

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7448953号
(P7448953)

(45)発行日 令和6年3月13日(2024.3.13)

(24)登録日 令和6年3月5日(2024.3.5)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864 1 0 0 Z
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 0 1 K	67/027 (2024.01)	A 0 1 K	67/027
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
請求項の数 39 (全222頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-528530(P2020-528530)	(73)特許権者	520038471
(86)(22)出願日	平成30年7月31日(2018.7.31)		リフレクション バイオテクノロジーズ
(65)公表番号	特表2021-500917(P2021-500917 A)		リミテッド
(43)公表日	令和3年1月14日(2021.1.14)		香港 ニュー テリトリーズ パク シェク
(86)国際出願番号	PCT/IB2018/055755		コック サイエンス パーク イースト ア
(87)国際公開番号	WO2019/025984		ベニュー ナンバー1 コア ビルディング
(87)国際公開日	平成31年2月7日(2019.2.7)		1 6 /エフ ユニット 6 0 1
審査請求日	令和3年8月2日(2021.8.2)	(74)代理人	100084995
(31)優先権主張番号	62/539,473		弁理士 加藤 和詳
(32)優先日	平成29年7月31日(2017.7.31)	(72)発明者	ヤン、リチャード アール、
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		香港 ニュー テリトリーズ パク シェク
			コック サイエンス パーク イースト ア
			ベニュー ナンバー1 コア ビルディング
			1 6 /エフ ユニット 6 0 1
		(72)発明者	ツァン、スティーブン エイチ、
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 眼疾患のための細胞モデル及び治療関連出願への相互参照

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの制御配列に作動可能に連結された、配列番号4～6のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも98%の配列同一性を有する非変異又は機能的CYP4V2タンパク質をコードする配列を含む核酸分子を含むベクターであって、前記ベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターである、ベクター。

【請求項2】

前記rAAVベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12のいずれかの血清型、又はAAVのその他の天然由来の血清型、分離株、若しくは分岐群、又はそれらのハイブリッドから選択されるVP1、VP2、又はVP3カプシドタンパク質を含む、請求項1に記載のベクター。

【請求項3】

前記rAAVベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、又はAAVのその他の天然由来の血清型、分離株、若しくは分岐群、又はそれらの変異体、キメラ、若しくは融合体から選択される、5'AAV末端逆位反復配列（ITR）又は3'AAVITRを含む、請求項1又は請求項2に記載のベクター。

【請求項4】

前記rAAVベクターが、キメラAAV、シャッフルAAV、又はカプシド改変AAV

である、請求項 1～請求項 3 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 5】

前記 r A A V ベクターが偽型 A A V である、請求項 1～請求項 3 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 6】

前記 r A A V ベクターがハイブリッド A A V である、請求項 1～請求項 3 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7】

前記 r A A V ベクターが、1 又は複数の天然由来の A A V カプシドタンパク質に 1 又は複数の改変を含む、請求項 1～請求項 6 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 8】

前記 A A V カプシドタンパク質に対する改変が、1 又は複数のアミノ酸残基 Y → F、K → R、T → A、S → A、又は T → V 置換を含む、請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 9】

前記 r A A V ベクターが、A A V 2 / 5、A A V 2 / 8、A A V 2 / 2、A A V 2 (Y 4 4 4 F + Y 5 0 0 F + Y 7 3 0 F)、A A V 2 / 1、A A V 2 / 9、A A V 2 / 8 (Y 7 3 3 F)、A A V 2 / 6、A A V 2 / 4、A A V 2 / 7、A A V 5、A A V 2、A A V 8、A A V 1、A A V 9、A A V 6、A A V 1 0、A A V 3、A A V 4、A A V 7、A A V 1 1、A A V 1 2、A n c 8 0、A A V 7 m 8、A A V - D J、S h H 1 0、A A V - P H P、B、r h 1 0、及びそのハイブリッドからなる群より選択される、請求項 1～請求項 8 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 10】

前記 r A A V ベクターが、一本鎖 A A V ベクター又は自己相補性 A A V (s c A A V) ベクターである、請求項 1～請求項 9 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 11】

前記非変異又は機能的 C Y P 4 V 2 タンパク質をコードする配列が、配列番号 1～3 のいずれかの核酸配列と少なくとも 7 6 % の配列同一性を有する、請求項 1～請求項 10 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 12】

前記制御配列がプロモーターを含む、請求項 1～請求項 11 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 13】

前記プロモーターが、網膜色素上皮 (R P E) 細胞特異的プロモーター、光受容体特異的プロモーター、網膜細胞特異的プロモーター、角膜細胞特異的プロモーター、眼細胞特異的プロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、ユビキタスプロモーター、制御されたプロモーター、誘導性プロモーター、又はそれらのハイブリッド、若しくは組み合わせである、請求項 12 に記載のベクター。

【請求項 14】

前記プロモーターが、C A G プロモーター (C A G G S プロモーター、C B プロモーター又は C B A プロモーターとしても知られる)、ニワトリ β アクチンプロモーター、小型 C B A (s m C B A) プロモーター、C B ^S B プロモーター、C B h プロモーター、 β アクチンプロモーター、ヒト β アクチンプロモーター、伸長因子 1 α 短 (E F S) プロモーター、伸長因子 1 α (E F - 1 α) プロモーター、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーター、P G K プロモーター、U B C プロモーター、G U S B プロモーター、U C O E プロモーター、V M D 2 (卵黄状黄斑ジストロフィー 2 ; B E S T 1 としても知られる) プロモーター、R P E 6 5 プロモーター、G R K 1 プロモーター、ヒト光受容体間レチノイド結合タンパク質近位 (I R B P) プロモーター、h I R B P プロモーターの 2 3 5 n t 断片、R P G R 近位プロモーター、赤オプシンプロモーター、赤緑オプシンプロモーター、青オプシンプロモーター、マウスオプシンプロモーター、ロドプシン (R h o) プロモーター、 β ホスホジエステラーゼ (P D E) プロモーター、網膜色素変性症 (R P 1)

プロモーター、NXNL2/NXNL1プロモーター、網膜変性スロー／ペリフェリン2 (Rds/perphZ)プロモーター、IRBP/GNAT2プロモーター(錐体トランスデュシナαプロモーターに融合したhIRBPエンハンサー)、Rds(網膜変性スロー)プロモーター、hPDE6bプロモーター、VEcadプロモーター(VE-カドヘリン/カドヘリン5(CDH5)/CD144プロモーター)、カルシウム感受性プロモーター、NFATプロモーター、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン(MX)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導性マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制系、テトラサイクリン誘導系、RU486誘導系、ラパマイシン誘導系、及びそれらのハイブリッドからなる群より選択される、請求項12に記載のベクター。

10

【請求項15】

前記制御配列がコザック(Kozak)配列を含む、請求項1～請求項14のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項16】

前記制御配列がエンハンサーを含む、請求項1～請求項15のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項17】

前記エンハンサーが、転写後制御因子(PRE)、内部リボソーム進入部位(IRES)、イントロン制御配列、ミニイントロンスプライスドナー/スプライスアクセプター(SD-SA)、又は構成的輸送要素(CTE)を含む、請求項16に記載のベクター。

20

【請求項18】

前記エンハンサーが、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)エンハンサー、B型肝炎ウイルス転写後制御エレメント(HPRE又はHBVPRE)エンハンサー、IRBPエンハンサー、Mason-PfizerサルウイルスCTEエンハンサー、サイトメガロウイルス(CMV)最初期(immediate early)エンハンサー、SV40エンハンサー、鳥白血病ウイルスCTEエンハンサー、及びこれらのハイブリッドからなる群より選択される、請求項16に記載のベクター。

【請求項19】

前記制御配列がポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む、請求項1～請求項18のいずれか1項に記載のベクター。

30

【請求項20】

前記ポリAシグナルが、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル(bGHポリA)、スモールポリAシグナル(SPA)、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル(hGHポリA)、SV40ポリAシグナル、SV40初期ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル、及びこれらのハイブリッドからなる群より選択される、請求項19に記載のベクター。

【請求項21】

前記制御配列が、ポリAシグナルと作動可能に連結されている上流エンハンサー(USE)を含む、請求項1～請求項20のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項22】

前記USEが、SV40後期2×USE、HIV-1(ヒト免疫不全ウイルス1)USE、GHV(地リス肝炎ウイルス)USE、アデノウイルス(L3)USE、hTHGB(ヒトプロトロンビン)USE、及びhC2(ヒトC2補体遺伝子)USE、及びこれらのハイブリッドからなる群より選択される、請求項21に記載のベクター。

40

【請求項23】

前記制御配列が、イントロン配列、UTR配列、スプライス部位配列、上流制御ドメイン配列、応答要素配列、誘導性要素配列、複製起点配列、内部リボソーム進入部位(IRES)配列、転写開始配列、終止配列、RNAプロセッシング配列、ジャンクション配列、リンカー配列、及びこれらのハイブリッドからなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項1～請求項22のいずれか1項に記載のベクター。

50

【請求項 24】

前記制御配列が、前記制御配列により発現が制御される CYP4V2 コード配列に対し異種又は同種である、請求項 1～請求項 23 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 25】

前記制御配列が、臓器特異的、組織特異的、又は細胞特異的マイクロ RNA (miRNA) 標的配列を含む、請求項 1～請求項 24 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 26】

前記ベクターのいずれかの部分が、配列番号 60～64 の CYP4V2 発現カセット配列のいずれかと少なくとも 80% の配列同一性を有する、請求項 1～請求項 25 のいずれか 1 項に記載のベクター。

10

【請求項 27】

医薬的に許容可能な担体及び特定の投与経路又はデバイスに適する追加の成分中に含まれる、請求項 1～請求項 26 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 28】

請求項 1～請求項 27 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 29】

哺乳動物細胞又は昆虫細胞である、請求項 28 に記載の細胞。

【請求項 30】

HEK293 細胞、293T 細胞、A459 細胞、Sf9 細胞、又はベクター生産に用いられる他の細胞である、請求項 28 に記載の細胞。

20

【請求項 31】

両アレル CYP4V2 変異を伴う、クリスタリン網膜症 (BCD、Bietti 結晶性角膜網膜ジストロフィー、Bietti 結晶性網膜症、Bietti 網膜ジストロフィーとしても知られる)、網膜色素変性症 (RP)、又は遺伝性網膜変性 (IRD) に罹患するヒト対象の、または前記ヒト対象に由来する、網膜色素上皮 (RPE) 細胞、光受容体細胞、光受容体前駆細胞、脈絡膜細胞、網膜細胞、人工多能性幹 (iPS) 細胞、又は幹細胞である、請求項 28 に記載の細胞。

【請求項 32】

ヒト対象の網膜に、請求項 28 又は請求項 31 に記載の細胞を送達することにより、必要とするヒト対象において、両アレル CYP4V2 変異を伴う、クリスタリン網膜症 (BCD、Bietti 結晶性角膜網膜ジストロフィー、Bietti 結晶性網膜症、Bietti 網膜ジストロフィーとしても知られる)、網膜色素変性症 (RP)、又は遺伝性網膜変性 (IRD) を治療、阻止、又は予防するための、請求項 28 又は請求項 31 に記載の細胞を含む医薬組成物。

30

【請求項 33】

請求項 1～請求項 27 のいずれか 1 項に記載のベクターで眼細胞を形質導入することにより、両アレル CYP4V2 変異を伴う、クリスタリン網膜症 (BCD、Bietti 結晶性角膜網膜ジストロフィー、Bietti 結晶性網膜症、Bietti 網膜ジストロフィーとしても知られる)、網膜色素変性症 (RP)、又は遺伝性網膜変性 (IRD) に罹患するヒト対象の眼細胞の機能障害、機能喪失、ジストロフィー、障害、変性、又は萎縮を治療、進行阻止又は遅延、救助若しくは改善するため、又は前記ヒト対象の眼細胞の死滅を防止するための、請求項 1～請求項 27 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む医薬組成物。

40

【請求項 34】

前記眼細胞が、網膜細胞、網膜色素上皮 (RPE) 細胞、光受容体細胞 (桿体及び錐体)、脈絡膜上皮細胞、角膜上皮細胞、脈絡膜細胞、角膜細胞、網膜双極細胞、光受容体前駆細胞、神経節細胞、又は視神経細胞である、請求項 33 に記載の医薬組成物。

【請求項 35】

請求項 1～請求項 27 のいずれか 1 項に記載のベクターをヒト対象の網膜に送達することにより、必要とするヒト対象において、両アレル CYP4V2 変異を伴う、クリスタリ

50

ン網膜症（BCD、B i e t t i 結晶性角膜網膜ジストロフィー、B i e t t i 結晶性網膜症、B i e t t i 網膜ジストロフィーとしても知られる）、網膜色素変性症（RP）、又は遺伝性網膜変性（IRD）を治療、阻止、又は予防するための医薬組成物であって、前記ヒト対象の、1又は複数の網膜色素上皮（RPE）細胞、1又は複数の脈絡膜細胞、又は1又は複数の光受容体細胞が、前記ベクターにより形質導入される、請求項1～請求項27のいずれか1項に記載のベクターを含む医薬組成物。

【請求項36】

請求項1～請求項27のいずれか1項に記載のベクターを眼細胞に接触させることを含む、眼細胞で外因性CYP4V2遺伝子をインビトロで発現する方法であって、前記眼細胞は網膜細胞、網膜色素上皮（RPE）細胞、光受容体細胞（桿体又は錐体）、脈絡膜上皮細胞、角膜上皮細胞、脈絡膜細胞、角膜細胞、網膜双極細胞、光受容体前駆細胞、神経節細胞、又は視神経細胞である、方法。

【請求項37】

請求項1～請求項27のいずれか1項に記載のベクターをヒト対象の網膜に送達することにより、網膜色素上皮（RPE）細胞の萎縮、ジストロフィー、機能不全、変性又は死滅と関連するヒト対象の疾患を治療、阻止、又は予防するための、請求項1～請求項27のいずれか1項に記載のベクターを含む医薬組成物であって、

前記ヒト対象の1又は複数のRPE細胞が前記ベクターにより形質導入される、医薬組成物。

【請求項38】

医薬組成物をヒト対象の網膜に送達することにより、網膜色素上皮（RPE）細胞の萎縮、ジストロフィー、機能障害、変性、又は死滅と関連する前記ヒト対象の疾患を治療、阻止、又は予防するための医薬組成物であって、

前記医薬組成物はRPE細胞、又は幹細胞を含み、

前記RPE細胞、又は幹細胞は請求項1～請求項27のいずれか1項に記載のベクターを含む、医薬組成物。

【請求項39】

配列番号2の核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、非変異又は機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸配列と、前記核酸配列に作動可能に連結された1又は複数の制御配列と、を含み、前記核酸配列にコードされる前記非変異又は機能的CYP4V2タンパク質は、配列番号4～6のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも98%の配列同一性を有する、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国特許法119条(e)に基づき、2017年7月31日に出願された、「CELLULAR MODELS OF AND THERAPIES FOR OCULAR DISEASES（眼疾患のための細胞モデル及び治療）」と題される、米国特許出願第62／539，473号の優先権を主張する。上述の内容全体は、参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

クリスタリン網膜症（B i e t t i ' s C r y s t a l l i n e D y s t r o p h y （BCD））

クリスタリン網膜症（BCD、B i e t t i 結晶性角膜網膜ジストロフィー（B i e t t i C r y s t a l l i n e C o r n e o r e t i n a l D y s t r o p h y）、B i e t t i 結晶性網膜症（B i e t t i C r y s t a l l i n e R e t i n o p a t h y）、B i e t t i 網膜ジストロフィー（B i e t t i ' s R e t i n a l D y s t r o p h y）としても知られる（OMIM 210370））は、網膜色素上皮（r e t i n a l p i g m e n t e p i t h e l i u m（RPE））の萎縮、色素塊、及び脈絡膜

10

20

30

40

50

硬化症に関連する、網膜の後極部にある多数の小さな輝く黄白色結晶のような沈着物を特徴とする、稀な常染色体劣性及び失明性網膜ジストロフィーである。本疾患は、G. B. B i e t t i 博士によって1937年に最初に特定された。BCD患者の眼底写真及びSD-OCT画像から、結晶沈着物が主に網膜色素上皮(RPE)の網膜側に位置することが示された(H. Kojima, A. Otani, K. Ogino et al., "Outer retinal circular structures in patients with Bietti crystalline retinopathy," British Journal of Ophthalmology, vol. 96, pp. 390-393, 2012)。角膜縁の結晶沈着物は、BCD患者の4分の1〜3分の1に発生すると推定されている(Kaiser-Kupfer et al. Clinical biochemical and pathologic correlations in Bietti's crystalline dystrophy, Am J Ophthalmol., 1994, 118:569-82)。場合によっては、水晶体の結晶沈着も観察される(Chung et al., J Ophthalmol. 57:447-450, 2013)。進行期では、BCD患者は高度な脈絡膜硬化症、結晶性沈着物の減少又は欠如、及び網膜血管の減弱を呈する(Wada et al. Am J Ophthalmol 2005; 139:894-9)。異常ERG及び網膜の薄化もBCDに認められる。

【0003】

臨床的には、BCDは進行性であり、RPEのジストロフィー及び変性に関連している。同一患者における目の間の著しい非対称性が一般的である。疾患の発症年齢及び進行は、同じ家族内であってもBCD患者によって異なる。ほとんどの患者は、10歳代〜30歳代の間に夜盲症、狭視野、色覚異常、黄斑変性、及び視力低下を発症し、20歳代から50歳代で法的失明(legal blindness)へと進行する。

【0004】

脈絡膜毛細血管の血管と視細胞の光感受性外節との間に位置するRPEは、視覚機能の維持において視細胞(錐体細胞及び桿体細胞)と密接に相互作用する色素細胞の単層である。RPEの重要な機能は、栄養を与え、感覚神経網膜である視細胞から老廃物を除去することである。RPEのその他の機能としては、光吸収、上皮輸送、空間に存在するイオンのバッファリング、視覚サイクル、食作用、分泌、及び免疫調節が挙げられるが、これらに限定されない(Strauss, 2005, The retinal pigment epithelium in visual function. Physiol Rev 85:845-81)。したがって、RPEの機能障害及び変性は、視細胞の機能障害と変性を引き起こし、視力の喪失をもたらす。BCDがRPEの進行性ジストロフィー及び変性に関連していることを考えると、RPEはBCDの研究及び治療のいずれの目的にとっても重要である。

【0005】

BCDは希少疾患である。ある情報源によると、BCD発生率は1:67,000と推定された(ghr.nlm.nih.gov/condition/bietti-crystalline-dystrophy#statistics、World Wide Web参照)。別の情報源によると、BCDの有病率は全てのRP患者の2.5%であると推定された(RP発症患者121人中3人のBCD発症患者、Mataftsi et al., Retina. 24:416-426, 2004を参照)。この推定に基づき、RP発生率を1:4000とすると(Hartong et al., Lancet. 368:1795-1809, 2006)、BCD発生率は1:160,000と推定される。BCDの症状は、網膜を進行的に損傷する他の眼疾患の症状と類似しているため、網膜色素変性症(RP)と一般的に診断されることがある(Mataftsi A et al. Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy: a cross-sectional study. Retina. 2004; 24: 416-426)。BCDの患者は、アジア、アフリカ、ヨーロッパ、中東、北米、及び南米を含む世界の様々な地域で報告されているが、BCDは東アジア系の人、特に中国人及び日本人でより一般的であると報告されている(Hu 1983, Ophthalmic genetics in China. Ophthalm Paed Genet 2:39-45; Li et al., Am J Hum Genet. 2004 May; 74(5): 817-826)。

【0006】

現在、承認されたBCD治療法はなく、患者は最終的に失明する。この希少疾患に苦しむ患者のために、人生を変えるような治療オプションを開発するという、強いアンメットメディカルニーズが存在する。

【0007】

10

20

30

40

50

CYP4V2

CYP4V2 (シトクロムP450、ファミリー4、サブファミリーV、ポリペプチド2、(OMIM 608614)、同義語:CYP4A1)は、シトクロムP450スーパーファミリーのタンパク質の1つであり、ヘムチオレートシトクロムP450サブファミリー4(CYP4)のメンバーである。シトクロムP450(CYP)は、モノオキシゲナーゼ反応で知られる重要なヘム含有タンパク質である。それらは、生体異物、及びステロイドや脂肪酸などの内因性化合物の代謝に関与している。ヒトCYPは、主にミトコンドリアの内膜又は細胞の小胞体にある膜関連タンパク質である。P450タンパク質は、特徴的な配列要素FxxGxxxCG(配列番号30)によって識別可能であり、下線付きのシステインは、ヘム鉄に対する軸配位子として機能する。P450タンパク質の別の特徴的な配列要素はExxR(配列番号31)である。ヒトゲノムプロジェクトでは、ヒトP450遺伝子の数は57とされている。参考として、103個のマウスP450遺伝子と89個のラットP450遺伝子が存在する(Guengerich & Cheng, Pharmacological Reviews, September 2011, 63(3) 684-699)。

【0008】

ヒトCYP4ファミリーは、12個の遺伝子及び10個の偽遺伝子で構成されている。ヒトCYP4V2遺伝子(HGNC:23198)は4q35に位置し、11個のエクソンを有する。CYP4V2遺伝子の変異はBCDを引き起こす(Li et al., Am J Hum Genet. 74:817-826, 2004)。CYP4V2はほぼ全ての組織で発現されるが、BCDの主要な臨床所見を示す組織では、網膜及びRPEでは高レベルで、角膜ではやや低レベルで発現される(Li et al., Am J Hum Genet. 74:817-826, 2004; Nakano M, Kelly EJ, Rettie AE: Expression and Characterization of CYP4V2 as a Fatty Acid omega-Hydroxylase. Drug Metab Dispos 2009; Nakano M, Kelly EJ, Wiek C, Hanenberg H, Rettie AE: CYP4V2 in Bietti's crystalline dystrophy: ocular localization, metabolism of omega-3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.H331P variant. Mol Pharmacol 2012; 82: 679-686)。

【0009】

CYP4V2はP450ファミリーの比較的新しいメンバーであり、BCDは希少疾患であるため、CYP4V2の機能は広く研究されていない。これまでの研究において、CYP4V2タンパク質が脂肪酸代謝において主に活性があることが示された。脂肪酸及びその代謝における異常は、BCD患者の血清、リンパ球、及び皮膚線維芽細胞で示されている(Lee J, Jiao X, Hejtmancik JF et al: The metabolism of fatty acids in human Bietti crystalline dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42: 1707-1714; Lai T, Chu KO, Chan KP et al: Alterations in serum fatty acid concentrations and desaturase activities in Bietti crystalline dystrophy unaffected by CYP4V2 genotypes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010; 51: 1092-1097)。別の研究では、CYP4V2がオメガ-3-多価不飽和脂肪酸(PUFA)ヒドロキシラーゼであり、形質転換されたヒトRPE細胞系ARPE-19で高度に発現するP450であることが示された(Nakano M, Kelly EJ, Wiek C, Hanenberg H, Rettie AE: CYP4V2 in Bietti's crystalline dystrophy: ocular localization, metabolism of omega-3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.H331P variant. Molecular pharmacology 2012; 82: 679-686)。

【0010】

CYP4V2遺伝子には、BCDを引き起こす多数の変異が確認されており、遺伝子の11個のエクソンのそれぞれに少なくとも1つの変異がある。BCD患者の中で最も一般的なCYP4V2変異はc.802-8_810del17insGCである(CYP4V2遺伝子のイントロン6の終端から8塩基で始まる場所における、17塩基の欠失と2塩基(GC)の挿入を指し、IVS6-8 del/insGCとも称される。c.802-8_810del17insGC変異を含むヒトCYP4V2ゲノムDNA領域の配列を示す配列番号46及び対応する野生型配列を示す配列番号47を参照。c.802-

10

20

30

40

50

8__810del17insGC変異を、ヒトCYP4V2イントロン6-エクソン7接合部を示す以下の配列に示す。イントロン6配列を小文字で、エクソン7配列を大文字で示す。17bpの欠失及びGCの挿入を括弧内に示す) : caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca tac agG TCA TCG CT) (GC) GAA CGG GCC AAT GAA ATG AAC GCC AAT GA (配列番号46)。これにより、エクソン7のスキップが起こる。(Xiao et al., Biochem Biophys Res Commun. 409:181-6, 2011、Meng et al., 2014, Mol. Vis., 20:1806-14、Wada et al., Am J Ophthalmol. 139:894-9, 2005、Jiao et al., European Journal of Human Genetics(2017) 25, 461-471)。最近の研究では、c. 802-8__810del17insGC変異の年代は、中国人では1,040~8,200世代、日本人では300~1100世代であると推定された。Jiao et al., European Journal of Human Genetics(2017) 25, 461-471参照。

【0011】

CYP4V2遺伝子の全欠失並びにミスセンス、複製、スプライス部位、フレームシフト、欠失、挿入、インデル(挿入欠失)、ナンセンス、多型(例えば、一塩基多型)、及び早期終結など、様々な種類のCYP4V2変異がBCDに関連して発見された。ヒトBCD患者の間で選択されたCYP4V2変異の概要を、本明細書の表1に示しており、それらは様々な出版物やオンラインデータベース、例えばLOVD (databases.lovd.nl/shared/genes/CYP4V2、World Wide Web参照)、OMIM (omim.org/allelicVariant/608614、World Wide Web参照)、及びClinVar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=608614[MIM]、World Wide Web参照)で確認できる。

【0012】

10

20

30

40

50

【表 1 A】

表 1 : B C D 患者における選択された C Y P 4 V 2 変異

エクソン	ヌクレオチドの変化	予想される タンパク質の変化
1	c.31C>T	p.Q11X
1	c.64C>G	p.L22V
1	c.71T>C	p.L24P
1	c.77G>A	p.G26D
1	c.130T>A	p.W44R
1	c.134A>C	p.Q45P
1	c.181G>A	p.G61S
1	c.197T>G	p.M66R
IVS1	c.214+1G>A	Exon1del
IVS1	c.214+25delT	不明
IVS1	c.215-2A>G	Exon2del
IVS1	c.215-1G>A	Exon2del
2	c.219T>A	p.F73L
2	c.237G>T	p.E79D
2	c.253C>T	p.R85C
2	c.277T>C	p.W93R
2	c.283G>A	p.G95R
2	c.327G>A	不明
IVS2	c.327+1G>A	p.E72Gfs*5
IVS2	c.327+11G>C	不明
3	c.332T>C	p.I111T
3	c.335T>G	p.L112*
3	c.367A>G	p.M123V
3	c.400G>T	p.G134*

【 0 0 1 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 B】

エクソン	ヌクレオチドの変化	予想される タンパク質の変化
3	c.413+2T>G	スプライスアクセプター
4	c.518T>G	p.L173W
5	c.637_641delAGTAA	p.S213*
5	c.655T>C	p.Y219H
6	c.677T>A	p.M226K
6	c.694C>T	p.R232*
6	c.724delG	p.D242Ifs*35
6	c.732G>A	p.W244*
6	c.761A>G	p.H254R
6	c.772C>T	p.L258F
6	c.791delT	欠失
7	c.802-8_806del13	Exon7del
7	c.802- 8_810del17insGC	Exon7del
7	c.810delT	p.(Glu271Argfs*34)
7	c.838G>T	p.E280*
7	c.958C>T	p.R320*
7	c.971A>T	p.D324V
7	c.974C>T	p.T325I
IVS7	c.985+3A>G	不明
8	c.992A>C	p.H331P
8	c.998C>A	p.T333K
8	c.1020G>A	p.W340*
8	c.1021T>C	p.S341P
8	c.1027 T>G	p.Y343D
8	c.1062dupA	p.V355Sfs*4
IVS8	c.1091-2A>G	Exon9del
9	c.1157A>C	p.K386T
9	c.1168C>T	p.R390C
9	c.1169G>A	p.R390H
9	c.1178C>T	p.P393L
9	c.1187C>T	p.P396L

【 0 0 1 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 C】

エクソン	ヌクレオチドの変化	予想される タンパク質の変化
9	c.1198C>T	p.R400C
9	c.1199G>A	p.R400H
9	c.1219G>T	p.E407*
9	c.1225+1 G>A	p.(G364_V408del)
10	c.1226-6_1235del16	Exon10del
10	c.1328G>A	p.R443Q
10	c.1348C>T	p.Q450*
10	c.1355G>A	p.R452H
10	c.1372G>A	p.V458M
10	c.1393A>G	p.R465G
10	c.1396 A >G	p.N466D
10	c.1399T>C	p.C467R
10	c.1441delT	p.(Ser481Argfs*4)
10	c.1445C>T	p.S482*
11	c.1523G>A	p.R508H
11	c.1526C>T	p.P509L
	c.604G>A	p.(Glu202Lys)
	c.242C>G	p.(Thr81Arg)
	c.604+4A>G	p.(?)
	c.1249dup	p.(Thr417Asnfs*2)
	全 CYP4V2 欠損	*

【0015】

これは単に選択されたリストであり、これまでに特定及び報告されたBCD患者のすべての病的CYP4V2変異／バリエーションが含まれているとは限らない。変異は参照配列（NM_207352.3）及び（NP_997235.3）と比較したものである。BCD患者の新たなCYP4V2病的変異は継続的に特定されている。BCDに関連する既に特定された及び将来特定される全ての病的CYP4V2変異／バリエーションは、参照により本明細書に組み込まれる。

【0016】

遺伝性網膜変性（Inherited Retinal Degeneration、IRD）

遺伝性網膜変性（IRD）は、失明の主な原因である。現在、200超の遺伝子がIRD及び関連疾患に関与していることが知られている。網膜色素変性症（RP）は、ヒトの主要なIRDである。RPの遺伝には3つの一般的な様式がある（常染色体優性、常染色体劣性、及びX連鎖）。RPの世界的な発生率は4000人に1人と推定され、常染色体劣性RPはRPの50%～60%を占めている（Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. Lancet. 2006;368:1795-809）。ヨーロッパの研究では、BCDの有病率は、全てのRP患者の2.5%、及び非症候性常染色体劣性RPを有する人の約10%であると推定されている（Mataftsi A, Zografos L, Milla E, Secretan M, M

unier FL. Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy: a cross-sectional study. *Retina*. 2004;24:416-26)。同研究では、BCDはRPとして一般的に診断されることが多いことも指摘されている。そのため、BCDは過少診断されてきた可能性がある。BCDは世界的規模の疾患であるが、東アジア、特に中国人及び日本人で最も一般的である (Li et al., *Am J Hum Genet*. 2004 May; 74(5): 817-826)。

【0017】

表1の変異の参照：

Li A, Jiao X, Munier FL, Schorderet DF, Yao W, et al.(2004) Bietti crystalline corneoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2. *Am J Hum Genet* 74: 817-826。

Xiao X, Mai G, Li S, Guo X, Zhang Q(2011) Identification of CYP4V2 mutation in 21 families and overview of mutation spectrum in Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 181-186。

Shan M, Dong B, Zhao X, Wang J, Li G, et al.(2005) Novel mutations in the CYP4V2 gene associated with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. *Mol Vis* 11: 738-743。

Rossi S, Testa F, Li A, Yaylacioglu F, Gesualdo C, et al.(2013) Clinical and genetic features in Italian Bietti crystalline dystrophy patients. *Br J Ophthalmol* 97: 174-179。

Lin J, Nishiguchi KM, Nakamura M, Dryja TP, Berson EL, et al.(2005) Recessive mutations in the CYP4V2 gene in East Asian and Middle Eastern patients with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. *J Med Genet* 42: e38。

Manzouri B, Sergouniotis PI, Robson AG, Webster AR, Moore A(2012) Bietti crystalline retinopathy: report of retinal crystal deposition in male adolescent siblings. *ARCH OPHTHALMOL* 130: 1470-1473。

Lai TY, Ng TK, Tam PO, Yam GH, Ngai JW, et al.(2007) Genotype phenotype analysis of Bietti's crystalline dystrophy in patients with CYP4V2 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 5212-5220。

Parravano M, Sciamanna M, Giorno P, Boninfante A, Varano M(2012) Bietti crystalline dystrophy: a morpho-functional evaluation. *Doc Ophthalmol* 124: 73-77。

Wada Y, Itabashi T, Sato H, Kawamura M, Tada A, et al.(2005) Screening for mutations in CYP4V2 gene in Japanese patients with Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 139: 894-899。

Zenteno JC, Ayala-Ramirez R, Graue-Wiechers F(2008) Novel CYP4V2 gene mutation in a Mexican patient with Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy. *Curr Eye Res* 33: 313-318。

Lee KY, Koh AH, Aung T, Yong VH, Yeung K, et al.(2005) Characterization of Bietti crystalline dystrophy patients with CYP4V2 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3812-3816。

Yokoi Y, Sato K, Aoyagi H, Takahashi Y, Yamagami M, et al.(2011) A Novel Compound Heterozygous Mutation in the CYP4V2 Gene in a Japanese Patient with Bietti's Crystalline Corneoretinal Dystrophy. *Case Rep Ophthalmol* 2: 296-301。

Haddad NM, Waked N, Bejjani R, Khoeir Z, Chouery E, et al.(2012) Clinical and molecular findings in three Lebanese families with Bietti crystalline dystrophy: report on a novel mutation. *Mol Vis* 18: 1182-1188。

Fu Q, Wang F, Wang H, Xu F, Zaneveld JE, et al.(2013) Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of a Chinese patient cohort with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 4158-4166。

10

20

30

40

50

Song Y, Mo G, Yin G(2013) A novel mutation in the CYP4V2 gene in a Chinese patient with Bietti ' s crystalline dystrophy. *Int Ophthalmol* 33: 269-276。

Jin ZB, Ito S, Saito Y, Inoue Y, Yanagi Y, et al.(2006) Clinical and molecular findings in three Japanese patients with crystalline retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 50: 426-431。

Halford S, Liew G, Mackay DS, Sergouniotis PI, Holt R, Broadgate S, Volpi EV, Ocaka L, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Michaelides M, Webster AR. Detailed phenotypic and genotypic characterization of bietti crystalline dystrophy. *Ophthalmology*. 2014; 121:1174-84。

Houfa Yin, Chongfei Jin, Xiaoyun Fang, Qi Miao, Yingying Zhao,Zhiqing Chen, Zhaoan Su, Panpan Ye, Yao Wang and Jinfu Yin, Molecular Analysis and Phenotypic Study in 14 Chinese Families With Bietti Crystalline Dystrophy. *PLoS One* 9(4), e94960. 2014 Apr 16。

Xiao Hong Meng, Hong Guo, Hai Wei Xu, Qi You Li, Xin Jin, Yun Bai, Shi Ying Li, Zheng Qin Yin, Identification of novel CYP4V2 gene mutations in 92 Chinese families with Bietti ' s crystalline corneoretinal dystrophy, *Molecular Vision*(2014); 20:1806-1814。

Galuh D N Astuti, Vincent Sun, Miriam Bauwens, Ditta Zobor, Bart P Leroy, Amer Omar, Bernhard Jurklies, Irma Lopez, Huanan Ren, Volkan Yazar, Christian Hamel, Ulrich Kellner, Bernd Wissinger, Susanne Kohl, Elfride De Baere, Rob W J Collin, and Robert K Koenekoop, Novel insights into the molecular pathogenesis of CYP4V2-associated Bietti ' s retinal dystrophy, *Mol Genet Genomic Med*. 2015 January; 3(1): 14-29。

Xiaodong Jiao, Anren Li, Zi-Bing Jin, Xinjing Wang, Alessandro Iannaccone, Elias I Traboulsi, Michael B Gorin, Francesca Simonelli and J Fielding Hejtmancik, Identification and Population History of CYP4V2 mutations in Patients with Bietti Crystalline Corneoretinal Dystrophy, *European Journal of Human Genetics*(2017) 25, 461-471。

