

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-517929

(P2023-517929A)

(43)公表日 令和5年4月27日(2023.4.27)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z 4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	

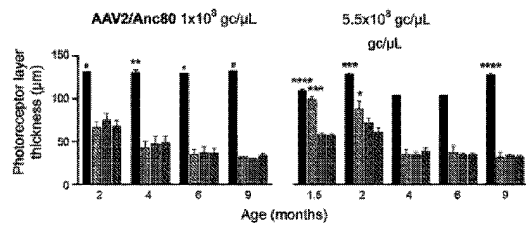
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全36頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-554440(P2022-554440)	(71)出願人	511140770
(86)(22)出願日	令和3年3月11日(2021.3.11)		マサチューセッツ アイ アンド イヤー インファーマリー
(85)翻訳文提出日	令和4年11月1日(2022.11.1)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 1 4 , ポストン , チャールズ スト リート 2 4 3
(86)国際出願番号	PCT/US2021/021936	(71)出願人	516106623
(87)国際公開番号	WO2021/183779		ザ スケベンス アイ リサーチ インステ イテュート , インコーポレイテッド
(87)国際公開日	令和3年9月16日(2021.9.16)		アメリカ合衆国 0 2 1 1 4 マサチュー セッツ州 , ポストン , スタニフォード ストリート 2 0
(31)優先権主張番号	62/988,260	(74)代理人	100092783
(32)優先日	令和2年3月11日(2020.3.11)		弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100120134
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 NMNA T 1 関連網膜変性に対する遺伝子療法

(57)【要約】

ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ1 (NMNA T 1) の変異に関連する網膜変性の遺伝子療法のための方法および組成物。



FIGs. 3C

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト対象におけるニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ 1 (NMNAT1) 遺伝子の変異によって引き起こされる網膜変性を治療する方法であって、網膜細胞、好ましくは光受容器における発現を駆動するプロモーターと操作可能に連結されているヒトNMNAT1をコードする配列を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの治療有効量を、前記対象の眼に送達するステップを含む、方法。

【請求項 2】

前記プロモーターが、CAG、CASI、CMV、RHOまたはロドプシンキナーゼ(GRK1)プロモーターである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

NMNAT1をコードする配列が、野生型(配列番号2)またはコドン最適化(配列番号1)配列と少なくとも80%同一である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ベクターが網膜下注射によって送達される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ヒト対象の眼におけるNMNAT1の発現を増加させる方法であって、網膜、好ましくは光受容器細胞における発現を駆動するプロモーターと操作可能に連結されているヒトNMNAT1をコードする配列を含むアデノ随伴ウイルス2型(AAV2)ベクターの治療有効量を、前記対象の眼に送達するステップを含む、方法。

20

【請求項 6】

前記プロモーターが、CAG、CASI、CMV、RHOまたはロドプシンキナーゼ(GRK1)プロモーターである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

NMNAT1配列がコドン最適化されている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ベクターが網膜下注射によって送達される、請求項 5 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

網膜、好ましくは光受容器細胞における発現を駆動するプロモーターと操作可能に連結されているヒトNMNAT1をコードする配列を含む、アデノ随伴ウイルス2型(AAV2)ベクター。

30

【請求項 10】

前記プロモーターが、CAG、CASI、CMV、RHOまたはロドプシンキナーゼ(GRK1)プロモーターである、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 11】

NMNAT1配列がコドン最適化されている、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 12】

網膜下注射による送達のために製剤化されている、請求項 9 から 11 に記載のベクターを含む医薬組成物。

40

【請求項 13】

ヒト対象の眼におけるNMNAT1の変異によって引き起こされる網膜変性の治療に使用するための、請求項 9 から 11 に記載のベクター。

【請求項 14】

ヒト対象の眼におけるNMNAT1の発現の増加に使用するための、請求項 9 から 11 に記載のベクター。

【請求項 15】

ヒト対象の眼におけるNMNAT1の変異によって引き起こされる網膜変性の治療に使用するための、請求項 12 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 16】

ヒト対象の眼における NMNAT1 の発現の増加に使用するための、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

本出願は、2020年3月11に出願された米国仮特許出願第62/988,260号の利益を請求する。前記出願の全内容は、参照によって本明細書中に組み込まれるものとする。

【0002】

連邦政府の資金提供による研究または開発

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号EY012910の下で政府の支援を受けて行ったものである。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

本発明は、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ1 (NMNAT1) の変異に関連する網膜変性の遺伝子療法のための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0004】

NMNAT1 関連網膜変性は、人生の最初の10~20年の間に重度の視力喪失を引き起こす¹⁻⁴ 早期発症型の劣性遺伝病である⁵。罹患遺伝子、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ1 (NMNAT1) は、細胞核内におけるNAD⁺の再生に不可欠な、遍在的に発現される酵素をコードする^{1,6}。核内NAD⁺プールは、DNA修復、遺伝子発現、細胞内シグナル伝達および細胞老化に関連する細胞内プロセスを含む、多くの細胞内プロセスにとって重要である⁷⁻¹⁰。NMNAT1の少なくとも34の変異は、網膜変性と関連し^{10,11}、そのそれぞれが、さまざまな程度で酵素活性を低下させると推定されている⁴。t a b t t w oの完全に機能しない対立遺伝子の遺伝は、Nmna t 1ノックアウトマウスでの研究に基づき、胚性致死と考えられるので、深刻であるが不完全な、核内NAD⁺の喪失が疾患を引き起こす可能性がある¹²。2つの他のNMNATアイソフォーム、NMNAT2とNMNAT3はそれぞれ、サイトソールおよびミトコンドリアにおいて同じNAD⁺シンターゼ機能を有するが^{8,13}、少なくとも網膜ではいずれもNMNAT1の喪失を補償することができない¹²ことは明白である。この疾患の孤立性は、本研究で使用される同じモデルである、Nmna t 1^{V9M/V9M}マウスの神経網膜ではNAD⁺レベルが低下している（前駆体のレベルの上昇を伴う）が、脳組織を含む他の組織中のレベルは未変化のままであるという最近の発見（Greenwald et al., RD2018 abstract）によって部分的に説明できる。しかし、網膜がこの独特の脆弱性を有する根本的な理由は、依然としてはっきりしていない。

【発明の概要】

【0005】

ヒト対象におけるニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ1 (NMNAT1) 遺伝子の変異によって引き起こされる網膜変性を治療する方法が、本明細書中で提供される。一般に、この方法は、網膜細胞、好ましくは光受容器における発現を駆動するプロモーターと操作可能に連結されているヒトNMNAT1をコードする配列（例えば、配列番号3と少なくとも80%同一の配列）を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの治療有効量を、対象の眼に送達するステップを含む。

【0006】

一部の実施形態において、プロモーターは、CAG、CASI、CMV、RHOまたはロドプシンキナーゼ（GRK1）プロモーターである。

【0007】

一部の実施形態において、NMNAT1をコードする配列は、野生型（配列番号2）ま

10

20

30

40

50

たはコドン最適化（配列番号 1）配列と少なくとも 80% 同一である。

【0008】

一部の実施形態において、ベクターは網膜下注射によって送達される。

【0009】

ヒト対象の眼における NMNAT1 の発現を増加させる方法もまた、本明細書中で提供される。この方法は、網膜、好ましくは光受容器細胞における発現を駆動するプロモーターと操作可能に連結されているヒト NMNAT1 をコードする配列を含むアデノ随伴ウイルス 2 型（AAV2）ベクターの治療有効量を、対象の眼に送達するステップを含む。

【0010】

一部の実施形態において、プロモーターは、CAG、CASI、CMV、RHO またはロドプシンキナーゼ（GRK1）プロモーターである。 10

【0011】

一部の実施形態において、NMNAT1 配列はコドン最適化されている。

【0012】

一部の実施形態において、ベクターは網膜下注射によって送達される。

【0013】

網膜、好ましくは光受容器細胞における発現を駆動するプロモーターと操作可能に連結されているヒト NMNAT1 をコードする配列を含むアデノ随伴ウイルス 2 型（AAV2）ベクターもまた、本明細書中で提供される。

【0014】

一部の実施形態において、プロモーターは、CAG、CASI、CMV、RHO またはロドプシンキナーゼ（GRK1）プロモーターである。 20

【0015】

一部の実施形態において、NMNAT1 配列はコドン最適化されている。一部の実施形態において、NMNAT1 をコードする配列は、野生型（配列番号 2）またはコドン最適化（配列番号 1）配列と少なくとも 80% 同一である。

【0016】

網膜下注射による送達のために製剤化されている、本明細書中に記載したベクターを含む医薬組成物も、本明細書中で提供される。

【0017】

本明細書中に記載したベクターおよび組成物は、例えば、ヒト対象の眼における NMNAT1 の変異によって引き起こされる網膜変性の治療に、および/またはヒト対象の眼における NMNAT1 の発現の増加に使用できる。 30

【0018】

別段の定義がない限り、本明細書中で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本発明に使用するための方法および材料は、本明細書中に記載されており；当技術分野において公知の他の好適な方法および材料も使用できる。材料、方法および例は例示に過ぎず、限定的であることを意図するものではない。本明細書中で言及した全ての公表文献、特許出願、特許、配列、データベースエントリおよび他の参考文献は、参照によってそれら全体が組み込まれる。矛盾が生じる場合は、定義を含めて、本明細書が優先するものとする。 40

【0019】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図ならびに特許請求の範囲から明白となるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図 1 - 1】図 1A ~ 図 1E：NMNAT1 導入遺伝子配列およびウイルス試薬を示す図である。A) 840 ヌクレオチドのコドン最適化ヒト NMNAT1 cDNA 配列（黒文字、配列番号 1）は、174 のサイレント置換（太字）を有し、それぞれの野生型ヌクレ 50

オチドの同一性は、真下に示される（野生型配列は、ここでは配列番号2として提示する）。B) CASIプロモーターによって駆動されかつSC.AAV2/9にパッケージングされているNMNAT1は、同じプロモーターによって駆動され、WPREがそれに続く、SS.AAV2/9にパッケージングされているEGFPレポーター構築物と共に、マウスに同時送達される。C) 両構築物がSS.AAV2/9にパッケージングされている以外は、パネルAと同じ。D) CAGプロモーターによって駆動され、WPREがそれに続く自己切断型NMNAT1-EGFP融合構築物が、AAV2/Anc80ベクターにパッケージングされている。E) CASIプロモーターによって駆動され、SS.AAV7m8にパッケージングされている、NMNAT1。略語：bGH、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル；EGFP、高感度緑色蛍光タンパク質；WPRE、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント；T2A、トセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス2A自己切断配列。

10

【図1-2】(上記の通り)

【図2】in vivoイメージングを示す図である。4月齢のNmnat1^{V9M/V9M}マウスからの注射された網膜(左列)および注射されなかった網膜(右列)の明視野眼底画像は、OCT画像の光受容器層測定的面を示している。白色破線：下方網膜(注射された網膜の注射部位の近位)；黄色破線：上方網膜(注射された眼の注射部位の遠位)；矢印は、注射部位を示す(上段)。EGFPは、注射された網膜にのみ見える(中段)。代表的な断面OCT画像は、 2×10^9 gc/ μ LのSC.AAV2/9試薬が注射された網膜(左)は、注射されなかった網膜(右)よりも厚いことを示している。

20

【図3-1】図3A~図3C：SC.AAV2/9試薬が、網膜の安定な構造的レスキューを提供することを示すin vivoイメージングを示すグラフである。A) 1×10^7 gc/ μ L、 1×10^8 gc/ μ Lおよび 2×10^9 gc/ μ LのSC.AAV2/9試薬が注射された後の、9月齢にわたるOCT画像からの光受容器層厚さの測定値は、より高用量でレスキューを示している。注射されなかったNmnat1^{V9M/V9M}網膜の下方領域と僚眼の注射された網膜の下方領域および上方領域ならびに注射されなかった野生型同腹仔の対照網膜との比較(上段)。注射された僚眼の網膜の上方領域および下方領域と比較した、注射されなかった野生型の網膜の下方領域の光受容器層厚さの測定値は、試薬の毒性が最小であることを示している(下段)。B) 光受容器層厚さの測定値は、2月齢において 1×10^8 gc/ μ LのSS.AAV2/9試薬では検出可能なレスキューを示さなかった。C) 光受容器層厚さの測定値は、2月齢において 3×10^8 gc/ μ LのAAV2/7m8試薬では検出可能なレスキューを示さなかったが、光受容器層厚さの測定値は、 5.5×10^8 gc/ μ LのAAV2/Anc80を使用すると、4月齢にわたって一過性のレスキューを示した。エラーバーは、S.E.M.を表す；* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、**** p < 0.0001。

30

【図3-2】(上記の通り)

【図4】高力価のAAV2/Anc80試薬が網膜に対して毒性があることを示す図である。注射されなかった野生型マウス(第1列)および 5.5×10^8 gc/ μ Lの用量が注射されたマウス(第2列)とは対照的に、注射された野生型網膜(第3列)および注射されたNmnat1^{V9M/V9M}網膜(第4列)の明視野眼底画像(上段)は、網膜のしわおよび出血(赤色)を示している。注射された網膜における細胞への形質導入を、EGFP発現によって確認した(中段)。注射されたマウスにおいて、OCT画像(下段)は、網膜剥離、神経網膜の破壊および硝子体内細胞浸潤物(神経網膜の真上に超反射性の斑点として見られる)を示している。マウスは、6週齢でイメージングされた。

