

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6533246号
(P6533246)

(45) 発行日 令和1年6月19日 (2019.6.19)

(24) 登録日 令和1年5月31日 (2019.5.31)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/60 (2006.01)	C 1 2 N 15/60 Z N A
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00

請求項の数 27 外国語出願 (全 91 頁)

(21) 出願番号	特願2017-65722 (P2017-65722)	(73) 特許権者	500360769
(22) 出願日	平成29年3月29日 (2017.3.29)		ユニバーシティ オブ フロリダ リサー
(62) 分割の表示	特願2015-27502 (P2015-27502)		チ ファウンデーション, インコーポレイ
原出願日	平成23年4月22日 (2011.4.22)		ティド
(65) 公開番号	特開2017-114914 (P2017-114914A)		アメリカ合衆国, フロリダ 32611-
(43) 公開日	平成29年6月29日 (2017.6.29)		5500, ゲインズビル, グラインター
審査請求日	平成29年3月29日 (2017.3.29)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/327, 521		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成22年4月23日 (2010.4.23)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	シャノン エリザベス ボーイ
			アメリカ合衆国 フロリダ 32608,
			ゲインズビル, エスダブリュー 41
			エスティー アベニュー 10206
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーバー先天性黒内障 1 (LCA1) を処置するための rAAV-グアニル酸シクラーゼ組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

網膜光受容体細胞において生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼタンパク質の欠損を発症する危険性がある、または欠損を有すると診断されている哺乳動物を処置するための組成物であって、該組成物は、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターを含み、該 rAAV ベクターは、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一である少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの第 1 の生物学的に活性なヒトグアニル酸シクラーゼタンパク質をコードする少なくとも 1 つの第 1 の核酸セグメントに作動可能に連結されたユビキタス切断型キメラ CMV-ニワトリ β -アクトチンプロモーターを含む少なくとも 1 つの第 1 のポリヌクレオチドを含み、該 rAAV ベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス血清型 5 (rAAV5) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス血清型 8 (rAAV8) ベクターである、組成物。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの第 1 のヒトグアニル酸シクラーゼタンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 rAAV ベクターが、組換えアデノ随伴ウイルス血清型 5 (rAAV5) ベクターである、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 rAAV ベクターが、組換えアデノ随伴ウイルス血清型 8 (rAAV8) ベクターで

ある、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 r A A V ベクターが r A A V 8 (Y 7 3 3 F) である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記ベクターが自己相補性 r A A V (s c A A V) である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記切断型キメラ C M V - ニワトリ β - アクチンプロモーターが、配列番号 1 3 からの少なくとも 9 0 の連続した塩基対配列からなる核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの第 1 の核酸セグメントに作動可能に連結された少なくとも 1 つの第 1 のエンハンサーをさらに含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの第 1 の核酸セグメントに作動可能に連結された少なくとも 1 つの第 1 の哺乳動物イントロン配列をさらに含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0】

前記 r A A V ベクターが、感染性アデノ随伴ウイルス粒子、ビリオン、または、複数の感染性 A A V 粒子内に含まれる、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 1 1】

前記 r A A V ベクターが、ビリオンまたは感染性ウイルス粒子内に含まれる、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 2】

脂質、リボソーム、脂質複合体、エトソーム、ニオソーム、ナノ粒子、マイクロ粒子、リポスフィア、ナノカプセル、またはその任意の組み合わせをさらに含む、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 3】

ヒトの眼への投与のために処方される、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

療法または予防における使用のための、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 1 5】

ヒト網膜ジストロフィー、疾患、または障害の療法または予防における使用のための、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

レーバー先天性黒内障 1 (L C A 1) の療法または予防における使用のための、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記哺乳動物が、レーバー先天性黒内障 1 (L C A - 1) などの先天性網膜ジストロフィーを発症する危険性があるか、またはレーバー先天性黒内障 1 (L C A - 1) などの先天性網膜ジストロフィーを有すると診断された、ヒト新生児、新産児、幼児、または年少者である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 1 8】

前記哺乳動物の網膜光受容体において前記生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼタンパク質が、正常な哺乳動物における生物学的に活性な r e t G C 1 タンパク質のレベルと比較した場合に、欠陥または欠損を有する、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記 r A A V ベクターの導入が、前記哺乳動物の眼において、錐体光受容体を保持し、錐体媒介性の機能および視覚行動を修復する、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の組成

50

物。

【請求項 2 0】

前記哺乳動物の眼の中への前記 r A A V ベクターの 1 回の導入が、少なくとも 3 か月の期間、該哺乳動物において、錐体光受容体を保持し、錐体媒介性の機能および視覚行動を修復する、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記哺乳動物の眼の中への前記 r A A V ベクターの 1 回の導入が、少なくとも 6 か月の期間、該哺乳動物において、錐体光受容体を保持し、錐体媒介性の機能および視覚行動を修復する、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記哺乳動物の眼の中への前記 r A A V ベクターの 1 回の導入が、少なくとも 1 0 か月の期間、該哺乳動物において、錐体光受容体を保持し、錐体媒介性の機能および視覚行動を修復する、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記哺乳動物が、レーバー先天性黒内障 1 (L C A - 1) と診断された、請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 4】

(1) 請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物、および
(2) 該組成物を、ヒトにおける網膜ジストロフィー、疾患、障害、または異常状態の 1 つまたは複数の症状の診断、予防、処置、または改善において使用するための説明書を含む、キット。

【請求項 2 5】

前記網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障 1 (L C A - 1) と診断されている、請求項 2 4 に記載のキット。

【請求項 2 6】

哺乳動物の眼の疾患、障害、機能不全、もしくは異常状態またはその 1 つもしくは複数の症状を診断するか、予防するか、処置するか、または改善させるための医薬の製造における、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 2 7】

ヒトにおけるレーバー先天性黒内障 1 (L C A - 1) の 1 つまたは複数の症状を処置するか、または改善させるための医薬の製造における、請求項 2 6 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願への相互参照

この出願は、2 0 1 0 年 4 月 2 3 日に提出された米国仮特許出願第 6 1 / 3 2 7 , 5 2 1 号 (現在係属中) への優先権を主張し、上記米国仮特許出願の全容は、明示的に参考としてその全体が本明細書に具体的に援用される。

【 0 0 0 2 】

連邦政府支援の研究または開発についての陳述

米国政府は、国立衛生研究所 (N I H) からの助成金番号 E Y 1 3 7 2 9 、 E Y 1 1 1 2 3 、および E Y 0 8 5 7 1 によって、本発明における一定の権利を有する。

【 0 0 0 3 】

共同研究契約の当事者の名称

該当なし。

【 0 0 0 4 】

発明の分野

本発明は、一般に、分子生物学およびウイルス学の分野ならびに特に、少なくとも 1 つの第 1 の処置用遺伝子産物をコードする少なくとも 1 つの第 1 の核酸セグメントを発現する組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 組成物を使用するための方法、特に、哺乳動物

10

20

30

40

50

の眼の疾患、障害、傷害、外傷、または機能不全の1つまたは複数の症状の予防、処置、または改善において有用なそれらの産物に関する。特定の実施形態では、本発明は、たとえば、哺乳動物の眼の1つまたは複数の障害または疾患の処置を含む、1つまたは複数の治験用の、診断上の、および／または処置用のレジメンにおける使用のための、特に、ヒトにおける、レーバー先天性黒内障、1型（LCA1）などのような網膜ジストロフィーを含む、先天性の網膜の失明を処置するための、生物学的に機能的なグアニル酸シクラーゼペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を発現するrAAVベクターを含む組成物を提供する。ヒトにおけるグアニル酸シクラーゼ欠損の1つまたは複数の症状を処置するまたは改善させるためのrAAV-LCA1ベクターを含む、ウイルスベクターベースの遺伝子療法における使用のための、rAAVベクターベースのグアニル酸シクラーゼ医薬を調製するための方法もまた、提供される。

10

【背景技術】

【0005】

1869年にドイツの眼科医Dr. Theodor Leberによって先天性のタイプの色素性網膜炎（RP）として最初に記載されたレーバー先天性黒内障（LCA）（以前は「レーバー先天性黒内障（amaurosis congenita of Leber）」）は、遺伝性の網膜症の最も初期の、最も重症の形態であり、すべての遺伝性網膜ジストロフィーの約6%を占める。LCAは、網膜の変性疾患の1つのグループであり、子供における先天性失明の最も一般的な原因である。この常染色体劣性状態は、全盲または非常に損なわれた視力、正常な眼底、および網膜電位図（ERG）の消滅により、誕生時にまたは幼児における出生後1か月の間に通常、認識される（たとえば非特許文献1を参照されたい）。これらの機能的な欠乏にもかかわらず、LCA1患者は、黄斑および周辺部網膜の両方においていくつかの杆体および錐体光受容体を何年間も保持する。疾患の症状は、網膜の機能不全、不安定な眼球運動（眼振）、損なわれた視力、遅い瞳孔反応、および最終的に、失明を含む。

20

【0006】

遺伝子分析を通して、LCA1座に割り当てられたグアニル酸シクラーゼ1（Gucy2d）における変異は、LCAについて報告されたすべての症例の20%を占めることが示された（たとえば非特許文献2；非特許文献1；非特許文献3を参照されたい）。LCA1によって冒された患者の数は、疾患の網膜色素上皮特異的65kDaタンパク質（RPE65）における欠陥のバージョン（LCA2）によって冒された患者のおよそ2倍であり、これは、近年、遺伝子療法コミュニティにおいて多くの注目を集めてきた。

30

【0007】

200,000人の米国人が1型レーバーを有すると推測される。Gucy2dは、光受容体外節膜において発現されるグアニル酸シクラーゼ（retGC1）をコードし（たとえば非特許文献4；非特許文献5を参照されたい）、光伝達の回復フェーズにおいて役割を果たす。この酵素の活性を低下させるまたは消滅させる変異は、杆体および錐体光受容体において慢性の光暴露と生化学的に等価な状態を引き起こすと考えられる。LCAは、光受容体の発達障害または正常に発達した細胞の非常に初期の変性の結果として通常、見なされる。LCA1座（GUCY2D）は、ホモ接合性マッピングによってヒト染色体17p13.1（LCA1）にマッピングされた。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Perrault et al., 「Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis」, Nat. Genet., 1996, 14(4):461-4

【非特許文献2】Milam, A. H.; Barakat, M. R.; Gupta, N.; Rose, L.; Aleman, T. S.; Pianta

50

, M. J. ; Cideciyan, A. V. ; Sheffield, V. C ; Stone, E. M. ; Jacobson, S. G. , 「Clinicopathologic effects of mutant GUCY2D in Leber congenital amaurosis」, Ophthalmology, 2003. 110:549-558

【非特許文献3】Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Ducroq D et al, 「Spectrum of retGC1 mutations in Leber's congenital amaurosis」, Eur. J. Hum. Genet., 2000. 8:578-82

【非特許文献4】Dizhoor AM, Lowe DG, Olshevskaya EV, Laura RP and Hurley JB, 「The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator」, Neuron, 1994. 12: 1345-52

【非特許文献5】Liu X, Seno K, Nishizawa Y, Hayashi F, Yamazaki A et al, 「Ultrastructural localization of retinal guanylate cyclase in human and monkey retinas」, Exp. Eye Res., 1994. 59:761-8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

先行技術における不備

現在、ヒトにおいてLCA1を予防するまたは処置することができる有効な予防薬も治療薬もない。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、1つまたは複数の処置用哺乳動物ポリペプチド、特に、生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼポリペプチド活性の欠乏またはその欠損から結果として生じるまたはそれによって悪化する、1つもしくは複数の哺乳動物の疾患、障害、もしくは機能不全またはその1つもしくは複数の症状の処置および／または改善のための、グアニル酸シクラーゼファミリーのそれらのタンパク質、ペプチド、ポリペプチドをコードする、新規の、自明でない、有用な、rAAVベースの遺伝子構築物を提供することによって、先行技術における本質的な限界を克服する。特に、本発明は、LCA1のような状態ならびに生理学的に正常なレベルのグアニル酸シクラーゼポリペプチドの欠損または欠如から現れる、錐体杆体ジストロフィーの劣性および優性形態などのような眼の他の状態の処置における使用のための、1つまたは複数の哺乳動物網膜特異的グアニル酸シクラーゼ（retGC1）ポリペプチドをコードする遺伝子構築物を提供する。

【0011】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする少なくとも1つの第1の核酸セグメントに作動可能に連結されたプロモーターを含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターを提供する。好ましくは、プロモーターは、光受容体特異的プロモーター（たとえばヒトロドプシンキナーゼプロモーターなど）またはユビキタスプロモーター（たとえば切断型キメラCMV-ニワトリβ-アクチンプロモーターなど）である。好ましくは、第1の核酸セグメントは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において示される、任意の1つま

10

20

30

40

50

たは複数の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質において記載される配列の少なくとも約60、約70、約80、約90、または約100以上の連続したアミノ酸の少なくとも1つの第1の配列領域との同一性が少なくとも約80%、約85%、または約90%以上である少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域を含む、それから本質的になる、またはその代わりにそれからなる、少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする。

【0012】

ある実施形態では、少なくとも1つの第1の核酸セグメントは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、および配列番号11において列挙される任意の1つまたは複数の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質配列において記載される配列の少なくとも約100、約110、約120、約130、約140、または約150以上の連続したアミノ酸の少なくとも1つの第1の配列領域との一次アミノ酸配列同一性が少なくとも約91%、約92%、約93%、約94%、または約95%以上である少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域を含む、少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを好ましくはコードする。

10

【0013】

好ましくは、少なくとも1つの第1の核酸セグメントは、1つまたは複数の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、および配列番号11において示される少なくとも1つの第1のグアニル酸シクラーゼタンパク質の少なくとも約90、約110、約130、約150、または約170以上の連続したアミノ酸を含む少なくとも1つの第1の配列領域と少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一の少なくとも1つの第1の連続した一次アミノ酸配列をそれぞれ好ましくは含む少なくとも1つまたは複数の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドをコードするであろう。

20

【0014】

好ましくは、本発明のrAAVベクターは、任意の1つまたは複数の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、および配列番号11のアミノ酸配列を含む、それから本質的になる、もしくはその代わりにそれからなる少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、もしくはポリペプチドをコードする少なくとも1つの第1の核酸セグメントまたは1つもしくは複数のそのような配列に相補的なもしくはストリンジェント〜高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でそれに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む。好ましくは、第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、形質転換哺乳動物細胞において、好ましくは、形質転換ヒト宿主細胞において、*in vitro*においておよび*in vivo*においてグアニル酸シクラーゼ活性を有するであろう。特定の態様では、グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、ペプチド、タンパク質、またはポリペプチドをコードする核酸セグメントが、哺乳動物、好ましくは、ヒト宿主細胞において配列を発現することができる少なくとも1つの第1のプロモーターに作動可能に連結される場合、形質転換哺乳動物細胞において、好ましくは、形質転換ヒト宿主細胞において、*in vitro*においておよび*in vivo*において有意な生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼ活性を有するであろう。

30

40

【0015】

本発明のrAAVベクターは、特定の血清型に必ずしも限定されないが、ある実施形態では、発明者らは、1つまたは複数の以下の公知の血清型であるrAAVベクターを利用することによって有益な結果を達成することができることを企図する：組換えアデノ随伴ウイルス血清型1 (rAAV1)、組換えアデノ随伴ウイルス血清型2 (rAAV2)、組換えアデノ随伴ウイルス血清型3 (rAAV3)、組換えアデノ随伴ウイルス血清型4

50

(rAAV4)、組換えアデノ随伴ウイルス血清型5(rAAV5)、組換えアデノ随伴ウイルス血清型6(rAAV6)、組換えアデノ随伴ウイルス血清型7(rAAV7)、組換えアデノ随伴ウイルス血清型8(rAAV8)、または組換えアデノ随伴ウイルス血清型9(rAAV)ベクター。ある適用では、本発明のrAAVベクターは、自己相補的rAAV(scAAV)ベクターであってもよい。

【0016】

光受容体特異的プロモーターが所望される実施形態では、本明細書において開示されるrAAVベクターは、少なくとも1つの第1の光受容体特異的ロドプシンキナーゼプロモーターを含んでいてもよい。例示的なそのようなプロモーターは、配列番号12において示されるヒトロドプシンキナーゼプロモーターを含む。本発明のある態様では、配列番号12からの少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、または少なくとも約50以上の連続したヌクレオチドを含むプロモーター配列の使用は、処置用構築物の組織特異的(特に、光受容体特異的)発現が所望される場合、特に好ましい。

10

【0017】

同様に、ユビキタスプロモーターが所望される実施形態では、本明細書において開示されるrAAVベクターは、少なくとも1つの第1の切断型キメラCMV-ニワトリβ-アクチンプロモーターを含んでいてもよい。例示的なそのようなプロモーターは、配列番号13において示される切断型キメラCMV-ニワトリβ-アクチンプロモーターを含む。本発明のある態様では、配列番号13からの少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、または少なくとも約50以上の連続したヌクレオチドを含むプロモーター配列の使用は、処置用遺伝子の非組織特異的発現が所望される場合、特に好ましい。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、開示される処置用遺伝子構築物において用いられるプロモーター配列は、配列番号12または配列番号13において記載されるプロモーター配列からの少なくとも55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約105、約110、約115、または約120以上の連続したヌクレオチドを含む核酸配列を含んでいてもよい、それから本質的に成ってもよい、または代わりにそれから成ってもよい。

30

【0019】

本明細書において開示される遺伝子療法ベクターはまた、任意選択で、少なくとも1つの第1の核酸セグメントに作動可能に連結された第1のエンハンサーまたはウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節性エレメントなどのような転写調節性領域などのような、1つまたは複数の「上流」または「下流」調節性配列をさらに含んでいてもよい。本発明の構築物はまた、任意選択で、処置剤をコードする少なくとも1つの第1の核酸セグメントに作動可能に連結された1つまたは複数のイントロン配列をさらに含んでいてもよい。

【0020】

本発明の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、およびポリペプチドをコードする核酸セグメントは、天然、半合成、または完全に合成の配列に由来してもよいが、好ましくは、哺乳動物起源のものであろう。例示的な哺乳動物の供給源は、限定を伴うことなく、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、エピン(epine)、ヤギ、オオカミ(lupine)、およびその他同種のものを含む。

40

【0021】

本明細書において開示されるrAAVベクターは、任意選択で、感染アデノ随伴ウイルス粒子、ビリオン内に、または1つもしくは複数の複数の感染AAV粒子内に含まれていてもよい。そのため、本発明はまた、1つまたは複数の開示されるrAAV遺伝子構築物を含有するビリオン、ウイルス粒子、および単離組換え宿主細胞を包含する。本発明の実施のための特に好ましい宿主細胞は、限定を伴うことなく、1つまたは複数のrAAVベ

50

クター、AAVビリオン、または複数の感染性ウイルス粒子を含む単離哺乳動物宿主細胞を含む。

【0022】

他の態様では、本発明は、1つまたは複数の(a) rAAVベクター、rAAVビリオン、rAAV感染性ウイルス粒子、複数のそのようなビリオンもしくは感染性粒子、またはベクター、ビリオン、感染性粒子、もしくはその複数の含む単離哺乳動物宿主細胞を含む、新規で有用な組成物を提供する。好ましくは、そのような組成物は、任意選択で、1つまたは複数の薬学的に許容される緩衝剤、キャリア、ビヒクル、希釈剤などをさらに含むであろう、また、さらに任意選択で1つまたは複数の脂質、リポソーム、脂質複合体、エトソーム(ethosome)、ニオソーム(niosome)、ナノ粒子、マイクロ粒子、リボスフィア(liposphere)、ナノカプセル、またはその任意の組み合わせを含んでいてもよい。好ましくは、そのような組成物は、好ましくは、ヒトの眼への投与のために処方され、療法または予防および特に、ヒト網膜ジストロフィー、疾患、または障害(LCA1など)の療法または予防において使用されてもよい。

【0023】

下記に述べられるように、本発明はまた、本明細書において開示される1つまたは複数のrAAVベクター構築物を含む診断上の、処置用の、および予防用のキットをも含む。そのようなキットは、任意選択で、ヒトにおける網膜ジストロフィー、疾患、障害、または異常状態の1つまたは複数の症状の診断、予防、処置、または改善において構成要素を使用するための1つまたは複数のプロトコル、投薬レジメン、または説明書をさらに含んでいてもよい。ある態様では、レーバー先天性黒内障1(LCA-1)と診断されたヒト患者の処置のための処置用のキットが、特に企図される。

【0024】

本発明はまた、哺乳動物の疾患または障害の療法におけるまたは予防における1つまたは複数の開示されるrAAVベースの組成物の使用をも包含する。同様に、本発明は、哺乳動物の眼の疾患、障害、機能不全、または異常状態の1つまたは複数の症状を診断する、予防する、処置する、または改善させるための、特に、ヒトにおけるレーバー先天性黒内障1(LCA-1)の1つまたは複数の症状を処置するまたは改善させるための医薬の製造における開示される組成物の使用を含む。

【0025】

本発明はまた、哺乳動物における疾患、機能不全、障害、欠損、または異常状態の1つまたは複数の症状を予防する、処置する、または改善させるための方法を提供する。そのような方法は、一般に、哺乳動物における疾患、機能不全、障害、欠損、または異常状態の1つまたは複数の症状を予防する、処置する、および／または改善させるのに十分な時間、有効量の本明細書において開示されるrAAV組成物をその必要性のある哺乳動物に投与するステップを含む。そのような哺乳動物は、好ましくは、たとえばレーバー先天性黒内障1(LCA-1)を含む、少なくとも1つの第1の網膜障害、疾患、もしくはジストロフィーを有する、それを有することが疑われている、それを発症する危険性がある、もしくはそれを有すると診断されているまたは哺乳動物は、生物学的に活性で機能的なグアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、もしくはポリペプチドの1つもしくは複数の欠損、欠陥、もしくは欠如を発症する危険性があるもしくは欠損、欠陥、もしくは欠如を有すると診断されている。哺乳動物は、任意の年齢であってもよいが、より好ましくは、レーバー先天性黒内障1(LCA-1)などのような先天性網膜ジストロフィーを発症する危険性があるまたはそれを有すると診断されている新生児、新産児、幼児、または年少者であろう。

【0026】

本発明はまた、その必要性のある哺乳動物に、治療有効量の生物学的に活性な哺乳動物グアニル酸シクラーゼペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を哺乳動物に提供するための方法をもさらに含む。そのような方法は、一般に、少なくとも、有効量の1つまたは複数の本明細書において開示されるrAAVベクターを、その必要性のある哺乳動物の

適した細胞の中に、r A A Vベクターが導入された哺乳動物の細胞の少なくとも1つの第1の集団または少なくとも1つの第1の組織において生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をそれから産生するのに十分な時間、導入するステップを含む。方法の実施において、その必要性のある哺乳動物は、好ましくは、正常な哺乳動物における生物学的に活性なr e t G C 1タンパク質のレベルと比較した場合、哺乳動物の身体内のまたはその身体に関する1つまたは複数の組織において、機能的で、生物学的に活性なr e t G C 1タンパク質の1つまたは複数の欠陥、欠損、または実質的な欠如もしくは完全な欠如を有するであろう。方法のある適用では、哺乳動物からの複数の細胞に、e x v i v oにおいてまたはi n v i t r oにおいてr A A Vベクターが提供され、方法は、続いて、哺乳動物の身体内のまたはその身体に関する少なくとも1つの第1の組織部位の中に、複数の提供された細胞を導入するさらなるステップをさらに含む。たとえば、複数の得られた細胞は、たとえば、網膜、網膜下スペースの中へのまたは網膜を囲む1つもしくは複数の組織へのまたは眼全体へのまたは眼を囲む組織への直接的な注射によるものを含めて、哺乳動物の一方または両方の眼内の少なくとも1つの第1の部位の中に導入されてもよい。

10

【0027】

特定の態様では、細胞の中へのr A A Vベクターグアニル酸シクラーゼ遺伝子構築物の導入およびその続く発現は、機能的なグアニル酸シクラーゼペプチド、タンパク質、またはポリペプチドの翻訳を可能にし、その結果、錐体光受容体は、保持され、錐体媒介性の機能が修復される。重要なことには、そのような方法は、哺乳動物の眼における正常な視覚的な行動の復帰および好ましくは、視力の復帰を提供する。

20

【0028】

本発明のr A A Vベクターの投与は、1回限りの療法の一部であってもよいまたは処置されている対象の生涯の間に2回以上繰り返される、進行中の療法レジメンの一部であってもよい。ある態様では、r A A V構築物の1回の投与は、投与の後の少なくとも1か月、少なくとも2か月、または少なくとも3か月以上の期間にわたり、錐体光受容体の保持ならびに錐体媒介性の機能および視覚的な行動の回復と共に、グアニル酸シクラーゼタンパク質形成の持続をもたらす。より好ましくは、長期療法または予防は、数か月～数年間の期間、哺乳動物の眼への処置用構築物の1つまたは複数の続く投与を使用して達成される。好ましくは、錐体光受容体は、保持され、錐体媒介性の機能および視覚的な行動は、投与の後の少なくとも4か月、少なくとも5か月、または少なくとも6か月以上の期間、哺乳動物において修復される。ある態様では、光受容体の保持、錐体媒介性の機能、および視覚的な行動は、本明細書において開示される組成物を含む処置レジメンの終了の後の少なくとも1年間、少なくとも2年間、少なくとも3年間、または少なくとも4年間以上の期間、哺乳動物において修復される。本発明は、L C A 1を有する、それを有することが疑われている、それを有すると診断される、またはそれを発症する危険性がある哺乳動物の1つまたは複数の網膜細胞において、生物学的に活性なr e t G C 1タンパク質のレベルを増加させるための方法をさらに提供する。そのような方法は、一般に、哺乳動物の1つまたは複数の網膜細胞において生物学的に活性なr e t G C 1タンパク質のレベルを増加させるのに有効な量および時間で、1つまたは複数の開示されるr A A Vグアニル酸シクラーゼウイルスベクター構築物を、その必要性がある哺乳動物の網膜細胞の少なくとも1つの第1の集団の中に導入するステップを含む。そのような方法は、哺乳動物における網膜ジストロフィーの1つまたは複数の症状を予防する、処置する、または改善させるために特に企図され、好ましくは、哺乳動物における網膜ジストロフィーの1つまたは複数の症状を処置するまたは改善させるのに十分な量および時間で、1つまたは複数の開示される処置用構築物を、哺乳動物の網膜、網膜下スペース、または眼に直接または間接的に投与するステップを含んでいてもよい。

30

40

【0029】

本発明はまた、哺乳動物におけるグアニル酸シクラーゼタンパク質欠損の症状を予防する、処置する、または改善させるための、特に、生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼ

50

ポリペプチドの欠損に関係する1つまたは複数の障害を示すヒトにおける欠損の重症度または程度を処置するまたは低下させるための組成物および方法を提供する。一般的な意味で、方法は、そのような障害または1つもしくは複数のその症状に罹患していることが疑われている動物における欠損を処置するまたは改善させるのに十分な量でのおよびその期間の、動物への、薬学的に許容されるビヒクル中の1つまたは複数のグアニル酸シクラーゼペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする、少なくとも1つの第1のrAAVベースの遺伝子構築物の投与を含む。本発明の実施において有用な例示的なグアニル酸シクラーゼポリペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において開示される配列およびその生物学的に機能的な等価物または誘導体のいずれか1つに一次アミノ酸配列が実質的に同一であるグアニル酸シクラーゼ活性を有するペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質を含むが、これらに限定されない。実施において有用なさらなる例示的なグアニル酸シクラーゼペプチド、タンパク質、およびポリペプチドは、哺乳動物グアニル酸シクラーゼをコードするアミノ酸配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなるもの、特に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において開示されるそれらの配列ならびにその生物学的に機能的な等価物または誘導体を含むが、これらに限定されない。

10

【0030】

rAAVグアニル酸シクラーゼベクター組成物

20

第1の実施形態では、本発明は、そのようなベクターを用いて形質転換された適した宿主細胞において核酸セグメントを発現することができる、少なくとも1つの第1のプロモーターに作動可能に連結された、グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチド、特に、哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、もしくはポリペプチド（またはその生物学的に活性な断片もしくは誘導体）をコードする少なくとも1つの第1の核酸セグメントを含むポリペプチドを含むrAAVベクターを提供する。好ましい実施形態では、核酸セグメントは、哺乳動物、特に、ヒトグアニル酸シクラーゼペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質、特に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、もしくは配列番号11において開示される1つもしくは複数のアミノ酸配列またはその生物学的に活性な断片もしくは変異体からの少なくとも1つの第1の30の連続したアミノ酸配列と少なくとも90%相同である少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列を含むペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする。

30

【0031】

好ましくは、ポリペプチドは、配列番号1からの少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、または少なくとも80の連続したアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%相同である少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列を含み、より好ましくは、ポリペプチドは、配列番号1からの少なくとも90の連続したアミノ酸配列と少なくとも99%相同である少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列を含む。

40

【0032】

その代わりに、本発明の処置用構築物は、たとえば、マウス、霊長類、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、エピン、ヤギ、イヌ、ネコ、および／もしくはオオカミ起源の核酸、ペプチド、およびポリペプチドなどのような、任意の哺乳動物の起源のグアニル酸シクラーゼポリペプチドをコードする核酸セグメントを包含してもよいまたは1つもしくは複数の哺乳動物の種から最初に得られ、それらのグアニル酸シクラーゼ活性が保持されるようにヒト細胞において発現されるように遺伝子修飾された修飾核酸セグメントもしくは部位特異的変異誘発核酸セグメントを包含してもよい。

【0033】

他の好ましい実施形態では、本発明の実施における使用のための好ましい核酸セグメン

50

トは、哺乳動物、特にヒトグアニル酸シクラーゼポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片もしくは変異体をコードする。

【0034】

本発明のベクターおよびウイルス粒子において含まれるポリヌクレオチドは、好ましくは、本明細書において記載されるグアニル酸シクラーゼコード核酸セグメントに作動可能に連結された、少なくとも1つの第1の恒常的または誘発性プロモーターを含む。そのようなプロモーターは、同種または異種プロモーターであってもよく、グアニル酸シクラーゼコードセグメントの発現がプロモーターの制御下となるように、グアニル酸シクラーゼポリペプチドをコードする核酸セグメントの上流に、適切に作用するように位置づけられてもよい。構築物は、単一のプロモーターを含んでもよいまたはその代わりに、2つ以上のプロモーターが、グアニル酸シクラーゼコードDNA配列の発現を促進するために使用されてもよい。

10

【0035】

本発明の実施において有用な例示的なプロモーターは、たとえば、CMVプロモーター、プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ハイブリッドCMVプロモーター、ハイブリッドCMV- β -アクチンプロモーター、切断型CMVプロモーター、切断型 β -アクチンプロモーター、切断型ハイブリッドCMV- β -アクチンプロモーター、EF1プロモーター、U1aプロモーター、もしくはU1bプロモーターなどのようなユビキタスプロモーター；または1つもしくは複数の細胞もしくは組織特異的プロモーター（たとえば、ロドプシンキナーゼプロモーター[hGRK1]などのような光受容体特異的プロモーターを含む）またはTet誘発性プロモーターもしくはVP16-LexAプロモーターなどのような誘発性プロモーターなどのような、哺乳動物、特にヒト宿主細胞、組織、および器官において作動可能なそれらのプロモーター配列を含むが、これらに限定されない。

20

【0036】

例証となる実施形態では、処置用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ユビキタス切断型ハイブリッドニワトリ β -アクチン(CBA)プロモーターの制御下にまたは光受容体細胞特異的hGRK1プロモーターの制御下に配置され、適した宿主細胞が遺伝子構築物を用いて形質転換され、かつグアニル酸シクラーゼポリペプチドをコードするDNAが、そのような細胞において発現される場合、処置的に有効なレベルのコードグアニル酸シクラーゼポリペプチドを産生するために使用された。適したhGRK1プロモーターの例は、配列番号12において示されるが、切断型ハイブリッドニワトリ β -アクチン(CBA)プロモーターなどのような適したユビキタスプロモーターは、配列番号13において示される。

30

【0037】

本発明のベクターおよびウイルス粒子において含まれるポリヌクレオチドはまた、任意選択で、1つまたは複数の天然、合成、同種、異種、もしくはハイブリッドエンハンサーまたは5'調節性エレメント、たとえば、CMVエンハンサーなどのような天然エンハンサーまたはその代わりに、合成エンハンサーをさらに含んでもよい。たとえば、作動可能に連結された遺伝子配列の発現を増加させるものを含む細胞または組織特異的エンハンサーもまた、本発明の実施において特に有用であることが企図される。そのようなエンハンサーは、網膜特異的エンハンサー、杆体特異的エンハンサー、および錐体特異的エンハンサーなどを含んでもよいが、これらに限定されない。

40

【0038】

本発明のベクターおよびウイルス粒子内に含まれるポリヌクレオチドおよび核酸セグメントはまた、任意選択で、1つまたは複数のイントロン配列をさらに含んでもよい。そのような実例では、イントロン配列（複数可）は、好ましくは起源が哺乳動物であろう、より好ましくは起源がヒトであろう。

【0039】

本発明のベクター、ビリオン、ウイルス粒子、宿主細胞、または組成物内に含まれるDNA配列、核酸セグメント、およびポリヌクレオチドはまた、任意選択で、コードされた

50

ポリペプチドのより優れた発現、より優れた安定性、および／または翻訳の増強をもたらすように本明細書において開示されるグアニル酸シクラーゼコード核酸セグメントに関して作動可能に位置づけられた、1つまたは複数の天然、合成、同種、異種、またはハイブリッド転写後もしくは3'調節性エレメントをさらに含んでもよい。そのような1つの例は、グアニル酸シクラーゼ遺伝子の下流に作動可能に位置づけられたウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節性エレメント(WPRE)である。そのような状況におけるこれらなどのようなエレメントの使用は、分子生物学の技術分野における当業者らに周知である。

【0040】

例証となる実施形態では、本発明は、以下に開示されるポリペプチドおよびペプチド配列からの少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約55、少なくとも約60、少なくとも約65、少なくとも約70、少なくとも約75、少なくとも約80、少なくとも約85、少なくとも約90、少なくとも約95、または少なくとも約100以上の連続したアミノ酸配列、特に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11のいずれか1つにおいて列挙されるそれらのポリペプチドを含む、1つまたは複数の生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドの投与に関する。

【0041】

同様に、さらなる例証となる実施形態では、本発明は、以下に開示される核酸セグメントからの少なくとも約10、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90、少なくとも約100、少なくとも約110、少なくとも約120、少なくとも約130、少なくとも約140、少なくとも約150、少なくとも約160、少なくとも約170、少なくとも約180、少なくとも約190、もしくは少なくとも約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、またはさらに約800以上の連続した核酸残基、特に、たとえば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において列挙されるものを含む、任意の1つまたは複数の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質をコードするDNA配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなる核酸セグメントによってコードされる、1つまたは複数の生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドの投与に関する。

【0042】

本発明の例示的なアデノ随伴ウイルスベクター構築物およびポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11の配列と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一であるペプチドまたはポリペプチドをコードする少なくとも1つの第1の核酸セグメントを含む、それから本質的になる、またはそれからなるものを含み、ペプチドまたはポリペプチドは、選択された哺乳動物の細胞および／または組織において発現される場合、グアニル酸シクラーゼ活性を有する。

【0043】

ある実施形態では、本発明のウイルスベクター構築物およびポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において開示される1つまたは複数の配列と少なくとも約82%、少なくとも約84%、少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約92%、または少なくとも約94%同一であ

るペプチドまたはポリペプチドをコードする少なくとも1つの第1の核酸セグメントを含む、それから本質的になる、またはそれからなるそれらのベクターおよびポリヌクレオチドを含むであろう。そのような構築物は、選択された哺乳動物細胞および／または組織において、特にヒト細胞および／または組織において発現される場合、グアニル酸シクラーゼ活性を有する1つまたは複数の生物学的に活性なペプチドまたはポリペプチドを好ましくはコードするであろう。

【0044】

本発明の例示的なポリヌクレオチドはまた、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11のいずれか1つをコードする核酸配列と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一である少なくとも1つの第1の核酸セグメントを含む、それから本質的になる、またはそれからなる配列をも含み、核酸セグメントによってコードされるペプチドまたはポリペプチドは、選択された哺乳動物細胞および／または組織において発現される場合、グアニル酸シクラーゼ活性を有する。

【0045】

rAAVウイルス粒子およびビリオンならびにそれらを含む宿主細胞

本発明の他の態様は、本発明のrAAVグアニル酸シクラーゼベクターを含むrAAV粒子およびビリオン、複数のそのような粒子およびビリオンならびに哺乳動物の選択された細胞、組織、または器官、たとえば、選択された哺乳動物の眼の1つまたは複数の領域への、筋肉内、静脈内、または直接的な注射によってなどのような、適した手段を通しての哺乳動物への投与が意図される、たとえば、rAAVグアニル酸シクラーゼベクターまたはビリオンの医薬処方物などのような、本明細書において開示される1つまたは複数のrAAVグアニル酸シクラーゼベクターを含む医薬組成物および宿主細胞に関する。典型的に、そのような組成物は、以下に記載されるように、薬学的に許容される賦形剤、緩衝剤、希釈剤、アジュバント、またはキャリアと共に処方されるであろう、また、処置効果が所望される、選択された器官、組織、および細胞への投与を促進するために、1つまたは複数のリポソーム、脂質、脂質複合体、マイクロスフェア、マイクロ粒子、ナノスフェア、またはナノ粒子処方物をさらに含んでもよい。

【0046】

本発明のさらなる態様は、本明細書において開示される1つまたは複数のrAAVベクター、ビリオン、または感染性ウイルス粒子を含む哺乳動物宿主細胞およびその複数を含む。特に好ましい細胞は、たとえば網膜細胞を含むヒト宿主細胞、特にヒトの眼組織である。

【0047】

処置用のキットおよび医薬組成物

哺乳動物におけるグアニル酸シクラーゼ欠損から結果として生じる状態の症状を処置するまたは改善させるための処置用のキットもまた、本発明の一部である。例示的なキットは、好ましくは、本明細書において記載される1つまたは複数の開示されるAAVグアニル酸シクラーゼベクター構築物、ビリオン、または医薬組成物およびキットを使用するための説明書を含むものである。グアニル酸シクラーゼ、特に、網膜特異的グアニル酸シクラーゼ-1欠損の処置の方法におけるそのようなキットの使用は、retGC1欠陥または欠損の処置においておよび罹患哺乳動物におけるLCA-1などのような網膜ジストロフィーの処置において好ましい。

【0048】

本発明の他の重要な態様は、哺乳動物、特にヒトにおけるグアニル酸シクラーゼ欠損の症状を処置するまたは改善させるための医薬の調製における、本明細書において記載される、開示のベクター、ビリオン、組成物、および宿主細胞の使用に関する。医薬の調製におけるならびに、たとえば、LCA-1などのような網膜ジストロフィーにおけるなどの

ような、たとえば、網膜 G C 1 における欠損または欠陥から結果として生じる状態を含む神経学のおよび／または中枢神経系欠陥の処置のための方法におけるそのような組成物の使用は、一般に、罹患哺乳動物においてそのような欠損の症状を処置するまたは改善させるのに十分な量でのおよびその時間の、1つまたは複数の開示されるウイルスベクター、ビリオン、宿主細胞、またはそれらの1つもしくは複数を含む組成物の、その必要性がある哺乳動物、特にヒトへの投与を含む。方法はまた、診断の後のまたは症状の発症前の、そのような状態を有することが疑われている動物の予防療法またはそのような状態を発症する危険性があるそれらの動物へのそのような組成物の投与を包含してもよい。

【0049】

本発明の他の態様は、本明細書において記載される、1つまたは複数の開示されるアデノ随伴ウイルスベクター、ビリオン、ウイルス粒子、および宿主細胞を含む組成物に関する。そのようなものを含む医薬組成物は、罹患哺乳動物、特にヒトを処置するための療法において、特に、医薬の調製において有用であることが特に企図される。