【発明の概要】

【0018】

細胞系に関する請求

細胞系及び疾患モデルに関する請求

細胞系組成物

一態様では、細胞系を含む細胞疾患モデルが提供される。そのような疾患モデルは、標的遺伝子に1又は複数の変異を含む、(a)対象から提供された幹細胞、若しくは対象から提供された細胞からリプログラミングされた幹細胞、又は(2)対象から提供された幹細胞に由来する細胞、若しくは対象から提供された細胞からリプログラミングされた幹細胞に由来する細胞、を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、前記幹細胞は、人工多能性幹(iPS)細胞である。いくつかの実施形態では、前記幹細胞は、胚性幹(ES)細胞、体性(又は成体)幹細胞、又は間葉系幹細胞(MSC)である。いくつかの実施形態では、対象から提供される前記細胞は、前記対象の任意の細胞型及び／又は任意の組織のものである。いくつかの実施形態では、対象から提供される前記細胞は、皮膚細胞、線維芽細胞、又は血液細胞である。いくつかの実施形態では、対象から提供される前記細胞は、皮膚線維芽細胞又は末梢血単核細胞(PBMC)である。いくつかの実施形態では、対象から提供される前記細胞は、尿細胞、腎上皮細胞、毛包、又は真皮乳頭細胞である。

【0020】

いくつかの実施形態では、幹細胞に由来する前記細胞は、眼細胞である。いくつかの実施形態では、前記眼細胞は、網膜色素上皮(RPE)細胞、光受容体細胞(photoreceptor)

receptor cell (PRC) ; 桿体細胞、錐体細胞、及び光受容体前駆細胞を含む)、網膜細胞、角膜細胞、角膜上皮細胞 (CEC)、視神経細胞、水晶体細胞、脈絡膜内皮 (CE) 細胞、視神経細胞、又は脈絡膜細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞に由来する前記細胞は、ニューロン細胞である。

【0021】

いくつかの実施形態では、前記変異は、前記対象にとって内因性である。いくつかの実施形態では、前記変異は、前記対象にとって外因性である。いくつかの実施形態では、前記変異は、遺伝子編集又は遺伝子操作を介して人工的に導入される。いくつかの実施形態では、前記細胞系は、前記対象にとって内因性及び／又は外因性である複数の変異を含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、前記対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、前記対象は、ヒトである。

【0023】

いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子は、表4に示す遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子は、

変異若しくは欠陥を有するCYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子、又は

不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子、

を含む。いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子は、CYP4V2である。

【0024】

いくつかの実施形態では、前記細胞系は、iPS細胞を含む。いくつかの実施形態では、前記細胞系は、iPS-RPE細胞を含む。いくつかの実施形態では、前記細胞系は、iPS-光受容体 (iPS-PRC) 細胞、iPS-角膜上皮細胞 (iPS-CEC)、iPS-脈絡膜内皮 (CE) 細胞、iPS-角膜細胞、iPS-脈絡膜細胞、iPS-視神経細胞、iPS-眼細胞、又はiPS-ニューロン細胞を含む。いくつかの実施形態では、前記細胞系におけるCYP4V2変異は、前記対象にとって内因性である。いくつかの実施形態では、前記対象は、CYP4V2遺伝子又はCYP4V2遺伝子のオーソログに病的変異を有する。

【0025】

いくつかの実施形態では、前記対象は、表1に示す少なくとも1つの変異を有する。いくつかの実施形態では、前記対象は、遺伝性網膜変性 (IRD) 又は網膜色素変性症 (R

10

20

30

40

50

P)を有する。いくつかの実施形態では、前記対象は、クリスタリン網膜症（BCD、Bietti結晶性角膜網膜ジストロフィー、Bietti結晶性網膜症、Bietti網膜ジストロフィーとしても知られる）を有するか、又はBCDを発症するリスクがある。

【0026】

いくつかの実施形態では、前記細胞系は、前記対象にとって外因性であって遺伝子編集又は遺伝子操作を介して人工的に導入されるCYP4V2変異を含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、前記細胞系は、iPS細胞、ES細胞、MSC、若しくは成体幹細胞；又はiPS細胞、ES細胞、MSC、若しくは成体幹細胞に由来する、RPE細胞、光受容体細胞、角膜上皮細胞、脈絡膜内皮（CE）細胞、若しくは脈絡膜細胞、を含む。いくつかの実施形態では、iPS細胞又は他の種類の幹細胞は、次の1又は複数によって特徴付けられる：

- a. iPS、ES、又はMSCのiPSCの固有の形態；
- b. Oct-4、Sox-2、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81、NANOG、及びAPなどの1又は複数の多能性マーカー；
- c. 所望の細胞の種類（例えば、RPE）に分化する能力；及び／又は
- d. テラトーマアッセイ。

【0028】

いくつかの実施形態では、前記iPS-RPE細胞又は他の種類の幹細胞に由来するRPE細胞は、

- a. 形態：色素及び六角形の形状、及び／又は
- b. 1又は複数の以下のバイオマーカー：レチナルデヒド結合タンパク質1（RLBP1、別名：CRALBP）、RPE65、BESTROPHIN-1、MITF、LRAT、RDH5、PAX6、MERTK、TYR、ZO-1及び／又はVINCULINによって特徴付けられる。

【0029】

別の態様では、BCDヒト細胞モデル又はCYP4V2機能細胞モデルが提供される。そのようなモデルは、BCD患者の細胞若しくは細胞系に由来する、又は人工的に作製されたCYP4V2変異を有する細胞若しくは細胞系に由来する、iPS細胞若しくはiPS細胞系又はiPS-RPE細胞若しくはiPS-RPE細胞系を含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、前記細胞系は、健康な対照の対応する細胞系と比較して、以下の化合物群の1又は複数の化合物について異常な生化学的プロファイルを有する：（i）脂肪酸、（ii）セラミド、（iii）スフィンゴミエリン、（iv）スフィンゴシン、（v）スフィンガニン、又は（vi）ヒドロキシ脂肪酸。いくつかの実施形態では、前記細胞系は、健康な対照の関連する細胞系と比較して、表2に示す1又は複数の化合物について異常な生化学的プロファイルを有する。

【0031】

細胞疾患モデルの作製方法：

別の態様では、iPS由来のBCD疾患モデルの作製方法が提供される。そのような方法は、

CYP4V2遺伝子に内因性変異を有する細胞を対象から取得すること、又はCYP4V2遺伝子に内因性変異を有しない細胞を取得することであって、この段階又は後続の任意の段階で遺伝子編集又は遺伝子操作を介して外因性CYP4V2変異が人工的に導入される、前記取得すること；

前記細胞に多能性を誘導するか、前記細胞をリプログラミングしてiPSCを生産すること；

前記iPSCが所望の眼細胞に分化する条件下で前記iPSCを培養して、iPS由来眼細胞系を作製すること、を含む。

10

20

30

40

50

【0032】

いくつかの実施形態では、前記対象から得られる前記細胞は、体細胞である。いくつかの実施形態では、前記対象から得られる前記細胞は、皮膚細胞、線維芽細胞、血液細胞、末梢血単核細胞（P B M C）、又は眼細胞である。いくつかの実施形態では、前記対象から得られた前記細胞は、尿細胞、腎上皮細胞、毛包、又は真皮乳頭細胞である。いくつかの実施形態では、前記眼細胞は、網膜色素上皮（R P E）細胞、角膜上皮細胞（C E C）、光受容体細胞（P R C）、脈絡膜内皮（C E）細胞、視神経細胞、網膜細胞、角膜細胞、又は脈絡膜細胞である。いくつかの実施形態では、転写因子O C T 4、S O X 2、K L F 4、及びc-M Y Cのうち1又は複数を使用して多能性が誘導され又は細胞がリプログラミングされる。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、前記変異は、病的なものである。いくつかの実施形態では、前記細胞系は、表1に示す変異の1又は複数の変異を含む。いくつかの実施形態では、前記細胞系は前記変異に関してヘテロ接合性である。いくつかの実施形態では、前記細胞系は前記変異に関してホモ接合性である。

【0034】

いくつかの実施形態では、前記細胞疾患モデルは、健康な対照の関連する細胞系と比較して、以下の化合物群の1又は複数の化合物の異常なレベルを示す：（i）脂肪酸、（i i）セラミド、（i i i）スフィンゴミエリン、（i v）スフィンゴシン、（v）スフィンガニン、又は（v i）ヒドロキシ脂肪酸。いくつかの実施形態では、前記細胞疾患モデルは、表2に示す1又は複数の化合物における健康な対照の関連する細胞系のレベルと比較して異常なレベルを示す。

20

【0035】

生化学アッセイ法：

一態様では、疾患細胞モデルの異常又は表現型を発見する方法が提供される。そのような方法は、典型的に、患者の細胞系（又はその疾患を引き起こす遺伝子の外因性変異を含む遺伝子編集又は遺伝子操作された細胞系）と健康な対照との間で、（i）脂肪酸、（i i）セラミド、（i i i）スフィンゴミエリン、（i v）スフィンゴシン、（v）スフィンガニン、及び／又は（v i）ヒドロキシ脂肪酸から選択される1又は複数の化合物のレベルを評価及び比較することを含む。

30

【0036】

いくつかの実施形態では、評価される化合物のうち1又は複数は、表2に示されている。いくつかの実施形態では、L C-M S、L C-M S/M S、G C-M S、G C-M S/M S、及び／又はF I A-M S/M Sを使用して化合物レベルの識別及び／又は評価が実施される。いくつかの実施形態では、前記疾患細胞モデルは、表4に示す変異又は欠陥を有する遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、前記疾患細胞モデルは、C Y P 4 V 2、C Y P 1 B 1、M Y O 7 A、D F N B 3 1、U S H 1 C、U S H 1 G、C D H 2 3、P C D H 1 5、C L R N 1、A C O 2、A F G 3 L 2、A T X N 2、A U H、C 1 2 o r f 6 5、C I S D 2、F O X C 1、F O X F 2、L T B P 2、M T P A P、M Y O C、N D U F S 1、N R 2 F 1、O P A 1、O P A 3、O P T N、P A X 6、P D G F、P I T X 2、P O L G、S P G 7、T E K、T X N R D 2、W F S 1、A B C A 4、R E P-1、R P E 6 5、C E P 2 9 0、P D E 6 B、R P G R、M E R T K、M T-ND4、F A M 4 7 E、G B A、G C H 1、H T R A 2、L R R K 2、P A R K 2、P I N K 1、S N C A、S Y N J 1、N P C 1、N P C 2、C Y P 4 A 1 1、C Y P 4 A 2 2、C Y P 4 B 1、C Y P 4 F 2、C Y P 4 F 3、C Y P 4 F 8、C Y P 4 F 1 1、C Y P 4 F 1 2、C Y P 4 F 2 2、C Y P 4 X 1、C Y P 4 Z 1、又はC Y P 4 6 Aの遺伝子の中に、変異又は欠陥を有する遺伝子を含む。

40

【0037】

B C D細胞モデルの使用法（薬物、投与量、及びデバイスのスクリーニング）

別の態様では、B C Dに対する治療効果について試験薬をスクリーニングする方法が提

50

供される。そのような方法は、典型的に、

B C D患者由来の i P S - R P E 細胞系からの細胞、又は人工の遺伝子編集又は遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有する C Y P 4 V 2 遺伝子を含んでいる i P S - R P E 細胞系からの細胞を、試験薬に接触させることと；

上記試験薬による接触前と比較した、表 2 に示す 1 又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥 C Y P 4 V 2 核酸配列の増加；前記細胞内の C Y P 4 V 2 ポリペプチドの量の増加；及び／又は細胞構造、細胞形態又は細胞機能の改善、について前記細胞を評価することと、
を含み、

上記試験薬による処理前と比較した、表 2 に示す 1 又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥 C Y P 4 V 2 核酸配列の増加；前記細胞内の C Y P 4 V 2 ポリペプチドの量の増加；及び／又は細胞構造、細胞形態、又は細胞機能の改善は、B C D に対して治療効果を有する試験薬の指標となる。

【0038】

いくつかの実施形態では、前記試験薬は、核酸又はそのアナログ、核酸配列を含む又はポリペプチドをコードするベクター、ポリペプチド又はそのアナログ、抗体、化学物質、小分子、及び／又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記細胞は、P C R 技術、イムノアッセイ、シーケンシング、生化学アッセイ、機能アッセイ、顕微鏡検査、又はそれらの組み合わせを用いて評価される。

【0039】

別の態様では、B C D の試験薬を含む製剤、ベクター、又はコンストラクトの有効性又は効率をスクリーニングする方法が提供される。そのような方法は、典型的に、

B C D 患者由来の i P S - R P E 細胞系からの複数の細胞試料、又は人工の遺伝子編集若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有する C Y P 4 V 2 遺伝子を含んでいる i P S - R P E 細胞系からの複数の細胞試料を、様々な製剤、ベクター、又はコンストラクトに製剤化又はパッケージングされた試験薬に接触させることと；

上記試験薬による処理前と比較した、及び／又は同じ試験薬ではあるものの異なる製剤、ベクター、又はコンストラクトに製剤化又はパッケージングされた試験薬で処理された細胞試料と比較した、表 2 に記載の 1 又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥 C Y P 4 V 2 核酸配列の増加；前記細胞内の C Y P 4 V 2 ポリペプチドの量の増加；細胞構造、細胞形態、又は細胞機能の改善；及び／又は細胞耐性若しくは細胞死、について前記細胞試料を評価することによって、上記製剤、ベクター、又はコンストラクトの効率又は有効性を決定及び比較することと、
を含み、

前記細胞は、P C R 技術、イムノアッセイ、シーケンシング、生化学アッセイ、機能アッセイ、細胞生存率アッセイ、顕微鏡検査、又はそれらの組み合わせを用いて評価される。

【0040】

一態様では、B C D のための試験薬の効果的かつ安全な投与量範囲をスクリーニングする方法が提供される。そのような方法は、典型的に、

B C D 患者由来の i P S - R P E 細胞系からの複数の細胞試料、又は人工の遺伝子編集若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有する C Y P 4 V 2 遺伝子を含んでいる i P S - R P E 細胞系からの複数の細胞試料を、細胞試料ごとに異なる用量で、試験薬に接触させることと、

上記試験薬による処理前と比較した、及び／又は同じ試験薬ではあるものの異なる用量の試験薬で処理された細胞試料と比較した、表 2 に記載の 1 又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥 C Y P 4 V 2 核酸配列の増加；前記細胞内の C Y P 4 V 2 ポリペプチドの量の増加；細胞構造、細胞形態、又は細胞機能の改善；及び／又は細胞耐性若しくは細胞死、について前記細胞試料を評価することによって、異なる用量の有効性及び安全性を決定及び比較し、それにより適切な用量範囲を決定することと、

10

20

30

40

50

を含み、

前記細胞は、P C R技術、イムノアッセイ、シーケンシング、生化学アッセイ、細胞生存率アッセイ、機能アッセイ、顕微鏡検査、又はそれらの組み合わせを用いて評価される。

【0041】

別の態様では、網膜又は網膜細胞に治療薬を送達するための送達デバイス又は送達方法の有効性又は効率をスクリーニング又は評価する方法が提供される。そのような方法は、典型的に、

(i) B C D患者由来のi P S - R P E細胞系からの細胞試料、又は人工の遺伝子編集若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有するC Y P 4 V 2遺伝子を含んでいるi P S - R P E細胞系からの細胞試料を、前記送達デバイス又は送達方法を使用せずに、試験薬に接触させることと；

(i i) B C D患者由来のi P S - R P E細胞系からの別個の細胞試料、又は人工の遺伝子編集若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有するC Y P 4 V 2遺伝子を含んでいるi P S - R P E細胞系からの別個の細胞試料を、前記送達デバイス又は送達方法を使用して、(i)と同じ用量の前記試験薬に接触させることと、

(i i i) 上記試験薬による処理前と比較した、及び／又は同じ用量の同じ試験薬による処理であって前記送達デバイス又は送達方法を使用していない処理と比較した、表2に示す1又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥C Y P 4 V 2核酸配列の増加；前記細胞内のC Y P 4 V 2ポリペプチドの量の増加；細胞構造、細胞形態若しくは細胞機能の改善；細胞耐性若しくは細胞死；及び／又は前記細胞内の前記試験薬のレベル、について(i)及び(i i)からの前記細胞試料を評価及び比較することによって、上記送達デバイス又は送達方法の有効性又は効率を決定及び比較すること、

を含み、

前記細胞は、P C R技術、イムノアッセイ、シーケンシング、生化学アッセイ、機能アッセイ、顕微鏡検査、又はそれらの組み合わせを用いて評価される。

【0042】

いくつかの実施形態では、網膜細胞はR P E細胞である。

【0043】

C R I S P R遺伝子編集療法

一態様では、(a) C Y P 4 V 2遺伝子の核酸配列、又はC Y P 4 V 2遺伝子の隣接100bp以内の核酸配列を(「標的配列」を)標的とするC R I S P RガイドRNA、及び(b)機能的C R I S P R関連タンパク質(C a s)を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、そのような組成物は、(c) C Y P 4 V 2遺伝子又はその一部の修正、破壊、又は置換のための、C Y P 4 V 2遺伝子の野生型配列又は機能的配列の全部又は一部を含むドナー核酸配列をさらに含んでもよい。

【0044】

いくつかの実施形態では、前記組成物の1又は複数の成分は、上記成分をコードするD N A分子、上記成分をコードするm R N A分子、R N A分子、ポリペプチド、及び／又はリボ核タンパク質(R N P)、又はタンパク質-R N A複合体の形態で提供される。いくつかの実施形態では、前記組成物の2以上の成分は、別々の分子にある又は1つの分子若しくは1つの複合体に組み合わされているか、別々のベクターにある又は1つのベクターに組み合わされているか、1又は複数の核酸複合体にあるか、1又は複数のR N P複合体にある。いくつかの実施形態では、前記ドナー核酸配列は、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチド(s s O D N)又はベクター中に提供される。いくつかの実施形態では、前記ベクターはプラスミド、組換えA A Vベクター、組換えレンチウイルスベクター、及び／又はそれらの組み合わせである。

【0045】

いくつかの態様では、本明細書に記載の組成物のいずれかを含む、病的C Y P 4 V 2変異を有する細胞を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、(a)前記C R I

10

20

30

40

50

S P RガイドRNAは、

(i) 標的遺伝子 (「標的遺伝子」) 中又は標的遺伝子の隣接 1 0 0 b p 以内にある標的配列に相補的であるプロトスペーサーエレメント配列、及び t r a n s - a c t i v a t i n g c r R N A (t r a c r R N A) の相補的な領域に対応する配列、を含む C R I S P R R N A (c r R N A) と、

(i i) 前記 c r R N A の対応する領域に相補的な領域、及び C R I S P R 関連タンパク質 9 (C a s 9) と相互作用する配列、を含む t r a c r R N A と、を含み、

(b) 前記機能的 C R I S P R 関連タンパク質は C a s 9 を含む。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態では、前記プロトスペーサーエレメントは、約 2 0 塩基、約 1 9 塩基、約 2 1 塩基、約 1 9 ~ 2 1 塩基、約 1 8 ~ 2 2 塩基、又は約 1 6 ~ 2 4 塩基である。いくつかの実施形態では、前記 c r R N A 及び前記 t r a c r R N A は、別々の分子内にある。いくつかの実施形態では、前記 c r R N A 及び前記 t r a c r R N A は、シングルガイドRNA (s g R N A) において組み合わされている。いくつかの実施形態では、前記 s g R N A は、約 8 8 ~ 1 5 0 b p である。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、前記 C a s 9 は、ストレプトコッカス・ピオゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) (S p C a s 9) 、 S p C a s 9 ニッカーゼ (C a s 9 n D 1 0 A) 、 S p C a s 9 (D 1 1 3 5 E) 、 e S p C a s 9 、 S p C a s 9 - H F 1 、 S p C a s 9 V R E R 、 S p C a s 9 V Q R 、 S p C a s 9 E Q R 、 スタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) (S a C a s 9) 、 ナイセリア・メニンギチジス (N e i s s e r i a M e n i n g i t i d i s) 、 ストレプトコッカス・サーモフィラス (S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s) 、 ストレプトコッカス・ニューモニエ (S t r e p t o c o c c u s p n e u m n o n i a e) 、 カンピロバクター・コリ (C a m p y l o b a c t e r c o l i) 、 カンピロバクター・ジェジュニ (C a m p y l o b a c t e r j e j u n i) 、 ストレプトコッカス・ミュータンス (S t r e p t o c o c c u s m u t a n s) 、 パスツレラ・ムルトシダ (P a s t e u r e l l a m u l t o c i d a) 、 ビフィドバクテリウム・ロンガム (B i f i d o b a c t e r i u m l o n g u m) 、 バチルス・スミシー (B a c i l l u s s m i t h i i) 、 トレポネマ・デンティコーラ (T r e p o n e m a d e n t i c o l a) 、 マイコプラズマ・カニス (M y c o p l a s m a c a n i s) 、 及びエンテロコッカス・ファエカリス (e n t e r o c o c c u s f a e c a l i s) から選択される C a s 9 オーソログ又は変異体 C a s 9 を含む。いくつかの実施形態では、前記 C R I S P R 関連タンパク質である C a s 9 又は C p f 1 は、1、2、3又はそれ以上の核局在化配列 (N L S) を N 末端及び／又は C 末端にさらに含む、及び／又は、非限定的な例として G F P 又は E G F P が挙げられる選択マーカーをさらに含む。

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、(a) 前記 C R I S P R ガイドRNAは、標的遺伝子中又は標的遺伝子の隣接 1 0 0 b p 以内の標的配列に相補的であるプロトスペーサーエレメント配列を含む c r R N A を含み、(b) 前記機能的 C R I S P R 関連タンパク質は C p f 1 を含む。いくつかの実施形態では、前記プロトスペーサーエレメントは、約 2 0 塩基、約 2 1 塩基、約 2 2 塩基、約 2 3 塩基、約 2 4 塩基、約 1 9 ~ 2 5 塩基、約 1 8 ~ 2 6 塩基、又は約 1 6 ~ 2 8 塩基である。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、前記プロトスペーサーエレメント配列は、配列番号 4 8 ~ 5 2 からなる群から選択されるか、配列番号 4 8 ~ 5 2 の一つと少なくとも 8 5 % の配列同一性を有し、C Y P 4 V 2 遺伝子の c . 8 0 2 - 8 _ 8 1 0 d e l 1 7 i n s G C 変異を標的とするために、N G G をプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) とする C a s タンパク質と共に使用される。いくつかの実施形態では、前記ドナー核酸配列は、配列番号 5

10

20

30

40

50

6 及び 5 7（これは 2 つのドナー鋳型配列である）から選択されるか、配列番号 5 6 及び 5 7 のいずれか又はその相補的な配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C Y P 4 V 2 遺伝子の c . 8 0 2 - 8 _ 8 1 0 d e l 1 7 i n s G C 変異を修正、破壊、又は置換するために使用される。

【 0 0 5 0 】

C R I S P R 遺伝子治療法に関する請求

別の態様では、変異した C Y P 4 V 2 遺伝子を持つ対象又は細胞における B C D を治療又は予防する方法が提供される。そのような方法は、

(i) シークエンシングによって前記対象又は細胞における病的変異を特定すること、
(i i) 前記変異に関与する最初のヌクレオチドの上流約 1 0 0 b p から、前記変異に関与する最後のヌクレオチドの下流約 1 0 0 b p までに及ぶ領域内の C a s 関連 P A M 部位を見つけること、

(i i i) (i i) で特定された各 P A M 部位に関連する C Y P 4 V 2 配列を標的とする様々なプロトスペーサーエレメント配列を特定すること、

(i v) (i i i) で特定されたプロトスペーサーエレメント配列を含む各 C R I S P R ガイド RNA の活性レベルと、オフターゲット編集のプロファイルとを、前記プロトスペーサーエレメント配列及び P A M について評価すること、

(v) (i v) に基づいて 1 又は複数の C R I S P R ガイド RNA 設計を選択すること、

(v i) 標的 C Y P 4 V 2 変異を修正、破壊、又は置換するための相同組換え修復 (H D R) に基づく 1 又は複数のドナー核酸配列を設計すること、

(v i i) 組成物に関する請求項 1 ~ 請求項 1 8 で提供される、C R I S P R ガイド RNA 、 C a s 、及びドナー核酸配列を構築すること、

(v i i i) 所望により、活性レベル及び／又はオフターゲット編集プロファイルを評価するために、前記対象から単離された細胞；前記対象由来の i P S 細胞、若しくは前記対象由来の幹細胞から分化した細胞；又は前記対象から単離されたゲノム DNA 、又は前記対象から単離された細胞若しくはこれに由来する細胞、における (v i i) の成分を検証し、さらに選択すること、及び

(i x) リボ核タンパク質又はタンパク質 - R N A 複合体、ベクター、タンパク質、核酸分子、ナノ粒子、リボソーム、ミセル、ウィロソーム、核酸複合体、及び／又はそれらの組み合わせからなる群から選択される送達システムによって、前記対象又は前記細胞に (v i i i) の成分を投与することであって、前記送達は、エレクトロポレーションにより、若しくは、脂質媒介トランスフェクション、ヌクレオフェクション、ウイルス形質導入若しくはインジェクション、又はそれらの組み合わせによって行われる、前記投与すること、
を含み、

(x) インビトロでの細胞における治療のために、非限定的な例として G F P 、 E G F P 、又はピューロマイシン耐性が挙げられる選択マーカーが、所望により前記 (v i i i) の成分に追加又は組み込まれている。

【 0 0 5 1 】

一態様では、インビボで対象における又はインビトロで細胞における C Y P 4 V 2 遺伝子の c . 8 0 2 - 8 _ 8 1 0 d e l 1 7 i n s G C 変異を修正又は置換するための遺伝子編集組成物が提供される。そのような組成物は、典型的に、

(i) 配列番号 4 8 ~ 5 2 の 1 つから選択されるか、配列番号 4 8 ~ 5 2 の配列の 1 つと少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するプロトスペーサーエレメント配列を含む C R I S P R ガイド RNA 、

(i i) 配列番号 5 6 及び 5 7 の 1 つから選択されるか、配列番号 5 6 及び 5 7 の 1 つ又はその相補的な配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するドナー核酸配列、及び

(i i i) C a s 9 タンパク質（例示的な配列を配列番号 5 8 に示す）（所望により、1、2、3 又はそれ以上の N L S 、及び／又は非限定的な例として G F P 又は E G F P が挙げられる選択マーカーを含む）、

を含む。

【0052】

いくつかの実施形態では、前記プロトスペーサーエレメント配列の前にオプションなヌクレオチドGが付加される。いくつかの実施形態では、前記CRISPRガイドRNAは、crRNA（例示的な配列（ただし、5'プロトスペーサーエレメント配列は含めていない）を配列番号53に示す）及びtracrRNA（例示的な配列を配列番号54に示す）を含み；前記プロトスペーサーエレメント配列は前記crRNAに含まれる。いくつかの実施形態では、前記CRISPRガイドRNAは、前記プロトスペーサーエレメント配列を含むシングルガイドRNA（sgRNA）（例示的なsgRNA配列（ただし、5'プロトスペーサーエレメント配列は含めていない）を配列番号55に示す）を含む。

10

【0053】

いくつかの実施形態では、(i)、(ii)、及び(iii)の1又は複数の成分は、当該成分をコードするDNA分子、当該成分をコードするmRNA分子、核酸分子、ペプチド、RNA分子、ポリペプチド、リボ核タンパク質(RNP)、又はタンパク質-RNA複合体、及び／又はそれらの組み合わせの形態で提供される。

【0054】

BCD細胞療法、眼疾患自家細胞療法、及び併用療法に関する請求

BCD細胞療法

BCDに対する遺伝子修復を伴わない同種（アロジェニック）細胞療法又は自家細胞療法

いくつかの態様では、対象における眼の疾患を治療又は予防する方法が提供され、前記疾患はCYP4V2遺伝子の病的な遺伝的又はエピジェネティックな変化に関連している。そのような方法は、典型的に、前記対象に細胞組成物を投与することを含み、前記細胞組成物は、幹細胞由来の、網膜色素上皮(RPE)細胞、光受容体又は光受容体前駆細胞(PRC)、角膜上皮細胞(CEC)、脈絡膜内皮(CE)細胞、及び／又は他の眼細胞を含む。

20

【0055】

いくつかの実施形態では、前記幹細胞は、胚性幹(ES)細胞、iPC細胞、MSC、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である。いくつかの実施形態では、前記幹細胞は、BCDを有しない又は病的CYP4V2遺伝子を有しない1又は複数の対象からのものであるか、又はBCDを有しない又は病的CYP4V2遺伝子を有しない1又は複数の対象に由来するものである。いくつかの実施形態では、前記幹細胞は、CYP4V2遺伝子に病的変異を有する1又は複数の対象からのものであるか、又はCYP4V2遺伝子に病的変異を有する1又は複数の対象に由来するものである。いくつかの実施形態では、前記対象は、ヒト対象である。

30

【0056】

BCDに対する遺伝的に修復された自家細胞療法

別の態様では、

(a) BCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞、若しくはBCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された幹細胞、又は

40

(b) BCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された幹細胞から分化した細胞、若しくはBCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞から分化した細胞、を含む細胞組成物が提供される。

【0057】

いくつかの実施形態では、前記対象から単離された細胞からリプログラミングされた前記幹細胞は、iPC細胞である。いくつかの実施形態では、前記iPS細胞は、前記対象の任意の組織の任意の細胞からリプログラムされる。いくつかの実施形態では、前記iPS細胞は、皮膚細胞、血液細胞、尿細胞、有毛細胞、線維芽細胞、末梢血単核細胞(PBMC)、腎上皮細胞、毛包、又は真皮乳頭細胞からリプログラミングされる。いくつかの

50

実施形態では、前記対象から単離された前記幹細胞は、MSC、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞から分化した前記細胞は、眼細胞である。いくつかの実施形態では、前記幹細胞から分化した細胞は、RPE細胞、PRC、網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、CEC、又はCE細胞である。いくつかの実施形態では、前記幹細胞から分化した細胞は、iPS-RPE、iPS-PRC、iPS-CEC、又はiPS-CE細胞である。

【0058】

いくつかの実施形態では、

(i) iPSCヘリプログラミングするために使用される、BCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞、

(ii) 前記BCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された幹細胞、若しくは前記BCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞からリプログラミングされたiPS細胞、又は

(iii) 前記BCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された幹細胞から分化した細胞、若しくは前記BCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞からリプログラミングされたiPS細胞から分化した細胞、

は、変異CYP4V2遺伝子の影響を緩和するために遺伝的に修復される。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、iPS細胞へのリプログラミング前に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、iPS細胞へのリプログラミング後に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、幹細胞又はiPS細胞の分化前に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、幹細胞又はiPS細胞の分化後に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、遺伝子導入療法によって行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、遺伝子治療に関する請求項のいずれか一項に記載の任意の組成物又は方法を使用することにより、遺伝子導入療法によって行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、CRISPR遺伝子治療に関する請求項のいずれか一項に記載の任意の組成物又は方法を使用することにより、遺伝子編集によって行われる。

【0059】

別の態様では、BCDに罹患したかCYP4V2遺伝子に病的な遺伝的又はエピジェネティックな変化を有する対象における眼の疾患を治療又は予防する方法が提供される。そのような方法は、本明細書に記載のCYP4V2自家細胞組成物のいずれかを対象に投与することを含み、前記細胞組成物は、幹細胞由来の、網膜色素上皮(RPE)細胞、光受容体又は光受容体前駆細胞(PRC)、角膜上皮細胞(CEC)、脈絡膜内皮(CE)細胞、及び／又は対象の他の眼細胞を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、前記幹細胞は、iPC細胞、MSC、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である。いくつかの実施形態では、前記iPS細胞は、転写因子OCT4、SOX2、KLF4、及びc-MYCのうち1又は複数を使用してリプログラミングされる。いくつかの実施形態では、前記遺伝的に修復された細胞は、遺伝子修復を行う前と比較した、表2に示す1又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥CYP4V2核酸配列の増加；前記細胞内のCYP4V2ポリペプチドの量の増加；及び／又は細胞構造、細胞形態、細胞生存率、又は細胞機能の改善、の1又は複数を実証する。

【0061】

いくつかの実施形態では、投与される細胞の量は、1回の投与で約1,000～約1億個の細胞である。いくつかの実施形態では、前記投与は、注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜下注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、硝子体内注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜への直接注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、角膜注射によるものである。いくつかの実施形態では、投与は、前記対象の眼の網膜下の場所、後部

10

20

30

40

50

、又は角膜に細胞を効果的に送達するその他の任意の投与方法による。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液の注射によって前記細胞が投与される。いくつかの実施形態では、前記細胞は、シート、マトリックス、足場、又は組織の一部として投与される。

【0062】

いくつかの実施形態では、前記RPE細胞は、天然及び／又は合成の足場を使用して投与され、機能的なRPE単層を生成する。いくつかの実施形態では、前記対象は、ヒト対象である。

【0063】

眼疾患に対する遺伝的に修復された自家細胞療法

別の態様では、

(a) 変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞、又は

変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された幹細胞、又は

(b) 変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された幹細胞から分化した細胞、又は

変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞から分化した細胞、を含む細胞組成物が提供される。

【0064】

いくつかの実施形態では、前記対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞は、iPS細胞である。いくつかの実施形態では、前記iPS細胞は、前記対象の任意の組織の任意の細胞からリプログラムされる。いくつかの実施形態では、前記iPS細胞は、皮膚細胞、血液細胞、尿細胞、有毛細胞、線維芽細胞、末梢血単核細胞(PBMC)、腎上皮細胞、毛包、又は真皮乳頭細胞からリプログラミングされる。いくつかの実施形態では、前記対象から単離された幹細胞は、MSC、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である。

【0065】

いくつかの実施形態では、前記遺伝子は、眼の発達又は機能に関与する、及び／又は前記遺伝子の変異が眼疾患を引き起こすか眼疾患を引き起こす危険因子である。いくつかの実施形態では、前記遺伝子は、神経の発達又は機能に関与する、及び／又は前記遺伝子の変異が神経変性疾患を引き起こすか神経変性疾患を引き起こす危険因子である。いくつかの実施形態では、前記遺伝子は、シトクロムP450遺伝子である。いくつかの実施形態では、前記遺伝子は、表4に示す遺伝子である。

【0066】

いくつかの実施形態では、前記遺伝子は、

変異若しくは欠陥を有するCYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若

10

20

30

40

50

しくはCYP46Aの遺伝子、又は

不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子、を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、前記幹細胞から分化した細胞は、任意の種類の細胞である。いくつかの実施形態では、前記幹細胞から分化した細胞は、眼細胞である。いくつかの実施形態では、前記幹細胞から分化した細胞は、RPE細胞、PRC、網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、CEC、CE細胞、又は視神経細胞である。いくつかの実施形態では、前記幹細胞から分化された細胞は、iPS-RPE、iPS-PRC、iPS-CEC、又はiPS-CE細胞である。いくつかの実施形態では、前記幹細胞から分化された細胞は、ニューロンである。

【0068】

いくつかの実施形態では、

(i) iPSCヘリプログラミングするために使用される、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞、

