及び / 又は、 (i i) 前記ベクターは、 C M V / ヒト グロビン・イントロン及び / 又はヒト グロビン・ポリアデニル化シグナルをさらに含む。野生型 R P G R - O R F 1 5 をコードする前記ヌクレオチド配列は、 任意の生物種に由来する野生型 R P G R - O R F 1 5 をコードする、 任意の適したヌクレオチド配列である場合がある。好ましい実施形態においては、 R P G R - O R F 1 5 は、 ヒト R P G R - O R F 1 5 である。本発明の一実施形態においては、 野生型ヒト R P G R - O R F 1 5 をコードする前記ヌクレオチド配列は、 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む野生型ヒト R P G R - O R F 1 5 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。本発明の一実施形態においては、 野生型ヒト R P G R - O R F 1 5 タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列は、 配列番号 2 7 のヌクレオチド配列を含む。野生型 R P G R - O R F 1 5 の機能的変異体をコードするヌクレオチド配列は、 野生型 R P G R - O R F 1 5 の機能的変異体をコードする、 任意の適し

10

20

30

40

50

たヌクレオチド配列である場合がある。好ましい実施形態においては、R P G R - O R F 15の機能的変異体は、ヒトR P G R - O R F 15の機能的変異体である。本発明の一実施形態においては、野生型ヒトR P G R - O R F 15の機能的変異体をコードするヌクレオチド配列は、配列番号25のアミノ酸配列を含む野生型ヒトR P G R - O R F 15タンパク質の機能的変異体をコードするヌクレオチド配列を含む。本発明の一実施形態においては、野生型ヒトR P G R - O R F 15タンパク質の機能的変異体をコードするヌクレオチド配列は、配列番号3のヌクレオチド配列を含む。以降、野生型R P G R - O R F 15及び野生型R P G R - O R F 15の機能的変異体は、別段の記載がない限り、まとめて「R P G R - O R F 15」として参照する。

【0014】

10

前記A A Vベクターは、眼の細胞に投与するために適した、任意のA A V血清型又はその変異体にパッケージする(packaging into)ために適している場合がある。適したA A V血清型の例としては、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9及びそれらの任意の変異体が挙げられるが、それらに限定されない。好ましくは、前記A A Vベクターは、血清型A A V 8又はA A V 9にパッケージされる。

【0015】

前記A A Vベクターは、本明細書に記載の、いずれかのA A V血清型のキャプシド・タンパク質又はその断片に、パッケージされる場合がある。好ましくは、前記ベクターは、A A V 8のキャプシドにパッケージされる。本発明の一実施形態においては、A A V 8のキャプシドは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。

20

【0016】

適した組換え体A A Vは、本明細書において定義されるように、A A V血清型キャプシド・タンパク質又はその断片をコードする核酸配列、機能的r e p遺伝子、本明細書に記載の任意の本発明のベクター、及びA A Vキャプシド・タンパク質に本発明のベクターをパッケージングすることを可能にするのに十分なヘルパー機能、を含有するパッケージング細胞を培養することによって生成しても良い。A A Vキャプシドに本発明のA A Vベクターをパッケージするためにパッケージング細胞が必要とする要素を、宿主細胞にin transで提供しても良い。代替的には、必要とする要素(例えば、本発明のベクター、r e p配列、キャプシド配列及び/又はヘルパー機能)の任意の1以上は、当業者に公知である方法を用いて、必要とされる要素の1以上を含有するように操作されている、適したパッケージング細胞によって提供される場合がある。

30

【0017】

本発明の一実施形態においては、前記A A Vベクターは、自己相補的である。自己相補的であるベクターは、有利に、2本目のD N A鎖を合成する律速的な段階を克服し、遺伝子発現のより早期の開始及びより強力な遺伝子発現をもたらし得る。好ましくは、R P 2をコードするヌクレオチド配列を含む前記A A Vベクターは、自己相補的である。一実施形態においては、前記ベクターは、一本鎖D N Aを含む。

【0018】

40

本明細書において用いられる場合、「核酸」としては、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「核酸分子」が挙げられ、一般的に、D N A又はR N Aのポリマーを意味し、一本鎖又は二本鎖であり得、天然の供給源から合成又は取得(例えば、単離及び/又は精製)でき、天然、非天然又は改変したヌクレオチドを含み得、天然のヌクレオチド間結合、非修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間で見られるホスホジエステルの代わりに、ホスホロアミダイト結合又はホスホロチオエート結合のような、非天然又は改変したヌクレオチド間結合を含み得る。一般的に、好ましくは、前記核酸は、任意の挿入、欠失、逆位及び/又は置換を含まない。しかし、本明細書において検討されるように、前記核酸にとって、1以上の挿入、欠失、逆位及び/又は置換を含むことが、いくつかの例においては適する場合がある。

【0019】

50

一実施形態においては、本発明の核酸は組換え体である。本明細書において用いられる場合、用語「組換え体」は、(i)生細胞において複製し得る核酸分子に、天然の又は合成した核酸断片を連結することにより(by joining)、生細胞の外側で構築される分子、又は(ii)上記(i)に記載のものの複製の結果得られる分子を指す。本明細書の目的のために、前記複製は、in vitroでの複製又はin vivoにおける複製であり得る。

【0020】

前記核酸は、当該技術分野において公知である手順を用いて、化学合成及び/又は酵素的なライゲーション反応に基づいて構築し得る。例えば、Greenら編、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2012)を参照。例えば、核酸は、天然で生じたヌクレオチド、又は前記分子の生物学的安定性を増強するように、若しくはハイブリダイゼーションの際に形成された二重鎖の物理的安定性を増強するように(例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチド)設計された、様々な修飾されたヌクレオチドを用いて、化学的に合成し得る。前記核酸の生成に用い得る修飾されたヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル(5-fluorouracil)、5-ブロモウラシル(5-bromouracil)、5-クロロウラシル(5-chlorouracil)、5-ヨードウラシル(5-iodouracil)、ヒポキサンチン(hypoxanthine)、キサンチン(xanthine)、4-アセチルシトシン(4-acetylcytosine)、5-(カルボキシドロキシメチル)ウラシル(5-(carboxyhydroxymethyl)uracil)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン(5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine)、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル(5-carboxymethylaminomethyluracil)、ジヒドロウラシル(dihydouracil)、-D-ガラクトシリルキュオシン(beta-D-galactosylqueosine)、イノシン(inosine)、N⁶-イソペンテニルアデニン(N⁶-isopentenyladenine)、1-メチルグアニン(1-methylguanine)、1-メチルイノシン(1-methylinosine)、2,2-ジメチルグアニン(2,2-dimethylguanine)、2-メチルアデニン(2-methyladenine)、2-メチルグアニン(2-methylguanine)、3-メチルシトシン(3-methylcytosine)、5-メチルシトシン(5-methylcytosine)、N⁶-置換アデニン(N⁶-substituted adenine)、7-メチルグアニン(7-methylguanine)、5-メチルアミノメチルウラシル(5-methylaminomethyluracil)、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル(5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil)、-D-マンノシリクエオシン(beta-D-mannosylqueosine)、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル(5'-methoxycarboxymethyluracil)、5-メトキシウラシル(5-methoxyuracil)、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン(2-methylthio-N⁶-isopentenyladenine)、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)(uracil-5-oxyacetic acid(v))、ワイブトキソシン(wybutoxosine)、シユードウラシル(pseudouracil)、キュオシン(queosine)、2-チオシトシン(2-thiocytosine)、5-メチル-2-チオウラシル(5-methyl-2-thiouracil)、2-チオウラシル(2-thiouracil)、4-チオウラシル(4-thiouracil)、5-メチルウラシル(5-methyluracil)、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル(uracil-5-oxyacetic acid methylester)、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル(3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil)及び2,6-ジアミノプリン(2,6-diaminopurine)が挙げられるが、これらに限定されない。代替的に、本発明の前記核酸の1以上は、Macromolecular Resources (Fort Collins, CO)及びSynthegen (Houston, TX)のような企業から購入し得る。

【0021】

本発明の一実施形態においては、前記ベクターは組換え発現ベクターである。本明細書の目的のために、用語「組換え発現ベクター」は、宿主細胞によってmRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの発現を可能にする、遺伝的に改変されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド・コンストラクトを意味する。前記コンストラクトが、mRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むとき、前記ベクターを、mRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを細胞内において発現させるのに十分な条件下で、細胞と接触させる。本発明のベクターは、全体として自然

10

20

30

40

50

に存在した物でない。しかし、ベクターの一部については、自然に存在した物であり得る。本発明の組換え発現ベクターは、任意の型のヌクレオチドを含み得、一本鎖又は二本鎖であり、合成されたか又は部分的に自然のソースから得られ、及び天然、非天然又は改変されたヌクレオチドを含み得る、DNA及びRNAを含むが、これらに限定されない。組換え発現ベクターは、天然で生じたヌクレオチド間の結合、非天然で生じたヌクレオチド間の結合又は両方の型の結合を含み得る。好ましくは、非天然で生じたか、又は改変されたヌクレオチド又はヌクレオチド間の結合は、ベクターの転写又は複製を妨げない。

【0022】

本発明の組換え発現ベクターは、例えば、Greenら（上記）に記載された標準的な組換えDNA技術を用いて、調製し得る。発現ベクターのコンストラクトは、環状又は直鎖状であり、原核又は真核の宿主細胞において機能的である複製システムを含有するよう調製し得る。複製システムは、例えば、COL E 1、2 μ プラスミド、S V 4 0、ウシ・パピローマ・ウイルス等に由来し得る。

10

【0023】

組換え発現ベクターは、1以上のマーカー遺伝子を含み得、形質転換されたか又はトランسفェクトされた宿主の選択を可能にする。マーカー遺伝子としては、殺生物剤耐性、例えば、抗生物質、重金属等に対する耐性、原栄養性を付与するための栄養要求性宿主における相補性等が挙げられる。本発明の発現ベクターにとって適したマーカー遺伝子としては、例えばネオマイシン / G 4 1 8 耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。

20

【0024】

前記ベクターは、ベクターでトランسفェクトしたか、又はベクターを含むウイルスを感染させた細胞において、R P 2 又はR P G R - O R F 1 5 の転写、翻訳及び発現のうちの1以上を可能にする様式で、R P 2 又はR P G R - O R F 1 5 をコードするヌクレオチド配列に作動可能なようにつながれた調節配列を、さらに含んでも良い。本明細書において用いられる場合、「作動可能につながれた」配列としては、R P 2 又はR P G R - O R F 1 5 をコードするヌクレオチド配列と隣接する調節配列、及びR P 2 又はR P G R - O R F 1 5 をコードするヌクレオチド配列を調節するために、in trans又は少し離れて作用する調節配列の両方が挙げられる。

30

【0025】

前記調節配列は、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーター配列及びエンハンサー配列、スプライシング及びポリアデニル化（ポリA）シグナル配列のようなRNAプロセッシング・シグナル、細胞質のmRNAを安定化する配列、翻訳効率を促進する配列（即ち、コザック・コンセンサス配列）、タンパク質の安定性を促進する配列、及び所望により、コードされた産物の分泌を促進する配列、を含んでもよい。ポリAシグナル配列は、合成しても良く、又は、例えば、S V - 4 0、ヒト及びウシを含む、多くの適切な生物種に由来しても良い。好ましくは、該ベクターは全長又はトランケートされた（truncated）ヒト グロビン・ポリAシグナル配列を含む。本発明の一実施形態においては、ヒト グロビン・ポリAシグナル配列は、配列番号6（全長）又は配列番号7（トランケート）のヌクレオチド配列を含む。

40

【0026】

前記調節配列はまた、イントロンを含んでも良い。好ましくは、イントロンは、プロモーター配列及びR P 2 又はR P G R - O R F 1 5 をコードするヌクレオチド配列の間に位置する。適したイントロン配列の例としては、サイトメガロウイルス（CMV）/ヒト

グロビン・イントロン及びS V - 4 0 由来のイントロン（SD - SAとして参照する）が挙げられる。好ましくは、イントロンはCMV / ヒト グロビン・イントロンである。本発明の一実施形態においては、CMV / ヒト グロビン・イントロンは、配列番号8又は9のヌクレオチド配列を含む。