【0050】

処置方法

本発明はまた、その必要性がある哺乳動物に治療有効量のグアニル酸シクラーゼポリペプチドを送達するための方法を提供する。そのような方法は、一般に、本明細書において開示される1つまたは複数のグアニル酸シクラーゼ組成物をそのような哺乳動物に提供するまたは投与するステップを少なくとも含む。たとえば、方法は、本明細書において記載される1つまたは複数の r A A V ベクター、ビリオン、ウイルス粒子、宿主細胞、または医薬組成物をそのような哺乳動物に提供するステップを含んでいてもよい。好ましくは、そのような提供またはそのような投与は、本明細書において開示される、治療有効量の1つまたは複数のグアニル酸シクラーゼポリペプチドを哺乳動物の選択された細胞、組織、または器官に、特に、処置的に有効なレベルを哺乳動物の眼の細胞に提供するのに有効な量およびその時間となるであろう。そのような方法は、薬 (t h e r a p e u t i c u m) の全身性の注射 (複数可) を含んでいてもよいまたは哺乳動物の特定の細胞、組織、もしくは器官への処置用組成物の直接的なもしくは間接的な投与、注射、もしくは導入をさらに含んでいてもよい。

【0051】

たとえば、処置用組成物は、眼の組織へのもしくは網膜へのまたは網膜下スペースへのまたは哺乳動物の眼内の1つもしくは複数の特定の細胞型への直接的な注射によって哺乳動物に提供されてもよい。

【0052】

本発明はまた、動物におけるグアニル酸シクラーゼ欠損の症状を処置する、改善させる、およびその重症度を低下させるための方法を提供する。これらの方法は、一般に、 r e t G C 1 ポリペプチド欠陥もしくは欠損を処置するのにまたはそのような蓄積から結果として生じるまたは L C A 1 およびその他同種のものなどのような網膜ジストロフィーを含む、動物における十分な生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼポリペプチドの過小発現もしくは欠如から結果として生じる機能不全を処置するのに有効な量および時間で、本明細書において開示される1つまたは複数の r A A V グアニル酸シクラーゼベクター組成物をその必要性がある動物に提供するステップを少なくとも含む。上記に記載されるように、そのような方法は、薬の全身性の注射 (複数可) を含んでいてもよいまたは動物の特定の細胞、組織、もしくは器官への処置用組成物の直接的なもしくは間接的な投与、注射、もしくは導入をさらに含んでいてもよい。

【0053】

本発明は、哺乳動物におけるグアニル酸シクラーゼ欠陥もしくは欠損、網膜ジストロフィー、もしくは L C A 1 または他の G C 1 関連眼疾患、障害、もしくは機能不全を処置するための医薬の製造における、本明細書において開示されるアデノ随伴ウイルスベクター、ビリオン、ウイルス粒子、宿主細胞、および／または医薬組成物の使用にさらに関する。この使用は、哺乳動物の1つまたは複数の細胞、組織、または器官への全身性のまたは

局所的な注射、感染、または投与を含んでもよい。そのような使用は、L C A-1 などのような1つまたは複数の網膜ジストロフィーを有する、それを有することが疑われている、またはそれを発症する危険性があるヒトにおいて特に企図される。

したがって本発明は以下の項目を提供する：

(項目1)

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ベクターであって、

少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする少なくとも1つの第1の核酸セグメント、および、

該第1の核酸セグメントに作動可能に連結された光受容体特異的ヒトロドプシンキナーゼプロモーターまたはユビキタス切断型キメラC M V-ニワトリβ-アクチンプロモーターを含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチドを含む、r A A Vベクター。

10

(項目2)

上記少なくとも1つの第1の核酸セグメントが、少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域を含む少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドをコードし、該少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において記載される配列の少なくとも80の連続したアミノ酸の少なくとも1つの第1の配列領域と少なくとも約90%同一である、項目1に記載のr A A Vベクター。

20

(項目3)

上記少なくとも1つの第1の核酸セグメントが、少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域を含む少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドをコードし、該少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において記載される配列の少なくとも100の連続したアミノ酸の少なくとも1つの第1の配列領域と少なくとも約92%同一である、項目1または項目2に記載のr A A Vベクター。

(項目4)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域を含み、該少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において記載される配列の少なくとも120の連続したアミノ酸の少なくとも1つの第1の配列領域と少なくとも約95%同一である、前述の項目のいずれかに記載のr A A Vベクター。

30

(項目5)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域を含み、該少なくとも1つの第1の連続したアミノ酸配列領域が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11において記載される配列の少なくとも140の連続したアミノ酸の少なくとも1つの第1の配列領域と少なくとも約98%同一である、前述の項目のいずれかに記載のr A A Vベクター。

40

(項目6)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、少なくとも1つのアミノ酸配列を含み、該少なくとも1つのアミノ酸配列が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも約98%同一である、前述の項目のいずれかに記載のr

50

AAVベクター。

(項目7)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11のアミノ酸配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目8)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11の配列と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列から本質的になる、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

10

(項目9)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、生物学的に活性であり、かつ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11からの少なくとも50のアミノ酸の連続した配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目10)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、生物学的に活性であり、かつ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11からの少なくとも75のアミノ酸の連続した配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

20

(項目11)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、生物学的に活性であり、かつ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11からの少なくとも100のアミノ酸の連続した配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

30

(項目12)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、生物学的に活性であり、かつ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11からの少なくとも125のアミノ酸の連続した配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目13)

上記哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、生物学的に活性であり、かつ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11の1つまたは複数からの一次アミノ酸配列と少なくとも95%同一である一次アミノ酸配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

40

(項目14)

上記哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、生物学的に活性であり、かつ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11の1つまたは複数からの一次アミノ酸配列と少なくとも99%同一である一次アミノ酸配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目15)

前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクターであって、該rAAVベクターが、組

50

換えアデノ随伴ウイルス血清型1 (rAAV1) ベクター、組換えアデノ随伴ウイルス血清型2 (rAAV2) ベクター、組換えアデノ随伴ウイルス血清型3 (rAAV3) ベクター、組換えアデノ随伴ウイルス血清型4 (rAAV4) ベクター、組換えアデノ随伴ウイルス血清型5 (rAAV5) ベクター、組換えアデノ随伴ウイルス血清型6 (rAAV6) ベクター、組換えアデノ随伴ウイルス血清型7 (rAAV7) ベクター、組換えアデノ随伴ウイルス血清型8 (rAAV8) ベクター、または組換えアデノ随伴ウイルス血清型9 (rAAV) ベクターである、rAAVベクター。

(項目16)

自己相補的rAAV (scAAV) である、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

10

(項目17)

上記光受容体特異的ヒトロドプシンキナーゼプロモーターが、配列番号12からの少なくとも30の連続した塩基対配列から本質的になる核酸配列を含むか、または上記切断型キメラCMV-ニワトリβ-アクチンプロモーターが、配列番号13からの少なくとも70の連続した塩基対配列から本質的になる核酸配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目18)

上記光受容体特異的ヒトロドプシンキナーゼプロモーターが、配列番号12からの少なくとも40の連続した塩基対配列から本質的になる核酸配列を含むか、または上記切断型キメラCMV-ニワトリβ-アクチンプロモーターが、配列番号13からの少なくとも90の連続した塩基対配列から本質的になる核酸配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

20

(項目19)

上記光受容体特異的ヒトロドプシンキナーゼプロモーターが、配列番号12からの少なくとも60の連続した塩基対配列から本質的になる核酸配列を含むか、または上記切断型キメラCMV-ニワトリβ-アクチンプロモーターが、配列番号13からの少なくとも120の連続した塩基対配列から本質的になる核酸配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目20)

上記光受容体特異的ヒトロドプシンキナーゼプロモーターが、配列番号12の核酸配列を含むか、または上記切断型キメラCMV-ニワトリβ-アクチンプロモーターが、配列番号13の核酸配列を含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

30

(項目21)

上記少なくとも1つの第1の核酸セグメントに作動可能に連結された少なくとも1つの第1のエンハンサーをさらに含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目22)

上記少なくとも1つの第1の核酸セグメントに作動可能に連結された少なくとも1つの第1の哺乳動物のイントロン配列をさらに含む、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目23)

上記少なくとも1つの第1の哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドが、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、エピン、ヤギ、またはオオカミ起源のものである、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

40

(項目24)

上記少なくとも1つの第1の核酸セグメントが、ヒト起源の生物学的に活性なヒトグアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目25)

上記切断型キメラCMV-ニワトリβ-アクチンプロモーターが、配列番号12の配列

50

から本質的になる核酸配列を含むか、または上記少なくとも1つの第1の核酸セグメントが、配列番号1からの少なくとも100の連続したアミノ酸配列を含む哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、もしくはポリペプチドをコードする、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目26)

感染性アデノ随伴ウイルス粒子、ビリオン、または複数の感染性AAV粒子内に含まれる、前述の項目のいずれかに記載のrAAVベクター。

(項目27)

項目1～26のいずれか一項目に記載のrAAVベクターを含む、ビリオンまたは感染性ウイルス粒子。

10

(項目28)

項目1～26のいずれか一項目に記載のrAAVベクターから調製される、複数の感染性ウイルス粒子。

(項目29)

(a) 項目1～26のいずれか一項目に記載のrAAVベクター、

(b) 項目27に記載のビリオンもしくは感染性ウイルス粒子、または

(c) 項目28に記載の複数の感染性ウイルス粒子

を含む、単離哺乳動物宿主細胞。

(項目30)

ヒト宿主細胞である、項目27に記載の単離哺乳動物宿主細胞。

20

(項目31)

(1)

(a) 項目1～26のいずれか一項目に記載のrAAVベクター、

(b) 項目27に記載のビリオンもしくは感染性ウイルス粒子、

(c) 項目28に記載の複数の感染性ウイルス粒子、または

(d) 該ベクター、該ビリオン、もしくは該感染性粒子を含む単離哺乳動物宿主細胞および

(2) 薬学的に許容される緩衝剤、キャリア、ビヒクル、または希釈剤を含む、組成物。

(項目32)

30

脂質、リポソーム、脂質複合体、エトソーム、ニオソーム、ナノ粒子、マイクロ粒子、リポスフィア、ナノカプセル、またはその任意の組み合わせをさらに含む、項目31に記載の組成物。

(項目33)

ヒトの眼への投与のために処方される、項目31または項目32に記載の組成物。

(項目34)

療法または予防における使用のための、項目31～33のいずれか一項目に記載の組成物。

(項目35)

ヒト網膜ジストロフィー、疾患、または障害の療法または予防における使用のための、項目31～34のいずれか一項目に記載の組成物。

40

(項目36)

レーバー先天性黒内障1(LCA1)の療法または予防における使用のための、項目31～54のいずれか一項目に記載の組成物。

(項目37)

(1)

(a) 項目1～26のいずれか一項目に記載のrAAVベクター、

(b) 項目27に記載のビリオンもしくは感染性ウイルス粒子、

(c) 項目28に記載の複数の感染性ウイルス粒子、

(d) 項目29もしくは項目30に記載の単離哺乳動物宿主細胞、または

50

(e) 項目 3 1 ~ 3 6 のいずれか一項目に記載の組成物
からなる群より選択される構成要素、および

(2) 該構成要素を、ヒトにおける網膜ジストロフィー、疾患、障害、または異常状態
の 1 つまたは複数の症状の診断、予防、処置、または改善において使用するための説明書
を含む、キット。

(項目 3 8)

上記網膜ジストロフィーが、レーバー先天性黒内障 1 (L C A - 1) と診断されている
、項目 3 5 に記載のキット。

(項目 3 9)

哺乳動物の眼の疾患、障害、機能不全、もしくは異常状態またはその 1 つもしくは複数の
10 症状を診断するか、予防するか、処置するか、または改善させるための医薬の製造にお
ける、項目 3 1 に記載の組成物の使用。

(項目 4 0)

ヒトにおけるレーバー先天性黒内障 1 (L C A - 1) の 1 つまたは複数の症状を処置す
るか、または改善させるための医薬の製造における、項目 3 9 に記載の使用。

(項目 4 1)

哺乳動物における疾患、機能不全、障害、欠損、もしくは異常状態、またはその 1 つも
しくは複数の症状を予防するか、処置するか、または改善させるための方法であって、該
方法は、該哺乳動物における該疾患、機能不全、障害、欠損、もしくは異常状態、または
その 1 つもしくは複数の症状を予防するか、処置するか、または改善させるのに十分な量
20 および時間で、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項目に記載の r A A V ベクターを含む組成物を
該哺乳動物に投与するステップを含む、方法。

(項目 4 2)

上記哺乳動物が、少なくとも 1 つの第 1 の網膜障害、疾患、もしくはジストロフィーを
有するか、少なくとも 1 つの第 1 の網膜障害、疾患、もしくはジストロフィーを有するこ
とが疑われているか、少なくとも 1 つの第 1 の網膜障害、疾患、もしくはジストロフィー
を発症する危険性があるか、または少なくとも 1 つの第 1 の網膜障害、疾患、もしくはジ
ストロフィーを有すると診断された、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

上記哺乳動物が、生物学的に活性な網膜グアニル酸シクラーゼタンパク質、ペプチド、
30 またはポリペプチドにおける欠損症を発症する危険性があるか、または該欠損症を有する
と診断された、項目 4 1 または項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

上記哺乳動物が、ヒト新生児、新産児、幼児、または年少者であって、レーバー先天性
黒内障 1 (L C A - 1) などの先天性網膜ジストロフィーを発症する危険性があるか、ま
たはレーバー先天性黒内障 1 (L C A - 1) などの先天性網膜ジストロフィーを有すると
診断された、ヒト新生児、新産児、幼児、または年少者である、項目 4 1 ~ 4 3 のいづれ
か一項目に記載の方法。

(項目 4 5)

治療有効量の生物学的に活性な哺乳動物グアニル酸シクラーゼペプチド、ポリペプチド
40 、またはタンパク質を必要とする哺乳動物に、治療有効量の生物学的に活性な哺乳動物グ
アニル酸シクラーゼペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を提供するための方法で
あって、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項目に記載の有効量の r A A V ベクターを、十分な時
間、治療有効量の生物学的に活性な哺乳動物グアニル酸シクラーゼペプチド、ポリペプ
チド、またはタンパク質を必要とする哺乳動物の適した細胞に導入して、該 r A A V ベク
ターが導入された該哺乳動物の細胞の少なくとも 1 つの第 1 の集団または少なくとも 1 つの
第 1 の組織において、該 r A A V ベクターから生物学的に活性なグアニル酸シクラーゼ
ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を産生するステップを含む、方法。

(項目 4 6)

上記治療有効量の生物学的に活性な哺乳動物グアニル酸シクラーゼペプチド、ポリペ

10

20

30

40

50

チド、またはタンパク質を必要とする哺乳動物が、該哺乳動物の少なくとも1つの第1の組織において、正常な哺乳動物における生物学的に活性な *retGC1* タンパク質のレベルと比較した場合に、生物学的に活性な *retGC1* タンパク質の欠陥、欠損、または実質的な欠如を有する、項目45に記載の方法。

(項目47)

項目45または項目46に記載の方法であって、ここで、上記哺乳動物からの複数の細胞には、*ex vivo*または*in vitro*において上記 *rAAV* ベクターが提供され、該方法は、該哺乳動物の身体内のまたは身体に関する少なくとも1つの第1の組織部位の中に、該複数の提供を受けた細胞を導入するステップをさらに含む、方法。

(項目48)

10

上記複数の得られた細胞が、上記哺乳動物の一方または両方の眼内の少なくとも1つの第1の部位の中に導入される、項目45～47のいずれか一項目に記載の方法。

(項目49)

上記複数の得られた細胞が、網膜または周囲の組織の中への直接的な注射によって、上記哺乳動物の一方または両方の眼内の少なくとも1つの第1の部位の中に導入される、項目45～48のいずれか一項目に記載の方法。

(項目50)

上記 *rAAV* ベクターの導入によって、上記哺乳動物の眼において、錐体光受容体が保持され、錐体媒介性の機能および視覚行動が修復された、項目45～49のいずれか一項目に記載の方法。

20

(項目51)

上記哺乳動物の眼の中への上記 *rAAV* ベクターの1回の導入によって、少なくとも3か月の期間、該哺乳動物において、錐体光受容体が保持され、錐体媒介性の機能および視覚行動が修復された、項目45～50のいずれか一項目に記載の方法。

(項目52)

上記哺乳動物の眼の中への上記 *rAAV* ベクターの1回の導入によって、少なくとも6か月の期間、該哺乳動物において、錐体光受容体が保持され、錐体媒介性の機能および視覚行動が修復された、項目45～51のいずれか一項目に記載の方法。

(項目53)

上記哺乳動物の眼の中への上記 *rAAV* ベクターの1回の導入によって、少なくとも10か月の期間、該哺乳動物において、錐体光受容体が保持され、錐体媒介性の機能および視覚行動が修復された、項目45～52のいずれか一項目に記載の方法。

30

(項目54)

LCA1 を有するか、*LCA1* を有することが疑われているか、*LCA1* を有すると診断されているか、または *LCA1* を発症する危険性がある哺乳動物の1つまたは複数の網膜細胞において、生物学的に活性な *retGC1* タンパク質のレベルを増加させるための方法であって、該哺乳動物の1つまたは複数の網膜細胞において生物学的に活性な *retGC1* タンパク質のレベルを増加させるのに有効な量および時間で、該哺乳動物の網膜細胞の少なくとも1つの第1の集団の中に、項目1～26のいずれか一項目に記載の *rAAV* ベクターを導入するステップを含む、方法。

40

(項目55)

哺乳動物における網膜ジストロフィーの1つまたは複数の症状を処置するかまたは改善させるための方法であって、該哺乳動物における網膜ジストロフィーの1つまたは複数の症状を処置するかまたは改善させるのに十分な量および時間で、項目1～26のいずれか一項目に記載の *rAAV* ベクターを該哺乳動物の網膜または網膜下スペースに直接投与するステップを含む、方法。

(項目56)

上記哺乳動物が、レーバー先天性黒内障1 (*LCA-1*) と診断された、項目55に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

50

【0054】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明のある態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、添付の図面に関連して記載される以下の説明に対する参照によってより理解されてもよく、同様の参照数字は、同様のエレメントを識別する。

【図1】図1は、+/+（上位の波形）、無処置GC1KO（中央の波形）、およびAAV-mGC1処置（最下位の波形）マウスからの代表的な錐体（左のカラム）および杆体（右のカラム）媒介性のERG結果を示す。黒色の結果は、hGRK1-mGC1を注射した眼（最下位の波形）およびそれらの注射していない反対側の眼（中央の波形）に相当する。赤色の結果は、smCBA-mGC1を注射した眼（最下位の波形）および注射していない反対側の眼（中央の波形）に相当する。AAV-mGC1処置眼における錐体の応答は、正常のおよそ45%まで修復される。

10

【図2】図2Aおよび図2Bは、ある期間にわたる、GC1KO、同質遺伝+/+対照、smCBA-mGC1処置（図2A）、およびhGRK1-mGC1処置（図2B）GC1KOMausにおける平均明所視b波最大振幅を示す。smCBA-mGC1およびhGRK1-mGC1処置マウスの両方の錐体の応答は、注射後少なくとも3か月間で、正常のおよそ45%となる。

【図3】図3A、図3B、および図3Cは、視覚によって誘発された行動が、smCBA-mGC1またはhGRK1-mGC1を用いて処置したGC1KOMausにおいて修復されたことを視運動分析によって示す。M1~M9は、試験のために使用した9匹のマウスに相当する。+/+対照マウス（M1、M2）、ナイーブGC1KO（M3、M4）、smCBA-mGC1（M5、M6、M7）、およびhGRK1-mGC1処置（M8、M9）マウスの明所視力およびコントラスト感度は、処置マウスが、正常の目の見えるマウスのように行動することを明らかにする（図3Bおよび図3C）。すべての+/+眼（n=4）、GC1KO眼（n=9）、およびAAV-mGC1処置眼（n=5）の平均を示す（図3C）。それぞれのマウス（M1~M9）からの錐体媒介性のERG応答を電気生理学的比較のために示す（図3A）。

20

【図4】図4A、図4B、図4C、図4D、図4E、および図4Fは、AAV5-hGRK1-mGC1が、GC1KOMausの光受容体外節においてGC1の発現を駆動することを示す（図4A）。GC1発現は、無処置の反対側の対照眼において見られない（図4B）。AAV5-smCBA-mGC1は、光受容体外節（図4C）においておよび時々、光受容体細胞体（図4Fにおける白色の矢）においてGC1の発現を駆動する。そのようなGC1発現は、無処置の反対側の対照眼において見られない（図4D）。AAV5-mGC1処置眼における処置用導入遺伝子発現のレベルは、同質遺伝+/+対照眼において見られるものと類似する（図4E）。網膜はすべて、処置後3か月のマウスまたは年齢が一致する無処置対照から採取した。スケールバーは、図4Aにおいて100μm、図4Fにおいて25μmとする。OS=外節、IS=内節、ONL=外顆粒層。

30

【図5】図5A、図5B、図5C、および図5Dは、+/+、GC1KO、AAV5-smCBA-mGC1処置、およびAAV5-hGRK1-mGC1処置マウスの錐体光受容体における錐体アレスチン発現を示す。無処置GC1KO網膜は、特徴的な、無秩序で、剥離した錐体外節を含有する（図5B）のに対して、処置GC1KO（図5Cおよび図5D）ならびに+/+（図5A）網膜切片において、錐体外節は、損なわれておらず、錐体アレスチン分布は正常に見えた。網膜はすべて、処置後3か月のマウスまたは年齢が一致する無処置対照から採取した。スケールバーは、図5Dにおいて100μmとする。OS=外節、IS=内節、S=シナプス終末。

40

【図6】図6A、図6B、図6C、および図6Dは、AAV-mGC1処置が、処置後少なくとも3か月間、処置眼における錐体光受容体の保持をもたらすことを示す。錐体アレスチンについて染色したhGRK1-mGC1研究（図6A：「TXなし」=無処置；図6C：「TX」=処置）およびsmCBA-mGC1研究（図6B：「TXなし」=無処置；図6D：「TX」=処置）および反対側の注射していない眼からの代表的な網膜ホルマウントは、錐体光受容体が、処置後少なくとも3か月間、AAV-mGC1を用いて処

50

置したGC1KOマウスにおいて保持されることを明らかにする。錐体細胞密度は、処置および無処置マウスの中央および下位の網膜においてカウントした。有意差は、各々のウイルスベクターを用いる処置の後に両方のエリアにおいて見出された。

【図7】図7は、脊椎動物光伝達カスケードを示す。光刺激に際して、ロドプシン(R)における立体構造変化は、トランスデューシン(T)およびcGMPホスホジエステラーゼ(PDE)の活性化を含む事象のカスケードを刺激し、最終的に、cGMPの加水分解をもたらす。細胞内cGMPの低下は、光受容体外節膜における環状ヌクレオチド感受性チャンネル(CNG)の閉鎖を引き起こす。これらのチャンネルの閉鎖は、細胞の過分極およびそのため、細胞内カルシウムにおける劇的な低下を引き起こす。カルシウムレベルが下がると、非結合グアニル酸シクラーゼ活性化タンパク質(GCAP)は、自由にグアニル酸シクラーゼ(GC)を刺激することができる。GCは、その目的がcGMPを産生することであるという理由で光伝達の回復フェーズにおいて役割を果たす。cGMPのレベルがGCによって十分に増加されたら、cGMP感受性チャンネルは再び開き、細胞の脱分極および暗順応状態への復帰をもたらす。

【図8】図8は、retGC1の予測される構造および形態が、1回膜貫通領域、細胞内、および細胞外ドメインを有する他のグアニル酸シクラーゼに相同性を示すことを示す。細胞内ドメインは、「キナーゼ様」領域および触媒ドメインにさらに分けられる。retGC1のカルシウムおよびGCAP1依存性の調節は、細胞内ドメイン(KHD)を通して調節される。光受容体細胞におけるカルシウム濃度が高度である場合(暗/脱分極状態)、カルシウム結合GCAP1は、retGC1の活性化を予防する。光刺激に際して、カルシウムレベルは減少する。カルシウムは、GCAP1から解離し、それによって、GCAP1がretGC1を活性化するのを可能にする。retGC1の役割は、cGMPを産生することである。

【図9】図9は、正常(WT)対GC1KOマウスにおける錐体光受容体を示す。WT錐体では、GC1は、有効にCNG感受性チャンネルを再び開き、かつその暗順応/脱分極状態に細胞を戻すことができるcGMPを産生するように、正常に機能する。GC1KOマウスの錐体光受容体では、GC1は、cGMPを産生しない。この不全は、CNG感受性チャンネルの再開を妨げる。これらの細胞は、本質的に、慢性的に過分極化している(明順応)。それらは、見るために光を伝達せず(ERGの欠乏によって証明されるように)、最終的に変性するであろう。

【図10】図10は、コンセンサス配列を含む、ウシGC1(bov GC1)およびマウスGC1(mGC1)のアミノ酸配列アライメントを示す。N末端エリアに位置する可変領域を赤色の長方形によって強調する。

【図11】図11は、2つの例証となるベクターのマップを示す。一方は、ユビキタスプロモーターsmCBAを含有し、他方は、光受容体特異的プロモーター、hGRK1を利用する。

【図12】図12は、GC1(赤色)およびPNAレクチン(緑色)について染色したAAV5-smCBA-mGC1を注射したGC1KO眼からの代表的な網膜切片が錐体外節(黄色のオーバーレイ)および杆体外節(赤色のみ)においてGC1発現を示すことを示す。hGRK1-mGC1を注射した眼は、同じパターンを示した。

【図13】図13A、図13B、および図13Cは、GC1KOマウスにおける網膜機能のAAV媒介性の回復を示す。図13A: AAV5-hGRK1-mGC1(赤色)、AAV5-smCBA-mGC1(緑色)、もしくはAAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1を用いて約P14に処置したGC1KOマウスまたは年齢が一致する同質遺伝GC1+/+対照の眼から記録した代表的な明所視の(錐体媒介性)結果。結果は、注射後4か月(左)、7か月(中央)、および9か月(右)目に得た。図13B: 処置GC1KOマウス、無処置GC1KO、および年齢が一致する同質遺伝GC1+/+対照マウスにおいて12cd/m²刺激を用いて毎月生成した平均錐体b波振幅。図13C: ある期間にわたる処置対無処置GC1KOマウスにおける暗所視(杆体伝達)応答。値は、処置対無処置眼における5cd/m²で生成された杆体b波振幅の比率を示す。3つのベクタ

10

20

30

40

50

ーはすべて、G C 1 K Oマウスに対して安定した長期処置効果を与え、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 が最も効率的である。

【図14】図14は、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 を用いて処置したG C 1 K Oマウスを注射後7か月目に安楽死させたことを示す。A A V 5 - s m C B A - m G C 1 およびA A V 5 - h G R K 1 - m G C 1 処置マウスは注射後9か月目に安楽死させた。これらの眼および約11月齢G C 1 + / +マウスの眼を切片化し、G C 1 (緑色、上位の列) および錐体アレスチン (赤色、最下位の列) に対して産生される抗体を用いて網膜を染色した。3つの処置用ベクターはすべて、もっぱら、G C 1 K Oマウスの光受容体においてG C 1 発現を駆動した。おそらく、このベクターの高度な力価による結果である、いくらかの網膜の菲薄化が、A A V 5 - h G R K 1 - m G C 1 処置マウスにおいて観察された。A A V 8 (Y 7 3 3 F) およびA A V 5 - s m C B A 処置マウスにおけるG C 1 発現および錐体密度／形態は、年齢が一致するG C 1 + / +対照において見られるものと類似していた。これに反して、年齢が一致するG C 1 K Oマウスの網膜は、G C 1 発現の欠如および錐体細胞密度における著しい低下を示した。

10

【図15】図15は、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 を用いる注射後7.5か月目に、あるG C 1 K Oマウスを安楽死させ、その網膜をウエスタンブロットに使用したことを示す。G C 1 に対して特異的な抗体は、処置G C 1 K O眼におけるA A V 媒介性のG C 1 発現のレベルが、年齢が一致する同質遺伝G C 1 + / +対照眼において見られるものと類似することを示す。グアニル酸シクラーゼ活性化タンパク質-1 (G C A P 1) 発現 (グアニル酸シクラーゼの生化学的パートナー) のレベルもまた、処置および無処置G C 1 K OならびにG C 1 + / +対照眼において評価した。以前の報告と一致して、G C A P 1 タンパク質は、無処置G C 1 K O眼においてダウンレギュレートされた。A A V 媒介性のG C 1 発現は、同質遺伝G C 1 + / +対照において見られるレベルに類似して、G C A P 1 発現の増加をもたらす。

20

【図16】図16Aおよび図16Bは、A A V 5 - s m C B A - m G C 1 を用いる注射後11か月目の結果を示し、あるG C 1 K Oマウスを安楽死させ、その網膜をホルマウントし、錐体アレスチンに対して産生される抗体を用いて染色した。免疫染色は、錐体が、上部の網膜以外において無処置G C 1 K O眼 (図16A) において不在であることを明らかにした。A A V 媒介性のG C 1 発現は、処置眼 (図16B) の網膜の全体にわたって少なくとも11か月間 (研究した最も後の時点) 、錐体光受容体を保持する。

30

【図17】図17は、A A V 8 (7 3 3) - h G R K 1 - m G C 1 を注射したG C 1 K Oマウスを注射後4か月目および7か月目に安楽死させたデータを示す。A A V 5 - s m C B A - m G C 1 およびA A V 5 - h G R K 1 - m G C 1 を注射したG C 1 K Oマウスは、注射後7か月目および10か月目に安楽死させた。年齢が一致するナীবG C 1 K Oマウスは、対照として使用した。処置および無処置眼からの視神経ならびに視路を含有する右および左脳の一部を単離し、ベクターゲノムの回収のために使用した。A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 をG C 1 K Oマウスの左眼に注射したのに対して、両方のA A V 5 ベクターをG C 1 K Oマウスの右眼に注射したことに注意されたい。ベクターゲノムは、すべての症例において処置眼の視神経のみから回収された。A A V 5 ベクターの注射後10か月目までに、ベクターゲノムは脳から回収されなかった。最も多くのベクターゲノムは、強力で速効性のA A V 8 (7 3 3) ベクターを注射したG C 1 K Oマウスから回収された。

40

【図18A】図18Aおよび図18Bは、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 を用いる注射後2か月目のG C d k oマウスからのO C Tおよび杆体／錐体E R Gのデータを示す。

【図18B】図18Aおよび図18Bは、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 を用いる注射後2か月目のG C d k oマウスからのO C Tおよび杆体／錐体E R Gのデータを示す。

【図19A】図19Aおよび図19Bは、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 を用いる注射後1か月目のG C d k oマウスからの代表的な杆体および錐体E R Gのデ

50

ータを示す。

【図19B】図19Aおよび図19Bは、AAV8 (Y733F) - hGRK1 - mGC1を用いる注射後1か月目のGCdkoマウスからの代表的な杆体および錐体ERGのデータを示す。

【図20】図20Aおよび図20Bは、リアルタイムRT-PCR基準を示す。蛍光 (Y軸のlog単位) を、サイクル閾値C_t値 (X軸) に対してプロットする。パネルはそれぞれ、野生型、GC1+/+マウス (a)、またはAAV8 (Y733F) - hGRK1 - mGC1を用いて処置したGC1KOマウスからの網膜cDNAを使用する、GC1およびGapdh転写物についての標準曲線 (全網膜cDNAの希釈系列によって生成) を示す。各々の鋳型を使用するGC1およびGapdhのプライマーセットによって生成された標準曲線は、類似しており、同様の増幅反応速度を示した。C_tサイクル値は、鋳型の量の減少と共に増加する。

【図21】図21Aおよび図21Bは、処置および無処置GC1KOマウスおよびGC1+/+対照の網膜におけるGC1および錐体アレスチン発現を示す。図21A：凍結網膜横断切片の免疫組織化学的検査は、AAV8 (Y733F) - hGRK1 - mGC1 (注射後7か月目)、AAV5 - smCBA - mGC1 (注射後10か月目)、またはAAV5 - hGRK1 - mGC1 (注射後10か月目) ベクターを用いて処置したGC1KOマウスならびに8月齢無処置GC1KOおよびGC1+/+対照マウスからの網膜におけるGC1 (緑色、上位の列) および錐体アレスチン (赤色、最下位の列) の発現の場所を突き止めるために使用した。核は、DAPI (青色) を用いて染色した。切片はすべて、20×倍率で画像処理し、同一の設定に暴露した。図21B：錐体アレスチンに対する抗体を用いる、AAV5 - smCBA - mGC1 (一方の眼のみ) を用いる処置後11か月目のあるGC1KOマウスからの網膜ホールマウントの免疫染色は、無処置の反対側の対照眼 (最下位、左) と比較して、処置眼 (最下位の右) において錐体光受容体の著しい保持を示した。網膜ホールマウントは、それらの側頭の部分を12時の位置とし、同様に方向づけた。ホールマウントの一部を10×倍率で画像処理し、最終的な表示のためにともにマージした。OS = 外節; ONL = 外顆粒層; INL = 内顆粒層。

【図22】図22Aおよび図22Bは、処置および無処置GC1KOならびに無処置GC1+/+対照眼の錐体媒介性の網膜電位図 (ERG) を示す。図22A：AAV5 - hGRK1 - mGC1 (赤色の線)、AAV5 - smCBA - mGC1 (緑色の線)、もしくはAAV8 (Y733F) - hGRK1 - mGC1 (黒色の線) を用いて処置したGC1KO眼または無処置の年齢が一致するGC1+/+対照眼からの12cd/m²の光刺激によって誘発された代表的な錐体媒介性の結果。処置後4か月～1年の間に生成された代表的な結果を示す (上位のパネル)。スケール: y軸 = 50 μV、x軸 = 20 ms。図22B：最大錐体b波振幅 (12cd/m²で生成されたもの) をそれぞれのマウスから計算し、それぞれの処置群ならびに年齢が一致する無処置GC1KOおよびGC1+/+対照において毎月平均した。比較は、n > 3を有する動物の群の間で行った。AAV処置群はすべて、処置後6か月目のものについて統計的に比較した。AAV5ベクターで処置した眼は、処置後9か月目のものについて統計的に比較した。

【図23】図23Aおよび図23Bは、処置および無処置GC1KOおよびGC1+/+対照眼の杆体媒介性の網膜電位図 (ERG) を示す。図23A：暗所視条件下で1cd/m²の刺激によって誘発された杆体b波振幅 (左上) およびa波振幅 (右上) は、AAV8 (Y733F) - hGRK1 - mGC1 (黒色の丸)、AAV5 - hGRK1 - mGC1 (赤色の丸)、またはAAV5 - smCBA - mGC1 (緑色の三角形) ベクターを用いて処置したGC1KOマウスの処置および無処置眼において決定した。処置および無処置眼のマウス内の比率は、処置眼における最大aまたはb波振幅を無処置眼における最大振幅によって割ることによって生成した。これらの比率は、すべての処置群において毎月平均した。比較は、n > 3を有する動物の群の間で行った。AAV処置群はすべて、6か月間、統計的に比較した。AAV5ベクターもまた、9か月間、統計的に比較した。ベクター媒介性の改善は、平均比率 > 0.8によって定義した。図23B：あるGC1KOマ

10

20

30

40

50

ウスからの代表的な杆体媒介性のERG結果は、AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1処置眼(黒色の線)からの杆体の応答が、無処置の反対側の対照眼(緑色の線)から記録されたものよりも高かったことを示す。この処置した杆体の応答は、正常なGC1+/+杆体応答(赤色の線)の約50%まで修復された。

【図24】図24Aおよび図24Bは、処置および無処置GC1KOマウスならびにGC1+/+対照におけるタンパク質および転写物のレベルを示す。図24A:抗GC1および抗GCAP1抗体を用いてプローブした、AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1を用いる処置後10か月目のあるGC1KOマウス眼からの網膜溶解物のイムノブロット。抗β-アクチン抗体は、内部ローディング対照として使用した。図24B:AAV5-smCBA-mGC1を用いて処置したあるGC1KO網膜、AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1ベクターを用いて処置したあるGC1KO網膜における、および個々の無処置GC1KOまたはGC1+/+対照網膜における、いくつかの転写物(GC1、GCAP1、GNAT2、およびPDE6α)の半定量的リアルタイムRT-PCR。試料は、標準物質としてGapdh特異的プライマーを使用して、三通り実行した。データは、GC1+/+対照と比べたmRNAレベルにおける倍数変化として示す。

【発明を実施するための形態】

【0055】

本発明の例証となる実施形態は、下記に記載される。明瞭にするために、実際の実施についてのすべての特徴が本明細書において記載されるわけではない。任意のそのような実際の実施形態の開発において、実施によって相互に変化するであろうシステム関連およびビジネス関連の制約とのコンプライアンスなどのような、開発者特有の目標を達成するための多数の実施に特有の決定を下さなければならないことがもちろん十分に理解されるであろう。さらに、そのような開発努力は、複雑であり、多くの時間を要し得るが、それにもかかわらず、本開示の利益を有する当業者らにとってルーチン的な仕事になるであろうということが十分に理解されるであろう。

【0056】

アデノ随伴ウイルス

アデノ随伴ウイルス-2(AAV)は、溶菌ウイルスおよびプロウイルスの両方として増やすことができるヒトパルボウイルスである(Cukorら、1984年;Hogganら、1972年)。ウイルスゲノムは、145塩基の末端逆位配列が側面に位置する(Lusbyら、1982年)、4679塩基長の(Srivastavaら、1983年)直線状一本鎖DNA(Roseら、1969年)からなる。溶菌成長のために、AAVは、ヘルパーウイルスとの同時感染を必要とする。アデノウイルス(Atchinsonら、1965年;Hoggan、1965年;Parksら、1967年)または単純ヘルペス(Bullerら、1981年)は、ヘルパー機能を提供することができる。ヘルパーなしで、AAV特異的な複製または遺伝子発現の証拠はない(RoseおよびKoczot、1972年;Carterら、1983年)。ヘルパーが利用可能でない場合、AAVは、統合プロウイルスとして存続することができる(Hoggan、1965年;Bernsら、1975年;Handaら、1977年;Cheungら、1980年;Bernsら、1982年)。

【0057】

統合は、明らかに、AAV末端および宿主配列の間の組換えを伴い、ほとんどのAAV配列は、プロウイルスにおいて損なわれないままである。AAVが宿主DNAの中に統合する能力は、明らかに、ヘルパーウイルスの非存在下においてAAV配列の生存を確実にするための固有の戦略である。AAVプロウイルスを保持する細胞が、続いて、ヘルパーに重感染すると、統合AAVゲノムは奪回され、増殖性の溶菌サイクルが起こる(Hoggan、1965年)。

【0058】

原核生物プラスミドの中にクローニングされたAAV配列は、感染性である(Samulskiら、1982年)。たとえば、野生型AAV/pBR322プラスミド、pSM

10

20

30

40

50

620がアデノウイルスの存在下においてヒト細胞の中にトランスフェクトされる場合、AAV配列は、プラスミドから奪回され、正常なAAV溶菌サイクルが続いて起こる（Samulskiら、1982年）。これは、組換えプラスミド中のAAV配列を修飾し、次いで、ヒト細胞の中にこのプラスミドをトランスフェクトすることによって変異体のウイルス株を成長させることを可能にする（Samulskiら、1983年；Hermonatら、1984年）。AAVは、表現型が別個の少なくとも3つの領域を含有する（Hermonatら、1984年）。rep領域は、DNA複製および組換えプラスミドからの奪回のために必要とされる、1つまたは複数のタンパク質をコードするが、capおよびlip領域は、AAVカプシドタンパク質をコードするように思われ、これらの領域内の変異体は、DNA複製が可能である（Hermonatら、1984年）。AAV末端がDNA複製に必要とされることが示されてきた（Samulskiら、1983年）。

10

【0059】

Laughlinら（1983年）は、それぞれがAAVの全DNAゲノムを含有する2つのE. coliハイブリッドプラスミドの構築ならびにAAVゲノムの奪回および複製に成功する、ヘルパーアデノウイルスの存在下におけるヒト細胞系の中への組換えDNAのトランスフェクションについて記載している（Tratschinら、1984年a；1984年bもまた、参照されたい）。