(ii) 変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された幹細胞、又は

変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞からリプログラミングされたiPS細胞、又は

(iii) 変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された幹細胞から分化した細胞、又は

変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞からリプログラミングされたiPS細胞、

は、変異又は欠陥を有する遺伝子の影響を緩和するために遺伝的に修復される。

【0069】

いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、iPS細胞へのリプログラミング前に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、iPS細胞へのリプログラミング後に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、幹細胞又はiPS細胞の分化前に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、幹細胞又はiPS細胞の分化後に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、遺伝子導入療法によって行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、遺伝子治療に関する請求項のいずれか一項に記載の任意の組成物又は方法を使用することにより、遺伝子導入療法によって行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、遺伝子編集療法によって行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子修復は、CRISPR遺伝子治療に関する請求項のいずれか一項に記載の任意の組成物又は方法を使用することにより、遺伝子編集療法によって行われる。

【0070】

別の態様では、表4に記載の、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象において疾患を治療又は予防する方法が提供される。そのような方法は、典型的に、本明細書に記載の自家細胞組成物を対象に投与することを含み、前記細胞組成物は、前記対象の幹細胞由来の、網膜色素上皮（RPE）細胞、光受容体又は光受容体前駆細胞（PRC）、角膜上皮細胞（CEC）、ニューロン、脈絡膜内皮（CE）細胞、及び／又は他の眼細胞を含んでおり、前記細胞組成物中で前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子は遺伝的に修復済みである。

【0071】

さらに別の態様では、対象を自家治療する方法が提供される。そのような方法は、典型的に、

- (i) 眼疾患に罹患した対象からの細胞を準備すること、
 - (ii) 前記対象からの前記細胞に多能性を誘導してiPSCを生成すること、
 - (iii) 前記対象に由来する前記iPSCにおいて、表4に示される変異又は欠陥を有する遺伝子の1又は複数の変異を遺伝的に修復すること、
 - (iv) 前記iPSCを眼細胞に分化させること、
 - (v) 工程(iii)の代わりに、遺伝子導入療法によって前記iPSC-眼細胞を遺伝的に修復すること、及び
 - (vi) 前記iPSC-眼細胞を前記対象に導入し、それにより、前記眼疾患を有する前記対象を自家治療すること、
- を含む。

【0072】

いくつかの実施形態では、前記幹細胞は、iPC細胞、MSC、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である。いくつかの実施形態では、前記iPS細胞は、転写因子OCT4、SOX2、KLF4、及びc-MYCのうち1又は複数を使用してリプログラミングされる。いくつかの実施形態では、前記遺伝的に修復された細胞は、遺伝子修復を行う前と比較した、前記細胞内の非欠陥標的遺伝子核酸配列の増加；前記細胞内の前記標的遺伝子にコードされる機能的ポリペプチドの量の増加；前記細胞における細胞構造、細胞形態、又は細胞機能の改善；及び／又は細胞内の生化学的機能の改善若しくは正常化、の1又は複数を表す。いくつかの実施形態では、投与される細胞の量は、1回の投与で約1,000～約1億個の細胞である。

【0073】

いくつかの実施形態では、前記投与は、注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜下注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、硝子体内注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜への直接注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、角膜注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、前記対象の眼の網膜下の場所、後部、又は角膜に細胞を効果的に送達するその他の任意の投与方法による。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液の注射によって前記細胞が投与される。いくつかの実施形態では、前記細胞は、シート、マトリックス、足場、又は組織の一部として投与される。いくつかの実施形態では、前記RPE細胞は、天然及び／又は合成の足場を使用して投与され、機能的なRPE単層を生成する。いくつかの実施形態では、前記対象は、ヒト対象である。

【0074】

いくつかの実施形態では、前記疾患は、前記対象の遺伝的又はエピジェネティックな変化又は危険因子に関連している。いくつかの実施形態では、前記疾患は、光受容体変性、網膜色素上皮細胞変性、網膜変性、角膜変性、及び／又は脈絡膜障害である。いくつかの実施形態では、前記疾患は、遺伝性網膜変性（IRD）である。いくつかの実施形態では、前記疾患は、又は網膜色素変性症（RP）である。いくつかの実施形態では、前記疾患は、クリスタリン網膜症（BCD、Bietti結晶性角膜網膜ジストロフィーとしても

10

20

30

40

50

知られる)である。いくつかの実施形態では、前記疾患は、神経変性に関連している。いくつかの実施形態では、前記疾患は、角膜ジストロフィーである。いくつかの実施形態では、前記対象は、BCDに罹患しているかBCDを発症するリスクがある。

【0075】

いくつかの実施形態では、前記細胞は、線維芽細胞、血液細胞、又は眼細胞である。いくつかの実施形態では、前記細胞は、尿、毛、又は毛包から得られる。いくつかの実施形態では、前記眼細胞は、網膜色素上皮(RPE)細胞、角膜上皮細胞(CEC)、脈絡膜内皮(CE)細胞、又は光受容体細胞(PRC)である。

【0076】

いくつかの実施形態では、前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、変異、挿入、一塩基多型、不適当なメチル化、不適当な脱メチル化、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、変異である。いくつかの実施形態では、前記対象からの前記iPSC-眼細胞における前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、遺伝子編集を使用して遺伝的に修復済みである。いくつかの実施形態では、前記遺伝子編集法は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALENテクノロジー、又はCRISPRテクノロジーを利用している。いくつかの実施形態では、前記対象からの前記iPSC-眼細胞における前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、遺伝子導入を使用して遺伝的に修復済みである。いくつかの実施形態では、前記遺伝子導入法は、組換えAAVベクター又は別のウイルスベクター又は非ウイルスベクターを利用して、移植される前記細胞に前記標的遺伝子の健全なコピー(例えば、cDNA)を送達する。

【0077】

いくつかの実施形態では、前記投与工程は、疾患症状の発現前又は疾患症状の発現後に行われる。いくつかの実施形態では、投与は、眼又はニューロンを含む別の臓器若しくは組織に対するものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜下注射又は硝子体内注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜への直接注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、角膜注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、前記対象の眼の網膜下の場所、後部、又は角膜に細胞を効果的に送達するその他の任意の投与方法による。

【0078】

いくつかの実施形態では、前記方法は、投与又は移植の前に、前記細胞の遺伝子型分析を行って、表4に示す1又は複数の遺伝子の遺伝的又はエピジェネティックな変化の有無を確認することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、変異である。いくつかの実施形態では、前記変異は、前記CYP4V2核酸分子内にある。いくつかの実施形態では、前記方法は、投与前に、前記対象の眼を評価して、損傷した又は維持されている光受容体、網膜細胞、又は角膜細胞の領域及び程度を特定すること、をさらに含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、前記方法は、投与後に、前記対象をモニタリングすることをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記モニタリングには、非侵襲的網膜イメージング、角膜検査、視野測定、ERG、OCT、視力検査、及び/又は機能検査が含まれる。いくつかの実施形態では、前記モニタリングは、免疫応答について前記対象を評価することを含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、投与後に、前記対象の眼を評価して、損傷した又は維持されている光受容体、網膜細胞、又は角膜細胞の領域及び程度を特定すること、をさらに含む。

【0080】

細胞療法-RNPに関する請求

RNPに関する請求

別の態様では、

10

20

30

40

50

(a) 標的遺伝子(「標的遺伝子」)中又は標的遺伝子の隣接100bp以内にある核酸配列を(「標的配列」を)標的とするCRISPRガイドRNA、及び(b)機能的CRISPR関連タンパク質、を、リボ核タンパク質(RNP)又はタンパク質RNA複合体内に含む組成物が提供される。

【0081】

いくつかの実施形態では、前記組成物は、(c)前記標的遺伝子又はその一部の修正又は置換のための、前記標的遺伝子の野生型配列又は機能的配列の全部又は一部を含むドナー核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子は、眼の発達又は機能に関与する、及び／又は前記標的遺伝子の変異は眼疾患を引き起こすか眼疾患を引き起こす危険因子である。いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子は、神経の発達又は機能に関与する、及び／又は前記標的遺伝子の変異は神経変性疾患を引き起こすか神経変性疾患を引き起こす危険因子である。

10

【0082】

いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子は、シトクロムP450遺伝子である。いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子は、変異若しくは欠陥を有する、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする、表4に記載の遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、前記ドナー核酸配列は、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチド(ssODN)又はベクター中に提供される。

【0083】

いくつかの実施形態では、

20

(a)前記CRISPRガイドRNAは、(i)標的遺伝子内又は標的遺伝子の隣接100bp以内にある標的配列に相補的であるプロトスペーサーエレメント配列と、trans-activating crRNA(tracrRNA)の相補的な領域に対応する配列と、を含むCRISPR RNA(crRNA)、及び(ii)前記crRNAの対応する領域に相補的な領域と、CRISPR関連タンパク質9(Cas9)と相互作用する配列と、を含むtracrRNA、を含み、

(b)前記機能的CRISPR関連タンパク質はCas9を含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、前記プロトスペーサーエレメントは、約20塩基、約19塩基、約21塩基、約19~21塩基、約18~22塩基、又は約16~24塩基である。いくつかの実施形態では、前記crRNA及び前記tracrRNAは、異なる核酸分子内にある。いくつかの実施形態では、前記crRNA及び前記tracrRNAは、シングルガイドRNA(sgRNA)において組み合わせられている。いくつかの実施形態では、前記sgRNAは、約88~150bpである。

30

【0085】

いくつかの実施形態では、前記Cas9は、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)(SpCas9)、SpCas9ニッカーゼ(Cas9n D10A)、SpCas9(D1135E)、eSpCas9、SpCas9-HF1、SpCas9 VRER、SpCas9 VQR、SpCas9 EQR、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)(SaCas9)、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria Meningitidis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)、カンピロバクター・コリ(*Campylobacter coli*)、カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)、ストレプトコッカス・ミュータンズ(*Streptococcus mutans*)、パストレラ・ムルトシダ(*Pasteurella multocida*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)、バチルス・スミシー(*Bacillus smithii*)、トレポネーマ・デンティコーラ(*Treponema denticola*)、マイコプラズマ・カニス(*Mycoplasma*

40

50

ma canis)、及びエンテロコッカス・ファエカリス (enterococcus faecalis) から選択される Cas9 オーソログ又は変異体 Cas9 を含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、(a) 前記 CRISPR ガイド RNA は、標的遺伝子中又は標的遺伝子の隣接 100 bp 以内にある標的配列に相補的であるプロトスペーサーエレメント配列を含む crRNA を含み、(b) 前記機能的 CRISPR 関連タンパク質は Cpf1 を含む。いくつかの実施形態では、前記プロトスペーサーエレメントは、約 20 塩基、約 21 塩基、約 22 塩基、約 23 塩基、約 24 塩基、約 19～25 塩基、約 18～26 塩基、又は約 16～28 塩基である。いくつかの実施形態では、前記 CRISPR 関連タンパク質である Cas9 又は Cpf1 は、1、2、3 又はそれ以上の核局在化配列 (NLS) を N 末端及び／又は C 末端にさらに含む、及び／又は、非限定的な例として GFP 又は EGFP が挙げられる選択マーカーをさらに含む。

10

【0087】

いくつかの実施形態では、前記プロトスペーサーエレメントは、前記標的配列に 100 % 相補的であるか、標的配列に対応させると 1、2、3、4、又は 5 個のヌクレオチドミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、前記 crRNA 配列は、前記プロトスペーサーエレメントの直前に、前記 crRNA 配列に所望により追加された G ヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記 CRISPR ガイド RNA、crRNA、及び／又は tracrRNA、又は sgRNA は、化学修飾されている。

20

【0088】

いくつかの実施形態では、ドナー核酸配列は、ssODN で提供されるドナー核酸配列の場合、約 1 kb、約 800 bp、約 600 bp、約 500 bp、約 400 bp、約 300 bp、約 280 bp、約 260 bp、約 240 bp、約 220 bp、又は約 200 bp 以下であり、ベクターで提供されるドナー核酸配列の場合、約 30 kb、約 25 kb、約 20 kb、約 15 kb、約 10 kb、約 9 kb、約 8 kb、約 7 kb、約 6 kb、約 5 kb、約 4.5 kb、約 4 kb、約 3.5 kb、約 3 kb、約 2.5 kb、約 2 kb、約 1.5 kb、約 1 kb、約 0.5 kb、約 0.2 kb、又は約 0.1 kb 以下である。いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子の野生型バージョンは、酵素をコードする。

【0089】

いくつかの実施形態では、前記標的遺伝子は、
変異若しくは欠陥を有する、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、
若しくは CYP46A の遺伝子、又は

30

40

不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4

50

B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子、を含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、前記CRISPRガイドRNA、CRISPR関連タンパク質、及び／又は前記ドナー核酸配列を含む、1又は複数の成分は、当該成分に転写及び／又は翻訳できるベクター、DNA、及び／又はmRNAに別々に及び／又は追加的に提供されている。一態様では、本明細書に記載の組成物のいずれかを含む医薬製剤が提供される。

【0091】

別の態様では、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる対象の疾患を治療又は予防する方法が提供される。そのような方法は、本明細書に記載の組成物のいずれかを前記対象に投与することによってそのような遺伝子を破壊、修正、又は置換することを含む。

【0092】

別の態様では、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる対象の眼疾患を治療する又はこれに関連する危険因子を緩和する方法が提供される。そのような方法は、本明細書に記載の組成物のいずれかを前記対象に投与することによってそのような遺伝子を破壊、修正、又は置換することを含む。

【0093】

別の態様では、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる対象の神経変性疾患を治療する又はこれに関連する危険因子を緩和する方法が提供される。そのような方法は、本明細書に記載の組成物のいずれかを前記対象に投与することによってそのような遺伝子を破壊、修正、又は置換することを含む。

【0094】

別の態様では、変異若しくは欠陥を有するシトクロムP450遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードするシトクロムP450遺伝子、によって引き起こされる対象の疾患を治療する又はこれに関連する危険因子を緩和する方法が提供される。そのような方法は、本明細書に記載の組成物のいずれかを前記対象に投与することによってそのような遺伝子を破壊、修正、又は置換することを含む。

【0095】

いくつかの実施形態では、破壊、修正、又は置換される、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、表4に示す遺伝子の変異若しくは欠陥があるバージョン、又は表4に示す遺伝子の不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードするバージョンである。いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、線維芽細胞、血液、RPE、光受容体、網膜、角膜、脈絡膜、眼、視神経、ニューロン、若しくは幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の種類の細胞に存在する。

【0096】

いくつかの実施形態では、前記組成物は、線維芽細胞、血液、RPE、光受容体、網膜、角膜、脈絡膜、眼、視神経、ニューロン、若しくは幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の種類の細胞に送達される。いくつかの実施形態では、送達は、エレクトロポレーションにより、若しくは脂質媒介トランスフェクション、ヌクレオフェクション、ウイルス形質導入、若しくはインジェクション、又はそれらの組み合わせにより行われる。いくつかの実施形態では、前記CRISPRガイドRNA、CRISPR関連タンパク質、及び／又は前記ドナー核酸配列を含む、1又は複数の成分は、リボ核タンパク質又はタンパク質一

10

20

30

40

50

RNA複合体、ナノ粒子、リボソーム、ミセル、ウィロソーム、核酸複合体、及び／又はそれらの組み合わせからなる群から選択される送達システムを介して前記対象又は前記細胞に投与される。

【0097】

いくつかの実施形態では、前記治療は、対象に対してインビボで行われる。いくつかの実施形態では、前記治療は、インビトロで、線維芽細胞、血液、RPE、光受容体、網膜、角膜、脈絡膜、眼、視神経、ニューロン、若しくは幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の種類の細胞に対して行われる。いくつかの実施形態では、前記治療された細胞は、インビボで対象に移植される、又は前記治療された細胞が幹細胞である場合、該幹細胞は移植のための所望の種類の細胞に分化させられ、その後分化した細胞はインビボで対象に移植される。

10

【0098】

いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、置換される。いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子において、1又は複数の変異が修正又は置換される。いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、破壊される。

【0099】

いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子において、1～20、21～40、41～60、61～80、81～100、101～1000、又は1001～10000塩基対のヌクレオチド又は変異が破壊、修正、又は置換される。いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の領域が、破壊、修正、又は置換される。いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の約10、8、6、4、2、又は1 kb未満である領域が、破壊、修正、又は置換される。

20

【0100】

いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、ヌクレオチドの挿入及び／又は欠失によって破壊、修正、又は置換される。いくつかの実施形態では、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、片方又は両方のアレルにおいて破壊、修正、又は置換される。いくつかの実施形態では、2以上の異なるCRISPRガイドRNA、2以上の異なるCRISPR関連タンパク質、及び／又は2以上の異なるドナー核酸配列を使用して、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子における、1又は複数の変異若しくは欠陥を破壊、修正、又は置換する。

30

【0101】

いくつかの実施形態では、前記対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、前記対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、前記方法は、眼の発達又は機能を改善するか、眼、網膜、又は角膜の変性を予防する。いくつかの実施形態では、前記方法は、神経学的発達又は機能を改善するか、神経変性を予防する。いくつかの実施形態では、前記方法は、P450酵素の発現又は機能を改善する。

40

【0102】

いくつかの実施形態では、前記ドナー核酸配列に基づく相同組換え修復は、前記標的遺伝子のイントロン及び／又はエクソンを生じた。いくつかの実施形態では、前記ドナー核酸配列に基づく相同組換え修復は、前記標的遺伝子のスプライスアクセプターを生じた。その

50

ような方法は、さらに（c）変異又は変化された標的遺伝子又はその一部の生成のための、変異又は変化を有する表4に示す標的遺伝子の全部又は一部を含むドナー核酸配列を含む。

【0103】

いくつかの態様では、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子によって引き起こされる疾患の細胞疾患モデルを、そのような遺伝子に変異を作製することによって、作製する方法が提供される。そのような方法は、本明細書に記載の前記組成物のいずれかを介してそのような遺伝子の健康なバージョンを細胞へ送達することを含む。いくつかの実施形態では、送達は、エレクトロポレーションにより、若しくは脂質媒介トランスフェクション、ヌクレオフェクション、ウイルス形質導入、若しくはインジェクション、又はそれらの組み合わせにより行われる。いくつかの実施形態では、前記細胞は、線維芽細胞、血液、RPE、光受容体、網膜、角膜、脈絡膜、眼、視神経、ニューロン、若しくは幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の種類の細胞である。

【0104】

さらに別の態様では、表4に示す変異又は欠陥を有する遺伝子を有する細胞を含む組成物が提供される。

【0105】

別の態様では、本願の請求項のいずれか一項に記載の組成物を含む、変異又は欠陥を有する、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、又はCYP46Aの遺伝子を有する細胞を含む組成物が提供される。

【0106】

いくつかの実施形態では、前記ベクターはAAVベクターである。いくつかの実施形態では、前記プロトスペーサーエレメント配列は、配列番号48～52からなる群から選択されるか、配列番号48～52の一つと少なくとも80%の配列同一性を有し、CYP4V2遺伝子のc. 802-8__810del17insGC変異を標的とするために、NGGをプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）とするCasタンパク質と共に使用される。いくつかの実施形態では、前記ドナー核酸配列は、配列番号56及び57から選択されるか、配列番号56及び57のいずれか又はその相補的な配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、CYP4V2遺伝子のc. 802-8__810del17insGC変異を修正、破壊、又は置換するために使用される。

【0107】

遺伝子治療に関する請求

コドン最適化配列に関する請求

一態様では、ヒトCYP4V2タンパク質をコードする配列番号2の核酸配列又は前記配列番号2の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸分子が提供される。

【0108】

別の態様では、本明細書に記載の核酸分子と、その核酸配列に作動可能に連結された1又は複数の制御配列と、を含む発現カセットが提供される。さらに別の態様では、本明細書に記載の核酸分子又は本明細書に記載の発現カセットを含むベクターが提供される。

【0109】

いくつかの実施形態では、前記ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、前記ウイルスベクターは、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクター、組換え単純ヘルペスウイルスベクター、組換えセンダイウイルスベクター、及び組換えレトロウイルスベクターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記ベクターは組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクター又はプラスミドである。いくつかの実施形態では、前記ベクターはプラスミド又は非ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、前記非ウイルスベクターは、裸の（naked）核酸、リボソーム、デンドリマー、及びナノ粒子からなる群から選択される。

【0110】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載の任意の前記核酸分子及び／又は本明細書に記載の任意の前記組成物を含む。いくつかの実施形態では、前記宿主細胞は、細菌細胞、大腸菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、前記宿主細胞は、HEK293細胞、HeLa細胞、Vero細胞、V27細胞、A549細胞、K562細胞、B50細胞、WI38細胞、HepG2細胞、又はBHK細胞である。

【0111】

別の態様では、本明細書に記載の任意の核酸分子、本明細書に記載の任意の発現カセット、又は本明細書に記載の任意のベクターは、そのような核酸分子によってコードされる産物を発現するために、細菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳動物細胞、RPE細胞、光受容体又は光受容体前駆体（PRC）、網膜細胞、角膜細胞、眼細胞、ニューロン、神経細胞、血液細胞、上皮細胞、体細胞、iPS細胞、ES細胞、MSC、成体幹細胞、幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の細胞において使用される。

【0112】

EFS及び／又はSPAに関する請求

別の態様では、ポリペプチドをコードする核酸分子、干渉RNA分子、又はオリゴヌクレオチド、に作動可能に連結した伸長因子1 α 短（EFS）プロモーター及び／又はスモールポリアデニル化（ポリA）シグナル（SPA）を含む自己相補性アデノ随伴ウイルス（scAAV）ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、前記EFSプロモーターは、配列番号35の少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列からなり、前記SPAは、配列番号36の少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列からなる。

【0113】

いくつかの実施形態では、前記scAAVベクターは、前記核酸分子によってコードされる産物が細胞内で発現されるように、細胞に送達される。いくつかの実施形態では、前記細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、前記細胞は、網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、眼細胞、脳細胞、ニューロン、神経細胞、iPS細胞、ES細胞、MSC、幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の細胞である。

【0114】

一態様では、遺伝子治療において、ウイルスベクターに対する免疫応答を低下させて形質導入効率を維持し、及び／又は同じ遺伝疾患の様々な患者に対する治療効果を最大化する方法が提供される。そのような方法は、

（a）遺伝子治療のための標的細胞型において十分な形質導入効率を持つ複数の組換えウイルスベクター（例えば、rAAV）のプールを確立すること（前記ウイルスベクタープールは、前記疾患に関連する標的細胞（例えば、BCDに対するCYP4V2遺伝子治療におけるiPS-RPE細胞系）において十分な形質導入効率を有することが確認された抗原領域変異若しくは他の変異を有するバリエーション、又は前記ウイルスベクターのカプシドのバリエーション、を作製することにより拡大することができる。）；

（b）遺伝子治療を必要とする対象における様々なウイルスベクター血清型及び／又はカプシド変異又はバリエーションに対する既存の中和抗ウイルスベクター抗体（NAbs）を検出し、及び／又は上記対象に由来する患者特異的細胞（例えば、iPS-RPE細胞）に

10

20

30

40

50

において様々なウイルスベクターを試験及び比較すること；

(c) 前記ウイルスベクターのプールから、十分な形質導入効率を有し、対象の既存の N A b との最も低い交差反応性を有するウイルスベクター、及び／又は前記対象の患者特異的細胞における最良の表現型レスキュー結果を有するウイルスベクターを選択することであって、

該ウイルスベクターのプールは、様々な血清型及び／又はカプシド改変ウイルスベクター（例えば、カプシド変異体 A A V 及び／又はカプシドタンパク質バリエーション A A V を含むがこれらに限定されない）を含む、

前記選択すること；

(d) (c) から選択された前記ウイルスベクターを前記対象への投与に使用すること；及び

(e) 前記対象が遺伝子治療の投与を必要とするたびに、上記 (b) ～ (d) (既存の N A b に関連する部分のみ) を繰り返すこと（例えば、限定されるものではないが、同じ眼若しくは反対側の眼、又は別の臓器へのフォローアップ投与）、を含む。

【0115】

別の態様では、有効量のベクター及び医薬的に許容される担体を含む、対象の疾患を治療又は予防するための組成物が提供される。通常、前記ベクターは、制御配列に作動可能に連結された、非変異又は機能的 C Y P 4 V 2 タンパク質をコードする核酸分子又はその非病原性バリエーションを含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、前記疾患は、クリスタリン網膜症 (B C D、B i e t t i 結晶性角膜網膜ジストロフィーとしても知られる) である。いくつかの実施形態では、前記疾患は、前記対象の遺伝的又はエピジェネティックな変化に関連している。いくつかの実施形態では、前記疾患は、光受容体変性、網膜色素上皮細胞変性、網膜変性、角膜変性、又は脈絡膜変性である。いくつかの実施形態では、前記網膜変性は、網膜色素変性症 (R P) である。いくつかの実施形態では、前記網膜変性は、遺伝性網膜変性 (I R D) である。いくつかの実施形態では、前記疾患は、B C D である。いくつかの実施形態では、前記疾患は、角膜ジストロフィーである。いくつかの実施形態では、前記対象は、B C D に罹患しているか B C D を発症するリスクがある。

【0117】

一態様では、制御配列に作動可能に連結された、非変異又は機能的 C Y P 4 V 2 タンパク質をコードする核酸分子又はその非病原性バリエーションを含むベクターが提供される。

【0118】

いくつかの実施形態では、前記ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、前記ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター、及びレトロウイルスベクターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記 A A V は、組換え A A V (r A A V) である。いくつかの実施形態では、前記 r A A V は、A A V ゲノム又はその誘導体、及び／又は A A V カプシドタンパク質又はその誘導体を含む。いくつかの実施形態では、前記 r A A V は、キメラ A A V、シャッフル A A V、又はカプシド改変 A A V である。

【0119】

いくつかの実施形態では、前記 A A V ゲノム又は A A V カプシドタンパク質は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、又は A A V の別の天然由来の血清型、分離株、若しくはクレード (C l a d e)、又はそれらの誘導体若しくはハイブリッドのいずれか 1 つに由来する。いくつかの実施形態では、前記 r A A V は、偽型 A A V (例えば、A A V 2 / 5、A A V 2 / 8、A A V 2 / 1、A A V 2 / 4、A A V 2 / 6、A A V 2 / 7、A A V 2 / 12、A A V 2 / 10、及び A A V 2 / 9) である。いくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、前記 $rAAV$ は、ハイブリッド AAV （例えば、 $AAV-DJ$ 、 $AAV-DJ/8$ 、又は $AAV-DJ/9$ ）である。いくつかの実施形態では、前記 $rAAV$ は、定向進化法（*directed evolution*）及び／又は合理的設計法（*rational design*）（例えば、 $AAV-7m8$ 又は $AAV-PHP.B$ ）を通じて開発される。
【0120】

いくつかの実施形態では、前記 $rAAV$ は、1 又は複数のカプシド変異（例えば、 $Y-F$ 、 $K-R$ 、 $T-A$ 、 $S-A$ 及び／又は $T-V$ 変異（例えば、 $Y444F$ 、 $Y500F$ 、 $Y730F$ 、 $Y252F$ 、 $Y272F$ 、 $Y700F$ 、 $Y704F$ 、及び $T491V$ からの 1 又は複数のカプシド変異を有する $AAV2$ 、又は異なる AAV 血清型における対応する変異（例えば、 $AAV2/8$ （ $Y733F$ ）、 $AAV2$ （ $Y444F+Y500F+Y730F$ ）及び $AAV2$ （ $Y-F$ を 4 つ（ $quad Y-F$ ）+ $T-V$ ））を含む。いくつかの実施形態では、前記 $rAAV$ の血清型は、 $AAV1$ 、 $AAV2$ 、 $AAV3$ 、 $AAV4$ 、 $AAV5$ 、 $AAV6$ 、 $AAV7$ 、 $AAV8$ 、 $AAV9$ 、 $AAV10$ 、 $AAV11$ 、 $AAV12$ 、 $Anc80$ 、 $rh10$ 、及び $ShH10$ からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記 $rAAV$ ベクターは、 $AAV2/5$ 、 $AAV2/8$ 、 $AAV2/8$ （ $Y733F$ ）、 $AAV2$ （ $Y444F+Y500F+Y730F$ ）、 $AAV2/1$ 、 $AAV2/4$ 、 $AAV2/9$ 、 $AAV2/6$ 、 $AAV2/7$ 、 $AAV1$ 、 $AAV2$ 、 $AAV4$ 、 $AAV5$ 、 $AAV6$ 、 $AAV7$ 、 $AAV8$ 、 $AAV9$ 、 $AAV12$ 、 $Anc80$ 、 $AAV-7m8$ 、 $AAV-DJ$ 、 $ShH10$ 、 $AAV-PHP.B$ 又はそれらのハイブリッド、誘導体、若しくはバリエーションからなる群から選択される。

【0121】

いくつかの実施形態では、前記 $rAAV$ ベクターは、一本鎖 AAV ベクター又は自己相補的 AAV （*scAAV*）ベクターである。いくつかの実施形態では、前記ベクターは、プラスミド又は非ウイルスベクター（例えば、裸の（*naked*）核酸、リボソーム、デンドリマー、及びナノ粒子）である。

【0122】

いくつかの実施形態では、核酸配列によってコードされる非変異又は機能的 $CYP4V2$ タンパク質は、

(i) ヒト $CYP4V2$ タンパク質（配列番号 4）、

(ii) ヒト $CYP4V2$ タンパク質又は機能的 $CYP4V2$ タンパク質のバリエーション（例えば、アミノ酸の変化及び／又はスプライスバリエーション）（例えば、配列番号 5）、

(iii) 機能性 $CYP4V2$ タンパク質の 1 又は複数の断片（例えば、配列番号 6）、

(iv) 他の種の 1 又は複数の $CYP4V2$ オースログからの配列の全て又は一部、

(v) 非限定的な例として他の $CYP4$ タンパク質及び $CYP46A1$ が挙げられる、1 又は複数の他の $P450$ タンパク質からの配列の全て又は一部、

(vi) 患者の細胞（例えば、 BCD 患者の $iPS-RPE$ 細胞）の表 4 に挙げられている 1 又は複数の遺伝子の 1 又は複数の生化学的異常を改善、治療、又は阻止できるポリペプチド、及び／又は

(vii) 上記の組み合わせ、

を含む。

【0123】

いくつかの実施形態では、核酸配列によってコードされる非変異又は機能的 $CYP4V2$ タンパク質は、配列番号 4、5、又は 6 に示すアミノ酸配列の全部又は一部を含む。いくつかの実施形態では、前記核酸配列によってコードされる非変異又は機能的 $CYP4V2$ タンパク質は、 $CYP4V2$ 、 $CYP4A11$ 、 $CYP4A22$ 、 $CYP4B1$ 、 $CYP4F2$ 、 $CYP4F3$ 、 $CYP4F8$ 、 $CYP4F11$ 、 $CYP4F12$ 、 $CYP4F22$ 、 $CYP4X1$ 、 $CYP4Z1$ 、及び $CYP46A1$ （配列番号 4～18）及びそれらの誘導体、ハイブリッド、バリエーション及び／又は断片からなる群から選択されるアミノ酸配列の全部又は一部を含む。いくつかの実施形態では、前記核酸配列によってコードされる非変異又は機能的 $CYP4V2$ タンパク質は、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウ

シ、マウス、ラット、ニワトリ、カエル、ウマ、ウサギ、及びミバエの CYP4V2（又は CYP4V2 のオーソログ）（配列番号 19～29）及びそれらの誘導体、ハイブリッド、バリエーション及び／その断片からなる群から選択されるアミノ酸配列の全部又は一部を含む。

【0124】

いくつかの実施形態では、核酸配列にコードされる非変異又は機能的 CYP4V2 タンパク質は、配列番号 4～29 からなる群から選択される配列のいずれかに対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の配列同一性）を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、核酸配列によってコードされる非変異又は機能的 CYP4V2 タンパク質は、FxxGxxxCG 及び ExxR（配列番号 30 及び 31）の配列エレメントを含む。いくつかの実施形態では、非変異又は機能的 CYP4V2 タンパク質は、患者細胞（例えば、BCD 患者の iPS-RPE 細胞）の表 4 に挙げられている 1 又は複数の前記遺伝子の 1 又は複数の生化学的異常を改善、治療、又は阻止できる化合物又は薬剤である。

【0125】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、請求項 43～50 のいずれか一項に記載の非変異又は機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 4、5、又は 6 に示すアミノ酸配列を含む又は配列番号 4、5、又は 6 のいずれか 1 つと少なくとも 80% の配列同一性を有する非変異又は機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 に示す配列のいずれかと少なくとも 60% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 に示す配列のいずれかと少なくとも 70% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 に示す配列のいずれかと少なくとも 75% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 に示す配列のいずれかと少なくとも 76% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 に示す配列を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、前記制御配列はプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、RPE 細胞特異的プロモーター、網膜細胞特異的プロモーター、角膜細胞特異的プロモーター、眼細胞特異的プロモーター、又は構成的プロモーターである。いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、哺乳動物 β アクチンプロモーター又はウイルスプロモーターである。

【0127】

いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、CAG プロモーター（ハイブリッド CMV 初期エンハンサー／ニワトリ β アクチンプロモーター（CAGGS プロモーター、CB プロモーター又は CBA プロモーターとしても知られる））、ニワトリ β アクチンプロモーター、小型 CBA（smCBA）プロモーター、CB^{SB} プロモーター、又は CB^h プロモーター、その他の β アクチンプロモーター（例えば、ヒト β アクチンプロモーター）、伸長因子 1 α 短（EFS）プロモーター、伸長因子 1 α （EF-1 α ）プロモーター、CMV プロモーター、PGK プロモーター、UBC プロモーター、GUSB プロモーター、UCOE プロモーター、VMD2（卵黄状黄斑ジストロフィー 2；BEST1 としても知られる）プロモーター、RPE65 プロモーター、又はそれらのハイブリッド若しくは誘導体からなる群から選択される。

【0128】

いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、CAG プロモーター（ハイブリッド CMV 初期エンハンサー／ニワトリ β アクチンプロモーター（CAGGS プロモーター、CB プロモーター又は CBA プロモーターとしても知られる））、伸長因子 1 α 短（EFS

10

20

30

40

50

）プロモーター、伸長因子1 α 短（EF-1 α ）プロモーター、CMVプロモーター、又はそれらの誘導体若しくはハイブリッドである。いくつかの実施形態では、前記制御配列はエンハンサーを含む。

【0129】

いくつかの実施形態では、前記エンハンサーは、非限定的な例としてWPREエンハンサー、HPREエンハンサー、CTEエンハンサー又はそれらの誘導体若しくはハイブリッドが挙げられるウイルスエンハンサーである。いくつかの実施形態では、前記制御配列はポリアデニル化（ポリA）シグナルを含む。いくつかの実施形態では、前記ポリAシグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（bGHポリA）、スモールポリAシグナル（SPA）、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル（hGHポリA）、SV40ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル、又はそれらの誘導体若しくはハイブリッドである。いくつかの実施形態では、前記制御配列はコザック配列（配列番号37又は38）を含む。

10

【0130】

いくつかの実施形態では、前記組成物は、担体と、特定の投与経路に適した追加の成分とで製剤化されている。

【0131】

別の態様では、本明細書に記載のベクターのいずれかを含む宿主細胞が提供される。

【0132】

別の態様では、ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ベクターは、制御配列に作動可能に連結した、ヒトCYP4V2タンパク質又は機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸分子又はその非病原性バリエーションを含む、対象における眼の疾患を治療又は予防する方法が提供される。

20

【0133】

一態様では、ベクターを眼細胞へ送達することを含み、前記ベクターは、制御配列に作動可能に連結したヒトCYP4V2タンパク質又は機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸分子又はその非病原性バリエーションを含む、眼細胞の機能障害、ジストロフィー、障害、変性、萎縮及び／又は死滅を予防、阻止、進行遅延、又は改善するための方法が提供される。