【0027】

50

前記調節配列はまた、プロモーターを含んでも良い。プロモーターは標的細胞、例えば眼の細胞において、R P 2 又は R P G R - O R F 1 5 を発現するために適した任意のプロモーターであっても良い。プロモーターは誘導的又は構成的であっても良い。本発明の一実施形態においては、プロモーターは、特定の眼の細胞の種類において、R P 2 又は R P G R - O R F 1 5 を発現するために適している。この点、プロモーターは細胞特異的であっても良い。例えば、プロモーターは、眼の細胞、網膜色素上皮 (R P E) 細胞、光受容器細胞の任意の 1 以上においてか、桿体においてか、又は錐体細胞においての発現にとつて特異的であっても良い。適したプロモーターの例としては、ヒト G タンパク質共役受容体タンパク質キナーゼ 1 (G R K 1) プロモーター (ヒト・ロドプシン・キナーゼ・プロモーターとしても参照する)、ヒト光受容器間レチノイド結合タンパク質近位 (I R B P) 10 プロモーター、R P 2 又は R P G R - O R F 1 5 のネイティブ・プロモーター、R P G R 近位プロモーター、桿体オプシン・プロモーター、赤及び緑オプシン・プロモーター、青オプシン・プロモーター、c G M P - - ホスホジエステラーゼ・プロモーター、マウス・オプシン・プロモーター、ロドプシン・プロモーター、錐体トランスデューションのサブユニット、ホスホジエステラーゼ (P D E) プロモーター、網膜色素変性症 (R P 1) プロモーター、N X N L 2 / N X N L 1 プロモーター、R P E 6 5 プロモーター、網膜変性スロー / ペリフェリン 2 (slow/peripherin 2) (R d s / p e r p h Z) プロモーター、V M D 2 プロモーター、及び前記のいずれかの機能的断片が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、R P 2 又は R P G R - O R F 1 5 をコードするヌクレオチド配列は、G R K 1 プロモーター (ヒト・ロドプシン・キナーゼ・プロモーターとしても参照する) の転写制御下にある。本発明の一実施形態においては、ヒト・ロドプシン・キナーゼ・プロモーターは配列番号 1 0 のヌクレオチド配列を含む。

【0028】

本発明の一実施形態においては、ベクターは I T R 又はその機能的断片を含む。好ましくは、ベクターは 5' 及び 3' A A V I T R を含む。I T R は、本明細書に記載の、いずれかの A A V 血清型を含む、任意の適した A A V 血清型であっても良い。I T R は、当該技術分野において公知である技術を用いて容易に単離され、公的な又は商業的な供給源 (例えば、アメリカン・タイプカルチャ・コレクション、Manassas, VA) から単離又は取得しても良い。代替的には、I T R 配列は、公開された配列を参照して、合成又は他の適した方法によって取得しても良い。好ましくは、ベクターは 5' 及び 3' A A V 2 I T R を含む。本発明の一実施形態においては、ベクターはトランケート 5' A A V 2 I T R を含む。本発明の一実施形態においては、ベクターは配列番号 1 1 のヌクレオチド配列を含む 5' A A V 2 I T R 及び配列番号 1 2 のヌクレオチド配列を含む 3' A A V 2 I T R を含む。本発明の別の実施形態においては、ベクターは配列番号 1 3 のヌクレオチド配列を含むトランケート 5' A A V 2 I T R 及び配列番号 1 2 のヌクレオチド配列を含む 3' A A V 2 I T R を含む。

【0029】

本明細書に記載のタンパク質の機能的断片をコードする、本明細書に記載の、いずれかのヌクレオチド配列の機能的断片を含むベクターは、本発明の範囲に含まれる。R P 2 又は R P G R - O R F 1 5 タンパク質を参照する際に用いられる場合、用語「機能的断片」は、一部分 (part) 又は部分 (portion) が、一部分であるタンパク質 (親タンパク質) の生物学的活性を維持している、タンパク質の任意の一部分又は部分を指す。機能的なタンパク質断片は、例えば、親タンパク質と類似する程度、同じ程度又はより高い程度に、X L R P を治療又は予防を認識する、光受容器数を増加する、哺乳動物における網膜剥離を低減する、哺乳動物における光受容器の電気的応答が上昇する、哺乳動物の網膜におけるタンパク質発現が上昇する、哺乳動物の網膜における桿体外節にタンパク質が局在する、又は哺乳動物の視力が上昇する能力を維持するタンパク質の一部分を包含する。例えば、R P G R - O R F 1 5 をコードするヌクレオチド配列の機能的断片は、R P G R - O R F 1 5 をコードするが、反復領域において、6 5 4 塩基対 (b p) 短くなっている (Hong ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 46(2): 435-441 (2005)) c D N A であっても良く 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100

、それはマウスにおいてR P G R機能を再構成することが示されている。

【0030】

ポリAシグナル配列又はI T Rを参照する際に用いられる場合、用語「機能的断片」は、又クレオチド配列の任意の一部分又は部分を指し、一部分又は部分は、それが一部分である又クレオチド配列（親又クレオチド配列）の生物学的活性を維持している。機能的なタンパク質断片は、例えば、親又クレオチド配列と、類似する程度、同じ程度又はより高い程度に、R N A切断複合体によって認識される能力を維持しているポリAシグナル配列の一部分、又は複製を可能にする能力を維持しているI T Rの一部分を包含する。親又クレオチド配列又はタンパク質を参照すると、機能的断片は、例えば親又クレオチド配列又はタンパク質の約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%以上を含み得る。 10

【0031】

本明細書に記載のR P 2及びR P G R - O R F 1 5タンパク質の機能的変異体をコードするベクターは、本発明の範囲に含まれる。本明細書において用いられる場合、用語「機能的変異体」は、親タンパク質と実質的な又は有意な配列の同一性又は配列の類似性を有するタンパク質を指し、機能的変異体は変異体であるタンパク質の生物学的活性を維持している。機能的変異体は、例えば、親R P 2又はR P G R - O R F 1 5タンパク質と、類似する程度、同じ程度又はより高い程度に、X L R Pを治療又は予防する、光受容器数を増加する、哺乳動物における網膜剥離を低減する、哺乳動物における光受容器の電気的応答が上昇する、哺乳動物の網膜におけるタンパク質発現が上昇する、哺乳動物の網膜における桿体外節にタンパク質が局在する、及び/又は哺乳動物の視力が増加する、能力を維持している、本明細書に記載のR P 2又はR P G R - O R F 1 5タンパク質（親タンパク質）の変異体を包含する。親R P 2又は親R P G R - O R F 1 5タンパク質を参照すると、機能的変異体は、例えば、親R P 2又は親R P G R - O R F 1 5タンパク質と、アミノ酸配列において、少なくとも約30%、約50%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%以上一致し得る。 20

【0032】

機能的変異体は、例えば、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する親R P 2又はR P G R - O R F 1 5タンパク質のアミノ酸配列を含み得る。代替的に又は追加的に、機能的変異体は、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を有する親R P 2又はR P G R - O R F 1 5タンパク質のアミノ酸配列を含み得る。この場合において、好ましくは、非保存的アミノ酸置換が、機能的変異体の生物学的活性に干渉しないか又はそれを阻害しない。非保存的アミノ酸置換は、親R P 2又は親R P G R - O R F 1 5タンパク質と比べて機能的変異体の生物学的活性が上昇するように、機能的変異体の生物学的活性を促進する場合がある。 30

【0033】

親R P 2又は親R P G R - O R F 1 5タンパク質のアミノ酸置換は、好ましくは、保存的アミノ酸置換である。保存的アミノ酸置換は、当該技術分野において公知であり、ある物理的及び/又は化学的な性質を有する1のアミノ酸が、同じか又は類似する化学的又は物理的性質を有する別のアミノ酸に変換されるアミノ酸置換を含む。例えば、保存的アミノ酸置換は、酸性/負電荷の極性アミノ酸が、別の酸性/負電荷の極性アミノ酸（例えば、A s p又はG l u）の代わりとなり、非極性側鎖を有するアミノ酸が、非極性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、A l a、G l y、V a l、I l e、L e u、M e t、P h e、P r o、T r p、C y s、V a l等）の代わりとなり、塩基性/正電荷の極性アミノ酸が、別の塩基性/正電荷の極性アミノ酸（例えば、L y s、H i s、A r g等）の代わりとなり、極性側鎖を有し電荷を有していないアミノ酸が、別の極性側鎖を有し電荷を有していないアミノ酸（例えば、A s n、G l n、S e r、T h r、T y r等）の代わりとなり、一位で分枝した側鎖を有するアミノ酸が、別の一位で分枝した側鎖を有するアミノ酸（例えば、I l e、T h r及びV a l）の代わりとなり、芳香族側鎖を有するアミノ酸が 40 50

、別の芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、His、Phe、Trp及びTyr）の代わりとなる等、あり得る。

【0034】

R P 2 若しくは R P G R - O R F 1 5 タンパク質又は機能的変異体は、他の構成要素、例えば他のアミノ酸が R P 2 若しくは R P G R - O R F 1 5 タンパク質又は機能的変異体の生物学的活性を実質的に変化させないように、本明細書に記載の特定のアミノ酸配列から本質的になり得る。

【0035】

本発明の一実施形態においては、R P 2 ベクターは、表1に記載された構成要素を含むヌクレオチド配列を含む。この点、全長R P 2 ベクターは、配列番号14のヌクレオチド配列を含んでも良い。 10

【0036】

【表1】

R P 2 ベクター（配列番号14）		
配列番号14のヌクレオチドの位置	配列番号	構成要素
1-106	13	5' AAV2 ITR (トランケート)
137-432	10	ヒト・ロドプシン・キナーゼ・プロモーター
446-730	9	CMV/ヒトβグロビン・イントロン
759-1811	1	ヒトR P 2 cDNA
1817-1930	7	ヒトβグロビン・ポリアデニル化シグナル (トランケート)
1943-2087	12	3' AAV2 ITR

【0037】

本発明の一実施形態においては、野生型ヒトR P G R - O R F 1 5 の機能的変異体をコードするベクターは、表2に記載の構成要素を含むヌクレオチド配列を含む。この点、野生型ヒトR P G R - O R F 1 5 (配列番号25)の機能的変異体をコードする全長ベクターは、配列番号15のヌクレオチド配列を含んでも良い。 20

【0038】

【表2】

野生型ヒトR P G R - O R F 1 5 の機能的変異体ベクター（配列番号15）		
配列番号15のヌクレオチドの位置	配列番号	要素
1-130	11	5' AAV2 逆位末端反復配列 (ITR)
140-434	10	ヒト・ロドプシン・キナーゼ・プロモーター
449-668	8	サイトメガロウイルス (CMV) /ヒトβグロビン・イントロン
686-4144	3	野生型ヒトR P G R - O R F 1 5 の機能的変異体cDNA
4194-4403	6	ヒトβグロビン・ポリアデニル化シグナル
4417-4561	12	3' AAV2 ITR

【0039】

本発明の一実施形態においては、野生型ヒトR P G R - O R F 1 5 をコードするベクターは、表3に記載の構成要素を含むヌクレオチド配列を含む。この点、野生型ヒトR P G 50

R - O R F 1 5 (配列番号4)をコードする全長ベクターは、配列番号2 6のヌクレオチド配列を含んでも良い。

【0040】

【表3】

野生型ヒトRPGR-ORF15のベクター(配列番号26)		
配列番号26のヌクレオチドの位置	配列番号	要素
1-130	11	5' AAV2逆位末端反復配列(ITS)
140-434	10	ヒト・ロドプシン・キナーゼ・プロモーター
449-668	8	サイトメガロウイルス(CMV) /ヒトβグロビン・イントロン
686-4144	27	野生型ヒトRPGR-ORF15 cDNA
4194-4403	6	ヒトβグロビン・ポリアデニル化シグナル
4417-4561	12	3' AAV2 ITS

【0041】

本発明の一実施形態は、マウスRPGR-ORF15又はその機能的断片をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸を含む、AAVベクターを提供する。マウスRPGR-ORF15をコードするヌクレオチド配列は、配列番号23のアミノ酸配列を含むマウスRPGR-ORF15タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでも良い。該ベクターは、本発明の他の態様に関して、本明細書に記載のマウスRPGR-ORF15をコードするヌクレオチド配列に、作動可能につながれた調節配列を、さらに含んでも良い。本発明の一実施形態においては、マウスRPGR-ORF15をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むAAVベクターは、配列番号24のヌクレオチド配列を含む。

【0042】

本発明の一実施形態においては、該ベクターはまた、本明細書に記載の、いずれかのヌクレオチド配列と、約70%以上、例えば約80%以上、約90%以上、約91%以上、約92%以上、約93%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上又は約99%以上同一であるヌクレオチド配列を含んでも良い。

【0043】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載のRPGR-ORF15又はその機能的断片若しくはその機能的変異体をコードするヌクレオチド配列を含むいずれかのAAVベクターを作製する方法を提供する。前記方法は、鋳型としてゲノムDNAを用いて、RPGR-ORF15又はその機能的変異体のプリン・リッチ領域を増幅することを含んでも良い。増幅は、当該技術分野において公知の任意の適した方法によって行う場合がある。例えば、増幅は、PCRによって行ってもよい。前記方法は、RPGR-ORF15又はその機能的変異体のエキソン1-14をコードするヌクレオチド配列に、プリン・リッチ領域を結合することを含んでも良い。結合することは、当該技術分野において公知の任意の適した方法によって行う場合がある(例えば、Greene(上記)を参照)。前記方法は、XL10-gold細菌株における、ベクターの増殖をさらに含んでも良い。

【0044】

本発明のベクターは、医薬組成物のような組成物に製剤化し得る。この点、本発明は本明細書に記載の、いずれかのベクター及び医薬的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。任意の適した担体は、本発明の文脈内で使用することができ、そのような担体は、当該技術分野において周知である。担体の選択は、組成物が投与される特定の部位によって(例えば、眼細胞、RPE細胞、光受容器細胞、桿体及び錐体)、及び組成物を投与