40

【図5-1】図5A~図5B：SC.AAV2/9試薬で処置した網膜における細胞レベルの構造的レスキューを示すex vivoイメージングを示す図である。9月齢のNmnat1^{V9M/V9M}および野生型の網膜の画像がそれぞれ、左パネル群および右パネル群に示されている。A) 注射されなかった網膜(左側パネル)および注射された網膜(中央パネルおよび右側パネル)のH&E染色。中央パネルおよび右側パネルは、主な形質導入領域内で、注射と関連した形態的変動を示している(中央パネルで損傷がより多く；

50

右側パネルで損傷がより少ない)。黒色矢印は、ONLの軽度のスカロッピングを示している。倍率40倍、スケールバー75 μ m。B)注射されなかった網膜(左列の2つのパネル群)は、-NMNAT1抗体の反応性(赤色)もEGFP発現(緑色)も示していないが、注射された傍眼の網膜は両方を示している(中央列の2つのパネル)。DAPIは、マージした画像における対比染色(青色)である。モンタージュは、各網膜切片の全体が-NMNAT1抗体で標識され、DAPIで対比染色されて(左パネル群および右パネル群の右側パネル)、導入遺伝子発現の程度を網膜全体にわたって示すことを示している。白色矢印は、注射部位を示す。倍率63倍、スケールバー50 μ m。

【図5-2】(上記の通り)

【図6】抗ヒトNMNAT1ポリクローナル抗体の検証を示す図である。ヒト由来ARPE-19細胞(上段)において、-NMNAT1標識(赤色、左列)およびDAPI染色細胞核(青色、中央列)が共存している(右列)。野生型マウスの網膜は、内因性マウスNMNAT1と最小の交差反応性を示した(中央段)。AAVの注射後にヒトNMNAT1を発現するマウスでは、細胞核に免疫反応性が検出された(下段)。倍率20倍;スケールバー:100 μ m。

【図7-1】図7A~図7B:SC.AAV2/9試薬での処置による網膜機能の保存を示すERGを示すグラフである。A)2 \times 10⁹gc/ μ Lの用量のSC.AAV2/9で処置したNmnat1^{V9M/V9M}マウスからの網膜は、ERGのb波によって測定した場合に、処置されなかった傍眼の網膜よりも有意に大きい杆体ERG、杆体/錐体混合ERGおよび錐体分離ERGを生成している。注射されなかったNmnat1^{V9M/V9M}網膜からの測定値が、注射された傍眼の網膜ならびに野生型マウスの注射されなかった網膜および注射された網膜と比較されている(上段)。6月齢の処置Nmnat1^{V9M/V9M}マウス(処置された網膜、灰色トレース;処置されなかった網膜、薄灰色トレース)および齢が一致した野生型同腹仔(黒色トレース)からの代表的なERG波形(下段)。B)1 \times 10⁸gc/ μ Lの用量のSC.AAV2/9が注射されたマウスについての、9月齢までのERG測定値は、2 \times 10⁹gc/ μ Lの用量の場合よりも弱いレスキューレベルを示し(上段)、5.5 \times 10⁸gc/ μ Lの用量のAAV2/Anc80が注射された場合の4月齢までのERG測定値は、効果がないことを示している(下段)。エラーバーは、S.E.M.を表す;*p<0.05、**p<0.1、***p<0.001、****p<0.0001。

【図7-2】(上記の通り)

【図8】図8A~図8C:治療の成功には光受容器における導入遺伝子の早期発現が必要であることを示す図である。A)注射後14日において、SC.AAV2/9試薬(左列)が注射された網膜で(とりわけ、ONLで)、高密度の-NMNAT1免疫反応性(赤色)が観察され、一方、SS.AAV2/9試薬(中央列)またはAA2/Anc80試薬(右列)のいずれが注射された、齢が一致した網膜では、このシグナルは低密度であった。倍率40倍、スケールバー75 μ m。B)5.5週齢の野生型マウスからの代表的な網膜に、p1でAAV2/Anc80が注射された。これは、杆体光受容器を除く実質的に全ての細胞型において強い-NMNAT1免疫反応性(赤色)を示している。ONLの標識細胞の上列は錐体であり(矢印の間)、DAPIは対比染色である。倍率20倍、スケールバーは100 μ mを表す。C)対照マウスにおける2週齢でのAAV2/7m8(3 \times 10⁸gc/ μ L)の硝子体内注射は、注射後4週間でINLおよびGCLにおいて強いNMNAT1発現(赤色)を生じるが、ONLには生じない。DAPIは、対比染色である;倍率20倍、スケールバー:100 μ m。

【発明を実施するための形態】

【0021】

現在、NMNAT1関連網膜変性に対する治療は存在しない。患者は人生の最初の数年間にかなりの視力喪失に陥るが、通常寿命を有することが予想されるため、早期介入は何十年にもわたって視力を保存する可能性がある。この疾患は劣性遺伝パターンを有する¹⁰ため、およびNMNAT1が比較的小さい遺伝子である¹⁴ため、アデノ随伴ウイル

10

20

30

40

50

ス(AAV)媒介性遺伝子増強療法は魅力的な戦略である。840bpのヒトNMNAT1 cDNAは、一本鎖AAV(SS-AAV)の最大カーゴ容量約4.7kb¹⁵および自己相補的AAV(SC-AAV)の最大カーゴ容量約2.2kb¹⁶の範囲内に十分に収まる。AAVベクターを介して細胞に変異遺伝子の正常なコピーを補給して網膜細胞の生存能を維持するこのアプローチは、FDAに認可された治療法(Luxturna)として、RPE65関連網膜変性の治療のために患者において現在使用されている¹⁷。加えて、コロイデミア¹⁸、色覚異常(clinicaltrials.gov、11/7/2019アクセス)、MERTK-網膜色素変性¹⁹、X連鎖性網膜色素変性(recruiting, clinicaltrials.gov、11/7/2019アクセス)、およびとりわけ、X連鎖性網膜分離症²⁰のためのAAV媒介性遺伝子増強療法の臨床試験が進行中であり¹⁵、同様に他の遺伝性網膜変性についての数多くの前臨床研究も進行中である²¹⁻²⁴。

10

【0022】

NMNAT1が2012年に疾患遺伝子として最初に報告されたとき、in situで可能性がある治療法を評価するための好適な動物モデルは入手できなかった。伝統的なNmnat1ノックアウトマウスは生存できず¹²、標的網膜細胞においてNmnat1を切除するコンディショナルノックアウトマウスは、疾患の生理を正確に表さなかったであろう。本発明者らは最近、非血縁系統群の構成員において網膜疾患を引き起こすことがわかっている対立遺伝子、Nmnat1においてp.Val9Met(V9M)変異に対してホモ接合型のNMNAT1関連網膜疾患マウスモデル²⁵の特徴づけを報告した^{4, 10}。このマウス系統の初代は、ENU変異スクリーニング中に特定された。ホモ接合型変異体の後代(Nmnat1^{V9M/V9M})は常に早期発症型の孤立性網膜疾患を発症し、寿命、可動性または認知に対する明らか障害はなく、これらは、それらがモデル化するヒトとよく似ている。Nmnat1^{V9M/V9M}マウスは、3週齢で十分に成熟した網膜と、網膜電図(ERG)によって検出される、確実な光応答を有するが、1週間後には、光受容器層は機能低下を伴う変性の徴候を示す。約4月齢までに、網膜は重度に変性し、光に対する応答は検出できないことが多い²⁵。このマウスにおける変異が患者集団において存在しかつ人生の最初の1カ月の間に介入の機会があるならば、このモデルは、NMNAT1関連疾患から網膜を保護することを目標とする治療法を試験するのに適している。

20

【0023】

Nmnat1関連網膜変性を有するヒトにおいて視力を保存するための治療法を開発する目的で、本発明者らは、p.V9M-Nmnat1マウスモデルを使用してNMNAT1の正常なコピーを網膜細胞に提供すると疾患進行が予防されるという仮説を試験した。これを達成するために、ヒトNMNAT1 cDNAを、独立して評価されたいくつかの組換えAAV2ベクターを介して、Nmnat1^{V9M/V9M}マウスの網膜に送達した。効果はウイルス製剤および実験条件によって異なった。したがって、本発明者らは、特定の可変要素がなぜ成功または失敗と関連するのか、およびこれらの知識が他のAAV媒介性遺伝子療法の開発を支援するためにどのようにして一般化し得るのかを理解することを目標とした。

30

【0024】

AAV媒介性遺伝子増強を使用して処置されたNmnat1^{V9M/V9M}マウスから収集された形態学的データおよび機能的データは、NMNAT1関連網膜変性を標的とするあらゆるタイプの治療法の最初の実証を提供する。このマウスモデルにおける治療可能時間域は狭いため、導入遺伝子が十分に早期に発現されて脆弱な細胞をレスキューするように、自己相補的ウイルスベクターが必要であった。自己相補的AAVは、折り畳まれて二本鎖DNAを作製する逆方向反復ゲノムを含む点で、一本鎖ベクターと異なる⁴²。このように、ウイルスは、導入遺伝子の発現に先立って普通は必要とされる第2鎖DNA合成の律速段階をバイパスすることができる^{31, 43}と共に、DNA複製後に短時間で起こるベクターゲノムの不安定性を回避することができる⁴⁴。また、自己相補的ベクターは、導入遺伝子発現前に核への輸送もカプシドからの脱コートも必要としない¹⁶。この

40

50

モデルにおいて、同じAAV血清型/カプシド(AAV2/9)でありかつ同一のゲノムカーゴを含むものを含む一本鎖ベクターは、不都合な結果をもたらしたが、このような一本鎖ベクターはヒトを含む他の種においては役立ち得る。

【0025】

Nmna t 1 V 9 M / V 9 Mマウスの治療可能時間域は、早い側面で杆体光受容器の発生生物学の制限^{4 5}によって、遅い側面では4週齢弱で変性の開始^{2 5}によって制限された。理論的には、出生直後の治療を意味する、可能な限り早期の介入が好ましいであろう。しかし、新生仔への注射後に杆体が強い導入遺伝子発現を示さないという観察は、P0~P1マウスにおける発生中の杆体光受容器にはAVVが形質導入される能力がないと記載する他のグループによる最近の報告と一致している^{4 5, 4 6}。光受容器における導入

10

【0026】

しかし、SC.AAV2/9は、マウス網膜においてNMNAT1を発現するのに1週間よりも長い期間を必要とするので、P21まで介入を遅延させると、ウイルスの潜伏期間中に無競争の疾患進行を許すことになったであろう。代わりに、導入遺伝子の発現の開始に必要な時間を提供する一方で、杆体集団のかなりの部分に形質導入を行う可能性を依然として有する、P16あたりで、注射を行った。この場合、この治療によってレスキューされた光受容器の数は、年齢が一致した野生型同腹仔と比較して、約80%のONL厚さを維持するのに十分であった。網膜構造のこのような保存は速やかであったが、機能のレスキューは、注射後3.5カ月まではERGでは明白でなかったことに留意すべきである。

20

【0027】

本方法において、送達は、ヒト患者における治療可能時間域の間に行う。Nmna t 1 V 9 M / V 9 Mマウスのレスキューされた網膜は、数カ月にわたって安定な錐体および杆体光受容器機能の保存を示した。SC.AAV2/9で処置された眼からのERGは、注射されなかった野生型網膜において測定されたものの約50%であったが、この差は、網膜下注射がERG応答を減衰させるという以前の観察と一致しており、これはおそらく、外科手術中に持続される機械的損傷によるものと考えられる^{5 0}。この可能性は、野生型同腹仔の注射された網膜でも、典型的にはそれほど広範囲でないが、b波振幅が減衰する傾向があり、光受容器層が注射後に薄くなっている領域がある傾向があったという知見によって裏付けられる。加えて、ウイルス潜伏期間中に起こったように見える光受容器の変性もまた、比較的低いシグナルに寄与した可能性がある。別の仮説は、一部の細胞がNMNAT1を過剰発現するように増強されたことおよびこれが生存能と適合しないことである。しかし、NMNAT1/NAD⁺補給の治療指数に対するこのような天井効果の理由は、明らかでない。変異マウスにおいて、この試薬の最高用量(2×10⁹ gc/μL)は最良の転帰をもたらしたが、製造上の制約により、さらに高いレベルの効果を試験することは可能でなかった。

30

40

【0028】

本方法は、プロモーターまたは細胞型特異的プロモーターの遍在的活性化を使用することができる。p.V9M-Nmna t 1マウスモデルの特徴づけにより、光受容器が疾患の影響を受ける最初の細胞であり、網膜内細胞およびRPEがそれに続く^{2 5}ことが示された。本発明者らは、本明細書中に記載した実験から、網膜を保存しようとする場合には、光受容器を処置しなければならないことを承知している。したがって、一部の方法では、光受容器特異的プロモーターを使用して網膜のレスキューを提供する。しかし、他の細胞型は、低い核NAD⁺に应答してより遅い速度で変性し、光受容器のみを処置することによっては軽減できない二次変性を引き起こす可能性がある。その場合、双極性の神経節