【0134】

いくつかの実施形態では、前記疾患は、クリスタリン網膜症（BCD、Bietti結晶性角膜網膜ジストロフィー、Bietti結晶性網膜症、Bietti網膜ジストロフィーとしても知られる）である。いくつかの実施形態では、前記対象は、CYP4V2遺伝子の変異によって引き起こされる臨床的に定義される他の眼科的状態（例えば、遺伝性網膜変性（IRD）、網膜色素変性症（RP）、又は角膜ジストロフィー）を患っている。いくつかの実施形態では、前記眼の疾患は、光受容体変性、網膜色素上皮細胞変性、網膜変性、角膜ジストロフィー、又はBCD角膜変性である。

30

【0135】

いくつかの実施形態では、前記ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、前記ウイルスベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクター、組換え単純ヘルペスウイルスベクター、組換えセンダイウイルスベクター、及び組換えレトロウイルスベクターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記ウイルスベクターは、rAAVベクターである。いくつかの実施形態では、前記rAAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12のいずれかの血清型、又はAAVのその他の天然由来の血清型、分離株、若しくはクレード（Clade）、又はそれらのハイブリッド、バリエーション、若しくは誘導体からなる群から選択されるVP1、VP2、又はVP3カプシドタンパク質を含む。

40

【0136】

50

いくつかの実施形態では、前記 rAAVベクター5' AAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、又はAAVのその他の天然由来の血清型、分離株、若しくはクレード (Clade)、又はそれらの変異体、キメラ、バリエント、又は融合体のいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態では、前記 rAAVベクター3' AAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、又はAAVのその他の天然由来の血清型、分離株、若しくはクレード (Clade)、又はそれらの変異体、キメラ、バリエント、又は融合体のいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態では、前記 rAAVは、キメラAAV、シャッフルAAV、又はカプシド改変AAVである。いくつかの実施形態では、前記 rAAVは、偽型AAV (例えば、AAV2/5、AAV2/8、AAV2/1、AAV2/4、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/12、AAV2/10、及びAAV2/9) である。いくつかの実施形態では、前記 rAAVは、ハイブリッドAAV (例えば、AAV-DJ、AAV-DJ/8、又はAAV-DJ/9)。いくつかの実施形態では、前記 rAAVは、定向進化法及び/又は合理的設計法 (例えば、AAV 7m8又はAAV-PHP.B) を通じて開発される。

【0137】

いくつかの実施形態では、前記 rAAVは、1又は複数のカプシド変異 (例えば、Y-F、K-R、T-A、S-A及び/又はT-V変異 (例えば、Y444F、Y500F、Y730F、Y252F、Y272F、Y700F、Y704F、及びT491Vからの1又は複数のカプシド変異を有するAAV2、又は異なるAAV血清型における対応する変異 (例えば、AAV2/8 (Y733F)、AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F) 及びAAV2 (Y-Fを4つ (quad Y-F) +T-V))) を含む。いくつかの実施形態では、前記 rAAVの血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Anc80、rh10、及びShH10からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記 rAAVベクターは、AAV2/5、AAV2/8、AAV2/8 (Y733F)、AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F)、AAV2/1、AAV2/4、AAV2/9、AAV2/6、AAV2/7、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV12、Anc80、AAV 7m8、AAV-DJ、ShH10、AAV-PHP.B又はそれらのハイブリッド、誘導体、若しくはバリエントからなる群から選択される。

【0138】

いくつかの実施形態では、前記 rAAVベクターは、一本鎖AAVベクター又は自己相補的AAV (scAAV) ベクターである。いくつかの実施形態では、前記ベクターはプラスミド又は非ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、前記非ウイルスベクターは、裸の (naked) 核酸、リポソーム、デンドリマー、及びナノ粒子からなる群から選択される。

【0139】

いくつかの実施形態では、核酸配列によってコードされる非変異又は機能的CYP4V2タンパク質は、

- (i) ヒトCYP4V2タンパク質 (配列番号4)、
- (ii) ヒトCYP4V2タンパク質又は機能的CYP4V2タンパク質のバリエント (例えば、アミノ酸の変化及び/又はスプライスバリエント) (例えば、配列番号5)、
- (iii) 機能的CYP4V2タンパク質の1又は複数の断片 (例えば、配列番号6)、
- (iv) 他の種の1又は複数のCYP4V2オースログからの配列の全て又は一部、
- (v) 非限定的な例として他のCYP4タンパク質及びCYP46A1が挙げられる、1又は複数の他のP450タンパク質からの配列の全て又は一部、
- (vi) 患者の細胞 (例えば、BCD患者のiPS-RPE細胞) の表4に挙げられている1又は複数の遺伝子の1又は複数の生化学的異常を改善、治療、又は阻止できるポリ

10

20

30

40

50

ペプチド、及び／又は
(vii) 上記の組み合わせ
を含む。

【0140】

いくつかの実施形態では、核酸配列によってコードされる非変異又は機能的CYP4V2タンパク質は、配列番号4、5、又は6に示すアミノ酸配列の全部又は一部を含む。いくつかの実施形態では、核酸配列によってコードされる非変異又は機能的CYP4V2タンパク質は、CYP4V2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、及びCYP46A1（配列番号4～18）及びそれらの誘導体、ハイブリッド、バリエーション及び／又は断片からなる群から選択されるアミノ酸配列の全部又は一部を含む。

10

【0141】

いくつかの実施形態では、核酸配列によってコードされる非変異又は機能的CYP4V2タンパク質は、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ニワトリ、カエル、ウマ、ウサギ、及びミバエのCYP4V2（又はCYP4V2のオーソログ）（配列番号19～29）及びそれらの誘導体、ハイブリッド、バリエーション及び／又は断片からなる群から選択されるアミノ酸配列の全部又は一部を含む。いくつかの実施形態では、前記核酸配列にコードされる非変異又は機能的CYP4V2タンパク質は、配列番号4～29からなる群から選択される配列のいずれかに対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性）を有するポリペプチドを含む。

20

【0142】

いくつかの実施形態では、核酸配列によってコードされる非変異又は機能的CYP4V2タンパク質は、FxxGxxxCxG及びExxR（配列番号30及び31）の配列エレメントを含む。いくつかの実施形態では、非変異又は機能的CYP4V2タンパク質は、患者細胞（例えば、BCD患者のiPS-RPE細胞）の表4に挙げられている1又は複数の前記遺伝子の1又は複数の生化学的異常を改善、治療、又は阻止できる化合物又は薬剤である。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、請求項91～97のいずれか一項に記載の非変異又は機能的CYP4V2タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号4、5、又は6に示すアミノ酸配列を含む又は配列番号4、5、又は6のいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有する非変異又は機能的CYP4V2タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、前記機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号1、2、又は3に示す核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、前記機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号1、2、又は3のいずれかと少なくとも60%の配列同一性を有する。

30

【0143】

いくつかの実施形態では、前記制御配列はプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、RPE細胞特異的プロモーター、網膜細胞特異的プロモーター、角膜細胞特異的プロモーター、又は眼細胞特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、哺乳動物βアクチンプロモーター又はウイルスプロモーターである。

40

【0144】

いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、CAGプロモーター（ハイブリッドCMV初期エンハンサー／ニワトリβアクチンプロモーター（CAGGSプロモーター、CBプロモーター又はCBAプロモーターとしても知られる））、ニワトリβアクチンプロモーター、小型CBA（smCBA）プロモーター、CB^SBプロモーター、又はCB^hプロモーター、その他のβアクチンプロモーター（例えば、ヒトβアクチンプロモーター）、伸長因子1α短（EFS）プロモーター、伸長因子1α短（EF-1α）プロモーター

50

一、CMVプロモーター、PGKプロモーター、UBCプロモーター、GUSBプロモーター、UCOEプロモーター、VMD2（卵黄状黄斑ジストロフィー2；BEST1としても知られる）プロモーター、RPE65プロモーター、又はそれらのハイブリッド若しくは誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記プロモーターは、CAGプロモーター（ハイブリッドCMV初期エンハンサー／ニワトリβアクチンプロモーター（CAGGSプロモーター、CBプロモーター又はCBAプロモーターとしても知られる））、伸長因子1α短（EFS）プロモーター、伸長因子1α短（EF-1α）プロモーター、CMVプロモーター、又はそれらの誘導体若しくはハイブリッドである。

【0145】

いくつかの実施形態では、前記制御配列はエンハンサーを含む。いくつかの実施形態では、前記エンハンサーは、非限定的な例としてWPREエンハンサー、HPREエンハンサー、CTEエンハンサー、又はそれらの誘導体若しくはハイブリッドが挙げられる、ウイルスエンハンサーである。いくつかの実施形態では、前記制御配列はポリアデニル化（ポリA）シグナルを含む。いくつかの実施形態では、前記ポリAシグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（bGHポリA）、スモールポリAシグナル（SPA）、SV40ポリAシグナル、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル（hGHポリA）、SV40後期ポリAシグナル、又はそれらの誘導体若しくはハイブリッドである。いくつかの実施形態では、前記制御配列はコザック配列（配列番号37又は38）を含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、インビトロ治療のために、細胞あたり約 1×10^3 GC～約 1×10^6 GC（GC：ゲノムコピー、ゲノムを含むAAV粒子を測定する（ベクターゲノム（vg）又はゲノム粒子（gp）としても知られる））の量（MOI：感染多重度）で前記標的細胞への感染が行われる。いくつかの実施形態では、対象の眼へのインビボ投与のために、1回の投与は、約 1×10^6 GC～約 2×10^{13} GCのオーダー（例えば、約 1×10^{11} GC～約 1×10^{12} GCの高用量範囲、約 1×10^{10} GC～約 1×10^{11} GCの中用量範囲、約 1×10^9 GC～約 1×10^{10} GCの低用量範囲、約 1×10^6 GC～約 1×10^9 GCの超低用量範囲、及び約 1×10^{12} GC～約 2×10^{13} GCの超高用量範囲）で、又はこれらの範囲内の用量であってかつ所望の効果を提供するのに十分な任意の用量で実施することができる。

【0147】

いくつかの実施形態では、前記投与工程は、疾患症状の発現前又は疾患症状の発現後に行われる。いくつかの実施形態では、前記投与は、眼に対するものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜下注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、硝子体内注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜への直接注射によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、前記対象の網膜下の場所、眼の後部、角膜又はRPE細胞、光受容器細胞又は角膜上皮細胞へ前記ベクターを効果的に送達するその他の任意の投与方法による。

【0148】

いくつかの実施形態では、前記投与は、角膜送達によるものである。いくつかの実施形態では、前記眼への投与は、血流を介した送達によって達成される。いくつかの実施形態では、前記投与は、点眼によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、水晶体送達によるものである。いくつかの実施形態では、前記投与は、網膜下腔、角膜、水晶体、又は硝子体に行われる。いくつかの実施形態では、前記眼細胞は、網膜色素上皮（RPE）細胞、光受容器細胞（PRC）、角膜上皮細胞（CEC）、脈絡膜内皮（CE）細胞、網膜細胞、角膜細胞、水晶体細胞、神経節細胞、視神経細胞、及び／又は脈絡膜細胞、並びに幹細胞（例えば、iPSC、ES細胞、MSC、成体幹細胞、及び／又は組織特異的幹細胞が挙げられるがこれらに限定されない）に由来するこれらの種類の細胞からなる群から選択される。

【0149】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、BCDに罹患した又はBCDを発

10

20

30

40

50

症するリスクがある対象を特定することをさらに含んでもよい。

【0150】

C a s をコードする核酸配列を含む r A A V ベクターにおける E F S 及び／又は S P A の使用に関する請求

一態様では、C R I S P R 関連タンパク質 (C a s) をコードする核酸分子に作動可能に連結した、伸長因子 1 α 短 (E F S) プロモーター及び／又はスモールポリアデニル化 (ポリ A) シグナル (S P A) を含む組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ベクターを含む組成物が提供される。

【0151】

いくつかの実施形態では、前記 E F S プロモーターは、配列番号 35 の少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列からなり、前記 S P A は、配列番号 36 の少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列からなる。いくつかの実施形態では、前記 E F S プロモーター及び／又は前記 S P A に作動可能に連結された前記核酸配列にコードされる前記 C a s は、C a s 9 又は C p f 1 である。

【0152】

本明細書に記載の r A A V を含む宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態では、前記宿主細胞は、細菌細胞、大腸菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、前記細胞は体細胞又は幹細胞である。いくつかの実施形態では、前記宿主細胞は、網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、眼細胞、脳細胞、ニューロン、神経細胞、i P S 細胞、E S 細胞、M S C、成体幹細胞、組織特異的細胞、幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の細胞である。いくつかの実施形態では、前記 r A A V ベクターは、前記核酸分子によってコードされる C a s が細胞内で発現されるように、宿主細胞に送達される。いくつかの実施形態では、前記宿主細胞は、請求項 131 ~ 134 のいずれか一項に記載のいずれかの細胞を含む。

【0153】

本発明のその他の特徴及び利点は、発明を実施するための形態、図面の簡単な説明、及び実施例、並びに特許請求の範囲から明らかになるであろう。本明細書で言及される全ての出版物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、及びその他の参考文献は、その全体が参照により援用される。

【図面の簡単な説明】

【0154】

本発明は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない以下の図及び図面でさらに説明される。

【0155】

【図 1 A (i)】 B C D 患者由来の i P S 細胞系 (a) B C D 患者の皮膚生検試料の線維芽細胞から作製された i P S 細胞 (i) 患者 1 (P 1) i P S 細胞

【図 1 A (i i)】 B C D 患者由来の i P S 細胞系 (a) B C D 患者の皮膚生検試料の線維芽細胞から作製された i P S 細胞 (i i) 患者 2 (P 2) i P S 細胞

【図 1 A (i i i)】 B C D 患者由来の i P S 細胞系 (a) B C D 患者の皮膚生検試料の線維芽細胞から作製された i P S 細胞 (i i i) O c t - 4、S o x - 2、及び S S E A - 4 マーカーによる P 1 及び P 2 i P S 細胞系の特性評価

【図 1 A (i v)】 B C D 患者由来の i P S 細胞系 (a) B C D 患者の皮膚生検試料の線維芽細胞から作製された i P S 細胞 (i v) N a n o g 及び T r a - 1 - 6 0 マーカーによる P 1 及び P 2 i P S 細胞系の特性評価

【図 1 B (i)】 B C D 患者由来の i P S 細胞系 (b) 血液試料の末梢血単核細胞 (P B M C) 由来の B C D 患者及び健康な対照から作製された i P S 細胞：(i) i P S 細胞系の位相コントラスト画像

【図 1 B (i i)】 B C D 患者由来の i P S 細胞系 (b) 血液試料の末梢血単核細胞 (P B M C) 由来の B C D 患者及び健康な対照から作製された i P S 細胞：(i i) i P S 細胞系の A P 染色結果

10

20

30

40

50

【図1C】BCD患者由来のiPS細胞系(c)正常なヒト核型を示すとみられるBCD患者由来のiPS細胞核型画像

【図2A(i)】BCD患者由来のiPS-RPE細胞系(a)RPE特有の形態(六角形、色素沈着、及び単層)を示すBCD患者由来のiPS-RPE細胞系の明視野画像：(i)P1 iPS-RPE細胞

【図2A(ii)】BCD患者由来のiPS-RPE細胞系(a)RPE特有の形態(六角形、色素沈着、及び単層)を示すBCD患者由来のiPS-RPE細胞系の明視野画像：(ii)P2 iPS-RPE細胞

【図2B】BCD患者由来のiPS-RPE細胞系(b)RPE特異的マーカーであるRPE65、CRAI BP、及びMITFの存在を示す、BCD患者のiPS-RPE細胞のRPEマーカーの結果。

【0156】

【図3】iPS-RPE試料におけるCYP4V2発現のqRT-PCR結果。WT(対照)。WT AVG(対照の平均)。P1(BCD患者1)。P1-AAV8(AAV8・CYP4V2fvにより処置したP1試料、MOI=1.5×10⁴GC/細胞)

【0157】

【図4】iPS-RPE試料におけるCYP4V2op発現のqRT-PCR結果。WT(対照)。WT AVG(対照の平均)。P1及びP2(BCD患者1及び患者2)。P1-AAV2(AAV2・CYP4V2opで処置したP1試料、MOI=2×10⁴GC/細胞)。P2-AAV2(AAV2・CYP4V2opで処置したP2試料、MOI=2×10⁴GC/細胞)。P2-scAAV1(scAAV1・CYP4V2opにより処置したP2試料、MOI=2×10⁴GC/細胞)

【0158】

【図5A】青色光に暴露されていないiPS-RPE試料の細胞生存画像。WT(対照)。P1及びP2(BCD患者1及び患者2)。赤色(死細胞/病気の細胞)、緑色(生細胞/健康な細胞)。(a)赤色のみ

【図5B】青色光に暴露されていないiPS-RPE試料の細胞生存画像。WT(対照)。P1及びP2(BCD患者1及び患者2)。赤色(死細胞/病気の細胞)、緑色(生細胞/健康な細胞)。(b)赤色及び緑色

【図6A】青色光に1時間暴露後のiPS-RPE試料の細胞生存画像。WT(対照)。P1及びP2(BCD患者1及び患者2)。赤色(死細胞/病気の細胞)；緑色(生細胞/健康な細胞)。(a)赤色のみ

【図6B】青色光に1時間暴露後のiPS-RPE試料の細胞生存画像。WT(対照)。P1及びP2(BCD患者1及び患者2)。赤色(死細胞/病気の細胞)；緑色(生細胞/健康な細胞)。(b)赤色及び緑色

【0159】

遺伝子治療

【図7A】例示的なCYP4V2発現カセット及び組換えAAV(rAAV)ベクターの模式図及び注釈(a)一本鎖AAV(ssAAV)ベクターにパッケージ化されたCYP4V2発現カセット(エンハンサー付き)注釈：CYP4V2発現カセット(AAV ITRに隣接して示される)は、任意のAAV血清型又はそのハイブリッド若しくはバリエーションからのカプシドとともにrAAVベクターにパッケージ化することができる。ITR：inverted terminal repeat(末端逆位反復配列)(AAV2 ITR又は他のAAV血清型のITRである可能性がある)。例示的なAAV2 ITR配列を配列番号42及び配列番号43に示す。CYP4V2：ヒトCYP4V2タンパク質又はその機能的バリエーションをコードするcDNA、例えば、ヒトCYP4V2タンパク質(配列番号4)をコードするCYP4V2st(配列番号1)若しくはCYP4V2op(配列番号2)、又は機能的CYP4V2タンパク質(配列番号5)をコードするCYP4V2fv(配列番号3)。コザック配列(配列番号37又は配列番号38に示す配列)は、CYP4V2 cDNA配列の直前に挿入される。CAG：ハイブリッドCA

10

20

30

40

50

Gプロモーター（例示的な配列を配列番号32に示す）。非限定的な例としてCMVプロモーター（例示的な配列を配列番号40に示す）又はEF-1 α プロモーター（例示的な配列を配列番号41に示す）が挙げられる、本明細書に記載の他のプロモーターを使用してもよい。WPRE: woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element（ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント）（例示的な配列を配列番号33に示す）。bGHポリA: ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル（例示的な配列を配列番号34に示す）。SV40後期ポリAシグナル（例示的な配列を配列番号39に示す）など、代替のポリAシグナルを使用してもよい。EFS: elongation factor 1 α short (EFS) コアプロモーター（伸長因子1 α 短(EFS)コアプロモーター）。例示的な配列を配列番号35に示す。SPA: スモールポリAシグナル。例示的な配列を配列番号36に示す。変異体/切断型ITR: scAAVベクターで使用される2つのITRの1つは、変異体/切断型ITR (ITR*として表示) である。例示的な配列を配列番号44に示す。CYP4V2発現カセットでは、エンハンサーはオプションで存在する。

10

【図7B】例示的なCYP4V2発現カセット及び組換えAAV (rAAV) ベクターの模式図及び注釈 (b) 一本鎖AAV (ssAAV) ベクターにパッケージ化されたCYP4V2発現カセット (エンハンサーなし) 注釈: CYP4V2発現カセット (AAV ITRに隣接して示される) は、任意のAAV血清型又はそのハイブリッド若しくはバリエーションからのカプシドとともにrAAVベクターにパッケージ化することができる。ITR: inverted terminal repeat (末端逆位反復配列) (AAV2 ITR又は他のAAV血清型のITRである可能性がある)。例示的なAAV2 ITR配列を配列番号42及び配列番号43に示す。CYP4V2: ヒトCYP4V2タンパク質又はその機能的バリエーションをコードするcDNA、例えば、ヒトCYP4V2タンパク質 (配列番号4) をコードするCYP4V2 st (配列番号1) 若しくはCYP4V2 op (配列番号2)、又は機能的CYP4V2タンパク質 (配列番号5) をコードするCYP4V2 fv (配列番号3)。コザック配列 (配列番号37又は配列番号38に示す配列) は、CYP4V2 cDNA配列の直前に挿入される。CAG: ハイブリッドCAGプロモーター (例示的な配列を配列番号32に示す)。非限定的な例としてCMVプロモーター (例示的な配列を配列番号40に示す) 又はEF-1 α プロモーター (例示的な配列を配列番号41に示す) が挙げられる、本明細書に記載の他のプロモーターを使用してもよい。WPRE: woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element (ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント) (例示的な配列を配列番号33に示す)。bGHポリA: ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル (例示的な配列を配列番号34に示す)。SV40後期ポリAシグナル (例示的な配列を配列番号39に示す) など、代替のポリAシグナルを使用してもよい。EFS: elongation factor 1 α short (EFS) コアプロモーター (伸長因子1 α 短(EFS)コアプロモーター)。例示的な配列を配列番号35に示す。SPA: スモールポリAシグナル。例示的な配列を配列番号36に示す。変異体/切断型ITR: scAAVベクターで使用される2つのITRの1つは、変異体/切断型ITR (ITR*として表示) である。例示的な配列を配列番号44に示す。CYP4V2発現カセットでは、エンハンサーはオプションで存在する。

20

30

40

【図7C】例示的なCYP4V2発現カセット及び組換えAAV (rAAV) ベクターの模式図及び注釈 (c) 自己相補的AAV (scAAV) 又はssAAVベクターにパッケージ化されたCYP4V2発現カセット注釈: CYP4V2発現カセット (AAV ITRに隣接して示される) は、任意のAAV血清型又はそのハイブリッド若しくはバリエーションからのカプシドとともにrAAVベクターにパッケージ化することができる。ITR: inverted terminal repeat (末端逆位反復配列) (AAV2 ITR又は他のAAV血清型のITRである可能性がある)。例示的なAAV2 ITR

50

配列を配列番号 4 2 及び配列番号 4 3 に示す。 CYP4V2：ヒトCYP4V2タンパク質又はその機能的バリエーションをコードするcDNA、例えば、ヒトCYP4V2タンパク質（配列番号 4）をコードするCYP4V2 st（配列番号 1）若しくはCYP4V2 op（配列番号 2）、又は機能的CYP4V2タンパク質（配列番号 5）をコードするCYP4V2 fv（配列番号 3）。 コザック配列（配列番号 3 7 又は配列番号 3 8 に示す配列）は、CYP4V2 cDNA配列の直前に挿入される。 CAG：ハイブリッドCAGプロモーター（例示的な配列を配列番号 3 2 に示す）。非限定的な例としてCMVプロモーター（例示的な配列を配列番号 4 0 に示す）又はEF-1 α プロモーター（例示的な配列を配列番号 4 1 に示す）が挙げられる、本明細書に記載の他のプロモーターを使用してもよい。 WPRE：woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element（ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント）（例示的な配列を配列番号 3 3 に示す）。 bGHポリA：ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル（例示的な配列を配列番号 3 4 に示す）。SV40後期ポリAシグナル（例示的な配列を配列番号 3 9 に示す）など、代替のポリAシグナルを使用してもよい。 EFS：elongation factor 1 α short（EFS）コアプロモーター（伸長因子1 α 短（EFS）コアプロモーター）。例示的な配列を配列番号 3 5 に示す。 SPA：スモールポリAシグナル。例示的な配列を配列番号 3 6 に示す。 変異体／切断型ITR：scAAVベクターで使用される2つのITRの1つは、変異体／切断型ITR（ITR*として表示）である。例示的な配列を配列番号 4 4 に示す。 CYP4V2発現カセットでは、エンハンサーはオプションで存在する。

【図8A】青色光に1時間暴露後のBCD患者由来のiPS-RPE試料の細胞生存画像（AAV.CYP4V2処置なし vs. AAV2.CYP4V2 op又はscAAV1.CYP4V2 opによる処置（MOI=1 $\times$ 10⁵ GC／細胞））。P1及びP2（BCD患者1及び患者2）。赤色（死細胞／病気の細胞）；緑色（生細胞／健常な細胞）。（a）赤色のみ

【図8B】青色光に1時間暴露後のBCD患者由来のiPS-RPE試料の細胞生存画像（AAV.CYP4V2処置なし vs. AAV2.CYP4V2 op又はscAAV1.CYP4V2 opによる処置（MOI=1 $\times$ 10⁵ GC／細胞））。P1及びP2（BCD患者1及び患者2）。赤色（死細胞／病気の細胞）；緑色（生細胞／健常な細胞）。（b）赤色及び緑色

【図9A】青色光に1時間暴露後のBCD患者由来のiPS-RPE試料の細胞生存画像（AAV.CYP4V2処置なし vs. AAV5.CYP4V2 op、AAV5.CYP4V2 st、又はAAV8.CYP4V2 fvによる処置（MOI=1 $\times$ 10⁵ GC／細胞））。P1（BCD患者1）。赤色（死細胞／病気の細胞）；緑色（生細胞／健常な細胞）。（a）赤色のみ

【図9B】青色光に1時間暴露後のBCD患者由来のiPS-RPE試料の細胞生存画像（AAV.CYP4V2処置なし vs. AAV5.CYP4V2 op、AAV5.CYP4V2 st、又はAAV8.CYP4V2 fvによる処置（MOI=1 $\times$ 10⁵ GC／細胞））。P1（BCD患者1）。赤色（死細胞／病気の細胞）；緑色（生細胞／健常な細胞）。（b）赤色及び緑色

【図10A】青色光に1時間暴露後のBCD患者由来のiPS-RPE試料の細胞生存画像（AAV.CYP4V2処置なし vs. AAV5.CYP4V2 op、scAAV1.CYP4V2 op、又はscAAV5.CYP4V2 opによる処置（MOI=1 $\times$ 10⁴ GC／細胞））。P2（BCD患者2）。赤色（死細胞／病気の細胞）；緑色（生細胞／健常な細胞）。（a）赤色のみ

【図10B】色光に1時間暴露後のBCD患者由来のiPS-RPE試料の細胞生存画像（AAV.CYP4V2処置なし vs. AAV5.CYP4V2 op、scAAV1.CYP4V2 op、又はscAAV5.CYP4V2 opによる処置（MOI=1 $\times$ 10⁴ GC／細胞））。P2（BCD患者2）。赤色（死細胞／病気の細胞）；緑色（生細胞／健常な細胞）。（b）赤色及び緑色

胞／健全な細胞)。 (b) 赤色及び緑色

【図11A】青色光に1時間暴露後のBCD患者由来のiPS-RPE試料の細胞生存画像(AAV, CYP4V2処置なし vs. scAAV9, CYP4V2opによる処置(MOI=1×10⁵GC／細胞))。P1(BCD患者1)。赤色(死細胞／病気の細胞)；緑色(生細胞／健全な細胞)。 (a) 赤色のみ

【図11B】青色光に1時間暴露後のBCD患者由来のiPS-RPE試料の細胞生存画像(AAV, CYP4V2処置なし vs. scAAV9, CYP4V2opによる処置(MOI=1×10⁵GC／細胞))。P1(BCD患者1)。赤色(死細胞／病気の細胞)；緑色(生細胞／健全な細胞)。 (b) 赤色及び緑色

【図12】図12は、CYP4V2配列の領域、及びgRNA活性アッセイ用のc. 802-8__810del17insGC変異に対する設計されたガイドRNA(gRNA)とプライマー(オレンジ色の矢印)の位置を示す図である。

【図12-2】図12は、CYP4V2配列の領域、及びgRNA活性アッセイ用のc. 802-8__810del17insGC変異に対する設計されたガイドRNA(gRNA)とプライマー(オレンジ色の矢印)の位置を示す図である。

【図12-3】図12は、CYP4V2配列の領域、及びgRNA活性アッセイ用のc. 802-8__810del17insGC変異に対する設計されたガイドRNA(gRNA)とプライマー(オレンジ色の矢印)の位置を示す図である。

【図13】図13は、インビトロの調査又はアッセイを示す。レーン1：アンプリコン+Cas9；レーン2：アンプリコン+g1+Cas9；レーン3：アンプリコン+g2+Cas9；レーン4：アンプリコン+g3+Cas9；レーン5：アンプリコン+g4+Cas9；レーン6：アンプリコン+g5+Cas9；レーン7：アンプリコンのみ；M：1kb DNAマーカー。

【0160】

【図14】図14は、調査又はアッセイで使用するDNAの起点を確認する配列比較である。上：未処置アンプリコン；中：g2処置アンプリコンの断片；下：変異部位を示すCYP4V2遺伝子座。

【図14-2】図14は、調査又はアッセイで使用するDNAの起点を確認する配列比較である。上：未処置アンプリコン；中：g2処置アンプリコンの断片；下：変異部位を示すCYP4V2遺伝子座。

【図14-3】図14は、調査又はアッセイで使用するDNAの起点を確認する配列比較である。上：未処置アンプリコン；中：g2処置アンプリコンの断片；下：変異部位を示すCYP4V2遺伝子座。

【0161】

【図15】図15は、gRNAベクター構造を示す図である。

【図16】図16は、gRNA(例としてg1を使用)、Cas9、及びPuroR共発現プラスミドpX459-hSpCas9-2A-Puroのベクターマップを示す図である。

【図17】図17は、pX459-hSpCas9-2A-PuroプラスミドのU6プロモーターに対するgRNAの位置(例としてg1を使用)を示す図である。U6プロモーター及びgRNAの間の「G」ヌクレオチドは、U6プロモーターによって促進される転写効率を高めるためのものである。別のプロモーターを使用する場合、又はgRNAが「G」ヌクレオチドで始まる場合、これはオプションであり必要とは限らない。

【発明を実施するための形態】

【0162】

定義

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「1つ(の)」(「a」又は「an」)は、それが使用される文脈に応じて1又は複数を意味し得ることを理解されたい。したがって、例えば、「細胞(acell)」に言及する場合、「少なくとも1つの細胞」又は「複数の細胞」を意味し得る。

10

20

30

40

50

【0163】

用語「約」若しくは「およそ」又は記号「 $\approx$ 」は、所与の値又は状態の $\pm 10\%$ （端点を含む）の範囲内を指す。文脈からそうでないことが明らかでない限り、本明細書で提示される全ての数値は、「約」という用語によって修飾され得る。

【0164】

「AAV、CYP4V2」という用語は、機能的CYP4V2タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを指す。

【0165】

「CYP4V2 遺伝子治療」という用語は、機能的CYP4V2タンパク質又は機能的CYP4V2タンパク質をコードするポリヌクレオチドの細胞及び／又は対象への導入を指す。本開示の詳細な説明を参照のこと。

10

【0166】

「有効量」、「有効投与量」、又は「治療有効投与量」という用語は、治療を必要とする対象に投与した場合に、その治療を行うのに充分及び／又は適切な化合物（例えば、ベクター）及び／又は細胞の量を指す。有効量は、使用される治療薬の特定の活性、患者の病状の重症度、並びに対象の年齢、体調、その他の病状の存在、及び栄養状態に応じて異なるであろう。さらに、患者が受けている可能性のあるその他の薬物療法及び／又は治療は、投与する治療薬の有効量の決定に影響を与えるであろう。さらなる詳細については、本明細書の記載を参照のこと。

【0167】

20

「治療」又は「治療する」という用語は、本明細書に開示される組成物（例えば、導入遺伝子を含むAAV、及び／又は細胞）の以下を含む目的のための対象への投与を指す：

- 1) 疾患又は状態に対して予防又は保護する、つまり、臨床症状を発症させないこと、
- 2) 疾患又は状態を阻害する、すなわち、臨床症状の発現を阻止、減速、改善、又は抑制すること、
- 3) 疾患又は状態を緩和する、すなわち、臨床症状を軽減すること、及び／又は
- 4) 罹患細胞、組織、及び／又は臓器の機能喪失を置換及び／又は回復させること。

いくつかの実施形態では、「治療」又は「治療する」という用語は、疾患又は状態を緩和すること、つまり、臨床症状を軽減することを指す。いくつかの実施形態では、「治療」又は「治療する」という用語は、上記に代えて又は上記に加えて、治療を必要とする対象の予防的治療を指す。予防的治療は、病気に苦しむリスクのある対象に適切な用量の治療薬を提供することにより達成することができ、それにより病気の発症を実質的に回避することができる。1又は複数の最終的に誘導されるイベントは不明又は潜在的であるか、1又は複数のイベントの発生後しばらくの間患者において確認されない可能性があるため、「予防」及び「抑制」を常に区別できるわけではないことを当業者は理解するであろう。したがって、本明細書で使用される「予防」という用語は、「治療」の要素として、本明細書で定義される「予防」及び「抑制」の両方を包含することが意図されている。

30

【0168】

「対象」という用語は、動物、例えば哺乳動物（ヒトなど）を指す。本明細書に記載の方法は、ヒトの治療、前臨床、及び獣医学の用途に有用であり得る。いくつかの実施形態では、前記対象は哺乳動物であり、いくつかの実施形態では、前記対象はヒトである。

40

【0169】

「バリエーション」とは、生物活性タンパク質の治療的及び／又は生物学的活性の少なくとも一部を保持する基準となる生物活性タンパク質と配列相同性を有するタンパク質である。例えば、バリエーションタンパク質は、基準となる生物活性タンパク質に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有し得る。「生物活性タンパク質」という用語には、例えば、部位特異的変異誘発、挿入、又は偶然の変異によるなど、意図的に改変されたタンパク質が含まれる。「バリエーション」には、治療的及び／又は生物学的活性の少なく

50

とも一部を保持する天然又は非天然の生物活性タンパク質の切断型である「断片」が含まれる。

【0170】

用語「核酸」は、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）を含む、核酸、ポリヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチドの全ての形態を指すために本明細書で使用される。核酸には、ゲノムDNA、cDNA、及びRNAが含まれる。ポリヌクレオチドには、天然、合成、及び意図的に修飾又は改変されたポリヌクレオチドが含まれる。ポリヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、若しくは三本鎖、線形若しくは円形であり得、任意の長さであり得る。特定のポリヌクレオチドの配列又は構造は、5'から3'方向の配列を提示する慣例に従って本明細書に記載され得る。

10

【0171】

「配列バリエーション」という用語は、1又は複数のヌクレオチド又はアミノ酸の挿入、欠失、及び／又は置換により、天然又は元の配列と比較して改変された遺伝子又はポリペプチドを意味する。挿入は、遺伝子又はタンパク質の一方又は両方の末端に位置してもよく、及び／又はヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の内部領域内に配置してもよい。欠失バリエーションでは、本明細書に記載の遺伝子又はポリペプチドの1又は複数のヌクレオチド又はアミノ酸残基が除去される。置換バリエーションでは、遺伝子又はポリペプチドの1又は複数のヌクレオチド又はアミノ酸残基が除去され、代替残基に置換される。一態様では、置換は本質的に保存的であり、この種類の保存的置換は当技術分野で周知である。

20

【0172】

本明細書で使用される場合、「療法（therapy）」又は「治療（treatment）」という用語は、インビボで対象に適用してもよく、又はインビトロで細胞に適用してもよい。