10

20

30

40

50

するために用いる特定の方法によって、ある程度決定される。前記医薬組成物は、任意で無菌であるか、又は1以上のアデノ随伴ウイルス・ベクターを例外的に含む無菌であり得る。

【0045】

医薬組成物に適した製剤としては、水溶液及び非水溶液、等張な滅菌された溶液が挙げられ、それらは、抗酸化剤、緩衝剤及び静菌薬、並びに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び防腐剤を含み得る水溶性及び非水溶性の滅菌された懸濁液を含有し得る。該製剤は、アンプル及びバイアルのような1回投与量又は多数回投与量で封入された容器において存在することができ、使用する直前に、例えば水といった滅菌された液状担体を添加することだけを要するフリーズドライ(凍結乾燥)条件において保管し得る。即時溶液及び懸濁剤は、滅菌された粉末、顆粒及び錠剤から調製され得る。好ましくは、該担体は、緩衝生理食塩水溶液である。より好ましくは、本発明の方法において使用するための前記医薬組成物は、投与する前の損傷からアデノ随伴ウイルス・ベクターを保護するために製剤化される。例えば、該医薬組成物は、ガラス器具、シリنج又は針のような、発現ベクターを調製するか、保管するか、又は投与するために使用される装置において、アデノ随伴ウイルス・ベクターの減耗を減らすよう、製剤化し得る。該医薬組成物は、アデノ随伴ウイルス・ベクターの光感受性及び/又は温度感受性を低減するよう、製剤化し得る。この目的のために、該医薬組成物は、好ましくは、例えば、上記したような医薬的に許容される液状担体を含み、ポリソルベート80、L-アルギニン、ポリビニルピロリドン、トレハロース及びそれらの組合せからなる群より選択される安定剤を含む。そのような組成物の使用によって、該ベクターの保存可能期間が延び、投与が容易になり、本発明の方法の有効性が増す場合がある。医薬組成物はまた、アデノ随伴ウイルス・ベクターの形質導入効率を促進するよう製剤化し得る。加えて、当業者であれば、該医薬組成物が、他の治療的又は生物学的活性がある剤を含み得ることを十分理解する。例えば、イブプロフェン又はステロイドのような、炎症を制御する因子は、アデノ随伴ウイルス・ベクターを *in vivo* に投与することに伴って起こる、腫脹及び炎症を低減するための医薬組成物の一部であり得る。抗生物質、即ち殺菌剤及び抗真菌剤は、存在している感染を治療するために、及び/又は遺伝子導入手順と関連する感染のような、将来的な感染のリスクを低減するために、提供し得る。

【0046】

本発明のベクター及び医薬組成物(本明細書においては)、以後、まとめて「本発明のAAVベクター材料」として参照する)は、XLRPを治療又は予防する方法において使用し得ると考えられる。この点、本発明の一実施形態は、哺乳動物におけるXLRPを治療又は予防するための有効量で、本明細書に記載の、いずれかの本発明のAAVベクター材料を、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるXLRPを治療又は予防する方法を提供する。

【0047】

本明細書において用いられる場合、用語「治療」及び「予防」とそれから派生する用語は、100%若しくは完全な治療又は予防であることを意味する必要はない。むしろ、当業者が潜在的な利益又は治療効果を有すると認識する治療又は予防の様々な程度がある。この点、本発明の方法は、哺乳動物におけるXLRPの治療又は予防の任意の量又は任意のレベルを提供し得る。さらに、本発明の方法によって提供される治療又は予防は、XLRPの1以上の状態、症状又は兆候を治療又は予防することを含み得る。幾つかのケースにおいては、本発明の方法はXLRPを治療(cure)し得る。また、本明細書の目的のために、「予防」は、XLRPの発症、又はその症状、兆候(sign)若しくは状態を遅らせることを包含し得る。

【0048】

例えば、本発明の方法は、外核層(ONL)の菲薄化又は肥厚、外網状層(OPL)の菲薄化又は肥厚、桿体及び錐体の内側部分の短縮、双極細胞樹状突起の退縮、内核層、内網状層、神経節細胞層及び神経線維層を含む内網膜層の菲薄化又は肥厚、オプシンの誤局

10

20

30

40

50

在、神経フィラメントの過剰発現、哺乳動物における網膜剥離、哺乳動物における光受容器の電気的応答の低下、網膜電図（ERG）機能の喪失、視力及びコントラスト感度の喪失、視覚誘導行動の喪失、周辺視力の低下、中心視力の低下、夜間視力の低下、コントラスト感度の喪失、及び色覚の喪失である、光受容器構造及び／又は機能の喪失の任意の1以上の進行を、改善し、修正し又は停止し得る。

【0049】

本発明の方法、ベクター及び医薬組成物は、任意の1以上の利点を提供し得る。例えば、本発明の方法、ベクター及び医薬組成物は、網膜の健全性又は質を改善する場合があり、視覚障害を低減するか又は予防する場合がある。従って、本発明の方法、ベクター及び医薬組成物は、例えば、自動車の運転や独立した生活などの、視覚によって誘導される活動を行うための、患者の能力を有利に改善する場合がある。

10

【0050】

本発明のベクター及び医薬組成物は、哺乳動物の網膜における、光受容器数を増加させる方法において使用し得ると考えられる。この点、本発明の一実施形態は、哺乳動物の網膜における光受容器数を増加させる方法を提供し、該方法は、哺乳動物の網膜の光受容器数を増加させるための有効量で、本明細書に記載された、いずれかの本発明のAAVベクター材料を、哺乳動物に投与することを含む。

【0051】

本発明のベクター及び医薬組成物はまた、哺乳動物の視力を増加させるために有用であり得る。この点、本発明の一実施形態は、哺乳動物の視力を増加させる方法を提供し、前記方法は、哺乳動物の視力を増加させるための有効量で、本明細書に記載された任意の本発明のAAVベクター材料を、哺乳動物に投与することを含む。

20

【0052】

本発明のベクター及び医薬組成物はまた、哺乳動物における網膜剥離を低減するために有用であり得る。この点、本発明の一実施形態は、哺乳動物における網膜剥離を低減する方法を提供し、前記方法は、哺乳動物における網膜剥離を低減するための有効量で、本明細書に記載された、いずれかの本発明のAAVベクター材料を、哺乳動物に投与することを含む。

【0053】

本発明のベクター及び医薬組成物はまた、哺乳動物における光受容器の電気的応答を増加させるために有用であり得る。この点、本発明の一実施形態は、哺乳動物における光受容器の電気的応答を増加させる方法を提供し、前記方法は、哺乳動物における光受容器の電気的応答を増加させるための有効量で、本明細書に記載された、いずれかの本発明のAAVベクター材料を、哺乳動物に投与することを含む。光受容器は、例えば、桿体及び錐体の一方又は両方を含んでも良い。光受容器の電気的応答は、当該技術分野において公知である、例えば網膜電図（ERG）のような、任意の適した方法によって、測定する場合がある。

30

【0054】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物の網膜におけるタンパク質の発現を増加させる方法を提供する。前記方法は、哺乳動物の網膜におけるタンパク質の発現を増加させるための有効量で、本明細書に記載の、いずれかの本発明のAAV-RP2ベクター又は前記ベクターを含む医薬組成物を、哺乳動物に投与することを含んでも良い。本発明の一実施形態においては、前記タンパク質はRP2、錐体オプシン又は錐体PDE6である。

40

【0055】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物の網膜におけるタンパク質の発現を増加させる方法を提供し、前記方法は、哺乳動物の網膜におけるタンパク質の発現を増加させるための有効量で、本明細書に記載の、いずれかの本発明のRPGRベクター又は該ベクターを含む医薬組成物を、哺乳動物に投与することを含む。本発明の一実施形態においては、該タンパク質はRPGRである。

【0056】

50

本発明の別の実施形態は、哺乳動物の網膜における桿体外節に、タンパク質を局在させる方法を提供する。前記方法は、哺乳動物の網膜における桿体外節にタンパク質を局在させるための有効量で、本明細書に記載の、いずれかの本発明のR P G R ベクター又は該ベクターを含む医薬組成物を、哺乳動物に投与することを含んでも良い。本発明の一実施形態においては、前記タンパク質はロドプシン又はP D E 6 である。

【0057】

本発明の方法は、哺乳動物の目に、例えば、眼内に、網膜下に、又は硝子体内に、A A V ベクター材料を投与することを含んでも良い。好ましくは、A A V ベクター材料は、網膜下に投与される。

【0058】

本発明の目的のために、投与される本発明のA A V ベクター材料の量又は投与量は、望ましい応答、例えば合理的な時間枠での哺乳動物における、治療的又は予防的な応答をもたらすために十分でなければならない。例えば、投与時から約2時間以上、例えば12～24時間以上の期間で、X L R P を治療又は予防するため、光受容器を増加させるため、及び/又は視力を増加させるために、本発明のA A V ベクター材料の投与量は十分でなければならない。ある実施形態では、期間をより長くすることができる。投与量は、特定の本発明のA A V ベクター材料の有効性、並びに哺乳動物（例えばヒト）の状態及び哺乳動物（例えばヒト）の体重によって決定される。

【0059】

投与量を決定するための多くのアッセイ法は、当該技術分野において公知である。投与される量は、in vitro（例えば細胞培養）で又はin vivo（例えば動物実験）で決定する場合がある。例えば、投与される量は、I C₅₀ 値（疾患の兆候について、最大時の半分阻害を達成する投与量）、L D₅₀ 値（集団の50%が致死的である投与量）、E D₅₀ 値（集団の50%で、治療効果が得られる投与量）、細胞培養、動物実験又はその組合せでの治療指数によって決定してもよい。治療指数は、E D₅₀ 値に対するL D₅₀ 値の比（即ちL D₅₀ / E D₅₀）である。

【0060】

本発明のA A V ベクター材料の投与量はまた、特定の本発明のA A V ベクター材料を投与したことに伴い得る、任意の不利な副作用の存在、性質及び程度によって決定する場合がある。典型的には、主治医が、年齢、体重、一般的健康状態、食事、性別、投与される本発明のA A V ベクター材料、投与経路及び治療される状態の深刻度のような様々な要因を考慮に入れて、各患者個人を治療するための、本発明のA A V ベクター材料の投与量を決定する。例として（本発明を限定することを意図していない）、本発明のA A V ベクター材料の投与量は、約1×10⁸～約2.5×10⁸ ベクター・ゲノム（v g）/眼、約1×10⁸～約1×10⁹ ベクター・ゲノム（v g）/眼、又は約1×10⁶～約1×10¹³ であり得る。本発明の一実施形態においては、本発明のR P 2 ベクターの投与量は、約5×10⁶～約5×10¹²、約5×10⁶～約5×10⁸、又は約5×10⁷～約5×10⁸ ベクター・ゲノム（v g）/眼である。本発明の別の実施形態においては、本発明のR P G R - O R F 15 ベクターの投与量は、約5×10⁶～約5×10¹²、約1×10⁸～約5×10⁹ v g /眼であり、好ましくは、約5×10⁸～約2×10⁹ v g /眼である。約1×10⁹ v g /眼の、本発明のR P G R - O R F 15 ベクターの投与量が特に好ましい。本発明の別の実施形態においては、本発明のマウスR P G R - O R F 15 ベクターの投与量は、約1×10⁸～約5×10⁸ v g /眼であり、好ましくは、約3×10⁸ v g /眼である。

【0061】

本明細書において用いられる場合、用語「哺乳動物」は、マウス及びハムスターのようなげっ歯目の哺乳動物、ウサギのようなウサギ目の哺乳動物を含むが、これらに限定されない、任意の哺乳動物を指す。好ましくは、ネコ科（ネコ）及びイヌ科（イヌ）を含むネコ目に由来する哺乳動物である。より好ましくは、ウシ科（ウシ）及びブタ科（ブタ）を含むウシ目、又はウマ科（ウマ）を含むウマ目に由来する哺乳動物である。最も好ましく

10

20

30

40

50

は、靈長類、セボイド (Ceboids) 目、シモイド (Simoids) 目 (サル) 又は真猿亜 (Anthropoids) 目 (ヒト及び類人猿) の哺乳動物である。特に好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0062】

以下の実施例は本発明について、さらに説明するが、もちろん、決して本発明の範囲を限定すると解釈されるべきでない。

【実施例】

【0063】

実施例 1 - 6

以下の材料及び方法を、実施例 1 ~ 6 で用いた。

10

【0064】

マウスの系統と飼育

R p g r - ノックアウト (KO) マウスは、国立衛生研究所 (NIH) において、12 時間 (h) の明 / 12 h の暗のサイクルで制御された周囲照明の動物飼育施設で維持した。研究は、眼及び視力研究における動物の使用に関する視覚と眼科学研究協会 (ARVO) の声明を遵守している。動物プロトコールは、国立眼科研究所 (NEI) の動物実験委員会によって承認された。