50

細胞、およびミューラーグリア特異的プロモーターを次に使用できるであろう。

【0029】

本明細書中で示すように、NMNAT1発現を駆動するCASIを含む例示的なSCAAV2/9試薬は、NMNAT1関連網膜変性を有する患者における遺伝子増強療法の使用の成功を実証した。一部の実施形態において、自己相補的ベクターによって導入遺伝子発現の開始を迅速に駆動することが最適な戦略である。

【0030】

この治療法には、そうでなければ人生の早い段階で重度の視力喪失を被るであろう世界中の人々に何十年にわたって視力を提供する可能性がある。

【0031】

ベクター

網膜における、例えば、光受容器における、例えば主に光受容器におけるまたは光受容器のみにおける、本明細書中に開示したNMNAT1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの*in vivo*トランスフェクションおよび発現のための標的発現ベクターが本明細書に記載される。一部の実施形態において、発現はまた、網膜内細胞またはRPE細胞中である。このような成分の発現構築物は、任意の有効なキャリア、例えば、*in vivo*で成分遺伝子を細胞に効果的に送達することができる任意の製剤または組成物に入れて投与することができる。アプローチは、組換えレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、および単純ヘルペスウイルス1型、アルファウイルス、ワクシニアウイルスを含むウイルスベクター、または組換え細菌もしくは真核生物プラスミドへの遺伝子の挿入を含み、好ましいウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス2型(AAV2)である。ウイルスベクターは細胞に直接トランスフェクトし；プラスミドDNAは、裸で送達することもできるし、または例えば、カチオン性リポソーム(リポフェクタミン)もしくは誘導體化された(例えば、抗体コンジュゲートされた)、カチオン性 dendrimer、無機ベクター(例えば、酸化鉄マグネトフェクション)、リポイド、細胞透過性ペプチド、シクロデキストリンポリマー(CDP)、ポリリジンコンジュゲート、グラミシジンS、人工ウイルスエンベロープもしくはその他のそのような細胞内キャリア、ならびに遺伝子構築物の直接注射または*in vivo*で実施されるCaPO₄沈殿の助けを借りて、送達できる。

【0032】

細胞への核酸の*in vivo*導入の例示的アプローチは、核酸、例えば、cDNAを含むウイルスベクターの使用によるものである。細胞へのウイルスベクターの感染は、標的細胞の大部分が核酸を受け取ることができるという利点を有する。さらに、ウイルスベクター内で、例えばウイルスベクター内に含まれるcDNAによって、コードされた分子は、ウイルスベクターの核酸を取り入れた細胞中で効率的に発現される。

【0033】

ウイルスベクターは、*in vivo*で、特にヒトに外来遺伝子を導入するための組換え遺伝子送達系として使用できる。これらのベクターは、細胞への効率的な遺伝子送達を可能にし、場合によっては、導入された核酸は、宿主の染色体DNAに安定的に組み込まれる。組換えウイルスを作製するためのプロトコルおよび細胞に*in vitro*または*in vivo*でこのようなウイルスを感染させるためのプロトコルは、Ausubel, et al., eds., Gene Therapy Protocols Volume 1: Production and In Vivo Applications of Gene Transfer Vectors, Humana Press, (2008), pp. 1-32および他の標準的な実験マニュアル中に見ることができる。

【0034】

核酸の送達に有用な好ましいウイルスベクター系は、アデノ随伴ウイルス(AAV)である。アデノ随伴ウイルスは、効率的な複製および増殖性生活環(productive life cycle)のためのヘルパーウイルスとして、別のウイルス、例えば、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスを必要とする天然起源の欠陥ウイルスである。(総説に関しては、Muzyczka et al., Curr. Topics in Micro and Immunol.158:97-129 (1992)を参

10

20

30

40

50

照のこと ; Domenger and Grimm, *Human Molecular Genetics*, 28(R1):R3-R14 (October 2019)も参照のこと)。AAVベクターは種々の細胞型に効率的に形質導入を行い、*in vivo*で導入遺伝子の長期発現を引き起こすことができる。AAVベクターゲノムは、エピソームとして細胞内に留まることができるが、ベクターの組み込みが観察されている(例えば、Deyle and Russell, *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Aug; 11(4): 442-447 ; Asokan et al., *Mol Ther.* 2012 April; 20(4): 699-708 ; Flotte et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356 (1992) ; Samulski et al., *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989) ; およびMcLaughlin et al., *J. Virol.* 62:1963-1973 (1989)を参照のこと)。AVVベクター、特にAAV2は、遺伝子増強および置換のために広範に使用されており、ある範囲の動物モデルでおよび診療所で治療効果を示している ; 例えば、Mingozzi and High, *Nature Reviews Genetics* 12, 341-355 (2011) ; Deyle and Russell, *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Aug; 11(4): 442-447 ; Asokan et al., *Mol Ther.* 2012 April; 20(4): 699-708を参照のこと。AAVのわずか300の塩基対を含むAAVベクターは、パッケージングすることができ、組換えタンパク質発現を引き起こすことができる。外来DNAのためのスペースは、約4.5 kbに限定される。例えば、AAV1、2、4、5または8ベクターを使用して、DNAを網膜に、例えば、光受容器、網膜内層細胞またはRPE細胞(例えば、以下に記載されているもの : Maguire et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2240-2248 ; Maguire et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374: 1597-1605 ; Bainbridge et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2231-2239 ; Hauswirth et al. (2008). Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 19: 979-990 ; Cideciyan et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15112-15117 ; Cideciyan et al. (2009). Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 361: 725-727 ; Simonelli et al. (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther* 18: 643-650 ; Acland, et al. (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 12: 1072-1082 ; Le Meur et al. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 14: 292-303 ; Stieger et al. (2008). Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Mol Ther* 16: 916-923 ; およびVandenberghe et al. (2011). Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Sci Transl Med* 3: 88ra54)に導入することができる。一部の実施形態において、AAVベクターは、国際公開第2015054653号パンフレットに記載されているAAVカプシドポリペプチド ; 例えば、国際公開第2015054653号パンフレットの配列番号1、3、5、7、9、11、13、15および17からなる群から選択されるアミノ酸配列、ならびに本明細書中に記載されているNMNAT1コード配列を有するAAVカプシドポリペプチドを含むウイルス粒子を含む(またはそれをコードする配列を含む)。一部の実施形態において、AAVカプシドポリペプチドは、国際公開第2015054653号パンフレットの表1に示されているものであり、それを

ここに転載する：

【 0 0 3 5 】

【 表 1 】

ノード	ポリペプチド(配列番号)	核酸(配列番号)
Anc80	1	2
Anc81	3	4
Anc82	5	6
Anc83	7	8
Anc84	9	10
Anc94	11	12
Anc113	13	14
Anc126	15	16
Anc127	17	18

10

【 0 0 3 6 】

一部の実施形態において、AAVカプシドポリペプチドは、Anc80ポリペプチド、例えば、配列番号19 (Anc80L27)；配列番号20 (Anc80L59)；配列番号21 (Anc80L60)；配列番号22 (Anc80L62)；配列番号23 (Anc80L65)；配列番号24 (Anc80L33)；配列番号25 (Anc80L36)；および配列番号26 (Anc80L44)に示される例示的なポリペプチドである。

20

【 0 0 3 7 】

種々の核酸が、AVVベクターを使用して異なる細胞型に導入されている(例えば、上記で引用された参考文献ならびに以下で引用されるものを参照のこと：Asokan et al., *Molecular Therapy* (2012); 20 4, 699-708；およびHermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470 (1984)；Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1985)；Wondisford et al., *Mol. Endocrinol.* 2:32-39 (1988)；Tratschin et al., *J. Virol.* 51:611-619 (1984)；およびFlotte et al., *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790 (1993)。

30

【 0 0 3 8 】

一部の実施形態において、折り畳まれて二本鎖DNAを作製する逆方向反復ゲノムを含む自己相補的AAVを使用する。

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態において、NMNAT1をコードする遺伝子は、表面に正電荷を有するリポソーム(例えば、リポフェクチン)中に封入されており、その表面は、標的組織の細胞表面抗原に対する抗体でタグ付けすることができる(Mizuno et al., *No Shinkei Geka* 20:547-551 (1992)；PCT公報国際公開第91/06309号パンフレット；日本国特許出願第1047381号明細書；および欧州特許出願公開第43075号明細書)。

40

【 0 0 4 0 】

ベクターはまた、プロモーター、エンハンサー(例えば、CMVエンハンサー)、他のシス調節エレメントおよび/またはカプシド血清型バリエーションを含むことができる。プロモーターに関しては、ベクターは、多くの細胞型(例えば、CAG、CMVまたはCASI)および光受容器細胞(RHO、ロドプシンキナーゼ(GRK1)および錐体アレスチン(CAR))またはRPE細胞(例えば、RPE特異的タンパク質に対するプロモーター、例えば、VMD2、RPE65、RLBP1、RGRまたはTIMP3)において発現を駆動するプロモーターを含むことができる(Esumi et al., *Journal Biological Chemistry*, 2004;279:19064-73；Guziewicz et al., *PLoS One*, 2013;8:e75666；Allocca et al., *J Virol*, 2007;81:11372-80；また、Domenger and Gri

50

mm, Human Molecular Genetics, 28(R1):R3-R14 (October 2019)を参照のこと)。合成プロモーター P r o C 1 および P r o D 5 も使用できるであろう；例えば、Juttner et al. Nat Neurosci. 2019 Aug;22(8):1345-1356を参照のこと。他のシス調節エレメントは、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント (W P R E) またはマウス (M V M) イントロンの微小ウイルスを含むことができる (Domenger and Grimm, Human Molecular Genetics, 28(R1):R3-R14 (October 2019)を参照のこと)。

【 0 0 4 1 】

遺伝子療法構築物の医薬製剤は、許容される希釈剤中の遺伝子送達系 (ウイルスベクターおよび任意の関連する作用物質、例えば、ヘルパーウイルス、タンパク質、脂質など) から本質的になることができ、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれている徐放性マトリックスを含むことができる。あるいは、完全な遺伝子送達系を、組換え細胞、例えば、レトロウイルスベクターから無傷で産生できる場合は、医薬製剤は、遺伝子送達系を産生する1つまたは複数の細胞を含むことができる。

10

【 0 0 4 2 】

配列

本方法は、ヒト N M N A T 1 をコードする配列の送達を含む。例示的なヒトのニコチンアミドヌクレオチドアダデニリルトランスフェラーゼ 1 (N M N A T 1) 配列を以下の表に示す。

【 0 0 4 3 】

20

【表 2】

転写物	タンパク質	コードされるアイソフォーム	バリエント
NM_022787.4	NP_073624.2	アイソフォーム 1	バリエント(1)
NM_001297778.1	NP_001284707.1	アイソフォーム 1	バリエント(2)
NM_001297779.2	NP_001284708.1	アイソフォーム 2	バリエント(3)

【 0 0 4 4 】

30

バリエント (1) は、より長いアイソフォーム (1) をコードする。バリエント (2) は、バリエント 1 と比較して、5' U T R が異なる。バリエント 1 と 2 は、同じアイソフォーム (1) をコードする。バリエント (3) は、エクソンを欠いており、代わりに 3' 末端エクソンを含み、その結果、バリエント 1 と比較して 3' コード領域および 3' U T R が異なる。コードされるアイソフォーム (2) は、アイソフォーム 1 とは異なる C 末端を有し、アイソフォーム 1 より短い。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態において、N M N A T 1 をコードする配列は、配列番号 2、または配列番号 2 と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 7、9 8 もしくは 9 9 % 同一の配列を含む。

40

【 0 0 4 6 】

ヒト N M N A T 1 をコードする配列

【 0 0 4 7 】

50

【化 1】

atggaaaattccgagaagactgaagtggttctccttgcttggttcattcaatccc
 atcaccaacatgcacctcagggtgtttgagctggccaaggactacatgaatggaaca
 ggaaggtacacagttgtcaaaggcatcatctctcctggttggtgatgcctacaagaag
 aaaggactcattcctgcctatcaccgggtcatcatggcagaacttgctaccaagaat
 tctaaatgggtggaagttgatacatgggaaagtcttcagaaggagtggaaagagact
 ctgaaggtgctaagacaccatcaagagaaattggaggctagtgactgtgatcaccag
 cagaactcacctactctagaaaggcctggaaggaagaggaagtggactgaaacacaa
 gattctagtcaaaagaaatccctagagccaaaaacaaaagctgtgccaaaggtcaag
 ctgctgtgtggggcagattttattggagtcctttgctgttcccaatttgtggaagagt
 gaagacatcacccaaatcgtggccaactatgggctcatatgtgttactcgggctgga
 aatgatgctcagaagtttatctatgaatcggatgtgctgtggaacaccggagcaac
 attcacgtggtgaatgaatggatcgctaatacatccacaaaaatccggaga
 gccctcagaagggccagagcattcgctacttggtagcagatcttgtccaagaatac
 attgaaaagcataatttgtacagctctgagagtgaagacaggaatgctgggggtcatc
 ctgccccctttgcagagaaacactgcagaagctaagacatag (配列番号 2)