【0173】

本明細書で使用される場合、プラスミドはベクターの一種である。

【0174】

本明細書で使用される用語「遺伝的に修復された」又は「遺伝子修復」とは、もともと遺伝子の遺伝的欠陥（例えば、変異又は病的変化）を有する細胞であって、その遺伝的欠陥が、細胞のゲノムDNA又はmRNAにおける遺伝子修正又は破壊（本明細書では「遺伝子編集」、「遺伝子編集療法」、又は「遺伝子修正」と定義）、又は欠陥遺伝子に相当する機能的タンパク質を発現する細胞への外因性核酸分子による遺伝子導入又は補充（本明細書では「遺伝子導入療法」又は「遺伝子治療」と定義される）のいずれかにより修復されている細胞をいう。

30

【0175】

本明細書で使用される「パーセント配列同一性」又は「配列同一性」という用語は、次のように決定及び計算されるものとする。（パーセント）配列同一性の計算では、2つの配列が整列（アラインメント）され、2つの配列間のヌクレオチド又はアミノ酸残基の完全な一致の数が決定される。完全な一致の数は、整列領域の長さ（つまり、整列したヌクレオチド又はアミノ酸残基の数）で除算され、100を掛けてパーセント配列同一性値とする（そして、次に大きい整数に切り上げられる（例えば、65.01%は66%に切り上げられ、本明細書の目的では66%と見なされる）。整列領域の長さは、片方又は両方の配列の一部であり得、短い方の配列の正味の全長（ギャップを適用しない）のサイズまでであり得ることが理解されよう。完全な一致を決定し、2つのタンパク質コード化ヌクレオチド配列間の配列同一性を計算するには、アラインメント用の2つの配列を提出し配列同一性を計算する前に、非コード化ヌクレオチド配列（例えば、限定されるものではないが、イントロン、UTR、コザック配列、プロモーター、エンハンサー、又は他の制御配列）が削除される。Needleman-Wunschアルゴリズム（The European Bioinformatics Institute（EMBL-EBI）及びWorld Wide Webにおいて入手可能：ヌクレオチドのアラインメントにはebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html、タンパク質のアラインメントに

40

50

は`ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/`)を用い、またデフォルトのパラメーター（ヌクレオチド配列用）：

```
Matrix: EDNAFULL.  
Gap Open Penalty: 10.  
Gap Extend Penalty: 0.5.  
Output format: pair.  
End Gap Penalty: false.  
End Gap Open Penalty: 10.  
End Gap Extend Penalty: 0.5.
```

タンパク質配列用：

```
Matrix: EBLOSUM62.  
Gap Open Penalty: 10.  
Gap Extend Penalty: 0.5.  
Output format: pair.  
End Gap Penalty: false.  
End Gap Open Penalty: 10..  
End Gap Extend Penalty: 0.5.)
```

を用いて、2つの配列の最適なグローバルアラインメントを作成する `Pairwise Sequence Alignment EMBOS Needle` を使用して、2つの配列間のヌクレオチド又はアミノ酸残基の完全な一致の数を決定する2つの配列のアラインメントを実行することができる。

【0176】

「アデノ随伴ウイルスベクター」という用語は、例えば `AAV1`、`AAV2`、`AAV3`、`AAV4`、`AAV5`、`AAV6`、`AAV7`、`AAV8`、`AAV9`、`AAV10`、`AAV11`、`AAV12` 血清型、又は `AAV` 血清型のカプシドタンパク質に対してカプシドタンパク質配列相同性を有する他のウイルス又は血清型などの任意の `AAV` 血清型に由来する核酸を指す。「組換えアデノ随伴ウイルス」又は「`rAAV`」という用語は、`AAV` `ITR` が片側又は両側に隣接した目的の核酸分子をカプセル化した `AAV` タンパク質シェルで構成される感染性の複製欠損ウイルスを指す。本明細書で使用される特定の `AAV` 血清型への言及は、その `AAV` 血清型の少なくとも1つのカプシドタンパク質を有する `AAV` を意味する。例えば、用語「`AAV2`」は、少なくとも1つの `AAV` 血清型2カプシドタンパク質を有する `AAV` を指す。

【0177】

「`CYP4V2`」という用語は、シトクロム `P450 4V2` 又はシトクロム `P450`、ファミリー4、サブファミリーV、ポリペプチド2（場合により `CYP4A1` と称する）、及び他の種におけるそのオースログを指す。`CYP4V2` の変異は `BCD`（例えば、Li et al., Am J Hum Genet. 74:817-826, 2004を参照）及び網膜色素変性症（例えば、Wang et al., PLOS ONE 7:e33673, 2012を参照）と関連している。全長ゲノムヒト `CYP4V2` 遺伝子の長さは約22,053 bpであり、例えば、`World Wide Web` 上（`genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP4V2&keywords=CYP4V2`）で確認できる。本明細書で使用される「`hCYP4V2`」という用語は、ヒト `CYP4V2` 遺伝子又はタンパク質を指す。`hCYP4V2` 及び `CYP4V2` は、遺伝的又はエピジェネティックな変化を含む遺伝子又はタンパク質、又は遺伝的又はエピジェネティックな変化を含まない遺伝子又はタンパク質を指し得ることが理解されるであろう。

【0178】

本明細書で使用される「機能的 `CYP4V2`」という用語は、発現すると、個体（例えば、`CYP4V2` 分子に遺伝的又はエピジェネティックな変化を有する個体）に対して治療的利益（例えば、標的細胞内の異常な脂肪酸レベル（`DHA` レベルなど）を改善又はレスキュー（救済）する）を提供するのに有効なタンパク質を産生するタンパク質又はヌクレオチド分子を指す。機能的 `CYP4V2` 分子は、野生型 `hCYP4V2` 配列若しくはそ

10

20

30

40

50

の天然に存在するバリエーション（例えば、病的変化を含まないバリエーションなどの多型バリエーション）、又は最適化された配列に相当し得る。いくつかの実施形態では、機能的 CYP4V2 分子は、ヒト CYP4V2 と同様のオーソロジーを共有する別の種（例えば、げっ歯類、ウサギ、犬、豚、又は非ヒト霊長類などの別の哺乳類）の CYP4V2 分子である。例えば、ヒト CYP4V2 配列のオーソログはマウス mCyp4v3 配列である。いくつかの実施形態では、機能的 CYP4V2 分子は別の P450 分子である（例えば、CYP4タンパク質）。

【0179】

「眼細胞」という用語は、任意の眼の細胞又は眼機能に関連する細胞を指し、非限定的な例として、網膜細胞、網膜双極細胞、光受容体細胞又は光受容体前駆細胞（桿体及び／又は錐体を含み、「PRC (photoreceptor progenitor cell)」と総称される）、神経節細胞、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium (RPE)) 細胞、脈絡膜上皮 (choroidal epithelial (CE)) 細胞、角膜上皮細胞 (corneal epithelium cell (CEC))、脈絡膜細胞、角膜細胞、又は視神経細胞が挙げられる。

【0180】

「機能喪失 (function loss)」又は「機能不全 (dysfunction)」という用語は、正常な非罹患細胞、又は他方の眼若しくはより早い時点における同じ眼と比較した、細胞機能（例えば、光受容体機能、光受容体細胞機能、網膜色素上皮細胞機能、水晶体機能、脈絡膜機能、又は角膜機能）の低減又は喪失を指す。本明細書で 사용되는「変性 (degeneration)」、「萎縮 (atrophy)」、「障害 (disorder)」、「疾患 (disease)」、及び／又は「ジストロフィー (dystrophy)」という用語は、機能喪失と同義的に使用することができる。「機能増進」という用語は、罹患している眼（同じ眼疾患を有する）、より早い時点での同じ眼、同じ眼の未治療部分、又は同じ患者の反対側の眼と比較して、機能（例えば、光受容体、光受容体細胞、網膜色素上皮細胞、脈絡膜細胞、又は角膜細胞の機能）を改善する、又は機能的な光受容体若しくは光受容体細胞（例えば、光受容体細胞、網膜色素上皮細胞、脈絡膜細胞、又は角膜細胞）の数又は割合を増やすことを意味する。

【0181】

「導入遺伝子」という用語は、細胞又は生物に導入されることを意図した又は導入されたドナー核酸を指す。導入遺伝子には、表 4 に示す遺伝子又は cDNA など、任意の遺伝子が含まれる。

【0182】

「医薬的に許容可能な製剤」、「生理学的に許容可能な製剤」、及び「医薬的に許容可能な担体」という用語は、インビボ送達、インビトロ送達又は接触において、1 又は複数の投与経路に適した、気体、液体、固体、又はそれらの混合物であってもよい生物学的に許容可能な製剤を意味し、他の疾患の治療（例えば、他の眼疾患の遺伝子治療又は細胞療法）に使用される製剤又は担体を含んでもよい。「医薬的に許容される」又は「生理学的に許容される」組成物は、生物学的又はその他の点で望ましくないものではない物質であり、例えば、このような物質は、実質的に望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく対象に投与可能である。したがって、そのような医薬組成物は、例えば、タンパク質、ポリヌクレオチド、プラスミド、ウイルスベクター、又はナノ粒子を細胞又は対象に投与する際に使用され得る。そのような組成物としては、限定されるものではないが、医薬品投与、又はインビボ若しくはインビトロでの接触又は送達に適合しうる、溶媒（水性又は非水性）、溶液（水性又は非水性）、エマルジョン（例えば、水中油又は油中水）、懸濁液、シロップ、エリキシル、分散媒、懸濁媒体、コーティング、等張剤、及び吸収促進剤又は吸収遅延剤が挙げられる。水性及び非水性の溶媒、溶液、及び懸濁液には、懸濁化剤、潤滑剤、及び増粘剤が含まれてもよい。そのような医薬的に許容される担体には、錠剤（コーティング又は非コーティング）、カプセル（ハード又はソフト）、マイクロビーズ、粉末、顆粒、及び結晶が含まれる。補助的な活性化化合物（例えば、防腐剤、抗菌剤、抗

10

20

30

40

50

ウイルス剤、抗真菌剤、及び免疫抑制剤）を組成物に組み込んでもよい。医薬組成物は、本明細書に記載の又は当業者に周知の、特定の投与又は送達経路に適合するように製剤化してもよい。したがって、医薬組成物は、様々な経路による投与に適した担体、希釈剤、又は賦形剤を含む。

【0183】

「crRNA」という用語はCRISPR RNAを指し、これはプロトスペーサーエレメントと、tracrRNAに相補的な追加のヌクレオチドと、の両方を含む。

【0184】

「tracrRNA」という用語はtransactivating RNAを指し、これはcrRNAにハイブリダイズし、Cas9タンパク質に結合し、複合体を活性化して、ゲノム配列内の特定の部位に二本鎖切断を生じる。

【0185】

「sgRNA」という用語はシングルガイドRNAを指し、これはcrRNAとtracrRNA（これらはS. pyogenesの天然のCRISPR/Cas9システムにおいては別個の分子である）を一つのRNAコンストラクト中に結合したものである。

【0186】

用語「PAM」は「プロトスペーサー隣接モチーフ」（protospacer adjacent motif）を指し、これは切断部位としてCRISPRヌクレアーゼにより認識される、ゲノムのいずれかの鎖における短い配列である。PAMはヌクレアーゼ（例えば、Cas9、Cpf1など）によって異なる。プロトスペーサーエレメント配列は通常、PAM部位のすぐ上流にある。

【0187】

「プロトスペーサーエレメント」（「ガイドRNA」、「CRISPR gRNA」、「gRNA」、又はg1、g2、g3、g4、g5などとも称される）という用語は、ゲノムDNA標的配列に相補的である、crRNA（又はsgRNA）の一部を指す。

【0188】

DHA：ドコサヘキサエン酸；22：6（ ω -3）又はC22：6 n3としても知られる多価不飽和オメガ3脂肪酸

【0189】

AA：アラキドン酸；20：4（ ω -6）若しくはC20：4 n6、又はARAとしても知られる多価不飽和オメガ6脂肪酸

【0190】

PBS（+）：カルシウム及びマグネシウムを含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）

【0191】

PBS（-）：カルシウム又はマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水（PBS）

【0192】

BCD細胞疾患モデルのための方法及び組成物

適切なBCD疾患モデルを開発し、BCDの分子レベルの表現型を確認することは、BCDに関連したBCD用薬剤及び治療オプションの研究、開発、及び試験にとって重要である。これはCYP4V2機能の研究にとっても重要である。本明細書の背景技術のセクションで概説したように、BCDの臨床表現型は80年前から特性化、確立、研究されており、BCDを生じる遺伝子変異は10年以上にわたって同定されてきた。しかし、臨床表現型（例えば、BCD患者の網膜の結晶様沈着物）とその原因となるCYP4V2変異との間にはまだギャップがある。

【0193】

BCDに関する以前の研究では、線維芽細胞、リンパ球、及び血清などにおいて、異常な脂肪酸レベルがBCD患者に認められている。例えば、Lee et al., The Metabolism of Fatty Acids in Human Bietti Crystalline Dystrophy, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Jul;42(8):1707-14では、研究者はパルスチェイス法を使用して、BCD患者の線維芽細胞及びリンパ球の異常を研究した。BCD患者及び正常対照の線維芽細胞及

10

20

30

40

50

びリンパ球が、 $[(14)C] 18:3n-3$ 又は $[(14)C] 18:2n-6$ と共にインキュベートされた。BCD患者の線維芽細胞では、 $18:3n-3$ の多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid (PUFA)) への変換が正常な被験者よりも低かったが、 $18:2n-6$ にはこれが当てはまらなかった。別の研究 (Lai et al., Alterations in Serum Fatty Acid Concentrations and Desaturase Activities in Bietti Crystalline Dystrophy Unaffected by CYP4V2 Genotypes, Invest Ophthalmol Vis Sci 2010;51:1092-7) では、研究者はGC-MSを使用して、BCD患者及び対照の血清試料中の血清脂肪酸濃度を分析した。この研究により、BCD患者の血清中のオクタデカン酸 ($18:0$) の濃度は対照被験者よりも高く、オクタデカジエン酸 ($18:1n-9$) の濃度は対照被験者よりも低いことが判明した。さらに、BCDの一価不飽和脂肪酸の総濃度は、対照よりも有意に低かった。BCD患者試料は研究対象として使用されていない別の研究 (Nakano et al., CYP4V2 in Bietti's Crystalline Dystrophy: Ocular Localization, Metabolism of omega-3-Polyunsaturated Fatty Acids, and Functional Deficit of the p.H331P Variant, Mol Pharmacol 82:679-686, 2012) の結果では、CYP4V2酵素がオメガ3-PUFAに対するオメガヒドロキシラーゼ活性を有することが示唆された。

【0194】

BCD患者の線維芽細胞及び血清に見られる異常な脂肪酸レベルが、BCDの原因となる細胞であるBCD患者のRPE細胞に実際に存在するかどうかを確認することは重要である。したがって、BCD疾患の病態及びCYP4V2機能の理解を深め、治療オプションの有効性を評価するために、BCD患者のRPE細胞を直接調べることを可能とするBCD疾患モデルが望まれる。しかしながら、RPEの位置及びBCDの希少性を考慮すると、BCD患者からネイティブなRPE細胞を得ることは実際的ではない。

【0195】

本開示は、BCD細胞モデル及びBCD細胞モデルを生成する方法を提供する。BCD細胞モデルは、BCD患者特異的幹細胞 (非限定的な例として、人工多能性幹細胞 (iPSC)、胚性幹 (ES) 細胞、体性 (又は成人) 幹細胞、間葉系幹細胞 (MSC) が挙げられる) 及びBCD患者の任意の幹細胞に由来する、眼細胞 (非限定的な例として、RPE細胞、光受容体 (桿体又は錐体) 細胞、光受容体前駆細胞、角膜上皮細胞、水晶体細胞及び/又は脈絡膜細胞が挙げられる) からなる。患者特異的幹細胞に加えて、BCDを有しない個体の細胞に人工CYP4V2変異を作製することにより、BCD細胞モデルを生成することも可能であり、そのような細胞は、ES細胞、iPS細胞、若しくは他の幹細胞、又は幹細胞にリプログラミング可能な任意の細胞若しくは任意の眼細胞 (幹細胞由来又は非由来のいずれであってもよい) であり得る。

【0196】

人工多能性幹細胞技術は、動物モデルに代わる疾患モデリングの代替手段を提供する。ただし、全ての疾患がiPSCを使用してモデル化に成功しているわけではない (Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q. & Benvenisty, N. Differential Modeling of Fragile X Syndrome by Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 6, 407-411 (2010))。さらに、BCDに関連する報告された脂肪酸同化を考慮すると、BCDの患者特異的iPS細胞又は患者特異的iPS-RPE細胞がiPS技術によって作製可能かどうかは不明であった。

【0197】

A. 多能性の誘導

人工多能性幹細胞 (iPSC) を作製する方法は、当技術分野で公知である。実質的に全ての種類の体細胞をiPSCリプログラミングの細胞源として使用することができる。簡潔には、iPSCは、特定のタンパク質のセット (例えば、特定のタンパク質のセットをコードする核酸、又はタンパク質の直接送達による) を細胞に導入することで作製できる。1つの例示的な非限定的方法としては、OCT4、SOX2、KLF4、及び/又はc-MYC (例えば、「山中因子」) のうちの1又は複数をコードする1又は複数の導入

遺伝子を導入することによる方法が挙げられることを当業者は理解するであろう。ある実施形態では、リプログラミングでは4つの転写因子の全てを使用する。ある実施形態では、1つ、2つ、又は3つの転写因子を使用できる。Li et al., Stem Cells, 2009;27:2992-3000. Zhu et al., Cell Stem Cell 2010;7:651-655. いくつかの実施形態では、iPSCは、リプログラミングタンパク質の直接送達によって作製してもよい。Kim et al., Cell Stem Cell. 2009;4(6):472-6. 実施例セクションでは、非統合的な (non-integrating) 方法、例えばセンダイウイルス (実施例1) 又はエピソード法 (実施例2) を使用して iPSC を製造する方法を示している。しかしながら、iPSC を製造するいかなる方法であっても本開示の範囲内であると想定される。

【0198】

様々な方法 (例えば、小分子を使用した、又は使用しない、センダイウイルス、エピソード法) を使用して iPSC を作製することができる。実施例セクションを参照のこと。また、例えば、Hubbard et al., J. Vis. Exp., 2014, 92:52009 を参照。また、多くの異なる細胞型から iPSC を作製する方法が当技術分野で公知である。例えば、Hayashi et al., 2012, PLoS One, 7(9):e45435; Poon et al. 2015, PLoS One, 10(7):e0131288; Lamba et al. 2010, PLoS One, 5(1):e8763 を参照。通常、iPSC は、非限定的な例として Oct-4、Sox-2、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81、AP 及び/又は NANOg が挙げられる、少なくとも1つのマーカーを検出可能なレベルで発現する。

【0199】

本明細書に記載のBCD細胞モデルの生成には、任意の種類の幹細胞を使用可能であり、非限定的な例として、人工多能性幹細胞 (iPSC)、造血幹細胞 (HSC)、胚性幹 (ES) 細胞、間葉系幹細胞、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞が挙げられる。本明細書に記載の方法で使用される幹細胞は、多能性、複能性、又は全能性幹細胞であり得る。

【0200】

本明細書で使用される「多能性 (pluripotent)」という用語は、少なくとも外胚葉細胞、内胚葉細胞、及び中胚葉細胞の1つに発達可能な細胞を指す。一実施形態では、「多能性」という用語は、全能性 (totipotent) 及び複能性 (multipotent) の細胞を指す。本明細書で使用される「全能性」細胞という用語は、細胞の全ての系統に発達可能な細胞を指す。本明細書で使用される「複能性」という用語は、最終分化していない細胞を指す。本明細書の開示の多能性細胞は、任意の幹細胞であってもよく、当技術分野で公知の誘導、脱分化、及び核移植法を使用して、線維芽細胞などの非多能性細胞から産生されてもよい。本明細書に記載の多能性細胞は、幹細胞であっても非多能性細胞から産生された細胞であっても、BCD又はCYP4V2変異を有する対象からのものであってもよく、対照として使用する若しくは人工CYP4V2変異を作製するための、BCDを有しない健康な個体からのものであってもよい。

【0201】

実質的にあらゆる種類の細胞をiPS細胞にリプログラミングすることができる。本明細書の「細胞の起源」と題されたサブセクションの記載を参照。

【0202】

B. iPSCの分化

BCD患者のiPS細胞を、iPS-RPE細胞 (又は別の種類の眼細胞 (例えば、iPS-CEC、iPS-CE細胞、又はiPS-PRC)) に分化させた。iPSCをRPE細胞又は別の種類の眼細胞 (例えば、CECやPRC) に分化させる方法は公知である。例えば、実施例セクション; Hayashi et al., 2012, PLoS One, 7(9):e45435、Songstad, et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science December 2015, Vol.56, 8258-8267、及びLamba et al., PLoS One. 2010 Jan 20;5(1):e8763を参照。例えば、細胞からリプログラミングされた人工多能性幹細胞 (iPSC) を製造し、さらに、例えばRPE細胞 (本明細書では「iPS-RPE」と称する)、角膜上皮細胞 (本明細書では「iPS-CEC」と称する)、光受容体細胞 (又は光受容体前駆細胞、

本明細書では「i P S－P R C」と称する）、又は i P S－脈絡膜内皮（C E）細胞（「i P S－C E」と称する）にさらに分化させることができる。

【0203】

分化した細胞、例えば i P S－R P E細胞を、健康な対照の i P S－R P E細胞と比較して、その生化学的欠陥／異常を評価するために、生化学的機能（本明細書及び実施例セクションに記載の通り）について試験した。

【0204】

本明細書に記載の通り製造された i P S－R P E細胞系は、R P E細胞の指標となる形態（例えば、色素沈着及び六角形）、及び／又は1又は複数のバイオマーカーを発現する。R P E細胞（及び i P S－R P E細胞）のバイオマーカーは公知であり、非限定的な例として、R L B P 1（C R A L B Pとしても知られる）、R P E 6 5、B E S T R O P H I N－1、M I T F、V I N C U L I N、L R A T、R D H 5、P A X 6、M E R T K、T Y R及び／又はZ O－1の1又は複数の挙げられ、R P Eの分化が生じたことを判断又は確認するために使用することができる。同様に、C E C（及び i P S－C E C）並びにP R C（及び i P S－P R C）のバイオマーカーは公知であり、例えば、角膜上皮細胞についてはサイトケラチン12及びサイトケラチン3；並びに光受容体についてはC r x、桿体及び錐体についてはリカバリリン、桿体についてはN r 1が挙げられる。

【0205】

実施例セクションに記載の i P Sリプログラミング法及びR P E分化法により、B C D患者特異的な i P S細胞及び i P S－R P E細胞の作製に成功した。

【0206】

C．B C D患者の i P S－R P E細胞における、生化学的欠陥／異常を特定するための生化学アッセイ、及びR P E萎縮を評価するための細胞生存率アッセイ

一連の生化学アッセイが開発され、B C D患者特異的 i P S－R P E細胞の表現型を評価及び決定するために使用された。

【0207】

まず、脂肪酸のより完全なリストを本開示の生化学アッセイに含めた。先行研究では、B C D患者の異常な血清脂肪酸レベルが特定されており、試料を次の脂肪酸について試験している：16：0、16：1、18：0、18：1 n－9、18：2 n－6、18：3 n－3、20：3 n－6、20：4 n－6、22：5 n－3、22：6 n－3、24：0、及び24：1。この研究により、B C D患者の血清中のオクタデカン酸（18：0）の濃度は対照被験者よりも高く、オクタデカジエン酸（18：1 n－9）の濃度は対照被験者よりも低いことが判明した。B C D患者特異的 i P S－R P E細胞に同じ脂肪酸異常が存在するかどうか、そして他の脂肪酸にさらに異常があるかどうかを判断するために、L C－M Sを使用して、より多くの脂肪酸を包含する生化学アッセイを開発した（表2を参照）。

【0208】

さらに、B C D患者特異的 i P S－R P E細胞が脂肪酸に加えて他の異常を有するかどうかを判断するために、セラミド（C e r）、スフィンゴミエリン（S M）、並びにスフィンゴシン及びスフィンガニン（S O S A）を含む他の脂質種を、B C D疾患モデルの表現型を分析し、C Y P 4 V 2タンパク質の生化学的機能を決定するアッセイに含めた。B C D患者特異的 i P S－R P E細胞の試験に使用される生化学アッセイに含まれる様々な種及び化合物のリストについては、表2を参照。

【0209】

驚くべきことに、試験結果（実施例セクションを参照）より、B C D患者特異的 i P S－R P E細胞が、B C D患者の血清に見られるものとは異なる脂肪酸異常プロファイルを有していることがわかった。

【0210】

眼は、人体における光を感知する器官である。B C DはR P E萎縮から始まり、それが光受容体の死滅と視力喪失を引き起こす。R P Eの重要な機能は光吸収である（Strauss,

10

20

30

40

50

2005, The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845-81)。環境光への暴露は、加齢黄斑変性症（AMD）や網膜色素変性症（RP）などのヒト網膜変性症の発生及び進行に影響を与える可能性がある。眼疾患モデルにおける光暴露の使用は、網膜変性の研究に適したモデルシステムである。青色光暴露を含む光暴露は、網膜研究で広く使用されている（Dual roles of polyunsaturated fatty acids in retinal physiology and pathophysiology associated with retinal degeneration, Masaki Tanito & Robert Anderson (2009) *Clinical Lipidology*, 4:6, 821-827. Seko, et al., *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001 Jan;239 (1):47-52. Blue light-induced apoptosis in cultured retinal pigment epithelium cells of the rat. Narimatsu, et al., *Exp Eye Res*. 2015 Mar;132:48-51. Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo)。青色光は、太陽光や人工照明（例えば、オフィス照明）などの環境光、並びにテレビ、モニター、スマートフォン、ノートブック、及びタブレットなどの電子ディスプレイデバイスに見られる（Moon, et al., Blue light effect on retinal pigment epithelial cells by display devices, *Integr Biol (Camb)*. 2017, 22;9(5):436-443. doi:10.1039/c7ib00032d)。

【0211】

本研究では、細胞生存率アッセイにより、BCD細胞モデルでRPE萎縮が発見された。（青色）光への暴露は、BCD患者のiPSC-RPE試料において、対照試料よりも著しく高い細胞死を引き起こした。BCDの臨床表現型（すなわち、RPE萎縮）は、BCD細胞モデルでは明らかである。AAV-CYP4V2は、BCD細胞モデルでRPE萎縮のレスキュー（救済）に有効性を示した。

【0212】

D. BCD細胞モデルの用途

BCDに関連する細胞レベルの表現型の評価に加えて、BCD細胞モデルは、疾患モデルの他の用途（非限定的な例として、薬物スクリーニング、治療薬又はデバイスの開発、投与量範囲の決定、安全性及び毒性試験、BCD又はCYP4V2に関連する他の状態のための様々な製剤の試験、又はCYP4V2の機能と用途の研究（非限定的な例として、例えばCYP4V2遺伝子治療など、CYP4V2タンパク質を含む又は発現する薬物の開発及びスクリーニングなど）が挙げられる）にも使用可能である。さらに、BCD患者特異的iPSC-RPE（及び非限定的な例としてiPSC-光受容体細胞、iPSC-角膜細胞が挙げられる他のBCD患者特異的幹細胞由来の眼細胞）は、非改変形態で又は遺伝子修復（例えば、本明細書に記載の遺伝子導入又は遺伝子編集による）後、細胞療法として使用してもよい。実施例セクションでは、BCD細胞モデルの用途の非限定的な例を示す。

【0213】

E. 化合物スクリーニング法

重要なことに、本明細書に記載のiPSC-RPE細胞系は、ヒト細胞疾患モデル（例えば、BCD、網膜色素変性症、IRD）を提供することができる。このようなiPSC-RPE細胞、iPSC-CEC細胞、又はiPSC-PRC細胞は、「iPSC-眼細胞」と総称することができ、BCD患者、網膜色素変性症患者、又は別の種類の遺伝性網膜疾患を有する患者の診断、予後診断、並びに疾患発症、重症度、及び進行率の予測に使用することができる。例えば、このようなiPSC-眼細胞系は、CYP4V2核酸の遺伝的又はエピジェネティックな変化に関連する疾患（例えば、BCD）の治療又は予防に治療効果がある可能性のある化合物の試験化合物のスクリーニングにも使用することができる。

【0214】

本明細書に記載の多能性細胞、特にCYP4V2に遺伝的又はエピジェネティックな変化を有する対象や眼疾患（例えば、BCD）を有する対象から産生された多能性細胞は、眼疾患（例えば、BCD）の治療、診断、予後診断、又は予防の治療的候補である化合物

を同定する方法の研究ツールとして使用できる。前記試験化合物は任意の種類の化合物であり得ることが理解されよう。それらは自然起源のものであってもよく、化学合成によって作製されたものであってもよい。それらは、構造的に定義された化学化合物、特徴付けられていない化合物若しくは物質、又は化合物の混合物のライブラリであってもよい。試験化合物は、限定されるものではないが、核酸又はそのアナログ、ポリペプチド又はそのアナログ、抗体、化学物質、及び小分子であり得ることを当業者は理解するであろう。

【0215】

本明細書に記載の細胞は、試験化合物の存在下又は非存在下で、動物モデル（例えば、動物モデルの眼）において、成長及び機能する能力、及びその腫瘍を形成する傾向の有無について評価することができる。非限定的な例としてPCR技術、免疫アッセイ、及び／又は脂質／脂肪酸代謝分析が挙げられる多くの方法を使用して、細胞を評価することができる。

10

【0216】

細胞療法の方法及び組成物

本明細書で説明されるように、CYP4V2遺伝子治療は、BCD患者特異的iPS-RPE細胞の生化学的異常の修正に有効性を実証した。しかし、インビボで機能するための遺伝子治療の前提条件は、対象の治療中の眼にRPE及び光受容体細胞がある程度残存していることである。RPE細胞又は光受容体細胞が眼にほとんど又は全く残存していない後期BCD患者の場合、代替療法として、又は治療オプションとして、細胞療法を遺伝子治療と組み合わせて使用してもよい。

20

【0217】

細胞療法では、新しい細胞を移植して、死滅した細胞又は変性した細胞と置き換える。BCDの場合、新しい細胞は、対象においてどの種類の細胞が変性を示し、置換を要するかによって、RPE細胞、光受容体細胞（錐体及び／又は桿体）、光受容体前駆細胞、脈絡膜細胞、角膜上皮細胞、水晶体細胞、又は他の種類の眼細胞であり得る。本明細書の以下の記載及び実施例では、方法及びプロセスを説明するためにiPS-RPE細胞を使用した。これらは他の種類の眼細胞に適用してもよい。

【0218】

BCD、及び非限定的な例として遺伝性網膜疾患（IRD）、網膜色素変性症（RP）、黄斑変性（加齢黄斑変性（AMD）を含む）が挙げられる他の種類の眼疾患の細胞療法は、以下のように分類できる。

30

【0219】

（1）同種（アロジェニック）移植：

一実施形態では、BCDの細胞療法として、健康なドナー由来の胚性幹細胞（ESC）又はiPSCに由来する、RPE細胞、PRC、CEC、CE細胞、及び他の眼細胞を同種（アロジェニック）移植に使用することができる。これには、健康な個体（すなわち、CYP4V2変異を持たない個体）由来の健康なESC又はiPSCをRPE細胞に分化させ、そのようなESC-RPE細胞をBCD患者の眼に移植することが含まれる。iPSCのリプログラミング、及びESC又はiPSCをRPEに分化させる方法は、本明細書の実施例セクションで提示される。以前の研究では、胚性幹細胞（ESC）由来のRPE細胞が加齢黄斑変性（AMD）の治療に使用された。Schwartz et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science April 2016, Vol.57, ORSFC1-ORSFC9を参照。同種移植片（allograft）又は同種（アロジェニック）移植の長所は、複数の患者を治療するために1つの共通の供給源を使用できるため、自家移植よりも安価であることである。しかし、宿主である対象による免疫拒絶がその有効性及び持続期間に大きな影響を与える可能性があるなど、重大な短所がある。さらに、重度の全身性副作用に至る可能性のある長期の免疫抑制剤使用が必要である。最後に、ESCの使用は倫理的な懸念を引き起こす可能性がある。

40

【0220】

（2）遺伝子修復を伴わない自家（Autologous）移植：

50

一実施形態では、自家細胞をBCDの細胞療法に使用してもよい。そのような自家供給源の1つは、BCD患者由来のiPS細胞及びiPS-RPE細胞であり、これらをBCD患者の眼に移植してもよい。BCDは比較的発症が遅い疾患である。BCD患者の症状は、通常、10歳代、20歳代、さらには30歳代に発症する。さらに、iPSリプログラミングのプロセスには、iPS細胞及びiPS細胞由来の細胞に対してある程度の「時計のリセット」効果がある。したがって、BCD患者由来のiPS-RPE細胞及び他のiPS-眼細胞は、iPS-RPE細胞におけるCYP4V2変異の遺伝子修復がなくても、BCD患者への移植の細胞療法として使用できる。iPSのリプログラミング方法及びRPEの分化方法は、本明細書の実施例セクションで提示されている。予防的に、iPSのリプログラミング及びRPE分化のプロセスにおいて、何らかの疾患の原因となる変異が生成したかどうかについて、全ゲノムシーケンシングを実行して、iPS細胞又はiPS-RPE細胞のゲノムDNAと供給源細胞（例えば、線維芽細胞又は血液細胞）のゲノムDNAとを比較してもよい。

【0221】

(3) BCD並びに他の種類のIRD及びRPの細胞療法のための遺伝的に修復された患者の自家細胞

本開示は、細胞療法のために遺伝的に修復された自家細胞を生成するための方法及び組成物を提供する。本明細書で使用される「遺伝的に修復された」又は「遺伝子修復」という表現は、患者のゲノムの遺伝子編集（例えば、CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、ジンクフィンガー、TALENなどを使用した染色体上での直接的編集）によるか、通常ゲノムに組み込まれない、CYP4V2遺伝子の健康なコピー（cDNA、RNA、又は他の形態）の患者細胞への遺伝子導入（例えば、本明細書に記載のCYP4V2遺伝子治療）による、CYP4V2変異の修正、又は患者の細胞内の欠陥mRNAを修正又は補償することを指す。

【0222】

遺伝子変異によって引き起こされる疾患として、BCD又は別のIRD若しくはRPの細胞療法で使用する自家細胞は、理想的には、その遺伝的欠陥（すなわち、CYP4V2変異）及び／又は機能不全のCYP4V2タンパク質が移植前に修正されている。一実施形態では、本明細書に説明されるように、そのような遺伝子修復は、非限定的な例として機能的CYP4V2タンパク質をコードし発現する核酸配列のAAV媒介遺伝子導入療法が挙げられる、遺伝子導入療法により達成してもよい。CYP4V2遺伝子導入療法の組成物及び方法を本明細書に提示する。発明の詳細な説明及び実施例セクションを参照のこと。BCD患者特異的な供給源細胞、iPS細胞又はiPS-RPE細胞は、AAV-CYP4V2（本明細書に提示）により処理してもよく、その後iPSリプログラミング及び／又はRPE分化（該当する場合）、並びに生化学的機能の改善の検証（本明細書に提示）が行い、同一患者の眼に移植してもよい。別の実施形態では、そのような遺伝子修復は、遺伝子編集、例えば、BCD患者の細胞のゲノム又はRNAのCYP4V2変異を修正することにより達成してもよい。細胞療法の一環としてインビトロで適用されることに加えて、そのような遺伝子編集は遺伝子治療としてインビボで直接適用してもよい。そのような遺伝子編集は、患者の供給源細胞（例えば、線維芽細胞又は血球）、iPS、iPS-RPE、又は他の種類のiPS-眼細胞に対して実施してもよい。患者特異的iPS及びiPS-RPEを作製するためのiPSリプログラミング及びRPE分化は、遺伝子修復（遺伝子導入療法又は遺伝子編集など）の前に実施してもよく、後に実施してもよい。

【0223】

本開示は、遺伝子編集を通じてCYP4V2変異を修正する組成物及び方法を提供する。実施例セクションの記載は、CRISPR/Cas9コンストラクトを使用して、BCD患者の間で最も一般的な変異であるc.802-8_810del17insGC変異を修正する組成物と方法を示す。また、他の遺伝子編集方法（例えば、CRISPR/Cpf1、TALEN、ジンクフィンガー）及び他のIRD変異（例えば、限定されるものではないが、表1にある他のCYP4V2変異）に、当技術分野で公知の方法と組み合わ

せて適用してもよい。

【0224】

BCD患者の中で最も一般的なCYP4V2変異はc. 802-8__810del17 insGCである(CYP4V2遺伝子のイントロン6の終端から8塩基で始まる場所における、17塩基の欠失と2塩基(GC)の挿入を指し、IVS6-8 del/ins GCとも称される。c. 802-8__810del17 insGC変異を含むヒトCYP4V2ゲノムDNA領域の配列を示す配列番号46、及び対応する野生型配列を示す配列番号47を参照。c. 802-8__810del17 insGC変異を、ヒトCYP4V2イントロン6-エクソン7接合部を示す以下の配列に示す。イントロン6配列を小文字で、エクソン7配列を大文字で示す。17bpの欠失及びGCの挿入を括弧内に示す)：

caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca
tac agG TCA TCG CT) (GC) GAA CGG GCC AAT GAA
ATG AAC GCC AAT GA) (配列番号46)。これにより、エクソン7のスキップが起こると予想される。(Xiao et al., Biochem Biophys Res Commun. 409:181-6, 2011, Meng et al., 2014, Mol. Vis., 20:1806-14, Wada et al., Am J Ophthalmol. 139:894-9, 2005, Jiao et al., European Journal of Human Genetics (2017)25, 461-471)。最近の研究では、c. 802-8__810del17 insGC変異の年代は、中国人では1,040~8,200世代、日本人では300~1100世代であると推定された。Jiao et al., European Journal of Human Genetics (2017)25, 461-471.