【0060】

それがいかなる病原性の応答をも誘発せず、宿主細胞染色体の中に統合することができるので、アデノ随伴ウイルス（AAV）は、遺伝子移入にとって特に魅力的である（Kotinら、1990年）。AAV末端リピート（TR）は、染色体統合のための最適な本質的なシス構成要素である（MuzyczkaおよびMcLaughlin、1988年）。これらのTRは、プロモーター活性を有することが報告されている（Flotteら、1993年）。それらは、細胞質から核への効率的な遺伝子移入を促進し得るまたはプラスミドDNAの安定性を増加させ、かつより長く続く遺伝子発現を可能にし得る（BartlettおよびSamulski、1998年）。AAV TRを含有する組換えプラスミドDNAを使用する研究は、相当な関心を引きつけてきた。AAVベースのプラスミドは、ほとんどの細胞型においてAAVのTRを欠く同一のプラスミドよりも高度でより長い導入遺伝子発現を駆動することが示されてきた（Phillipら、1994年；Shaftronら、1998年；Wangら、1998年）。

20

30

【0061】

発現ベクターとしてrAAVを使用する可能性を研究するように研究者に促したいくつかの要因がある。1つは、宿主染色体の中に統合するために遺伝子を送達するための必要条件が、驚くほどわずかであるということである。145-bp ITRを有することが必要であり、これらはAAVゲノムのわずか6%である。これは、4.5 kbのDNA挿入を構築するための、ベクターにおける余地を残す。この運搬能力はAAVが大きな遺伝子を送達するのを妨げるかもしれないが、それは、本発明のアンチセンス構築物の送達に十分に適している。

【0062】

AAVはまた、その安全性により送達ビヒクルについて好適な選択肢となる。比較的複雑な奪回メカニズムがある：野生型アデノウイルスだけでなくAAV遺伝子もまた、rAAVを用意するのに必要とされる。さらに、AAVは病原性でなく、いかなる疾患にも関連しない。ウイルスコード配列の除去は、ウイルス遺伝子発現に対する免疫反応を最小限にし、そのため、rAAVは、炎症反応を引き起こさない。AAVは、そのため、本発明のグアニル酸シクラーゼコードポリヌクレオチドの送達のための理想的な候補に相当する。

40

【0063】

rAAVベクターの産生

rAAVベクターを産生するための従来のプロトコールは、一般に、3つの構成要素の

50

系に基づいてきた。この系の1つの構成要素は、rAAVとしてパッケージされることとなる組換えDNAをコードするプロウイルスプラスミドである。この組換えDNAは、ベクターの複製およびパッケージングを指示する最小のシス作用性AAV-2配列である145塩基対(bp)AAV-2末端逆位配列(ITR)の間に位置する。系の第2の構成要素は、AAV-2遺伝子、rep、およびcapをコードするプラスミドである。AAV-2 rep遺伝子は、rAAVゲノムを複製し、複製中間体を分離し、次いで、一本鎖rAAVゲノムをパッケージするようにトランスで作用する4つのRepタンパク質(Rep 78、68、52、および40)をコードする。AAV-2 cap遺伝子は、ウイルスカプシドを含む3つの構造タンパク質(VP1、VP2、およびVP3)をコードする。AAV-2が単独でうまく複製しないので、rAAVパッケージング系の第3の構成要素は、他のDNAウイルスからのヘルパー機能のセットとなる。これらのヘルパー機能は、rAAV複製およびパッケージングが効率的に起こることができる細胞環境を築く。アデノウイルス(Ad)によって提供されるヘルパー機能は、rAAVを産生するためにほとんど独占的に使用されてきており、遺伝子E1a、E1b、E2a、E4orf6、およびVA RNAによってコードされる。複製およびパッケージングがトランスフェクションによって起こる細胞の中に系の最初の2つの構成要素が一般に導入されるが、adヘルパー機能は、野生型Adウイルスによる重感染によって導入される。

【0064】

従来のrAAV産生技術は、トランスフェクションにおける固有の非効率のために大量のベクターを産生するそれらの能力が限られている。深刻な問題点はまた、トランスフェクションのスケールが増加する場合にも遭遇する。ウイルス複製のために必要とされるが、限られた量でのみ存在する細胞およびウイルス基質についてAdが競合し得るので、野生型Adにとっての必要条件はまた、産生されるrAAVの量を低下させるかもしれない。従来の産生プロトコールにおいて遭遇する他の問題は、Adによる重感染が、産生されるrAAVからのAdの精製にとって有効な手順の開発を必要とすることである。これらの精製プロセスがrAAV調製物のAdコンタミネーションの排除に一般に成功するが、それらはまた、rAAV力価を低下させもする。rAAVのAdコンタミネーションによってストリンジェントなアッセイもまた、必要である。

【0065】

rAAVを産生するために、二重同時トランスフェクション手順は、1:1のモル比で、AAV repおよびcap遺伝子ならびにrAAVの複製およびパッケージングに必要とされるAdヘルパー遺伝子を保持するpDG(Grimmら、1998年)AAVヘルパープラスミドと一緒にrAAV移行ベクタープラスミドを導入するために使用する。トランスフェクションにおいて使用されるプラスミドDNAは、従来のアルカリ性溶解/CsCl勾配プロトコールによって精製する。トランスフェクションは、以下のように実行する: 293細胞は、実験の前の日に1:2に分離し、その結果、トランスフェクトされた場合、細胞コンフルエンスは約75~80%となる。10枚の15cmプレートを1つのバッチとしてトランスフェクトする。CaPO₄沈降物を作製するために、0.7mgのpDGを、0.25MのCaCl₂の12.5mLの全容量において180μgのrAAV移行ベクタープラスミドと混合する。古い培地を細胞から除去し、CaPO₄沈降物の形成は、37℃に予熱した12.5mLの2×HBS(pH7.05)をDNA-CaCl₂溶液に追加することによって開始する。DNAは、1分間インキュベートし、次いで、200mLの予熱したDMEM-10% FBSの中への混合物の移入により、沈降物の形成を停止する。22mLの培地は、それぞれのプレートの中に直ちに分注し、細胞は、48時間、37℃でインキュベートする。細胞生存率を損なうことなく、全インキュベーション期間の間、細胞上にCaPO₄沈降物を維持させる。トランスフェクションの48時間後に、細胞は、10分間、1,140×gで遠心分離によって収集する。次いで、細胞は、ドライアイス-エタノールおよび37℃のバスにおける3回の凍結/解凍サイクルによって、15mLの0.15M MgCl₂、50mM Tris-HCl(pH8.5)中で溶解する。Benzonase(Nycomed Pharma A/

10

20

30

40

50

S、高純度)を混合物(50 U/mL最終濃度)に追加し、溶解物を37℃で30分間、インキュベートする。溶解物は、20分間、3,700×gで遠心分離によって浄化し、ウイルス含有上清は、不連続濃度勾配を使用してさらに精製する。

【0066】

典型的な不連続ステップ勾配は、OptiPrep (Nycomed)の60% (重量/容量)の無菌溶液を使用して調製したイオジキサノール、5,5″[(2-ヒドロキシ(hydroxi)-1-3-プロパンジイル)-ビス(アセチルアミノ)]ビス[N,N′-ビス(bi),(2,3ジヒドロキシプロピル-2-4,6-トリヨード-1,3-ベンゼンカルボキサミド(enzenecarboxamide)]をそれほど高密度でない細胞溶解物の下層にし(underlayer)、細胞溶解物を移動させることによって形成される。特に、15mLの浄化溶解物を、1/27×89mmスパイナル針を装備したシリンジを使用して、Quick-Seal Ultra-Clear 25×89-mm遠心分離管(Beckman)の中に移入する。チューブの続く充填および密閉に干渉するであろう気泡を回避するように注意する。変速蠕動ポンプ、Model EP-1 (Bio-Rad)は、順番に、フェノールレッド(イオジキサノール溶液1ml当たり、2.5μLの0.5%原液)を含有するPBS-MK緩衝剤中9mLの15%イオジキサノールおよび1M NaCl;PBS-MK緩衝剤中、5mLの40%イオジキサノール;最後に、フェノールレッド(0.1μL/L)を含有するPBS-MK緩衝剤中、5mLの60%イオジキサノールを下に置くために使用する。チューブは、密閉し、18℃で1時間、350,000×gでType 70 Tiローター(Beckman)において遠心分離する。透明な40%の段階の4mlは、最上部に斜面を有する18ゲージ針を装備したシリンジを用いて側面でチューブを刺した後に吸引する。イオジキサノール画分は、従来のヘパリンアガロースアフィニティークロマトグラフィーを使用して、さらに精製する。

10

20

【0067】

クロマトグラフィーのために、典型的に、あらかじめパックされた2.5mLヘパリンアガロースI型カラム(Sigma)を、重力下で、20mLのPBS-MKを用いて平衡化する。次いで、rAAVイオジキサノール画分を、あらかじめ平衡化したカラムにかけ、カラムを10mLのPBS-MKを用いて洗浄する。rAAVは、1M NaClを含有する同じ緩衝剤を用いて溶出する。溶出緩衝剤を適用した後、溶出剤の最初の2mlは廃棄し、ウイルスは、溶出緩衝剤の続く3.5mL中に収集される。

30

【0068】

次いで、ウイルスは、メーカーの指示に従って、BIOMAX(登録商標)100 Kフィルター(Millipore, Bedford, MA, USA)を通して遠心分離によって濃縮し、脱塩する。高塩緩衝剤は、繰り返し、乳酸加リンガー溶液を用いて濃縮ウイルスを希釈し、ゲノム含有粒子および感染性rAAV粒子の両方の力価を再び求めることによって変化させる。従来のドットプロットアッセイ、定量的競合的PCR(QC-PCR)アッセイ、またはより最近では定量的リアルタイムPCR(aRT-PCR)が、物理的粒子力価を決定するために使用される(Zolotukhinら、2002年; Jacobsonら、2006年)。感染性力価は、感染中心アッセイ(ICA)およびGFPの発現をスコア化する蛍光細胞アッセイ(FCA)によって決定される(Zolotukhinら、2002年)。

40

【0069】

QC-PCR方法は、反応チューブにおける既知濃度の内部標準プラスミドとの特異的な標的配列の競合的同時増幅に基づく。それは、ウイルス粒子の正確で急速な定量化をもたらす。内部標準は、特異的な鋳型と共にプライマー認識部位を有していなければならない。特異的な鋳型および内部標準の両方は、同じ効率でPCR増幅されなければならない。PCR増幅産物を別々に分析することが可能でなければならない。鋳型および内部標準を区別するための最も容易な方法は、2つの産物においてサイズ差異を組み込むことである。これは、たとえば、特異的な標的と同じ配列を有するが、欠失を含有する標準物質を構

50

築することによって達成することができる。次いで、定量化は、特異的な鋳型のPCRシグナルを、既知濃度の競争者（内部標準）により得られたPCRシグナルと比較することによって実行される。定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）は、公知のDNA標準物質に対するリアルタイムにおけるPCR産物形成の比較によって未知の試料のDNA濃度を評価するための標準的な方法である。

【0070】

精製ウイルス株は、あらゆるコンタミネーションしている、パッケージにされていないDNAを消化するためにDNase Iを用いて最初に処理する。10 μ Lの精製ウイルス株は、37℃で、1時間、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl₂を含有する100 μ L反応混合物において、10UのDNase I (Boehringer, Ingelheim am Rhein, Germany) と共にインキュベートする。反応の終わりに、10 μ Lの10×プロテイナーゼK緩衝剤(10mM Tris-HCl [pH 8.0]、10mM EDTA、1% SDS最終濃度)を追加し、その後続けて1 μ LのプロテイナーゼK (18.6 mg/mL, Boehringer)を追加した。混合物は、1時間、37℃でインキュベートした。ウイルスDNAは、フェノール/クロロホルム抽出(2回)によって精製し、その後、キャリアとして10 μ gのグリコーゲンを使用するクロロホルム抽出およびエタノール沈殿を続けた。DNAペレットは、100 μ Lの水中に溶解した。QC PCR反応混合物はそれぞれ、1 μ Lの希釈ウイルスDNAおよびpdl-GFPなどのような内部標準プラスミドDNAの2倍段階希釈溶液を含有した。標準DNAの最も信頼できる範囲は、1~100 pgであることが分かった。次いで、2つのPCR産物が分離するまで、それぞれの反応の一定分量を2%アガロースゲル電気泳動によって分析した。臭化エチジウム染色ゲルのアナログ画像は、ImageStore 7500システム(UVP; Upland, CA, USA)を使用してデジタル化した。それぞれのレーンにおける標的および競争者のバンドの密度は、ZERO-Dscan Image Analysis Systemバージョン1.0 (Scanalytics, Rockville, MD, USA)を使用して測定し、それらの比率は、標準DNA濃度の関数としてプロットする。ウイルスDNA分子の数が競争者DNA分子の数に等しい1.0の比率は、ウイルス株のDNA濃度を決定するために使用した。

【0071】

先に公開されたプロトコル(McLaughlinら、1988年)の改良版は、ウイルスがC12細胞に感染し、脱殻し(unpackaging)、かつ複製する能力を測定するために使用した。手短かに言えば、統合wtAAV repおよびcap遺伝子(Clarkら、1995年)を含有するC2細胞は、約75%のコンフルエンスで96ウェル皿において平板培養し、次いで、20のM.O.IでAd5を感染させた。段階希釈rAAV-sCNTFのうちの1 μ Lを蛍光顕微鏡を使用して、視覚によってスコア化した。高感度CHROMAフィルター#41012 HighQ FITC LP (Chroma Technology, Bellows Fall, VA, USA)を、蛍光をモニターするために使用した。ハイブリダイゼーションによって力価を計算するために、本質的に先に記載されるように(McLaughlinら、1988年)、細胞を収集し、処理した。

【0072】

医薬組成物

ある実施形態では、本発明は、単独でまたは療法の1つまたは複数の他の様式と組み合わせて細胞または動物に投与するための、薬学的に許容される溶液における、本明細書において開示される1つまたは複数のrAAV-グアニル酸シクラーゼ組成物の処方物に関する。

【0073】

所望される場合、本明細書において開示される処置用遺伝子産物を発現する核酸セグメント、RNA、DNA、またはPNA組成物は、グアニル酸シクラーゼポリペプチドの1

つまたは複数の全身性または局所的な投与を含めて、たとえばタンパク質またはポリペプチドまたは様々な薬学的に活性な作用物質などのような他の作用物質と組み合わせて同様に投与されてもよいこともまた、理解されるであろう。実際、さらなる作用物質が標的細胞または宿主組織との接触に際して有意な副作用を引き起こさないとすれば、含まれていてもよい他の構成要素は事実上、限定されない。rAAVベクターグアニル酸シクラーゼ組成物は、したがって、特定の事例において必要とされる様々な他の作用物質と共に送達されてもよい。そのような組成物は、宿主細胞もしくは他の生物学的供給源から精製されてもよいまたはその代わりに、本明細書において記載されるように化学的に合成されてもよい。同様に、そのような組成物は、置換または誘導体化RNA、DNA、またはPNA組成物をさらに含んでいてもよい。

10

【0074】

たとえば、たとえば眼、網膜、および網膜下注射などを含む、動物内の1つまたは複数の細胞または組織のタイプへの経口、非経口、静脈内、鼻腔内、筋肉内、および直接的な投与を含む、様々な処置レジメンにおいて本明細書において記載される特定の組成物を使用するのに適した投薬および処置レジメンの開発のように、薬学的に許容される賦形剤およびキャリア溶液の処方物は、当業者らに周知である。

【0075】

典型的に、活性成分（複数可）のパーセンテージはもちろん変化してもよいが、これらの処方物は、活性化合物の少なくとも約0.1%以上を含有してもよく、好都合に、処方物の全体の重量または容量の約1または2%～約60%または70%以上であってもよい。天然に、それぞれの処置的に有用な組成物における活性化合物（複数可）の量は、適した投薬量が化合物の所与のユニット用量において得られるように、調製されてもよい。溶解性、生物学的利用率、生物学的半減期、投与のルート、産物有効期間などのような要因ならびに他の薬理学的考慮は、そのような医薬処方物を調製する当業者によって企図されるであろう、また、そのため、様々な投薬量および処置レジメンは望ましくてもよい。

20

【0076】

ある状況では、記載されるように、非経口的に、静脈内に、筋肉内に、またはさらに腹腔内に本明細書において開示される医薬組成物を送達することは望ましいであろう（たとえば、それぞれ、それに対する明白な参照によってその全体が本明細書において明確に組み込まれる米国特許第5,543,158号；米国特許第5,641,515号、および米国特許第5,399,363号を参照されたい）。フリーベース（free base）または薬理学的に許容される塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどのような界面活性剤と適宜混合された水において調製されてもよい。分散液もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物においてならびに油において調製されてもよい。保存および使用の通常の状態下で、これらの調製物は、微生物の増殖を予防するために保存剤を含有する。

30

【0077】

注射用の使用のために適した医薬形態は、無菌注射用溶液または分散液の即席の調製のための無菌水溶液または分散液および無菌粉末を含む（たとえば、それに対する明白な参照によってその全体が本明細書において明確に組み込まれる米国特許第5,466,468号を参照されたい）。すべての場合において、形態は無菌でなければならず、容易な注射可能性（syringability）が存在する程度まで流動性でなければならない。それは、製造および保存の状態下で安定していなければならず、細菌および菌類などのような微生物のコンタミネーション作用に対して保存されなければならない。たとえば、キャリアは、水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール、およびその他同種のもの）、その適した混合物、ならびに／または植物油を含有する溶媒または分散媒とすることができる。適切な流動度は、たとえば、レシチンなどのようなコーティングの使用によって、分散液の場合には必要とされる粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持されてもよい。微生物の作用の予防は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、たとえばパラベン、クロロブタノール、

40

50

フェノール、ソルビン酸、チメロサル、およびその他同種のものによってもたすことができる。多くの場合では、等張剤、たとえば糖、塩化ナトリウムを含むことは好ましいであろう。注射用組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる作用物質の組成物、たとえばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンにおける使用によってもたすことができる。

【0078】

水溶液における非経口投与については、たとえば、溶液は、必要ならば、適宜緩衝されるべきであり、液体希釈剤は、最初に、十分な食塩水またはグルコースと等張にされるべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与にとりわけ適している。これに関連して、利用することができる無菌水性溶媒は、本発明の開示に照らして当業者らに公知であろう。たとえば、ある投薬量は、1mlの等張性のNaCl溶液中に溶解され、1000mlの皮下注入液に追加されてもよいまたは注入の提唱される部位に注射されてもよい（たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences 第15版、1035～1038頁および1570～1580頁を参照されたい）。投薬量におけるいくつかの変動は、処置されている対象の状態に依存して必ず起こるのである。投与の担当者は、少なくとも、個々の対象に適切な用量を決定するのである。さらに、ヒト投与のために、調製物は、United States Food and Drug Administration's (FDA) Office of Biologics Standardsによって必要とされる無菌性、発熱性、ならびに一般的な安全性および純度基準を満たさなければならない。

【0079】

無菌注射用溶液は、必要に応じて、本明細書において列挙される様々な他の成分と共に適切な溶媒において必要とされる量で活性化化合物を組み込み、その後に無菌濾過をすることによって調製される。一般に、分散液は、基本的な分散媒および上記に列挙されるものからの必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクルの中に様々な無菌活性成分を組み込むことによって調製される。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合には、調製の好ましい方法は、そのあらかじめ無菌濾過された溶液から活性成分および任意のさらなる所望される成分の粉末を得る減圧乾燥および凍結乾燥技術である。

【0080】

本明細書において開示される組成物は、中性または塩形態において処方されてもよい。薬学的に許容される塩は、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基により形成される）を含み、これらは、たとえば塩酸もしくはリン酸などのような無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸、およびその他同種のものなどの有機酸により形成される。遊離カルボキシル基により形成される塩はまた、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などのような無機塩基ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン、およびその他同種のものなどの有機塩基にも由来し得る。処方に基づいて、溶液は、投薬処方物と適合する様式でおよび処置的に有効である量で投与されるであろう。処方物は、注射用溶液、薬剤放出カプセル、およびその他同種のものなどのような様々な剤形において容易に投与される。

【0081】

本明細書において使用されるように、「キャリア」は、任意のおよびすべての溶媒、分散培地、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤、キャリア溶液、懸濁液、コロイド、ならびにその他同種のものを含む。医薬活性物質に対するそのような培地および作用物質の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の培地または作用物質が活性成分と不適合性である場合を除いて、処置用組成物におけるその使用は、企図される。補足活性成分もまた、組成物の中に組み込むことができる。

【0082】

語句「薬学的に許容される」は、ヒトに投与された場合に、アレルギー反応または同様の好ましくない反応をもたさない分子要素および組成物を指す。活性成分としてタンパ

ク質を含有する水性組成物の調製は、当技術分野において十分に理解されている。典型的に、そのような組成物は溶液か懸濁剤のいずれかとして注射液として調製される。注射前の、液体中の溶液または懸濁剤に適している固体形態もまた、調製することができる。調製物はまた、乳化することもできる。

【0083】

配列比較、同一性、および相同性

配列比較および相同性決定のために、典型的に、一方の配列は、試験配列を比較する参照配列として果たす。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験および参照配列がコンピューターに入力され、必要ならば、部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列と比べた、試験配列（複数可）についての配列同一性パーセントを計算するために使用することができる。

10

【0084】

比較のための配列の最適なアライメントは、たとえば、局所性相同性アルゴリズムによって（たとえばSmithおよびWaterman、1981年を参照されたい）、相同性アライメントアルゴリズムによって（たとえばNeedlemanおよびWunsch、1970年を参照されたい）、類似性検索比較法によって（たとえばPearsonおよびLipman、1988年を参照されたい）、Wisconsin Genetic Software Package、Genetics Computer Group、Madison、WI、USAにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTAなどのようなアルゴリズムのコンピューターインプリメンテーションによって、または目視検査によって、行うことができる。配列同一性および配列類似性のパーセントを決定するのに適したアルゴリズムの1つの例は、BLASTアルゴリズム（Altschulら、1990年）およびBLOSUM62スコアリングマトリックスである（たとえばHenikoffおよびHenikoff、1989年を参照されたい）。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通して公的に入手可能である（www.ncbi.nlm.nih.gov/）。

20

【0085】

配列同一性パーセントの計算に加えて、BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列の間の類似性の統計分析をも実行する（たとえばKarlinおよびAltschul、1993年を参照されたい）。有用な配列アライメントアルゴリズムの他の例は、プログレッシブペアワイズアライメントを使用して関連する配列の群から多数の配列アライメントを生成するPILEUPプログラムである。それはまた、アライメントを生成するために使用されるクラスタリング関係を示すツリーをプロットすることができる。PILEUPは、プログレッシブアライメント比較法を単純化したものを使用し（たとえばFengおよびDoolittle、1987年を参照されたい）、HigginsおよびSharp（1989年）によって記載されるものに類似する一般的なアライメントマトリックスを用いる。

30

【0086】

処置用のキットおよび診断キット

本発明はまた、本明細書において記載されるように、特定のrAAV-グアニル酸シクラーゼ処方物の処方においてならびにLCA1のような網膜ジストロフィーなどのような、1つまたは複数のグアニル酸シクラーゼ欠損状態のための、哺乳動物および特にヒトへの投与のための処置剤の調製物において用いられてもよい1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤、キャリア、希釈剤、アジュバント、および／または他の構成要素と一緒に1つまたは複数の組成物を包含する。特に、そのようなキットは、哺乳動物におけるそのような障害の処置においてウイルスベクターを使用するための説明書と組み合わせて1つまたは複数のrAAVベクター-グアニル酸シクラーゼ組成物を含んでもよく、典型的に好都合な商業包装のために用意される容器をさらに含んでもよい。

40

50

【0087】

そのため、本明細書において開示される医薬組成物の投与のための好ましい動物は、哺乳動物、特にヒトを含む。他の好ましい動物は、非ヒト霊長類、マウス、エピン、ウシ、ヒツジ、ウマ、ヤギ（*hircine*）、オオカミ、ウサギ（*leporine*）、キツネ（*vulpine*）、ブタ、イヌ、ネコ、およびその他同種のものを含む。組成物は、単独でまたは1つまたは複数のさらなる活性成分と組み合わせて、部分的にまたは著しく精製されたrAAV-グアニル酸シクラーゼ組成物を含んでいてもよく、さらなる活性成分は、天然もしくは組換え供給源から得られてもよいまたは天然に入手可能であってもよいもしくは化学的に合成されてもよいまたはその代わりに、そのようなさらなる活性成分をコードするDNAセグメントを発現する組換え宿主細胞から*in vitro*において

10

【0088】

本明細書において開示される少なくとも1つの組成物および処置剤として組成物を使用するための説明書を含む処置用のキットもまた、調製されてもよい。そのようなキットのための容器手段は、典型的に、開示されるrAAV組成物（複数可）が配置され、好ましくは、適宜、小分けされてもよい少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または他の容器手段を含んでいてもよい。第2のグアニル酸シクラーゼ組成物もまた、提供される場合、キットはまた、この第2の組成物が配置されてもよい第2の別個の容器手段を含有してもよい。その代わりに、複数のグアニル酸シクラーゼ組成物は、単一の医薬組成物において調製されてもよく、バイアル、フラスコ、シリンジ、ボトル、または他の適した単一の容器手段などのような単一の容器手段においてパッケージされてもよい。本発明のキットはまた、典型的に、たとえば、所望のバイアル（複数可）が保持される射出成形またはブロー成形プラスチック容器などのような、商品の販売のための

20

【0089】

動物細胞における発現

発明者らは、本発明の処置用グアニル酸シクラーゼポリペプチドをコードする連続した核酸配列を含むポリヌクレオチドが、形質転換宿主細胞における1つまたは複数の細胞の欠陥を処置するために利用されてもよいことを企図する。そのような細胞は、好ましくは、ヒトもしくは非ヒト霊長類からまたは限定を伴うことなく、マウス、イヌ、ウシ、ウマ、エピン、ネコ、ヒツジ、ヤギ、オオカミ、ウサギ、ブタ、およびその他同種のものを含む1つもしくは複数の哺乳動物種から得られるものなどのような哺乳動物細胞を含む動物細胞である。そのような障害に罹患していることが疑われているまたはそのような状態を発症する危険性があるヒト対象におけるLCA1などのような網膜ジストロフィーのまたは関連する網膜または眼疾患、障害、状態、もしくは機能不全の1つまたは複数の症状の処置および／または改善のためのそのような構築物の使用は、特に、本発明者らによって企図される。

30

【0090】

細胞は、対象の1つまたは複数の処置用グアニル酸シクラーゼ遺伝子を含む1つまたは複数のrAAVベクターを用いて形質転換されてもよく、動物の宿主細胞の中に導入され、発現される遺伝子構築物は、*ex vivo*、*in vitro*、*ex situ*、*in situ*、および／または*in vivo*において有害なもしくは疾患状態（複数可）またはその1つもしくは複数の症状を改変する、低下させる、改善させる、または予防するのに十分である。

40

【0091】

グアニル酸シクラーゼ

グアニル酸シクラーゼ（GC）（EC 4.6.1.2）は、3', 5'環状グアノシンーリン酸（cGMP）およびピロリン酸へのグアノシン三リン酸（GTP）の変換を触媒するリアーゼである。その代わりに、文献において「グアニルシクラーゼ」または「グアニリルシクラーゼ」と呼ばれるように、GCの膜結合（1型）および可溶性（2型）形

50

態の両方が存在する。

【0092】

レーバー先天黒内障

レーバー先天黒内障（LCA）は、すべての遺伝性網膜ジストロフィーのうちで最も初期の最も多い重症の形態に相当する疾患の常染色体劣性群である。この遺伝的にかつ臨床的に異質性の疾患の発病において関係し、そのため、LCA 1 座に割り当てられた最初の遺伝子は、網膜特異的グアニル酸シクラーゼ-1（Gucy 2d）であった（Perraultら、1996年）。Gucy 2dは、光受容体外節膜において主に発現され、これらの細胞内のcGMPおよびCa²⁺のレベルの調節において役割を果たす網膜特異的タンパク質グアニル酸シクラーゼ（retGC1）をコードする。光刺激に続いて、光受容体外節内のcGMPのレベルは、cGMPホスホジエステラーゼ（PDE）による加水分解によって急速に下がる。cGMPのこの低下は、cGMP感受性チャネルの閉鎖、Ca²⁺流入の低下、および細胞の過分極に至る。細胞内Ca²⁺におけるこの減少は、GCの活性を調節するカルシウム結合タンパク質のファミリーであるグアニル酸シクラーゼ活性化タンパク質（GCAP）とのその相互作用を介して、光に刺激された光受容体の暗状態への回復を刺激する。暗順応光受容体では、Ca²⁺結合GCAPは、GCの活性を阻害する。しかしながら、光刺激に際して、Ca²⁺なしのGCAPは、cGMPレベルの増加、cGMP感受性チャネルの再開、および脱分極状態への細胞の復帰をもたらすGCの活性を刺激する。LCA 1における症例のように、GCが細胞内cGMPを補充し、cGMP感受性カチオンチャネルを再び開く能力を低下させるまたは消滅させる変異は、杆体および錐体光受容体において慢性の光暴露と生化学的に等価な状態を引き起こすと考えられる。

10

20

【0093】

Gucy 2dにおける変異は、LCAのすべての症例の約15%を占め、それをこの疾患の主要原因にしている。LCA 1によって冒された患者の数は、AAV媒介性の遺伝子療法治験の成功が最近、世界的な注目を集めた形態である、その疾患の周知のRPE65バージョン（LCA 2）によって冒された患者のおよそ2倍である。LCA 1の診断は、典型的に、全盲または著しく損なわれた視力、網膜電位図（ERG）の消滅、および振子様眼振を有する幼児において出生後最初の数か月以内に成される（Perraultら、1999年；ChungおよびTraboulsi、2009年）。これらの機能的な欠乏にもかかわらず、LCA 1患者は、正常な眼底を示し（Perraultら、1999年）、黄斑および周辺部網膜の両方においていくつかの杆体および錐体光受容体を何年間も保持する（Milamら、2003年；Simonelliら、2007年；Pasadhikaら、2009年）。中央の黄斑および中心窩周囲エリアをスキャンするためにスペクトルドメイン光干渉断層撮影（SDOCT）を使用して、最近の研究は、LCA 1患者（年齢範囲、20～53歳）が、目に見える光受容体内／外節接合部と共に6つの網膜層をすべて保持することを明らかにした。LCA 1における網膜構造の維持は、年齢と共に一般に悪化する網膜菲薄化を示す著しい疾患の他の形態と異なる（Pasadhikaら、2009年）。網膜構造の保持がLCA 1患者におけるよりよい視覚と相応しないが、彼らが、将来の処置戦略により適していることを示唆する。

30

40

【0094】

動物モデル

retGC1遺伝子中にヌル変異を保持する2つの動物モデル、天然に存在するGUCY1*Bニワトリおよびグアニル酸シクラーゼ-1（GC1）ノックアウトマウスは、遺伝子置換療法を評価するために使用されてきた（たとえばWilliamsら、2006年；Haireraら、2006年を参照されたい）。GUCY1*Bニワトリは、孵化時に盲目であり、暗所視（杆体媒介性）および明所視（錐体媒介性）ERGの消滅ならびに網膜変性を示す（たとえばUlshafferら、1984年；Huangら、1998年；Semple-Rowlandら、1998年を参照されたい）。GUCY1*B網膜へのGucy 2dのレンチウイルス媒介性の移行は、行動的な試験およびERGによって証

50

明されるようにこれらの動物の視力を修復した（たとえばWilliamsら、2006年を参照されたい）。短期処置の成功にもかかわらず、この療法は、長期における網膜構造または機能の保持に至らなかった。卵内に送達された、統合ウイルスベクターにより非哺乳動物種において得られたこの結果の一時的な性質は、臨床適用の発展に向けたより適切でトランスレーショナルな研究の必要性を示唆した。

【0095】

LCA1の哺乳動物モデル、GC1KOマウスは、錐体光受容体変性を示す（たとえばYangら、1999年；Colemanら、2004年を参照されたい）。LCA1患者のように、このマウスモデルにおける錐体機能の損失は、錐体変性に先行する（Yangら、1999年）。さらに、錐体アレスチンの光誘発性の移動は、破壊されている。このモデルにおける杆体光受容体は、変性せず、光に対する電氣的な応答を生成し続け（Yangら、1999年）、これは、おそらく、これらの細胞における、GC1の密接な類縁体であるGC2の存在による結果である（たとえばLoweら、1995年；Yangら、1995年；YangおよびGarbers、1997年；Karanら、2010年を参照されたい）。出生後のGC1KO網膜へのGucy2dのAAV媒介性の移行は、形質導入された細胞において錐体アレスチンの光駆動性の移動を修復したが、錐体ERG応答を修復せず、錐体変性を予防しなかった（Hairera、2006年）。同じ研究者によって行われた、ニワトリおよびマウスの両方の研究において、処置用cDNAは、GC1の機能性を評価する生化学的アッセイにおいて歴史的に使用されるタンパク質種であるウシ起源のものであった（Otto-Brucaら、1997年；Williamsら、2006年）。

【0096】

例示的な定義

その他に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する当技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において記載されるものに類似するまたはそれと等価であるいかなる方法および組成物も、本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および組成物が、本明細書において記載される。本発明の目的のために、以下の用語が下記に定義される。

【0097】

長年の特許法条約に従って、請求項を含む本出願において使用される場合の用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、「1つまたは複数の」を意味する。

【0098】

本明細書において使用されるように、用語「約」は、一連の数字における両方の数について言及するように一般に理解されたい。たとえば、「約1~10」は、「約1~約10」と理解されたい。さらに、本明細書における数の範囲はすべて、範囲内のそれぞれの全整数およびそれぞれの10分の1を含むことが理解されたい。本明細書において使用される用語「約」は、「およそ」を意味するように一般に理解されたい、また、典型的に、一連の数字の範囲内に列挙された所与の数とおよそ等しい数を指す。さらに、本明細書における数の範囲はすべて、範囲内のそれぞれの全整数を含むことが理解されたい。

【0099】

本発明に従って、ポリヌクレオチド、核酸セグメント、核酸配列、およびその他同種のものは、天然の供給源から得られた、化学的に合成された、修飾された、または他の場合には、人の手によって全体的にもしくは部分的に調製されたもしくは合成されたDNA（ゲノムまたはゲノム外(extragenomic)DNAを含むが、これらに限定されない）、遺伝子、ペプチド核酸(PNA)、RNA(rRNA、mRNA、およびtRNAを含むが、これらに限定されない)、ヌクレオシド、ならびに適した核酸セグメントを含むが、これらに限定されない。

【0100】

本明細書において使用されるように、用語「核酸」は、1つまたは複数のタイプのポリ

デオキシリボヌクレオチド（２-デオキシ-D-リボースを含有する）、ポリリボヌクレオチド（D-リボースを含有する）、およびプリンもしくはピリミジン塩基または修飾プリンもしくはピリミジン塩基のN-グリコシドである任意の他のタイプのポリヌクレオチド（脱塩基部位を含む）を含む。本明細書において使用される用語「核酸」はまた、サブユニットの間のホスホジエステル連結によってであるが、いくつかの場合にはホスホロチオエート、メチルホスホネート、およびその他同種のものによって共有結合されるリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのポリマーを典型的に含む。「核酸」は、一本鎖および二本鎖DNAならびに一本鎖および二本鎖RNAを含む。例示的な核酸は、限定を伴うことなく、gDNA；hnRNA；mRNA；rRNA、tRNA、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、核小体RNA（snORNA）、核内低分子RNA（snRNA）、および小分子RNA（stRNA）、ならびにその他同種のもの、ならびにその任意の組み合わせを含む。

10

【0101】

本明細書において使用されるように、用語「DNAセグメント」は、特定の種的全ゲノムDNAから単離されたDNA分子を指す。そのため、本明細書において開示される組成物の1つを使用して、生物学的試料から得られるDNAセグメントは、それらが得られる特定の種的全ゲノムDNAから単離されたまたは精製された1つまたは複数のDNAセグメントを指す。DNAセグメントおよびそのようなセグメントのより小さな断片ならびにたとえば、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス、およびその他同種のものを含む組換えベクターは、用語「DNAセグメント」内に含まれる。

20

【0102】

同様に、用語「RNAセグメント」は、特定の種的全細胞RNAから単離されたRNA分子を指す。そのため、RNAセグメントは、他のRNAから単離されたまたは精製された1つまたは複数のRNAセグメント（天然または合成起源）を指すことができる。RNAセグメントおよびそのようなセグメントのより小さな断片は、用語「RNAセグメント」内に含まれる。

【0103】

本発明の関連において、用語「発現」は、コードペプチドまたはポリペプチドを合成するために構造遺伝子などのようなポリヌクレオチドによって行われる転写および翻訳を含む細胞内プロセスの組み合わせを含むように意図される。

30

【0104】

本明細書において使用される用語「たとえば」は、単に例として、限定を伴うことなくということを意図して使用され、本明細書において明確に列挙されるそれらのアイテムのみを表すように解釈されるべきでない。

【0105】

本明細書において使用されるように、用語「プロモーター」は、一般に、転写を調節する核酸配列の領域（複数可）を説明するように意図される。

【0106】

本明細書において使用されるように、用語「調節性エレメント」は、一般に、転写を調節する核酸配列の領域（複数可）を説明するように意図される。例示的な調節性エレメントは、エンハンサー、転写後エレメント、転写制御配列などを含むが、これらに限定されない。

40

【0107】

本明細書において使用されるように、用語「構造遺伝子」は、一般に、コードペプチド、ポリペプチド、タンパク質、リボザイム、触媒RNA分子、またはアンチセンス分子を産生するように発現される遺伝子などのようなポリヌクレオチドを説明するように意図される。

【0108】

本明細書において使用されるように、用語「形質転換」は、一般に、外因性ポリヌクレオチドが少なくとも1つの第1の染色体の中に組み込まれるまたは形質転換宿主細胞内で

50

自律複製が可能である宿主細胞またはプロトプラストの中に外因性ポリヌクレオチド配列（たとえばウイルスベクター、プラスミド、または組換えDNAもしくはRNA分子）を導入するプロセスを説明するように意図される。トランスフェクション、エレクトロポレーション、および「裸の」核酸取り込みはすべて、1つまたは複数のポリヌクレオチドを用いて宿主細胞を形質転換するために使用される技術の例を示す。

【0109】

本明細書において使用されるように、用語「形質転換細胞」は、その細胞の中への1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドの導入によってその核酸相補体（complement）が改変された宿主細胞を意味するように意図される。

【0110】

本明細書において使用されるように、用語「トランスジェニック細胞」は、形質転換細胞から誘導されるもしくは再生されるまたは他のトランスジェニック細胞からまたはそのような形質転換もしくはトランスジェニック宿主細胞の任意の世代の子孫または子から誘導される任意の細胞を意味するように一般に意図される。

【0111】

本明細書において使用されるように、用語「ベクター」は、宿主細胞における複製が可能なおよび／または付加されたセグメントの複製をもたらすように他の核酸セグメントが適切に作用するように連結される核酸分子（典型的にDNAから構成される）を意味するように一般に意図される。プラスミド、コスミド、またはウイルスは、例示的なベクターである。

【0112】

本明細書において使用される用語「実質的に相当する」、「実質的に相同な」、または「実質的な同一性」は、核酸またはアミノ酸配列の特徴を意味し、選択された核酸またはアミノ酸配列は、選択された参照核酸またはアミノ酸配列と比較して、少なくとも約70または約75パーセントの配列同一性を有する。より典型的に、選択された配列および参照配列は、少なくとも約76、約77、約78、約79、約80、約81、約82、約83、約84、またはさらに約85パーセントの配列同一性およびより好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、少なくとも約87%の配列同一性、少なくとも約88%の配列同一性、少なくとも約89%の配列同一性、少なくとも約90%の配列同一性、少なくとも約91%の配列同一性、少なくとも約92%の配列同一性、少なくとも約93%の配列同一性、少なくとも約94%の配列同一性、または少なくとも約95パーセント以上の配列同一性を有するであろう。より好ましくは、さらに高度に相同な配列は、多くの場合、選択された配列およびそれが比較される参照配列の間で、少なくとも約96%以上の配列同一性、少なくとも約97%以上の配列同一性、少なくとも約98%以上の配列同一性、または少なくとも約99%以上の配列同一性を共有する。配列同一性のパーセンテージは、比較されることとなる配列の全長にわたり計算されてもよいまたは選ばれた参照配列の合計約25パーセント未満程度になる小さな欠失または追加を除くことによって計算されてもよい。参照配列は、遺伝子もしくはフランキング配列の一部または染色体の反復部分などのような、より大きな配列のサブセットであってもよい。