10

【0048】

一部の実施形態において、NMNAT1をコードする配列は、より効率的にアミノ酸配列に翻訳され得るようにコドン最適化することができる。種々の生物のコドン使用表は当技術分野において公知である。例示的なコドン最適化NMNAT1コード配列は、図1Aに示される / 配列番号1。

20

【0049】

本方法、ベクターおよび組成物において有用な配列としては、ヒトNMNAT1タンパク質またはヒトNMNAT1タンパク質と少なくとも80、85、90、95、97、98または99%同一のタンパク質をコードするものが挙げられる。例示的なヒトNMNAT1タンパク質配列は、NP_073624.2で示されており、本明細書中では配列番号3として示す。

【0050】

例示的なヒトNMNAT1タンパク質配列

30

【0051】

【化 2】

MENSEKTEVLLACGSFNPIITNMHLRFLFELAKDYMNGTGRYTVVKGIISPVGDAYKK
 KGLIPAYHRVIMAEELATKNSKWVEVDTWESLQKEWKETLKVLRHHQEKLEASDCDHQ
 QNSPTLERPGRKRKWTETQDSSQKKSLEPKTKAVPKVKLLCGADLLESFAVPLWKS
 EDITQIVANYGLICVTRAGNDAQKFIYESDVLWKHRSNIHVVNEWIANDISSTKIRR
 ALRRGQSIRYLVPDLVQEIYIEKHNLYSSESEDRNAGVILAPLQRNTAEAKT (配列
 番号 3)

40

【0052】

一部の実施形態において、ヒトNMNAT1タンパク質アイソフォーム2、例えば、GenBank Ref. No. NP_001284708.1で提供されるものが使用できる。

【0053】

ヒトNMNAT1タンパク質は、1つまたは複数の変異、例えば、最大で残基の1、2、3、4、5、10、15または20%の変異を含むことができる。このようなバリエーションは、野生型タンパク質の活性、例えば、細胞核内におけるNAD⁺の再生に関する能力を保持するべきである。一部の実施形態において、変異は保存的置換である。そのような変化は、イソロイシン(I)、バリン(V)およびロイシン(L)で任意の他のこれら

50

の疎水性アミノ酸を置換すること；アスパラギン酸（D）でグルタミン酸（E）を置換することならびにその逆；グルタミン（Q）でアスパラギン（N）を置換することおよびその逆；ならびにセリン（S）でトレオニン（T）を置換することおよびその逆を含む。他の置換もまた、特定のアミノ酸の環境およびタンパク質の三次元構造におけるその役割に応じて、保存的と考えることができる。例えば、アラニン（A）とバリン（V）が交換可能であり得るように、グリシン（G）とアラニン（A）はしばしば交換可能であり得る。比較的疎水性であるメチオニン（M）は、しばしばロイシンおよびイソロイシンと、場合によりバリンと交換できる。リジン（K）およびアルギニン（R）は、アミノ酸残基の重要な特徴がその電荷でありかつこれら2つのアミノ酸残基のpKの違いが重要でない位置でしばしば交換可能である。さらに他の変化は、特定の環境で「保存的」と考えることができる（例えば、米国特許出願第2011/0201052号明細書の表III；pages 13-15 "Biochemistry" 2nd ED. Stryer ed (Stanford University)；Henikoff et al., PNAS 1992 Vol 89 10915-10919；Lei et al., J Biol Chem 1995 May 19；270(20):11882-6を参照のこと）。

10

【0054】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較のために整列させる（例えば、最適な整列のために、第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較のためには非相同配列を無視することができる）。好ましい一実施形態において、比較のために整列させる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも80%であり、一部の実施形態においては少なくとも90%または100%である。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有されている場合は、分子はその位置において同一である（本明細書中に記載される通り、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」に相当する）。2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適な整列のために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れて、それらの配列に共通である同一位置の数と相関関係がある。

20

【0055】

配列の比較および2つの配列間の同一性の決定は、数学アルゴリズムを使用して行うことができる。例えば、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、GC Gソフトウェアパッケージ（ワールドワイドウェブのgcg.comで入手可能）にGAPプログラムを組み込んでいるNeedleman-Wunsch（1970）J. Mol. Biol. 48:444-453）アルゴリズムを使用し、デフォルトパラメーター、例えば、ギャップペナルティ12、ギャップ拡張ペナルティ4およびフレームシフトギャップペナルティ5を用いるBlossum 62スコアマトリックスを使用して、決定できる。

30

【0056】

方法

臨床設定では、ベクターは、それぞれが当技術分野においてよく知られているいくつかの方法のいずれかによって、対象に導入することができる。他の方法も使用できるが、一部の実施形態において、遺伝子療法ベクターの網膜への送達に最適の経路は、網膜下注射によるものである。これにより、RPEおよび網膜の光受容器細胞にアクセスすることができる。異なる血清型のAAVが、網膜下注射後にこれらの細胞集団に効果的に形質導入を行うことが動物研究において示されている（Vandenberghe et al., PLoS One. 2013;8:e53463. PMID: 3559681；Vandenberghe and Auricchio, Gene Therapy. 2012;19:162-8；Vandenberghe et al., Science translational medicine. 2011;3:88ra54；Dinculescu et al., HumGene Ther. 2005;16:649-63；Boye et al., Mol Ther. 2013;21:509-19；Alexander and Hauswirth, Adv Exp Med Biol. 2008;613:121-8）。網膜下注射によるアプローチは、RPE65およびCHM遺伝子の遺伝性疾患において変異によって引き起こされる網膜変性のための遺

40

50

伝子増強療法の進行中の臨床試験において使用されている (Maguire et al., *New England Journal of Medicine*. 2008;358:2240-8; Bainbridge et al., *New England Journal of Medicine*. 2008;358:2231-9; Cideciyan et al., *Proceedings National Academy Sciences USA*. 2008;105:15112-7; Maguire et al., *Lancet*. 2009;374:1597-605; Jacobson et al., *Archives Ophthalmology*. 2012;130:9-24; Bennett et al., *Science translational medicine*. 2012;4:120ra15; MacLaren et al., *Lancet*. 2014;383:1129-37)。網膜下注射は、標準的な外科的アプローチ (例えば、Maguire et al., 2008前掲; Bainbridge et al., 2008前掲; Cideciyan et al., 2008前掲; MacLaren et al., 2014前掲に記載されているようなもの) を使用して行うことができる。

10

【0057】

対象

方法は、NMNAT1関連網膜症/網膜変性、例えば、レーバー先天黒内障または早期発症型重度網膜ジストロフィー (EOSRD) を有する対象を治療するのに使用できる。このような対象は、当業者が特定することができ、診断は、遺伝子検査 (例えば、対象のNMNAT1遺伝子における変異の存在を明らかにするための配列決定) によって確定することができる。例えば、Kumaran et al., "Leber Congenital Amaurosis / Early-Onset Severe Retinal Dystrophy Overview" in *Gene Reviews*, Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020; Kumaran et al., *Retin Cases Brief Rep*. 2018 Jul 11. doi: 10.1097/ICB.0000000000000754を参照のこと。

20

【実施例】

【0058】

本発明を以下の実施例においてさらに説明するが、これらの実施例は、特許請求の範囲に記載した本発明の範囲を限定するものではない。

【0059】

材料および方法

以下の方法および材料を、以下の実施例において使用した。

【0060】

マウス系統

p.V9M-Nmnat1マウス系統は、N-エチル-N-ニトロソ尿素 (ENU) 変異誘発スクリーンから以前に得られたものである²⁵。繁殖力を増加させるために、元のC57Bl/6J系統を、野生型129S6/SvEvTacマウス (Taconic, Rensselaer, NY) および野生型C57Bl/6Jマウス (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) と交互に異系交配させて、C57Bl/6J-129S6混合遺伝的背景を維持した。試薬成分の毒性のスクリーニングのみに使用した、野生型CD1-IGSマウス (Charles River, Wilmington, MA) は別個に維持した。実験では、雄および雌のマウスを、優先なしで使用した。

30

【0061】

動物飼育

マウスは、Schepens Eye Research Institute Animal Care Facilityにおいて繁殖させ、維持した。マウスには、脂肪分4%の齧歯類用飼料および水を自由に摂取できるように与え、明12時間/暗12時間のサイクルで飼育した。この研究は、Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchに準拠したものであり、全ての手順は、Animal Care and Use Committee of the Schepens Eye Research Instituteによって承認されたものである。

40

50

【0062】

遺伝子型判定

Allele-In-One Mouse Tail Direct Lysis Buffer (Allele Biotech, San Diego, CA) を製造業者の取扱説明書に従って使用して、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のために組織生検材料を調製した。PCR を、フォワードプライマー 5' - CATGGCTGTGCTGAGGTG - ' 3 (イントロン 1; 配列番号 4) およびリバースプライマー 5' - AACAGCC TGAGGTGCATGTT - ' 3 (エクソン 2; 配列番号 5) を使用して行って、コドン 9 を含む Nmnat1 の 691 bp 領域を増幅した。20 μ L の PCR 反応液は、各プライマーの最終濃度が 200 μ mol/L、dNTP 類 (dATP、dGTP、dTTP および dCTP) のそれぞれの最終濃度が 200 nmol/L であり、2 mmol/L の MgCl₂、および 1 単位の Hot Fire Pol DNA ポリメラーゼ (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) を有していた。サーモサイクリングプロトコル (thermocycling protocol) は 95 で 14 分間; 95 で 45 秒間、53 で 45 秒間、72 で 30 秒間の 30 サイクル; 72 で 7 分間であった。次に、増幅産物を、プライマー 5' - ACGTATTTGCCACCTGTCT - ' 3; 配列番号 6 を使用して Sanger 配列決定に供し、電気泳動図を c. 25 において解析して、各マウスを Nmnat1^{V9M} に対して野生型、ヘテロ接合型またはホモ接合型と特定した。

【0063】

DNA 構築物および AAV ベクターの調製

DNA 2.0 (Menlo Park, CA) によって設計されかつ gBlock 遺伝子断片に合成された (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)、コドン最適化ヒト NMNAT1 cDNA (図 6A) を、次に組換え AAV ウイルスベクターにパッケージングされる構築物に組み込んだ。

【0064】

完全構築物を含むプラスミドを、標準的なエンドトキシンを含まない分子クローニング技術を使用して作製し、NMNAT1 およびライゲーション部位を横断する領域を配列決定することによって検証した。

【0065】

AAV は、前述のように、Grousbeck Gene Therapy Center of Massachusetts Eye and Ear で調製されたものである³⁴。精製されたウイルスを、1x PBS、35 mM NaCl および 0.001% Pluronic F68 界面活性剤を含有する最終バッファー中に収集し、次いで力価を決定した。必要な場合には、同じバッファーを使用して、ウイルスをさらに希釈して、目標用量を得た。注射手順を補助するために、0.25% 未満のフルオレセイン (AK-Fluor, Akorn, Lake Forest, IL) を、トレーサーとして希釈標準溶液に混ぜ入れた。

【0066】

AAV2/Anc80 試薬毒性を解決するために、注射は、特定の変更を使用して行った: 1) AAV2/Anc80 を、作製後に初めて界面活性剤を添加して製造、2) AAV2/Anc80 を低塩希釈バッファーで希釈、3) 生理食塩水のみ (ベクターは除去)、4) 生理食塩水 + 100x 濃度の界面活性剤 (ベクターは除去)、5) フルオレセインを含む生理食塩水 (ベクターは除去)。

【0067】

全身麻酔

全身麻酔のために、ケタミン/キシラジンの混合物を、腹腔内注射によって送達した。2 週齢のマウスに、37.5 mg/kg のケタミンおよび 3.8 mg/kg のキシラジンの用量を投与し、成体マウスに 100 mg/kg のケタミンおよび 20 mg/kg のキシラジンの用量を投与した。持続的な麻酔誘発性角膜混濁の形成に対抗するために、ケタミン/キシラジンが使用された各回復手順 (すなわち、AAV 注射、in vivo イメー

ジング、ERG)の直後に、2 mg / kg用量のヨヒンピン塩酸塩 (Wedgewood Pharmacy, Swedesboro, NJ)を、皮下注射によって投与した^{5 1}、^{5 2}。新生仔マウスに関しては、低体温による全身麻酔を、氷への間接的な曝露によって誘導した^{5 3}。

【0068】

ウイルス送達

2週齢のマウスにおいて、RPEキット (World Precision Instruments, Sarasota, FL)を備えたMicro 4マイクロインジェクションポンプを使用して、ウイルス試薬を網膜下腔または硝子体腔のいずれかに送達した。トロピカミド (1%)またはトロピカミド (0.25%)、フェニレフリン塩酸塩 (0.25%)、シクロペントラート (1%)の半混合物のいずれかを使用して、瞳孔を散大させた。マウスをケタミン/キシラジンで深麻酔し、局所麻酔を、プロパラカイン塩酸塩 (0.5%)を使用して局所的に施した。次に、眼球を突出させ、30 g注射針を使用して、上方側頭強膜 (superior-temporal sclera)および角膜輪部の上強膜血管の直ぐ後方の網膜に穿刺して、鈍端33 gカニューレの進入経路を作製した。