【0065】

AAVベクターの構築及び產生

マウス又はヒト R P G R - O R F 1 5 エキソンのプリン・リッチ領域を、雄の C 5 7 マウス又は健常な成人男性のドナーの、それぞれのゲノム DNA から、ポリメラーゼ連鎖反応増幅した。S a p I 制限酵素部位及び近接するプリン・リッチ領域を含む、エキソン O R F 1 5 の 3' DNA を、健常な成人男性のドナーのゲノム DNA から PCR 増幅した。

20

プライマーの配列は以下の通り：

- m R p g r フォワード (F) : 配列番号 1 6 ;
- m R p g r リバース (R) : 配列番号 1 7 ;
- h R P G R F : 配列番号 1 8 ; 及び
- h R P G R R : 配列番号 1 9

【0066】

PCR は、PRIMESTAR HS DNA ポリメラーゼ (クロンテック・ラボラトリーズ社、Mountain View, CA) を用いて行った。PCR 条件は、94 × 1 分の後、98 × 10 秒、72 × 80 秒で 30 サイクル、72 で 7 分の伸長、及び 4 で維持であった。PCR 産物は、シーケンス解析 (Sequetech Inc., Redwood City, CA) によって確認し、ヒト又はマウス R P G R - O R F 1 5 全長の cDNA を生成するために、合成した上流のエキソンに結合した。エキソン 1 ~ 1 4 、及び S a p I 部位を有する、エキソン O R F 1 5 の 5' 部分を合成した。PCR 増幅した DNA 断片及び合成した DNA 断片を S a p I でそれぞれ消化し、次いで、ヒト R P G R - O R F 1 5 全長の cDNA (配列番号 3) を組み立てるために結合した。マウス R p g r - O R F 1 5 全長の cDNA は、同じ戦略を用いて生成した。

30

【0067】

AAV タイプ 2 逆位末端反復配列 (ITRS) (配列番号 1 1 及び 1 2) を、AAV ベクターの構築において用いた。R P G R - O R F 1 5 発現カセットは、ヒト・ロドプシン・キナーゼ・プロモーター (配列番号 1 0) (Khaniら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 48: 3954-3961 (2007)) 、キメラ CMV / ヒト グロビン・イントロン (配列番号 8) 、ヒト (配列番号 3) 又はマウス R P G R - O R F 1 5 の cDNA 、及びヒト グロビン・ポリアデニル化部位 (配列番号 6) を含んでいた。ベクター・プラスミドは、X L 1 0 - g o l d 細菌株 (アジレント・テクノロジーズ社、Santa Clara, CA) 内で増幅した (propagated)。

40

【0068】

AAV ベクターは、Grimmら、Blood, 102: 2412-2419 (2003) に記載されているように

50

、 H E K 2 9 3 細胞に 3 重のプラスミド・トランスフェクションを行うことによって產生した。ヒト R P G R - O R F 1 5 A A V コンストラクトを A A V 8 にパッケージした一方で、マウス R P G R - O R F 1 5 コンストラクトは、 A A V 8 及び A A V 9 の両方にパッケージした。ベクターは、 Grimm (上記参照) に記載されているように、 ポリエチレンギリコール沈殿後、 塩化セシウム密度勾配分画によって精製した。精製したベクターは、 1 0 m M Tris - H C l 、 1 8 0 m M N a C l 、 p H 7 . 4 に配合し、 直鎖化プラスミド標準を用いてリアルタイム P C R によって定量し、 使用まで - 8 0 で保管した。ベクターの完全性は、 精製後に毎回、 R P G R - O R F 1 5 c D N A のプリン・リッチ領域を増幅することによって検証した。

【 0 0 6 9 】

網膜下注射

幾つかの点は変更したが、 Sun ら、 Gene Ther. , 17: 117-131 (2010) に記載されているように、 A A V ベクターを網膜下に注射した。簡易には、 マウスに、 ケタミン (8 0 m g / k g) 及びキシラジン (8 m g / k g) を腹腔内注射して、 麻酔した。瞳孔を、 局所的なアトロピン (1 %) 及びトロピカミド (1 %) で拡張させた。手術は、 眼科手術用顕微鏡の下で行った。 1 8 ゲージの針を用いて、 縁の近傍で角膜を僅かに切開した。 3 3 ゲージのブラント (blunt) 針をハミルトン・シリングに装着し、 切開部を通して、 レンズを避けながら挿入し、 網膜にまで突き刺した。全ての注入は、 網膜の鼻側象限 (nasal quadrant) 内の位置で、 網膜下に行った。各動物には、 1 m L あたり $1 \times 1 0 ^ { 1 1 } \sim 1 \times 1 0 ^ { 1 3 }$ ベクター・ゲノムの濃度で、 1 μ L の A A V ベクターを注入した。治療ベクターは右目に投与し、 対照のビヒクルはもう片方の目に注入した。注入している間の可視化は、 ベクター懸濁液に 0 . 1 体積 % のフルオレセイン (1 0 0 m g / m l の A K - F L U O R 、 Alcon, Fort Worth, TX) を添加して補助した。 1 0 0 を超える R p g r ノックアウト・マウスにおいて、 投与による有効性研究を行った。

【 0 0 7 0 】

イムノプロット分析

1 \times プロテアーゼ阻害剤を含有する放射性同位体免疫沈降アッセイ (R I P A) 溶解バッファー中で、 マウス網膜を短時間の超音波破碎によって、 ホモジエナライズした。組織片を、 短時間の遠心によって除去した。網膜タンパク質を、 電気泳動によってドデシル硫酸ナトリウム (S D S) ポリアクリルアミドゲルで分離し、 ニトロセルロース膜に転写した。 5 % 脱脂粉乳を用いて、 室温で 1 時間、 プレ吸着した後、 プロットした膜 (membrane blots) を、 4 で一次抗体と共に、 オーバーナイトでインキュベートした。次いで、 プロットを、 T W E E N 2 0 界面活性剤を含むトリス緩衝生理食塩水 (T B S T : 1 3 7 m M 塩化ナトリウム、 2 0 m M トリス、 0 . 1 % T w e e n - 2 0 、 p H 7 . 6) で洗浄し、 二次抗体である、 西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ・コンジュゲート化抗ウサギ I g G 又は抗マウス I g G のヤギ抗体 (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) と共に、 室温で 1 時間、 インキュベートした。次に、 S U P E R S I G N A L W e s t P i c o C h e m i l u m i n e s c e n t (サーモフィッシュ・サイエンティフィック社、 Rockford, IL) で発色させた。本研究で用いた一次抗体は、 ウサギ抗マウス R P G R - O R F 1 5 抗体 C 1 0 0 及びウサギ抗ヒト R P G R 抗体 6 4 3 であり、 それぞれ、 マウス R P G R - O R F 1 5 の C 末端並びにヒト R P G R - O R F 1 5 及び R P G R $^{ 1 - 1 9 }$ アイソフォーム (isoforms) の共通領域を認識する。マウスモノクローナル抗 アクチン抗体 (シグマ) を、 ローディング (loading) 対照として用いた。

【 0 0 7 1 】

組織処理、 免疫蛍光及び形態的分析

安樂死の後、 マウスの眼球を採取した。ベクターで処置した眼及びビヒクルで処置した眼と同等の領域において、 免疫染色が行われたことを確認するために、 摘出前に眼の位置 (orientation) に印を付けるよう青色色素を用いた。固定のために、 眼を直ぐに、 4 % パラホルムアルデヒド中に 1 時間置いた。固定された組織を、 オーバーナイトで、 3 0 % スクロースを含む P B S に浸漬し、 低温保持装置を用いて、 急速に凍結し、 1 0 μ m の厚

10

20

30

40

50

さの切片にした。Hongら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 44: 2413-2421 (2003)に記載されているように、結合纖毛に局在化した R P G R を検出するために、代替的なプロトコールを用いた。簡易には、固定及び液体窒素中での急速な凍結を行わず、眼を最適薄切温度 (optimal cutting temperature) 化合物 (O C T) に包埋した。凍結切片は、10 μ mで薄切し、前処理したスライドガラス (Superfrost Plus; フィッシュラー・サイエンティフィック、Pittsburgh, PA) 上に収集した。切片は -80 $^{\circ}$ C に保管し、2~3日以内に使用した。使用の直前に、切片を、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S、p H 7.0) 中の 1% ホルムアルデヒドで、2分間、スライドガラス上で固定した。切片を1週間より長く保管した場合、0.1% 2-メルカプトエタノール (P B S 中) で追加の処理を5分間行った後、1% ホルムアルデヒド固定を5分間行った。次いで、切片をP B S で1回洗浄し、免疫蛍光染色を行った。 10

【 0 0 7 2 】

免疫蛍光染色のために、Hongら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 44: 2413-2421 (2003)に記載されている通りに、凍結切片を、0.1% Triton X-100 を含有する P B S (P B S T) 中の 5% ヤギ血清の中で、1時間プレ吸着させ、次いで、5% ヤギ血清中で希釈した一次抗体の中で、4 \circ 、オーバーナイトでインキュベートした。切片をP B S T 中で3回洗浄し、蛍光色素をコンジュゲート化した二次抗体及び 0.2 μ g / ml の D A P I (4 \circ , 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール) と共に、1時間、インキュベートした。切片を再度洗浄し、FLUOROMOUNT-G 封入剤 (SouthernBiotech, Birmingham, AL) 中で、マウントした (mounted)。画像は、蛍光顕微鏡 AXIO IMAGER Z1 又は共焦点走査顕微鏡 LSM 700 (Zeiss, Germany) を用いて撮影した。 20

【 0 0 7 3 】

一次抗体としては、ヒト及びマウスにおける R P G R - O R F 1 5 及び R P G R¹⁻¹⁹ アイソフォームの共通領域を、それぞれ認識する、ポリクローナル・ウサギ抗ヒト R P G R - O R F 1 5 抗体 636 及びウサギ抗マウス R P G R - O R F 1 5 抗体 S1 (Hong ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 43: 3373-3382 (2002)) が挙げられた。本研究で用いた他の一次抗体としては、ロドプシン (1D4, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) 及びM錐体オプシン (Millipore, Billerica, MA) に対するモノクローナル抗体が挙げられる。二次抗体としては、ALEXA FLUOR 555 及び 568 色素でコンジュゲート化した抗ウサギ及び抗マウスのヤギ抗体 (ライフテクノロジーズ、Grand Island, NY) が挙げられた。 30

【 0 0 7 4 】

外核層 (O N L) の厚さの形態的分析については、視神経頭 (optic nerve head) の各側面に対する、各々 500 μ m 隔てられた 4 力所において、垂直な経線 (vertical meridian) に沿って計測した。計測は、その視神経頭自体から約 500 μ m の位置で開始した。

【 0 0 7 5 】

網膜電図 (E R G)

マウスをオーバーナイトで、暗順応させた。麻酔及び瞳孔拡張を上記の通りに行った。コンピューター・ベース・システム (E S P I O N E 2 網膜電図システム、Diagnosys LLC, Lowell, MA) を、発光ダイオード (L E D) 又はキセノン電球で生じたフラッシュへの応答における、E R G を記録するために用いた。2.5% ヒプロメロース眼用鎮痛溶液の液滴を有するゴールド・ワイヤー・ループ電極を用いて、両目の角膜 E R G を記録した。口中に留置したゴールド・ワイヤー・ループ電極を基準として使用し、接地電極を尾部に置いた。E R G のプロトコールは、-2~+3 log sec cd. s. m⁻² / フラッシュの短時間のフラッシュを用いて、暗順応 E R G を記録することからなる。応答は、コンピューターで平均化し、刺激の強さに依存して、3~60 秒間隔で記録した。明順応 E R G は、白色 32 cd. m⁻² 桿体抑制バックグラウンドに 2 分間順応させた後に、記録した。E R G は、-0.52~+2 log sec cd. s. m⁻² の刺激強度につ 40 50

いて記録した。

【0076】

光コヒーレンス・トモグラフィ (OCT)

OCTボリューム・スキャン画像は、スペクトル・ドメイン (SD) OCTシステム (SPECTRALIS system, Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA) を用いて得た。マウスを麻酔し、上述のように瞳孔を拡張させた。視神経頭を、直径約1.0 mm以内の視野の中心にした。網膜の厚さを示す図を、ハイデルベルグ・アイ・エクスプローラー・ソフトウェアによって作製した。

【0077】

統計分析

10

ベクターで処置した眼とビヒクルで処置した眼における結果を比べるために、対応のある両側T検定を用いた。GRAPHPAD Prism 6ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA) を統計分析のために用いた。

【0078】

実施例1

この実施例は、マウス及びヒトRPGR-ORF15AAVベクターの生成を実証する。

【0079】

マウス又はヒトRPGR-ORF15発現カセットのいずれかを有するAAVベクターを構築した。末端のORF15エキソンのプリン・リッチ領域のために、逆転写PCRを用いたRPGR-ORF15全長のcDNAを獲得するための以前の試みは、成功しなかった。この問題を克服するために、プリン・リッチ領域を増幅するための鑄型としてゲノムDNAを用いて、通常のPCRを行い、次いで、該プリン・リッチ領域を上流エキソンをコードする合成DNA断片に結合した。マウス及びヒトRPGR-ORF15のcDNAの両方を獲得するために、この戦略を採用した。産物を検証するために、完全cDNAのシーケンスを行った。桿体及び錐体細胞特異性を示すヒト・ロドプシン・キナーゼ (RK) プロモーター (配列番号10) (Khaniら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 48: 3954-3961 (2007)) を、RPGR-ORF15を発現させるために用いた。これらの2つのベクターをAAV8型にパッケージした。これらは以降、それぞれAAV8-mRpgr及びAAV8-hRPGRとして参照する。マウスRPGR-ORF15ベクターはまた、非ヒト靈長類の錐体細胞を効率的に形質導入する血清型であるAAV9型 (Vandenbregheら、PLoS One, 8: e53463 (2013)) にパッケージした (以降、AAV9-mRpgrとして参照する)。