10

20

【0225】

本明細書に記載されるように、細胞療法(cell therapy)(cellular therapy又はcytotherapyとしても知られる)を使用して、対象の眼疾患を治療又は予防することができる。本明細書に記載されるように、BCD、特定のRP、IRD、及び本明細書で言及される他の眼疾患は、CYP4V2核酸配列の遺伝的又はエピジェネティックな変化に関連する。

【0226】

細胞療法は、一般に、細胞を含む組成物を対象(例えば、患者の組織又は器官(例えば、眼))に注入、埋込、移植、又はその他の方法で送達することを含む。本明細書に記載の方法は、眼疾患を有する対象の遺伝的に修復された自家細胞療法を可能にする特有なものである。

30

【0227】

本明細書では、眼疾患(例えば、CYP4V2核酸配列の遺伝的又はエピジェネティックな変化に関連する)を有する対象から細胞を得ることと、例えば遺伝子編集、又は機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸配列の送達(遺伝子導入など)を介した修復を用いる、CYP4V2核酸(DNA又はRNAなど)内の変異を修復することと、を含む方法を説明する。細胞は、対象(例えば、対象の眼)への投与の前に、多能性とし(例えば、iPSC作製のために多能性を誘導することにより)、1又は複数の眼細胞(例えば、iPS-RPE、iPS-CEC、iPS-PRC)に分化させてもよい。前記細胞の遺伝的修復は、多能性化の前でも後でも、又は眼細胞に分化した後でもよいことが理解されよう。

40

【0228】

A. 細胞の起源

いくつかの例では、本明細書に記載の細胞療法の方法において自家細胞(例えば、対象(例えば、患者)特異的細胞)を使用してもよい。例えば、線維芽細胞又は末梢血単核細胞(PBMC)などの細胞を対象から入手し、実施例セクションに記載されているようにiPSCを作製するために使用してもよい。実質的にいかなる種類の細胞を使用してもiPSCを作製できるため、いかなる種類の細胞を供給源細胞として使用してもよい。いくつかの例では、尿から得られた細胞(例えば、Zhou et al., 2012, Nat. Protoc., 7:2080-9を参照)又は毛包若しくは真皮乳頭細胞(例えば、Muchkaeva et al., 2014, Acta

50

Naturae, 6:45-53を参照)を用いてiPSCを作製することができる。

【0229】

B. 多能性の誘導

人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法は、当技術分野で公知である。簡潔に述べると、iPSCは、特定のタンパク質のセット(例えば、特定のタンパク質のセットをコードする核酸)を細胞に導入することで作製できる。1つの例示的な非限定的方法では、OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC(例えば、「山中因子」)をコードする1又は複数の導入遺伝子を導入することによる方法が挙げられることを当業者は理解するであろう。ある実施形態では、リプログラミングでは4つの転写因子の全てを使用する。ある実施形態では、1つ、2つ、又は3つの転写因子を使用してもよい。Li et al., Stem Cells, 2009;27:2992-3000. Zhu et al., Cell Stem Cell 2010;7:651-655. いくつかの実施形態では、iPSCは、リプログラミングタンパク質の直接送達によって作製してもよい。Kim et al., Cell Stem Cell. 2009;4(6):472-6. 実施例セクションでは、非統合的な方法、例えばセンダイウイルス(実施例1)又はエピソード法(実施例2)を使用してiPSCを製造する方法を示す。しかしながら、本開示の範囲内においてiPSCを製造するあらゆる方法が想定される。

【0230】

様々な方法(例えば、小分子を使用した、又は使用しない、センダイウイルス、エピソード法)を使用してiPSCを作製することができる。実施例セクションを参照のこと。また、例えば、Hubbard et al., J. Vis. Exp., 2014, 92:52009を参照。また、多くの異なる細胞型からiPSCを作製する方法が当技術分野で公知である。例えば、Hayashi et al., 2012, PLoS One, 7(9):e45435; Poon et al. 2015, PLoS One, 10(7):e0131288; Lamba et al. 2010, PLoS One, 5(1):e8763を参照。通常、iPSCは、非限定的な例としてOct-4、Sox-2、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81、AP及び／又はNANOGが挙げられる、少なくとも1つのマーカーを検出可能なレベルで発現する。

【0231】

本明細書に記載の細胞療法には、任意の種類の幹細胞を使用可能であり、非限定的な例として、人工多能性幹細胞(iPSC)、造血幹細胞(HSC)、胚性幹(ES)細胞、間葉系幹細胞、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞が挙げられる。本明細書に記載の方法で使用される幹細胞は、多能性、複能性、又は全能性幹細胞であり得る。

【0232】

本明細書で使用される「多能性(pluripotent)」という用語は、少なくとも外胚葉細胞、内胚葉細胞、及び中胚葉細胞の1つに発達可能な細胞を指す。一実施形態では、「多能性」という用語は、全能性(totipotent)及び複能性(multipotent)の細胞を指す。本明細書で使用される「全能性」細胞という用語は、細胞の全ての系統に発達可能な細胞を指す。本明細書で使用される「複能性」という用語は、最終分化していない細胞を指す。本発明の多能性細胞は、任意の幹細胞であってもよく、又は当技術分野で公知の誘導、脱分化、及び核移植法を使用して、線維芽細胞などの非多能性細胞から産生されてもよい。本明細書に記載の多能性細胞は、幹細胞であっても非多能性細胞から産生された細胞であっても、BCD又はCYP4V2変異を有する対象からのものであってもよく、又は健康な個体からのものであってもよい。

【0233】

iPSCは、次の1又は複数によって特徴付けられる：

- iPSCの固有の形態；
- Oct-4、Sox-2、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、Nanog、及びAPなどの1又は複数の多能性マーカー；
- 所望の細胞種類(例えば、RPE細胞)に分化する能力；及び／又は
- テラトーマアッセイ。

iPSCの特性評価及び多能性の検証に上記のすべてが必要なわけではない(例えば、テ

ラトーマ；Buta et al., 2013, Stem Cell Res., 11(1):552-562を参照)。

【0234】

C. 遺伝子編集

本明細書に記載の方法において、多数の遺伝子編集技術を使用して、対象のCYP4V2核酸に存在する遺伝的又はエピジェネティックな変化を修復することができる。遺伝子編集は、クラスター化規則的間隔占有短鎖パリンドローム反復 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat; CRISPR) 技術 (例えば、米国特許第8,697,359号、8,889,418号、8,999,641号及び米国出願公開第2014/0068797号を参照)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) 技術 (例えば、Li et al., 2011, Nucleic Acids Res., 39(14):6315-25を参照)、又はジンクフィンガーヌクレアーゼ技術 (例えば、Wright et al., 2005, The Plant J., 44:693-705を参照) などの、任意の数の技術を使用して実施することができる。

【0235】

CRISPR技術を用いて遺伝子編集を行うには、ヌクレアーゼをコードする核酸 (例えば、Cas9ヌクレアーゼがよく使用されるが、他のヌクレアーゼ (例えば、Cpf1などの他のCasヌクレアーゼ、又は非Casヌクレアーゼ) を使用してもよい) を1又は複数のベクターに組み込み、本明細書に記載されるように対象に投与してもよい。単に例として、本明細書に記載の細胞 (例えば、iPSCへのリプログラミング前の対象の細胞; RPE、角膜上皮細胞、若しくは光受容体細胞への分化前の対象のiPSC; 又はRPE、角膜上皮細胞、若しくは光受容体細胞への分化後の対象のiPSC (本明細書では「iPSCs-RPE」、「iPSC-CEC」、又は「iPSC-PRC」と称する)) は、少なくとも1つのガイドRNA (gRNA)、少なくとも1つのCRISPR関連タンパク質 (例えば、Cas9又はCpf1)、及び少なくとも1つのドナー鋳型核酸を含む及び／又はコードする1又は複数のコンストラクト (例えば、ベクター、RNP、mRNA) で形質導入 (transduct) 又はトランスフェクト (transfect) してもよい。いくつかの実施形態では、例えば、遺伝子修復がノックアウトによって達成される場合は、ドナーの鋳型核酸は必要ない。

【0236】

同様に、TALEN技術を使用して遺伝子編集を行うために、TALENをコードする核酸 (例えば、二量体転写因子／ヌクレアーゼ) をベクターに組み込み、本明細書に記載されるように対象に投与してもよい。同様に、ジンクフィンガーヌクレアーゼ技術を使用して遺伝子編集を行うには、カスタムDNAエンドヌクレアーゼ (例えば、各サブユニットがジンクフィンガードメイン及びFokIエンドヌクレアーゼドメインを含むヘテロダイマー) をコードする核酸を1又は複数のベクターに組み込み、本明細書に記載されるように対象に投与する。

【0237】

これらの各技術を実施するために必要な成分は市販されており、特定の標的配列に合わせてカスタマイズすることができる。例えば、Caribou Biosciences、GenScript、CRISPR Therapeutics、Editas Medicine、Cellestis Bioresearch、Life Technologies、Sangamo BioSciences、又はSigma Aldrich Chemical Co.を参照。

【0238】

適切な状況下では、対象のCYP4V2核酸の遺伝的又はエピジェネティックな変化が修復され、その結果、機能的CYP4V2タンパク質が発現されるように遺伝子編集が生じ得る。CYP4V2核酸 (CYP4V2 mRNAなど) の存在が回復する、CYP4V2タンパク質の存在が回復する、又はCYP4V2タンパク質の機能が回復すると、CYP4V2核酸配列が修復されたことになる。同様に、「修復 (した／された) (repaired)」又は「修正 (した／された) (corrected)」という用語は、野生型配列又は本明細書に記載の別の非変異体配列に対して影響 (例えば、遺伝的又はエピジェネティックな変化) を受けた配列を元の状態に戻すことを指し得る。

【0239】

遺伝子編集を用いて、1又は複数の変異を細胞に導入することが望ましい場合がある（例えば、CYP4V2核酸）。これは、疾患の細胞モデル（例えば、BCD）を作製可能な方法である。例えば、胚性幹細胞（ES細胞）に対して遺伝子編集を実施して、人工CYP4V2変異を含む細胞系を作製し、RPE細胞に分化させてもよい。または、CYP4V2変異iPS又はCYP4V2変異RPE細胞系を作製するために、健康な対象（例えば、非BCDの対象）のiPS細胞系又はRPE細胞系（例えば、ARPE-19細胞系）に対して遺伝子編集を実施してもよい。

【0240】

いくつかの例では、遺伝子編集工程が完了した後、細胞をスクリーニングして（例えば、全ゲノムシーケンシングを用いて）、標的変異が修復されたこと及び重要なオフターゲット編集が発生していないことを確認することが望ましい。

【0241】

CRISPR、及びCRISPR-Cas9として知られるCRISPR関連タンパク質9（Cas9）は、RNA誘導型ヌクレアーゼ（Cas9）とガイドRNAとで構成され、部位特異的DNA切断を生成し、これが内在性の細胞メカニズムによって修復される。こうしたアプローチにより生じ得る結果には、切断部位での挿入又は欠失（インデル）が生じる変異原性の非相同末端結合（non-homologous end joining（NHEJ））を介した特定部位の変異、及び外因的に導入されたドナー鋳型を用いた相同組換え（homologous recombination（HR））によるゲノム配列の正確な変更が含まれる。CRISPRガイドRNAは、CRISPR標的化RNA（crRNA、本明細書ではCRISPR RNAとも称する）及びtrans-activating crRNA（tracrRNA）と称される2つのRNAで構成されている。crRNAの長さは通常約20ヌクレオチド（nt）である。crRNAは、ワトソン・クリック（Watson-Crick）塩基対によって標的DNA配列にハイブリダイズし、Casエンドヌクレアーゼを誘導して前記標的ゲノムDNAを切断させる。

【0242】

遺伝子編集により最も一般的なCYP4V2変異を遺伝的に修復するために、様々なCYP4V2変異CRISPR修正コンストラクトを開発した（実施例を参照）。CRISPRが用いられた理由は、TALENやジンクフィンガーヌクレアーゼなどの他の形式の遺伝子編集よりも、実施が容易であり編集効率が高いためである。CRISPRコンストラクトには、BCD患者細胞系のc. 802-8__810del17insGC変異の修正に容易に使用できる最適化されたインビトロ検証済みgRNA配列及び様々なコンストラクトのオプションが含まれており、限定されるものではないが、BCDに対する自家細胞療法を含む細胞療法に使用できる遺伝的に修復された細胞が得られる。

【0243】

CRISPR遺伝子編集療法には、ヌクレアーゼであるCRISPR関連タンパク質（Cas）及びCRISPRガイドRNAの使用が関係する。CRISPRガイドRNAの役割は、標的配列に相補的（又は特異的）なCRISPRガイドRNAに含まれるプロトスペーサーエレメントを介してCRISPRガイドRNAが標的とする配列にCasを誘導することである。Cas（例えば、Cas9又はCrf1）が標的配列に結合し、標的配列の近くで切断を行うには、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列の存在も必要となる。PAM配列は、Casの結合シグナルとして機能する短いDNAの区間（通常2～6ヌクレオチド）である。異なるCasは、異なるPAM及び切断パターンを有する。例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）Cas9（SpCas9）の場合、標準PAM配列はNGGである。スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）（SaCas9）の場合、PAM配列はNGRRT又はNGRRNである。ナイセリア・メニンギチジス（Neisseria meningitidis（NM））及びトレポネマ・デンティコーラ（Treponema denticola（Td））の場合、PAM配列は

それぞれNNNNGATT及びNAAAACである。改変された又は変異したCasでは、PAM配列が変わることもある。例えば、SpCas9 VQRバリエーション(D1135V、R1335Q、及びT1337R)のPAM配列はNGAN又はNGNGである。SpCas9 EQRバリエーション(D1135E、R1335Q、及びT1337R)のPAM配列はNGAGである。SpCas9 VRRバリエーション(D1135V、G1218R、R1335E、及びT1337R)のPAM配列はNGCGである。Cpf1の場合、PAM配列はTTTNである。通常、Casは二本鎖切断(DSB)を生成するが、変更されたCasは一本鎖切断を生成したり(例えば、SpCas9ニッカーゼ(Cas9n D10A))、切断を生成しない(dCas9)こともある。Cas9はPAM部位の3nt上流で平滑末端を生成するが、Cpf1はジグザグ状に切断し、PAMから18~23塩基離れた5ヌクレオチドの5'オーバーハングを生成する。

10

【0244】

Cas9のCRISPRガイドRNAは通常、CRISPR RNA(crRNA)及びtrans-activating crRNA(tracrRNA)を含む。crRNAは、修正、破壊、又は置換の対象となる遺伝子内又はこれに近い標的配列に相補的(又は特異的)に設計されたプロトスペーサーエレメント配列、及びtracrRNAの相補領域に対応する配列を含む。tracrRNAは、crRNAの対応する領域に相補的な領域と、CRISPR関連タンパク質9(Cas9)と相互作用する配列とを含む。Cpf1にはtracrRNAは必要ではない。

【0245】

20

プロトスペーサーエレメントの長さは、通常約20ヌクレオチドである。より長い又はより短いプロトスペーサーエレメント配列(約16~24nt)を使用してもよい。プロトスペーサーエレメントは、標的配列と100%相補的であっても、標的配列とのミスマッチを含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、プロトスペーサーエレメント配列の開始部分に所望により「G」ヌクレオチドを追加してもよい。

【0246】

DNA分子はCasによって切断された後、2つの方法のいずれかによって修復される。エラープローン非相同末端結合(NHEJ)修復は、遺伝子によってコードされたタンパク質機能を破壊する可能性のあるインデル変異を引き起こし得る。NHEJを使用すると、細胞系に人為的な変異を作製しうる。いくつかの実施形態では、内因性CYP4V2変異のない細胞系(例えば、ES細胞、iPS細胞、又はARPE-19細胞系)のCYP4V2遺伝子に変異(例えば、エクソン又はスプライスアクセプター領域のインデル)を作製するために使用し、それにより疾患細胞モデル(例えば、BCD細胞モデル)を作製してもよい。さらに、2つのCRISPRガイドRNAと一緒に使用して、標的遺伝子の標的領域又は標的遺伝子全体をノックアウトし、ノックアウトモデルを作製してもよい。いくつかの実施形態では、例えば、優性遺伝病の治療において、遺伝子を破壊(又はサイレンシング)又は欠損させるためにCRISPRベースの遺伝子サイレンシングが使用される。遺伝子サイレンシング中、細胞は壊れたDNAを修復しようとするが、NHEJはしばしば遺伝子を破壊するエラーを伴って修復を行い、これにより遺伝子を効果的にサイレンシングする。いくつかの実施形態では、NHEJはまた、例えば、特に変異が1ヌクレオチドの変更又は約10ヌクレオチド以下の変更である場合、変異の修正をもたらすこともある。または、ドナー核酸配列が利用可能な場合、DNA切断は、標的遺伝子の修正又は置換のために相同組換え修復(homology-directed repair(HDR))によって修復可能である。ドナー核酸配列は、一本鎖DNA(ssDNA)又は一本鎖オリゴDNAヌクレオチド(ssODN)又はベクターの形態で提供され得る。いくつかの実施形態では、ssODNで提供されるドナー核酸配列の場合、ドナー核酸配列は、約1kb、約800bp、約600bp、約500bp、約400bp、約300bp、約280bp、約260bp、約240bp、約220bp、又は約200bp以下である。いくつかの実施形態では、ドナー核酸配列は、ベクターで提供されるドナー核酸配列の場合、約25kb、約20kb、約15kb、約10kb、約9kb、約8

30

40

50

k b、約 7 k b、約 6 k b、約 5 k b、約 4.5 k b、約 4 k b、約 3.5 k b、又は約 3 k b 以下である。いくつかの実施形態では、ドナー核酸配列は対称的である。いくつかの実施形態では、ドナー核酸配列は非対称的である。いくつかの実施形態では、ドナー核酸配列の長さは、HDR 率が高くなるように調整してもよい。いくつかの実施形態では、CRISPR 遺伝子編集で使用される Cas が標的とする PAM がドナー核酸配列にも存在する場合、PAM がドナー核酸配列に存在しないように変異させる（異なるヌクレオチドに変更する）ことにより、ドナー鋳型又はドナー鋳型によって修復された DNA 配列が Cas によって切断及び破壊されることを防いでもよい。HDR は、変異又は欠陥を有する遺伝子又はその一部を修正又は置換することに加えて、内因性 CYP4V2 変異のない細胞系（例えば、ES 細胞、iPS 細胞、又は ARPE-19 細胞系）の CYP4V2 遺伝子に人工変異（例えば、エクソン又はスプライスアクセプター領域に変異を挿入）を作製するために使用し、それにより疾患細胞モデル（例えば、BCD 細胞モデル）を作製してもよい。

10

【0247】

CRISPR 遺伝子編集療法で使用される CRISPR ガイド RNA 及び Cas は、ベクター（例えば、プラスミド（例えば、pX330、pX458、pX459）、組換え AAV ベクター、又は組換えレンチウイルスベクター）、又はそのような成分をコードする mRNA 及び／又は RNA、及びタンパク質の形態として提供してもよい。

【0248】

ドナー鋳型は、HDR に使用するために、ssDNA（例えば、ssODN）で提供されるか、HDR で使用するためのプラスミド又は他の種類のベクター（例えば、AAV ベクター（例えば、AAV2 又は AAV6））にクローニングされ得る。

20

【0249】

様々な組成物及び方法を使用して、オンターゲット編集又は修復効率を改善し、及び／又は潜在的なオフターゲットを低下させることができる。例えば、様々な Cas（例えば、Cas9 又は Cpf1）、若しくは様々な種の Cas（例えば、SpCas9、SaCas9、NmCas9）、又はバリエーション（SpCas9、SpCas9 VQR）を、標的配列のための利用可能な PAM 選択肢を広げるために使用し、特異性を向上させてもよい。標的配列領域に SpCas9 のための NGG PAM 部位はないが ATR 1 の場合、代わりに Cpf1 が考慮され得る。Cas9 ニッカーゼ（例えば、Cas9 D10A）は、標的 DNA に一本鎖切断のみを生成するため、二本鎖切断を生成するには対になる 2 つのペアとなる CRISPR ガイド RNA が必要である。DSB を生じるのに十分な近さで 2 つのオフターゲットニックが生成される可能性は低いため、上記の要件によって標的特異性が劇的に向上する。さらに、非対称ドナー鋳型により HDR 率が向上する場合がある。触媒的に不活性な dCas9 は標的 DNA を切断しないが、Cas9 切断に通常伴う如何なるエラープロン修復も行わずに、配列置換を達成できる。Richardson et al., Nature Biotechnology 34, 339-344 (2016) を参照。

30

【0250】

標的遺伝子修正を達成し、その間にオフターゲット編集を回避又は最小限にすることが遺伝子編集の 2 つの目的である。先行研究により、非限定的な例として CRISPR 及び TALEN が挙げられる遺伝子編集技術によって引き起こされるオフターゲット変異が明らかになった。Tsai et al, Nature Biotechnology 33, 187-197 (2015)、Wang et al., Nature Biotechnology 33, 175-178 (2015)、Wu, W.H. et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. Mol. Ther. 24, 1388-1394 (2016) を参照。インビボ又は細胞療法で使用される遺伝子編集（例えば、まずインビトロで細胞を移植後インビボで細胞を移植）の場合、オフターゲット編集は病気の原因となったり腫瘍形成を誘発したりすることから、第 2 の目的であるオフターゲット編集の回避又は最小限化は標的遺伝子修正の達成と同じくらい重要である。全てのオフターゲット編集がコンピューターソフトウェア又はアルゴリズムによって予測可能なわけではないことに注意しなければならない。

40

50

【0251】

したがって、CYP4V2変異CRISPR遺伝子修正コンストラクトの開発及び検証には、慎重な設計、検証、及び改善を要した：

(1) c. 802-8__810del17insGC変異を含む変異CYP4V2核酸配列に基づいて、複数のgRNA候補を生成した。

(2) 以下の基準により上位5つのgRNAを選択した（配列番号48～配列番号52、表5及び図12を参照）：

- a. gRNA切断部位が改変部位に近接していること、及び
- b. gRNAのオフターゲットプロファイル。

(3) 上位5つのgRNAの活性を、ホモ接合c. 802-8__810del17insGC変異を有するBCD患者のゲノムDNAで検証した（図13を参照）。

(4) (2) 及び (3) に基づいて、3つのgRNAを選択した。3つのgRNAのそれぞれを、ピューロマイシンを使用したトランスフェクト細胞選択のために、Cas9及びピューロマイシン耐性遺伝子（Puro）をコードする核酸配列とともにpX459プラスミドにクローニングした（図15及び18を参照）。

(5) HDRドナー核酸配列を提供する2つのドナー鑄型（順方向相補的及び逆方向相補的の両方）を作製した。ドナー鑄型配列を含むssODNはIDTによって合成された（配列番号56及び配列番号57を参照）。

(6) プラスミドコンストラクトに加えて、CRISPR RNPコンストラクトを開発した。RNPコンストラクトは、他のコンストラクトに比べて特定の利点を提供する。詳細な説明は以下及び実施例セクションで説明する。

(7) CYP4V2 CRISPR修正コンストラクトは、ホモ接合c. 802-8__810del17insGC変異を有するBCD患者由来のiPS細胞で検証される。

(8) 非改変細胞、及びCYP4V2変異CRISPR修正コンストラクトによって遺伝的に修復されたiPS細胞で全ゲノムシーケンシングを実施し、c. 802-8__810del17insGC変異の修正を確認し、オフターゲット編集を評価する。

【0252】

iPSCでのトランスフェクションの最適条件を決定し、トランスフェクトされた細胞を選択する方法が提供される。詳細な説明については、実施例セクションを参照。これらのコンストラクトは、インビトロにおけるBCD患者特異的iPS細胞だけでなく、インビトロでの供給源細胞（例えば、線維芽細胞又はPBMC）、iPS-RPE、iPS-PRC、iPS-CE細胞、若しくはiPS-CEC細胞、又はBCD患者特異的iPS細胞由来の他の眼細胞の治療に使用することもでき、さらには、c. 802-8__810del17insGC変異を有する患者においてインビボでも使用できることが想定される。一実施形態では、前記コンストラクトの成分は直接使用してもよい。いくつかの実施形態では、前記コンストラクトの成分を変更するか、異なるベクターにクローニングして、インビボでの形質導入効率を高めたり、標的細胞型に対する特異性を高めたり、他の目的を達成したりしてもよい。例えば、Cas9をCas9ニッカーゼ（Cas9n D10A）に変更してもよい。Cas9ニッカーゼは、当該エンドヌクレアーゼが二本鎖切断ではなく一本鎖ニックを作製することを可能にする変異を有する。対向する2つのgRNA配列をSpCas9ニッカーゼとペアリングさせることは、不要なインデルの形成を防ぐ遺伝子編集の効率的な方法である。プラスミドに加えて、CRISPR成分をパッケージ化するために使用される他の一般的なベクターとしては、レンチウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターが挙げられる。AAVベクターを使用する場合、SaCas9はSpCas9よりもおよそ1kb短く、AAVパッケージングの制約にさらに柔軟に対応できるため、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）Cas9オーソログ（SaCas9）をエンドヌクレアーゼとして使用してもよい。

【0253】

CRISPR RNPコンストラクトに様々な改善を加えた。IVTs gRNA又はc

10

20

30

40

50

rRNA:tracrRNA複合体(duplex)の代わりに、合成sgRNAを使用した。合成gRNAはIVT sgRNAよりも純度が高いため、sgRNAの不純物によって引き起こされるオフターゲット編集のリスクが低くなる。さらに、sgRNAを細胞内分解から保護するためにsgRNAに化学修飾を適用すると、編集効率を向上することができる。詳細については実施例を参照。

【0254】

本明細書に記載のプラスミドコンストラクト及びCRISPR RNPコンストラクトに加えて、Cas9をコードするmRNA及びガイドRNAオリゴヌクレオチドを含むmRNAコンストラクトも使用できると考えられる。

【0255】

BCD患者特異的iPS細胞にCYP4V2変異CRISPR修正コンストラクトをトランスフェクトした後、トランスフェクト細胞をピューロマイシンを使用して選択する。GFPなどの他のマーカーを前記コンストラクトに組み込み、ピューロマイシンの代わりに、又はピューロマイシンに加えてマーカーとして使用してもよいことを理解されたい。選択に続いて、単一細胞クローニングが実施され、その後、単一細胞クローンからいくつかの細胞がシーケンシングのために収集される。シーケンシングの結果、オンターゲット遺伝子編集の成功が確認され、病気の原因となる遺伝子編集が認められなければ、同じクローンの残りの細胞を、目的の眼細胞種類、例えばiPS-RPE細胞に分化させるために用いる。

【0256】

D. iPSCの分化

遺伝的に修復されたBCD患者のiPS細胞は、iPS-RPE細胞又は別の種類の眼細胞(例えば、iPS-CEC、iPS-CE細胞、又はiPS-PRC)に分化される。iPSCをRPE細胞又は別の種類の眼細胞(例えば、CEC及びPRC)に分化させる方法は公知である。例えば、Hayashi et al., 2012, PLoS One, 7(9):e45435、Songstad, et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science December 2015, Vol.56, 8258-8267、及びLamba et al., PLoS One 2010 Jan 20;5(1):e8763を参照。例えば、細胞からリプログラミングされた人工多能性幹細胞(iPSC)を製造し、さらに、例えばRPE細胞(本明細書では「iPS-RPE」と称する)、角膜上皮細胞(本明細書では「iPS-CEC」と称する)、光受容体細胞(又は光受容体前駆細胞、本明細書では「iPS-PRC」と称する)、又はiPS-脈絡膜内皮(CE)細胞(「iPS-CE」と称する)にさらに分化させてもよい。

【0257】

分化した細胞、例えばiPS-RPE細胞を、遺伝子修復のない患者のiPS-RPE細胞と比較して、生化学的機能が改善されていることを確認するために、生化学的機能(本明細書及び実施例セクションに記載の通り)について試験する。

【0258】

本明細書に記載の通り製造されたiPSC-RPE細胞系は、RPE細胞の指標となる形態(例えば、色素沈着及び六角形)を示す、及び／又は1又は複数のバイオマーカーを発現する。RPE細胞(及びiPS-RPE細胞)のバイオマーカーは公知であり、非限定的な例として、RLBP1(CRALBPとしても知られる)、RPE65、BESTROPHIN-1、MITF、VINCULIN、LRAT、RDH5、PAX6、MERTK、TYR及び／又はZO-1の1又は複数が挙げられ、RPEの分化が生じたことを判断又は確認するために使用することができる。同様に、CEC(及びiPS-CEC)並びにPRC(及びiPS-PRC)のバイオマーカーは公知であり、例えば、角膜上皮細胞についてはサイトケラチン12及びサイトケラチン3；並びに光受容体についてはCrx、桿体及び錐体についてはリカバリン、及び桿体についてはNr1が挙げられる。

【0259】

E. 投与／送達

遺伝的に修復されたiPS-RPE細胞は、iPS-RPE細胞が由来する患者への自

10

20

30

40

50

家移植に使用してもよい。CYP4V2変異によるBCD又は別の眼科疾患を有する患者は、本明細書で提供される細胞療法の方法で治療することができる。同様に、この方法を使用して、1又は複数の遺伝子変異によって引き起こされる他の眼疾患に対して遺伝的に修復された自家細胞療法を提供してもよい。

【0260】

細胞を投与又は送達する方法は公知であり、細胞を眼に投与又は送達する方法は公知である。例えば、Wert et al., J Vis Exp. 2012;(69):4286、国際公開第2016/179496号、Schwartz et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science April 2016, Vol.57, ORSFC1-ORSFC9を参照。一実施形態では、眼細胞は、細胞懸濁液、例えばRPE細胞の懸濁液の注入により移植してもよい。別の実施形態では、細胞は、シート又は足場の一部として、例えば、極性を持った機能的なRPE単層を生成するために、天然及び／又は合成の足場を使用したインビトロ組織として移植してもよい。

10

【0261】

眼に投与される細胞の治療有効量は、当業者に知られており、移植される細胞の種類、移植される細胞の成熟度、移植後の分裂が予想されるかどうか、置換の標的となる領域のサイズ又は細胞の数、及び治療される対象（例えば、治療対象の年齢、性別、体重、疾患進行度、及び状態）、投与経路、並びに必要なレジメンによって変わり得る。眼細胞療法で使用される細胞の治療有効量は、1回の投与で約 1×10^3 細胞から約 1×10^8 細胞の範囲内でありうる。

【0262】

iPSC細胞系は個々の対象に対して作製することができる一方、共通のHLAハプロタイプを有する（又はHLAハプロタイプが遺伝子操作されている）iPSCの細胞バンクを作製してもよい。これは、患者集団の大部分と免疫学的マッチングを達成するように設計される。例えば、Turner et al., Cell Stem Cell, 13:382-384, 2013を参照。さらに、対象の遺伝子型に関係なく免疫学的にサイレントなiPSC細胞系を作製してもよい（例えば、Riolobos et al., Mol. Ther., 21:1232-41, 2013を参照）。これらの方法と組み合わせると、患者特異的iPSC細胞及びiPSC-眼細胞は、厳密な自家移植という意味で利用できるだけでなく、他の患者への移植にも使用できる。

20

【0263】

典型的には、細胞療法の投与工程は、疾患症状の発現後又は対象が網膜変性若しくは角膜ジストロフィーの兆候を示した後、必要に応じて行われる。一実施形態では、本明細書で提供される眼細胞療法は、眼疾患（例えば、BCD）の治療に独立して使用してもよい。別の実施形態では、本明細書で提供される眼細胞療法は、非限定的な例として本明細書で提供されるCYP4V2遺伝子導入療法及び／又はCYP4V2 CRISPR遺伝子編集療法が挙げられる1又は複数の他の治療オプションと組み合わせて使用してもよい。

30

【0264】

同様に、投与は1回又は複数回（例えば、数週間、数ヶ月、又は数年にわたって）であり得、同じ眼に適用しても反対側の眼に適用してもよい。さらに、1又は複数の種類の細胞を、単回又は別々の投与として投与してもよい。

【0265】

治療後の評価では、CYP4V2遺伝子治療のセクションに記載されている方法を使用してもよい。これには、非限定的な例として、視力、視野、暗順応、視覚機能及び／又は光干渉断層法（OCT、例えば、スペクトラルドメイン（Spectral Domain）-OCT（SD-OCT））、及びERGによって測定される視覚機能などの眼科検査が挙げられる。

40

【0266】

眼細胞療法及び遺伝子治療におけるCRISPR RNPの使用法

CRISPR RNPは、Casタンパク質（例えば、Cas9タンパク質）と複合したガイドRNAを含む遺伝子編集リボ核タンパク質（RNP）複合体である。ガイドRNAは、CRISPR RNA（crRNA）及びtrans-activating cr

50

RNA (tracrRNA) と称される2つのRNAで構成されている。一実施形態では、crRNA及びtracrRNAは、2つの別々の核酸分子として提供される。別の実施形態では、crRNA及びtracrRNAは、キメラシングルガイドRNA (sgRNA) に組み合わせてもよい。sgRNAは、長さが約100ヌクレオチド (nt) であり得、所望により、又は必要に応じてより短い又はより長いこともある。5'末端の20nt (crRNA) は、ワトソン・クリック (Watson-Crick) 塩基対によって標的DNA配列にハイブリダイズし、Casエンドヌクレアーゼを誘導して前記標的ゲノムDNAを切断させ、残りの二本鎖構造はCas9認識のために3'側にある。