10

【0069】

網膜下注射については、硝子体腔を通るカニューレの横断は、手術用顕微鏡を介して散大した瞳孔を通して可視化し、カニューレ先端は、眼の下鼻象限の後部の網膜下腔に位置付けた。試薬の185.5 nLポラスを4回連続注射し (合計0.75 μL)、フルオレセイントレーサーによって増強された可視化によって、プレブの形成を確認した。カニューレは、注射後約3秒間、適所に保持して試薬の逆流を回避し、次いで眼からそと取り外した。最後に、進入口の傷を、綿スワブでのタンポナーデによって処置した。次いで、人工涙液 (Blink Tears, Abbott Laboratories, Chicago, IL)で眼に水分補給した。マウスは、加温パッド上で麻酔から回復した。

20

【0070】

2週齢マウスの硝子体内注射の手順は、カニューレ先端を注射中に硝子体腔の中央に位置付ける以外は、同一であった。

【0071】

新生仔においては、網膜下注射は、FemtoJet 4iマイクロインジェクションシステム (Eppendorf, Hamburg, Germany)を使用して行った。マウスを氷上で麻酔しながら、30 g皮下針の先端を使用して上眼瞼と下眼瞼を分離させた。眼球を突出させ、特別仕様の斜めに切った (beveled) ガラス針 (Cat # C060609, Origio, Trumbull, CT)を、強膜を通して直接挿入し、下にある網膜下腔中に位置付けた。0.5 μLの試薬の単一ポラスを6秒間にわたって300 hPaの圧力で投与し、その後、針は、約3秒間、適所に保持して逆流を回避し、次いでそと取り外した。マウスは、加温パッド上で麻酔から回復した。

30

【0072】

in vivo網膜イメージング

網膜のen face画像および断面画像を、以前に記載されたようにして^{2 5}、眼底写真およびスペクトル領域光干渉断層撮影 (OCT)を使用して取得した (図7)。眼底撮影に追加したのは、EGFPの可視化、したがって注射の品質の早期評価を可能にするフィルターを通して一部の画像を撮影することであった。また、矩形ボリュームスキャン (rectangular volume scan)を網膜全体の複数の位置で行って、上方および下方領域を正確に測定できるようにし、10のスキャンを登録/平均して、最終画像を作成した。In VivoVue OCTソフトウェア (Bioptron)において使用して、外網状層から網膜色素上皮まで4つのほぼ等間隔のキャリパー測定を行って、光受容器層の厚さを測定した。

40

【0073】

網膜電図検査

以前に記載されたようにして^{2 5}、マウスから全視野フラッシュ網膜電図を取った。簡

50

潔には、マウスを一晩、暗順応させ、 $0.01 \text{ cd} \cdot \text{s} / \text{m}^2$ (暗所) および $10 \text{ cd} \cdot \text{s} / \text{m}^2$ (暗所) の広帯域光刺激をそれぞれ使用して、杆体応答および杆体/錐体混合応答を発生させた。次に、マウスを、 $30 \text{ cd} / \text{m}^2$ (明所) の広帯域光に10分間曝露することによって明順応させ、この光は、 $20 \text{ cd} \cdot \text{s} / \text{m}^2$ (明所) の広帯域光刺激に対する錐体分離応答を獲得の間、バックグラウンドに残った。

【0074】

統計

統計解析は、Prismバージョン8.2.1 (GraphPad, San Diego, CA) で完成させた。OCTおよび網膜電図(ERG)の時間経過については、混合効果回帰モデルを使用する二元配置ANOVAを行った。治療の効果を解析する場合は、注射されなかった眼の下方網膜を陰性対照として使用し、他の全ての測定の平均値をそれと比較した。多重比較検定によって生じた第1種の過誤を考慮に入れるために、ダネット事後検定を使用した。注射の効果を解析する場合は、全ての定量的データを平均値 \pm S.E.M.として報告した。

10

【0075】

特別仕様の抗ヒトNMNAT1抗体の開発

Aves Labs (Tigard, OR) によって、精製された完全長ヒトNMNAT1が抗原として使用されて、ニワトリにおいて特別仕様ポリクローナル抗体が作製された。この抗体は、ヒトNMNAT1に対して強く反応し、マウスオルソログとの交差反応性が最小である。図8において、DAPIで対比染色されたヒト由来ARPE-19細胞⁵⁴の核は、NMNAT1局在と一致するロバスタな抗体標識を示した(上段)。マウス網膜において、ヒトNMNAT1を発現するようにAAVで処置された(下段)場合を除いて、免疫蛍光は最小であり(中央段); AAVで処置された場合には、免疫反応性は強く、細胞核に局在していた。

20

【0076】

ex vivo網膜イメージング

免疫組織化学的検査

マウスをCO₂室息により安楽死させ、直ちに、Masterflexペリスタルティックポンプ(Cole-Parmer, Vernon Hills, IL)を使用して心臓を通して灌流させた。各動物に最初に、灌流液が透明になるまでヘパリン2U/mLを含有する0.13mol/Lリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2~7.4)を灌流させ、これに続いて、約40mLの2%パラホルムアルデヒド(PFA)を灌流させた。いずれの溶液も、灌流時に約37°Cに加温した。小血管コテライザー(#18000-00, Fine Science Tools, Foster City, CA)を使用して、上方輪部の直前の角膜に印を付けた。眼球を摘出し、室温で0.5時間にわたって2%PFAでインキュベートし、眼球前部を取り除き、次いで残りの眼盃(eye cup)を再度、室温で0.5時間にわたって2%PFA中でインキュベートした後、室温で少なくとも1時間30%スクロース中に浸漬させた。眼盃を包埋し、クリオトミー(cryotomy)によって厚さ10 μ mで切り出し、免疫標識および染色し、別段にTCSSP8共焦点顕微鏡(Leica, Wetzlar, Germany)でイメージングされない限り、以前に記載されたようにして²⁵、Eclipse Ti蛍光顕微鏡(株式会社ニコン、東京、日本)を使用して蛍光モードまたは明視野モードでイメージングした。

30

40

【0077】

ヘマトキシリン&エオシン標識

眼球を、CO₂室息による安楽死後に摘出し、PBS中で洗浄し、直ちに、O-fix組織固定液[70%未満のエタノール、5%未満のメタノール、7%未満の酢酸、4%未満の酢酸および4%ホルムアルデヒド](Leica, 3800676)に浸し、固定液中で一晩インキュベートした。次いで、試料を、一連の段階的エチルアルコール中で脱水し、キシレン中できれいにし、パラフィン(Paraplast Plus, McCormick Scientific, Richmond, IL)中に包埋した。Leica

50

RM2145マイクローム (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) を使用して厚さ $6\ \mu\text{m}$ の切片を調製し、次いで、Gill #2ヘマトキシリン - エオジン - y (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA USA) を使用してスライドを染色した後、Permouint封入剤でカバーリップした。

【0078】

[実施例 1]

DNA構築物およびAAV試薬の調製

コドン最適化ヒトNMNAT1 cDNA (図1A) を、次に組換えAAVウイルスベクターにパッケージングされる構築物に組み込んだ。コドン最適化は、タンパク質産物のアミノ酸配列を変えず、形質導入された細胞中におけるヒト遺伝子の発現のレベルおよび持続時間を改善することがわかっている²⁶⁻³⁰。同様に、840bpのNMNAT1 cDNAに導入された174ヌクレオチド置換は全てサイレントであり、正常なヒトタンパク質配列を規定した。

【0079】

4つのDNA構築物および6つのAVVベクターのサブタイプを組み合わせて使用して、この研究の一部としてマウスに送達する4種の試薬を創出した。NMNAT1が遍在的発現CASIプロモーターによって駆動される構築物を、AAV2/9の、自己相補的(SC)型および一本鎖(SS)型の両方にパッケージングした。SCベクターは、伝統的なSSベクターよりも迅速に遺伝子発現を活性化する³¹ので、試験のために選択された。さらに、EGFP (高感度緑色蛍光タンパク質) レポーター遺伝子を含む構築物は、またCASIプロモーターによって駆動され、マウス網膜におけるAAV2媒介性形質導入を増強するのに役立つWPRE (ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント)³²がそれに続いており、これをSS.AAV2/9にパッケージングした。マウスへの送達の直前に、このEGFP試薬に、SC.AAV2/9試薬(図1B)およびSS.AAV2/9試薬(図1C)を、ゲノムコピー 1×10^8 / マイクロリットル (gc/ μL) でスパイクして、*in vivo*イメージングおよび*ex vivo*イメージングによって遺伝子発現を確認できるようにした。NMNAT1が遍在的発現CAGプロモーターで駆動され、T2A切断配列、EGFPおよび次いでWPREがそれに続く、別の構築物を作製した。細胞における翻訳後、NMNAT1-EGFP融合タンパク質を、T2A切断部位において酵素的に分離して³³、名目上のタンパク質高次構造および動態の破壊を回避した。この構築物を、AAV2/Anc80にパッケージングした。AAV2/Anc80は、合成AAV2であって、自然免疫を回避するために定向進化によって生成されたものであり、マウスにおいて網膜細胞に効率的に形質導入を行うことがわかっている(図1D)³⁴。最後に、前記の同じCASI.NMNAT1構築物をAAV2/7m8ベクターにパッケージングした。AAV2/7m8ベクターは、他のベクターは異なり、硝子体内注射によって全網膜層に送達することができる(図1E)³⁵。

【0080】

[実施例 2]

自己相補的ベクターを使用する遺伝子増強は網膜構造を保存する

自己相補的(SC)AAV2/9 (SC.AAV2/9) 試薬を使用して2週齢のNmnat1^{V9M/V9M}マウスに遺伝子増強療法を施すと、Nmnat1^{V9M/V9M}マウスにおいて網膜構造が用量依存的に安定的に保存された。この知見は、光干渉断層撮影(OCT)を使用して*in vivo*で収集された光受容器層の厚さ測定値によって決定付けられた。注射された眼については、測定値は、レスキューが最もロバストであると予想される下方網膜の注射部位の近位で、および注射部位から遠位の上方網膜で取った。Nmnat1^{V9M/V9M}マウスの、注射されなかった僚眼、および齢が一致した同腹仔対照の注射されなかった眼における測定値を、下方網膜において、注射された眼において測定値を取ったのと等しい面で取得した(図2)。

【0081】

10

20

30

40

50

中力価および高力価の注射、それぞれ、 1×10^8 (g c / μ L) および 2×10^9 g c / μ L は、いずれも、注射された網膜全体に有意なレスキューを提供した(図3A、上段)。例えば、9月齢において、 2×10^9 g c / μ Lの用量で注射された眼は、下方および上方光受容器層の厚さがそれぞれ、注射されなかった僚眼の下方領域の厚さ $31.3 \mu\text{m} \pm 0.8 \mu\text{m}$ と比較して、 $100.0 \mu\text{m} \pm 4.8 \mu\text{m}$ (差 $68.7 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.0001$) および $96.1 \mu\text{m} \pm 6.4 \mu\text{m}$ (差 $64.8 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.0001$) であった。処置された網膜は典型的には、野生型の下方網膜の厚さの約20%以内であった。 2×10^9 g c / μ Lの用量後に、光受容器層厚さは、下方網膜(注射部位の近位)と上方網膜(注射部位の遠位)との間で同様である($p > 0.05$)傾向があった。しかし、 2×10^8 g c / μ Lの用量後には、注射部位からの距離に応じて、網膜厚さは約20%減少した。本発明者らは、 2×10^9 g c / μ Lの用量が完全強度の製剤であるので、 2×10^9 g c / μ Lより高用量が付加的な利点を提供するかどうかは試験できなかった。

10

【0082】

この試薬の試験された最低投与量である 1×10^7 (g c / μ L) では、Nmnat1^{V9M}/^{V9M}網膜の下方領域(注射部位の近位)において、注射されなかった僚眼の網膜と比較して、光受容器層厚さの中程度のレスキューが観察された。この知見は、4カ月および6カ月でのみ統計的有意性に達し、僚眼の網膜の下方領域との差がそれぞれ、 $25.8 \mu\text{m} \pm 6.5 \mu\text{m}$ ($p = 0.014$) および $30.2 \mu\text{m} \pm 7.9 \mu\text{m}$ ($p = 0.035$) であったことを示している。レスキューされた領域の光受容器層は、注射されなかった野生型同腹仔対照網膜の相当する領域の約半分の厚さしかなく、どの時点でも、注射部位の遠位の網膜領域(すなわち、上方網膜)はレスキューの証拠を示さなかった。

20

【0083】

NMNAT1活性の喪失は変異によって大きく異なる可能性があるため、NMNAT1の過剰発現かどうかの理解が重要である。このために、野生型マウスにSC.AAV2/9試薬を、変異同腹仔と同じ力価で注射した。全ての投与量および時点で、光受容器層厚さは典型的には影響を受けず、統計的に有意である差は、3つの例でしか認められなかった(図3A、下段)。

【0084】

最大の相違は、 2×10^9 g c / μ Lの注射後9カ月の、注射された網膜の上方領域にあり、 $17.9 \mu\text{m} \pm 6.9 \mu\text{m}$ ($p = 0.039$)の減少が測定された。しかし、同じ網膜の下方領域(注射部位の近位)は影響を受けないことを考えると、この減少量が毒性による可能性は低かった。

30

【0085】

[実施例3]