20

【0080】

RPGR-ORF15及び2つのAAV逆位末端反復配列 (ITRs) のプリン・リッチ領域を含有するベクター・プラスミドは、プラスミド・クローンを一般的に使用される細菌株内で増殖させたときに、欠失又は再構成が起こりやすかった。広範なテストを行った後、該ベクター・プラスミドがXL10 Gold細胞内において、完全性を維持していることを観察した。マウス又はヒトRPGR-ORF15のcDNAにおける、グルタミン酸-グリシンの繰り返しをコードする配列が広がっている領域のPCR増幅によって、ベクター・プラスミド及び全てのベクター調製物において、期待された1.3 kb又は1.6 kbの断片が産生された。PCRアッセイでは、殆どのAAVベクター調製物において、目に見える欠失は同定されなかった。しかし、小さな欠失は、2つのベクター調製物において検出された。全長ヒトRPGR-ORF15ベクターは、配列番号15を含み、配列番号25のアミノ酸配列 (野生型ヒトRPGRの機能的変異体) をコードしていた。全長マウスRPGR-ORF15ベクターは、配列番号24を含み、配列番号23のアミノ酸配列 (マウスRPGR) をコードしていた。

30

【0081】

実施例2

本実施例は、AAVベクターが媒介するRPGR-ORF15タンパク質の発現を実証

40

50

する。

【0082】

実施例1のベクターが、マウス網膜において全長R P G R - O R F 1 5 タンパク質の発現を媒介するかどうかテストするために、ベクターで処置したR p g r - K O マウスに由来する網膜溶解物のイムノプロット分析を行った。マウスR P G R - O R F 1 5 のC末端に対する抗体を用い、A A V 8 - m R p g r ベクターで処置したR p g r - K O 網膜において、R P G R タンパク質を同定した。1 × 1 0 ⁹ v g のA A V 8 - m R p g r ベクターを網膜下に注入した、R p g r - K O マウスに由来する網膜溶解物は、野生型 (W T) C 5 7 / B 1 6 マウス網膜において検出可能なものと同じである、全長R P G R - O R F 1 5 タンパク質に相当する約2 0 0 k D a のタンパク質バンドを明らかにした。このタンパク質が、野生型 (W T) R P G R タンパク質と同じサイズであったことは、全長マウスR P G R - O R F 1 5 タンパク質を生成する該ベクターの能力を示唆している。同様に、A A V 8 - h R P G R ベクターは、R p g r - K O 網膜において、全長ヒトR P G R - O R F 1 5 タンパク質を生成することができた。1 × 1 0 ⁹ v g のA A V 8 - h R p g r ベクターを網膜下に注入した、R p g r - K O マウスに由来する網膜溶解物は、市販されているヒト網膜溶解物由来のものと同じである、全長R P G R - O R F 1 5 タンパク質に相当する約2 0 0 k D a のタンパク質バンドを明らかにした。ベクターを注射した眼に由来する網膜溶解物の1 / 1 0 量を含むレーンでは、シグナルが検出されなかった。このことは、本アッセイの感度限界を明らかにするものである。O R F 1 5 エキソンの上流のエピトープに対する抗体を用いたとき、A A V 8 - h R P G R で処置した網膜において、一式の、より低分子量のタンパク質もまた検出された。これらのより短いタンパク質が、A A V ベクター調製物のO R F 1 5 エキソンにおける欠失によって生じた可能性を除外することはできないが、これらのより短いタンパク質は、W T マウス網膜で観察されたように (Hongら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 43: 3373-3382 (2002))、R P G R - O R F 1 5 の選択的スプライシング又はC末端のトランケート形態である可能性もある。マウスR P G R のO R F 1 5 エキソンの上流のエピトープに対する抗体を用いたとき、A A V 8 - m R P G R で処置したR p g r - K O 網膜においても、より短いタンパク質が同定されている。

【0083】

マウス及び他の哺乳動物種においては、光受容器の結合纖毛にR P G R - O R F 1 5 タンパク質が局在する (Hongら、Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 3649-3654 (2000)、Hongら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 44: 2413-2421 (2003))。ベクターによって発現したマウス及びヒトR P G R - O R F 1 5 もまた、結合纖毛に局在するかどうかをテストするため、従来通りの4 % パラホルムアルデヒド (P F A) で固定する代わりに、1 % ホルムアルデヒドを用いて (4 % P F Aは、この領域に対する抗体の浸透をブロックするためである (Hongら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 44: 2413-2421 (2003)))、凍結した網膜切片をスライドガラス上で簡易に (brief on-slide) 固定し、免疫蛍光アッセイに用いた。W T タンパク質と同様、ベクターによって発現したR P G R - O R F 1 5 は、主に結合纖毛の位置に対応する内側 (inner) (I S) 及び外節 (O S) の間に、ドットとして見られた。従来通りに4 % P F Aで固定したとき、ベクターによって発現したR P G R - O R F 1 5 は、その結合纖毛への局在に加えて、頻繁にI Sにおいて観察され、時々、光受容器の核及びシナプス末端で観察された。改変した固定法を用いたとき、W T 及びA A V 8 - m R P G R で処置した網膜の両方の、結合纖毛領域において、R P G R 免疫染色が観察された。習慣的な固定法を用いたとき、R P G R はW T 網膜においては検出できなかったが、A A V 8 - m R P G R で処置した網膜のI S、O N L 及びシナプス領域では染色が観察された。A A V 5 R P G R ベクターで処置したイヌ網膜においても観察された (Beltranら、Proc. Natl. Acad. Sci., 109: 2132-2137 (2012)) が、W T マウス網膜では観察されていないことから、この見かけ上のR P G R - O R F 1 5 の誤局在には、ベクターが関連しているようである。特定の理論又は機構に縛られることはないが、比較的高いベクター投与量 (1 × 1 0 ⁹ ベクター・ゲノム (v g)) 及び強力なR K プロモ

ーターを用いたことによるタンパク質の過剰発現が、この観察結果を説明し得ると思われる。R K プロモーターの光受容器特異性のために、他の網膜層においては、検出可能なR P G R - O R F 1 5 の発現は認められなかった。同じ投与量を用いたとき、A A V 9 ベクターによって送達されたマウスR P G R - O R F 1 5 は、A A V 8 ベクターのときと類似するレベルでタンパク質を発現し、該タンパク質は同じ細胞内位置に向かった。

【0084】

実施例3

本実施例は、マウス及びヒトR P G R - O R F 1 5 ベクターの短期間投与量毒性 (short-term dose-toxicity) プロファイルを実証する。

【0085】

長期間での効能研究のための投与量範囲を明らかにするために、短期間でのベクター毒性研究を4カ月間に亘って行った。8週齢R p g r - K O マウスに、網膜下注射によって、一方の眼に、 1×10^{10} 又は 1×10^9 v g / 眼のA A V 8 - h R P G R 又はA A V 8 - m R p g r ベクターを注射した。もう片方の眼は、同量のビヒクルを注射することによって対照として用いた。免疫蛍光分析のためにマウスを屠殺する前、注射後 (P I) 4カ月で、桿体及び錐体光受容器に由来する応答を評価するために、暗順応及び明順応ERGを記録した。R p g r - K O マウス系統における、遅い網膜変性のために、ベクター処置後、4カ月での治療効果は期待されなかった。

【0086】

1×10^9 v g のA A V 8 - h R P G R 又はA A V 8 - m R p g r ベクターの注射を受けたマウスにおける、暗順応a波、b波及び明順応b波のERG振幅においては、ベクター及びビヒクルで処置した眼の間には、統計的な有意差は見られなかった。しかし、 1×10^9 v g / 眼のベクターの投与では、有意なERG変化を起こさなかった一方で、 1×10^{10} v g のベクターを投与された眼においては、3つのERG要素の全てで顕著に小さい振幅が観察された。このことは、高い投与量では、ベクター毒性があることを示している。この観察結果は、ベクターで処置した網膜の免疫蛍光分析によても裏付けられた。網膜切片を凍結前に4% PFA中で固定したので、ISへの誤局在を起こした組換えR P G R のプールのみが観察された（上で説明した通り）。 1×10^{10} v g のベクターで処置した網膜においては、より強いR P G R - O R F 1 5 発現が観察され、遙かに薄い外側核層 (ONL) 及びより短いISも伴って観察された。対照的に、 1×10^9 v g のベクターで処置した網膜のONLの厚さは、ビヒクルで処置した網膜とは顕著な差が見られなかった。ERG及び免疫蛍光分析の両方で、 1×10^9 v g / 眼の投与量では十分に耐性があることを示す一方で、 1×10^{10} v g ではマウス網膜に毒性があった。特定の理論又は機構に縛られることはないが、R P G R - O R F 1 5 タンパク質を過剰発現することの組合せ効果、大量のA A V キャプシド・タンパク質及び網膜細胞の処理能力を超えるベクターDNAが、高いベクター投与量の毒性を説明し得ると思われる。それ故、後の長期間効能研究には、 1×10^{10} v g / 眼の投与量を含めなかった。

【0087】

実施例4

本実施例は、マウスR P G R - O R F 1 5 の遺伝子送達後のR p g r - K O マウスにおける、治療効果を実証する。

【0088】

A A V 8 又はA A V 9 ベクターによって送達されたマウスR P G R - O R F 1 5 c D N Aが有効であるかどうかを試験するために、6～8週齢のマウスの網膜下の空間に、 1×10^8 ～ 1×10^9 v g / 眼の範囲の投与量で、該ベクターを注射した。各マウスに片側（眼）へのベクター注射を行い、反対側の眼にはビヒクルを注射した。R p g r - K O マウスにおいては網膜変性の進行が緩やかなので (Hongら、Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 3649-3654 (2000)、Hongら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 46: 435-441 (2005))、18カ月の追跡調査期間中、長期的なERGモニタリングを実施した。個々のマウス間でERG振幅における大きな変動があることを前提として、ベクター及びビヒクルで処置し

10

20

30

30

40

50

た眼を比較する研究ではずっと、対応のある T 検定を用いた。全てのコホートの間では、 $3 \times 10^8 \text{ v g}$ の A A V 9 - m R p g r の投与を受けたマウスは、ベクターで処置した眼において最も強い治療効果を示した。注射後 (P I) 12 ヶ月で、ベクターで処置した眼においては、僅かな改善しか観察されなかったが、注射後 (P I) 18 力月での治療効果はより顕著になり、フラッシュ刺激を強くしていった際の応答においては、暗順応 a 波及び明順応 b 波について、有意により大きい振幅が観察された。これらの眼はまた、注射後 (P I) 12 ヶ月では観察されなかった、有意により大きい暗順応 b 波振幅を示した。このことは、双極細胞への視覚シグナリングが、より良く維持されていることを反映していた。18 力月モニタリングで生存した 7 尾全てのマウスにおいて、各動物は個々に、ベクターで処置した眼における最高のフラッシュ強度から誘発された、より強い暗順応 a 波、
b 波及び明順応 b 波の振幅を示した。他のベクター投与量 ($1 \times 10^9 \text{ v g}$ / 眼の A A V 8 - m R p g r ベクター、 $1 \times 10^8 \text{ v g}$ / 眼の A A V 8 - m R p g r ベクター又は $1 \times 10^9 \text{ v g}$ / 眼の A A V 9 - m R p g r ベクター) を受けたコホートは、 $3 \times 10^8 \text{ v g}$ の A A V 9 - m R p g r ベクターを投与されたものと比較して、注射後 (P I) 18 力月の時点で、次善のレスキュー (suboptimal rescue) を示した。
10