【0267】

CRISPR RNPは、従来のCas9/gRNAコンストラクト (例えば、CRISPRガイドRNA及びCas9タンパク質の核酸配列を組み込んだプラスミドコンストラクト) と比較して、長所と短所を有する。例えば、ガイドRNA (crRNA及びtracrRNA) 及びCas9タンパク質はインタクトな複合体として標的細胞に送達することができ、CRISPR成分を発現するための細胞自体の転写機構の必要性を克服する。その結果、CRISPR RNPはトランスフェクション後すぐに編集できる。CRISPR成分は細胞からより速く枯渇するため、オフターゲット編集の機会を減らすことができる。さらに、プラスミドによって引き起こされる組込み変異誘発の機会を低減し得る。これらの利点を考えると、RNPはインビボの遺伝子編集においても有利になり得る。一方、RNPはタンパク質の分解により細胞から迅速に消失するため、発現が細胞内でより長く続くプラスミドコンストラクトよりもオンターゲット編集効率が低くなる可能性がある。

【0268】

上記の仮説を評価し、CRISPR RNPコンストラクトが眼細胞療法及び遺伝子治療に望まれる遺伝子編集の両方の目的を達成できるかどうかを証明するために、2セットのコンストラクトを設計した。1つのコンストラクトはプラスミドコンストラクトで、もう1つはRNPコンストラクトである。両コンストラクトは、トランスフェクションにて同じBCD患者のiPS細胞を使用し、その後、シークエンスを行って各コンストラクトのオンターゲット遺伝子修復及びオフターゲット編集を分析する。オフターゲット編集は、同じ患者の未改変の線維芽細胞からのゲノムDNAと比較することにより決定される。プラスミドコンストラクトとRNPコンストラクトの両方の結果を比較してもよい。

【0269】

RNPの詳細な説明、RNPを形成する方法、及びRNPコンストラクトを使用してBCD患者の遺伝的に修復された細胞 (iPS細胞及びiPS-RPE細胞) を作製する方法は、実施例セクションに示す。

【0270】

同様のCRISPR RNPコンストラクトを使用して、BCDの他の変異並びに他のRP及びIRDの変異を修正又は不活性化しうることに留意されたい。一態様では、本明細書で使用されるcrRNA配列は、異なる標的変異配列を特異的に標的とする別のcrRNA配列に変更される。別の態様では、RNPコンストラクトにおけるガイドRNA又はsgRNAを改変して、遺伝子編集効率を高めてもよい。Hendel et al, Nat Biotechnol. 2015 Sep;33(9):985-989を参照。いくつかの実施形態では、前記CRISPR RNPコンストラクトは、エレクトロポレーションを使用してトランスフェクトしてもよい。いくつかの実施形態では、前記CRISPR RNPコンストラクトは、リポフェクション又はヌクレオフェクションを使用してトランスフェクトしてもよい。いくつかの実施形態では、前記CRISPR RNPコンストラクトは、マイクロインジェクションを介して送達してもよい。

【0271】

CRISPR RNPコンストラクトは、インビトロで患者の細胞を遺伝的に修復及び治療することに加えて、インビボで遺伝子変異によって引き起こされる眼疾患の治療に使用してもよく、インビボでの適用には、他の種類のCRISPRコンストラクト (例えば

、C R I S P R成分をコードするプラスミド及び／又はmRNA)よりも利点がある。例えば、C R I S P R RNPコンストラクトは、インビトロで転写されたC a s 9 mRNA及びs gRNAと比較して、より高い効力、より低いオフターゲットリスク、及び／又はより低い毒性若しくは自然免疫応答活性化能を有する。一実施形態では、変異体DNA配列の領域を標的とするガイドRNAと複合体化されたC a s 9タンパク質からなるC R I S P R RNPコンストラクトを、対象の眼に直接注射してもよい(例えば、網膜下注射、硝子体内注射、又は角膜注射)。別の実施形態では、インビボでの脳細胞の編集効率の向上が示されている(Staahl et al., Nat Biotechnol. 2017 May;35(5):431-434)、複数のSV40核局在化配列(nuclear localization sequence (NLS))を有するC a s 9の改変バリエーションを使用して、眼細胞で高い編集効率を達成してもよい。1又は複数のNLS(N末端及び／又はC末端)を持つC a s 9タンパク質は、IDTやFeldanなどの様々なCROで市販されている。いくつかの実施形態では、前記C R I S P R RNPコンストラクトは「そのままの状態」で送達される。いくつかの実施形態では、前記C R I S P R RNPコンストラクトは、送達時に医薬的に許容される担体とともに製剤化される。いくつかの実施形態では、前記C R I S P R RNPコンストラクトは、パッケージ化された形式、例えばナノ粒子で送達される。

【0272】

C R I S P R RNPの成分(例えば、ガイドRNA及びC a s 9タンパク質)の比率は、インビトロ又はインビボでの治療前に、インビトロで患者の細胞系(例えば、BCD患者特異的iPS細胞又はiPS-RPE細胞)で異なる比率について試験することで調整及び最適化できることが理解される。前記C R I S P R RNPコンストラクトは、独立して使用してもよく、非限定的な例としてC R I S P RガイドRNA若しくはcrRNA、C a sタンパク質、又はそれらの組み合わせをコードするプラスミド又はベクター；C a s 9をコードするmRNA；ガイドRNAオリゴヌクレオチド；別のC R I S P R RNPコンストラクト；又はこれらの組み合わせ若しくはハイブリッドが挙げられる別のC R I S P Rコンストラクトと組み合わせて使用してもよい。さらに、前記C R I S P R RNPコンストラクトを使用して、1又は複数の眼疾患に関連する1又は複数の変異を修正又は不活性化してもよい。

【0273】

遺伝子治療及び細胞療法の併用治療

本開示は、非限定的な例としてCYP4V2遺伝子導入療法及びCYP4V2 C R I S P R遺伝子編集療法が挙げられる、CYP4V2変異により引き起こされるBCD及び他の眼疾患の複数の治療オプションを提供する。CYP4V2遺伝子導入療法もCYP4V2遺伝子編集療法も、インビボ、インビトロ、又はインビボ及びインビトロの両方で使用することができる。インビボで適用する場合、CYP4V2遺伝子導入療法及び／又はCYP4V2 C R I S P R遺伝子編集療法は、遺伝子治療として、BCDに罹患した残りの眼細胞を治療することができる。患者細胞又は患者由来細胞にインビトロで適用する場合、細胞療法として、CYP4V2遺伝子導入療法及び／又はCYP4V2 C R I S P R遺伝子編集療法で治療された細胞を患者に移植して、死滅した又は変性した眼細胞を置き換えることができる。重要なことに、本明細書で提供される遺伝子治療及び細胞療法の組成物及び方法は、遺伝子治療又は細胞療法を単独で使用するのではなく追加的利益を患者に提供するために、組み合わせることができる。「併用療法」は、適格な患者のベースを広げうる。例えば、光受容体細胞又はRPE細胞が全く又はほとんど残っていない後期の患者では、遺伝子治療は初期の患者ほど効果的ではない。この場合、細胞療法は新しい細胞(例えば、RPE又は光受容体細胞)を提供することにより有益となりうるが、遺伝子治療は、残りのRPE又は光受容体細胞を救済(レスキュー)することにより、及び／又は眼細胞の状態に影響を与える脈絡膜細胞の健康状態を改善することにより、細胞療法の効果を改善することができる。遺伝子治療及び細胞療法それぞれの「救済(レスキュー)」効果及び「置換」効果の組み合わせは、遺伝子治療又は細胞療法のいずれか一方と比べて、組み合わせ治療において改善をもたらす。この組み合わせ治療法は、

1 又は複数の遺伝子変異によって引き起こされる他の眼疾患にも適用されうる。

【0274】

CYP4V2 遺伝子治療の方法及び組成物

本開示は、機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする核酸分子を含む様々な組成物、並びに眼細胞及び／又は眼疾患を治療するためにそれを利用する様々な方法に関する。一実施形態では、機能的 CYP4V2 タンパク質は治療目的に直接使用できる。いくつかの実施形態では、機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする核酸分子が使用される。いくつかの実施形態では、1 又は複数の制御配列と作動可能に連結された機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする上記核酸分子を含む発現カセットを使用して、核酸分子の産物の発現を指示及び制御する。いくつかの実施形態では、機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする核酸分子及び標的細胞への送達を強化するための 1 又は複数の制御配列を含む CYP4V2 発現カセットをパッケージ化し、上記 CYP4V2 コードする核酸分子の産物及び発現カセットの所望の発現を達成するためにベクターを使用する。

10

【0275】

いくつかの実施形態では、前記ベクターは組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターである。いくつかの実施形態では、前記ベクターはプラスミドである。いくつかの実施形態では、前記ベクターは、別の種類のウイルス又は非ウイルスベクターである。前記治療方法は、有効量 (又は有効濃度) の前記ベクターを対象の眼及び／又は標的細胞に投与又は送達することを含む。一実施形態では、治療はインビボで直接適用される。別の実施形態では、治療は、標的細胞 (例えば、眼細胞) におけるエクシボでの治療、及び治療された標的細胞を対象 (例えば、対象の眼) に移植することを含む。治療方法は、CYP4V2 変異に関連する眼疾患及びその他の状態を対象としている。一実施形態では、前記眼疾患は、クリスタリン網膜症 (BCD) である。

20

【0276】

A. 機能的 CYP4V2 タンパク質、及び機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする核酸

CYP4V2 (シトクロム P450、ファミリー 4、サブファミリー V、ポリペプチド 2、(MIM 608614)、同義語: CYP4A1) は、シトクロム P450 スーパーファミリー (P450) のタンパク質の 1 つであり、シトクロム P450 サブファミリー 4 (CYP4) のメンバーである。シトクロム P450 (CYP) は、オキシダーゼ酵素としての役割で知られる重要なヘム含有タンパク質である。P450 という用語は、酵素が還元状態にあり、一酸化炭素と複合体を形成しているときの酵素の吸収極大波長 (450 nm) の分光光度ピークに由来する。それらは、生体異物及び内因性化合物、例えばステロイド、脂肪酸などの代謝に関与している。CYP 酵素は、動物、植物、菌類、原生生物、細菌、古細菌、さらにはウイルスなど、あらゆる生物界で特定されている。ただし、それらは遍在しているわけではなく、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) では見出されていない。

30

【0277】

P450 タンパク質は構造上重要な要素を共有している。例えば、P450 タンパク質は、署名配列要素 FXXGXXXCXG (配列番号 30) によって識別可能であり、システインは、ヘム鉄に対する軸配位子として機能する。P450 タンパク質の中での配列の同一性は比較的低いが、それらの一般的なトポグラフィー及び構造の折り畳みは高度に保存されている。保存されたコアは、「ミアンダ形 (meander) (つづら折り状)」と称されるコイル、4 ヘリックスバンドル、ヘリックス J 及びヘリックス K、並びに 2 セットの β シートで構成されている。これらは、ヘム結合ループ (ヘム鉄の 5 番目のリガンドとして機能する完全に保存されたシステインを有する)、プロトン移動溝、及びヘリックス K における保存された EXXR モチーフ (配列番号 31) を構成する。P450 タンパク質は、主にミトコンドリアの内膜又は細胞の小胞体にある膜結合タンパク質である。

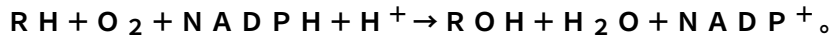
40

【0278】

構造的な類似性に加えて、P450 タンパク質は機能的な類似性も共有している。P4

50

50 酵素によって触媒される最も一般的な反応は、モノオキシゲナーゼ反応であり、例えば、酸素の1つの原子を有機基質 (RH) の脂肪族の部分に挿入し、残りの1つの酸素原子は水に還元される:



多くのヒドロキシル化反応 (ヒドロキシル基の挿入) は P450 酵素を使用する。多くの P450 酵素は、基質としてステロイド及び/又は脂肪酸を有する。

【0279】

ヒト CYP4V2 タンパク質 (NCBI 参照配列: NP_997235.3) は 525 個のアミノ酸を有する (アミノ酸配列を配列番号 4 に示す)。病的バリエーション (すなわち、変異) (BCD 患者間の CYP4V2 変異の選択リストについては、本明細書の表 1 を参照) 及び非病的 (すなわち、機能的) バリエーションなどの、ヒト CYP4V2 タンパク質のバリエーションが存在する。

【0280】

一態様では、機能的 CYP4V2 タンパク質は、ヒト CYP4V2 タンパク質 (配列番号 4) である。他の態様において、機能的 CYP4V2 タンパク質は、非限定的な例として配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を有するものが挙げられるヒト CYP4V2 タンパク質の機能的バリエーション又は断片である。

【0281】

機能的 CYP4V2 タンパク質は、別の機能的 CYP4V2 タンパク質のバリエーションであってもよい。以下は、本明細書に記載のポリペプチドのアミノ酸を変化させて、同等の又は改善された第 2 世代分子を作製することに基づく検討である。例えば、タンパク質構造中、一定のアミノ酸は、基質分子上の結合部位などの構造との相互作用的能力を大きく失うことなく (例えば、脂肪酸結合部位など)、他のアミノ酸と置換されてもよい。タンパク質の生物学的機能活性を決定するのはタンパク質の相互作用能力と性質であるため、特定のアミノ酸置換はタンパク質配列、及びその基礎となる DNA 又は RNA コード配列で行ってもよく、それでも同様の特性を持つタンパク質が生成する。したがって、本明細書で検討されるように、生物学的有用性又は活性を大きく喪失することなく、機能的 CYP4V2 タンパク質のアミノ酸配列、又はその遺伝子若しくはコード領域の DNA 配列若しくは RNA 配列に様々な変更を加えることができると考えられる。例えば、配列番号 5 は、配列番号 4 に示すヒト CYP4V2 タンパク質配列から 1 つのアミノ酸変化を有する CYP4V2 タンパク質バリエーションのアミノ酸配列である。

【0282】

様々な手法、アルゴリズム、ソフトウェア、及びツールを使用して、機能的 CYP4V2 タンパク質、例えばヒト CYP4V2 タンパク質の機能的誘導体、バリエーション、及び/又は断片を設計又は改変することができる。例えば、様々なポリペプチド又は変化の構造及び機能は、NMR、X 線結晶構造解析法、又はコンピューターモデリング (ClustalW、SWISS-MODEL サーバー、Swiss-Pdb Viewer、Polyphe-2、PROVEAN、SIFT、Condel、MutationAssessor、及び FatHMM など) によってモデル化、決定、又は予測してもよい。

【0283】

機能的 CYP4V2 タンパク質は、機能的 CYP4V2 タンパク質の断片であるか、断片に由来する場合もある。例えば、ヒト CYP4V2 タンパク質 (配列番号 4) 及びそのバリエーション (配列番号 5) はいずれも、N 末端から約 13 番目のアミノ酸残基と約 35 番目の残基の間に膜貫通ドメインを有する。ヒト CYP4V2 タンパク質 (配列番号 4) の骨格は約 36 ~ 525 aa の間に位置している。従って、機能的 CYP4V2 は、ヒト CYP4V2 タンパク質から最初の約 35 個のアミノ酸を欠失させて (配列番号 6) これを別の膜貫通ドメイン配列で置換したものに由来していてもよい。機能的 CYP4V2 タンパク質の別の供給源としては、機能的 CYP4V2 タンパク質のスプライスバリエーションが挙げられる。

【0284】

CYP4V2の予測される膜貫通セグメントはN末端近くにあり、CYP450ファミリーに典型的な球状構造ドメインがそれに続く。CYP4V2の球状ドメインには、18のヘリックス及びβ構造セグメントが含まれている。ヘム基はタンパク質の表面近くに位置し、タンパク質内部に向けてEヘリックスが、表面的にLヘリックスが、配位している。Li et al., Am J Hum Genet. 74:817-826, 2004。CYP4V2タンパク質は脂肪酸代謝において顕著に活性がある。他の多くのP450酵素も脂肪酸代謝に関与している。CYP4V2は、ほぼ全ての組織及び臓器で普遍的に発現している。CYP4V2の発現は、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、網膜、網膜色素上皮、角膜、及びリンパ球で認められた (Li et al., Am J Hum Genet. 74:817-826, 2004)。しかし、他のほとんどのP450酵素は眼細胞には存在しない。例えば、CYP4V2及びCYP1B1は、ARPE-19細胞系で高レベルで発現する唯一のP450酵素であった。CYP2E1、CYP2J2、及びCYP3A4は低レベルでのみ転写され (CYP4V2 mRNA発現の5%)、CYP4A11、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、及びCYP4F12の転写産物は検出されなかった (Nakano, et al., Mol Pharmacol 2012;82:679-686)。CYP4V2変異の症状は眼に限定されており (眼ではCYP4V2はCYP1B1以外に発現する唯一の主要なP450酵素であり、発現する唯一のP450サブファミリー4 (CYP4) 酵素である)、CYP4V2が他のP450酵素と共に存在する臓器では示されない、という事実は、他のP450酵素、特にCYP4酵素がCYP4V2の機能の全て又は一部を置換するために使われうることを示唆している。実際、CYP4サブファミリーは、限定されるものではないが、PUFAのヒドロキシラーゼなど、脂肪酸代謝における共通の役割を共有することがわかっている。Hardwick, Biochem. Pharmacol., 75(12):2263-75; Fer et al., J. Lipid Res., 49(11):2379-89; Nakano et al., Mol. Pharmacol., 2012, 82:679-686を参照。ヒトCYP4タンパク質のタンパク質配列を、配列番号8～18に示す。

【0285】

CYP4サブファミリーの他のタンパク質と基質及び機能を共有していることに加えて、コンピューター解析により、CYP4V2はCYP46A (配列番号7) の祖先の複製から形成され、さらに複製されてCYP4ファミリー全体が生成したことが明らかになった。Pan et al., Int. J. Mol. Sci., 2016, 17(7)pii:E1020. doi:10.3390/ijms17071020。

【0286】

さらに、CYP4V2遺伝子 (又はCYP4V2遺伝子のオーソログ、例えばマウスのCyp4v3) は、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ニワトリ、カエル、ウマ、ウサギ、及びミバエを含む多くの種で保存されている (配列番号19～29)。ヒト遺伝子CYP4V2を持つオーソログは、196の生物で見出されている。

【0287】

機能的CYP4V2タンパク質は、限定されるものではないが、以下を含むか、以下から設計された、改変された、又は由来するものであってもよい：

(i) ヒトCYP4V2タンパク質 (配列番号4)、

(ii) ヒトCYP4V2タンパク質又は機能的CYP4V2タンパク質のバリエーション (例えば、アミノ酸の変化及び／又はスプライスバリエーション) (例えば、配列番号5)、

(iii) 機能性CYP4V2タンパク質の1又は複数の断片 (例えば、配列番号6)、

(iv) 他の種のCYP4V2 (又はオーソログ) タンパク質、

(v) 別のCYP4タンパク質又はCYP46A1、

(vi) 患者の細胞 (例えば、BCD患者のiPS-RPE細胞) の表2に挙げられている1又は複数の化合物の1又は複数の生化学的異常を改善、治療、又は阻止できるポリペプチド、及び／又は

(vii) 上記の(i)～(vi)のいずれか1又は複数の誘導体、ハイブリッド、又はバリエーション。

【0288】

本開示の組成物及び方法は、上記の任意の機能的CYP4V2タンパク質を発現するために使用できると考えられる。一実施形態では、機能的CYP4V2タンパク質は、配列番号4、5、又は6に示すアミノ酸配列の全て又は一部を含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、機能的CYP4V2タンパク質は、CYP4V2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、及びCYP46A（配列番号4～18）、及びチンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ニワトリ、カエル、ウマ、ウサギ、及びミバエのCYP4V2（配列番号19～29）、並びにそれらの誘導体、ハイブリッド、バリエーション及び／又はそれらの断片、からなる群から選択されるアミノ酸配列の全て又は一部を含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、機能的CYP4V2タンパク質は、配列番号4～29からなる群から選択される配列のいずれかに対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有していてもよい（例えば、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性）。一実施形態では、機能的CYP4V2タンパク質は、FxxGxxxCG及びExxRの配列要素（配列番号30及び31）を含むポリペプチドである。

10

【0289】

いくつかの実施形態では、機能的CYP4V2タンパク質は、患者細胞（例えば、BCD患者のiPS-RPE細胞）の1又は複数の生化学的異常を改善、治療、又は阻止できる化合物又は薬剤である。

20

【0290】

一実施形態では、他の疾患のタンパク質ベースの薬物と同様に、機能的CYP4V2タンパク質をBCDの治療に直接使用してもよい。別の実施形態では、機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸分子を、標的細胞で機能的CYP4V2タンパク質を発現するために使用する。一実施形態では、前記核酸分子はRNAである。別の実施形態では、前記核酸分子は長期発現のためのDNAであり、非限定的な例として相補的DNA（cDNA）が挙げられる。cDNAは、ポジティブセンスであってもネガティブセンスであっても、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。いくつかの実施形態では、前記機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸は、1又は複数の制御配列と作動可能に連結されてCYP4V2発現カセットを形成する。いくつかの実施形態では、そのような発現カセットは、送達及び／又は発現効率を高めるためにベクターにパッケージ化されている。

30

【0291】

コドンは3つのヌクレオチドのセットで構成され、特定のアミノ酸をコードするか、翻訳の終了をもたらす（すなわち、停止コドン）。アミノ酸の大部分（通常はメチオニンを除くすべて）は、複数のコドンによってコードされている。したがって、異なる核酸配列を使用して同じタンパク質を発現させることができる。同じタンパク質配列をコードする2つの核酸分子間の配列同一性は、0%～99%以上の範囲内であり得る。例えば、核酸配列（配列番号1）と別の核酸配列（配列番号2）は、両方ともヒトCYP4V2タンパク質（配列番号4）をコードするが、77%の配列同一性のみを共有する。

40

【0292】

核酸配列のコドン最適化は、コードされたアミノ酸配列を変更せずにタンパク質発現を改善及び／又は安定化しうる。コドンの最適化は、核酸配列に存在するコドンを、同じアミノ酸をコードする好ましいコドン、例えば、哺乳類の発現に好ましいコドンに置き換える。様々な戦略及びパラメーターをコドン最適化に使用可能であり、非限定的な例として、コドン使用バイアス、GC含有量、CpGジヌクレオチド含有量、mRNA二次構造、クリプティックスプライシング（cryptic splicing）部位、未熟なPolyA部位、内部カイ部位及びリボソーム結合部位、ネガティブCpGアイランド、RNA不安定性モチーフ（ARE）、反復配列（直接反復、逆反復、及び二組反復（dyad

50

repeat))、及びクローニングに干渉する可能性のある制限部位が挙げられる。コドン最適化の方法は、当技術分野で知られており、例えば米国特許第6,114,148号及び米国特許公開第20110081708号を参照。所与のアミノ酸配列のコドン最適化核酸配列又はポリペプチドをコードする核酸配列は、本明細書に記載の方法及び／又はオンラインソフトウェアなどの様々なコドン最適化ソフトウェアの使用により作成できる。

【0293】

使用されるコドン最適化の方法、構成、アルゴリズム、又はソフトウェアに応じて、同じタンパク質をコードする異なるコドン最適化核酸配列を作成できることが理解されよう。しかし、コドンの最適化は、野生型の未改変核酸配列と比較して常に発現の改善をもたらすとは限らない。Alexeyev MF, Winkler HH:Gene synthesis, bacterial expression and purification of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase. Biochim Biophys Acta. 1999, 1419:299-306. 10.1016/S0005-2736(99)00078-4; Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS:Metabolic engineering of muconic acid production in Saccharomyces cerevisiae. Metab Eng. 2013, 15:55-66; Agashe D, Martinez-Gomez NC, Drummond DA, Marx CJ:Good codons, Bad transcript:large reductions in gene expression and fitness arising from synonymous mutations in a Key enzyme. Mol Biol Evol. 2013, 30 (3):549-560. 10.1093/molbev/mss273. doi:10.1093/molbev/mss273を参照。

【0294】

ヒトCYP4V2タンパク質(配列番号4)をコードするコドン最適化核酸配列(配列番号2)が本明細書で提示される。配列番号1及び配列番号2はいずれも、同じヒトCYP4V2タンパク質(配列番号4)をコードする。コドン最適化核酸配列(配列番号2)は、配列番号1に示される核酸配列のコドン適応指数(codon adaptation index(CAI))0.94よりも改善されたCAI0.95を有する。CAI1.0は、所望の発現生物において完全であると見なされる。本開示は、配列番号2に示すcDNA配列に代表されるように、あらゆるRNA配列、DNA配列、又は該cDNAに対応する若しくは由来する他の核酸配列を含む、あらゆるタイプのコドン最適化核酸配列の形態をカバーすることが理解されるであろう。また、前記核酸配列は、本明細書で提示される配列の一本鎖の形態であっても二本鎖の形態であってもよく、及び／又は同配列に対するポジティブセンスであっても、ネガティブセンスであっても、アンチセンスであっても、相補的センスであってもよいことが理解されるであろう。

【0295】

コドンの最適化に加えて、他の方法を使用して翻訳のパフォーマンスを向上させてもよい。たとえば、コザック(Kozak)配列又はシャイン・ダルガノ(Shine-Dalgarno)配列を使用して、翻訳開始の効率を高めてもよい。異なる終止コドン(例えば、TGA)を使用して、翻訳終結の効率を高めてもよい。ORF配列に加えて、機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸配列は、タンパク質発現を改善するためにUTR及び／又は1又は複数のイントロンなどの1又は複数の非コード配列も含んでいてもよい。発現を増強するために、コザック配列(例示的な配列を配列番号36に示す)がCYP4V2をコードするcDNAの直前に挿入されてもよい。

【0296】

本明細書で検討されるように、ヒトCYP4V2タンパク質の機能的バリエント及び／又は断片を利用できると考えられる。ヒトCYP4V2タンパク質(配列番号4)の機能的バリエント(配列番号5)をコードする核酸配列を、配列番号3に提示する。

【0297】

いくつかの実施形態では、CYP4V2核酸分子は、非限定的な例として配列番号4~30が挙げられる、任意の機能的CYP4V2タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子、又は配列番号4~30に示す配列のいずれかと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子である。いくつかの実施形

態では、CYP4V2 核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 のいずれかと少なくとも 60 %の配列同一性を有するポリヌクレオチドである。

【0298】

本明細書に記載のベクター（例えば、ウイルス又は非ウイルスベクター）及びCYP4V2 発現カセットは、典型的には1又は複数のCYP4V2 核酸分子又はその断片を含む。核酸分子は、多くの形態をとることができ、非限定的な例として、DNA又はRNA、一本鎖核酸（例えば、ssDNA、ssRNA）、二本鎖核酸（例えば、dsDNA、dsRNA）、プラス鎖又はマイナス鎖核酸、相補的DNA（cDNA）、ゲノムDNA、メッセンジャーRNA（mRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、及び／又はDNA指向性RNA干渉（ddRNAi）が挙げられることが理解されるであろう。核酸分子は、1又は複数のヌクレオチドアナログ又は骨格改変を含んでいてもよい。そして、cDNAは、逆転写酵素によって触媒される反応でmRNA鋳型から合成可能であり、又はコードすることを意図したタンパク質（非限定的な例としてコドン最適化cDNA）に基づいて設計及び合成可能であり、又は別の核酸分子から変異誘発により合成可能であることが理解されるであろう。また、cDNAはエクソンのみを含んでいてもよく、エクソンに他の配列、例えば非翻訳領域（UTR）及び／又はイントロンを含んでいてもよいことも理解されるであろう。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター及びCYP4V2 発現カセットは、ヒトCYP4V2 タンパク質又はその機能的バリエーション若しくは断片をコードする配列を有する核酸分子を含んでいてもよい。

【0299】

適切な核酸配列は、機能的CYP4V2 タンパク質をコードする任意の核酸配列であってよい。該核酸配列は、UTR、イントロン又はコザック配列などの非コード要素を含んでいても含んでいなくてもよい。野生型配列又は合成若しくは改変配列（例えば、コドン最適化配列）を含んでいてもよい。機能的CYP4V2 タンパク質をコードする核酸配列は、本明細書に記載のように作製してもよく、当技術分野で公知の他の方法によって作製してもよい。

【0300】

ヒトCYP4V2 タンパク質をコードする配列番号 1 に示す配列を有する核酸分子を、本明細書では「CYP4V2 st」と称する。ヒトCYP4V2 タンパク質をコードする配列番号 2 に示すコドン最適化配列を有する核酸分子を、本明細書では「CYP4V2 op」と称する。ヒトCYP4V2 タンパク質の機能的バリエーションをコードする配列番号 3 に示す配列を有する核酸分子を、本明細書では「CYP4V2 fv」と称する。いくつかの実施形態では、機能的CYP4V2 タンパク質をコードする核酸配列は、配列番号 1、2、又は 3 のいずれかと少なくとも 60 %の配列同一性を有する。

【0301】

機能的CYP4V2 タンパク質及びそのような機能的CYP4V2 タンパク質をコードする核酸分子は、当技術分野で公知の方法により合成又は単離、精製、及び検出することができる。さらに、タンパク質合成又は単離、精製、及び検出は、Wuxi Aptec（上海、中国）及びGenScript（ニュージャージー州ピスカタウェイ）などのCROでも商業的に提供されている。核酸分子の合成又は単離、精製クローニング、及び検出は、GenScript（ニュージャージー州ピスカタウェイ）及びIntegrated DNA Technologies（アイオワ州コーラルビル）を含むCROでも商業的に提供されている。

【0302】

ポリペプチドは（例えば、組換えタンパク質発現又は化学合成を介して）合成したものであっても単離したものであってもよい。本明細書で使用する「精製された」ポリペプチドは、天然では共に存在している細胞成分から分離又は精製されたポリペプチドである。典型的には、ポリペプチドは、乾燥重量で少なくとも 70 %（例えば、少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、又は 99 %）の割合で、当該ポリペプチドが天然では共に存在しているポリペプチド及び天然分子が除去されている場合、「精製された」

と見なされる。化学的に合成されるポリペプチドは、本来、天然では共に存在する成分から分離されているため、合成ポリペプチドは「精製」されている。

【0303】

ポリペプチドは、D E A E イオン交換、ゲルろ過、及びハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどの公知の方法によって、天然源（例えば、生体試料）から精製することができる。ポリペプチドは、例えば、発現ベクターで核酸を発現させることにより精製することもできる。さらに、精製されたポリペプチドを、化学合成により得ることもできる。ポリペプチドの純度は、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、又はHPLC分析などの適切な方法を使用して測定することができる。

【0304】

ポリペプチドは通常、抗体を使用して検出される。抗体を使用してポリペプチドを検出するための技術としては、酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）、ウェスタンブロット、免疫沈降、及び免疫蛍光法が挙げられる。抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよい。ポリペプチド又はポリペプチドの一部に対して特異的な結合親和性を有する抗体は、当技術分野で周知の方法を使用して作製することができる。抗体は、当技術分野で公知の方法を使用して、マイクロタイタープレートなどの固体支持体に付着させることができる。ポリペプチドの存在下で、抗体-ポリペプチド複合体が形成される。

【0305】

「単離された」核酸分子とは、典型的には、天然には当該単離された核酸分子が由来する生物のゲノム中において当該核酸の一端又は両端に隣接している配列、を有しない核酸分子を指す（例えば、cDNA又はPCR若しくは制限エンドヌクレアーゼ消化によって生成されたゲノムDNA断片）。そのような単離された核酸分子は、通常、操作の簡便さ、タンパク質の発現、融合タンパク質の生成、又は他の目的で（非限定的な例として、ベクター（例えば、ウイルス又は非ウイルスベクター）へのパッケージングなど）、通常、コンストラクト（例えば、遺伝子治療で使用するためのクローニングコンストラクト又は発現コンストラクト）に導入される。

【0306】

核酸は、当技術分野における常用技術を使用して単離され得る。例えば、核酸は、非限定的な例として組換え核酸技術、部位特異的変異誘発、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及び／又は他の遺伝子工学的な方法が挙げられる任意の方法を使用して単離することができる。一般的なPCR技術は、例えば、PCR Primer:A Laboratory Manual, Dieffenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に記載されている。組換え核酸技術としては、例えば、制限酵素消化及びライゲーションが挙げられ、これらを使用して核酸を単離することができる。変異誘発プロトコルは、例えば、In Vitro Mutagenesis Protocols, Braman, ed., Humana Press, 2002に記載されている。

【0307】

単離された核酸は、単一の核酸分子として、又は一連のオリゴヌクレオチドとして化学的に合成することもできる。

【0308】

核酸を含むコンストラクトは、当技術分野で公知である。クローニングコンストラクト及び発現コンストラクトなどのコンストラクトは、商業的にオーダーメイドすることができ、当技術分野における常用組換えDNA技術によって作製することもできる。コンストラクトは、発現させる核酸に作動可能に連結された制御配列を有してもよく、さらに選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）をコードする配列などの配列を含んでもよい。制御配列は本明細書で検討されている。核酸を含むコンストラクトは、キメラ又は融合ポリペプチド（すなわち、ポリペプチドのN末端又はC末端のいずれかであってもよい異種ポリペプチドに作動可能に連結されたポリペプチド）をコードしていてもよい。代表的な異種ポリペプチドとしては、コードされたポリペプチドの精製又は検出に使用できるものが挙げられる（例えば、6xHisタグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、CFP、Fc、FLAG、HA、Myc、RFP、Strep、VSV、GFP、及

10

20

30

40

50

びYFP)。

【0309】

核酸配列を運搬するコンストラクトは宿主細胞に導入することができる。本明細書で使用する「宿主細胞」という用語は、核酸が導入される特定の細胞を指し、コンストラクトを保有する当該細胞の子孫も含む。宿主細胞は、任意の原核細胞又は真核細胞であり得る。例えば、宿主細胞は、E. coliなどの細菌細胞、又は昆虫細胞、酵母、若しくは哺乳動物細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、COS細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、Vero細胞、V27細胞、A549細胞、K562細胞、B50細胞、WI38細胞、及びBHK細胞など)中の細胞であり得る。その他の宿主細胞としては、限定されるものではないが、iPS細胞、ES細胞、RPE細胞、iPS-RPE細胞、iPS-光受容体細胞、ES-RPE細胞、ARPE-19細胞、角膜細胞、光受容体細胞、脈絡膜細胞、視神経細胞、その他の種類の本明細書で検討される眼細胞、神経細胞、上皮細胞、血液細胞、線維芽細胞、リンパ球、及び幹細胞由来細胞が挙げられる。インビボ及びインビトロのいずれにおいても、宿主細胞に核酸、ベクター、又は核酸導入遺伝子を保有する発現カセットを導入するための多くの方法が当業者に周知であり、非限定的な例として、エレクトロポレーション、ソノポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール(PEG)形質転換、ヒートショック、リポフェクション、マイクロインジェクション、及びウイルス媒介核酸移動が挙げられる。

10

【0310】

核酸は、適切なオリゴヌクレオチド対(例えば、プライマー)を用いて、任意の数の増幅技術を使用して検出できる(例えば、PCR Primer:A Laboratory Manual, 1995, Diefenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY並びに米国特許番号第4,683,195号、第4,683,202号、第4,800,159号、及び第4,965,188号を参照)。当初のPCRに対する多くの改変が開発されており、核酸の検出に使用することができる。核酸はハイブリダイゼーションによっても検出できる。核酸間のハイブリダイゼーションの詳細については、Sambrook et al.で検討されている(1989, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、セクション7.37~7.57、9.47~9.57、11.7~11.8、及び11.45~11.57)。Sambrook et al.は、約100ヌクレオチド未満のオリゴヌクレオチドプローブの適切なサザンブロット条件(セクション11.45~11.46)及び約100ヌクレオチド超のオリゴヌクレオチドプローブのサザンブロット条件(セクション9.47~9.54を参照)を開示している。