【0113】

しかしながら、2つ以上のポリヌクレオチド配列の配列相同性の場合には、参照配列および標的配列は、典型的に、少なくとも約18～約25の連続した同一のヌクレオチド、より典型的に、同一である少なくとも約26～約35の連続したヌクレオチド、さらにより典型的には、同一である少なくとも約40、約50、約60、約70、約80、約90、またはさらに約100程度の連続したヌクレオチドを含むであろう。望ましいように、高度に相同な断片が所望される場合、2つの所与の配列の間の全体の配列同一性パーセントの程度は、たとえば、PearsonおよびLipman（1988年）によって記載されるFASTAプログラム解析などのような、当業者らに周知の1つまたは複数の配列比較アルゴリズムによって容易に決定されるように、少なくとも約80%同一、好ましくは、少なくとも約85%同一、より好ましくは、約90%同一、約91%同一、約92%

10

20

30

40

50

同一、約 93% 同一、約 94% 同一、またはさらに約 95% 以上同一となるであろう。

【0114】

2 つ以上の核酸またはポリペプチド配列との関連における用語「同一の」または「同一性」パーセントは、下記に記載される配列比較アルゴリズム（もしくは当業者らに入手可能な他のアルゴリズム）のうちの 1 つを使用してまたは目視検査によって測定されるように、最大の一致に向けて比較され、アライメントされる場合に、同じであるまたは特定されるパーセンテージの同じアミノ酸残基もしくはヌクレオチドを有する 2 つ以上の配列または部分配列を指す。

【0115】

2 つの核酸との関連における語句「実質的に同一の」は、配列比較アルゴリズムを使用してまたは目視検査によって測定されるように、最大の一致に向けて比較され、アライメントされる場合に、少なくとも約 90%、好ましくは 91%、最も好ましくは約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 98.5%、約 99%、約 99.1%、約 99.2%、約 99.3%、約 99.4%、約 99.5%、約 99.6%、約 99.7%、約 99.8%、または約 99.9% 以上のヌクレオチド残基同一性を有する 2 つ以上の配列または部分配列を指す。そのような「実質的に同一の」配列は、典型的に、実際の祖先に関係なく「相同である」と考えられる。

【0116】

対象に適用される、本明細書において使用される用語「天然に存在する」は、対象を自然界において見出すことができるという事実を指す。たとえば、自然界における供給源から単離することができ、研究所において人の手によって故意に修飾されていない有機体（ウイルスを含む）中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。本明細書において使用されるように、古典的遺伝学に従って選択的に交配されてもよいげっ歯動物の実験株は、天然に存在する動物と考えられる。

【0117】

本明細書において使用されるように、「異種の」は、所定の参照される遺伝子配列に関して定義される。たとえば、構造遺伝子配列に関して、異種プロモーターは、参照される構造遺伝子に隣接して天然に存在しないが、実験操作によって位置づけられるプロモーターとして定義される。同様に、異種遺伝子または核酸セグメントは、参照されるプロモーターおよび／またはエンハンサーエレメントに隣接して天然に存在しない遺伝子またはセグメントとして定義される。

【0118】

本明細書において使用されるように、用語「相同性」は、2 つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の間の相補性の程度を指す。第 1 の核酸またはアミノ酸配列が第 2 の核酸またはアミノ酸配列と全く同じ一次配列を有する場合、単語「同一性」は、単語「相同性」と置換されてもよい。配列相同性および配列同一性は、当技術分野において公知のアルゴリズムおよびコンピュータープログラムを使用して、2 つ以上の配列を分析することによって決定することができる。そのような方法は、所与の配列が、他の選択される配列と同一であるかまたは相同であるかを評価するために使用されてもよい。

【0119】

本明細書において使用されるように、「相同な」は、ポリヌクレオチドについて言及する場合、異なる起源から生じるにもかかわらず、同じ本質的なヌクレオチド配列を有する配列を意味する。典型的に、相同な核酸配列は、1 つまたは複数の実質的に同様のゲノム配列を有する、密接に関連する遺伝子または有機体に由来する。対照的に、「類似性の」ポリヌクレオチドは、異なる種または有機体からのポリヌクレオチドと同じ機能を共有するが、類似する機能を果たすまたは類似する生物学的活性を有する、1 つまたは複数のタンパク質またはポリペプチドをコードする、著しく異なる一次ヌクレオチド配列を有していてもよいポリヌクレオチドである。類似性のポリヌクレオチドは、多くの場合、密接に関連しない（たとえば遺伝的にまたは系統発生的に）2 つ以上の有機体に由来してもよい。

【0120】

本明細書において使用されるように、用語「ポリペプチド」は、単数の「ポリペプチド」および複数の「ポリペプチド」を包含するように意図され、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖（複数可）を含む。したがって、本明細書において使用されるように、「ペプチド」、「ジペプチド」、「トリペプチド」、「タンパク質」、「酵素」、「アミノ酸鎖」、および「連続したアミノ酸配列」を含むが、これらに限定されない用語はすべて、「ポリペプチド」の定義の範囲内に包含され、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかの代わりにまたはそれと区別なく使用することができる。用語は、たとえばグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、誘導体化、タンパク分解性切断、翻訳後プロセッシング、または1つもしくは複数の天然に存在しないアミノ酸の包含による修飾を含むが、これらに限定されない、1つまたは複数の翻訳後修飾を受けたポリペプチド（複数可）をさらに含む。従来の命名法は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造について当技術分野において存在する。たとえば、1文字および3文字の略語は、アミノ酸を記載するために広く用いられる：アラニン（A；Ala）、アルギニン（R；Arg）、アスパラギン（N；Asn）、アスパラギン酸（D；Asp）、システイン（C；Cys）、グルタミン（Q；Gln）、グルタミン酸（E；Glu）、グリシン（G；Gly）、ヒスチジン（H；His）、イソロイシン（I；Ile）、ロイシン（L；Leu）、メチオニン（M；Met）、フェニルアラニン（F；Phe）、プロリン（P；Pro）、セリン（S；Ser）、トレオニン（T；Thr）、トリプトファン（W；Trp）、チロシン（Y；Tyr）、バリン（V；Val）、およびリシン（K；Lys）。本明細書において記載されるアミノ酸残基は、「L」異性体形態であることが好ましい。しかしながら、「D」異性体形態における残基は、任意のLアミノ酸残基と置換されてもよい、ただし、ポリペプチドの所望の特性が保持されることを条件とする。

10

20

【0121】

「タンパク質」は、「ペプチド」および「ポリペプチド」と本明細書において区別なく使用され、合成的に、組換えで、または *in vitro* において産生されるペプチドおよびポリペプチドならびに核酸配列が宿主動物またはヒト対象の中に投与された後に *in vivo* において発現されるペプチドおよびポリペプチドの両方を含む。用語「ポリペプチド」は、好ましくは、長さが約2～約20のアミノ酸残基の短いペプチド、長さが約10～約100のアミノ酸残基のオリゴペプチド、および長さが約100～約5,000以上のアミノ酸残基のポリペプチドのものを含む、すべてのアミノ酸鎖長を指すように意図される。用語「配列」は、アミノ酸について言及する場合、所与のアミノ酸鎖、たとえばポリペプチドまたはタンパク質内の、直線状のN末端～C末端の順のアミノ酸のすべてまたは一部に関し、「部分配列」は、配列内のアミノ酸の任意の連続するストレッチ、たとえば、所与のタンパク質またはポリペプチド配列内の少なくとも3つの連続するアミノ酸を意味する。ヌクレオチドおよびポリヌクレオチド鎖に関して、「配列」および「部分配列」は、5'～3'の順のヌクレオチドに関する同様の意味を有する。

30

【0122】

本明細書において使用されるように、用語「実質的に相同な」は、一次ヌクレオチド配列レベルで、互いに有意に類似する、2つ以上の生体分子配列を包含する。たとえば、2つ以上の核酸配列との関連において、「実質的に相同な」は、少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、または少なくとも約90%の同一性を指すことができ、さらにより好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約97%同一、より好ましくは少なくとも約98%同一、より好ましくは少なくとも約99%同一、さらにより好ましくは、完全に同一（つまり、100%または「不変の」）である。

40

【0123】

同様に、本明細書において使用されるように、用語「実質的に同一の」は、ヌクレオチドレベルで互いに高度の同一性を示す、2つ以上の生体分子配列（特にポリヌクレオチド配列）を包含する。たとえば、2つ以上の核酸配列との関連において、「実質的に同一の

50

」は、互いに少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、または少なくとも約90%同一、さらにより好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約97%同一、より好ましくは少なくとも約98%同一、より好ましくは少なくとも約99%同一、さらにより好ましくは、完全に同一（つまり、100%同一または「非縮重」）である配列を指すことができる。

【0124】

用語「組換え体」は、物質（たとえばポリヌクレオチドまたはポリペプチド）が、ヒトの介入によって人工的にまたは合成的に（非天然に）改変されたことを示す。改変は、その天然環境または状態内の物質に対して実行するまたはそれから除去することができる。特に、たとえば、プロモーター配列は、人の手によって操作された核酸セグメントの発現によって產生される場合、「組換え体」である。たとえば、「組換え核酸」は、たとえば、クローニング、DNAシャフリング、もしくは他の手順の間に核酸を組換えることによってまたは化学的なもしくは他の変異誘発によって作製される核酸であり、「組換えポリペプチド」または「組換えタンパク質」は、組換え核酸の発現によって產生されるポリペプチドまたはタンパク質であり、「組換えウイルス」、たとえば組換えAAVウイルスは、組換え核酸の発現によって產生される。

【0125】

本明細書において使用されるように、用語「作動可能に連結される」は、機能的な関係における、2つ以上のポリヌクレオチドまたは2つ以上の核酸配列の連結を指す。核酸は、他の核酸配列と機能的な関係に配置される場合、「作動可能に連結される」。たとえば、プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響を与える場合、コード配列に作動可能に連結されている。「作動可能に連結される」は、連結されている核酸配列が、典型的には、連続しているまたは実質的に連続していることを意味し、2つのタンパク質コード領域をつなぐことが必要である場合、連続し、かつリーディングフレームについてインフレームであることを意味する。エンハンサーは、一般に、プロモーターから数キロベース離れている場合に機能するので、イントロン配列は、多様な長さであってもよいが、いくつかのポリヌクレオチドエレメントは、作動可能に連結されてもよいが、連続していなくてもよい。

【0126】

「転写調節性エレメント」は、単独でまたは1つまたは複数の他の核酸配列と組み合わせて転写を活性化するポリヌクレオチド配列を指す。転写調節性エレメントは、たとえば、1つもしくは複数のプロモーター、1つもしくは複数の応答エレメント、1つもしくは複数のネガティブ調節性エレメント、および／または1つもしくは複数のエンハンサーを含むことができる。

【0127】

本明細書において使用されるように、「転写因子認識部位」および「転写因子結合部位」は、直接的なタンパク質-DNA結合の形態を頻繁に取る、1つまたは複数の転写因子の配列特異的な相互作用のための部位であるとして同定されるポリヌクレオチド配列（複数可）または配列モチーフ（複数可）を指す。典型的に、転写因子結合部位は、DNAフットプリンティング、ゲル移動度シフトアッセイ、およびその他同種のものによって同定することができるならびに／または公知のコンセンサス配列モチーフに基づいてもしくは当業者らに公知の他の方法によって予測することができる。

【0128】

「転写ユニット」は、少なくとも1つの第1のシス作用性プロモーター配列に作動可能に連結されるおよび任意選択で、構造遺伝子配列の効率的な転写のために必要である1つまたは複数の他のシス作用性核酸配列に作動可能に連結される少なくとも1つの第1の構造遺伝子ならびにプロモーターおよび／またはエンハンサーエレメントの制御下に作動可能に位置づけられた構造遺伝子配列の適切な組織特異的および発生的な転写に必要とされてもよい少なくとも1つの第1の遠位調節性エレメントならびに効率的な転写および翻訳に必要である任意のさらなるシス配列（たとえばポリアデニル化部位（複数可）、mRN

10

20

30

40

50

A 安定性制御配列（複数可）などを含むポリヌクレオチド配列を指す。

【0129】

用語「実質的に相補的な」は、アミノ酸または核酸配列を定義するために使用される場合、特定の対象配列、たとえばオリゴヌクレオチド配列が選択される配列のすべてまたは一部に実質的に相補的であり、したがって、選択される配列をコードするmRNAの一部に特異的に結合するであろうということを意味する。そのため、典型的に、配列は、mRNA「標的」配列に高度に相補的であろう、また、配列の相補的な部分の全体にわたって多くとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、または約10程度の塩基ミスマッチを有するであろう。多くの事例では、配列が完全にマッチする、つまり、オリゴヌクレオチドが特異的に結合する配列に完全に相補的であり、そのため、相補的ストレッチに沿ってミスマッチがゼロであることが望ましくてもよい。そのため、高度に相補的配列は、典型的に、mRNAの標的配列領域にかなり特異的に結合するであろう、また、そのため、ポリペプチド産物への標的mRNA配列の翻訳を低下させるおおよび／またはさらに阻害するのに高度に効率的であろう。

10

【0130】

実質的に相補的な核酸配列は、核酸が特異的に結合する対応する核酸標的配列に約80パーセント（または「%の完全なマッチ」）超相補的であろう、また、より好ましくは、核酸が特異的に結合する対応する標的配列に約85パーセント超相補的であろう。ある態様では、上記に記載されるように、本発明の実施における使用のためのさらにより実質的に相補的な核酸配列を有することは望ましいであろう、また、そのような事例では、核酸配列は、核酸が特異的に結合する対応する標的配列に約90パーセント超相補的であろう、また、ある実施形態では、核酸が特異的に結合する対応する標的配列に約95パーセント超相補的であってもよく、設計される核酸が特異的に結合する標的配列のすべてまたは一部に相補的な約96%、約97%、約98%、約99%、おおよびさらに約100%まで完全にマッチしていてもよい。

20

【0131】

開示される核酸配列のいずれかの類似性パーセントまたは相補パーセントは、たとえば、University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWCGC) から入手可能なGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0を使用し、配列情報を比較することによって決定されてもよい。GAPのプログラムは、NeedlemanおよびWunsch（1970年）のアライメント方法を利用する。手短かに言えば、GAPのプログラムは、2つの配列のうちの短い方のシンボルの総数によって割った、類似する、アライメントされたシンボル（つまりヌクレオチドまたはアミノ酸）の数として類似性を定義する。GAPのプログラムについての好ましいデフォルトパラメーターは、（1）ヌクレオチドについての単項比較マトリックス（同一性に対して1および非同一性に対して0の値を含有する）ならびにGribkovおよびBurgess（1986年）の加重比較マトリックス、（2）それぞれのギャップについての3.0のペナルティーおよびそれぞれのギャップにおけるそれぞれのシンボルについてのさらなる0.10のペナルティー；ならびに（3）末端ギャップについてのペナルティーなしを含む。

30

40

【0132】

本明細書において使用されるように、用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」は、区別なく使用され、2つ以上のアミノ酸残基をともに連結する少なくとも1つのアミド結合を含む分子を含む。区別なく使用されるが、一般に、ペプチドは、比較的短い（たとえば長さが2～約100のアミノ酸残基）分子であり、一方、タンパク質またはポリペプチドは、比較的より長いポリマー（たとえば長さが100以上の残基）である。しかしながら、鎖長によって特に定義されない限り、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質という用語は、区別なく使用される。

【0133】

本明細書において使用されるように、用語「患者」（「宿主」または「対象」と区別な

50

く呼ばれる)は、本明細書において説明される1つまたは複数のr A A Vベースのグアニル酸シクラーゼ組成物のためのレシピエントを果たすことができる任意の宿主を指す。ある態様では、レシピエントは、任意の動物種(好ましくは、人間などのような哺乳動物種)を意味するように意図される脊椎動物となるであろう。ある実施形態では、「患者」は、限定を伴うことなく、飼育された家畜、牧畜動物もしくは移住動物、外来種、または動物検体ならびにコンパニオンアニマル、ペット、および獣医のケアの下での任意の動物を含む、ヒトおよび非ヒト霊長類、ウシ、イヌ、ヤギ(c a p r i n e)、キャビン(c a v i n e)、カラス(c o r v i n e)、エピン、ウマ、ネコ、ヤギ、ラピン(l a p i n e)、ウサギ、オオカミ、マウス、ヒツジ、ブタ、ラシン(r a c i n e)、キツネ、ならびにその他同種のものを含むが、これらに限定されない任意の動物宿主を指す。

10

【0134】

本明細書において使用されるように、用語「キャリア」は、適宜、適切な動物への投与に薬学的に許容されるまたは診断上の目的に許容される任意の溶媒(複数可)、分散媒、コーティング(複数可)、希釈剤(複数可)、緩衝剤(複数可)、等張剤(複数可)、溶液(複数可)、懸濁剤(複数可)、コロイド(複数可)、不活性成分(複数可)など、またはその組み合わせを含むように意図される。遺伝子療法構築物、ウイルス粒子、ベクター、およびその他同種のものについての1つまたは複数の送達ビヒクルの使用は、医薬および分子の技術分野における当業者らに周知である。任意の従来の培地または作用物質が活性成分と不適合性である場合を除いて、予防用および/または処置用組成物におけるその使用が企図される。1つまたは複数の補足の活性成分(複数可)もまた、1つまたは複数の開示される組成物と関連して、組み込まれてもよいまたは投与されてもよい。

20

【0135】

本明細書において使用されるように、「有効量」は、レシピエント患者に処置、予防、または他の場合には有益な効果をもたらすことが、当業者らによって理解されるであろう。

【0136】

語句「単離された」または「生物学的に純粋な」は、それがその天然の状態において見出されるように物質に通常伴う構成要素が実質的にまたは本質的にない物質を指す。したがって、本発明に従う単離ポリヌクレオチドは、好ましくは、それらの天然のまたはi n s i t u環境においてそれらのポリヌクレオチドと通常関連する物質を含有しない。

30

【0137】

「連結する」または「つなぐ」は、限定を伴うことなく、組換え融合、共有結合、ジスルフィド結合、イオン結合、水素結合、静電気結合、およびその他同種のものを含む、1つまたは複数のタンパク質、ペプチド、核酸、またはポリヌクレオチドを機能的に結び付けるための当技術分野において公知の任意の方法を指す。

【0138】

本明細書において使用されるように、用語「プラスミド」または「ベクター」は、遺伝物質(つまり核酸)から構成される遺伝子構築物を指す。典型的に、プラスミドまたはベクターは、細菌宿主細胞、たとえばE s c h e r i c h i a c o l iにおいて機能的な複製開始点およびプラスミドを含む細菌宿主細胞を検出するための選択マーカーを含有する。本発明のプラスミドおよびベクターは、挿入されたコード配列が適した発現細胞において転写され、翻訳され得るように配置される、本明細書において記載される1つまたは複数の遺伝因子を含んでいてもよい。さらに、プラスミドまたはベクターは、1つまたは複数の天然のおよび/または人工の供給源から得られるまたはそれに由来するセグメントを含む、1つまたは複数の核酸セグメント、遺伝子、プロモーター、エンハンサー、活性化因子、マルチクローニング領域、またはその任意の組み合わせを含んでいてもよい。

40

【0139】

用語「配列番号Xにおいて本質的に記載される配列」は、配列が、配列番号Xの一部に実質的に相当し、配列番号Xのヌクレオチド(またはアミノ酸)に同一でないまたはその生物学的に機能的な等価物である比較的少数のヌクレオチド(またはポリペプチド配列の

50

場合にはアミノ酸)を有することを意味する。用語「生物学的に機能的な等価物」は、当技術分野において十分に理解されており、本明細書において詳細にさらに定義される。したがって、本明細書において提供される1つまたは複数のヌクレオチド配列に同一であるまたは機能的に等価である、約85%~約90%またはより好ましくは約91%~約95%またはさらにより好ましくは約96%~約99%のヌクレオチドを有する配列は、本発明の実施において有用であることが特に企図される。

【0140】

本発明に適した標準的なハイブリダイゼーション条件は、たとえば、16時間、42℃での、50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSC、25mMリン酸ナトリウム、0.1%SDS、および100μg/mlの変性サケ精子DNAにおけるハイブリダイゼーション、その後続く、所望の量のバックグラウンドシグナルを除去するための60℃での0.1×SSC、0.1%SDS溶液を用いる1時間の連続的な洗浄を含む。本発明のための低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、たとえば、16時間、42℃での、35%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSC、25mMリン酸ナトリウム、0.1%SDS、および100μg/mlの変性サケ精子DNAまたはE. coli DNAにおけるハイブリダイゼーション、その後続く、55℃での0.8×SSC、0.1%SDSを用いる連続的な洗浄を含む。当業者らは、ストリンジェンシーの所望のレベルを得るために容易に条件を調節することができることを認識するであろう。

【0141】

もちろん、本発明はまた、本明細書において特に記載される少なくとも1つまたは複数の特定のヌクレオチド配列に相補的な、本質的に相補的な、および/または実質的に相補的な核酸セグメントを包含する。「相補的」核酸配列は、標準的なワトソンクリック相補性ルールに従って塩基対形成が可能なものである。本明細書において使用されるように、用語「相補的配列」は、上記に記載される同じヌクレオチド比較によって評価されてもよいまたはすぐ上に記載されるものなどのような比較的ストリンジェントな条件下で本明細書において開示される1つまたは複数の特定の核酸セグメントにハイブリダイズすることができるとして定義される、実質的に相補的な核酸配列を意味する。

【0142】

上記に記載されるように、本発明のプロブおよびプライマーは、任意の長さであってもよい。たとえば、第1の残基は1、第2の残基は2などというように配列に数値を割り当てることによって、所与の配列内に含有されるすべてのプロブまたはプライマーを定義するアルゴリズムを提案することができる。

【0143】

$n \sim n + y$ 、 n は、1~配列の最後の数の整数であり、 y は、プロブまたはプライマー-1の長さであり、 $n + y$ は、配列の最後の数を超えない。したがって、25塩基対プロブまたはプライマー（つまり「25塩基長」）については、プロブまたはプライマーの集団は、配列の全長にわたり塩基1~25、塩基2~26、塩基3~27、塩基4~28などに相当する。同様に、35塩基対プロブまたはプライマー（つまり「35塩基長」）については、例示的なプライマーまたはプロブ配列は、限定を伴うことなく、配列の全長にわたり、塩基1~35、塩基2~36、塩基3~37、塩基4~38などに対応する配列を含む。同様に、40塩基長については、そのようなプロブまたはプライマーは、第1の塩基対~40bp、配列の第2のbp~41bp、第3のbp~42bpなどのヌクレオチドに相当してもよく、一方、50塩基長については、そのようなプロブまたはプライマーは、1bp~50bp、2bp~51bp、3bp~52bp、4bp~53bpなどに及ぶヌクレオチド配列に相当してもよい。

【0144】

ある実施形態では、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて所与の標的配列の存在を決定する際に標識ポリヌクレオチドプロブを用いる場合などのように、適切な検出可能なマーカー（つまり「標識」）と組み合わせて本発明の1つまたは複数の核酸セグメントを用いることは好都合であろう。限定を伴うことなく、適したアッセイにおいて検出する

ことができる、アビジン／ビオチンなどのような蛍光、放射性、酵素学的、または他のリガンドなどを含む、オリゴヌクレオチドプローブを標識するための種々様々の適切な指標化合物および組成物は、当技術分野において公知である。特定の実施形態では、また、放射性または他の環境上それほど望ましくない試薬の代わりに、1つまたは複数の蛍光標識またはウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、もしくはペルオキシダーゼなどのような酵素タグを用いてもよい。酵素タグの場合には、1つまたは複数の相補的なまたは実質的に相補的な核酸配列を含有する試料との特異的なハイブリダイゼーションを同定するために、ヒトの眼に見えるまたはシンチグラフィ、蛍光分析、分光測光、およびその他同種のものなどのような分析法によって目に見える試料を検出するための方法を提供するために用いることができる比色定量、発色性、または蛍光発生性 (fluorigenic) 指標基質が公知である。2つ以上の標識プローブが同時にまたは連続的に検出される、いわゆる「多重」アッセイの場合には、第1の検出特性またはパラメーター（たとえば放射および／または励起スペクトルの最大値）を有する第1の標識を用いて、第1のオリゴヌクレオチドプローブを標識することは望ましくてもよい。これはまた、異なる（つまり、第1の標識と別個のまたはそれから識別可能な）第2の検出特性またはパラメーターを有する第2の標識を用いて第2のオリゴヌクレオチドプローブをも標識する。特に遺伝子増幅／検出プロトコールとの関連における多重アッセイの使用は、分子遺伝学の技術分野における当業者らに周知である。

10

【実施例】

【0145】

20

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために含まれる。続く実施例において開示される技術は、本発明の実施において十分に機能するように、発明者によって発見された技術を示し、したがって、その実施のための好ましいモードを構成すると考えることができることが、当業者らによって十分に理解されたい。しかしながら、当業者らは、本開示を考慮して、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの変形が、開示される特定の実施形態において成され、同様のまたは類似する結果をなお得ることができることを十分に理解されたい。

【0146】

（実施例1）

AAV媒介性の遺伝子療法はLCA1のマウスモデルの視覚機能および行動を修復する本実施例において、発明者らは、出生後のGC1KOマウスの錐体細胞へのretGC1種特異的なバージョン（つまりマウス）の送達、これらの細胞の機能を修復することができるかどうかを評価した。血清型5AAVベクターは、出生後14日目（P14）のGC1KOマウスの光受容体にmGC1を送達するために使用した。網膜電位図（ERG）および行動的な試験は、視覚機能を評価するために使用し、免疫細胞化学は、処置および無処置眼における、処置用導入遺伝子発現、錐体アレスチン局在化、および錐体光受容体密度を検査するために使用した。

30

【0147】

本実施例は、P14 GC1 KOマウスの一方の眼の網膜下に送達されたAAVベクターが、野生型retGC1の発現、視覚機能および行動の回復、ならびに錐体光受容体の保持を促進したことを実証する。注射の4週間後に、視覚機能（ERG）を処置および無処置眼において分析した。ERGは、その後、注射後3か月（評価した最も後の時点）まで2週間ごとに実行した。ポジティブなERG応答を有するマウスならびに同質遺伝野生型および非注射対照マウスは、視覚性運動反射試験を使用し、視覚的な行動の回復について評価した。注射後3か月目に、動物はすべて、安楽死させ、それらの処置および無処置網膜は、GC1の発現および錐体アレスチンの局在化について評価した。

40

【0148】

結果はまた、GC1KOマウスの処置眼の錐体媒介性の機能が修復されたことを確認する（ERG振幅は正常の約60%であった）。さらに、処置効果は、投与後少なくとも3か月間、安定した。行動試験は、錐体媒介性の視覚的な行動における堅調な改善を示し、

50

処置マウスの応答は、野生型マウスに類似したまたはそれと同一であった。組織学的検査は、処置マウスにおける光受容体 AAV 媒介性の GC1 発現および錐体アレスチン移動の回復を明らかにした。さらに、錐体細胞密度は、無処置の反対側の対照よりも処置眼において高度であった。この結果は、処置後少なくとも 3 か月間、処置が、錐体光受容体を保持することができることを示唆する。これは、出生後の遺伝子療法が、LCA1 の哺乳動物モデルにおいて視覚機能および視覚的な行動を修復し、網膜構造を保持することができるという第 1 の実証である。重要なことには、結果は、十分に特徴付けられた、臨床的に適切な AAV ベクターを使用して得られ、このように得られた *in vivo* における動物モデルデータは、LCA1 に冒された子供の処置のための AAV ベースの遺伝子療法ベクターについての根拠を提供する。

10

【0149】

材料および方法：

実験動物：

GC1+/-ヘテロ接合体胚は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) で凍結保存株から取り出した。ヘテロ接合体は、GC1 KO (-/-) および同質遺伝+/-+対照子を産生するために発明者らの施設で交配した。マウスはすべて、12時間/12時間の光/暗サイクル下で発明者らの機関の集中施設において飼育し、維持した。飼料および水は自由に動物が利用し得る形態とした。動物研究はすべて、地域の Institutional Animal Care and Use Committee によって承認されており、ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and NIH regulations に従って行った。

20

【0150】

AAV ベクターの構築：

血清型 5 アデノ随伴ウイルス (AAV5) ベクターは、それらが、堅調な形質導入効率および他の AAV 血清型よりも網膜光受容体における発現のより急速な開始を示すことが示されたので、マウス GC1 (mGC1) を送達するために使用した (Yang ら、2002 年)。細胞特異的およびユビキタスプロモーターの両方は、mGC1 の発現を駆動するために選択した。ロドプシンキナーゼプロモーターとしても公知である細胞特異的 Gタンパク質共役受容体キナーゼ 1 (GRK1) は、AAV と共に使用された場合に杆体および錐体光受容体において堅調な導入遺伝子発現を特異的に標的にするその能力のために選んだ (Khani ら、2007 年)。網膜における完全長 CBA に類似する発現パターンを示すユビキタス smCBA プロモーターは、神経網膜を効率的に標的にするその能力のために選んだ (Haire ら、2006 年)。

30

以下のフォワードプライマー：

【0151】

【化 1】

5'-AAAAGCGCCCGCATGAGCGCTTGGCTCCTGCCAGCC-3' (配列番号 14)

40

および以下のリバースプライマー：

【0152】

【化 2】

5'-AAAAGCGCCCGCTCACTTCCCAGTAACTGGCCTGG-3' (配列番号 15)

を利用するポリメラーゼ連鎖反応は、mGC1-eGFP 融合物を含有するプラスミドから mGC1 を増幅するために使用した (Bhowmick ら、2009 年)。結果として生じる断片は、pCRblunt プラスミド (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) の中にクローニングし、配列を検証した。mGC1 の発現を駆動する smCBA を含有する AAV ベクタープラスミド (pTR-smCBA-mGC1) は、E

50

c o R I 消化および続くライゲーションを介して、プラスミド p T R - C B ^{S B} - h R P E 6 5 (J a c o b s o n ら、2006 年) において s m C B A と完全長 C B A を交換することによって生成した。続いて、h R P E 6 5 を N o t I 消化およびライゲーションを介して m G C 1 と交換し、p T R - s m C B A - m G C 1 の生成をもたらした (図 1 1) 。 m G C 1 の発現を駆動するヒト G R K 1 プロモーターを含有する A A V ベクタープラスミド、p T R - G R K 1 - m G C 1 は、N o t I 消化物およびライゲーションを介して、p T R - h G R K 1 - h G F P (B e l t r a n ら、2010 年) から h G F P を除去し、それを m G C 1 と交換することによって生成した (図 1 1) 。 A A V ベクターは、先に公開された方法 (H a i r e ら、2006 年) に従ってパッケージした。ウイルス粒子は、平衡塩類溶液 (A l c o n、F o r t W o r t h、T X、U S A) 中に再懸濁し、定量的リアルタイム P C R によって力価を測定した (J a c o b s o n ら、2006 年) 。結果として生じる力価は、それぞれ、A A V 5 - s m C B A - m G C 1 および A A V 5 - h G R K 1 - m G C 1 について、1 m L 当たり 4.69×10^{12} ウイルスゲノム (v g / m L) および 4.12×10^{13} v g / m L であった。

【0153】

網膜下注射：

1 μ L の A A V 5 - G R K 1 - m G C 1 (4.12×10^{10} 送達ベクターゲノム) または A A V 5 - s m C B A - m G C 1 (4.69×10^9 送達ベクターゲノム) を、それぞれの G C 1 K O マウスの右眼に出生後 14 日目 (P 14) に網膜下に送達し、左眼は反対側の対照として残した。網膜下注射は、先に記載されるように実行した (T i m m e r s ら、2001 年；P a n g ら、2006 年) 。さらに、分析は、比較可能で好結果の注射 (> 60 % の網膜剥離および最小限の合併症) を受けた動物に対してのみ実行した。網膜剥離のエリアがウイルス形質導入のエリアに相当することは十分に立証される (C i d e c i y a n ら、2008 年；T i m m e r s ら、2001 年) 。

【0154】

網膜電図検査分析：

処置 G C 1 K O (n = 14) および同質遺伝 + / + 対照 (n = 2) の網膜電位図 (E R G) は、わずかな改良を伴う先に記載される方法に従って (H a i r e ら、2006 年) 、P C ベースの制御および記録ユニット (T o e n n i e s M u l t i l i n e r V i s i o n ; J a e g e r / T o e n n i e s、H o e c h b e r g、G e r m a n y) を使用して記録した。最初の E R G 測定値は、注射後 4 週間目に、その後、続く 2 週間ごとに、注射後 3 か月まで (研究において評価した最後の時点) 記録した。年齢が一致する + / + 同質遺伝対照は、すべての時点で処置動物と一緒に記録した。それぞれ、マウスは、一晚 (12 時間以上) 、暗順応させ、1 : 1 : 5 の比の 100 m g / k g ケタミン、20 m g / k g キシラジン、および生理食塩水の混合物を用いて麻酔をかけた。瞳孔は、1 % トロピカミドおよび 2 . 5 % 塩酸フェニレフリンを用いて散大させた。加熱した循環ウォーターバスは、38 $^{\circ}$ C に体温を維持するために使用した。ヒドロキシプロピルメチルセルロース 2 . 5 % は、角膜の脱水を予防するためにそれぞれの眼に適用した。全視野 E R G は、特注のゴールドワイヤループ角膜電極を使用して記録した。基準電極および接地電極 (g r o u n d e l e c t r o d e) は、それぞれ、眼の間および尾中に、皮下に配置した。暗所視杆体記録は、7 つの増加性の強度 (0 . 01 m c d / m ² ~ 5 c d / m ²) の一連の白色の閃光を用いて誘発した。低強度刺激についての刺激間隔は、1 . 1 秒とした。3 つの最も高度な強度 (100 m c d / m ²、1 c d / m ²、および 5 c d / m ²) では、刺激間隔は、それぞれ、2 . 5、5 . 0、および 20 . 0 秒とした。10 の応答を記録し、それぞれの強度で平均した。マウスは、次いで、2 分間、100 c d / m ² の白色のバックグラウンドに光順応させた。明所視錐体反応は、一連の 5 つの増加性の光強度 (100 m c d / m ² ~ 12 c d / m ²) を用いて誘発した。50 の応答を記録し、それぞれの強度で平均した。刺激はすべて、100 c d / m ² のバックグラウンドの存在下において行った。b 波振幅は、それぞれの波形のポジティブピークに対する a 波トラフの間の差異として定義した。

【0155】

すべての $smCBA-mGC1$ 処置 ($n=6$) および $hGRK1-mGC1$ 処置 ($n=8$) $GC1KO$ (処置および無処置眼の両方) ならびに同質遺伝+/+対照マウスの明所視 b 波最大振幅 (12 cd/m^2 で生成されたもの) は、平均し、標準誤差を生成するために使用した。これらの計算は、すべての時点 (注射後4週間~13週間) で行った。このデータは、最終的なグラフ表示のために Sigma Plot にインポートした。対応のある t 検定は、ある期間にわたって (注射後4週間対注射後3か月)、それぞれのプロモーター群 ($smCBA$ または $hGRK1$) 内の処置および無処置眼の間のならびにそれぞれのプロモーター群の間の P 値を計算するために使用した。標準的な t 検定は、 $smCBA-mGC1$ 処置眼対 $hGRK1-mGC1$ 処置眼の間の P 値を計算するために使用した。有意差は、 P 値 < 0.05 として定義した。それぞれの処置群からのマウスのいくつかを行動的な分析のために研究から一時的に取り出したので、図2Aおよび図2Bにおける、それぞれの時点で平均し、示すマウスの総数は、異なる。 $smCBA-mGC1$ 処置群からの3匹のマウスを視運動試験のために送り、8、10、および12週目の測定のためにERG分析のために「 n 」が3匹のマウスを使用した (図2A)。 $hGRK1-mGC1$ 処置群からの2匹のマウスを視運動試験のために送り、6、8、10、および12週目の測定のためにERG分析のために「 n 」が6のものをを使用した (図2B)。行動的な分析のために送ったマウスはすべて、行動的な分析の終了の後に、発明者らの研究所へのそれらの返却に際して注射後13週間目に測定した ($smCBA-mGC1$: $n=3$ 、 $hGRK1-mGC1$: $n=2$)。

【0156】

視運動試験:

処置および無処置 $GC1KO$ マウス眼の明所視視覚およびコントラスト感度は、先に記載されるように二者択一強制選択パラダイムを使用して測定した (たとえば $Umino$ ら、2008年; $Alexander$ ら、2007年を参照されたい)。同じ動物からの個々の眼の感度を試験するために、発明者らは、マウス視力が最小限の両眼の重複を有し、左眼が時計回りにより敏感であり、右が反時計回りにより敏感であるという事実を利用した ($Douglas$ ら、2005年)。したがって、発明者らの「ランダム化した別々の」視運動のプロトコルでは、それぞれの眼の視力およびコントラスト感度の閾値は、時計回りおよび反時計回りの方向の両方における正確な応答について段階的な機能を介して別々にかつ同時に決定した。時計回りの方向に回転するパターンの正確な検出は、主として、左眼から生じる視覚的なシグナルによって行い、反時計回りの方向における正確な応答は、右眼から生じる視覚的なシグナルから導き出した。視力は、閾値応答を得る最も高度な空間周波数 (100% コントラスト) として定義し、コントラスト感度は、閾値応答を得る最低パーセントのコントラストによって割った 100 として定義した。明所視力については、最初の刺激は、固定 100% コントラストと共に 0.200 サイクル/度の正弦波パターンとした。明所視コントラスト感度測定については、最初のパターンは、 0.128 サイクル/度の固定空間周波数と共に 100% コントラストで行った。明所視視力は、 70 cd/m^2 の平均輝度で測定した。視覚およびコントラスト感度は、1週間の期間、それぞれのマウスの両眼について4~6回測定した。年齢が一致する同質遺伝+/+対照動物 ($M1$ 、 $M2$) およびナイーブ $GC1KO$ マウス ($M3$ 、 $M4$) は、図3における $smCBA-mGC1$ 処置 ($M5$ 、 $M6$ 、 $M7$) および $hGRK1-mGC1$ 処置マウス ($M8$ 、 $M9$) と共に行った。すべてのマウス ($M1\sim M9$) の 12 cd/m^2 の刺激から生成される錐体媒介性のERG振幅は、行動結果と一緒にに行った。対応のない t 検定は、結果の有意性を決定するために視力およびコントラスト値パーセントに対して実行した。

【0157】

組織調製

注射後3か月目に、 $P14$ 処置 $GC1KO$ マウスおよび年齢が一致する同質遺伝+/+対照を、2時間、暗順応させた。暗順応直後に、マウスは、暗赤色光 ($>650\text{ nm}$) 下

で安楽死させた。注射および非注射眼の縁郭を、12:00位置で熱い針を用いてマークし、方向づけを容易にした。眼球除去は、暗赤色光下で実行し、眼は、4%パラホルムアルデヒド中に直ちに配置した。凍結切片法(cryosectioning)に使用されることになっていた眼は、先に記載される方法に従って調製した(Haireら、2006年)。手短かに言えば、角膜は、それぞれの眼から除去し、残りの眼杯の内部のレンズを残した。小さな「V」字形の切り込みを、方向づけを維持するために焼いた縁郭に隣接する強膜に行った。一晩の固定後、レンズおよび硝子体を除去した。残りの網膜/RPE含有眼杯は、4℃で少なくとも1時間、PBS中30%スクロース中に配置した。次いで、眼杯は、クライオスタット化合物(Tissue Tek OCT 4583; Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA, USA)中に配置し、ドライアイス/エタノールのバスにおいてスナップ凍結させた。眼は、クライオスタット(Microtome HM550; Walldorf, Germany)を用いて10μmで連続的に薄片を作った。ホールマウント分析の使用されることになっていた眼は、先に記載される方法に従って調製した(Pangら、2010年)。方向づけは、先に言及されるように達成した。一晩の固定後に、網膜を動かさずに、角膜、レンズ、硝子体、および網膜色素上皮をそれぞれの眼から除去した。切り込みは、方向づけを維持するために、もとの縁郭焼け跡に隣接する網膜の上部(背側)の部分に行った。