一本鎖ベクターは疾患表現型をレスキューしない

SC.AAV2/9試薬とは異なり、SS.AAV2/9、AAV2/7m8およびAAV2/Anc80試薬は、Nmnat1^{V9M}/^{V9M}網膜の安定な構造的レスキューを提供しなかった。2月齢において、SS.AAV2.9試薬が注射された変異網膜の下方領域は、注射されなかった僚眼の同じ領域全体にわたって $11.4 \mu\text{m} \pm 4.3 \mu\text{m}$ ($p = 0.033$)の非常にわずかなレスキューを示し、AAV2/7m8試薬には、効果がなかった。 5.5×10^8 g c / μ Lの用量のAAV2/Anc80試薬は変異網膜において一過性のレスキューをもたらし、これは2月齢を超えては持続せずかつ下方領域に限定されていた。1.5カ月および2カ月の時点で、AAV2/Anc80で処置された網膜の下方領域は、光受容器厚さがそれぞれ、処置されなかった僚眼の網膜よりも $42.0 \mu\text{m} \pm 3.7 \mu\text{m}$ ($p = 0.0005$) および $27.5 \mu\text{m} \pm 9.9 \mu\text{m}$ ($p = 0.045$)厚かった(図3C)。投与量を 1×10^8 g c / μ Lまで減少させると、レスキューは観察されず、毒性のため、AAV2/Anc80試薬の投与量は 1×10^9 g c / μ L以上まで増加させることができなかった。野生型網膜およびNMNAT1^{V9M}/^{V9M}網膜のいずれにおいても、AAV2/Anc80試薬の高力価注射は、6週齢までに、網膜変性、硝子体内細胞浸潤物の出現^{36, 37}および重度の網膜剥離を引き起こした(図

40

50

4)。AAV2/Anc80試薬と共に使用した希釈バッファの成分がこの転帰に寄与したかどうかを試験するために、この溶液の成分を、種々の条件下で野生型マウスに注射した。界面活性剤、塩およびフルオレセインの濃度を調節しても、OCTまたは組織像によって検出可能な網膜損傷は引き起こされなかった(データは示さず)。

【0086】

OCTによって観察された、SC.AAV2試薬と関連するNMNAT1V9M/V9M網膜の構造的レスキューは、光学顕微鏡によって*ex vivo*で裏付けられた。ヘマトキシリン-エオジン(H&E)染色により、処置されなかった変異網膜と全く異なり、レスキューされた網膜の十分に形質導入された領域は、全ての細胞型が無傷であり、精巧な光受容器外節を有することが確認された(図5A)。しかし、処置された変異網膜の網膜層は、処置されなかった野生型網膜よりもわずかに薄いように見え、これは、OCT画像からの前記測定値と一致していた。注射された野生型網膜は多くの場合、注射されなかった僚眼の網膜と識別できなかったが、光受容器外節が部分的に退縮している領域が存在し、他の網膜層はより薄かった。免疫標識実験により、注射された変異網膜および野生型網膜のいずれにおいても、ほぼ全ての型の網膜細胞の核において導入遺伝子の発現が検出可能であることが示された(図5B)。

10

【0087】

さらに、汎網膜導入遺伝子発現は多くの場合、組織の2/3を超えて拡大した(図3B)。免疫標識は、マウスNMNAT1との交差反応性が最小である、特別仕様のニワトリポリクローナル-ヒトNMNAT1抗体を使用して完了させた(図6)。

20

【0088】

[実施例4]

自己相補的ベクターを使用する遺伝子増強は網膜機能を保存する

網膜の構造的レスキューが機能の保存につながったかどうかを評価するために、光刺激に対する杆体応答、杆体/錐体混合応答および錐体分離応答を、光刺激に対する網膜の電機的応答の測定に使用される非侵襲性方法であるERGによって*in vivo*で測定した。具体的には、ON双極細胞によって媒介される^{38, 39}、ERGのb波の強度を、光受容器応答の間接的指標として⁴⁰および網膜内機能の尺度として使用した。SC.AAV2/9試薬で処置された網膜では、b波は、4月齢までは処置されなかった僚眼の眼より有意に大きく、明所刺激に対しては6月齢までそのままであり、暗所および混合杆体/錐体刺激に対しては少なくとも9カ月までそのままであった。明順応ERGは、9月齢では、処置された変異網膜においては、処置されなかった僚眼の網膜におけるよりも大きい傾向があった(図7A、上段)。例えば、6カ月において、処置された変異網膜の応答は、各条件で僚眼の網膜の応答を上回っていた: 杆体応答では $156.1 \mu V \pm 23.4 \mu V$ 対 $36.0 \mu V \pm 7.1 \mu V$ ($p = 0.0013$)、杆体/錐体混合応答では $293.6 \mu V \pm 51.1 \mu V$ 対 $62.0 \mu V \pm 11.8 \mu V$ ($p = 0.0034$)、錐体応答では $101.3 \mu V \pm 18.6 \mu V$ 対 $25.3 \mu V \pm 6.2 \mu V$ ($p = 0.0067$)。

30

【0089】

さらに、レスキューに関連する応答は、処置されなかった野生型網膜の応答よりも一貫して低かった。この効果は、2つ原因によって生じた可能性がある。第一に、OCT画像および組織学的画像は、最もロバストな構造的レスキューでさえも不完全であることを示した。

40

【0090】

第二に、注射された野生型網膜は僚眼の網膜よりも振幅が小さい傾向があるERGを生じたため、注射自体がERGシグナルを減衰させるように思われた。

【0091】

いずれにしても、各刺激条件に関して、レスキューERG波形の構造および潜時(implicit time)は正常であった(図7A、下段)。SC.AAV2試薬は 1×10^8 gc/ μL で、注射された変異網膜のレスキューの証拠を示した(図7B、上段)のに対して、AAV2/Anc80試薬によるレスキューの徴候は、構造の保存が存在する2月齢に

50

において観察されなかった（図 7 B、下段）。

【 0 0 9 2 】

[実施例 5]

自己相補的ベクターは一本鎖ベクターよりも早期に NMNAT1 発現を活性化する

導入遺伝子が SC . AAV2 / 9 ベクターによって送達された場合に網膜の構造および機能がより広い範囲まで保存される理由を理解するために、本発明者らは、早期 NMNAT1 発現プロフィールを特徴づけた。注射後 14 日に、SC . AAV2 / 9 によって送達された NMNAT1 の免疫標識は全網膜層において検出可能であり、密度は外顆粒層（ONL）において特に高かった（図 8 A）。逆に、SS . AAV2 / 9 ベクターが同一のカーゴを運びかつ AAV2 / Anc80 ベクターがマウス網膜光受容器に広いカバレッジで形質導入を行うことが示されている^{3 4}にもかかわらず、SS . AAV2 / 9 および AAV2 / Anc80 が注射された網膜では、NMNAT1 の検出はわずかであり、標識された光受容体は比較的少数であった。使用した送達ベクターに関係なく、注射後 7 日において NMNAT1 は検出できなかった。

10

【 0 0 9 3 】

[実施例 9]

介入の成功には光受容体の形質導入が必要である

さらに、介入が早期であるほど、AAV2 / Anc80 から良好な効果が得られるかどうかを明らかにするために、注射を新生仔マウスにおいて出生後 0 日（P0）から P2 まで行った。錐体光受容器を含むほとんどの細胞型は強い NMNAT1 発現を示したが、杆体光受容器における発現は圧倒的に弱く（図 8 B）；錐体光受容器は、ONL の最外列におけるそれらの核の位置によって識別された^{4 1}。同様に、光受容器層の保存は、2 週齢のマウスにおける AAV2 / 7m8 を介した NMNAT1 の硝子体内送達後 4 週間に OCT によって観察されず、免疫組織化学的検査によって、強い網膜内層シグナルにもかかわらず NMNAT1 発現が網膜外層に存在しなかったことが明らかにされた（図 8 C）。

20

【 0 0 9 4 】

参考文献

【 0 0 9 5 】

30

40

50

【表 3 - 1】

1. Chiang, PW, Wang, J, Chen, Y, Fu, Q, Zhong, J, Chen, Y, et al. (2012). Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 44: 972-974.
2. Koenekoop, RK, Wang, H, Majewski, J, Wang, X, Lopez, I, Ren, H, et al. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nat Genet* 44: 1035-1039. 10
3. Perrault, I, Hanein, S, Zanlonghi, X, Serre, V, Nicouleau, M, Defoort-Delhemmes, S, et al. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nat Genet* 44: 975-977.
4. Falk, MJ, Zhang, Q, Nakamaru-Ogiso, E, Kannabiran, C, Fonseca-Kelly, Z, Chakarova, C, et al. (2012). NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 44: 1040- 1045.
5. Nash, BM, Symes, R, Goel, H, Dinger, ME, Bennetts, B, Grigg, JR, et al. (2018). NMNAT1 variants cause cone and cone-rod dystrophy. *Eur J Hum Genet* 26: 428-433. 20

【 0 0 9 6 】

30

40

50

【表 3 - 2】

6. Garavaglia, S, D'Angelo, I, Emanuelli, M, Carnevali, F, Pierella, F, Magni, G, et al. (2002). Structure of human NMN adenylyltransferase. A key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *J Biol Chem* 277: 8524-8530.
7. Belenky, P, Bogan, KL, and Brenner, C (2007). NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci* 32: 12-19.
8. Lau, C, Niere, M, and Ziegler, M (2009). The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 410-431. 10
9. Chiarugi, A, Dolle, C, Felici, R, and Ziegler, M (2012). The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* 12: 741-752.
10. Sasaki, Y, Margolin, Z, Borgo, B, Havranek, JJ, and Milbrandt, J (2015). Characterization of Leber's Congenital Amaurosis-associated NMNAT1 Mutants. *J Biol Chem*.
11. Coppieters, F, Todeschini, AL, Fujimaki, T, Baert, A, De Bruyne, M, Van Cauwenbergh, C, et al. (2015). Hidden Genetic Variation in LCA9-Associated Congenital Blindness Explained by 5'UTR Mutations and Copy-Number Variations of NMNAT1. *Hum Mutat* 36: 1188-1196. 20
12. Conforti, L, Janeckova, L, Wagner, D, Mazzola, F, Cialabrini, L, Di Stefano, M, et al. (2011). Reducing expression of NAD⁺ synthesizing enzyme NMNAT1 does not affect the rate of Wallerian degeneration. *FEBS J* 278: 2666-2679.
13. Berger, F, Lau, C, Dahlmann, M, and Ziegler, M (2005). Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* 280: 36334-36341. 30
14. Carvalho, LS, and Vandenberghe, LH (2015). Promising and delivering gene therapies for vision loss. *Vision Res* 111: 124-133.
15. Ong, T, Pennesi, ME, Birch, DG, Lam, BL, and Tsang, SH (2019). Adeno-Associated Viral Gene Therapy for Inherited Retinal Disease. *Pharm Res* 36: 34.
16. McCarty, DM (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 16: 1648-1656.
17. Lloyd, A, Piglowska, N, Ciulla, T, Pitluck, S, Johnson, S, Buessing, M, et al. (2019). Estimation of impact of RPE65-mediated inherited retinal disease on 40

【 0 0 9 7 】

【表 3 - 3】

quality of life and the potential benefits of gene therapy. *Br J Ophthalmol* 103: 1610-1614.

18. Lam, BL, Davis, JL, Gregori, NZ, MacLaren, RE, Girach, A, Verriotto, JD, et al. (2019). Choroideremia Gene Therapy Phase 2 Clinical Trial: 24-Month Results. *Am J Ophthalmol* 197: 65-73.

19. Ghazi, NG, Abboud, EB, Nowilaty, SR, Alkuraya, H, Alhommadi, A, Cai, H, et al. (2016). Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. *Hum Genet* 135: 327-343.

10

20. Cukras, C, Wiley, HE, Jeffrey, BG, Sen, HN, Turriff, A, Zeng, Y, et al. (2018). Retinal AAV8- RS1 Gene Therapy for X-Linked Retinoschisis: Initial Findings from a Phase I/IIa Trial by Intravitreal Delivery. *Mol Ther* 26: 2282-2294.

21. Dyka, FM, Molday, LL, Chiodo, VA, Molday, RS, and Hauswirth, WW (2019). Dual ABCA4- AAV Vector Treatment Reduces Pathogenic Retinal A2E Accumulation in a Mouse Model of Autosomal Recessive Stargardt Disease. *Hum Gene Ther* 30: 1361-1370.

20

22. McCullough, KT, Boye, SL, Fajardo, D, Calabro, K, Peterson, JJ, Strang, CE, et al. (2019). Somatic Gene Editing of GUCY2D by AAV-CRISPR/Cas9 Alters Retinal Structure and Function in Mouse and Macaque. *Hum Gene Ther* 30: 571-589.

23. Alves, CH, and Wijnholds, J (2018). AAV Gene Augmentation Therapy for CRB1- Associated Retinitis Pigmentosa. *Methods Mol Biol* 1715: 135-151.

30

24. Ofri, R, Averbukh, E, Ezra-Elia, R, Ross, M, Honig, H, Obolensky, A, et al. (2018). Six Years and Counting: Restoration of Photopic Retinal Function and Visual Behavior Following Gene Augmentation Therapy in a Sheep Model of CNGA3 Achromatopsia. *Hum Gene Ther*.