【 0 0 8 9 】

ベクターで処置した網膜の機能的なレスキューは、構造的な改善と相関していた。注射後 (P I) 18 力月において、光コヒーレンス・トモグラフィ (O C T) の網膜画像によって明らかにされたように、 $3 \times 10^8 \text{ v g}$ の A A V 9 - m R p g r で処置した眼においては、対照の眼よりも、かなり厚い O N L が観察された。視神経頭 (O N H) が位置する中心領域を除いて、直径約 1.0 mm^2 の視野の内側で、ベクターで処置した眼における網膜の厚さの上昇が観察された。O C T に続き、治療したマウス網膜の免疫蛍光分析では、断面のおよそ半分に及ぶ A A V が媒介する R P G R 発現を示した。O C T の結果と一致して、対照の眼よりも、ベクターで処置した眼は、有意により多い光受容器の列を維持していた。対照の眼においては、4 ~ 6 列であったのに比べ、ベクターで処置した眼の大部分においては、7 ~ 10 列の光受容器が維持されていた。網膜切片上で、縦 (背側 - 腹側) の経線に沿って、 $500 \mu \text{m}$ おきに測定した O N L の厚さは、これらの結果をさらに裏付けた。ベクターで処置した網膜の異なる位置における O N L の平均の厚さは、 $31.7 \mu \text{m} \sim 43.5 \mu \text{m}$ の範囲であった一方、対照の網膜においては、 $19.0 \mu \text{m} \sim 28.3 \mu \text{m}$ の範囲であった。 $1 \times 10^9 \text{ v g}$ の A A V 8 - m R P G R の注射を受けたマウスの 1 群においては、注射後 (P I) 24 力月で、治療効果はより顕著になりさえするようだった。対照の網膜の O N L は、上部分において殆ど消失しており、1 ~ 3 列の光受容器のみが下領域 (inferior) 網膜に残存していた一方で、R P G R が発現していた、ベクターで処置した網膜の下領域においては、6 ~ 8 列の光受容器が生存していた。
20

【 0 0 9 0 】

(外節に向かって、輸送 / 標的指向性が変化したことによる) オプシンの誤局在は、R P G R 变異を有する動物モデル及びヒト保因者において検出可能である。オプシンの輸送を、R p g r 遺伝子の送達によって修正し得るかどうかを評価するために、注射後 (P I) 18 力月で、 $3 \times 10^8 \text{ v g}$ の A A V 9 - m R p g r で処置した網膜において、免疫染色を行った。W T 網膜においては、M 錐体オプシンが、専ら錐体細胞の外節において見られた。ビヒクルで処置した R p g r - K O 網膜においては、M オプシンは外節に加えて、内節並びに核周囲及びシナプス領域において検出された。より多くの M オプシンが、下領域の網膜と比べ、上領域の網膜の光受容器内節に存在していた。特定の理論又は機構に縛られることはないが、これは恐らく、上領域から下領域にかけての M オプシンの発現の勾配によるものと考えられる。この M オプシンの外節への輸送は、ベクターで処置した網膜の注射後 (P I) 18 力月で、部分的にレスキューされた。
30

【 0 0 9 1 】

ロドプシンは、W T 網膜の桿体外節にのみ局在していた。この誤局在は、ベクターを注射した K O 網膜の、R P G R 発現領域においては見られなかった。ロドプシンは、ビヒクルを注射した K O 網膜の、I S 及び核周囲で追加的に観察された。若い R p g r - K O マ
40

ウスの網膜においては、ロドプシンは適切に局在していた。しかし、ロドプシン免疫染色は、20月齢ビヒクル注射R p g r - K O網膜においては、内節及び核周囲領域において検出された。ベクターで処置したR p g r - K Oマウスの網膜の、R P G R - O R F 1 5を発現する領域においては、ロドプシンの局在は修正された。

【0092】

実施例5

本実施例は、ヒトR P G R - O R F 1 5の遺伝子送達後の、R p g r - K Oマウスにおける治療効果を実証する。

【0093】

将来的なヒトでの試験のための、潜在的なベクター候補として、A A V 8 - h R P G Rを、4つの異なる投与量(3×10^9 、 1×10^9 、 3×10^8 及び 1×10^8 vg/眼)で、R p g r - K Oマウスにおける有効性を試験した。6~8週齢のマウスの網膜下に該ベクターを注射し、注射後(P I)12及び18カ月でE R Gを実施した。4つの投与量群の間では、 1×10^9 vgで処置した群において、最適な結果が観察された。この投与量では、ベクターで処置した眼は、注射後(P I)18カ月での、強度が増加していくフラッシュ刺激に応答して、有意により高い振幅の暗順応a波、b波及び明順応b波を示した。このことは、ヒトR P G R - O R F 1 5遺伝子送達の後、R p g r - K Oマウスにおいて、網膜機能がレスキューされたことを示している。18カ月のモニタリング期間を生存した11尾全てのマウスは、ベクターで処置した眼において、より高い明順応b波振幅を示した。それらのうち10尾及び9尾のマウスが、それぞれ、より高い暗順応b波及び暗順応a波を示した。

10

【0094】

3×10^9 vgのベクター投与を受けたマウスは、注射後(P I)18カ月で、対照の眼と比べて、ベクターで処置した眼において、かなり低いE R G振幅を示した。但し、この投与量での長期間毒性を示す注射後(P I)12カ月では、この差異は統計的に有意でなかった。 3×10^8 vg及び 1×10^8 vgのベクターで処置した眼は、E R G振幅について対照の眼と異なることを示さなかった。治療効果が、検出するには小さすぎたかどうかを調べるために、6か月後(これらのマウスがほぼ26月齢の時)、再びE R Gを実施した。両方の投与量群の、ベクターで処置した眼において、E R Gの改善は未だ観察されなかった。このことは、R p g r - K Oマウスにおける機能的なレスキューを達成するには、これら2つのベクター投与量では、少なすぎたことを示している。

20

【0095】

1×10^9 vgのA A V 8 - h R P G Rベクターで処置したR p g r - K Oマウスにおいて、注射後(P I)18カ月で、O C T網膜のイメージングを行った。対照よりも、ベクターで処置した網膜においては、かなり厚いO N Lが観察され、ベクターで処置した眼の網膜全体は、対照よりも、直径約 1.0 mm^2 の視野の内部において、より厚かった。免疫蛍光分析によって、ベクターで処置した網膜では、断面の約半分の領域において、h R P G Rの発現が明らかにされた。O C Tの結果と一致して、ベクターで処置した網膜においては、対照よりも、多くの光受容器の列が維持されており、縦(背側-腹側)経線に沿って、網膜の各所で4mmのO N Lの厚さが測定されたことは、これらの観察を裏付けている。ベクターで処置した網膜の異なる位置におけるO N Lの平均的な厚さは、 $21.2\text{ }\mu\text{m} \sim 33.4\text{ }\mu\text{m}$ の範囲であった一方、ビヒクルで処置した網膜は、 $14.3\text{ }\mu\text{m} \sim 24.1\text{ }\mu\text{m}$ (の範囲)のO N Lを有していた。より低い量のベクター投与(3×10^8 vg)を受けた網膜の免疫蛍光分析では、より小さい領域におけるh R P G Rの染色が明らかになった。但し、隣接する領域と比べ、この領域においては、より多くの光受容器が維持されていた。それゆえ、全領域(full-field)E R Gによって評価されたように、全体的な機能的な保存性を欠いているにも関わらず、より低い量の投与を受けた群においては、ベクターが形質導入された領域の光受容器の維持が、依然として達成されていた。ロドプシンはW T網膜の桿体O Sにおいてのみ観察されたが、ビヒクルで処置したR p g r - K O網膜の、内節(I S)、核周囲及びシナプス末端で追加的な染色が観察された。対

30

40

50

照の網膜においてはロドプシンの誤局在は明らかであった一方、ベクターで処置した (1×10^9 vg の AAV8 - hRPGCR) 網膜における hRPGCR 発現が適切な領域においては、このロドプシンの誤局在は検出されなかった。

【0096】

実施例 6

本実施例は、より老齢な Rpgr - KO マウスへの RPGCR - ORF15 遺伝子送達後の、網膜機能及び構造のレスキューについて実証する。

【0097】

より大幅な変性を有する網膜がなお、治療の利益を得るかを評価するために、 3×10^8 vg の AAV8 - mRPGCR を 1 歳齢の Rpgr - KO マウスの網膜下に注射した。10 注射後 (PI) 5 カ月で検査したとき、ベクター及びビヒクルで処置した眼の間には、検知できるほどの違いは見られなかった。しかし、マウスが 2 3 月齢であったとき、注射後 (PI) 11 カ月では、ベクターで処置した眼において ERG のレスキューが明らかになつた。OCTイメージングでは、ビヒクルを注射した対照よりも、ベクターを注射した網膜における ONL がかなり厚いことが明らかになった。この発見は続いて形態分析によって確認された。ベクターを注射した眼で、RPGCR が発現している領域においては、対照の網膜と比べて、大幅により多くの光受容器の列が観察された。これらの結果は、網膜における活発な変性を伴う高齢時の処置であるときであっても、Rpgr - KO マウスがなお、Rpgr 遺伝子送達に有利に応答し得ることを示唆する。20

【0098】

実施例 7 ~ 12

以下の材料及び方法は、実施例 7 ~ 12 において用いられた：

【0099】

Rp2 - KO マウス系統の生成及び動物飼育

Rp2 - KO マウス系統は Rp2^{f1o} × / f1o × 系統と、遍在的に Cre を発現する系統 (CAG cre 及び Zp3 Cre 系統) との交配によって作製した。上記の実施例 1 ~ 6 で記載した方法の「マウス系統及び飼育」の節において記載したように、全てのマウスを維持した。

【0100】

AAVベクターの構築及び産生

ClaI と XhoI 部位を有する、合成ヒト R P 2 の cDNA (配列番号 1) を、ロドプシン・キナーゼ・プロモーター (配列番号 10)、キメラ (グロビン / CMV) イントロン (配列番号 9) 及び グロビン・ポリ A テイル (配列番号 7) を有するベクターにクローニングした。AAV2 型の逆位末端反復配列 (ITRS) (配列番号 12 及び 13) を AAV ベクター構築に用いた。それを自己相補的 AAV ベクターにするために、左の ITR (プロモーター領域に近い ITR) (配列番号 13) は、末端解離部位 (terminal resolution site) 及び AAV D 配列を除去するように変異させた。30

【0101】

Grimmら、Blood, 102: 2412-2419 (2003) に記載されているように、AAV ベクターを産生するために、HEK293 細胞に対する三重プラスミド・トランスフェクションを用いた。自己相補的なヒト R P 2 コンストラクト (配列番号 14) を AAV8 キャプシド (配列番号 5) にパッケージした。ウイルス量は、以下のプライマー及び蛍光標識プローブを用いたリアルタイム PCR によって測定した：40

- ・ フォワード・プライマー (5'-3') : -GCACCTTCTTGCCTACTCCTA (配列番号 20) ;
- ・ リバース・プライマー (5'-3') : -GACACAGCACCAGGCTAAATCC (配列番号 21) ; 及び
- ・ プローブ (5'-3') : -CGTCCTCCGTGACCCGGC (配列番号 22) 。

【0102】

網膜下注射

網膜下注射は、幾つかの点を改良し、Sunら、Gene Therapy, 17: 117-131 (2010) に記載されているように行った。マウスは、ケタミン (80mg / Kg) 及びキシラジン (850

mg / Kg の腹腔内注射で麻酔した。局所的なアトロピン (1%) 及びトロピカミド (0.5%) で、瞳孔を拡張させた。プロパラケイン (0.5%) を局所麻酔として用いた。眼科手術用顕微鏡の下で、手術を行った。18ケージの皮下注射針を用いて、縁の近傍で角膜を僅かに切開した。ハミルトン・シリングに取り付けた 33 ゲージのプラント針 (blunt needle) を、切開部を通し、水晶体を避けて挿入し、網膜に突き刺した。治療用ベクター又は生理的食塩水溶液のいずれかを含有する試料を $1 \mu\text{l}$ 、網膜下に送達した。治療用ベクターは、右目に投与し、ビヒクリをもう片方の眼に投与した。ベクター懸濁液の 0.1 体積 % で、フルオレセイン (100 mg / ml AK-FLUOR (フルオレセイン、注入用、USP)、Alcon, Fort Worth, TX, USA) を添加し、注入している間の可視化を助けた。

10

【0103】

ERG

ESPIONE E 2 網膜電図システムを用いて、ERGを行った。マウスを、オーバーナイトで暗順応させた。局所的なアトロピン (1%) 及びトロピカミド (0.5%) で、瞳孔を拡張させた。マウスは、ケタミン (80 mg / Kg) 及びキシラジン (8 mg / Kg) の腹腔内注射で麻酔した。上記の手順は全て、薄暗い赤色光の下で行った。0.5% のプロパラケイン局所麻酔及び角膜湿潤 (hydration) のための 2% メチルセルロースの液滴を含むゴールド・ワイヤー・ループを用いて、両目から ERG を記録した。口の中に設置したゴールド・ワイヤー・ループを基準として用い、接地電極を尾部に設置した。

- 410 g cd - s / m^2 ~ + 310 g cd - s / m^2 の範囲の、短時間の白色フラッシュ強度で、暗闇中での暗順応 ERG を測定した。白色光で 2 分の明順応後、明順応 ERG を記録した。バックグラウンドの白色光強度を 20 cd / m^2 として、- 0.5310 g cd - s / m^2 ~ + 210 g cd - s / m^2 の範囲の、短時間の白色フラッシュ強度で、ERG を記録した。フリッカー応答 (flicker response) は、10 Hz のライトフリック (light flicks) で取得した。M 及び S オプシンを介した ERG 応答を記録するために、マウスを最初に 20 cd / m^2 の光強度の緑色光の下で、2 分間、明順応させた。ERG は、緑色及び紫外線 (UV) のフラッシュを交互にすることにより記録した。緑色フラッシュについては - 0.52 ~ + 210 g cd - s / m^2 の範囲の強度、UV フラッシュについては - 4 ~ - 0.5210 g cd - s / m^2 の範囲の強度、バックグラウンドの緑色照明は 20 cd / m^2 とした。様々なベクター投与量で処置した R p 2 - KO マウス、及び同腹子の野生型マウスから、ERG を記録した。