【0158】

免疫組織化学的検査および顕微鏡検査法;

網膜凍結切片およびホールマウントは、1×PBS中で3×洗浄した。これらの洗浄の後に、試料は、室温で、暗中で、1時間、0.5% Triton X-100(登録商標)中でインキュベートした。次に、試料は、室温で、1時間、PBS中1%ウシ血清アルブミン(BSA)の溶液中でブロックした。網膜切片は、0.3% Triton X-100(登録商標)/1% BSA中で希釈したウサギポリクローナルGC1抗体(1:200、sc-50512, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)およびウサギポリクローナル錐体アレスチン抗体(「Lumij」1:1000; Dr. Cheryl Craft, University of Southern California, Los Angeles, CA, USAによって提供)と共に37℃で一晩、インキュベートした。網膜ホールマウントは、0.3% Triton X-100(登録商標)/1% BSA中で1:1000に希釈した同じ錐体アレスチン抗体と共に室温で一晩、インキュベートした。一次インキュベーションの後に、網膜切片およびホールマウントは、1×PBSを用いて3×洗浄した。

【0159】

網膜切片は、1×PBS中で1:500に希釈したAlexa-594またはAlexa-488蛍光団(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いてタグ付けしたIgG二次抗体と共に室温で1時間、インキュベートした。二次抗体とのインキュベーションの後に、切片およびホールマウントは、1×PBSを用いて洗浄した。網膜切片は、室温で、5分間、4', 6'-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI)を用いて対比染色した。1×PBSおよび水を用いる最終的なすすぎの後、切片は、水性培地(DAKO)中にマウントし、カバーガラスをかけた。網膜ホールマウントは、網膜の上部(背側)の部分を12:00位置に位置づけて、スライド上に方向づけた。試料は、DAKO中にマウントし、カバーガラスをかけた。

【0160】

網膜切片は、LCS Version 2.61、Build 1537ソフトウェア(Bannockburn, IL, USA)を装備した共焦点顕微鏡検査法(Leica TCS SP2 AOBs Spectral Confocal Microscope)を用いて分析した。画像はすべて、20×または63×の倍率で同一の露光設定を用いて撮った。DAPI、GC1、および錐体アレスチン染色のために使用した励起波長は、それぞれ、405nm、488nm、および594nmとした。放射スペクトルは、そ

10

20

30

40

50

れぞれ、440～470 nm、500～535 nm、および605～660 nmとした。網膜ホールマウントは、Q Imaging Retiga 4000R CameraおよびQ Imaging QCapture Proソフトウェア（Q Imaging, Inc., Surrey, BC, Canada）を装備した広視野蛍光顕微鏡（AxioPlan 2）（Zeiss, Thornwood, NY, USA）を用いて分析した。それぞれのホールマウントの四半部は、同一の露光設定下で5×で画像処理し、次いで、Photoshop（登録商標）（バージョン7.0）（Adobe, San Jose, CA, USA）において相互にマージした。

【0161】

画像分析：

錐体光受容体密度は、Image J（登録商標）ソフトウェア（National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）を使用して、中央および下位の網膜における、錐体アレスチン抗体に対して向けられた二次蛍光团により標識された細胞をカウントすることによって網膜ホールマウントにおいて分析した。これらの値は、図6に示す5×TIFファイルにおいてズームすることによって得た。5つの正方形（500 μm^2 ）は、処置および無処置GC1KO眼の中央および下位の網膜において同一のエリアにわたり配置した。中央の網膜については、正方形は、すべての眼において視神経乳頭のまわりに等しい偏心距離で配置した（125 μm ）。錐体光受容体を各それぞれの網膜エリアにおいてカウントし、値を平均し、標準偏差を計算した。標準的なt検定は、所望の試料の間のP値を計算するために使用した。有意差は、P値< 0.05として定義した。

【0162】

結果

光受容体機能（ERG）は、AAV処置GC1KOマウスにおいて修復された：

GC1KOマウスにおける錐体応答が、1月齢までわずかに検出可能であることが以前に報告された。本明細書で、発明者らは、光受容体特異的（hGRK1）またはユビキタス（smCBA）プロモーターの制御下にマウスGC1遺伝子を保持するAAVベクターを用いるこのマウスのP14処置が、ERGによって測定されるように、錐体光受容体機能の実質的な回復に至ったことを示した。代表的な錐体結果（図1）（ならびにhGRK1-mGC1処置、smCBA-mGC1処置、GC1KO、および同質遺伝+/+対照からの平均明所視b波振幅（図2Aおよび図2B））は、処置眼における錐体機能が注射後4週間で正常のおよそ45%まで修復されたことを示した。以前の報告と同様に、反対側の無処置眼における錐体応答はこの時点までに除去された。注射後4週間で、smCBA-mGC1処置眼における平均錐体媒介性b波振幅（65.1 μV ）は、無処置眼（3.9 μV ）よりも有意に高度であった（ $P=0.006$ ）。hGRK1-mGC1処置眼における平均錐体媒介性b波振幅（59.1 μV ）は、無処置眼（3.2 μV ）よりも有意に高度であった（ $P<0.001$ ）。光受容体特異的hGRK1-mGC1ベクターの送達後4週間で達成された回復のレベルは、ユビキタスプロモーター含有smCBA-mGC1ベクターを用いて達成されたものと有意に異なっていなかった（ $P=0.604$ ）。注射後3か月で、smCBA-mGC1処置眼における平均錐体媒介性b波振幅（53.3 μV ）は、無処置眼（2.8 μV ）よりも有意に高度であった（ $P<0.001$ ）。hGRK1-mGC1処置眼における平均錐体媒介性b波振幅（45.3 μV ）は、無処置眼（3.4 μV ）よりも有意に高度であった（ $P<0.001$ ）。光受容体特異的GRK1-mGC1ベクターの送達後3か月で達成された回復のレベルは、ユビキタスプロモーター含有smCBA-mGC1ベクターを用いて達成されたものと有意に異なっていなかった（ $P=0.331$ ）。両方のプロモーターは、短期で、GC1KOマウスの処置眼における錐体に対して同様のレベルの機能的な回復を与えた。重要なことには、錐体光受容体機能の回復は、3か月（本研究において評価した最後の時点（図1、図2A、および図2Bを参照されたい））間、安定したままであった。処置後4週間～3か月のsmCBA-mGC1処置またはhGRK1-mGC1処置眼の明所視b波振幅において有意差

はなかった（それぞれ $P = 0.174$ および 0.125 ）。

【0163】

LCAの他の形態（Sunら、2010年）を含む様々な網膜障害の診断において重要な特徴であるERGの絶対的な時間もまた、決定した。GC1KO眼（これらの眼においてERG応答はない）からそのような測定値を得ることはできないが、AAV-mGC1処置および同質遺伝+/+対照マウスにおける錐体b波の絶対的な時間を比較することは可能であった。注射後4週間で、処置および+/+対照眼において錐体b波の絶対的な時間の間で有意差はなく（ $P = 0.884$ ）、この時点でのAAV-mGC1処置および+/+眼における平均値は、それぞれ、 50.8 ms および 50.4 ms であった。注射後3か月で、2つの群の間の有意差もまたなく（ $P = 0.697$ ）、処置および+/+対照眼におけるすべての錐体b波の絶対的な時間の平均は、それぞれ、 59.7 ms および 58.3 ms であった。処置GC1KO網膜における錐体の応答反応速度（絶対的な時間測定によって決定される）は、短期において正常であり、かつ安定しているように思われた。

【0164】

GC1KOマウスにおける杆体ERGが1月齢までに改変を示し、杆体a波およびb波が両方とも著しく低下していることが以前に報告された（Yangら、1999年）。この低下は、5月齢で横ばい状態になり、応答は、野生型（WT）マウスのおよそ50~70%になる。AAV-mGC1媒介性の改善のいくつかの実例が、無処置対照と比べてGC1KOマウスの処置眼において観察されたが（図1において見られる例）、この結果は、錐体媒介性の応答において見られるものとそれほど一致していなかった。

【0165】

視覚的な行動はAAV処置GC1KOマウスにおいて修復された：

視運動分析は、smCBA-mGC1（M5、M6、M7）またはhGRK1-mGC1（M8、M9）を用いて処置したGC1KOマウスの眼が、すべての明所視錐体媒介性条件下で無処置眼よりも有意によく応答することを明らかにした。無処置GC1KO眼は、機能が不十分であり、1度当たり 0.163 ± 0.040 サイクルの視覚であった（図3Bおよび図3C、バー、平均 $\pm$ s.d.、 $n = 9$ の眼）。同質遺伝GC1+/+対照眼（M1、M2）は、有意によりよく応答し、1度当たり 0.418 ± 0.046 サイクルの平均視力を示した（ $n = 4$ の眼）。AAV-mGC1処置眼（M5~M9）は、1度当たり 0.392 ± 0.077 サイクルの平均視力を有し（ $n = 5$ の眼）、対照+/+眼と本質的に同一であり、かつ無処置GC1KO眼よりも有意によい（ $P < 0.0001$ ）レベルである。明所視コントラスト感度（図3Bおよび図3C）は、明所視力結果に類似し、AAV-mGC1処置眼（ 11.9 ± 7.37 のコントラスト感度、 $n = 5$ の眼）は、+/+マウス（ 11.94 ± 3.03 、 $n = 4$ の眼）とほぼ同一のコントラスト閾値を示した。さらに、AAV-mGC1を用いてP14に処置したGC1KO眼は、無処置眼よりも有意によく機能し、 1.27 ± 0.31 の平均コントラスト感度を示した（ $n = 9$ 、 $P < 0.0001$ ）。すべての明所視試験において、無処置GC1KO眼は、機能が非常に不十分であり、本質的に、錐体媒介性の機能がないに等しかった。これらの測定値の統計比較を表1に示す。行動分析において使用したすべてのGC1+/+（M1、M2）、GC1KO（M3、M4）、smCBA-mGC1処置（M5、M5、M7）、およびhGRK1-mGC1処置（M8、M9）マウスの錐体媒介性のERG結果は、視覚機能（視運動行動）を網膜機能（電気生理学）に関連づけるために、図3Aに示す。

【0166】

杆体網膜機能（ERG）は、GC1KOマウスにおいて部分的に保持されている。研究は、非常に小さなERG振幅でさえ、堅調な視覚的な行動に変わることを示した（Williamsら、2006年）。実際、AAV-RPE65療法を受けたLCA2患者は、ERG応答の完全な欠乏にもかかわらず行動的な回復を示すことが分かった（Maguireら、2008年）。視運動試験は、GC1KO眼の暗所視杆体媒介性の視覚およびコントラスト感度が、+/+対照に非常に類似することを明らかにした。この理由のために

、行動的なレベルについて処置対無処置眼の視覚的な回復を比較することは不可能であった。これらの測定値の統計比較を表 1 に示す。

【0167】

表 1

視運動行動によって測定される、WT、AAV-mGC1 処置、および無処置 GC1 KO 眼の明所視覚機能の統計比較

【0168】

【表 1】

明所視力			
	野生型 (WT)	処置	無処置
値の数	4	5	9
平均	0.4183	0.3919	0.163
標準偏差	0.0456	0.07731	0.03954
<i>P</i> 値			
WT 対 処置	0.5671	有意ではない	
WT 対 無処置	<0.0001		*
処置 対 無処置	<0.0001		*

明所視コントラスト感度			
	WT	処置	無処置
値の数	4	5	9
平均	11.94	11.16	1.27
標準偏差	3.03	7.37	0.31
<i>P</i> 値			
WT 対 処置	0.4186	有意ではない	
WT 対 無処置	<0.0001		*
処置 対 無処置	<0.0001		*

*= $p < 0.0001$

光受容体特異的およびユビキタスプロモーターは両方とも GC1 KO マウスの杆体および錐体において mGC1 導入遺伝子発現を駆動する：

GC1 欠損は、LCA1 患者において杆体および錐体光受容体の両方に影響を与える。そのため、光受容体特異的ヒト R K プロモーターおよびユビキタス smCBA プロモーターを、両方の細胞型を標的にする手段としてこの研究のために選んだ。ヒト R K プロモーターはその小さなサイズおよび光受容体細胞において特異的に導入遺伝子発現を効率的に駆動する能力のために選んだ。AAV-hGRK1-mGC1 を用いる処置後 3 か月の GC1 KO 網膜の免疫染色は、このプロモーターが光受容体外節において堅調な GC1 発現を駆動することを明らかにした。この処置用ベクターを注射した眼からの網膜断面の代表的な画像（図 4 A）は、OS 層において強い GC1 染色を示すのに対して、同じマウスからの反対側の無処置眼は、GC1 発現を欠く（図 4 B）。smCBA プロモーターもまた、光受容体細胞において GC1 発現を効率的に駆動した。光受容体 OS は、反対側の無処置眼（図 4 D）に比べて、処置眼（図 4 C）において堅調な smCBA 媒介性の GC1 発現を示した。hGRK1 および smCBA 媒介性の GC1 発現のレベルは、同質遺伝+/+ 対照眼において見られたものに近かった（図 4 E）。hGRK1-mGC1 処置眼における GC1 発現は、OS に限られた。smCBA-mGC1 処置眼では、GC1 発現は、外顆粒層の光受容体細胞体において時々見出された（たとえば、図 4 F の矢印を参照されたい）。しかしながら、特に、どちらのプロモーター構築物も、光受容体細胞の外側で処置用 GC1 の発現を駆動しなかった。オフターゲットの発現のこの欠乏は、将来の臨床の適用の発展に適切である。

【0169】

錐体アレスチン移動はAAV-mGC1処置GC1KOマウスにおいて修復された：

AAV-mGC1処置は、処置GC1KO網膜において錐体光受容体の、光誘発性の錐体アレスチン移動を修復した。錐体アレスチンに対して生成される抗体を用いて免疫染色した、代表的な処置、無処置、および+/+網膜横断切片は、錐体アレスチンが、+/+、smCBA-mGC1処置、およびhGRK1-mGC1処置錐体光受容体の外節、内節、軸索、およびシナプス末端に局在化したことを示した（それぞれ図5A、図5C、および図5D）。これに反して、錐体アレスチンは、無処置GC1KO網膜において錐体の外節にほとんど局在化し続けた（図5B）。この結果は、GC1KOマウス網膜における錐体が慢性的に過分極化しているという考えと一致していた。暗順応処置網膜における錐体アレスチン局在化の回復が観察されただけでなく、タンパク質の明らかなアップレギュレーションが、無処置対照と比べて処置眼において見られた。有意に、錐体細胞密度もまた、無処置対照と比べて処置眼においてより高いように思われた（たとえば図5A、図5B、および図5Cを参照されたい）。

10

【0170】

錐体光受容体はAAV-mGC1-処置GC1KOマウスにおいて保持された：

錐体アレスチンに対して向けられる抗体を用いて染色した、処置用ベクターを用いる注射後3か月の、smCBA-mGC1およびhGRK-mGC1処置ならびに非注射の反対側の網膜ホールマウントの分析は、処置用ベクターを用いる処置の結果として、錐体光受容体が保持されていることを明らかにした（図6）。処置および無処置網膜ホールマウントの両方の下位および中央の網膜における錐体光受容体のカウントは、処置対無処置眼の錐体細胞密度において統計的有意差があることを明らかにした。この結果は、堅調な電気生理学および行動的な回復がはっきりと明白であったという観察と一致していた。各々の処置用構築物を用いるGC1KOマウスのP14処置は、少なくとも3か月間、錐体光受容体構造を保持することができた。

20

【0171】

（実施例2）

GC1/GC2ダブルノックアウトを含有する動物モデル

GC1KOマウスにおいて錐体光受容体のみが影響を与えられている（杆体は部分的な機能を失っているのみであり、それらは変性していない）が、LCA1患者は、杆体機能損失および杆体変性を示すことに注目することは重要である。この差異についての理由は、杆体光受容体において発現されるGC1の密接な類縁体であるGC2に対する依存性における種特異的な差異であると推測される。推定上、GC2が活性を再構成することができるので、マウス杆体は、GC1の非存在下において機能することができるが、ヒトでは、これは当てはまらない。GC1は、杆体機能、よって杆体変性に必要とされる。GC1/GC2ダブルノックアウトマウスモデルを生成し、杆体機能損失を有することが示された（GC1KOにおいて見られるような錐体機能損失に加えて）（Baehrら、2007年）。GC2がGC1の非存在下において杆体機能を提供するものであることがこのモデルを用いる生化学的な研究を通して証明された。それでもやはり、ヒトの状態をより確実に模倣するのはGC1/GC2ダブルノックアウトマウスである（錐体および杆体の両方が影響を与えられている）（Karanら、2010年）。GC1/GC2ダブルノックアウトマウスにおいてrAAV-smCBA-mGC1およびrAAV-hGRK1-mGC1ベクターの両方を試験するために、rAAVベクターを、前述のGC1ノックアウト研究と正確に同じ様式および時間（出生後14日）で送達した。視力の回復の分析もまた、生理学的にまた行動的に、GC1ノックアウト研究について上記に記載されるものと同じ様式で実行する。杆体機能の測定可能な回復がGC1ベクター構築物を用いて処置したGC1/GC2ダブルノックアウトマウスにおいて期待されるので、暗所視（つまり杆体）応答が特に重要視される。

30

40

【0172】

（実施例3）

LCA1の「ヒト化」マウス動物モデル

50

本実施例は、L C A 1 の「ヒト化」マウス動物モデルの生成を記載する。一実施形態では、マウスモデルは、G C 1 / G C 2 / G C A P 1 ノックアウトを含有する。G C A P 1 は、G C 1 を活性化するタンパク質である。ヒトにおける使用のために設計した臨床グレード r A A V ベクターから発現されるヒト G C 1 を機能について評価することができる i n v i v o 系を生成するために、G C 1 / G C 2 / G C A P 1 トリプルノックアウト h G C A P 1 トランスジェニックマウスを利用した。このマウスでは、視覚機能は、h G C A P 1 のみと相互作用する r A A V 媒介性の h G C 1 に頼る（つまり、内因性マウス G C A P 1 は存在しない）。この研究から、ヒト G C A P 1 タンパク質がマウスモデルにおいてヒト G C 1 活性を刺激するために必要とされるかどうかおよび 2 つのヒトポリペプチドが疾患の非ヒト（つまりマウス）モデルにおいて再構成され、発現される場合に、錐体および杆体の機能を修復することができるかどうかを決定することが可能である。G C 1 / G C 2 / G C A P 1 トリプルノックアウト h G C A P 1 トランスジェニックマウスを生成するために、G C 1 / G C 2 ダブルノックアウトマウス（B a e h r ら、2 0 0 7 年）を G C A P 1 ノックアウトマウス（M e n d e z ら、2 0 0 1 年）と交雑した。次いで、G C 1 / G C 2 / G C A P 1 トリプルノックアウト h G C A P 1 トランスジェニックマウスを生成するために、ヒト G C A P 1 を、動物モデルにおいて遺伝子導入発現させる。r A A V ベクター h G C 1 がこれらの動物に提供される研究は、G C 1 ノックアウト研究において使用される方法と実質的に同一の様式で行う。視力の回復の分析は、次いで、生理学的にまた行動的に、G C 1 ノックアウト研究において実行した同じ様式で実行する。

【0173】

（実施例 4）

本発明の実施において有用な例示的なベクター構築物

2 つの例証となるベクターのマップを図 1 1 に示す。一方は、非特異的プロモーター s m C B A を含有し、他方は、杆体／錐体に限られるプロモーター G R K 1 を有する。両方とも、血清型 5 A A V の中にパッケージされている。現在まで試験したベクター用量はすべて、マウス網膜において安全である。次いで、G C 1 - / - マウスのコホートは、出生後の 1 4 日目（P 1 4）に網膜下に注射し、次いで、E R G によっておよび明所視視動性（錐体媒介性）行動によって周期的に分析した。G C 1 - / - マウスが杆体媒介性の E R G を維持するので、機能的な奪回のモニタリングは、主として、錐体機能の回復に集中した。s m C B A ベクターについては、E R G は、処置後 4 週間およびその後、処置後 1 2 ~ 1 3 週間まで 2 週間ごとに評価した。9 匹のマウスにおいて処置した 9 つの眼はすべて、処置に応答した。下記に示す結果は、対照無処置眼における本質的に記録可能でないものからの、パートナーのベクター処置眼における正常のおよそ 5 0 % までの明所視 E R G 振幅の有意な回復を実証する。

【0174】

次いで、4 匹の G C 1 - / - マウスを、処置対無処置パートナー眼によって媒介される差異について暗所視視動性行動によって分析した（下記に示す）。4 つの処置眼（2 8 9、2 9 0、2 9 4、2 9 5、赤色のバー）はすべて、それらの対照眼と比較して視覚における有意な改善を示し、4 つのうちの 3 つは、有意に改善されたコントラスト感度を示した。マウス 2 9 7 および 2 9 8 は野生型対照であり、マウス 2 9 9 は無処置 G C 1 - / - マウスであった。結果は、L C A 1 の動物モデルにおいてベクターが錐体媒介性の視力の機能的および行動的な回復を達成したことを実証する。

【0175】

発現を杆体および錐体に限る G R K 1 ベクターについては、E R G は、処置後 4 週間およびその後、処置後 1 2 ~ 1 3 週間まで 2 週間ごとに、一方の眼を処置した 1 4 の G C 1 - / - マウスにおいて評価した。1 2 の動物における 1 4 の処置眼のうちの 1 2 が応答した。結果（下記に示す）は、対照無処置眼における本質的に記録可能でないものからの、パートナーのベクター処置眼における正常のおよそ 4 0 % までの明所視 E R G 振幅の有意な回復を明らかにする。

【0176】

次いで、1匹のG C 1^{-/-}マウス（# 2 9 3）を、処置対無処置パートナー眼における差異について暗所視視動性行動によって分析した（上記に示す）。このマウスは、その対照の左眼（青色のバー）に比べて、ベクター処置右眼（赤色のバー）において視覚およびコントラスト感度の両方における有意な改善を示した。応答は、対照野生型マウス（2 9 7および2 9 8）とほぼ等しく、無処置G C 1^{-/-}マウス（2 9 9）と比較して有意に改善した。そのため、G R K 1ベクターが、L C A 1のこのモデルにおいて錐体媒介性の視力の機能的および行動的な回復もまた達成することが結論付けられた。

【0 1 7 7】

（実施例 5）

w t G C 1の特異的な錐体ターゲティングは奪回を改善する

10

上記に示すデータは、杆体／錐体に限られるG R K 1プロモーターにより錐体機能および錐体媒介性の行動を奪回することができることをはっきりと実証する。ヒトL C A 1が杆体および錐体欠乏の両方を示すので（主として錐体欠乏を示すG C 1^{-/-}マウスと異なり）、発現は、純粋な錐体特異性を獲得するためにさらに限られる必要はない。しかしながら、研究するのに重要であるマウスモデルにおける1つの最終的な錐体表現型がある：暗順応条件では、錐体アレスチンは、野生型網膜のように、錐体外節から内節、軸索、およびシナプス末端に通常移動しない。そのため、研究は、この細胞の生物学的表現型もまたベクター処置G C 1^{-/-}眼において修正されたかどうかを評価するために実行した。示す結果では、G C 1^{-/-}マウスはG R K 1ベクターを用いて一方の眼を処置し、次いで、注射後7週間目にマウスを暗順応させた。次いで、処置（最下位のパネル）および対照（上位のパネル）網膜を免疫組織化学的検査によって錐体アレスチン局在化について分析した。無処置G C 1^{-/-}網膜（上位のパネル）では、錐体アレスチンは、ほとんど錐体外節（O S）およびシナプス層（S L）に残った。対照的に、反対側の処置網膜（最下位のパネル）では、実質的な画分（約5 0 %）が内節およびシナプス末端に移動した。そのため、ベクター処置がまた錐体アレスチンの適切な移動を修復したことが結論付けられた。

20

【0 1 7 8】

（実施例 6）

r A A Vベクター遺伝子構築物を使用するL C A 1の長期処置効果

先の実施例は、マウスG C 1^{-/-}c D N A（光受容体特異的ヒトロドプシンキナーゼ[h G R K 1]またはユビキタス[s m C B A]プロモーターによって駆動される）を含有するr A A Vベクターの網膜下注射が、少なくとも3か月間、G C 1 K Oマウスにおいて錐体媒介性の機能および視覚的な行動を修復することができ、錐体光受容体を保持することができたことを実証した。

30

【0 1 7 9】

本実施例では、発明者らは、長期処置効果もまたL C A 1のげっ歯動物モデルにおいて達成可能であるかどうかを評価した。さらに、発明者らは、杆体および錐体の両方の構造および機能の損失を示し、表現型がヒトL C A 1に類似するモデルであるG C 1/G C 2ダブルノックアウトマウス（G C d k o）の光受容体へのG C 1の送達、これらの細胞に処置効果を与えるかどうかを検査した。

40

【0 1 8 0】

方法

A A V 5-h G R K 1-m G C 1、A A V 5-s m C B A-m G C 1、または高度に効率的なカプシドチロシン変異体A A V 8（Y 7 3 3 F）-h G R K 1-m G C 1の網膜下注射を、出生後1 4日（P 1 4）～P 2 5に、G C 1 K OまたはG C d k oマウスの一方の眼において実行した。杆体および錐体光受容体機能を網膜電計で（e l e c t r o r e t i n o g r a p h i c a l l y）アッセイした。処置用G C 1の発現の局在化および錐体光受容体保持の程度は、免疫組織化学的検査によって決定した。体内分布研究は、処置動物の視神経および脳におけるベクターゲノムの存在を評価するために使用した。

【0 1 8 1】

50

結果

錐体光受容体機能は、すべてのベクターを用いて処置したG C 1 K Oマウスにおいて修復され、A A V 8 (7 3 3) が最も効率的であった。応答は、処置後少なくとも1 0 か月間、安定していた。処置用G C 1 は、光受容体外節において見出された。注射後1 0 か月の間は、A A V 5 およびA A V 8 (7 3 3) ベクターゲノムは、G C 1 K Oマウスの処置眼の視神経においてのみ検出された。A A V 8 (7 3 3) ベクターm G C 1 は、処置G C d k oマウスにおいて杆体および錐体の両方の機能を修復した。

【0182】

結論

長期処置効果は、本明細書において開示されるr A A Vベクター構築物を使用すると、G C 1 欠損の哺乳動物モデルであるG C 1 K Oマウスにおいて達成可能である。重要なことには、療法はまた、L C A 1 杆体／錐体表現型を模倣するG C d k oマウスにおいても達成可能であった。これらの結果は、網膜ジストロフィー、特にL C A 1 の処置のためのr A A Vベースの遺伝子療法ベクターの使用のための証拠を提供する。

【0183】

(実施例7)

G C 1 K Oマウスにおける遺伝子療法による錐体光受容体の長期の保持および錐体機能の回復

先の実施例では、光受容体特異的(h G R K 1)またはユビキタス(s m C B A)プロモーターによって駆動されるマウスG C 1 c D N Aを含有する網膜下A A V 5 ベクターが、3 か月間、G C 1 K Oマウスにおいて、錐体媒介性の機能および視覚的な行動を修復することができ、錐体光受容体を保持することができることが示された。本実施例では、長期処置効果と同じマウスモデルを使用して評価する。A A V 5 - h G R K 1 - m G C 1、A A V 5 - s m C B A - m G C 1、または高度に効率的なカプシドチロシン変異体A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 を、出生後1 4 日 (P 1 4) ~ および出生後の日 (P 2 5) に、G C 1 K Oマウスの網膜下に送達した。網膜機能は、網膜電位図 (E R G) によってアッセイした。A A V 媒介性のG C 1 発現の局在化および錐体存続は、免疫組織化学的検査を用いてアッセイした。網膜を越えるベクターゲノムの広がり、視神経および脳組織のP C Rによって定量化した。錐体機能は、試験したすべてのベクターにより修復され、A A V 8 (Y 7 3 3 F) が最も効率的であった。G C 1 のA A V 媒介性の発現は、もっぱら光受容体において見出された。注射後1 0 か月の間は、A A V ゲノムは、処置眼の視神経においてのみ検出された。これらの結果は、長期処置効果が、G C 1 欠損の哺乳動物モデルにおいて達成可能であることを初めて実証する。

【0184】

G U C Y 2 Dによってコードされる網膜グアニル酸シクラーゼ-1 (G C 1) は、脊椎動物光伝達において重要な機能に果たす (P u g h ら、1 9 9 7 年) 。光刺激の後に、セカンドメッセンジャーサイクリックG M P (c G M P) は、光受容体細胞内で、ホスホジエステラーゼ (P D E 6) によって急速に加水分解され、c G M P 感受性カチオンチャネルの閉鎖および細胞の過分極に至る。細胞質内 [C a ²⁺] が5 0 n M以下に低下すると、G C 1 は、小さなC a ²⁺ 結合タンパク質、G C A P (グアニル酸シクラーゼ活性化タンパク質) によって活性化される。G C 1 は、c G M P 感受性チャネルに結合し、再び開くc G M Pを合成し、「暗」脱分極状態に光受容体を戻す (P u g h ら、1 9 9 7 年 ; P o l a n s ら、1 9 9 6 年 ; W e n s e l、2 0 0 8 年 ; L a m b および P u g h、2 0 0 6 年 ; A r s h a v s k y ら、2 0 0 2 年) 。したがって、G C 1 は、光暗および回復サイクルにおいて重大な役割を果たし、c G M Pを介して、細胞内カルシウムレベルおよび光受容体の分極状態を連結するフィードバックループの中心になる。

【0185】

G C 1 は、ヒト、サル、およびマウス網膜の杆体および錐体光受容体の外節において発現される (D i z h o o r ら、1 9 9 4 年 ; L i u ら、1 9 9 4 年 ; H a i r e ら、2 0 0 6 年) 。他の膜グアニル酸シクラーゼのように、それは、N ' 末端シグナル配列、細胞

10

20

30

40

50

外ドメイン（ECD）、1回膜貫通ドメイン、キナーゼ様相同性ドメイン（KHD）、二量体化ドメイン（DD）、およびC'末端触媒ドメイン（CCD）を含有し、おそらくホモマー二量体として存在する（YangおよびGarbers、1997年）。GUCY2Dにおける変異は、それぞれ、劣性レーバー先天性黒内障1（LCA1）ならびに錐体杆体ジストロフィーの優性および劣性形態、CORD6およびCORDと関連する（Perraultら、1996年；Perraultら、2000年；Kelsellら、1998年；Perraultら、1998年；Gregory-Evansら、2000年；Weigell-Weberら、2000年；Ugurら、2010年）。LCA1は、光受容体変性に先行する網膜電位図（ERG）消滅によって特徴付けられる、重症で、初期の発病である常染色体劣性失明障害である（Perraultら、1999年；ChungおよびTraboulsi、2009年）。CORD6は、進行性の夜盲症および周辺視野損失に至る、視覚および色覚の早期喪失、その後続く杆体の変性を引き起こす、錐体で始まる、光受容体の進行性の変性によって特徴付けられる優性障害である（Kelsellら、1998年；Perraultら、1998年）。CORD6変異は、二量体化ドメイン（DD）に限られ、GC1のGCAP媒介性の活性化の増加を一般に引き起こす（Payneら、2001年；Downesら、2001年；Wilkieら、2000年）。最近発見された、劣性CORDを引き起こす変異は、GC1の触媒ドメイン（CD）に位置し、酵素機能を全体的に低下させると考えられる（Ugurら、2010年）。LCA1を引き起こす変異は、GC1のECD、KHD、DD、およびCCDドメインの全体にわたって分布する（Karanら、2010年）。これらの変異は、酵素の構造および安定性を改変し、他の周辺膜結合タンパク質の逆行性輸送に影響を与える可能性があり、しばしばヌルである。

【0186】

GC1KOマウスは、GUCY2Dのマウス相同体であるGucy2eにおいてヌル変異を保持する。LCA1患者のように、このモデルにおける錐体機能の損失は、錐体変性に先行する（Timmersら、2001年）。杆体は、マウス光受容体における他の機能的なグアニル酸シクラーゼであるGC2の存在によりそれらの機能の30～50%を保持し、変性しない（YangおよびGarbers、1997年；Jacobsonら、2006年；Timmersら、2001年；Cideciyanら、2008年；Songら、2002年）。前の実施例では、光受容体特異的ヒトロドプシンキナーゼ（hGRK1）またはユビキタス（smCBA）プロモーターによって駆動されるマウスGC1cDNAを含有する血清型5アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの網膜下注射が、3か月間、GC1KOマウスにおいて、錐体媒介性の機能および視覚的な行動を修復することができ、錐体光受容体を保持することができることが示された。本研究では、AAV媒介性の遺伝子置換療法は、長期にわたりGC1KOマウスに療法を提供するその能力について評価した。AAV5-hGRK1-mGC1およびAAV5-smCBA-mGC1および高度に効率的なカプシドシロシン変異体ベクターAAV8（Y733F）-hGRK1-mGC1を、出生後14日（P14）～出生後25日（P25）に、GC1KOマウスの網膜下に送達した。これらの発見は、長期処置効果が、GC1欠損の哺乳動物モデルにおいて達成可能であることを初めて実証する。ベクターゲノム体内分布もまた、AAV5およびAAV8（733）ベースのベクターについて評価した。これらの発見は、LCA1（およびおそらく錐体杆体ジストロフィー）のためのAAVベースの遺伝子療法臨床試験の発展と直接的な関係があり、光受容体関連遺伝子における欠陥によって媒介される広範囲の劣性網膜変性のための標準化されたベクター設計を開発するのを支援する。

【0187】

材料および方法

実験動物：

Jackson Laboratory（Bar Harbor、ME、USA）によって提供されたGC1+/-マウスのヘテロ接合性の交配から誘導したGC1KOおよび類遺伝子+/+対照を、12時間/12時間の光/暗サイクル下で発明者らの施設内の動

物ケア施設において飼育し、維持した。飼料および水は自由に動物が利用し得る形態とした。研究はすべて、ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and NIH regulationsに従って行った。

【0188】

AAVベクターの構築：

マウスGC1 (mGC1) cDNAを駆動するユビキタス (smCBA) または光受容体特異的ヒトロドプシンキナーゼ (hGRK1) プロモーターを含有する血清型5アデノ随伴ウイルス (AAV5) ベクタープラスミドを、以前に記載される方法 (Boyeら、2010年) に従って生成した。AAV2カプシド上の表面暴露チロシン残基の部位特異的変異誘発が報告されている (Zhongら、2008年)。同様の方法を、本明細書で記載されるAAV8 (Y733F) カプシド変異体を生成するために使用した。ベクターはすべて、以前に記載される方法に従って、パッケージし、精製し、力価を測定した (Zolotukhinら、2002年; Jacobsonら、2006年)。AAV5-smCBA-mGC1、AAV5-hGRK1-mGC1、およびAAV8 (Y733F) -hGRK1-mGC1についての結果として生じる力価は、それぞれ、1ml当たり 4.69×10^{12} ベクターゲノム (vg/ml)、 4.12×10^{13} vg/ml、および 1.08×10^{13} vg/mlであった。

【0189】

網膜下注射：

AAV5-smCBA-mGC1 (4.69×10^9 ベクターゲノム)、AAV5-hGRK1-mGC1 (4.12×10^{10} ベクターゲノム)、またはAAV8 (Y733F) -hGRK1-mGC1 (1.08×10^{10} ベクターゲノム) のうちの1 μ Lを、出生後の14日 (P14) ~出生後の25日 (P25) に、GC1KOマウスの一方の眼の網膜下に注射した。反対側の対照眼には、注射しなかった。網膜下注射は、先に記載されるように実行した (Timmersら、2001年)。さらに、分析は、比較可能で好結果の注射 (最小限の合併症を有する>60%の網膜剥離) を受けた動物に対してのみ実行した。すべてのコホートのおよそ75%は、「好結果の」注射を受けた。ベクター形質導入のエリアが少なくとも網膜剥離のエリアに相当することは十分に立証される (Timmersら、2001年; Cideciyanら、2008年)。

【0190】

網膜電図検査分析：

処置GC1KOおよび年齢が一致する類遺伝子 (+/+) 対照のERGは、わずかな改良を伴う先に記載される方法に従って (Haireら、2006年; Boyeら、2010年)、PCベースの制御および記録ユニット (Toennies Multiline Vision; Jaeger/Toennies、Hoechberg、Germany) を使用して記録した。AAV5-smCBA-mGC1処置GC1KOマウス (n=10)、AAV5-hGRK1-mGC1処置GC1KOマウス (n=6)、AAV8 (Y733F) 処置GC1KOマウス (n=6)、および類遺伝子 (+/+) 対照 (n=8) の記録は、異なる日に始め、そのため、マウスのサブセットはそれぞれ、長さがわずかに異なる時間、モニターした。処置GC1KOマウスのERGは、注射後4週間、その後、注射後1年 (AAV5処置マウス) または注射後9か月 (AAV8 [Y733F] 処置マウス) まで毎月記録した。年齢が一致する類遺伝子 (+/+) 対照マウスは、8か月間、続けた。マウスは、様々な死後の研究 (体内分布研究、網膜免疫組織化学分析、網膜組織のリアルタイムRT-PCR) または予期しない疾病/死亡のために、実験を通じて異なる時点で研究から取り出した。ERGデータは、n>3を有する動物のグループにのみ行った。そのため、この研究は、AAV5処置マウスについての注射後9か月およびAAV8 (Y733F) 処置マウスについての注射後6か月の発見を比較する。処置マウスは、これらの時点を過ぎてもERG応答を示し続けたが、しかしながら、試料サイズは十分に低下し、統計分析はもはや役に立たなかった。この主張を立証するために、AAV5

ベクターを用いる処置後1年およびAAV8 (Y733F)を用いる処置後9か月の個々のマウスからの代表的な錐体媒介性の結果を示す。暗所視(杆体媒介性)および明所視(錐体媒介性)記録は、以前に記載される記録パラメーター(Boyeら、2010年)を使用して引き出した。b波振幅は、a波トラフおよびそれぞれの波形の続くポジティブピークの間の差異として定義した。無処置GCLKOマウスにおける杆体媒介性のERG応答は、動物によって多様であり(Yangら、1999年)、よって、異なる動物からの暗所視aおよびb波振幅を平均する場合、大きな標準偏差が観察された。杆体ERGデータは、比の形式で示す(個体内の処置対無処置杆体aおよびb波振幅の平均)。そのため、1を超えるいかなる値も、AAV-mGCL処置が杆体応答を改善したことを示す。比は、 1 cd/m^2 刺激を用いて生成された振幅を使用して計算した。 12 cd/m^2 で生成された処置GCLKOマウスおよび類遺伝子(+/+)対照マウスすべての注射および非注射眼における明所視錐体媒介性b波最大振幅は、それぞれの時点で平均し、標準誤差を生成するために使用した。データはすべて、最終的なグラフ表示のためにSigma Plotにインポートした。標準的なt検定は、データセットの間のP値を計算するために使用した。有意差は、 $P < 0.05$ として定義した。

【0191】

体内分布：

処置GCLKOマウスの組織におけるベクターDNAの広がり、わずかな改良を伴う以前に記載される方法(Jacobsonら、2006年)に従って、安楽死時に収集した試料において決定した。ベクター処置マウスは、以下の時点で安楽死させた：AAV8 (Y733F)-hGRK1-mGCL処置マウス(注射後4か月： $n=1$ ；注射後7か月： $n=1$)、AAV5-smCBA-mGCL(注射後7か月： $n=1$ ；注射後10か月： $n=5$)、AAV5-hGRK1-mGCL(注射後7か月： $n=1$ ；注射後10か月： $n=1$)。注射後7か月または注射後10か月の時点と年齢が一致するGCLKOマウスからの対照組織もまた、実験動物と一緒に評価した。安楽死の後に、異なる新しいピンセットを、およそ0.5cmの近位視神経を保持する処置および無処置眼を摘出するために使用した。次いで、異なる新しい解剖はさみは、眼球から視神経を切り取るために使用し、この後、それらは、液体窒素中でスナップ凍結し、 -80°C に移し、ここでそれらはDNA抽出の時間までそのままとした。眼球は、4%パラホルムアルデヒド(PAF)中に浸し、免疫組織化学的検査のために処理した(以下を参照されたい)。