25. Greenwald, SH, Charette, JR, Staniszevska, M, Shi, LY, Brown, SD, Stone, L, et al. (2016). Mouse Models of NMNAT1-Leber Congenital Amaurosis (LCA9) Recapitulate Key Features of the Human Disease. *Am J Pathol* 186: 1925-1938.

40

【 0 0 9 8 】

【表 3 - 4】

26. Burgess-Brown, NA, Sharma, S, Sobott, F, Loenarz, C, Oppermann, U, and Gileadi, O (2008). Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expr Purif* 59: 94-102.
27. Gustafsson, C, Govindarajan, S, and Minshull, J (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22: 346-353.
28. Ill, CR, and Chiou, HC (2005). Gene therapy progress and prospects: recent progress in transgene and RNAi expression cassettes. *Gene Ther* 12: 795-802. 10
29. Foster, H, Sharp, PS, Athanasopoulos, T, Trollet, C, Graham, IR, Foster, K, et al. (2008). Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. *Mol Ther* 16: 1825-1832.
30. Sack, BK, Merchant, S, Markusic, DM, Nathwani, AC, Davidoff, AM, Byrne, BJ, et al. (2012). Transient B cell depletion or improved transgene expression by codon optimization promote tolerance to factor VIII in gene therapy. *PLoS One* 7: e37671.
31. McCarty, DM, Monahan, PE, and Samulski, RJ (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8: 1248-1254. 20
32. Patricio, MI, Barnard, AR, Orlans, HO, McClements, ME, and MacLaren, RE (2017). Inclusion of the Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances AAV2-Driven Transduction of Mouse and Human Retina. *Mol Ther Nucleic Acids* 6: 198-208.
33. Kim, JH, Lee, SR, Li, LH, Park, HJ, Park, JH, Lee, KY, et al. (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 6: e18556. 30
34. Zinn, E, Pacouret, S, Khaychuk, V, Turunen, HT, Carvalho, LS, Andres-Mateos, E, et al. (2015). In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. *Cell Rep* 12: 1056-1068.
35. Dalkara, D, Byrne, LC, Klimczak, RR, Visel, M, Yin, L, Merigan, WH, et al. (2013). In vivo- directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 5: 189ra176.
36. Zarranz-Ventura, J, Keane, PA, Sim, DA, Llorens, V, Tufail, A, Sadda, SR, et al. (2016). Evaluation of Objective Vitritis Grading Method Using Optical 40

【 0 0 9 9 】

【表 3 - 5】

Coherence Tomography: Influence of Phakic Status and Previous Vitrectomy. *Am J Ophthalmol* 161: 172-180 e171-174.

37. Saito, M, Barbazetto, IA, and Spaide, RF (2013). Intravitreal cellular infiltrate imaged as punctate spots by spectral-domain optical coherence tomography in eyes with posterior segment inflammatory disease. *Retina* 33: 559-565.

38. Stockton, RA, and Slaughter, MM (1989). B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol* 93: 101-122. 10

39. Bush, RA, and Sieving, PA (1996). Inner retinal contributions to the primate photopic fast flicker electroretinogram. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 13: 557-565.

40. Greenwald, SH, Kuchenbecker, JA, Roberson, DK, Neitz, M, and Neitz, J (2014). S-opsin knockout mice with the endogenous M-opsin gene replaced by an L-opsin variant. *Vis Neurosci* 31: 25-37.

41. Carter-Dawson, LD, and LaVail, MM (1979). Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J Comp Neurol* 188: 263-272. 20

42. Carter, BJ, Khoury, G, and Rose, JA (1972). Adenovirus-associated virus multiplication. IX. Extent of transcription of the viral genome in vivo. *J Virol* 10: 1118-1125.

43. Sipo, I, Fehner, H, Pinkert, S, Suckau, L, Wang, X, Weger, S, et al. (2007). Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction. *Gene Ther* 14: 1319- 1329. 30

44. Wang, J, Xie, J, Lu, H, Chen, L, Hauck, B, Samulski, RJ, et al. (2007). Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13104-13109.

45. Petit, L, Ma, S, Cheng, SY, Gao, G, and Punzo, C (2017). Rod Outer Segment Development Influences AAV-Mediated Photoreceptor Transduction After Subretinal Injection. *Hum Gene Ther* 28: 464-481.

46. Xiong, W, MacColl Garfinkel, AE, Li, Y, Benowitz, LI, and Cepko, CL (2015). NRF2 promotes neuronal survival in neurodegeneration and acute nerve damage. *J Clin Invest* 125: 1433-1445. 40

【 0 1 0 0 】

【表 3 - 6】

47. Geller, AM, Sieving, PA, and Green, DG (1992). Effect on grating identification of sampling with degenerate arrays. *J Opt Soc Am A* 9: 472-477.
48. Geller, AM, and Sieving, PA (1993). Assessment of foveal cone photoreceptors in Stargardt's macular dystrophy using a small dot detection task. *Vision Res* 33: 1509- 1524.
49. Xiong, W, Wu, DM, Xue, Y, Wang, SK, Chung, MJ, Ji, X, et al. (2019). AAV cis-regulatory sequences are correlated with ocular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 5785-5794. 10
50. Pawlyk, BS, Bulgakov, OV, Liu, X, Xu, X, Adamian, M, Sun, X, et al. (2010). Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther* 21: 993-1004.
51. Turner, PV, and Albassam, MA (2005). Susceptibility of rats to corneal lesions after injectable anesthesia. *Comp Med* 55: 175-182. 20
52. Koehn, D, Meyer, KJ, Syed, NA, and Anderson, MG (2015). Ketamine/Xylazine-Induced Corneal Damage in Mice. *PLoS One* 10: e0132804.
53. Phifer, CB, and Terry, LM (1986). Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. *Physiol Behav* 38: 887-890.
54. Dunn, KC, Aotaki-Keen, AE, Putkey, FR, and Hjelmeland, LM (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 62: 155- 169. 30

【 0 1 0 1 】

他の実施形態

本発明をその詳細な説明と共に記載したが、前記記載は本発明を説明することを意図するものであり、本発明の範囲を限定することは意図せず、本発明の範囲は、添付した特許請求の範囲の範囲によって定義される。他の態様、利点および変更形態も、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【 図 面 】

【 図 1 - 1 】

コドン最適化 NMNAT1 cDNA

```

1-75  ATGGAAATTCAGAGAAAATGAAGTGGTGGCTGTGGCATGTGGATCGFTCAACCCCATCACCACATGCATCTG
      C G T C C T T T T A T C C
76-150 CGCCTCTTTGAACTGGCCAAAGACTACATGAATGGAAGTGGAAATACACTGTGGTCAAAGGCATCATCTCCCA
     A T G G G G G A A C C T T T A C A A T T A A T T A A T T A T T
151-225 GTGGGGATGCAATACAGAAGAGGGCTTGGATCCCTGCCATCCACCGGTCATCATGGCTGAGCTGGCCACCAG
     T T C T A A C C T T T T C A T T G G T A A T T
226-300 AACTCAAAATGGGTGGAAGTGGACACCTGGGATCACTGCAAAAGGAGTGGAAAGAAACCTTAAAGTCCTGGCG
     T T A A A C T T G A G T G G A A G T G G G A A
301-375 CATCACCGAAGAAAGCTGGAAGCTCCGACTGTCACCCAGCAGACAGCCACCCCTTGAACGCCAGGGAGA
     C T A G A T G T A G T T T C A T T A A G T A G
376-450 AAGCCCAAGTGGACTGAGACCCAGACTCAAGCCAGAAAGTCCGTGGAAACCCAGACCAAGCTGCCAAAG
     A G A A A T T T A A A C A G A A A A G
451-525 GTGAACTCCTCTGTGGAGTCACTCTCGAATCGTTGCTGTGGCTAATCTCTGGAAGTCGGAAGATATCACC
     C G G G G A T T A T T G C T C T G A G T
526-600 CAAATGTGGCCACTATGCCCCTGATCTGTGAGCTGAGCTGGTAATGATGCCAGAAATTCATCTATGAATCA
     C G C A T C G A T T C A T T G T G
601-675 GATGTGCTGTGGAAGCAGGAGCAACATCCATGCTGGTCAATGAGTGGATGCAATGACATCTCTCCACCAAG
     A T C G A C A T T G C A A T G A C A T C T C C A C C A A G
676-750 ATCAGAAGGCGCTGAGCGGGACACTCGATCAGTACTTGTGCCAGACCTGTGCCAAGTACATGAAAG
     C G A C C A A G C A G C T C A T T G T C C A G A C C T G T C C A A G T A C A T G A A A G
751-825 CACAACCTACAGCTCAGAGTCAGAGGTCGCAATGCAGGAATGATCTGGCCCTCTCCAGCGGAACACTGCA
     T T T G T A G T A C A G T G C T G C T G C T C C A G C G G A A C A C T G C A
826-840 GAGGCCAAGACTTAG
     A T A
    
```

図 1A

【 図 1 - 2 】

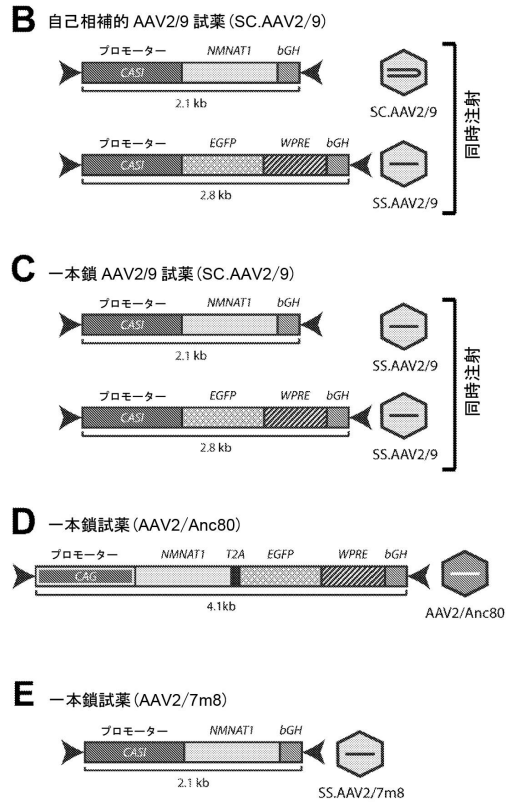


図 1B-E

【 図 2 】

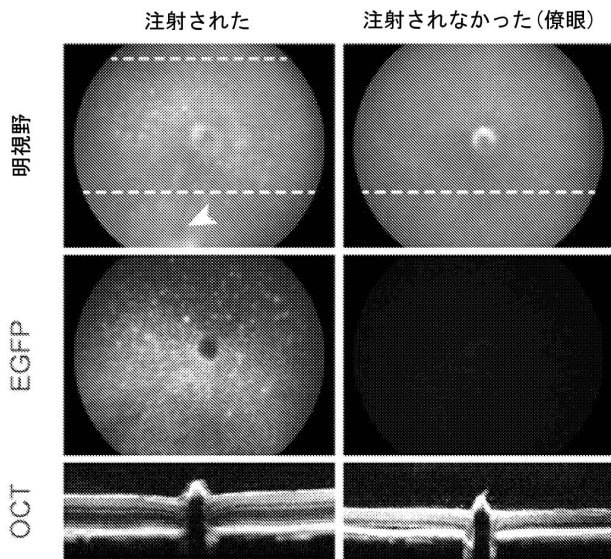
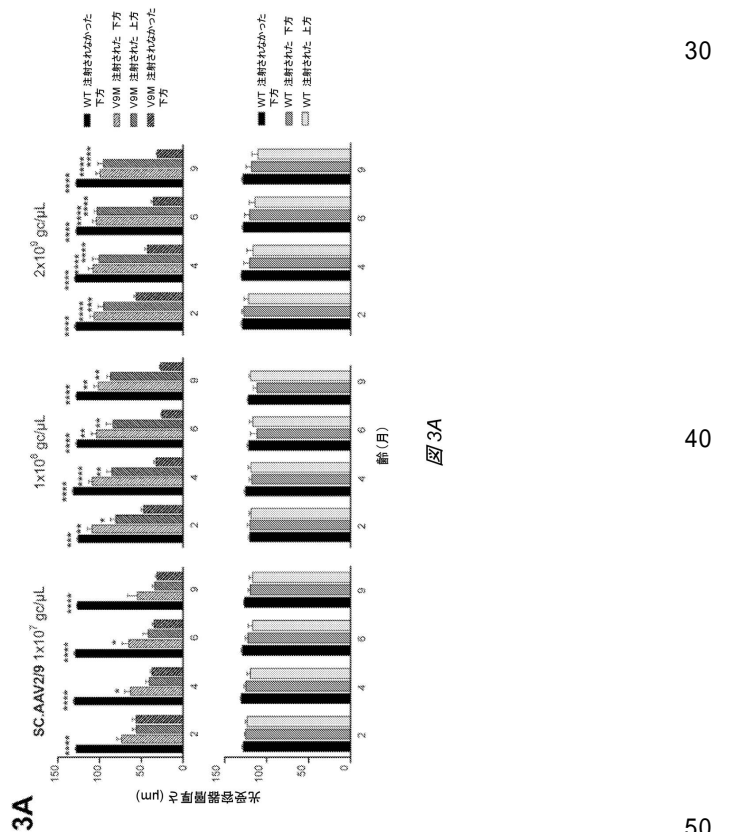