20

【0104】

視力の決定

マウスの視力は、Douglasら、Vis. Neurosci., 22: 677-684 (2005) 及びPruskyら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 45: 4611-4616 (2004) に記載のプロトコールに従って、Cerebral Mechanics が開発した、視運動性反射 (OKR) アリーナ (arena) における、視運動テストによって決定した。簡易には、4つのコンピューター画面、及び上部には動物の動きをモニターするためのカメラに囲まれた、閉鎖された OKR アリーナの中心に、マウスを置いた。コンピューター画面は、3次元確認 (3D confirmation) における正弦波格子を有する回転しているドラムの仮想イメージを作り出す。マウスによる格子の追跡は、頭及び首の動きによってスコア化した。格子の空間周波数は、OPTOMOTRY ソフトウェア (Version 14) によって制御し、モニターした。動物による追跡の動きを生成する、100% 背景のコントラストにおける、最大の空間周波数を、各眼について記録した。

30

【0105】

免疫プロッティング

プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む RIPA バッファーの中で、全体の網膜溶解物を超音波破碎によって調製した。溶解物は、遠心分離によって透明にし、ブラッドフォード試薬を用いてタンパク質を見積もった。約 $20 \mu\text{g}$ のタンパク質を、10% 变性タンパク質ゲル (BioRad, Hercules, CA) の全てのレーンで用いた。ヒト R P 2 及び アクチンに対

40

50

する一次抗体を用いた標準的な手順を用いて、免疫プロッティングを行った。タンパク質を、ペルオキシダーゼ・コンジュゲート化二次抗体と適切な試薬で可視化した。

【0106】

免疫組織化学

免疫組織化学のために、マウスを安楽死させ、眼を摘出した。眼を4%PFA溶液で1～2時間、固定し、凍結防止のための一連のスクロース溶液を浸透させて、OCT溶液内で急速に凍結した。12μmの厚さの一連の網膜切片を、低温保持装置によって、上下極配向で切った。下記のプロトコールを用いて、該切片を、特異的抗体（M及びS錐体オブシン、ロドプシン、PNA、RP2）で染色した。簡易には、切片を、0.1% Triton X-100を含有するPBS（PBST）中の5%ヤギ血清で、1時間ブロックし、続いて、2%ヤギ血清中で希釈した一次抗体中で、4℃、オーバーナイトでインキュベートした。切片をPBSTで3回洗浄し、蛍光色素コンジュゲート化二次抗体及び0.2μg/mlのDAPIと共に、1時間インキュベートした。切片を再度、PBSで洗浄し、FLUOROMOUNT-G封入剤（SouthernBiotech, Birmingham, Alabama）の中でマウントした。切片を可視化し、共焦点走査顕微鏡 LSM 700（Zeiss, Germany）で、画像を撮影した。

【0107】

網膜の均一な厚さのマウントを調製するため、安楽死させたマウスから摘出された眼を、最初に、氷上にて、冷却PBS溶液中で、15分間、インキュベートした。その後、次いで、眼球を数回徐々に絞り、網膜を剥離した。次いで、眼球を4%PFA中で、1時間固定し、眼の他の部分から網膜を分離し、0.1% Tritonを含有するPBS中で洗浄し、PBST中の5%ヤギ血清で、4時間ブロックした後、2%ヤギ血清中で希釈した一次抗体中で、4℃、オーバーナイトでインキュベートした。網膜は再度、PBST中で3回（2回は45分ずつ、1回は1時間）洗浄し、蛍光色素コンジュゲート化二次抗体と共に、4時間インキュベートした。切片は再度、上記のようにして、PBST中で洗浄し、FLUOROMOUNT-G封入剤（SouthernBiotech, Birmingham, Alabama）の中で、光受容器層が上向になるようにマウントした。共焦点走査顕微鏡 LSM 700（Zeiss, Germany）上で、画像を撮影した。

【0108】

統計分析

ベクターで処置した眼とビヒクルで処置した眼における結果を比較するために、対応のある及び対応のない両側T検定を用いた。GRAPHPAD Prism 6ソフトウェア（GraphPad Software, La Jolla, CA）を統計分析のために用いた。

【0109】

実施例7

本実施例は、R p 2 - K Oマウスで、錐体光受容器の進行性の変性がみられることを実証する。

【0110】

R p 2 - K Oマウスモデルは、R p 2 ^f 1 o x / f 1 o x マウスと、Liら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54: 4503-4511 (2013)に報告されている、CAG - Cre トランスジェニックマウス系統又はZ P 3 - Cre マウス系統のいずれかとを、交配させることによって生成した。Z P 3 - Cre 系統においては、Cre が卵母細胞において特異的に発現している。Cre は、CAG - Cre 系統に遍在的に発現しているが、Cre 発現それ自体は、Liら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54: 4503-4511 (2013)に示されているように、網膜機能に影響しない。R p 2 - K O 系統においてでさえ、CAG - Cre 導入遺伝子の追加は、網膜に更なる影響を与えない。結果として得られたR p 2 - K Oマウス系統においては、R P 2 エキソン2は欠失しており、網膜及び他の組織においてR P 2 タンパク質は検出されなかった（Liら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54: 4503-4511 (2013)）。このモデルにおける網膜変性の進行を評価するために、野生型（WT）の同腹子と共に、マウスの大きなコホートを、18カ月の期間、網膜電図（ERG）によって

モニターした。暗順応 a 波の振幅には、主に、桿体が寄与する。錐体に由来する a 波は、明順応条件下では比較的小さいが、b 波は内網膜神経 (inner retina neuron) によって產生され、錐体システムの活性を反映している。それ故、暗順応 a 波及び明順応 b 波は、それぞれ桿体及び錐体の機能を表わすために用いられる。以前の観察結果 (Liら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54: 4503-4511 (2013)、Zhangら、FASEB J., 29: 932-942 (2014)) と一致して、R p 2 - KO マウスは実験期間中の全体を通して、有意に減少した暗順応 a 波及び明順応 b 波の振幅を示した。暗順応及び明順応 ERG の刺激強度は、それぞれ、-4.0 ~ 3.0 及び -1.0 ~ 2.0 log cd s / m² であった。この ERG 振幅の減少は、観察したマウスの小群においては、早くも 1 月齢においてさえ起こった。このことは、若齢における、桿体及び錐体の両方の機能的障害を示している。しかしながら、ERG 振幅についての、WT に対する KO の比の測定によって、18 力月間を通して、KO マウスにおいては、桿体及び錐体機能の間の、異なる動態が明らかになった。KO の暗順応 a 波振幅は、WT のそれと比べて追加的な減少がなく、4 月齢後に、安定を維持していたのに対し、明順応 b 波振幅の、WT に対する KO の比は、4 ~ 18 力月の間で、一定に近い割合で、連続的に低下した。結果として、たった 33 % の錐体 ERG 振幅と比べて、桿体 ERG 振幅の約 78 % が、18 力月において維持されていた。このことは、KO マウスの、錐体機能の、より深刻な障害を実証している。さらに、薄暗いフラッシュ強度での暗順応 b 波について、KO と WT マウス間で相違が観察されなかったことから、桿体機能における比較的軽度の障害は、内網膜機能に有意な影響を与えたかった。KO 網膜における錐体機能の進行性の悪化はまた、フリッカー応答における顕著な減少を反映した。10 20

【0111】

WT の同腹子と比べたとき、明順応 b 波のキネティックスにおける有意な変化が、R p 2 - KO マウスにおいて観察された。このことは、Zhangら、FASEB J., 29: 932-942 (2014) における結果と一致している。応答キネティックスを評価するために、b 波の振幅頂点における振幅の 50 %まで上昇させるのに掛かる時間 (T_{50 rise})、振幅の頂点に到達するのに掛かる時間 (T_{max}、潜時と同じ) 及びその頂点から振幅頂点の 50 % に低下させるのに掛かる時間 (T_{50 decay}) を測定した。3 つの測定項目全てにおいて、4 月齢の KO マウスは、WT の同腹子よりも、有意に長い経時変化を示した。特に、かなり長い T_{50 decay} (WT では 40.1 ± 1.6 ms であるのに対し、KO では 81.8 ± 5.5 ms、平均値 ± 標準誤差) に反映されるように、b 波の下降局面のキネティックスは、WT と比べ、KO マウスにおいて明らかにゆっくりであった。より長い T_{max} 及び T_{50 decay} が、1 月齢の KO マウスにおいて既に観察されたことから、キネティックスにおけるこの変化は、早く始まっている。KO と WT マウスの間のキネティックスの相違は、錐体システムに特異的であるようであった。純粹な桿体システムの機能を反映している、低いフラッシュ強度での暗順応 b 波では、そのような変化が観察されなかったからである。30

【0112】

錐体を介した ERG での結果と一致して、WT 網膜と比べて、非常に少ない M 又は S 锥体光受容器が、18 月齢において観察された。このことは、R p 2 - KO 網膜における深刻な錐体の変性を示している。それに対して、桿体が優先する光受容器層の厚さにおいては、18 力月間、検出可能な変化がみられなかった。さらに、R p 2 - KO マウスにおけるロドプシンの分布は、ロドプシンが主に OS において (それ本来の位置で) 検出される WT マウスと同じ状態を維持していた。桿体が優先する光受容器層の厚さは、18 月齢の KO 網膜においてさえ有意に変化しなかった。KO マウスにおける、比較的軽度の桿体の機能障害は、超微細構造分析によって明らかにされたように (Liら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54: 4503-4511 (2013))、組織的にやや乱れた OS によって引き起こされるようである。桿体の乱れは、光学顕微鏡分析によっては、捉えられなかった。40

【0113】

実施例 8

本実施例は、ヒト R P 2 c D N A を有する A A V 8 ベクターが、マウス光受容器における安定な R P 2 発現を媒介することを実証する。

【 0 1 1 4 】

R P 2 関連網膜変性の遺伝子治療法を開発するために、ヒト R P 2 発現カセットを有する A A V ベクターを設計し、構築した。該ベクター（配列番号 14）は、光受容器特異的ヒト・ロドプシン・キナーゼ（R K）プロモーター（配列番号 10）、C M V 及びヒトグロビン・ハイブリッド・イントロン（配列番号 9）、ヒト R P 2 c D N A（配列番号：1）、及びヒト グロビン・ポリアデニル化部位（配列番号 7）（2つの A A V 血清型 2（A A V 2）（配列番号 12 及び 13）由来の逆位末端反復配列（I T R s）が隣接する）からなる。R K プロモーターは、マウスにおける桿体及び錐体の両方において、細胞特異的な導入遺伝子発現を起こし得ることが示されている（Khaniら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 48: 3954-3961 (2007)）。このヒト R P 2 発現カセットの長さは、より早期の発現を媒介する能力がある自己相補的（s c）A A V ベクターに良く適合するサイズである、2キロベースペア（k b）より短く、従来の一本鎖（s s）ベクターよりも効率的に導入遺伝子を発現する。s c ベクターを構築するために、末端解離部位及び A A V D 配列が欠失した変異 I T R で、W T I T R の一方を置き換えた。マウス及び非ヒト靈長類の光受容器に、非常に効率的に形質導入する血清型である、A A V 8（配列番号 5）に該ベクターをパッケージし、配列番号 2（ヒト R P 2）のアミノ酸配列をコードする A A V 8 - s c R K - h R P 2 ベクター（配列番号 14）と名付けた。

【 0 1 1 5 】

該ベクターが、ヒト R P 2 発現を媒介するかどうかを試験するために、該ベクターを R P 2 - K O マウスの網膜下に注射し、網膜抽出物を 4 週間後に、マウス及びヒト R P 2 タンパク質の両方を認識するポリクローナル抗体と共に、イムノプロット分析に掛けた。ビヒクルで処置した網膜が、R P 2 特異的なバンドを何ら示さなかった一方で、ベクターで処置した網膜は、ヒト網膜溶解物のそれと同じである、予期された約 40 k D a の分子量において、バンドを示した。このことは、ヒト R P 2 タンパク質を発現するベクターの能力を示している。W T 網膜における内在性マウス R P 2 タンパク質は、対応するヒトのタンパク質よりも、僅かに速く移動した。特定の理論又は機構に縛られることはないが、マウス及びヒト R P 2 タンパク質は、類似した数のアミノ酸残基（a.a.）を含有するので（ヒト R P 2 は、350 a . a .、マウス R P 2 は 347 a . a .）、この泳動移動度の違いは、2つのタンパク質の、異なるアミノ酸組成及び/又は翻訳後修飾を反映している可能性があると考えられる。