【0192】

脳は、取り出し、ステンレス鋼マウス冠状脳マトリックス(Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)は、視覚特異的な領域を単離するために使用した。右および左の外側膝状核は、ベクターゲノムを脳から回収し、免疫組織化学的検査が必要である場合に、処置群当たり1匹のマウスから収集し(最も後の時点)、ホルマリン固定し、保存した。視路を含有する右および左の脳の別々の部分を収集し、液体窒素中でスナップ凍結し、 -80°C に移し、ここでそれらはDNA抽出の時間までそのままとした。組織を収集する間にクロスコンタミネーションを回避するように注意した。ゲノムDNAは、メーカーのプロトコール(Qiagen DNeasy tissue kit)に従って組織から抽出した。結果として生じるDNA濃度は、Eppendorf Biophotometer (Model 6131; Eppendorf, Hamburg, Germany)を使用して決定した。定量的PCRは、わずかな改良を伴う以前に記載される方法に従って実行した(Jacobsonら、2006年；Songら、2002年；Poirierら、2004年)。

【0193】

プライマー対は、それぞれのベクターゲノムにおけるSV40ポリアデニル化シグナル(SV40ポリA)領域に対して設計し、標準曲線は、同じSV40ポリA標的配列を含有する既知濃度のプラスミドDNAを使用して確立した。DNA試料は、三通りアッセイした。PCRの阻害による偽ネガティブを除外するために、第3の反復実験に、100コピー/ゲノムDNA $1\mu\text{g}$ の比で標的(SV40ポリA)を含有するプラスミドDNAを

「加えた (spike)」。 >40 コピーの spike-in DNA が検出された場合、試料は、ベクターゲノムコピーを報告するのに許容されと考えられた。いくつかの場合には、「spike in」できない試料は、PCR 反応において $1\text{ }\mu\text{g}$ 未満のゲノム DNA を使用して再分析し、それによって、PCR 阻害剤を希釈し、抽出した組織における DNA と同時精製した。spike-in コピー数は、 100 コピー/ μg DNA 比を維持するために比例して低下した。ベクターゲノムコピーを報告する基準は、以前に記載される方法 (Jacobson ら、2006 年) に従って確立した。手短かに言えば、 100 を超えるゲノムコピー/ μg は、ポジティブであると考えられ、測定されたコピー数/ μg を報告した。 100 未満のコピー/ μg は、ネガティブであると考えられた。

【0194】

組織調製、免疫組織化学的検査、および顕微鏡検査法：

安楽死時に、注射後 7 か月 [AAV8 (Y733F) -hGRK1-mGC1] ならびに 10 か月 (AAV5-smCBA-mGC1 および AAV5-hGRK1-mGC1) に実行した体内分布研究と同時に、処置 GC1 KO マウス、年齢が一致する無処置 GC1 KO マウス、および年齢が一致する類遺伝子 GC1+/+ マウスの縁郭に、12 時の位置に熱い針を用いてマークし、方向づけを容易にした。無処置 GC1 KO および GC1+/+ 対照は、AAV8 (Y733F) 処置マウスと年齢が一致した (安楽死時、8 月齢)。凍結切片法のために指定した眼は、以前に記載される方法に従って処理し、免疫染色した (Haire ら、2006 年)。手短かに言えば、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 網膜切片は、GC1 (ウサギポリクローナル 1:200、sc-50512 Santa Cruz Biotechnology、USA) またはマウス錐体アレスチン (ウサギポリクローナル「LUMIj」、1:1000、Dr. Cheryl Craft、University of Southern California、Los Angeles、CA、USA によって提供) に対して向けられる抗体と共にインキュベートした。一次インキュベーションの後に、IgG 二次抗体 Alexa-488 または Alexa-594 は、それぞれ、室温で、1 時間、適用した ($1\times\text{PBS}$ 中 1:500)。切片は、室温で、5 分間、4'、6' - ジアミノ - 2 - フェニル - インドール (DAPI) を用いて対比染色した。注射後 11 か月目に、一方の眼にのみ AAV5-smCBA-mGC1 を用いる処置を受けたある GC1 KO マウスを安楽死させ、処置および無処置眼からの網膜ホールマウントを、以前に記載される方法に従って処理した (Pang ら、2010 年)。手短かに言えば、ホールマウントは、LUMIj (1:1000)、その後続けて IgG 二次 Alexa-594 ($1\times\text{PBS}$ 中 1:500) を用いて染色し、網膜の上部 (背側) の部分を 12 時に方向づけてスライド上に置いた。網膜切片は、LCS Version 2.61、Build 1537 ソフトウェアを装備した共焦点顕微鏡検査法 (Leica TCS SP2 AOBS Spectral Confocal Microscope) によって分析した。画像は、 $20\times$ の倍率で同一の露光設定で撮った。網膜ホールマウントは、QImaging Retiga 4000R Camera および QImaging QCapture Pro ソフトウェアを装備した広視野蛍光顕微鏡 (Zeiss Axioplan 2) を用いて分析した。それぞれのホールマウントの四半部は、同一の露光設定下で $10\times$ で画像処理し、次いで、Adobe Photoshop において相互にマージした。

【0195】

イムノプロットティング：

注射後 7 か月目に、AAV8 (Y733F) -hGRK1-mGC1 を注射したあるマウスおよび年齢が一致する類遺伝子 GC1+/+ (対照) マウスを安楽死させ、それらの眼を摘出し、 $1\times\text{PBS}$ 中に配置した。網膜は直ちに解剖し、以下のように処理した。個々の網膜は、 4°C で、1 時間、1% Triton X-100 および complete protease inhibitor (Roche) を有する PBS (137mM NaCl、 2.7mM KCl、 10mM Na_2HPO_4 、 1.8mM KH_2PO_4) において可溶性にし、その後 14000 rpm で遠心分離を続けた。上清のタンパク

10

20

30

40

50

質濃度は、BCA (Pierce) によって決定し、15 μ g のそれぞれの試料を、12 %ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad) 上で分離し、15 %メタノールを含有する移行緩衝剤 (25 mM Tris、192 mMグリシン) において1時間、Immobilon-FL膜上に移した。ブロットは、ブロッキング緩衝剤 (Li-Cor) を用いて処理し、GC1を認識するマウスモノクローナル抗体 (IS4、1:3000、Dr. Kris Palcowski、Case Western University、USAによって提供) ならびにGCAP1 (pAb UW14、1:25,000、Dr. Wolfgang Baehr、University of Utahによって提供) および β -アクチン (1:5000、Abcam) に対して産生されるウサギポリクローナル抗体を用いて1時間、標識した。二次抗体 (CW800にコンジュゲートされたヤギ抗マウスIgおよびIR680とコンジュゲートされたヤギ抗ウサギ) を1時間、適用し、ブロットは、Odyssey Infrared Imaging System (Licor、Lincoln、NE、USA) を用いて画像処理した。

【0196】

rtPCRによるmRNAの定量、網膜ゲノム回収、および視神経IHC

視神経が付属した個々の処置眼は、AAV8 (Y733F) -hGRK1-mGC1またはAAV5-smCBA-mGC1および年齢が一致する無処置GC1+/+マウスと共に処置後1年のGC1KOマウスから収集した。網膜は、直ちに眼から切り分け、液体窒素中でスナップ凍結させた。視神経は、眼から分離し、4℃で、一晩、4%パラホルムアルデヒドにおいて固定し、4℃で、2時間、30%スクロース中に浸し、次いで、ドライアイス/エタノールのバスにおいてクライオスタット化合物 (Tissue Tek (登録商標) OCT 4583; Sakura Finetek USA, Inc.、Torrance、CA、USA) 中で速やかに凍結させた。視神経は、10 μ mで切片化し、以前に記載される方法に従って染色した (Boyeら、2010年)。網膜は、45秒間、350 mLの緩衝剤RLT (RNeasy (登録商標) Protect Mini Kit、Qiagen, Inc.、Valencia、CA、USA) およびBMEにおいてホモジナイズした。試料は、遠心分離し、溶解物は、半分に分離した (一方の半分はゲノム回収および他方の半分はRNA抽出に指定した) (TraintおよびWhitehead、2009年)。ゲノム回収は、上記に記載されるように実行した。RNA抽出は、RNeasy (登録商標) Protect Mini Kit (Qiagen, Inc.) を用いて実行した。RNAは、以下の網膜特異的mRNAを測定するために、逆転写し (iScript (登録商標) cDNA synthesis kit、Biorad Laboratories、Hercules、CA、USA)、リアルタイムPCRにおいて使用した (iQ SYBR (登録商標) Green SupermixおよびiCycler (登録商標) thermal cycler、Biorad Laboratoriesと接続されたMyiQ real-time PCR detection system): グアニル酸シクラーゼ-1 (GC1)、グアニル酸シクラーゼ活性化タンパク質-1 (GCAP1)、錐体トランスデューシン α (GNAT2)、杆体cGMP特異的3', 5'環状ホスホジエステラーゼサブユニットアルファ (PDE6 α)、およびハウスキーピング遺伝子、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)。

【0197】

GCAP1、GNAT2、PDE α 、およびGAPDHについてのプライマー対は、Baehrら (2007年) によって使用されるものと同一のものとした。マウスGC1についてのプライマー (フォワードプライマー: 5'-GACCCCTTCCTGCTGGTTCGATCCA-3' [配列番号16]、リバースプライマー: 5'-CTGCATGTGTAGCAGCCTGTGCCCTC-3' [配列番号17]) は、GC1KOマウスにおける遺伝子破壊の部位 (Yangら、1999年) であるエクソン5の側面に位置し、かつ151 bpの増幅産物を生成するように設計した。PCRは、期待されるように、無処置GC1KO網膜ではなく、GC1+/+およびAAV-mGC1処置GC1KO網

10

20

30

40

50

膜試料において適切なサイズの増幅産物を産生した。増幅産物同一性は、標的配列内で切断して、56bpおよび95bpの断片を得るStuI (NEB)を用いる制限消化物によって検証した。逆転写DNA (GC1+/+およびAAV-mGC1処置GC1KO網膜試料の両方からの)の希釈系列に対するGC1およびGAPDHプライマーを用いるrtPCRは、同様の傾斜をもたらし、内因性およびベクター媒介性のGC1メッセージの両方を定量化するためのGC1プライマーの適合性を示した(図20Aおよび図20B)。

【0198】

結果は、3つの反復反応の平均であり、試料を標準化するためのGAPDHシグナルおよび較正物質として役立つGC1+/+試料を用い、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法(LivakおよびSchmittgen, 2001年)を使用して計算した。標準偏差は、それぞれの試料について行った3つの反復反応から計算した。データは、GC1+/+試料と比べたmRNAレベルにおける倍数変化として示す。

【0199】

結果

長期光受容体特異的GC1発現:

GC1に対して向けられる抗体を用いる免疫染色は、AAVベクター処置用タンパク質発現が、かなりの割合の動物の生涯の間、処置GC1KOマウスの光受容体においてもっぱら持続することを明らかにした; AAV8 (Y733F)-hGRK1-mGC1は少なくとも7か月、AAV5-smCBA-mGC1は少なくとも10か月、およびAAV5-hGRK1-mGC1は少なくとも10か月(図21Aおよび図21B)。GC1発現は、AAV8 (Y733F)-hGRK1-mGC1ベクターを用いて処置した杆体および錐体の外節に限られたのに対して、AAV5-smCBA-mGC1を用いて処置した眼の外節およびよりまれに光受容体細胞体の両方において見出され、光受容体特異的hGRK1と比べたこのユビキタスプロモーターの強さと一致する結果であった(Beltranら, 2010年)。網膜菲薄化の2つの例が観察された。第1のものは、AAV5-smCBA-mGC1(送達された 4.69×10^9 の全ベクターゲノム)を用いて処置されたGC1KO網膜であった。外顆粒層(ONL)は、ナীবGC1KOまたはGC1+/+対照網膜(両方とも8月齢)において見られたものに比べてわずかに薄くなった。これは、smCBAプロモーターによって媒介されたGC1の過剰発現の結果であるかもしれない(Beltranら, 2010年)。

【0200】

第2のものは、より濃度の高いAAV5-hGRK1-mGC1を用いて処置したGC1KO網膜を含み、すでに述べたように、光受容体特異的GC1発現を示したが、外顆粒層の深刻な菲薄化を伴った。このベクターは、本研究において評価した3つのうちで最も濃度の高いものであったことに注目されたい(送達した 4.12×10^{10} ベクターゲノム対それぞれ、AAV5-smCBA-mGC1プレップおよびAAV8 (Y733F)-hGRK1-mGC1について 4.69×10^9 および 1.08×10^{10})、また、さらに、GC1の過剰発現が、観察された菲薄化の原因であるかもしれないことを強調する。少なくとも、これらの結果は、用量制限毒性がマウスにおいて観察可能であるかもしれないことを示唆する。GC1発現は、無処置GC1KO網膜においてなかった(図21Aおよび図21B)。

【0201】

長期錐体光受容体存続はAAVベクターGC1によって達成される

処置および無処置GC1KOマウスならびにGC1+/+対照における錐体光受容体は、マウス錐体アレステチンを染色することによって同定した。最終的な体内分布研究のために安楽死させたマウスからの網膜横断切片およびAAV5-smCBA-mGC1(右眼のみ)を用いる処置後11か月のGC1KOマウスからの網膜ホルマウントを分析した。本明細書で、錐体光受容体密度が、10月齢までに無処置GC1KO網膜において著しく低下したことが示され、錐体が、このマウスモデルにおいて組織分布的に特異的な様式

10

20

30

40

50

で失われているという先の報告を確認する (Colemanら、2004年) (図21A および図21B)。ホールマウント分析は、11月齢の無処置網膜がまばらな錐体密度を示し、残存性の錐体は、もっぱら、上部の網膜領域において見出されたことを明らかにするのに対して、パートナーのP14処置網膜は、おそらく網膜下注射の間にベクターに暴露されず、そのため、導入遺伝子産物を含むしなかった側頭の網膜のわずかな部分を除いて、非常に高度な錐体密度をあらゆる部分で保持した。AAV5処置網膜において見られたものと比較して、AAV8 (Y733F) 処置マウスの網膜横断切片における錐体密度および構造は、正常GC1+/+網膜において見られるものと質的に最も類似するよう思われた (図21Aおよび図21B)。それらの密度は、無処置対照と比べて増加したが、AAV5処置網膜における錐体は、わずかに無秩序であるように思われ、これは、おそらく、これらのマウスにおける外顆粒層のわずかな、全体的な障害／菲薄化による結果である。

10

【0202】

AAV処置GC1KOマウスにおける光受容体機能 (ERG) の長期回復

先の実施例では、AAV5-smCBA-mGC1またはAAV5-hGRK1-mGC1のP14送達後に、3か月間、GC1KOマウスに錐体媒介性の機能を修復することができた (Boyeら、2010年)。処置マウスにおける平均明所視b波振幅は、注射後4週間で部分的に修復され、その研究を通じて安定したままであった。本実施例では、処置後9か月までの錐体媒介性の応答は、従来の研究において使用した同一のベクターをP14～P25に注射したGC1KOマウスにおいて比較した。AAV5-mGC1ベクターを用いて処置した残りのマウスはすべて、処置後少なくとも1年間、測定可能な錐体媒介性の機能を示し続けた。AAV5-hGRK1-mGC1を用いて処置した個々のマウスから12cd/m²で誘発された代表的な結果を、図22Aおよび図22Bに示す。錐体応答は、ある期間にわたって安定し、無処置の反対側の対照から生成された応答よりも有意に高度であり ($p < 0.001$)、錐体機能の回復が動物の生涯にわたり可能であることを示唆した (図22A)。先の実施例と一致して、光受容体特異的プロモーター (hGRK1) 含有ベクターの送達後に達成される回復のレベルは、あらゆる処置後の時点で、ユビキタスプロモーター (smCBA) 含有ベクターを用いて達成されるものと有意に異なっていなかった。代表的な結果は、修復された錐体ERGの反応速度が、研究の経過を通じて正常であるように思われたことを明らかにする (図22B)。さらに、本実施例において、錐体光受容体機能が、AAV8 (Y733F)-hGRK1-mGC1を用いる注射後の少なくとも6か月間、安定して修復されたことが示された。

20

30

【0203】

この強力で速効性のAAV8チロシンカプシド変異体を注射したGC1KOマウスにおける錐体b波振幅は、評価したすべての時点で各々のAAV5ベクターを注射したGC1KOマウスにおいて見られたものよりも高度であった。すべてのベクターを並行して比較することができた最も後の時点である処置後6か月目に、AAV8 (Y733)-hGRK1-mGC1対AAV5-hGRK1-mGC1処置マウス ($p = 0.033$) およびAAV (Y733F)-hGRK1-mGC1対AAV5-smCBA-mGC1処置マウス ($p = 0.025$) における錐体b波振幅の間で有意差があった。AAV8 (Y733F)-hGRK1-mGC1 ($n = 1$) を用いる注射後9か月目に記録した代表的な結果は、注射後6か月目に記録したものよりも顕著に小さかった。

40

【0204】

無処置GC1KO杆体応答 (5月齢までの50～70%のWT) におけるマウス間の多様性により (23)、処置対無処置眼の平均杆体応答の統計比較は、不確実である。しかしながら、動物内で、杆体ERG振幅は、パートナーの眼の間でほぼ等しく、そのため、発明者らは、処置対無処置眼について、平均マウス内杆体aおよびb波振幅比を計算し、次いで、ある期間にわたってこれらの比をプロットした (図23Aおよび図23B)。杆体機能のAAV媒介性の回復は、値 > 1.0 による比によって示す。図23Aおよび図23Bは、ある時点 (処置後4か月) を除いて、AAV8 (Y733F)-hGRK1-m

50

G C 1 処置対無処置眼における杆体b波振幅の平均比がすべて > 1.0 であったことを示す。A A V 5 処置対無処置眼の比は、時々 > 1.0 であったのみであった。同様に、杆体a波比は、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 処置マウスにおいて一貫してより高度であったのに対して、それらは、多くの場合、各々のA A V 5 ベクターを用いる処置の後に低下した(図23B)。これらの結果は、杆体に対する処置効果はわずかであったが、A A V 8 (Y 7 3 3 F) は、G C 1 K O マウスに最も堅調な杆体媒介性の機能改善を与えたことを示唆する(図23B)。1 c d / m² の刺激によって誘発される代表的な杆体媒介性の暗所視 E R G 結果は、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 処置 G C 1 K O マウス(処置後6か月)、無処置の反対側の対照眼、および年齢が一致する G C 1 + / + 対照において示す。杆体 E R G 振幅における A A V 8 (Y 7 3 3 F) 媒介性の改善は、本実施例において明らかであり、野生型以下の振幅は別にして、処置眼応答反応速度は、G C 1 + / + 対照において見られるものに類似していることを示す。

【0205】

ベクター体内分布：

体内分布研究は、A A V 5 または A A V 8 (Y 7 3 3 F) 送達ベクターゲノムを、数か月の期間の後に処置マウスの視神経および/または脳において検出することができたかどうかを立証するために、それぞれのベクターを用いて処置した G C 1 K O マウスにおいて実行した。A A V 5 ベクターを注射したマウスは、処置後7 (n = 2) および10 (n = 5) か月目に評価し、A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 を注射したマウスは、処置後4 (n = 1) および7 (n = 1) か月目に評価した。注射および非注射眼からの視神経ならびに視路を含有した左および右脳の一部を検査した。A A V 5 ベクターは、G C 1 K O マウスの右眼に注射した。したがって、ベクターゲノムは、注射後7および10か月目に A A V 5 処置マウスの右の視神経において検出された。注射後7か月目に、ベクターゲノムはまた、A A V 5 - h G R K 1 - m G C 1 を注射した1匹のマウスの左脳において検出された。ベクターゲノムは、その動物の右脳から検出されなかった。右の(注射した)視神経および左脳がポジティブであったという観察は、左半球が主に右眼に「つながっている」ので、解剖学的に矛盾しない。

【0206】

注射後10か月までに、A A V 5 送達ベクターゲノムは、右の(注射した)視神経においてなお検出されたが、両方の脳半球になかった。A A V 8 (Y 7 3 3) ベクターは、G C 1 K O マウスの左眼に注射した。したがって、A A V 8 (Y 7 3 3 F) 送達ベクターゲノムは、注射後4および7か月目に左の視神経において検出された。どの時点でも、A A V 8 (7 3 3) 処置マウスにおけるベクターゲノムは、各々の脳半球において検出されなかった。ベクターゲノムのより高度な平均数は、A A V 5 - s m C B A - m G C 1 と比較して、A A V 5 - G R K 1 - m G C 1 を注射した眼の視神経において検出された。この結果は、おそらく、後者 (4.69×10^{12} v g / m L) と比較した前者 (4.12×10^{13} v g / m L) のより高度な力価によるものである。

【0207】

さらに、A A V 5 - h G R K 1 - m G C 1 送達ゲノムのみ、本研究の経過にわたり脳組織において検出され、この違った観察は、おそらく、このベクターの比較的高度な力価によるものである。使用した A A V 8 (Y 7 3 3 F) - h G R K 1 - m G C 1 ベクターの力価 (1.08×10^{13} v g / m L) が、A A V 5 - h G R K 1 - m G C 1 ベクター未満であったという事実にもかかわらず、ベクターゲノムのより高度な平均数は、A A V 8 (Y 7 3 3 F) 処置眼の視神経において検出された。A A V 5 は、マウス網膜の神経節細胞の形質導入に効果がないことが公知であるが (S t i e g e r ら、2008年)、A A V 8 は、この細胞型を形質導入することが示された (J a c o b s o n ら、2006年)。シリンジが網膜下注射の間に内部の網膜を横断し、眼サイズ全体に対する注射容量の比がマウスにおいて高度であるので、網膜神経節細胞へのベクターのいくらかの暴露が期待される。そのため、A A V 8 (Y 7 3 3 F) 処置眼の視神経において検出されるより多くのベクターゲノムは、網膜神経節細胞に対する、A A V 5 と比べた、A A V 8 (Y 7 3 3 F

）の親和性の増加によるものとする事ができる。期待されるように、AAVベクターゲノムは、ナイーブGC1KO対照マウスのあらゆる組織からも回収されなかった。

【0208】

AAV-mGC1処置は、処置GC1KO網膜をGC1およびGCAP1の野生型レベルに修復する

AAV8 (Y733F) - hGRK1-mGC1を用いる注射後7か月目に、1匹のGC1KOマウスからの処置および無処置網膜ならびに1匹の年齢が一致するGC1+/+対照マウスは、GC1およびGCAP1タンパク質発現のレベルをアッセイするために使用した。この実験の目標は、処置群にわたってGC1レベルを比較することではなく、ベクター媒介性のGC1発現のレベルを野生型動物におけるGC1のレベルと比較することであった。同様に、発明者らは、GCAP1発現に対するAAV送達GC1の効果を評価した。期待されるように、GC1タンパク質は、GC1KOMausの無処置眼になかった。対照的に、AAV8 (Y733F) 処置眼におけるGC1のレベルは、正常GC1+/+対照において見られたものに近かった (図4)。GCAP1がGC1KOMausにおいて翻訳後にダウンレギュレートされるという先の報告と一致して、発明者らは、GC1+/+対照に比べて無処置GC1KO網膜においてGCAP1がダウンレギュレートされたことを示す (39)。しかしながら、GC1のAAV8 (Y733F) 媒介性の送達は、処置GC1KOMaus網膜におけるGCAP1発現におけるアップレギュレーションに至る。GCAP1発現のレベルもまた、GC1+/+対照において見られるものに匹敵した。

【0209】

処置GC1KOMausでは、GC1 mRNAは、存在し、GNAT2 mRNAレベルは、無処置GC1KOMausに比べて増加する。GC1KOMausのエクソン5内に位置するネオマイシン遺伝子破壊の側面に位置するGC1プライマー対を使用して (Timmersら、2001年)、GC1+/+およびベクター処置GC1KOMausの両方においてGC1 mRNAを測定することが可能であった。興味深いことには、遺伝子破壊の十分に下流にあるGC1のエクソン18および19を標的にする第2のGC1プライマー対は、無処置GC1KOMaus試料においてPCR産物を産生し、そのため、これらのプライマーは、使用しなかった。処置後1年間で、処置網膜におけるGC1 mRNAのレベルは、年齢が一致するGC1+/+対照マウスにおいて見られものよりも、およそ7倍 (AAV5処置) および14倍 [AAV8 (YY733F) 処置] 高度であった (図24Aおよび図24B)。一方はRNA抽出および他方はDNA用に、2つの等しい半分量に試料の均一な分割を可能にする核酸回収技術を使用することによって (Pangら、2011年)、同じ試料内でmRNAレベルを測定し、ベクターゲノムの数を決定することができた。処置網膜における高レベルのGC1 mRNAが多くのベクターゲノムの回収率に相当したことが分かった; AAV8 (Y733F) について 1.57×10^7 ベクターゲノム/DNA $1 \mu\text{g}$ およびAAV5について 4.7×10^6 ベクターゲノム/ μg 。処置網膜における高レベルのGC1 mRNAにもかかわらず、GC1発現は、処置眼の視神経において検出されなかった。この結果は、この研究において評価したベクターがオフターゲットの導入遺伝子発現をもたらさなかったという考えをさらに立証する。GC1KOMausにおけるGCAP1の低下が翻訳後である (つまり、mRNAレベルは不変である) という先の報告と一致して、発明者らは、試料にわたるGCAP1 mRNAのレベルにおける実質的な変化を見出さなかった (図24Aおよび図24B)。

【0210】

他の錐体特異的RNAに対する処置の最初の判断として、他のいくつかの転写物もまた、これらの試料において評価した。錐体トランスデューシン α (GNAT2) のレベルについてのベースラインを確立するために、GNAT2 RNAを無処置GC1KO試料において評価し、GC1+/+対照に比べて低下していることが分かり、これは、おそらく、これらの網膜における錐体光受容体の損失による結果である (図24Aおよび図24B)。対照的に、AAV5またはAAV8 (Y733F) ベクターを用いて処置した眼にお

いてG N A T 2 m R N Aレベルのかなりの増加があり、これは、錐体光受容体がA A V - m G C 1 処置G C 1 K Oマウスにおいて保持されているという考えをさらに立証する結果である。おそらく、杆体光受容体がG C 1 K Oマウスにおいて変性しないので、杆体P D E 6 αのレベルは、試料にわたって比較的不変であった（図2 4 Aおよび図2 4 B）。

【0 2 1 1】

結論として、これらの研究は、持続性のA A V 媒介性のG C 1 発現が、長期にわたって、G C 1 K Oマウスにおいて、網膜機能を修復することができ、錐体光受容体を保持することができることを実証する。A A V 5 およびA A V 8（Y 7 3 3 F）処置G C 1 K Oマウスのコホートは、それぞれ注射後9 か月目および6 か月目にE R G回復について評価した。錐体E R G 振幅の統計比較は、試料サイズの減少によりこれらの時点を越えて継続しなかったが、処置したマウスはすべて、機能的な（E R G）奪回を示し続けた。これらの残りのマウスのサブセットに対して実行した様々なアッセイはすべて、療法を継続する明らかな指標を示す。この処置による寿命延長を、多くの異なるレベルで検証した：1）処置後1 0 か月目の処置眼におけるG C 1 タンパク質の存在、2）処置後1 2 か月目にE R Gによって測定される錐体機能の回復、3）処置後1 1 か月目の処置眼における錐体存続の増加、および4）処置後1 2 か月の網膜におけるベクターゲノムおよびG C 1 m R N Aの回収。個々の別個の分析として考察された場合、これらのアッセイにおいて使用した試料サイズは、多くの場合、小さかった。しかしながら、すべてが、機能的な奪回の明らかな兆候を示すマウスにおける処置上の効能の相関現象と見なされる場合、試料サイズは、有効に、より大きなものとなる。この状況内では、そのため、処置効果は、E R G 奪回について統計的に評価される期間を越えて存続するように思われる。これは、G C 1 欠損の動物モデルにおける長期処置効果の第1の実証である。

【0 2 1 2】

錐体E R Gの修復は、それぞれ、処置後少なくとも9 か月目および6 か月目にA A V 5 およびA A V 8（Y 7 3 3）処置G C 1 K Oマウスにおいて観察された。応答は、安定しており、研究の経過を通じて無処置G C 1 K O錐体応答よりも有意に高度であった。回復は、A A V 8（Y 7 3 3 F）ベクターを用いて処置されたマウスにおいて最も明白であった。A A V 8（Y 7 3 3 F）処置マウスにおける平均錐体b波振幅は、標準的なA A V 5 ベクターを用いて処置したG C 1 K Oマウスから記録されたものよりも一貫して、約2 0 μ V 高度であった（それぞれ約5 5 μ V 対約3 5 μ V）。すべてのベクターを統計的に比較した最も後の時である処置後6 か月目に、この差異は有意なままであった。この結果は、A A V 8（Y 7 3 3 F）ベクターが、標準的なA A V ベクターを用いる処置に不応性のモデルであるr d l 1 0 マウスの網膜構造および機能を安定して修復したということを確認する。

【0 2 1 3】

G C 1 K Oマウスにおける処置および無処置眼の間の杆体振幅における差異の定量化は、このモデルにおける杆体機能が、グアニル酸シクラーゼー2（G C 2）によって部分的に促進されるという事実によって複雑になる（S u n ら、2 0 1 0 年）。そのため、杆体E R G 応答は、動物によって多様である（正常の3 0 ~ 5 0 %）。そのため、処置および無処置錐体応答の比較と異なり、処置杆体応答は、ゼロのベースラインと比較することができない。それにもかかわらず、対のG C 1 K O眼は、比較可能な杆体E R G 振幅を有し、一方は処置し、他方は無処置のパートナー眼における杆体E R Gの動物内比は、杆体機能に対する処置効果を評価するための有効な測定基準を提供する。A A V 8（Y 7 3 3 F）処置G C 1 K Oマウスにおける杆体媒介性の応答における改善は、処置および無処置眼からの杆体a およびb 波振幅の個体内の比を比較することによって示されるように、A A V 5 処置マウスから記録されたものよりも一貫して観察された。これは、G C 1 K O眼におけるG C 1の活動的な発現がマウス杆体機能に対するG C 2の部分的な効果を補足することができることを示唆する。

【0 2 1 4】

長期錐体光受容体の存続（注射後1 1 か月）は、錐体アレスチンに対して向けられる抗

10

20

30

40

50

体を用いる、AAV5-smCBA-mGC1を用いて処置したあるマウスからの処置および無処置網膜ホールマウントの免疫染色によって実証した。錐体は、処置GC1KO網膜の全体にわたって同定された。AAV5-smCBA-mGC1処置網膜はまた、先の報告と一致して、その上部の半球において小さな割合の錐体しか保持しなかった無処置眼よりも多くの錐体を明らかに含有した(Provostら、2005年)。処置GC1KO網膜において保持された錐体は、超微細構造レベル(たとえば電子顕微鏡)で検査しなかったが、錐体がERG分析によってある期間にわたって機能的なままであったという観察は、それらの構造が損なわれなかったことを示唆する。処置用AAV-GC1によって媒介される錐体光受容体の長期保持は、それが、GC1欠損を有する患者に対して、黄斑錐体を保持し、かつ利用可能な昼間視力/色覚を修復する可能性を示唆するので、明白な臨床上の妥当性を有する。

10

【0215】

AAV媒介性のGC1発現は、使用した血清型または光受容体特異的(hGRK1)もしくはユビキタス(smCBA)プロモーターがその発現を駆動したかにかかわらず、処置後少なくとも10か月間(IHCによって評価された最も後の時点)、存続し、もっぱら光受容体に位置した。導入遺伝子発現は、標的細胞型に限られたが、hGRK1プロモーターは、それが、もっぱら、標的細胞の適切なコンパートメント(光受容体外節)内の発現をもたらしたという点で、より特異的であった。この結果は、このプロモーターを利用する他の好結果の実証実験研究と共に、hGRK1プロモーターは、光受容体を標的にする臨床AAVベクターの設計において考慮されるべきであることを示唆する。

20

【0216】

AAV5-smCBA-mGC1を用いる処置後10か月の横断GC1KO網膜切片の免疫染色は、野生型および無処置GC1KO対照に比べてONLの中程度の菲薄化を明らかにした。さらに、この網膜では、GC1は、光受容体の細胞体において時々見出された。強力なユビキタスsmCBAプロモーターが、いくつかの光受容体の情報交換の仕組みを圧倒するレベルでGC1の発現を駆動し、光受容体細胞体における導入遺伝子産物の蓄積が、これらの細胞においてストレスによって開始されるアポトーシスを構成した可能性がある。より劇的なONL菲薄化は、AAV5-hGRK1-mGC1を注射したあるマウスにおいて観察された。nが1である場合、網膜菲薄化がこのベクターを用いて処置したすべてのマウスにおいて存在したということを決定的に結論付けることはできない。それにもかかわらず、過剰発現毒性についての考えと一致して、AAV5-hGRK1-mGC1ベクターの力価は、この研究において評価した3つのベクターのうちで最も高度であった。しかしながら、GC1の蓄積は、高度な力価のAAV5-hGRK1-mGC1ベクターを有する光受容体細胞体においてなかったこともまた注目されたい。

30

【0217】

AAV媒介性GC1発現の光受容体独占的な性質にもかかわらず、発明者らは、網膜下スペースの外側の組織へのベクターゲノムの広がりを評価することに関心を持った。重要なことには、これらのデータは、「疾患」動物から収集した。これは、ベクター形質導入のパターンが疾患対健康な網膜において異なるという証拠に基づいて適切である(Kolstadら、2010年)。これは、体内分布パターンもまた異なるかもしれないことを示唆するであろう。この理由のために、奪回動物モデル自体内の(つまり明らかなERG回復を示した対象内の)ゲノムの広がりを評価することが重要であった。試料サイズは限られたが、有用な情報は、視神経および脳におけるAAV5およびAAV8(Y733F)送達ゲノムの分布に関して収集した。

40

【0218】

これは、カプシド表面暴露チロシン変異を含有するAAVベクターについての体内分布の第1の評価である。AAV5およびAAV8(Y733F)送達ベクターゲノムは、評価したすべての時点で注射眼の視神経において検出された。ある時点(注射後7か月)でのみ、AAV5ベクターゲノムは、処置GC1KOMausの脳において検出された。ゲノムは、注射した眼の反対の半球においてのみ回収された。この結果は、網膜下の注射した

50

ラットおよびイヌの脳におけるAAV5送達配列の欠乏を報告したProvostら、2005年による発見と対照をなす。注射後10か月までに、ベクターゲノムは、あらゆる時点で、AAV5処置GC1KOマウスの脳からも、AAV8(Y733F)を用いて処置したマウスの脳からも回収されなかった。しかしながら、分析した比較的少数のマウスにより、AAV5送達ゲノムが、注射後10か月目に脳に存在したということまたはAAV8(Y733F)送達ゲノムが、あらゆる時点で、処置GC1KOマウスの脳に決して存在しないということを明確に除くことができない。

【0219】

処置眼の視神経からのベクターゲノムの回収にもかかわらず、免疫染色は、AAV5-smCBA-mGC1またはAAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1ベクターを用いて処置した眼の視神経におけるGC1発現の欠乏を明らかにした。Stiegerら(2005年)による先の研究は、緑色蛍光タンパク質(GFP)を含有するAAV8を用いる網膜下注射後の2か月と4週間目に、ラットおよびイヌの視神経および脳において導入遺伝子発現を検出した。AAV8(Y733F)ベクターが光受容体特異的hGRK1プロモーターを含有したということおよびsmCBAのようなユビキタスプロモーターの制御下の場合でさえ、GC1発現が光受容体に限られたという先の発見を考慮すると、視神経におけるGC1発現の欠乏は意外ではない。Stiegerら、(2005年)は、強力なユビキタスCMVプロモーターを、ウイルスベクターを介して送達された場合に、種々様々の組織において安定して発現することができるタンパク質であるGFPを駆動するためにそれらのベクターの中に組み込んだ。

【0220】

AAV5およびAAV8(Y733F)ベクターの両方がGC1KOマウスに長期処置効果を提供することができたが、AAV8(Y733F)の使用と関連する明らかな長所がある。何よりも先に、光受容体特異的プロモーターを有するAAV8(Y733F)は、各々のAAV5ベクターよりも処置マウスに対して有意に高度な錐体ERG応答を与えた。これについての理由は、AAV8ベクターがげっ歯動物網膜において注射のブレブの外側のエリアを形質導入する能力によるものかもしれないのに対して、AAV5によって形質導入された網膜のエリアは、ほとんどブレブに限られたままである(47)。したがって、AAV8(Y733F)は、単純に、AAV5ベクターに比べて、平均して、より大きなエリアの網膜を形質導入するかもしれず、次に、それぞれの形質導入した錐体における全体的な錐体存続の増加および／または光応答のレベルの増加のどちらかまたは両方を通して、より多くの錐体形質導入および堅調な全視野錐体ERG応答をもたらすかもしれない。

【0221】

(実施例8)

例示的な哺乳動物GC1ポリペプチド配列

本発明の実施において有用な例示的なアミノ酸配列は、限定を伴うことなく、生物学的に活性な哺乳動物グアニル酸シクラーゼタンパク質をコードする、1つまたは複数のアミノ酸配列を含む。そのような配列は、限定を伴うことなく、下記に、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、および配列番号11において記載されるグアニル酸シクラーゼタンパク質などのような、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ウシ、およびイヌ起源のものを含む。

【0222】

【化 3】

Homo sapiens (ヒト; GenPept 受託番号 NP 000171)

MTACARRAGGLPDPGLCGPAWWAPSLPRLPRALPRLPLLLLLLLLLLQPPALSAVFTVGVLPWACDP
IFSRARPDLAARLAAARLNRPGLAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAA
CRPAELLAAEEAGIALVPWGCPWTQAEGTTPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAG
RSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPRTAVIMVMHSVLLGGEEQRYLLEAAE
ELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAAANSSQLRRAHDAVLTITRHCPSEGSVLDSLRAQE
RRELPSDLNLQQVSPLFGTIYDAVFLLARGVAEAAAAAGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGG
DEEPPFVLLDTPAAGDRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPCWFDPNNICGGGLE
PGLVFLGFLLVVGMGLAGAFLAHYVRHRLHMQMVSGPNKIILTVDDITFLHPHGGTSRKVAQGSR
SSLGARMSDIRSGPSQHLDSPNIGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVAL
YLGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSLLQDLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKIRYLHHR
GVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLLEAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRTLA
GDVFSLAIIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVSPPLCRPLVSMDQAPVEICILLMKQCWAEQP
ELRPSMDHTFDLFDKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTDRLLTQMLP
PSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDALIGSHDVYKV
ETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVPVRIRIGLHSGPCVAGVVG
LTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKKGGAEDTFWL
VGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHGISLQEIPEPERRRKLEKARPGQFS (配列番号 1)

10

【0 2 2 3】

【化 4】

Mus musculus (マウス; GenPept 受託番号 NP 032218)