図 2

【 図 3 - 1 】



10

20

30

40

50

【 図 3 - 2 】

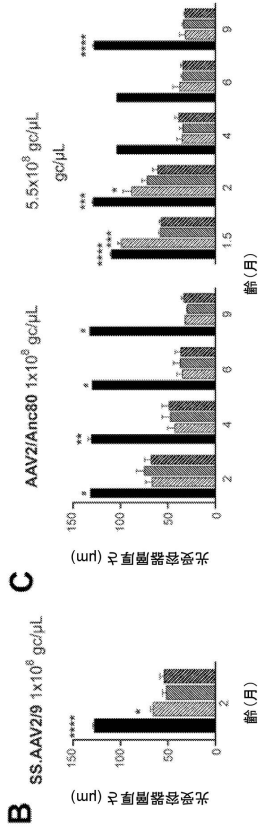


図 3B-C

【 図 5 - 1 】

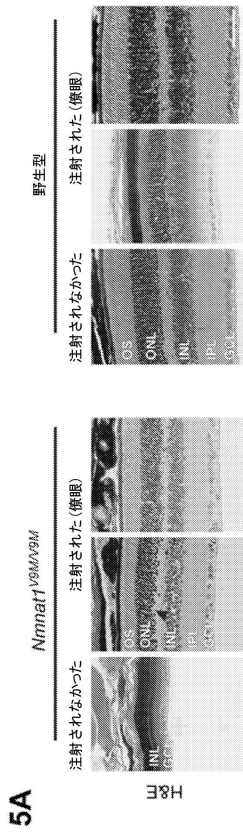


図 5A

【 図 4 】

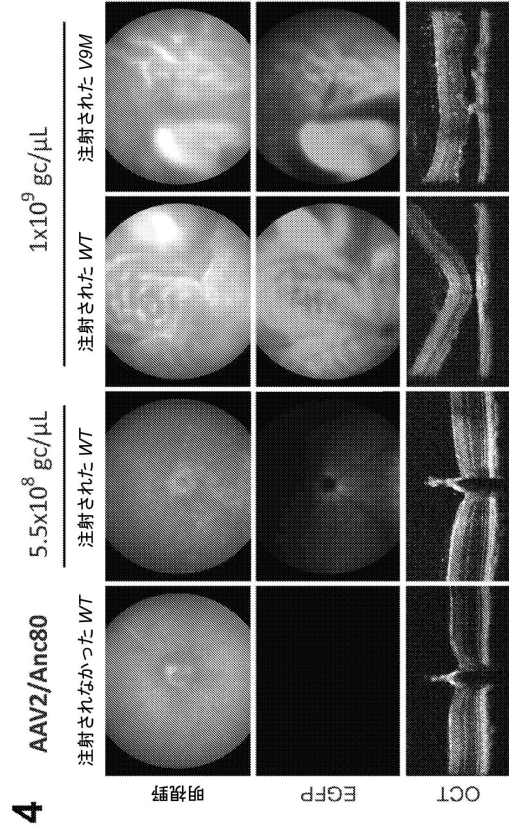


図 4

【 図 5 - 2 】

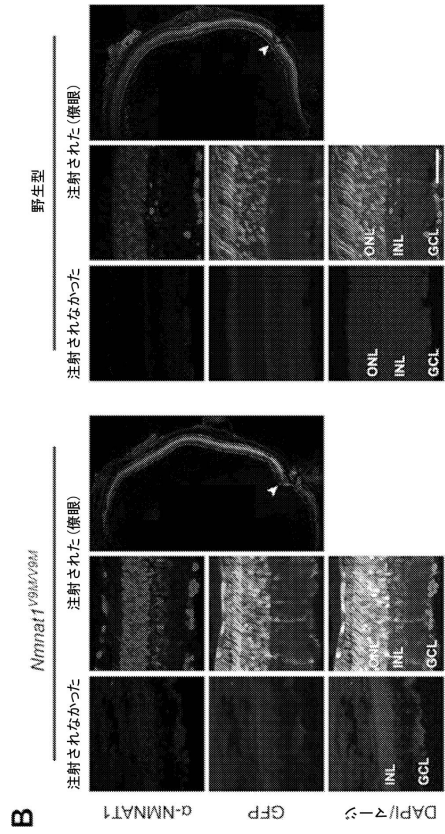
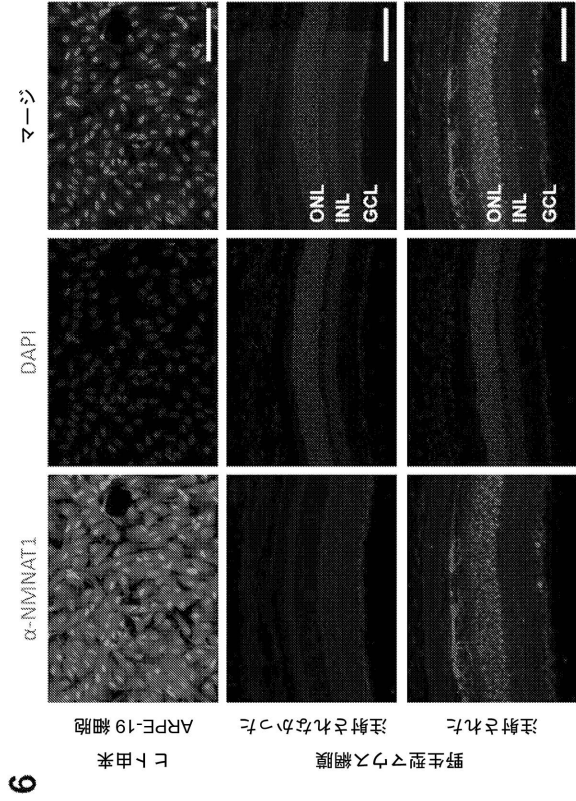


図 5B

【 図 6 】



【 図 7 - 1 】

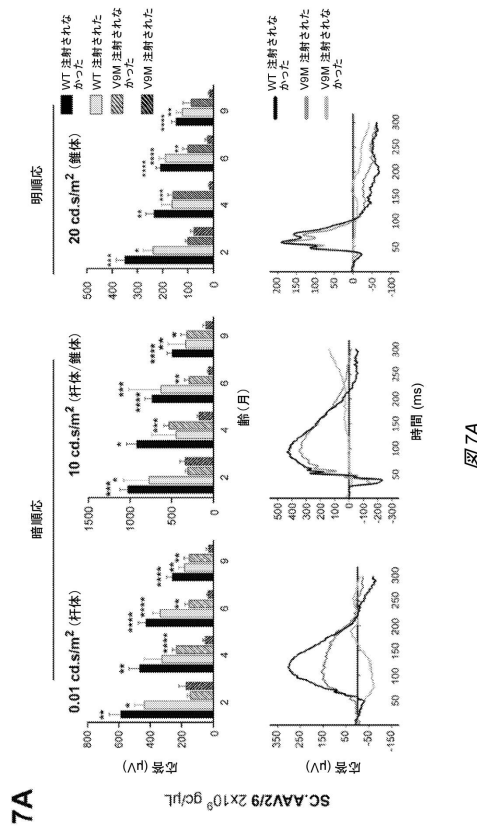
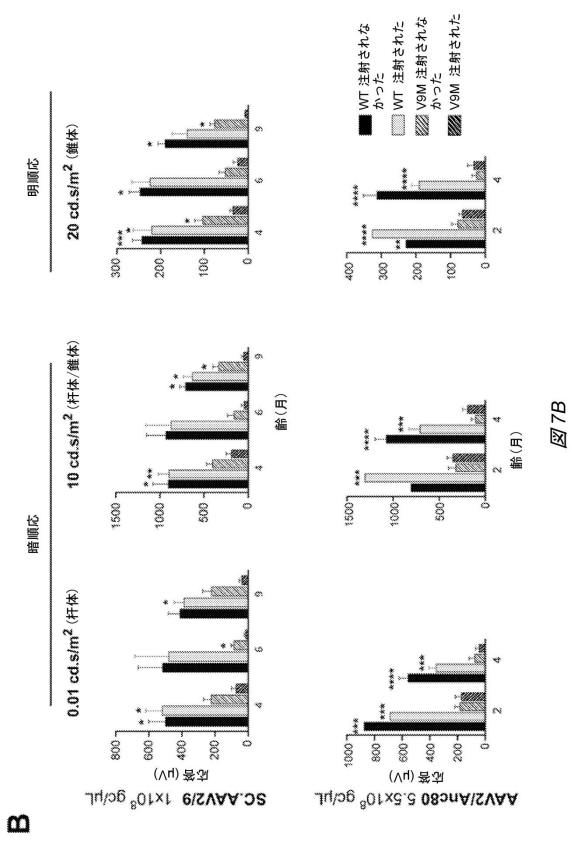


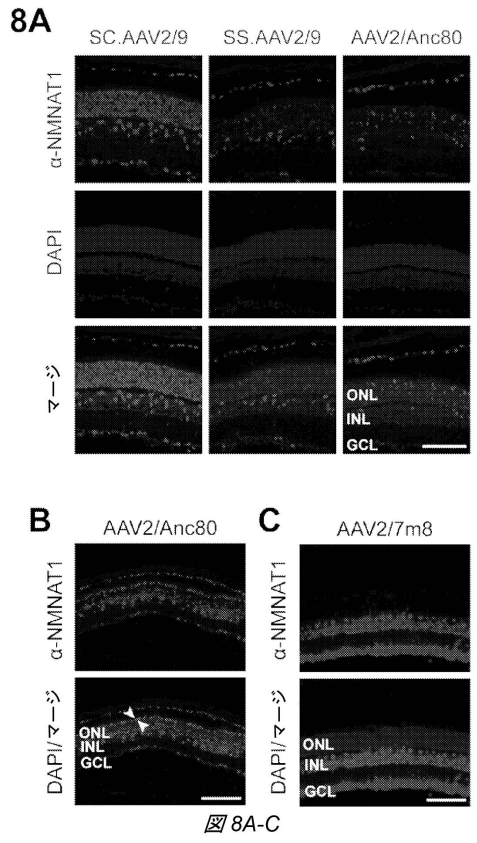
図 6

図 7A

【 図 7 - 2 】



【 図 8 】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023517929000001.app

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/021936

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

10

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

20

3. Additional comments:

SEQ ID NOS: 1-6 were searched.

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/021936

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 10

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.: 4, 8, 12-16
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 30
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 40

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/021936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(B) - A61K 31/137; A61K 31/138; A61K 31/19; A61K 31/222; A61K 31/27; A61K 31/4168 (2021.01)
CPC - A61K 31/19; A61K 31/455; A61K 31/4745; A61K 31/706; A61K 38/00; A61K 2300/00 (2021.05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
see Search History document

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/0344719 A1 (THE JACKSON LABORATORY) 06 December 2018 (06.12.2018) entire document	1-3, 5, 6, 9, 10
-		
Y		7, 11
Y	US 2015/0259395 A1 (AVALANCHE BIOTECHNOLOGIES, INC. et al) 17 September 2015 (17.09.2015) entire document	7, 11
P, A	GREENWALD et al. "Gene Therapy Preserves Retinal Structure and Function in a Mouse Model of NMNAT1-Associated Retinal Degeneration," Molecular Therapy Methods & Clinical Development, 09 July 2020 (09.07.2020), Vol. 18, Pgs. 582-594. entire document	1-3, 5-7, 9-11
A	GREENWALD et al. "Mouse Models of NMNAT1-Leber Congenital Amaurosis (LCA9) Recapitulate Key Features of the Human Disease," The American Journal of Pathology, 17 May 2016 (17.05.2016), Vol. 186, Iss. 7, Pgs. 1925-1938. entire document	1-3, 5-7, 9-11
A	US 2019/0328761 A1 (NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED) 31 October 2019 (31.10.2019) entire document	1-3, 5-7, 9-11
A	WO 2018/002938 A1 (RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. et al) 04 January 2018 (04.01.2018) entire document	1-3, 5-7, 9-11

20

30

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

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

40

Date of the actual completion of the international search 28 May 2021	Date of mailing of the international search report JUN 24 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Harry Kim Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 38/45 (2006.01)	A 6 1 K 38/45	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . P L U R O N I C

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100153693

弁理士 岩田 耕一

(72)発明者 ピアス, エリック エー .

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 7 8 , ベルモント, ゴーデン ストリート 1 1 8

(72)発明者 ヴァンデンバーグ, リュク エイチ .

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 9 3 , ウェストン, インディアン ヒル ロード 1 4

(72)発明者 グリーンウォルド, スコット

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 1 4 , ボストン, チャールズ ストリート 2 4 3

(72)発明者 ブラウン, エミリー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 1 4 , ボストン, チャールズ ストリート 2 4 3

F ターム (参考) 4C076 AA11 BB11 BB24 CC10 FF11

4C084 AA13 DC25 MA58 MA66 NA14 ZA331 ZA332 ZC02

4C087 AA01 AA02 BC83 MA58 MA66 NA14 ZA33 ZC02