【 0 1 1 6 】

網膜において、ベクターによって発現した R P 2 タンパク質の細胞局在及び細胞内局在を調べるために、免疫蛍光分析を行った。I S、外網状層及び内網状層（O P L 及び I P L）を含むW T 網膜の複数の層において、内在性マウス R P 2 タンパク質が検出され、R p 2 - K O 網膜においては検出されなかった。該ベクターによって発現したヒト R P 2 タンパク質は、最初に光受容器の I S 及び核に位置していたが、網膜の他の層においては、いずれも観察されなかった。特定の理論又は機構に縛られることはないが、これは恐らく、R K プロモーターの特異性のため、及び網膜下投与の後に内網膜層に該ベクターが到達できないためであると考えられる。該ベクターによって媒介される R P 2 発現は、18カ月の研究期間全体の間中、検出可能な喪失はなく、維持されていた。ビヒクルを注射した R p 2 - K O マウスにおいては、R P 2 タンパク質の発現が検出されなかった。

【 0 1 1 7 】

実施例 9

本実施例は、広い投与量範囲での R p 2 遺伝子送達が、R p 2 - K O マウスにおける錐体機能をレスキューすることを実証する。

【 0 1 1 8 】

A A V 8 - s c R K - h R P 2 ベクターの治療効果を試験するために、4 ~ 6 週齢の R p 2 - K O マウスの網膜下に、3つの投与量： 1×10^8 、 3×10^8 及び 1×10^9 ベ

10

20

30

40

50

クター・ゲノム (v g) / 眼で、ベクターを投与した。マウスは、片側にベクターを注射し、反対側の眼には、対照としてビヒクルを注射した。マウスが 18 月齢に達するまで、長期的な E R G モニタリングを行った。個々のマウス間で、E R G 振幅における変動が大きいことを前提として、ベクター及びビヒクルで処置した眼を比較する研究を通してずっと、対応のある T 検定を用いた。ベクターで処置した眼における明順応 E R G の b 波振幅が、ビヒクルを注射したもう片方の眼と比べ、有意に大きかったことに反映されるよう 10 に、 1×10^{-8} 及び 3×10^{-8} v g / 眼を投与した群においては、錐体機能のレスキューが達成された。この治療効果は、試験における最も早い時点である、4 月齢において早くも観察され、その効果は試験期間全体を通して続いた。18 カ月において、対照の眼においては、たった約 28 % しか残存していなかったのに対し、ベクターで処置した眼で、明所視 b 波振幅のほぼ 75 % (71 ~ 78 %) が維持されていた。明順応 b 波振幅の維持に加えて、4 月齢のマウスのベクターで処置した眼において測定された、ほぼ正常な $T_{50\text{rise}}$ 、 T_{max} 及び $T_{50\text{decay}}$ によって明らかになったように、処置は K O 網膜における b 波キネティックスの変性を完全に修正した。18 カ月の研究期間の桿体 E R G 応答 (暗順応 a 波) について、ベクター及びビヒクルで処置した眼の間で、有意な差が観察されなかったので、 1×10^{-8} v g / 眼でのベクター処置は、桿体にとっては毒性が無いようであった。同様に、 3×10^{-8} v g / 眼でのベクター処置は、ある時点においては、僅かに低い暗順応応答が観察されたものの、一般に桿体においては顕著な効果がなかった。桿体における効果の欠落は、R p 2 - K O マウスの桿体における機能障害のより遅い進行を通して、早期の発症 (1 月齢以内且つベクター投与前、データ非表示) によって説明され得る。 20

【 0119 】

1×10^{-8} 及び 3×10^{-8} v g / 眼でのベクター処置の効果は、より低い投与量でお機能し得るかどうかについての探索を促した。それゆえ、ベクターをマウスの 1 群に、 5×10^{-7} v g / 眼の投与量で投与し、治療したマウスを、6.5 及び 18 月齢で E R G によって検査した。対照の眼に比べ、ベクターで処置した眼においては、有意により高い明順応 b 波振幅が観察された。このことは、この低い投与量でのベクターの効力を示している。ベクターで処置した眼は、M 及び S 錐体による E R G 応答が同等の維持を示したので、錐体機能レスキューは、M 又は S 錐体に偏っていなかった。 30

【 0120 】

R P 2 遺伝子送達が視力をより良くできるかどうかを決定するため、 1×10^{-8} v g 又は 3×10^{-8} v g のベクターで処置したマウスに、19 月齢で、明所視条件下において視運動性試験を行った。ベクターで処置した眼の視力は、ビヒクルで処置した眼のそれよりも有意に高かった。しかし、野生型対照よりも低かった。このことは、処置によって、R P 2 - K O マウスにおける、錐体が媒介する視覚行動の改善を示している。 30

【 0121 】

実施例 1 0

本実施例は、広い投与量範囲での R p 2 遺伝子送達が、R p 2 - K O マウスにおける錐体機能をレスキューすることを実証する。 40

【 0122 】

既往の結果 (Li ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54: 4503-4511 (2013)) と一致して、M オプシンは W T 錐体の O S に局在したが、ビヒクルで処置した R p 2 - K O の錐体においては、I S、核周囲及びシナプス末端への誤局在が見られた。加えて、ビヒクルで処置した K O 網膜の M 錐体数は、W T 網膜と比べ、6.5 月齢で、減少しているようであった。このことは、実質的な錐体の変性を示している。しかし、ベクターで処置した網膜においては、M オプシンの誤局在は緩和され、より多くの M 錐体細胞が維持されていた。M オプシンの正常な細胞内局在は、ベクターで処置した網膜において観察された。このことは、治療が、M 錐体の輸送ミス (mis-trafficking) を防ぐか、反転させたかのいずれかであったことを示唆している。同様に、ビヒクル又はベクターのいずれかで処置した、K O の眼においては S オプシンの検出できる程度の誤局在が見られなかったが、ベクタ 50

一で処置した網膜においては、より多くの S 錐体が観察された。Zhangら、FASEB J., 29(3):932-42 (2015) の結果と一致して、錐体 P D E 6 発現は、ビヒクルで処置した R p 2 - K O 網膜の外節において殆ど検出出来なかった一方で、ベクターで処置した網膜は、外節におけるタンパク質の正常に近い発現を保持していた。2つの桿体特異的タンパク質である、ロドプシン及び P D E 6 の局在もまた検査した。これらの2つのタンパク質は主に、W T 網膜の光受容器の O S に局在しており、K O 網膜におけるそれらの発現又は局在は、ベクター処置による影響を受けなかった。

【 0 1 2 3 】

網膜の上側及び下側の両方における、ピーナッツ・アグルチニン (P N A) で染色された細胞数が、対照の眼のそれと比べ、有意に多かったことで明らかになったように、最終の 18 カ月時点において、処置した眼の錐体レスキューがより顕著であった。網膜のホール・マウント及び切片の両方の免疫蛍光分析は、ビヒクルで処置した網膜よりも、ベクターで処置した K O 網膜における M 及び S 錐体数が有意に多いことを明らかにした。

【 0 1 2 4 】

実施例 1 1

本実施例は、遅い時期の R P 2 遺伝子送達が、 R p 2 - K O マウスにおける錐体機能及び生存率を維持することを実証する。

【 0 1 2 5 】

錐体機能の障害は、 R p 2 - K O マウスモデルにおいては、1月齢の前に始まる (実施例 7 、 Li ら、 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54: 4503-4511 (2013)) 。より進行した錐体機能障害を有する R p 2 - K O マウスが、なお、処置による利益を受けるかどうかを評価するため、10月齢の R p 2 - K O マウスに、ベクターを 3×10^8 v g / 眼の用量で投与し、18月齢に達した時に、それらの網膜機能及び構造を検査した。桿体 E R G においては違いは見られなかったが、ベクターで処置した眼は、ビヒクルで処置した眼と比べて、有意に高い明順応 b 波振幅を示した。このことと一致して、実質的な M 及び S オプシン並びに錐体 P D E 6 発現細胞が、ビヒクルで処置した網膜とは対照的に、ベクターで処置した網膜において観察された。

【 0 1 2 6 】

実施例 1 2

本実施例は、 R p 2 - K O マウスで使用するための R P 2 ベクターの効果的な投与量を実証する。

【 0 1 2 7 】

$5 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8$ v g / 眼の範囲のベクター投与量で、上記のように、 R p 2 - K O マウスの錐体・光受容器の機能及び生存性をレスキューする際に効能が見られた。 3×10^8 v g の投与量群においては、8及び12ヶ月で、僅かな低下が見られたが、これらの投与量は、18カ月の研究期間において、桿体機能には影響しないようであった。毒性の大部分は、暗順応 E R G 応答に限られていた。このことは、この投与量では、桿体に対してベクターの一時的な毒性があることを示している。しかし、錐体機能は、 3×10^8 v g の投与量では、有意に改善した。それに対して、暗順応 a 波及び b 波の顕著に減衰した振幅に反映していたように、 1×10^9 v g / 眼の投与を受けたマウスは、 E R G 検査の全ての時点 (4 カ月、 8 カ月及び 18 カ月) において、桿体機能に有意な障害を呈していた。この投与量は 4 及び 8 カ月で錐体機能を維持したが、 18 カ月では、この処置の利益は結局、減退した。特定の理論又は機構に縛られることはないが、これは恐らく桿体が最終的に消失したことによって引き起こされた、二次的な錐体の細胞死のためであると考えられる。最終の 18 カ月時点での網膜切片の免疫蛍光分析によって、 1×10^9 v g で処置した眼においては、複数領域において、外核層が、かなり薄くなっていたか、又は小さくさえなっていたことが明らかになった。それに対して、 1×10^8 v g で処置した眼においては、明らかな変化は見られなかった。それゆえ、 1×10^9 v g / 眼の投与では、網膜に毒性があった。

【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

50

本明細書において引用した刊行物、特許出願及び特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個別に、具体的に、参照によって取り込まれることが示されるように、かつ全体が明細書に記載されているのと、同程度に、(文献を)参照することによって本明細書に取り込まれる。

【0129】

本発明を記載する文脈(特に、以下の特許請求の範囲の文脈)における用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1つ」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、単数及び複数形の両方を含むものとして解釈されるべきである。1以上の項目の列記が続く、用語「少なくとも1つ」の使用(例えば、「A及びBの少なくとも1つ」)は、明細書に別段の記載がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、記された項目(A又はB)から選択された1つの項目、又は列記された項目(A及びB)の2以上の任意の組合せを意味するものとして解釈されるべきである。「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」及び「含有する(containing)」という用語は、別段の記載がない限り、制限のない用語(open-ended terms)(すなわち、「含むが、これに限定されない(including, but not limited to)」を意味する)として解釈されるべきである。本明細書中の値の範囲の列挙は、本明細書中に別段の指示がない限り、単に範囲内の各別個の値を個別に指す簡略方法として役立つことを意図しており、本明細書において個々の値はそれぞれ個別に列挙されているかのように、個々の値は明細書に取り込まれる。本明細書中に記載された全ての方法は、本明細書中で他に指示されない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施し得る。本明細書で提供される任意の及び全ての例、又は例示的な言語(例えば「など(such as)」)の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図しており、特段特許請求されない限り、本発明の範囲を限定するものではない。本明細書中のいかなる言葉も、本発明の実施に不可欠であるとして、特許請求されていない任意の要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0130】

本発明の好ましい実施形態は、本発明を実施するために、本発明者らに知られている最も良の形態を含め、本明細書に記載する。これらの好ましい実施形態の変形形態は、上記の記載を読めば、当業者にとって明らかになり得る。本発明者らは、当業者がこのような変形を適宜使用することを予期しており、本発明者らは本発明が本明細書に具体的に記載されたものとは別の方で実施されることを意図する。従って、本発明は、適用法によって許容されるように、本明細書に添付した特許請求の範囲に列挙された主題の全ての改変及び均等物を含む。さらに、本明細書中で他に指示されない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、それらの全ての可能な変形例における上記要素の任意の組み合わせが本発明に包含される。

【配列表】

0006935049000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47

(74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子
(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
(74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子
(74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉
(72)発明者 ウー、ジジャン
アメリカ合衆国、メリーランド州 20878、ゲイザーズバーグ、レディ ファーン プレイス
446
(72)発明者 スワループ、アナンド
アメリカ合衆国、メリーランド州 20878、ゲイザーズバーグ、ドエ レーン 12802
(72)発明者 マッカージー、スッドハジル
アメリカ合衆国、メリーランド州 20852、ロックヴィル、アパートメント 1708、ロック
ヴィル パイク 1001
(72)発明者 ヒリヤンナ、スージャー
アメリカ合衆国、メリーランド州 20841、ボイズ、ゴールデン フック ロード 1422
4

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第2014/011210 (WO, A1)
特表2014-517694 (JP, A)
特表2001-500014 (JP, A)
MOOKHERJEE, Sudhansu et al., A Long-Term Study of AAV Vector-Mediated Gene Therapy for X-linked Retinitis Pigmentosa (XLRP) Due to RP2 Mutation, Molecular Therapy, 2014年 5月 1日, vol. 22, supplement 1, p. S46
STRAUSBERG, R.L. et al., Definition: Retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive) [Homo sapiens]., Database GenBank, [online], Accession No. AAH43348, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAH43348>>, 15-JUL-2006 uploaded

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N
A 61 K
A 61 P
C 07 K
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q
P u b M e d