MSAWLLPAGGLPGAGFCVPAQSPSSFSRVLRWPRPGLPGLLLLLLLLLLSPSPSALS AVFKVGVLPWA
 CDPIFARARPDLAARLAANRLNRDFALDGGPRFEVALLPEPCLTPGSLGAVSSALS RVSGLVGPVN
 PAACRPAELL AQEAGVALVPWGCPCGTRAAGTTAPAVTPAADALYVLLRAFRWARVALITAPQDLWV
 EAGRALSTALRARGLPVALVTSMTSDRSGAREALGRIRDGPRVRVIMVMH SVLLGGEEQRYLLE
 AAEEELALTDGSLVFLPFDTLHYALSPGPEALAAFVNSSQLRRAHDAVLTLTRCPPGGSVQDSLRR
 AQEHQELPLDLNLKQVSPFLFGTIYDAVFLLAGGVKARTAVGGGWVSGASVARQVREAQVSGFCGV
 LGRTEEPSFVLLD TDASGEQLFATHLLDPVLGSLRSAGTPMHFPRGGPAPGPD PSCWFDPDVICNG
 GVEPGLVFGVFLLVIGMGLTGAFLAHYLRHRL LHMOMASGPNKIILTLEDVTFLHPPGGSSRKVVQ
 GSRSSLATRSASDIRSVSPQPESTNVGLYEGDWVWLKKFPGEHMAIRPATKTA FSKLREL RHN
 VALYLGLFLAGTADSPATPGEGILAVVSEHCARGSLHDL LAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKGMRYL
 HHRGVAHGRLKSRNCVVDGRFVLKVTDHGHGRLL EAQRVLPEPPSAEDQLWTAPELLRDP SLERRG
 TLAGDVFS LAIIMQEVVCRSTPYAMLELTPEEVIQVRVSPPPLCRPLVSM DQAPMECIQLMTQCWA
 EHPRELPSMDLTDFDLFKSINKGRKTNIIDSMRLMLEQYSSNLEDLIRERTEEELEQE KQKTDRLLTQ
 MLPPSVAEALKMGT SVEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLF DAIIGAHDV
 YKVTETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGSFRMRHMP EVPVRIRIGLHSGPCVAG
 VVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNMSTVRILRALDQGFQMECRGRTELKGKGI EDT
 YWLVGR LGFNKPIPKPPDLQPGASNHGISLQEIPERRKKLEKARPGQFTGK (配列番号 2)

10

Rattus norvegicus (ドブネズミ; GenPept 受託番号 NP 077356)

MSAWLLPAGGFPGAGFCIPAWQSRSSLSRVLRWPGPGLPGLLLLLLLLLLSPSPA FSAVFKVGVLPWA
 CDPIFARARPDLAARLATDR LNRDLALDGGPWFEVTLPEPCLTPGSLGAVSSAL TRVSGLVGPVN
 PAACRPAELL AQEAGVALVPWGCPCGTRAAGTTAPAVTPAADALYVLLKA FRWARVALITAPQDLWV
 EAGRALSTALRARGLPVALVTSMPVSDLSGAREALRRIRDGPRVRVIMVMH SVLLGGEEQRYLLE
 AAEEELGLTDGSLVFLPFDTLHYALSPGPEALAAFVNSSKLRRAHDAVLTLTRCPPGGSVQDSLRR
 AQEHQELPLDLNLKQVSPFLFGTIYDAVFLLAGGVTRARA AVGGGWVSGASVARQVREAQVFGFCGI
 LGRTEEPSFVLLD TDAAAGERLFTTHLLDPVLGSLRSAGTPVHFPRGAPAPGPD PSCWFDPDVICNG
 GVEPGLVFGVFLLVIVVGLTGAFLAHYLRHRL LHMOMVSGPNKIILTLEDVTFLHPPGGSSRKVAQ
 GSRSSLATRSTSDIRSVPSPQPESTNIGLYEGDWVWLKKFPGEHMAIRPATKMA FSKLREL RHN
 VALYLGLFLAGTADSPATPGEGILAVVSEHCARGSLHDL LAQRDIKLDWMFKSSLLLDLIKGMRYL
 HHRGVAHGRLKSRNCVVDGRFVLKVTDHGHGRLL EAQRVLPEPPSAEDQLWTAPELLRDPALERRG
 TLAGDVFS LGIIMQEVVCRSTPYAMLELTPEEVIQVRVSPPPLCRPLVSM DQAPMECIQLMAQCWA
 EHPRELPSMDLTDFDLFKGINKGRKTNIIDSMRLMLEQYSSNLEDLIRERTEEELEQE KQKTDRLLTQ
 MLPPSVAEALKMGT SVEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLF DAIIGSHDV
 YKVTETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGSFRMRHMP EVPVRIRIGLHSGPCVAG
 VVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNMSTVRILRALDQGFQMECRGRTELKGKGV EDT
 YWLVGRVGFNKP IPKPPDLQPGASNHGISLQEIPERRKKLEKARPGQFTGK (配列番号 3)

20

30

Bos taurus GC1 (ウシ ; GenPept 受託番号 NP 776973)

MTACTFLAGGLRDPGLCAPTRWSPSPPLPPIPPRPRRLRLRPPLLLLLLLLLLPRSVLS AVFTVGVLP
 WACDPIFARARPDLAARLAASRLNHAAALEGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSAL TRVSGLVGP
 VNPAAACRPAELL AQEAGVALVPWGCPCGTRAAGTTAPVVTAAADALYALLRAFRWAHVALV TAPQDL
 WVEAGHALSTALRARGLPVALVTSMEPSDLSGAREALRRVQDGPRVRVIMVMH SVLLGGEEQRC L
 LEAAEEELGLADGSLVFLPFDTLHYALSPGPDALAVLANSSQLRKAHDAVLTLTRHCP LGGSVRDSL
 RRAQEHRELPLDLNLQVSPFLFGTIYDSVFLLAGGVARARVAAGGGWVSGAAVARHIRDARVP GFC
 GALGGAEPSFVLLD TDATGDQLFATYVLDPTQGGFFHSAGTPVHFPGGRGPGPD PSCWFDPDTIC
 NGGVEPSVVF IGFLLVVGMGLAGAFLAHYCRHRL LHIQMVSGPNKIILTDDITFLHPHGNSRKV
 AQGSRTSLAARSISDVSRIHSQLPDYTNIGLYEGDWVWLKKFPGDRHIAIRPATKMA FSKIRELRH
 ENVALYLGLFLAGGAGGPAAPGEGVLAVVSEHCARGSLQD LLAQRDIKLDWMFKSSLLLDLIKGI R
 YLHHRGVAHGRLKSRNCVVDGRFVLKVTDHGHGRLL EAQRVLPEPPSAEDQLWTAPELLRDPVLER
 RGTLAGDVFS LGIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVKRVQSPPLCRPSVSIDQAPMECIQLMKQC
 WAEQPELPSMDRTFELFKSINKGRKMNIIDSMRLMLEQYSSNLEDLIRERTEEELEK QKTDRLL
 TQMLPPSVAEALKMGT PVEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLF DAIIGSH

40

【 0 2 2 4 】

【化5】

DVYKVETIGDAYMVASGLPQRNGHRHAAEIANMALDILSAVGTFRMRHMPEVPVRIRIGLHSGPCV
 AGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNRSTVQILSALNEGFLTEVRGRTELKGKGAE
 ETYWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGASNHGISLHEIPDRRQKLEKARPGQFSGK
 (配列番号 4)

Canis lupus familiaris (イヌ ; GenPept 受託番号 NP 001003207)

MSACALLAGGLPDPRLCAPARWARSPPGVPGAPPWPQPRRLLLLLLLLLLPPSALS AVFTVGVLPW
 ACDPIFARARPDLAARLAAARLNRDAALEDGPRFEVTLLEPCRTPGSLGAVSSALGRVSGLVGPV
 NPAACRPAELLAQEAGVALVPWSCPGTRAGGTTAPAGTAAADALYALLRAFRWARVALITAPQDLW
 VEAGRALSAAALRAGLPVALVTTMEPSDLSGAREALRRVQDGPVRVAVIMVMHVSLLGGEEQRCLL
 QAAEELGLADGSLVFLPFDTLHYALSPGPEALAVLANSSQLRRAHDAVLILTRHCPGGSVMDNLR
 RAQEHQELPSDLDLQVSPFFGTIYDAVLLLAGGVARARAAAGGWWSGATVAHHIPDAQVPGFCG
 TLGGAQEPFFVLLDTPAAGDRLFATYMLDPTRGSLLSAGTPVHFPRGGTTPGSDPSCWFEPGVICN
 GGVEPGLVFLGFLLVGMGLTGAFLAHYLRHLLHIQMVSGPNKIILTLDDVTFLHHPGGSTRKVV
 QGSRSSLAARSTSDIRSVPSQPLDNSNIGLFEGDWVWLKFPDQHIAPATKTAFSKLRELKHE
 NVVLYLGLFLGSGGAGGSAAGEGVLAVVSEHCARGSLHDLAQDRIKLDWMFKSSLLLDLIKGMRY
 LHHRGVAHGRLKSRNCVVDGRFVLKVTDHGHARLMEAQRVLLPEPSAEDQLWTAPELLRDPALERR
 GTLPDGVFSLGIIQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVERVRSPPPLCRPSVSMDQAPVECIQMLKQCW
 AEHPDLRPSLGHIQFKSINKGRKTNIIIDSMRLMEQYSSNLEDLIRERTEEELELEKQKTDRLLT
 QMLPPSVAEALKMGTPVEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHD
 VYKVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMALDILSAVGSFRMRHMPEVPVRIRIGLHSGPCVA
 GVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNMSTVRILHALDEGFQTEVRGRTELKGKGAE
 TYWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGASNHGISLQEIPLDRRWKLEKARPGQFSGK
 (配列番号 5)

Macaca mulatta (アカゲザル ; XP 001111670 からの予測配列)

MTACARRAGGLPDPRLCGPARWAPALPRLPRALPRLPLLLLLLLLLLQPPALS AVFTVGVLPWACDP
 IFSRARADLAARLAAARLNRPDLAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALTRVSGLVGPVNPA
 CRPAELLAEEAGIALVPWGCPTQAAGTTAPALTAAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAG
 HSLSTALRAGLPVASVTSMEPLDLGAREALRKVRDGPRTAVIMVMHVSLLGGEEQRYLLEAAE
 ELGLTDGSLVFLPFDTVHYALSPGPEALAAALANSSQLRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVLDLRRQE
 RRELPSDLNLQVSPFLGTIYDAVFLLVRGVAEAAAAGGRWVSGAAVARHVWDAQVPGFCGDLGG
 DEEPFVLLDTPAAGDRLFATYMLDPTRGSLLSAGTPMHFPRGGSAPGPDPSCFWDPNNICGGGLE
 PGLVFLGFLLVGMGLAGAFLAHYVRHQLLHIQMVSGPNKIILTVDDITFLHHPGGSTRKVAQGS
 SSSLAARMSDVRSGPSQPTDSPNVGVYEGDRVWLKFPDQHIAPATKTAFSKLQELRHENVAL
 YLGLFLAQAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSLQDLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKIRYLHHR
 GVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLA
 GDVFS LAIIQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVRSPPPLCRPLVSMDQAPVECIHLMKQCWAEQ
 ELRPSMDHTFDLKFKNINKGRKTNIIIDSMRLMEQYSSNLEDLIRERTEEELELEKQKTDRLLTQMLP
 PSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYKV
 ETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVPVRIRIGLHSGPCVAGVVG
 LTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKGKGAEFTWL
 VGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHGISLQEIIPERRRKLEKARPGQFS (配列番号 6) .

Pongo abelii (スマトラ島のオランウータン ; XP_002827037 からの予測配列)

MTACARRAGGLPDPGLCGPARWAPSLPRLPRALPRLPLLLLLLLLLLQPPALS AVFTVGVLP
 PWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRPDLAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALGRVSGLVGPVNPA
 VSGLVGPVNPAACRPAELLADNPGIALVPWGCPTQAAGTTAPCVTAAADALYALLRAFG
 WARVALVTAPQDLWVEAGRSALRAGLPVASVTSMEPLDLGAREALRKVRDGPRTAVIMVMHVSLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAAALANSSQ
 LRRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVLDLRRRAQERRELPSDLNLQVSPFLGTIYDAVFLARG
 VAEAWAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGGDGEPPFVLLDTPAAGDRLFATYML
 DPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPSCFWDPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVGMGLAG
 AFLAHYVRHRLHIIQMVSGPNKIILTVNDITFLHHPGGSTRKVAQGSRSSLAARMSDIR

【 0 2 2 5 】

【化 6】

SGPSQPLDSPNVGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFL
 ARGAEPAALWEGNLAUVSEHCTRGSQDLDSQREIKLDWMFKSSLLLDLIKIRYLHHR
 GVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLLEAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPAL
 RRGTLAGDVFSGLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVSPPLCRPLVSMQAPVEC
 IHLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLDFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTE
 ELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIE
 VVDLLNDLYTLFDALIGSHDVYKVTIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAV
 GTFMRMRHMEVPVRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHV
 NLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKKGGAEDTFWLVGRRGFNKPPIPKPPDLQPGSSNHG
 ISLQEIPIPERRRKLEKARPGQFS (配列番号 7)

10

Callithrix jacchus (シロミミマーモセット ; XP_002747985 からの予測配列)

MTACARRAGGLPDPGLCGPARWAPALSRLPRALPRLPLLLLLLLLLQPPALSAQFTVGVVLG
 PWACDPIFSRARPDILAAARLNRDPSLAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALAR
 VSGLVGPVNPAACRPAELLAAEEAGIALVPWGCPCGTQAAGTTAPVVTAAADALYALLRAFG
 WARVALVTAPQDLWVEAGLSLSTALRARGLPVVSVTSMEPLDLSGAREALRKVRNGPRVT
 AVIMVMHVSLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGREALAAALVNSSQ
 LRRRAHDAVLTLTRHCSSEGSVLDLSLRKAQQRELPSDLNLEQVSPPLFGTIYDAVVLARG
 VADARAAVGGRWVSGAAVARHVWDAQASGFCGDLGRDEEPSFVLLDTDAAGDQLFATYML
 DPARGSLLSAGTPMHFPRGGPAPGPDPSCWFDPNNICDGGLEPGFIFLGLFLLVVMGLAG
 ALLAHYVRHQLLHIQMVSGPNKIILTVDDITFLHPHGGASRKVAQGSRSSLAHSTSDIR
 SGPSQPSDSPNIGVYEGDRVWLKKFPGEQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFL
 AQGAEGPAALWEGNLAUVSEHCTRGSQDLDSQREIKLDWMFKSSLLLDLIKIRYLHHR
 GVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLLEAQKVLPEPPKAEDQLWTAPELLRDPAL
 RRGTLAGDVFSGLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVSPPLCRPFVSMQAPVEC
 IHLMKQCWAEQPELRPSMDLTDFLDFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTE
 ELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIE
 VVDLLNDLYTLFDALIGSHDVYKVTIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAV
 GTFMRMRHMEVPVRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHV
 NLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKKGGAEDTFWLVGRRGFNKPPIPKPPDLQPGASNHG
 ISLQEIPIPERRRKLEKARPGQFS (配列番号 8)

20

Ailuropoda melanoleuca (ジャイアントパンダ ; XP_002921218 からの予測配列)

MRACALLAGGLPYPRLCAPTRWAPARPGVSRALPWPRPRLRLLLLLLLLLRPPSVLSAVFTV
 GVLGPWACDPIFARARPDILXXXXXXXXXDALYVLLRAFRWARVALVTAPQDLWVEAGRAL
 SAALRARGLPVALVTTMEPSDLSGAREALRRVQHGPRVSAVIMVMHVSLLGGEEQRCCLLQ
 AAELGLADGSLVFLPFDTLHYALSPGPEALAAALANSQQLRRRAHDAVLTLTRHCPGGSV
 MDSLRRARQRELPSDLNLEQVSPPLFGTIYDAVFLLAGGVARARAAAADSRVPGFCGALG
 GAEPPFVLLDTDAAGDRFFATYVLDPTRGSLHSAGTPVHFPRGGGAPGPDPSCWFEPS
 ICNGGVEPGLVFTGFLVVMGLMGAFLAHYVRHRLHIQMVSGPNKIILTVDDITFLHP
 QGGSARKVVQGSRSSLAARSTSDVRSVPSQPSDGGNIGLYEGDWVWLKKFPGSQHIAIRP
 ATKTAFSKLRELHENVLYLGLFLGGGEGGSAAAGGMLAVVSEHCTRGSQDLHDLAQRD
 IKLDWMFKSSLLLDLIKGMRYLHHRGVAHGRLKSRNCVVDGRFVLKVTDHGHGRLLLEAQK
 VLAEPESAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLAGDVFSGLAIIMQEVVCRSSPYAMLELSARE
 VVQVRVSPPLCRPSVSVDQAPAEICQLMKQCWAEQPELRPSLDRTFDQFKSINKGRKTNI
 IDSMLRMLEQYSSNLEGLIRERTEEELELEKRTDRLRAASLPSSVAEALKMGTPVEPEY
 FEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDALIGSHDVYKVTIGDAYMVAS
 GLPQRNGQRHAAEIANMALDILSAVGSFRMRHMEVPVRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPR
 YCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNMSTVRILRALDEGFQTEVRGRTELKKGGAEDTYW
 LVGXXXXXXXXPIPKPPDLQPGASNHGISLQEIPLDRRQKLEKARPGQFS (配列番号 9)

30

40

Monodelphis domestica (ハイロジネズミオポッサム ; XP_001369029 からの予測配列)

MLVPSINGLFHHPWCFPLPLPLFFLLLLLLPVPVLPATFTIGVLGPWSCDPIFSRAR
 PDLAARLAATRMNHDQALEGGPWFEVILLPEPCRTSGSLGALSPSLARVSGLVGPVNPA

【 0 2 2 6 】

【化 7】

CHPAELLAQEAGVPLVPWGCPQGKARTTAPALPLALDALYALLRAFWAKVALITAPQDL
 WVEAGQALAGGLRSRGLPVAMVTSLETTDLES AKNALKRVRDGPVKVVLIMVMHVSLLGG
 EEQRLLLEAAEELGLVEGTMVFLPFDTLHYALPPGPEALRPITNSSRLRKAHDAVLTLTR
 YCPKGSVSASLRQAQEHRELPLDLKPQQVSPLFGTIYDAIYLLAGAVAGA QVAGGGGWVS
 GAAVARHIPNTLVSGFCGDLGGTKEPPFVLLDTGMRDQLLPTYTLDPAGVLLHHAGNPI
 HFPHGGQGPDPDPWFDPNVICSGGIEPRFILLVILIIIGGLVVATLAYVYVRRQLLHA
 QMVSGPNKMILTLEDITFFPRQGSRRKATEGSRSSLIAHSASDMRSIPSQPPDNSNIGM
 YEGDWVWLKKFGEHYTEIRPATKMAFSKLRRELHENVAVQMGLFLAGSMEGAAAGGLGG
 GILAVVSEYCSRSLQDLLIQRDIKLDWMFKSSLLLDLIKGLRYLHHRGVAHGRLKSRNC
 VVDGRFVLKITDHAHGRLLLEAQRVSLEPPQAEDRLWTAPELLRNEALERQGTLLQGDVFSV
 GIIMQEVVCRCEPYAMLELTPEEIIQKVQSPPPMCRPSVSVDQAPMECIQLMKQCWAEQP
 DLRPNMDTTFDLFKNINKGRKTNIIDSMRLMEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTDKDL
 LTQMLPPSVAEALKLGIPVEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLF
 DAIIGSHDVYKVETIGDAYMVASGLPKRNGQRHAAEIANMSLDILSSVGSFRMRHMPEVP
 VRIRIGLHSGPCVAGVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVKILQGLN
 EGFQIEIRGRTELKGKGVEDTYWLVGKGFDPKPIPIPPDLLPGASNHGISLQEIPEDRRK
 KLEKARPGQPLGK (配列番号 10)

10

Equus caballus (ウマ ; XP_001918412 からの予測配列)

MVMHVSLLGGEEQRCLLEAAEELGLADGSLVFLPFDTLHYALSPGPEALAVLANNSQLRR
 AHDAVLTLTRHCPLGGSVLDSLRRQAQEHQELPSDLNLQQVSPLFGTIYDAVYLLAGGVAR
 ARAAAGGSWVSGAAVAHVVRDAQVPGFCGALGGAEEPQFVLLDTDAAGDRLFATYMLDPT
 RGSLSWAGTPVHFPRGGRGPGDPWCWFDPDICNGGVEPRLVFIGFLLAVGMGLAGVFL
 AHYVRHRLHLHIQMASGPNKIILTLDITFLHPQGGSSRKVIQGSRSSLAARSVSDIRSV
 SQPMDSSNIGLYEGDWVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLRRELHENVLYLGLFLAGG
 SSGAAAPREGMLAVVSEHCARGSLHDLAQRDIKLDWMFKSSLLLDLIKGMRYLHHRGVA
 HGRLKSRNCVVDGRFVLKVTDHGHRLLLEAQKVLPEPPSAEDQLWTAPELLRDPALERQ
 TLAGDVFSGLGIIIEVVCRSTPYAMLELTPEEVVQRLQSPPLCRPSVSMDQAPMECIQL
 MKQCWAEQPDRLPSMDRTFDLFKSINKGRKTNIIDSMRLMEQYSSNLEDLIRERTEELE
 LEKQKTDRLTLTQMLPPSVAEALKMGTPVEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVD
 LLNDLYTLFDLAIIGSHDVYKVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMALDILSAVGSF
 RMRHMPEVPVRIRIGLHSGPCVAGVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNS
 TVRILRALDEGFQVEVRGRTELKGKGVEDTYWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGASNHGISL
 QEIPERRQKLEKARPGQFSGK (配列番号 11)

20

30

(実施例 9)

公知の哺乳動物 G C 1 ポリペプチドの配列分析

以下の種についてのアミノ酸配列を使用して生成したすべての G C 1 アライメントデー
 タ : Bos taurus (ウシ ; 1110 残基)、Canis lupus fami
 liaris (イヌ ; 1109 残基)、Mus musculus (マウス ; 1108 残
 基)、および Homo sapiens (ヒト ; 1103 残基)。コンセンサスおよび可
 変領域の位置は、Bos taurus が、最も長い G C 1 タンパク質、1110 残基で
 あり、アライメントにおいてギャップを有していないので、Bos taurus に対応
 する数字で表した残基に基づく。

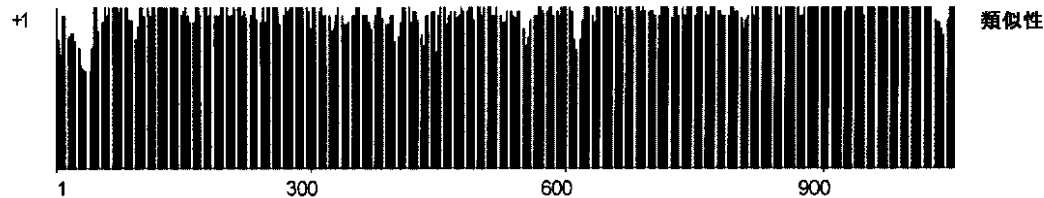
【0227】

40

Bos taurus、Canis lupus familiaris、Mus m
 usculus、および Homo sapiens からの G C 1 タンパク質のアライメン
 トの類似性の図。

【0228】

【化 8】



G C 1 コンセンサス領域：

アミノ酸位置：44～49、55～90、98～155、164～321、464～549、561～604、620～761、813～1026、1045～1054、および 1060～1110。 10

【0229】

可変領域：

アミノ酸位置：4～43、50～54、91～97、156～163、322～463、550～560、605～619、762～812、1027～1044、および 1055～1059。

【0230】

G C 1 コンセンサスアライメントの他の注目すべき領域は、

(1) キナーゼ相同性ドメイン：コンセンサス配列のアミノ酸位置 531～541（光受容体における活性にとって不可欠であることが公知—たとえば B e r e t a ら、2010 20 年を参照されたい）

(2) マウス G C 1 タンパク質のキナーゼ相同性ドメイン内のリン酸化セリン残基（コンセンサス／括弧中に示すウシの位置）：530（532）、532（534）、533（535）、および 538（540）を含む。

【0231】

（実施例 10）

S M C B A プロモーターのヌクレオチド配列

上記に記載する研究において使用した例証となるヒト G R K 1（h G R K 1）プロモーターの核酸配列を下記に示す。

【0232】

【化 9】

```
GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGAAGG
GGCCGGGCAGAAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTCTAGCACCTTCTTG
CCACTCCTAAGCGTCTCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGCTGTGTCAGCCCCGGTCTCCC
AGGGGCTTCCCAGTGGTCCCCAGGAACCCTCGACAGGGCCCGGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGGCAGGG
ACGGGCCACAGGCCAAGGGC（配列番号 12）
```

上記に記載する研究において使用した例証となる s m C B A プロモーターの核酸配列を下記に示す。

【0233】

30

40

【化 1 0】

AATTTCGGTACCCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
 GTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCAT
 GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
 GGACTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
 TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT
 TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCCGAGGTGAGCCCCACGTT
 CTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATT
 ATTTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGCGGGCGGGGCGA
 GGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTT
 TCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTATAAAAAGCGAAGCGCGGGCGGGCGGGAGT
 CGCTGCGACGCTGCCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCT
 GACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
 GCTTGTTTAAATGACGGCTTGTCTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGC
 TAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGT
 TATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAG (配列番号 13)

10

参考文献

20

以下の参考文献は、それらが、本明細書において記載されるものに対して補足的な、例示的な手順のまたは他の詳細を提供する程度まで、参照によって本明細書において明確に組み込まれる。

【 0 2 3 4 】

【数 1】

United States Patent 4,237,224, Dec. 2, 1980. 発行
 United States Patent 4,554,101, Nov. 19, 1985. 発行
 United States Patent 4,683,195, Jul. 28, 1987. 発行
 United States Patent 4,683,202, Jul. 28, 1987. 発行
 United States Patent 4,800,159, Jan. 24, 1989. 発行
 United States Patent 4,883,750, Nov. 28, 1989. 発行
 United States Patent 4,987,071, Jan. 22, 1991. 発行
 United States Patent 5,145,684, Sept. 8, 1992. 発行
 United States Patent 5,334,711, Aug. 2, 1994. 発行
 United States Patent 5,354,855, Oct. 11, 1994. 発行
 United States Patent 5,399,363, Mar. 21, 1995. 発行
 United States Patent 5,466,468, Nov. 14, 1995. 発行
 United States Patent 5,543,158, Apr. 6, 1996. 発行
 United States Patent 5,552,157, Sept. 3, 1996. 発行

30

40

【 0 2 3 5 】

【数 2】

- United States Patent 5,565,213, Oct. 15, 1996. 発行
- United States Patent 5,567,434, Oct. 22, 1996. 発行
- United States Patent 5,602,306, Feb. 11, 1997. 発行
- United States Patent 5,631,359, May 20, 1997. 発行
- United States Patent 5,639,940, Jun. 17, 1997. 発行
- United States Patent 5,641,515, Jun. 24, 1997. 発行
- United States Patent 5,656,016, Aug. 12, 1997. 発行
- United States Patent 5,697,899, Dec. 16, 1997. 発行 10
- United States Patent 5,720,936, Feb. 24, 1998. 発行
- United States Patent 5,738,868, Apr. 14, 1998. 発行
- United States Patent 5,741,516, Apr. 21, 1998. 発行
- United States Patent 5,770,219, Jun. 23, 1998. 発行
- United States Patent 5,779,708, Jul. 14, 1998. 発行
- United States Patent 5,783,208, Jul. 21, 1998. 発行
- United States Patent 5,789,655, Aug. 4, 1998. 発行
- United States Patent 5,795,587, Aug. 18, 1998. 発行
- United States Patent 5,797,898, Aug. 25, 1998. 発行 20
- Int. Pat. Appl. No. PCT/US87/00880.
- Int. Pat. Appl. No. PCT/US88/10315.
- Int. Pat. Appl. No. PCT/US89/01025.
- Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 89/06700.
- Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 91/03162.
- Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 92/07065.
- Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/15187.
- Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/23569.
- Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595.
- Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/13688. 30
- Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP 0329822.
- Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP 0360257.
- Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP 92110298.4.
- Eur. Pat. Appl. Publ. No. 320,308.
- Great Britain Appl. No. 2202328.
- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J., "Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness," *Nat. Genet.*, **28**(1):92-5, 2001.
- Alexander JJ, Umino Y, Everhart D, Chang B, Min SH, *et al.*, "Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia," *Nat. Med.*, **13**:685-687, 2007. 40
- Alstrom, C. H. "Heredo-retinopathia congenitalis monohybrida recessiva autosomalis: a genetical-statistical study in clinical collaboration with Olof Olson," *Hereditas*, **43**:1-178, 1957.
- Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN Jr, "G proteins and phototransduction," *Annu. Rev. Physiol.*, **64**:153-187, 2002.

【数 3】

- Azadi S *et al.*, "RD3, the protein associated with Leber congenital amaurosis type 12, is required for guanylate cyclase trafficking in photoreceptor cells," *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**:21158-63, 2010.
- Baehr W, Karan S, Maeda T, Luo DG, Li S, Bronson JD, Watt CB, Yau KW, Frederick JM, Palczewski K., "The function of guanylate cyclase 1 and guanylate cyclase 2 in rod and cone photoreceptors," *J. Biol. Chem.*, **282**(12):8837-47, 2007.
- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K *et al.*, "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, **358**:2231-2239, 2008.
- Beltran W, Boye SL, Boye SE, Chiodo V, Lewin AS *et al.*, "rAAV2/5 gene-targeting to rods: dose-dependent efficiency and complications associated with different promoters," *Gene Ther.*, **17**:1162-1174, 2010.
- Bereta G, Wang B, Kiser PD, Baehr W, Jang GF, Palczewski K., "A functional kinase homology domain is essential for the activity of photoreceptor guanylate cyclase 1," *J. Biol. Chem.*, **285**(3):1899-908, 2010.
- Bhowmick R, Li M, Sun J, Baker SA, Insinna C, Besharse JC, "Photoreceptor IFT complexes containing chaperones, guanylyl cyclase 1 and rhodopsin," *Traffic*, **10**:648-63, 2009.
- Boye SE, Boye SL, Pang J, Ryals R, Everhart D, Umino Y *et al.*, "Functional and behavioral restoration of vision by gene therapy in the guanylate cyclase-1 (GC1) knockout mouse," *PLoS One*, **5**:e11306, 2010.
- Burns ME and Arshavsky VY, "Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction," *Neuron*, **48**:387-401, 2005.
- Camuzat, A.; Dollfus, H.; Rozet, J.-M.; Gerber, S.; Bonneau, D.; Bonnemaïson, M.; Briard, M.-L.; Dufier, J.-L.; Ghazi, I.; Leowski, C.; Weissenbach, J.; Frezal, J.; Munnich, A.; Kaplan, J., "A gene for Leber's congenital amaurosis maps to chromosome 17p," *Hum. Molec. Genet.*, **4**:1447-1452, 1995.
- Camuzat, A.; Rozet, J.-M.; Dollfus, H.; Gerber, S.; Perrault, I.; Weissenbach, J.; Munnich, A.; Kaplan, J., "Evidence of genetic heterogeneity of Leber's congenital amaurosis (LCA) and mapping of LCA1 to chromosome 17p13," *Hum. Genet.*, **97**:798-801, 1996.
- Chung DC and Traboulsi EI, "Leber congenital amaurosis: clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions," *J. AAPOS*, **13**:587-92, 2009.
- Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S *et al.*, "Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**:15112-7, 2008.
- Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL *et al.*, "Vision one year after gene therapy for Leber congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, **361**:725-727, 2009.
- Coleman JE and Semple-Rowland SL, "GC1 deletion prevents light-dependent arrestin translocation in mouse cone photoreceptor cells," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**:12-6, 2005.
- Coleman JE, Zhang Y, Brown GA, Semple-Rowland SL, "Cone cell survival and downregulation of GCAP1 protein in the retinas of GC1 knockout mice," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**:3397-403, 2004.
- Cremers, F. P. M.; van den Hurk, J. A. J. M.; den Hollander, A. I., "Molecular genetics of Leber congenital amaurosis," *Hum. Molec. Genet.* **11**:1169-1176, 2002.
- den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers RP "Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms," *Prog Ret Eye Res* **27**:301-419, 2008.

【 0 2 3 7 】

【数 4】

- Dizhoor AM, Lowe DG, Olshevskaya EV, Laura RP and Hurley JB, "The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator," *Neuron*, **12**:1345-52, 1994.
- Douglas RM, Alam NM, Silver BD, McGill TJ, Tschetter WW *et al.*, "Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system," *Vis. Neuro.*, **22**:677-684, 2005.
- Downes SM, Payne AM, Kelsell RE, Fitzke FW, Holder GE, Hunt DM *et al.*, "Autosomal dominant cone-rod dystrophy with mutations in the guanylate cyclase 2D gene encoding retinal guanylate cyclase-1." *Arch. Ophthalmol.*, **119**:1667-1673, 2001. 10
- Ehara, H.; Nakano, C.; Ohno, K.; Goto, Y.-I.; Takeshita, K., "New autosomal-recessive syndrome of Leber congenital amaurosis, short stature, growth hormone insufficiency, mental retardation, hepatic dysfunction, and metabolic acidosis," *Am. J. Med. Genet.* **71**:258-266, 1997.
- Ek, J.; Kase, B. F.; Reith, A.; Bjorkhem, I.; Pedersen, J. I., "Peroxisomal dysfunction in a boy with neurologic symptoms and amaurosis (Leber disease): clinical and biochemical findings similar to those observed in Zellweger syndrome," *J. Pediatr.* **108**:19-24, 1986.
- Francois, J., "Leber's congenital tapetoretinal degeneration," *Int. Ophthalm. Clin.*, **8**:929-947, 1968.
- Gillespie, F. D., "Congenital amaurosis of Leber," *Am. J. Ophthalm.*, **61**:874-880, 1966. 20
- Glushakova LG *et al.*, "Does recombinant adeno-associated virus-vectored proximal region of mouse rhodopsin promoter support only rod-type specific expression *in vivo*?" *Mol Vis.* **12**:298-309, 2006.
- Gorczyca WA *et al.*, "Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods," *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**:4014-8, 1994.
- Haire SE, Pang J, Boye SL, Sokal I, Craft CM *et al.*, "Light-driven cone arrestin translocation in cones of postnatal guanylate cyclase-1 knockout mouse retina treated with AAV-GC1," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**(9):3745-53, 2006.
- Hanein, S.; Perrault, I.; Gerber, S.; Tanguy, G.; Barbet, F.; Ducroq, D.; Calvas, P.; Dollfus, H.; Hamel, C.; Lopponen, T.; Munier, F.; Santos, L.; Shalev, S.; Zafeiriou, D.; Dufier, J.-L.; Munnich, A.; Rozet, J.-M.; Kaplan, J., "Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis," *Hum. Mutat.* **23**:306-317, 2004. 30
- Hanein, S.; Perrault, I.; Olsen, P.; Lopponen, T.; Hietala, M.; Gerber, S.; Jeanpierre, M.; Barbet, F.; Ducroq, D.; Hakiki, S.; Munnich, A.; Rozet, J.-M.; Kaplan, J., "Evidence of a founder effect for the RETGC1 (GUCY2D) 2943DelG mutation in Leber congenital amaurosis pedigrees of Finnish origin," (Abstract) *Hum. Mutat.*, **20**:322-323, 2002.
- Hauswirth W, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L *et al.*, "Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial," *Hum. Gene Ther.*, **19**:979-990, 2008. 40
- Hayasaka, S.; Hara, S.; Mizuno, K.; Narisawa, K.; Tada, K., "Leber's congenital amaurosis associated with hyperthreoninemia," *Am. J. Ophthalm.*, **101**:475-479, 1986.
- Huang Y, Cideciyan AV, Papastergiou GI, Banin E, Semple-Rowland SL *et al.*, "Relation of optical coherence tomography to microanatomy in normal and rd chickens," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**:2405-16, 1998.

【 0 2 3 8 】

【数 5】

- Jacobson SG *et al.*, "Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis," *Hum Gene Ther.* **17**:845-58, 2006.
- Jacobson SG, Acland GM, Aguirre GD, Aleman TS, Schwartz SB *et al.*, "Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection," *Mol. Ther.*, **13**:1074-84, 2006.
- Karan S, Frederick JM and Baehr W, "Novel functions of photoreceptor guanylate cyclases revealed by targeted deletion," *Mol. Cell. Biochem.*, **334**:141-55, 2010.
- Khani SC, Pawlyk BS, Bulgakov OV, Kasperek E, Young JE, "AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**:3954-61, 2007. 10
- Khanna, H.; Davis, E. E.; Murga-Zamalloa, C. A.; Estrada-Cuzcano, A.; Lopez, I.; den Hollander, A. I.; Zonneveld, M. N.; Othman, M. I.; Waseem, N.; Chakarova, C. F.; Maubaret, C.; Diaz-Font, A. *et al.*, "A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies," *Nature Genet.*, **41**:739-745, 2009.
- Kolstad KD *et al.*, "Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration," *Hum. Gene Ther.*, **21**:571-8, 2010.
- Komáromy AM, Alexander JJ, Rowlan JS, Garcia MM, Chiodo VA, Kaya A *et al* "Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia." *Hum Mol Genet.* April 21 [Epub ahead of print], 2010. 20
- Lamb TD, Pugh EN Jr, "Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**:5138-5152, 2006.
- Lambert, S. R.; Sherman, S.; Taylor, D.; Kriss, A.; Coffey, R.; Pembrey, M., "Concordance and recessive inheritance of Leber congenital amaurosis," *Am. J. Med. Genet.*, **46**:275-277, 1993.
- Leber, T., "Ueber anomale formen der retinitis pigmentosa," *Albrecht von Graefes Arch. Ophthalm.*, **17**:314-340, 1871.
- Leber, T., "Ueber retinitis pigmentosa und angeborene amaurose," *Albrecht von Graefes Arch. Ophthalm.* **15**:1-25, 1869.
- Li T, Pawlyk BS, Bulgakov OV, Liu X, Xu X, Adamian M, Sun X, Khani SC, Berson EL, Sandberg M, "Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis," *Hum. Gene Ther.*, **21**(8):993-1004, 2010. 30
- Li W *et al.*, "Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye," *Mol Vis.*, **14**:267-75, 2009.
- Liu X, Seno K, Nishizawa Y, Hayashi F, Yamazaki A *et al.*, "Ultrastructural localization of retinal guanylate cyclase in human and monkey retinas," *Exp. Eye Res.*, **59**:761-8, 1994.
- Liu, L, Barone I, Dai X, Lei B, Boye SL, Chiodo V, Chang B, Hauswirth WW, Strettoi E, Pang JJ, "Gene therapy preserves inner retinal neurons and their connectivity in rd10 mice, a model of recessive retinitis pigmentosa with PDEβ mutations," *Abstr. ARVO Annu. Meet.*, #3112, 2010. 40
- Livak KJ and Schmittgen "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**:402-8, 2001.
- Lotery AJ *et al* "Adeno-associated virus type 5 transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina," *Hum Gene Ther.*, **14**:1663-71, 2003.

【 0 2 3 9 】

【数 6】

- Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K, Gu Q, Spencer M *et al.*, "Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:5535-9, 1995.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh Jr EN, Mingozzi F, Bennicelli J *et al.*, "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, **358**:2240-2248, 2008.
- Mah *et al.*, "Dual vectors expressing murine factor VIII result in sustained correction of hemophilia A mice," *Hum. Gene Ther.*, **14**(2):143-152, 2003.
- Mancuso K *et al.* "Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates," *Nature* **461**:784-7, 2009. 10
- McCarty *et al.*, "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*," *Gene Ther.*, **10**(26):2112-2118, 2003.
- Mendez A, Burns ME, Sokal I, Dizhoor AM, Baehr W, Palczewski K, Baylor DA, Chen J., "Role of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in setting the flash sensitivity of rod photoreceptors," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(17):9948-53, 2001.
- Milam, A. H.; Barakat, M. R.; Gupta, N.; Rose, L.; Aleman, T. S.; Pianta, M. J.; Cideciyan, A. V.; Sheffield, V. C.; Stone, E. M.; Jacobson, S.G., "Clinicopathologic effects of mutant GUCY2D in Leber congenital amaurosis," *Ophthalmology*, **110**:549-558, 2003.
- Moore, A. T.; Taylor, D. S. I. "A syndrome of congenital retinal dystrophy and saccade palsy--a subset of Leber's amaurosis," *Brit. J. Ophthalmol.*, **68**:421-431, 1984. 20
- Nakamura, M.; Ito, S.; Miyake, Y. "Novel de novo mutation in CRX gene in a Japanese patient with Leber congenital amaurosis," *Am. J. Ophthalmol.*, **134**:465-467, 2002.
- Natkunaratnam M *et al.*, "Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8," *Gene Ther.*, **15**:463-7, 2008.
- Nickel, B.; Hoyt, C. S. "Leber's congenital amaurosis. Is mental retardation a frequent associated defect?" *Arch. Ophthalmol.*, **100**:1089-1092, 1982.
- Otto-Bruc A, Buczylo J, Surgucheva I, Subbaraya I, Rudnicka-Nawrot M *et al.*, "Functional reconstitution of photoreceptor guanylate cyclase with native and mutant forms of guanylate cyclase-activating protein 1," *Biochemistry*, **36**:4295-302, 1997. 30
- Palczewski K *et al.*, "Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein," *Neuron* **13**:395-404, 1994.
- Pang J, Boye SE, Lei B, Boye SL, Everhart D, Ryals R, Umino Y, Rohrer B, Alexander J, Li J, Dai X, Li Q, Chang B, Barlow R, Hauswirth WW, "Self-complementary AAV-mediated gene therapy restores cone function and prevents cone degeneration in two models of Rpe65 deficiency," *Gene Ther.*, **17**(7):815-826, 2010.
- Pang JJ, Boye SL, Kumar A, Dinculescu A, Deng W, Li J, Li Q, Rani A, Foster TC, Chang B, Hawes NL, Boatright JH, Hauswirth WW, "AAV-mediated gene therapy for retinal degeneration in the rd10 mouse containing a recessive PDEbeta mutation," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**(10):4278-83, 2008. 40
- Pang JJ, Chang B, Kumar A, Nusinowitz S, Noorwez SM, Li J, Rani A, Foster TC, Chiodo VA, Doyle T, Li H, Malhotra R, Teusner JT, McDowell JH, Min SH, Li Q, Kaushal S, Hauswirth WW, "Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis," *Mol. Ther.*, **13**(3):565-72. 2006.

【数 7】

- Pang JJ, Dai X, Boye SE, Barone I, Boye SL, Mao S *et al.*, "Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa," *Mol. Ther.* **19**:234-42, 2011.
- Pang JJ, Dai X, Everhart D, 3, Lei B, Boye SL, Dinculescu A, Umino Y, Chang B, Barlow R, Hauswirth WW., "Long-term rescue following gene therapy with capsid mutant AAV8 in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa," *ARVO Abstract 2527*, Annu. Meet., 2010.
- Pasadhika S, Fishman GA, Stone EM, Lindeman M, Zelkha R *et al.*, "Differential macular morphology in patients with RPE65, CEP290, GUCY2D and AIPL1 related Leber congenital amaurosis," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**(5):2608-2614, 2010. 10
- Pawlyk BS *et al.*, "Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of leber congenital amaurosis," *Hum Gene Ther.*, Apr 12 [Epub ahead of print], 2010.
- Payne AM, Morris AG, Downes SM, Johnson S, Bird AC, Moore AT *et al.*, "Clustering and frequency of mutations in the retinal guanylate cyclase (GUCY2D) gene patients with dominant cone-rod dystrophies," *J Med Genet.* **38**:611-614, 2001.
- Perrault *et al.*, "Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis," *Nat. Genet.*, **14**(4):461-4, 1996.
- Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Ducroq D *et al.*, "Spectrum of retGC1 mutations in Leber's congenital amaurosis," *Eur. J. Hum. Genet.*, **8**:578-82, 2000. 20
- Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Leowski C *et al.*, "Leber congenital amaurosis," *Mol. Genet. Metab.*, **68**:200-8, 1999.
- Perrault, I.; Rozet, J. M.; Calvas, P.; Gerber, S.; Camuzat, A.; Dollfus, H.; Chatelin, S.; Souied, E.; Ghazi, I.; Leowski, C.; Bonnemaïson, M.; Le Paslier, D.; Frezal, J.; Dufier, J.-L.; Pittler, S.; Munnich, A.; Kaplan, J., "Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis," *Nature Genet.*, **14**:461-464, 1996.
- Perrault, I.; Rozet, J.-M.; Gerber, S.; Ghazi, I.; Leowski, C.; Ducroq, D.; Souied, E.; Dufier, J.-L.; Munnich, A.; Kaplan, J., "Leber congenital amaurosis," *Molec. Genet. Metab.*, **68**:200-208, 1999. 30
- Petr-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min SH, Chiodo V, Pang JJ, *et al.* "High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors," *Mol. Ther.* **17**:463-71, 2009.
- Poirier, A *et al.* "Toxicology and biodistribution studies of a recombinant adeno-associated virus 2- α -1 antitrypsin vector," *Preclinica* **2**:43-51, 2004.
- Polans A, Baehr W, Palczewski K "Turned on by Ca^{2+} ! The physiology and pathology of Ca^{2+} binding proteins in the retina," *Trends Neurosci* **19**:547-554, 2006.
- Provost N *et al.*, "Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain," *Mol Ther.*, **11**:275-83, 2005. 40
- Pugh EN Jr, Duda T, Sharma RK, Sitaramayya A "Photoreceptor guanylate cyclases: a review," *Biosci Rep.*, **17**:429-473, 1997.
- Rahn, E. K.; Falls, H. F.; Knaggs, J. G.; Proux, D. J., "Leber's congenital amaurosis with an Ehlers-Danlos-like syndrome: study of an American family," *Arch. Ophthalmol.*, **79**:135-141, 1968.

【 0 2 4 1 】

【数 8】

- Riess, O.; Weber, B.; Noeremolle, A.; Shaikh, R.A.; Hayden, M.R.; Musarella, M.A., "Linkage studies and mutation analysis of the PDEB gene in 23 families with Leber congenital amaurosis," *Hum. Mutat.*, **1**:478-485, 1992.
- Russell-Eggitt, I. M.; Taylor, D. S. I.; Clayton, P. T.; Garner, A.; Kriss, A.; Taylor, J. F. N. "Leber's congenital amaurosis--a new syndrome with a cardiomyopathy," *Brit. J. Ophthalmol.*, **73**:250-254, 1989.
- Schappert-Kimmijser, J.; Henkes, H. E.; Van den Bosch, J. "Amaurosis congenita (Leber)," *Arch. Ophthalmol.*, **61**:211-218, 1959.
- Schroeder, R.; Mets, M. B.; Maumenee, I. H. "Leber's congenital amaurosis: retrospective review of 43 cases and a new fundus finding in two cases," *Arch. Ophthalmol.*, **105**:356-359, 1987. 10
- Schuil, J.; Meire, F. M.; Delleman, J. W. "Mental retardation in amaurosis congenita of Leber," *Neuropediatrics*, **29**:294-297, 1998.
- Semple-Rowland SL, Lee NR, Van Hooser JP, Palczewski K, Baehr W, "A null mutation in the photoreceptor guanylate cyclase gene causes the retinal degeneration chicken phenotype," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:1271-6, 1998.
- Simonelli F, Ziviello C, Testa F, Rossi S, Fazzi E *et al.*, "Clinical and molecular genetics of Leber's congenital amaurosis: a multicenter study of Italian patients," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**:4284-90, 2007.
- Sohocki, M. M.; Bowne, S. J.; Sullivan, L. S.; Blackshaw, S.; Cepko, C. L.; Payne, A. M.; Bhattacharya, S. S.; Khaliq, S.; Mehdi, S. Q.; Birch, D. G.; Harrison, W. R.; Elder, F. F. B.; Heckenlively, J. R.; Daiger, SP, "Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis," *Nature Genet.*, **24**:79-83, 2000. 20
- Song S *et al.* "Intramuscular administration of recombinant adeno-associated virus 2 a-1 antitrypsin (rAAV-SERPINA1) vectors in a nonhuman primate model: safety and immunologic aspects," *Mol. Ther.*, **6**:329-335, 2002.
- Sorsby, A.; Williams, C. E., "Retinal aplasia as a clinical entity," *Brit. Med. J.* **1**:293-297, 1960.
- Stephen R *et al.*, "Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal calcium sensor, guanylate cyclase-activating protein 1," *Structure* **15**:1392-402, 2007.
- Stieger K *et al.*, "Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain," *Mol Ther.* **16**:916-23, 2008. 30
- Sun X, Pawlyk B, Xu X, Liu X, Bulgakov OV *et al.*, "Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations," *Gene Ther.*, **17**:117-31, 2010.
- Surace EM and Auricchio A. "Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer," *Vis. Res.*, **48**:353-359, 2007.
- Tan MH, Smith AJ, Pawlyk B, Xu X, Liu X *et al.*, "Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors," *Hum. Mol. Genet.*, **18**:2099-114, 2009.
- Timmers AM, Zhang H, Squitieri A, Gonzalez-Pola C, "Subretinal injections in rodent eyes: effects on electrophysiology and histology of rat retina," *Mol. Vis.*, **7**:131-7, 2001. 40
- Traint and Whitehead, "Simultaneous Extraction of High-Quality RNA and DNA from Small Tissue Samples," *J. Heredity*, **100**:246-250, 2009.
- Ulshafer RJ, Allen C, Dawson WW and Wolf ED, "Hereditary retinal degeneration in the Rhode Island Red chicken. I. Histology and ERG," *Exp. Eye Res.*, **39**:125-35, 1984.

【数 9】

- Umino Y, Solessio E, Barlow RB, "Speed, spatial, and temporal tuning of rod and cone vision in mouse," *J. Neurosci.*, **28**:189-198, 2008.
- Waardenburg, P. J.; Schappert-Kimmijser, J., "On various recessive biotypes of Leber's congenital amaurosis," *Acta Ophthalm.*, **41**:317-320, 1963.
- Wagner, R. S.; Caputo, A. R.; Nelson, L. B.; Zanoni, D., "High hyperopia in Leber's congenital amaurosis," *Arch. Ophthalm.*, **103**:1507-1509, 1985.
- Weiss ER, *et al.*, "Species-specific differences in expression of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) 7 and GRK1 in mammalian cone photoreceptor cells: implications for cone cell phototransduction," *J. Neurosci.*, **21**:9175-84, 2001. 10
- Wensel TG "Signal transducing membrane complexes of photoreceptor outer segments," *Vis Res.* **48**:2052-2061, 2008.
- Wilkie SE, Newbold FJ, Deery E, Walker CE, Stinton I, Ramamurthy V *et al.*, "Functional characterization of missense mutations at codon 838 in retinal guanylate cyclase correlates with disease severity in patients with autosomal dominant cone-rod dystrophy," *Hum Mol Genet.*, **9**:3065-3073, 2000.
- Williams GA and Jacobs GH "Cone-based vision in the aging mouse," *Vision Res* **47**:2037-46, 2007.
- Williams ML, Coleman JE, Haire SE, Aleman TS, Cideciyan AV, "Lentiviral expression of retinal guanylate cyclase-1 (RetGC1) restores vision in an avian model of childhood blindness," *PLoS. Med.*, **3**:e201, 2006. 20
- Yang GS, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC *et al.*, "Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size," *J. Virol.*, **76**:7651-60, 2002.
- Yang RB and Garbers DL, "Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers," *J. Biol. Chem.*, **272**:13738-42, 1997.
- Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fülle HJ, "Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:602-6, 1995.
- Yang RB and Garbers DL "Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers," *J. Biol. Chem.*, **272**:13738-13742, 1997.
- Yang RB, Robinson SW, Xiong WH, Yau KW, Birch DG *et al.*, "Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior," *J. Neurosci.*, **19**:5889-97, 1999. 30
- Yano, S.; Oda, K.; Watanabe, Y.; Watanabe, S.; Matsuishi, T.; Kojima, K.; Abe, T.; Kato, H. "Two sib cases of Leber congenital amaurosis with cerebellar vermis hypoplasia and multiple systemic abnormalities," *Am. J. Med. Genet.*, **78**:429-432, 1998.
- Yin L, Greenberg K, Hunter JJ, Dalkara D, Kolstad KD, Masella BD *et al.*, "Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Feb 10, 2011.
- Zernant, J.; Kulm, M.; Dharmaraj, S.; den Hollander, A. I.; Perrault, I.; Preising, M. N.; Lorenz, B.; Kaplan, J.; Cremers, F. P. M.; Maumenee, I.; Koenekoop, R. K.; Allikmets, R., "Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles," *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **46**:3052-3059, 2005. 40
- Zhang H, Huang W, Zhang H, Zhu X, Craft CM *et al.*, "Light-dependent redistribution of visual arrestins and transducin subunits in mice with defective phototransduction," *Mol. Vis.*, **9**:231-7, 2003.
- Zhong L, *et al.*, "Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**:7827-32, 2008.

【 0 2 4 3 】

【数 10】

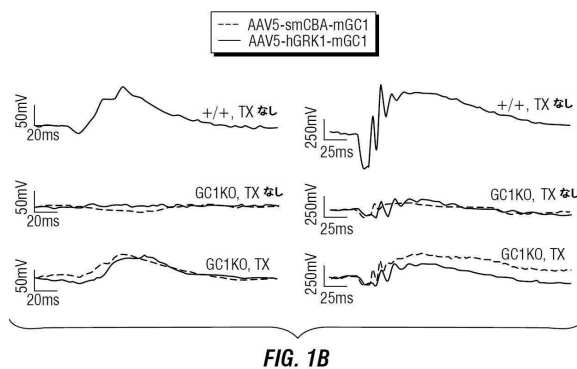
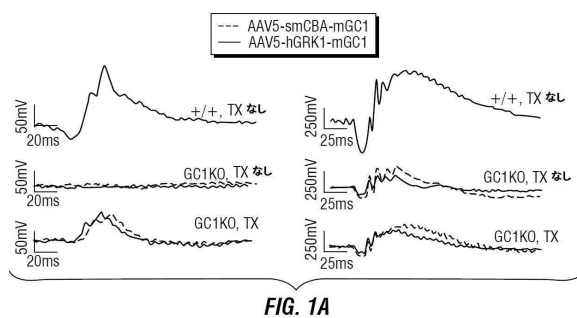
Zhu X, Li A, Brown B, Weiss ER, Osawa S, Craft CM, "Mouse cone arrestin expression pattern: light induced translocation in cone photoreceptors," *Mol. Vis.*, **8**:462-71, 2002.

Zolotukhin S *et al.*, "Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors," *Methods*, **28**(2):158-67, 2002.

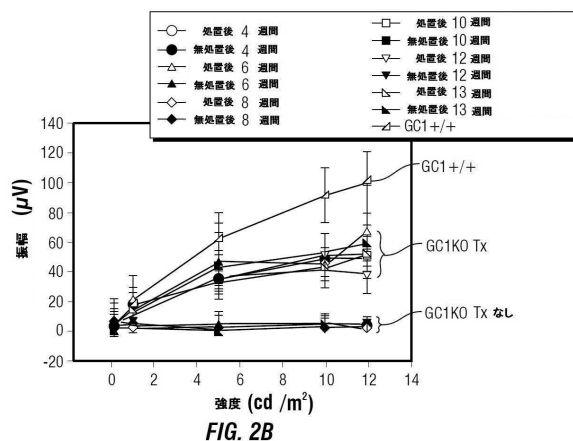
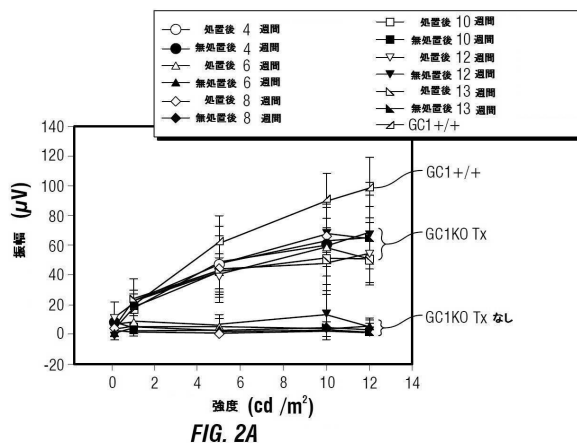
本明細書において開示され、特許請求される組成物および方法はすべて、本開示を考慮して、不必要な実験作業を伴うことなく、成し、実施することができる。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態に関して記載されるが、変形は、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書において記載される組成物および方法にならびにステップまたは方法のステップの順序に適用されてもよいことは、当業者らに明らかであろう。特に、化学的および生理学的の両方に関連するある作用物質が、本明細書において記載される作用物質と置換されてもよく、一方、同じまたは同様の結果が達成されてもよいことは明らかであろう。当業者らに明らかなすべてのそのような同様の代用物および修飾は、添付の請求項によって定義される本発明の精神、範囲、および概念内にあると考えられる。

10

【図 1】



【図 2】



【図 3 - 1】

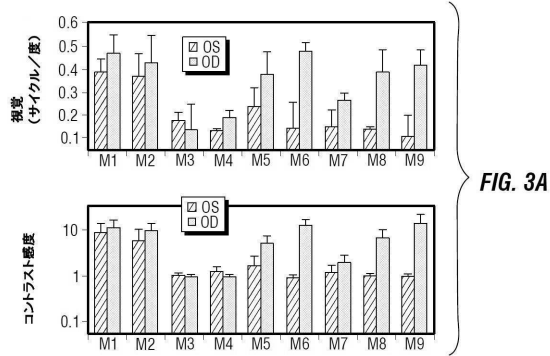


FIG. 3A

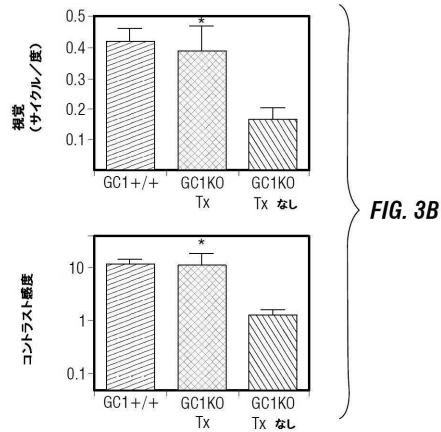


FIG. 3B

【図 3 - 2】

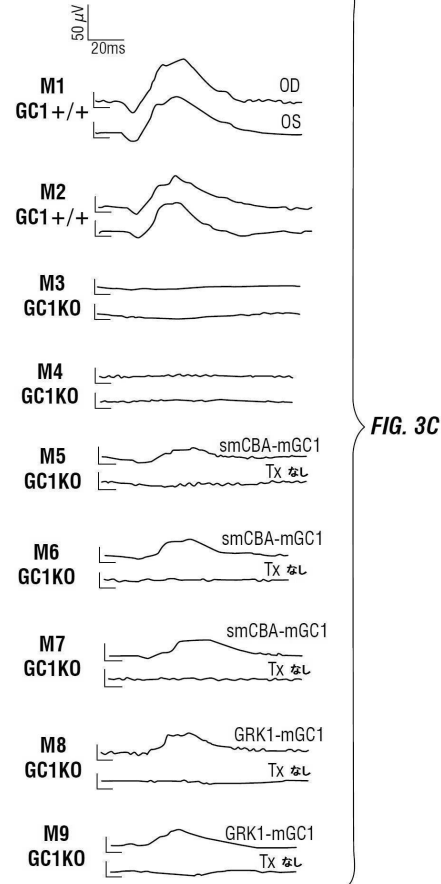


FIG. 3C

【図 4】

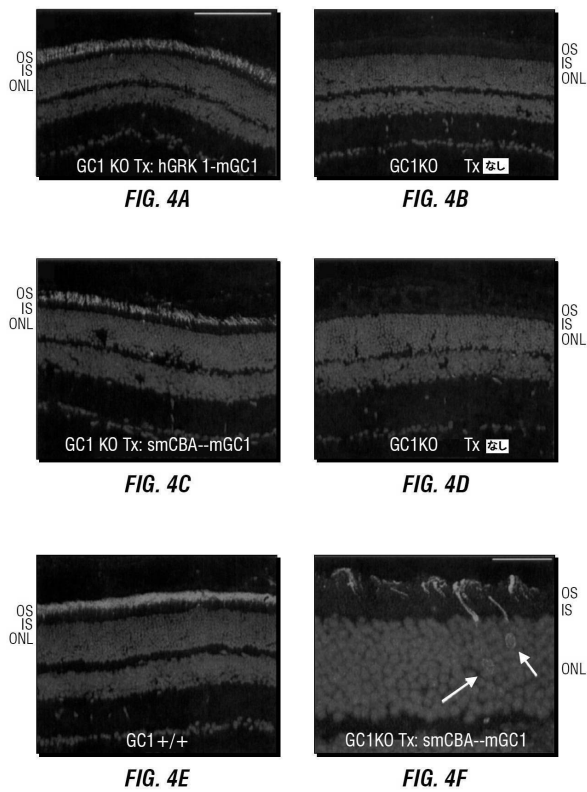


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

FIG. 4D

FIG. 4E

FIG. 4F

【図 5】

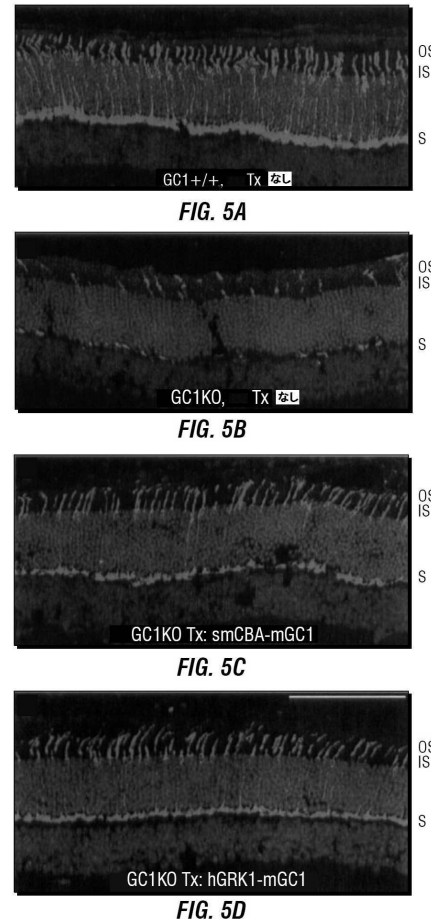


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

FIG. 5D

【図 6】

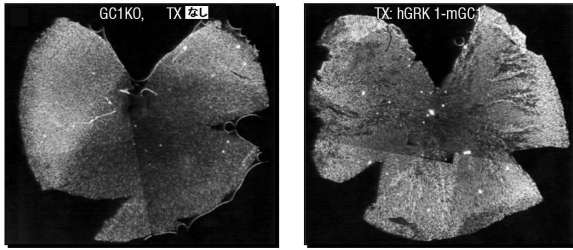


FIG. 6A

FIG. 6B

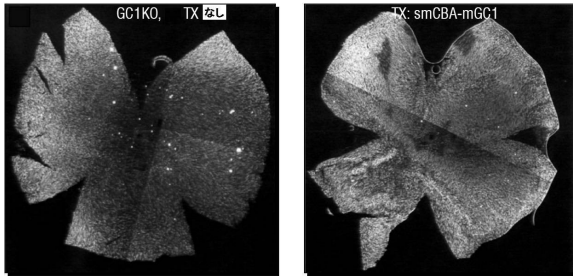


FIG. 6C

FIG. 6D

【図 7】

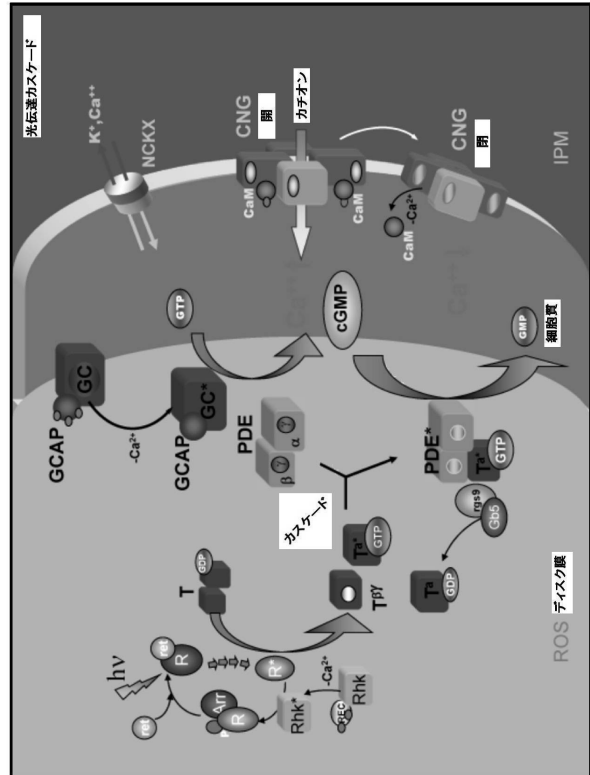


FIG. 7

【図 8】

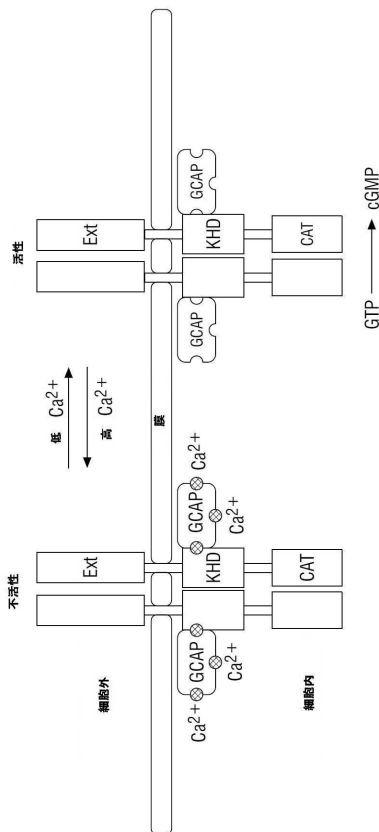


FIG. 8

【図 9】

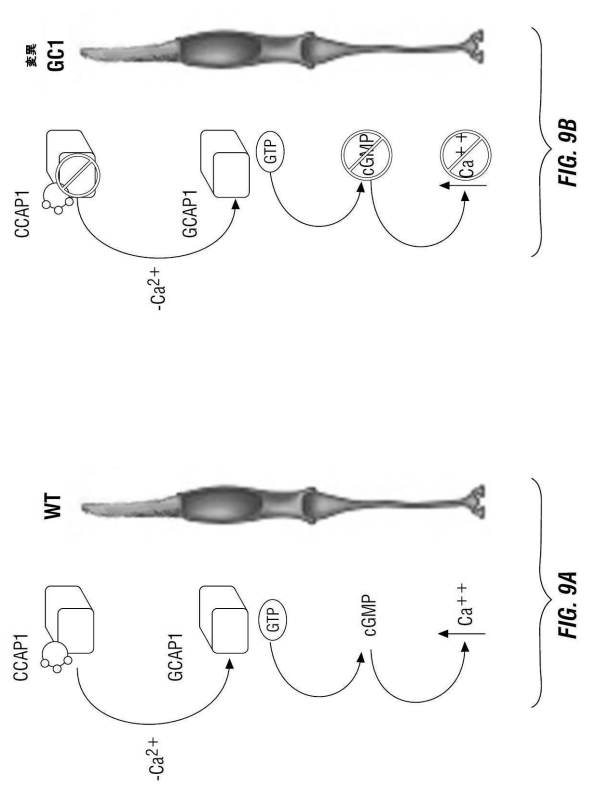


FIG. 9B

FIG. 9A

【图 13-2】

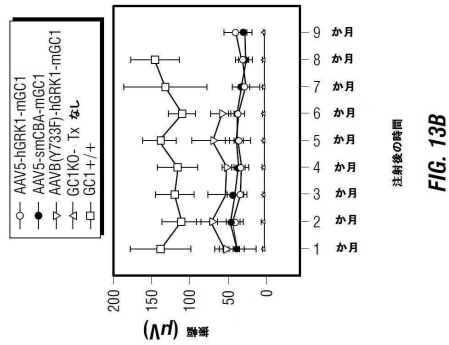


FIG. 13B

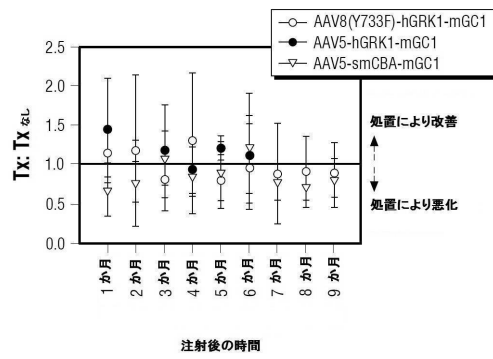


FIG. 13C

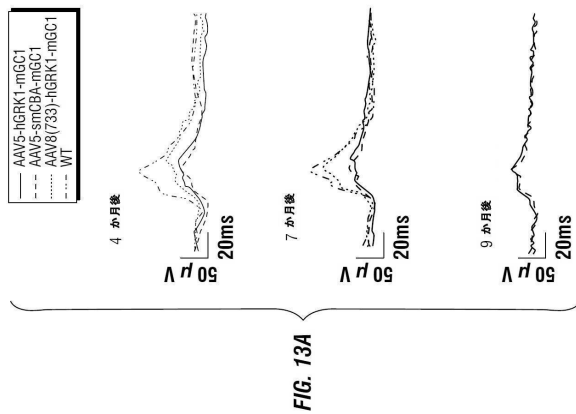


FIG. 13A

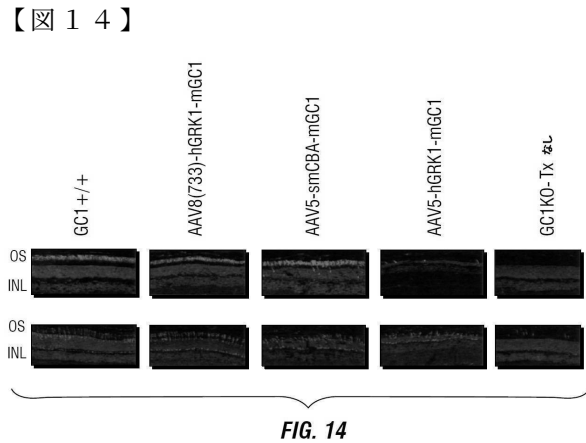


FIG. 14

【図 15】

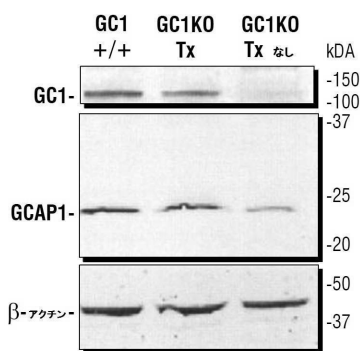


FIG. 15

【図 1 6】

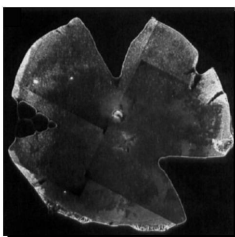


FIG. 16A

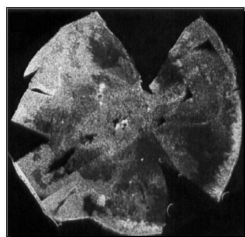


FIG. 16B

【図 17】

[illegible]

M、動物；R、右；L、左；Tx、処置；-、PCR増幅なし；+、ベクター配列のPCR増幅（示された反復数は、平均である）。DNA 1mg当たりのコピ一数；na、利用可能ではない（許容されないspike-inのために決定できない）

A 注射後4日目

A. 注射後4か月

B. 注射後7か月

C 注射後10か月

FIG. 17

【図 18】

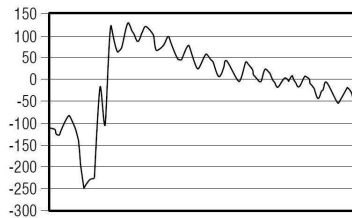


FIG. 18A-1

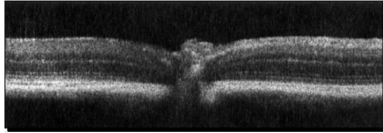


FIG. 18A-2

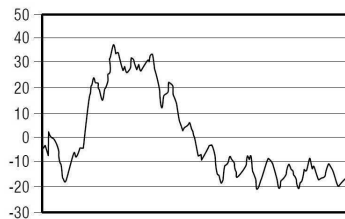


FIG. 18B-1

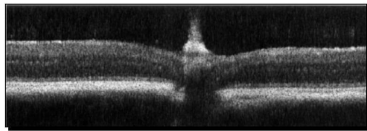


FIG. 18B-2

【図 20】

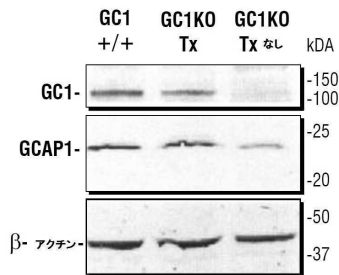


FIG. 20A

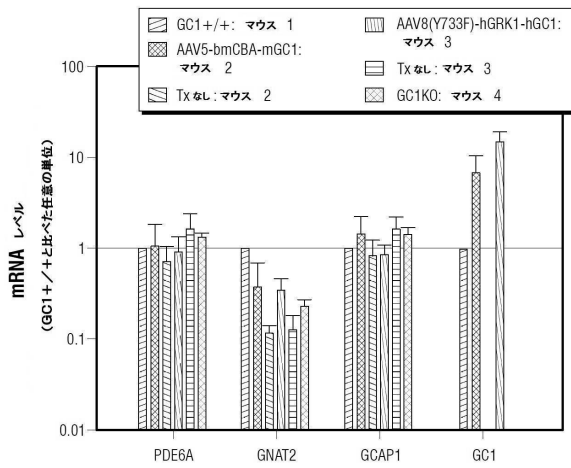
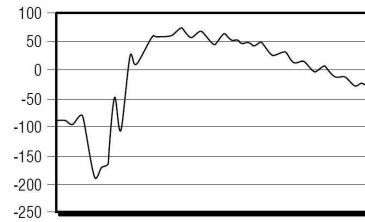


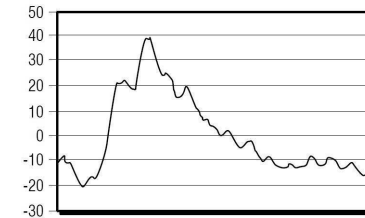
FIG. 20B

【図 19】



処置杆体

FIG. 19A



処置錐体

FIG. 19B

【図 21】

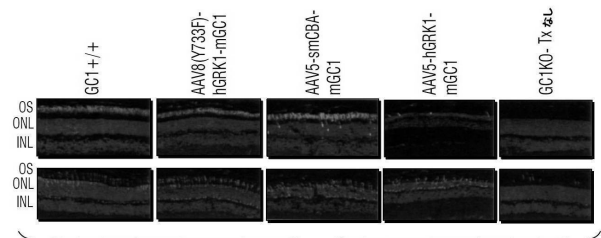


FIG. 21A

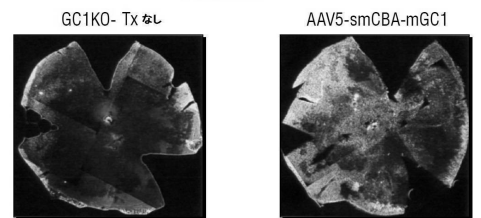


FIG. 21B

【図 2 2 A】

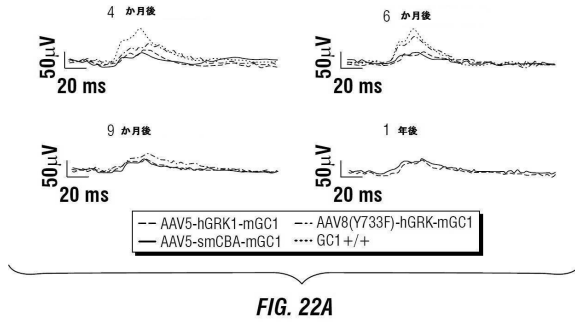


FIG. 22A

【図 2 2 B】

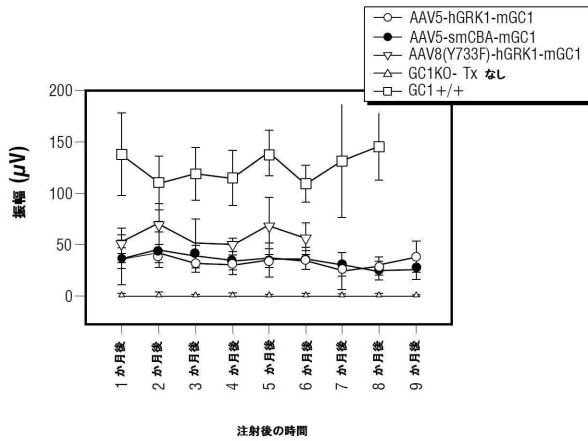


FIG. 22B

【図 2 3 - 2】

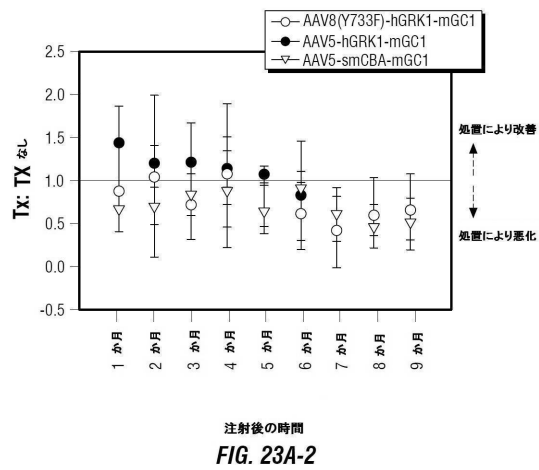


FIG. 23A-2

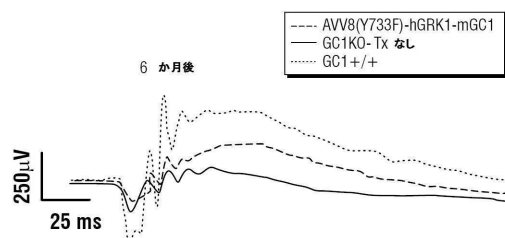


FIG. 23B

【図 2 3 - 1】

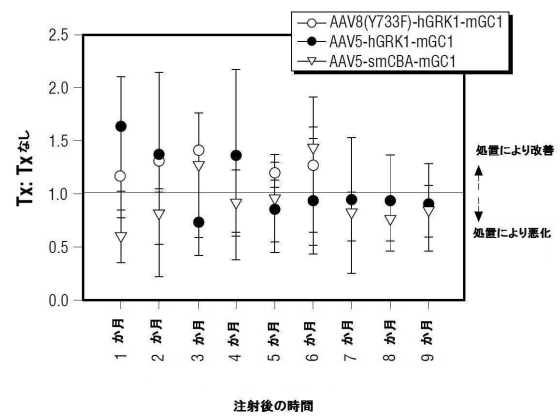


FIG. 23A-1

【図 2 4】

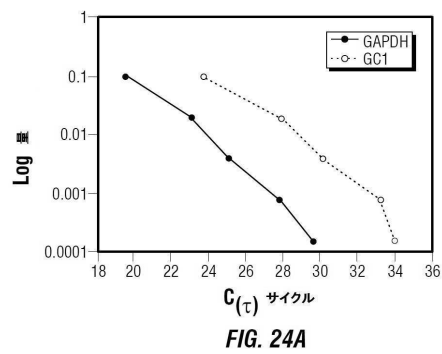


FIG. 24A

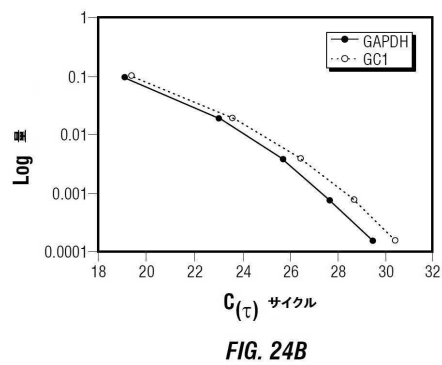


FIG. 24B

【配列表】

0006533246000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ウィリアム ダブリュー. ハウスワース
アメリカ合衆国 フロリダ 32610, ゲインズビル, エスダブリュー アーチャー ロード 1600
- (72)発明者 サンフォード レオン ボーイ
アメリカ合衆国 フロリダ 32608, ゲインズビル, エスダブリュー 41 エスティー
アベニュー 10206

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 国際公開第02/082904 (WO, A1)
国際公開第2009/046059 (WO, A1)
"Retinal guanylyl cyclase 1", Acc.Q02846, インターネット, 2010.04.20, [2015.07.17検索]
, URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1345920?sat=12&satkey=8663633>
Experimental Eye Research, 2010.02(online), Vol.90, p.546-554
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, Vol.105, No.22, pp.7827-7832
Invest Ophthalmol. Vis. Sci., 2006, Vol.47, No.9, pp.3745-3753

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12N 9/00-9/99
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
WPIDS/WPIX (STN)