20

30

【0311】

B. ベクター

いくつかの実施形態では、機能的CYP4V2タンパク質又はその断片をコードする核酸分子は、ベクターにより、治療を必要とする眼細胞に送達される。眼細胞への送達のために、治療用ベクターは、標的細胞への核酸分子(例えば、DNA、RNA)の送達において非毒性かつ効率的であることが望ましい。遺伝子治療ベクターは当技術分野で公知であり、ウイルスベクターであっても非ウイルスベクターであってもよい。

40

【0312】

細胞への核酸のインビボ導入のためのアプローチの1つとして、核酸分子、例えばcDNAなどのウイルスベクターの使用が挙げられる。ウイルスベクターによる細胞の感染には、標的細胞の大部分が核酸分子を受け取ることができるという利点がある。さらに、例えばウイルスベクターに含まれるcDNAによってウイルスベクター内にコードされる分子は、核酸分子を含むウイルスベクターを取り込んだ細胞で効率的に発現される。

【0313】

使用できるウイルスベクターの例としては、限定されるものではないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターなどのヘルペスウイルス(HV)ベクター、パピロー

50

マウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヒトフォーミーウイルス（H F V）ベクター、エプスタイン・バー（E p s t e i n B a r r）ウイルス（E B V）ベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター、及びレトロウイルスベクターが挙げられる。プラスミドを使用して、核酸分子を標的細胞に送達することもできる。いくつかの例では、ウイルスベクターは、組換え A A V（r A A V）ベクターなどの組換えウイルスベクターである。宿主細胞（例えば、対象の細胞）のゲノムに組み込まれるか、組み込まれる傾向のあるベクターもあれば、宿主細胞のゲノムへ組み込まれないか、組み込まれにくい傾向のあるベクターもある（例えば、染色体外発現）ことを、当業者は理解するであろう。

【0314】

組換え A A V（r A A V）ベクターは、遺伝子治療アプローチで一般的に使用されている。A A Vはパルボウイルスファミリーに属し、それぞれ一本鎖DNAを含んでいる。r A A Vベクターは現在、哺乳類細胞への遺伝子導入のための最も安全で効率的なプラットフォームであると考えられている（Salganik et al, 2015, Microbiol. Spectr., 3(4):doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014）。これまでに、12のA A V血清型（A A V 1～A A V 12）及び100超のバリエーションが、ヒト及び非ヒト霊長類の組織試料（例えば、Gao et al., 2005, Curr. Gene Ther., 5:285-97を参照）及び他の種から分離されている。本明細書に記載の方法では、天然に存在するA A V種類及び改変されたA A V種類のいずれも使用することができる。

【0315】

野生型A A Vは、3つのタンパク質V P 1、V P 2、及びV P 3で構成されるカプシド内に囲まれた線形の本鎖DNAゲノムを含んでいる。組換えA A V（r A A V）では、野生型A A Vゲノムのr e p遺伝子及びc a p遺伝子は、典型的に、パッケージングに必要なA A V末端逆位反復配列（I T R）に隣接する導入遺伝子発現カセットに置き換えられる。本明細書において、「r A A Vベクター」という用語は、1又は複数のA A Vウイルスの1又は複数のカプシド要素、又は1又は複数のA A Vウイルスに由来する1又は複数のカプシド要素を含む組換えA A Vベクターを指す。

【0316】

A A V及び他のウイルスベクター媒介遺伝子治療の利点にもかかわらず、全てのウイルスベクター及びすべてのA A V型が特定の疾患の治療に適しているわけではない。ウイルスベクター（例えば、A A Vベクター）を使用した遺伝子治療が直面する2つの大きな課題：第一に、治療の標的となる細胞型において、A A Vベクターによる十分な形質導入効率が望まれる。第二に、ウイルスベクターによって引き起こされる潜在的な免疫反応を考慮する必要がある。Madsen et al., Adeno-associated virus serotype 2 induces cell-mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1. J Gen Virol 90, 2622-2633 (2009)、Mingozzi et al., CD8(+)T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. Nat Med 13, 419-422 (2007)を参照。他のほとんどの臓器や組織と比較して、眼は他の多くの臓器に比べて免疫的に有利な臓器と見なされており、眼におけるA A Vを介した遺伝子治療における免疫応答は免疫抑制剤の使用により調節できるが、眼のA A V伝達における中和抗体（n e u t r a l i z i n g a n t i b o d y（N A B））などの免疫応答の役割は、大型動物では不明である。さらに、硝子体内A A V投与は、網膜下投与よりも免疫系との相互作用の影響を受けやすい。したがって、潜在的な副作用を回避し、ウイルスベクターの形質導入／発現効率が、例えば対象中既に存在しているN A Bなどの免疫反応によって実質的に低下しないようにするため、及び／又はr A A Vベクターの用量を低減させるために、眼の遺伝子治療で使用するウイルスベクターは、免疫応答を最小限とするか全く引き起こさないようにする。

【0317】

これらの課題に対処するためには、A A Vベクターの設計及び選択に関連する様々な組成及び方法を使用することができる。B C Dの治療のためにC Y P 4 V 2遺伝子治療を使

10

20

30

40

50

用する場合、治療の標的となる細胞が主にRPE細胞である場合、RPE細胞で十分な形質導入効率を持つベクターが望ましい。BCD患者の角膜細胞を治療する場合、角膜細胞で十分な形質導入効率を持つベクターが望ましい。いくつかの実施形態では、RPE細胞で十分な形質導入効率を持つベクターが使用される。いくつかの実施形態では、角膜細胞で十分な形質導入効率を持つベクターが使用される。いくつかの実施形態では、RPE及び光受容体細胞で十分な形質導入効率を持つベクターが使用される。いくつかの実施形態では、RPE、光受容体、及び脈絡膜細胞で十分な形質導入効率を持つベクターが使用される。いくつかの実施形態では、網膜細胞に十分な形質導入効率を持つベクターが使用される。いくつかの実施形態では、眼細胞で十分な形質導入効率を持つベクターが使用される。いくつかの実施形態では、眼細胞及び／又は血液細胞で十分な形質導入効率を持つベクターが使用される。潜在的な免疫応答（例えば、遺伝子治療ベクターに対するNAB及び細胞ベースの免疫応答）に対処するために、様々なAAV血清型及びバリエーション、改変AAVベクター、及び／又は免疫抑制プロトコルを使用することができる。

10

【0318】

本明細書で使用されるrAAVベクターは、野生型AAV（例えば、AAV1～AAV12のいずれか、又はヒト若しくは他の種から単離された他の野生型AAVバリエーション（非限定的な例としてAAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、及びAAV12が挙げられる））に基づく又は由来するものであってもよく、改変AAVに基づく又は由来するものであってもよい。改変AAVは、改変様々な方法で作製することができ、限定されるものではないが、偽型AAV（例えば、AAV2/5、AAV2/8、AAV2/1、AAV2/4、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/9、AAV2/12、AAV8/2）、キメラAAV（例えば、AAV-DJ）、カプシド改変AAV（例えば、カプシド変異体AAV（例えば、Y-F、K-R、T-A、S-A及び／又はT-V変異を有するAAV、並びにAAV-DJのカプシド変異体AAVであるAAV-DJ/8又はAAV-DJ/9））、カプシドバリエーションAAV（例えば、AAV 7m8及び誘導体）、祖先AAV（例えば、Anc80）、天然に存在するAAV又はバリエーションのゲノム及び／又はカプシドへの任意の変化を含む組換えAAV、及びそれらの任意の組み合わせが挙げられる。改変AAVに言及するとき、限定されるものではないが、人工、修飾、合成、再構築、改変、進化、設計、誘導、又は強化されたAAV、若しくは合理的設計法及び／又は定向進化法及び／又はDNAシャッフリングによって作製されたAAV、又はAAVバリエーションなどを含む様々な方法があることが理解されるだろう。改変AAVの使用には、未改変AAVとくらべていくつか利点があり、限定されるものではないが、より高い形質導入効率、より高い組織特異性又は細胞特異性、より少ない免疫反応、及び／又は特定の種類の投与（例えば、硝子体内注射、又は血流による送達）により適していることなどが挙げられる。

20

30

【0319】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用される改変AAVベクターは、偽型（pseudotyped）AAVである。AAVシュードタイピング（pseudotyping）とは、異なるウイルス血清型からのカプシドとゲノムとの混合を指す。これらの血清型はスラッシュ（/）を使用して示されており、AAV2/5は、血清型5のカプシドにパッケージ化された血清型2のゲノム（例えば、ITR）を含むウイルスを示す。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、AAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/8、AAV2/6、AAV2/9、AAV2/4、AAV2/7、AAV2/10、又はAAV2/12ベクターである。

40

【0320】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用される改変AAVベクターは、異なるAAV血清型（異なる種から単離された異なるAAV血清型を含む）に由来するキメラ（ハイブリッド又はシャッフルとも称される）AAVである。いくつかの実施形態では、AAVベクターはAAV-DJ、AAV-DJ/8又はAAV-DJ/9である。AAV-DJは、DNAシャッフリング法により8つの血清型のAAVハイブリッドのライブラリから生

50

成された AAV バリエーションである。Grimm, D. et al. (2008). J. Virol. 82:5887-5911。これは眼細胞などの広範な種類の細胞を効率的に形質導入することができる。さらに、キメラ AAV は、天然の AAV よりも免疫中和を回避する能力が高いため、より大量の治療的導入遺伝子を効率的に送達できる。ハイブリッド AAV はさらに改変してもよい。例えば、AAV-DJ/8 及び AAV-DJ/9 は、AAV-DJ のヘパリン結合ドメイン (heparin binding domain (HBD)) に点変異を作製することによって作製された。Grimm, D. et al. (2008). J. Virol. 82:5887-5911。

【0321】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用される改変 AAV は、カプシド変異体 AAV である。これには、AAV カプシドタンパク質に 1 又は複数の変異 (例えば、点変異) を作製することが含まれる。カプシド変異体 AAV は、未改変 AAV よりも利点を有する。例えば、AAV カプシドタンパク質の表面露出チロシン (Y) 残基の点変異は、リン酸化及びそれに続くユビキチン化を回避し、インビトロ及びインビボのいずれにおいてもより高い形質導入効率をもたらす簡単で効果的な方法として報告された (Zhong et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(22):7827-32; Markusic et al., Mol Ther. 2010;18(12):2048-56、Li et al., Hum Gene Ther. 2010 Nov;21(11):1527-1543)。例えば、7 つの AAV2 カプシドチロシン残基 (Y252、Y272、Y444、Y500、Y700、Y704、及び Y730) のそれぞれのフェニルアラニン残基置換による部位特異的変異誘発は、インビトロのヒト細胞及びインビボのマウス肝細胞において、EGFR-PTK リン酸化及びユビキチン-プロテアソーム経路を回避することにより、ベクター形質導入及び導入遺伝子発現の増加をもたらす (Zhong et al., Virology. 2008 Nov 25;381(2):194-202)。また、特定のチロシン (Y)、セリン (S)、スレオニン (T)、及びリジン (K) 残基での AAV カプシドの点変異が、インビトロでもインビボでも有意な形質導入の改善につながる可能性があることが報告されている (Gabriel et al., Hum Gene Ther Methods. 2013;24(2):80-93、Sen et al., Hum Gene Ther Methods. 2013;24(2):104-16、Sen et al., Sci Rep. 2013;3:1832、Wu et al., J Virol. 2006;80(22):11393-7)。カプシド変異を改変 AAV に対して行って、別の改変 AAV を作製してもよい。例えば、AAV-DJ/8 及び AAV-DJ/9 は、ハイブリッド AAV である AAV-DJ のヘパリン結合ドメイン (HBD) に点変異を作製することによって作製された。Grimm, D. et al. (2008). J. Virol. 82:5887-5911。カプシドの変異によれば、AAV に NAB を回避し、免疫応答を低下させることもできる。さらに、特定のカプシド変異により、AAV は硝子体内送達により適したものになることができる。Kay et al., PLoS One, 8:e62097, 2013。いくつかの実施形態では、本明細書で使用される AAV ベクターは、1 又は複数のカプシド変異を有する改変 AAV であり、カプシド変異としては、限定されるものではないが、チロシンからフェニルアラニン (Y-F)、スレオニンからバリン (T-V)、リジンからアルギニン (K-R)、スレオニンからアラニン (T-A)、セリンからアラニン (S-A)、及び/又は、AAV のヘパリン結合ドメイン (HBD) 及び/又は抗原性領域 (非限定的な例として 459 位、493 位及び 551 位が挙げられる) に影響を与えるものが挙げられる。いくつかの実施形態では、AAV ベクターは、Y444F、Y500F、Y730F、Y252F、Y272F、Y700F、Y704F、及び T491V のうちの 1 又は複数のカプシド変異を有する AAV2 である (番号 (444 など) は AAV カプシドの点変異の位置を示す)。いくつかの実施形態では、AAV ベクターは、Y263F 及び Y719F のうちの 1 又は複数のカプシド変異を有する AAV5 である。いくつかの実施形態では、AAV ベクターは、Y447F、Y733F、及び T494V のうち 1 又は複数のカプシド変異を有する AAV8 である。ある実施形態では、AAV ベクターは Y731F のカプシド変異体を有する AAV1 である。いくつかの実施形態では、AAV ベクターは、Y445F 及び Y731F のうちの 1 又は複数のカプシド変異を有する AAV6 である。いくつかの実施形態では、AAV ベクターは、Y731F のカプシド変異を有する AAV9 である。いくつかの実施形態では、AAV ベクターは、K137R、T251A、及び S503A のうちの 1 又は複数

10

20

30

40

50

のカプシド変異を有するAAV-DJ、AAV-DJ/8又はAAV-DJ/9である。

【0322】

いくつかの実施形態では、改変AAVベクターは、バリエーションAAVカプシドタンパク質を含むAAVである。バリエーションAAVカプシドタンパク質は、当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、非天然カプシドタンパク質は、異種配列（例えば、異なる選択されたAAV血清型、同じAAV血清型の非連続部分、非AAVウイルス源、又は非ウイルス源から得られた配列）と組み合わせた選択されたAAV配列（例えば、vp1カプシドタンパク質の断片）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、改変AAVベクターは、カプシドタンパク質GHループにアミノ酸（例えば、約5アミノ酸～約11アミノ酸）の1又は複数の挿入を含む。バリエーションAAVカプシドタンパク質は、非バリエーションAAV（例えば、野生型AAV）による網膜細胞の感染性と比較して、網膜細胞の感染性を増加させる可能性がある。いくつかの実施形態では、改変AAVは、導入遺伝子を血液眼関門（BOB）全体に送達できるものであり、これにより血流を介した送達に適するものになり、眼の遺伝子治療に使用される従来の投与（例えば、網膜下注射又は硝子体内注射）に対する代替の投与経路/送達経路が提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションAAVカプシドタンパク質を含むAAVは、AAV 7m8又はその誘導体若しくはバリエーションである（Dalkara et al., Science Translation Medicine, 5:189ra76, 2013、PCT国際出願PCT/US2012/034413、PCT国際出願PCT/US2014/039015、米国特許出願第14/214,011号、及び米国特許出願第13/899,481号）。いくつかの実施形態では、バリエーションAAVカプシドタンパク質を有するAAVは、AAV-PHP.Bである。

【0323】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、ウイルス進化系統の再構築を通じて再構築又は合成することができる。このような再構築により、先祖、古代、又は親のAAVを作製しうる。一実施形態では、AAVベクターは、Anc80（AAV1、2、8、及び9の祖先）又はその誘導体である。Zinn et al., Cell Rep. 2015 Aug 11;12(6):1056-68。

【0324】

いくつかの実施形態では、1又は複数のAAV及び/又は他のウイルスベクターは、例えば「定向進化法」及び/又は「合理的設計法」などの当技術分野で公知の技術によって改変できる（例えば、硝子体内送達、標的細胞型（例えば、RPE細胞）における増強された形質導入、又は血流による送達のために最適化される）。例えば、Asuri et al., Mol Ther. 20:329-338, 2012 and Yang et al., Methods Mol Biol. 709:127-139, 2011を参照。改変AAV又は他のウイルスベクターは、例えば、「改変された」、「ハイブリッド」、「進化した」、「強化された」、又は「設計された」ベクターと説明されうる。このような改変は、例えば、ベクターターゲティング（例えば、硝子体内送達又は血流を介した送達に対する適合性の改善）、形質導入効率を改善し、及び/又は免疫反応を低下させ、例えば、必要とされる用量をより低減することができる。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、AAV血清型rh10（EP 20100178940）又はShH10である。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、AAV-PHP.B（米国特許公開第20150079038号）である。

【0325】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、本明細書に記載されている複数の戦略の組み合わせから作製及び/又は選択することができる。例えば、AAV-DJ/8及びAAV-DJ/9は、ハイブリッドAAVであるAAV-DJのヘパリン結合ドメイン（HBD）に点変異を作製することによって作製された。

【0326】

いくつかのAAVが他のいくつかのAAVよりも硝子体内送達により適している可能性があることは当技術分野で公知である。硝子体内送達のためのそのようなAAVの多くは、変異によるAAVカプシドタンパク質の改変を伴う（例えば、AAV2（Y-Fを4つ

10

20

30

40

50

(quadY-F) + T-V) (Kay et al., PLoS One. 2013 Apr 26;8(4)) 又はバリエーションAAVカプシドタンパク質 (例えば、AAV 7m8)。さらに、例えばAAV-PHP.Bなど、血流を介した送達に適したAAVが存在する。しかし、それらの使用は、硝子体内送達又は血流を介した送達に限定されず、例えば、網膜下投与及び他の投与経路用のAAVベクターとして使用することもできる。

【0327】

いくつかの実施形態では、自己相補的AAVベクター (scAAV) が使用される。野生型AAVは一本鎖DNAゲノムを持っている。AAVの欠点の1つは、その一本鎖DNAゲノムにある。一本鎖AAVゲノムは細胞のDNA複製機構に依存して相補鎖を合成するため、導入遺伝子の発現は遅延し、二本鎖DNAほどロバストではない。我々は、CYP4V2遺伝子治療のために、従来の一本鎖AAVベクターで遅延となる第二鎖合成を回避し、ロバストな導入遺伝子発現を促進するscAAV設計を開発した (図7を参照)。scAAV.CYP4V2は、宿主細胞DNA合成を不要とする分子内自己相補的CYP4V2 DNA構造を備えており、形質導入時のより高速かつロバストな発現を実現する。しかしながら、scAAVの自己相補的構造は、scAAVベクターのパッケージングの制限を、ssAAVの約4.7~5.0 kbからscAAVの約2.4~2.5 kbに低減する。したがって、scAAV設計には、より短い長さの制御配列 (例えば、プロモーター、エンハンサー、及び/又はポリAシグナル) が必要である。発現カセットがベクターパッケージングの制限を超えないようにし、また使用するcDNAやその他の制御配列の長さに応じて、エンハンサーなどのいくつかのオプションな制御配列をscAAVコンストラクトから除外する必要がある。scAAV設計の2つのITRの1つは、切断型ITRであり、末端分離部位 (terminal resolution site (TRS)) に変異を有する。scAAVの構造、精製、及び生産に関する詳細な検討については、McCarthy, Molecular Therapy, Volume 16, Issue 10, p1648-1656, October 2008を参照。

【0328】

他の多くのベクター設計も利用可能である。例えば、デュアルベクターシステム (例えば、AAVベースのデュアルベクターシステム、例えば、トランススプライシング又はハイブリッドデュアルAAVベクター) を使用して、核酸配列 (例えば、CYP4V2核酸配列) を発現させることができる。例えば、Colella, et al., Gene Ther. 21, 450-456, 2014を参照。例えば、デュアルベクターシステムは、

(i) ポリヌクレオチドの各末端 (5' 及び 3' 末端) に末端逆位反復配列を有し、前記末端逆位反復配列間に、目的の核酸配列によってコードされるタンパク質のN末端部分をコードする部分的コード配列に作動可能に連結された適切なプロモーターを有する、第1のAAVベクターポリヌクレオチド、及び

ii) ポリヌクレオチドの各末端 (5' 及び 3' 末端) に末端逆位反復配列を有し、前記末端逆位反復配列間に、目的の核酸配列によってコードされるタンパク質のC末端部分をコードする部分的コード配列と、それに続くポリアデニル化 (pA) シグナル配列と、を有する第2のAAVベクターポリヌクレオチド、を含んでいてもよい。

【0329】

scAAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、scAAV2/5、AAV2/8、scAAV2/9、AAV2/2 (Y444F+Y500F+Y730F) を含む、様々なrAAVベクターが本研究用に設計及び生成された (図7の模式図及び注釈を参照)。それらは、様々なベクター設計のrAAVベクターをCYP4V2遺伝子治療に使用できることを実証する。さらに、複数のrAAVベクターを選択肢に含めることは、患者集団内の特定のAAV種類に対する既存の中和抗体及び他の個々の免疫応答を考慮すると、CYP4V2遺伝子治療における潜在的な免疫応答を減らすことに有用となり得る。また、同一の眼への引き続き投与や同じ対象の反対側の眼への投与が望ましい場合、より多くのオプションが提供されるであろう。

【0330】

ウイルス送達ベクターを作製する方法（ヘルパーフリーシステムを使用する作製など）は、当技術分野で公知である。例えば、PCT/US2007/010055号、米国特許第6458587号、及び米国特許第6428988号（B1）を参照。遺伝子治療で使用される様々なベクター（非限定的な例としてAAV、アデノウイルス、レンチウイルス、及びレトロウイルスベクターなど）の作製については、契約研究機関（CRO）及び契約製造機関（CMO）、例えばVector Biolabs（ペンシルベニア州マルバーン）及びCell Biolabs, Inc.,（カリフォルニア州サンディエゴ）によっても商業的に利用可能である。

【0331】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法において有用な組換えAAVベクターは、AAV血清型カプシドタンパク質又はその断片をコードする核酸分子；rep遺伝子；AAV末端逆位反復配列（ITR）及び目的の核酸分子（例えば、CYP4V2核酸配列を有する）を少なくとも含むミニ遺伝子；及び目的の核酸を前記AAVカプシドタンパク質にパッケージ化するのに十分なヘルパー機能、を含む宿主細胞（例えば、HEK293細胞）を培養することにより作製することができる。核酸をAAVカプシドにパッケージ化するために宿主細胞で培養する必要がある成分は、シス又はトランスで宿主細胞に提供することができる。または、必要な成分（例えば、目的の核酸分子、rep配列、cap配列、及び／又はヘルパー機能）の1又は複数を、1又は複数の前記必要な成分を含むように改変された安定な宿主細胞によって提供することができる。これらの成分はいずれも、適切な血清型の中から選択することができる。例えば、rAAVベクターは、

（a）2つのAAV ITRに隣接する、目的の遺伝子（例えば、CYP4V2をコードするcDNA）及び他の所望の制御配列で構成される、クローニングされた組換えAAVゲノムを含むプラスミド（AAV cisプラスミド）、

（b）AAVウイルスRep遺伝子及びCap遺伝子をトランスで発現する別個のコンストラクト、及び

（c）アデノウイルス感染、又はアデノウイルスヘルパー因子を提供する第三のプラスミドをプロデューサー細胞にトランスフェクトすることにより提供されるアデノウイルスヘルパー因子、

をプロデューサー細胞（例えば、HEK293細胞）にコトランスフェクトすることにより作製される。HEK293細胞の他、非限定的な例としてHeLa細胞、Vero細胞、A549細胞、B50細胞、WI38細胞、及びBHK細胞などが挙げられる他の細胞系をrAAVベクターの作製に使用してもよい。

【0332】

いくつかの実施形態では、ウイルス送達ベクターは、rAAV2ウイルス、rAAV2/5ウイルス、rAAV2/8ウイルス、rAAV2/1ウイルス、rAAV2/4ウイルス、rAAV2/6ウイルス、rAAV2/9ウイルス、rAAV2/12ウイルス、又は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV8、AAV9、及び／又はAAV12ウイルスの1又は複数からのカプシド要素を持つrAAVウイルスである。一実施形態では、ウイルス送達ベクターは、非限定的な例としてAAV2（Y444F+Y500F+Y730F）、又はAAV8（Y733F）が挙げられる1又は複数のY-F変異を有するrAAVウイルスである。

【0333】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス送達ベクターは一本鎖rAAV（ssAAV）ウイルスである。いくつかの実施形態では、前記ウイルス送達ベクターは、自己相補的rAAV（scAAV）ウイルスである。

【0334】

AAVベクターに加えて、他のウイルスベクターをCYP4V2遺伝子治療に使用してもよい。例えば、アデノウイルスベクターも遺伝子送達に有用であることが実証されている。例えば、Mori et al., 2002. IOVS, 43:1610-1615には、導入遺伝子（緑色蛍光タ

10

20

30

40

50

ンパク質)がCMVプロモーターによって駆動される、E-1が欠失し、部分的にE-3が欠失した5型Adであるアデノウイルスベクターの使用が記載されている。10⁷~10⁸個のウイルス粒子の注入により発現レベルのピークが得られ、網膜下注入では硝子体内注入よりも高いレベルの発現が得られた。

【0335】

いくつかの実施形態では、前記送達ベクターは、ヒトCYP4V2タンパク質又はその機能的バリエーション若しくは断片をコードする核酸分子を含むプラスミドである。

【0336】

CYP4V2遺伝子治療には非ウイルスベクターも使用可能である。非ウイルスベクターの例としては、裸の(naked)核酸、デンドリマー、リボソーム(例えば、カチオン性又はアニオン性リボソーム)、ポリマー(例えば、ポリプレックス)、脂質ポリマー系、及びナノ粒子(例えば、無機又は合成ナノ粒子)が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Farjo et al., 2006, PLoS 1:e38では効率的な非ウイルス性眼遺伝子導入が実証されており、ここでは、眼組織への非ウイルス性遺伝子導入のシステムとして、圧縮されたDNAナノ粒子が使用されている。概念実証として、CMV最初期(immediate-early)プロモーター及びエンハンサーによって転写調節される強化緑色蛍光タンパク質(GFP)cDNAをコードするpZEGFP5.1(5,147bp)発現コンストラクトが使用された。プラスミドDNAを、公知の方法を使用してCK30PEG10K(N末端に、マレイミド連結部分を介して10kDaポリエチレングリコールと連結しているシステインを有する、30-merリジンペプチド)と混合することにより、DNAナノ粒子が作製された。ナノ粒子は、生理食塩水中のDNAが4mg/mLとなるまで濃縮された。圧縮されたDNAは、硝子体腔に0.6µgの用量で送達された。PCR及び顕微鏡検査により、水晶体、網膜、及び色素上皮/脈絡膜/強膜におけるGFPの発現が観察された。

【0337】

さらに、眼遺伝子導入方法に関する多くの特許が発行されており、非限定的な例として、ヒアルロン酸媒介アデノウイルス形質導入の方法を提供する米国特許第7,144,870号、レンチウイルスベクター及び眼遺伝子送達を媒介するためのそれらの使用を提供する米国特許第7,122,181号及び米国特許第6,555,107号、単純ヘルペスウイルスベクター及び眼遺伝子送達を媒介するためのそれらの使用を提供する米国特許第6,106,826号、及びDNA発現ベクター及び眼遺伝子送達を媒介するためのその使用を提供する米国特許第5,770,580号が挙げられる。

【0338】

様々なベクターからCYP4V2遺伝子治療で使用するのに適したベクターをスクリーニング及び選択する方法は、本明細書の実施例セクションで提示される。実施例では、様々なAAVベクターを使用してかかる方法を説明している。そのような方法は、当業者が様々な種類のベクターを比較及び選択するために(ウイルスvs. 非ウイルスベクター、アデノウイルスvs. AAV、レンチウイルスvs. AAV、HSVvs. AAVなど)使用してもよいことは理解されるだろう。

【0339】

C. CYP4V2発現カセット及び制御配列

本開示はまた、機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸配列(例えば、配列番号1、2、又は3の核酸配列)及びCYP4V2をコードする核酸配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む発現カセットを提供する。機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸分子に加えて、CYP4V2遺伝子治療で使用する発現カセットの他の重要な要素には、前記核酸分子の発現を調節するための1又は複数の制御配列が含まれる。いくつかの実施形態では、前記発現カセットは、送達、形質導入、及び/又は発現の効率の向上のために、送達ベクター(例えば、両側にAAV ITRが存在するrAAVベクター)にパッケージ化されている。本明細書に記載の方法では、任意のAAV ITRを使用することができる。本明細書の実施例に記載されるssAAVベクターは、それぞれ

約141bpの2つのAAV2 ITRを含む（例示的な配列を配列番号42及び43に示す）。実施例に記載されたscAAVベクターは、2つのAAV2 ITRを含み、そのうちの1つは切断型である（例示的な配列を配列番号44及び45に示す）。AAV2 ITRの長さは通常、使用される親ベクターに応じて約132bp～約167bpである。
【0340】

本明細書で使用される「制御配列」という用語は、核酸配列の複製又は発現（転写又は翻訳）に制御効果を及ぼす、又は、その他の方法で核酸配列の発現を指示する、影響を及ぼす、及び／又は制御することができる任意の遺伝的要素（例えば、ポリヌクレオチド配列）を指す。一般的な発現制御配列としては、プロモーター、ポリアデニル化（poly A）シグナル、エンハンサー、上流制御ドメイン、イントロン、UTR、応答要素又は誘導要素、複製起点、内部リボソーム進入部位（IRES）、転写開始配列、終止配列、スプライシングやポリアデニル化（poly A）配列などのRNAプロセッシング配列、細胞質mRNAを安定化する配列、翻訳効率を高める配列（すなわち、Kozakコンセンサス配列）、タンパク質の安定性を高める配列、又はコードされたタンパク質の分泌を高める配列が挙げられる。制御配列は、細菌、酵母、昆虫、哺乳動物、又はウイルス起源のものであっても、その誘導体、ハイブリッド、又はバリエーションであっても、合成物であってもよく、ベクターは異なる起源の制御配列の組み合わせを含んでいてもよい。例えば、制御配列は、発現を制御しているコーディング配列（例えば、CYP4V2遺伝子）に対して、異種（例えば、異なる起源又は異なる遺伝子、例えば、非CYP4V2遺伝子由来）であっても同種（例えば、同じ遺伝子、例えば、CYP4V2遺伝子由来）であってもよい。本明細書で使用される「作動可能に連結された」という表現は、核酸コード配列の発現を指示する、影響を及ぼす、又は制御するように、プロモーター及び／又は他の制御配列が核酸コード配列に対して配置されることを意味する。制御配列は、同じベクターにおいて、又は異なるベクターにおいて、核酸コード配列と「作動可能に連結」することができる。核酸コード配列に作動可能に連結された1又は複数の制御配列は、連続的であってもよく、及び／又は核酸コード配列の発現を指示する、影響を及ぼす、又は制御するためにトランスに又は遠隔的に作用してもよい。制御配列の中で、プロモーターは必須であり、エンハンサー、イントロン、ターミネーターなどの他の制御配列は有用ではあるがオプションである。

【0341】

様々なプロモーター配列を使用して、核酸コード配列の発現を促進することができる。実質的にすべての組織及びほとんどの細胞型で発現を誘導する構成的プロモーターもあれば、より調節されているプロモーターもある。制御されたプロモーターは、特定の組織又は細胞でのみ作用する（すなわち、組織又は細胞特異的プロモーター）、又は発達中の特定の時間でのみ作用する（すなわち、発達段階特異的プロモーター）ことがあり、環境条件又は化学物質、酸素レベル、熱、若しくは光などの外部刺激（すなわち、誘導性プロモーター）に条件付けられていてもよい。

【0342】

いくつかの例では、構成的（又は遍在的）プロモーターを使用することが望ましい場合がある。例示的な構成的プロモーターとしては、非限定的に、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（Gray et al., Hum Gene Ther. 2011 Sep;22(9):1143-1153、Norman et al., PLoS ONE 5(8):e12413, Aug 2010）、ニワトリβ-アクチンプロモーター、CMV／ニワトリβ-アクチン／ウサギβ-グロビン由来のハイブリッドCAG（CAGGS、CBA、又はCBとしても知られる）プロモーター（Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K, Yamamura K. 1989. Expression vector system based on the chicken β-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. Gene 79:269-277、Acland, G. M. et al. Mol Ther, 2005, 12:1072-1082）、小型CBA（smCBA）プロモーター（約953bp、Mah, et al. 2003, Hum. Gene Ther. 14:143-152、Haire, et al. 2006 IOVS, 2006, 47:3745-3753を参照）、CBhプロモーター（約800bp、Gray et al., Hum Gene Ther. 2

011 Sep;22(9):1143-1153を参照)、ヒト β -アクチンプロモーター (ACTB) (Norman et al., PLoS ONE 5(8):e12413, Aug 2010)、伸長因子1 α (EF-1 α) プロモーター (Gill et al., Gene Ther. 2001;8(20):1539-1546、Norman et al., PLoS ONE 5(8):e12413, Aug 2010を参照)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK、ヒト又はマウス) プロモーター (Norman et al., PLoS ONE 5(8):e12413, Aug 2010)、ユビキチンC (UBC) プロモーター (Norman et al., PLoS ONE 5(8):e12413, Aug 2010)、GUSB (β -グルクロニダーゼ) プロモーター、GUSB最小プロモーター (hGBp) (Husain, Gene Therapy (2009)16, 927-932)、UCOEプロモーター、伸長因子1 α 短 (EFS) プロモーター、シミアンウイルス40 (SV40) プロモーター、及びラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus (RSV)) プロモーターが挙げられる。様々なプロモーターの一般的な比較と検討については、例えば、Powell, Discov Med. 2015 Jan;19(102):49-57を参照。いくつかの場合、「構成的」又は「遍在的」プロモーターは、選択された細胞型でサイレンシングされる傾向にあり、発現強度を差別的に促進したりすることが理解されるべきである。例えば、McCown et al., Brain Res. 1996;713(1-2):99-107、Gray et al., Hum Gene Ther. 2011;22:1143-1153を参照。

【0343】

いくつかの例では、特定の種類の細胞又は組織における核酸コード配列の発現を指示する細胞特異的又は組織特異的プロモーターを使用することが望ましい。本開示に基づいて、細胞特異的又は組織特異的プロモーターは、眼細胞、眼組織、又はリンパ球に特異的であってもよいことが理解されよう。眼細胞の種類としては、網膜細胞、網膜双極細胞、光受容体細胞、桿体細胞及び錐体細胞、神経節細胞、網膜色素上皮 (RPE) 細胞、脈絡膜細胞、又は角膜上皮細胞が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、本明細書に記載される細胞特異的プロモーターは、網膜特異的プロモーター (例えば、RPE特異的、光受容体特異的 (例えば、錐体特異的及び／又は桿体特異的) 及び／又は脈絡膜特異的) 又は角膜特異的プロモーターであってもよい。例示的な眼細胞特異的プロモーターとしては、限定されるものではないが、ロドプシンキナーゼ1 (GRK1) としても知られるヒトGタンパク質共役型受容体タンパク質キナーゼ1プロモーター (GenBank受託番号AY327580)、GRK1プロモーターの292nt断片 (1793位-2087位) (Beltran et al., Gene Therapy 17:1162-74, 2010を参照)、ヒト光受容体間レチノイド結合タンパク質近位 (interphotoreceptor retinoid-binding protein proximal (IRBP)) プロモーター、hIRBPプロモーターの235nt断片、RPGR近位プロモーター、赤オプシンプロモーター、赤緑オプシンプロモーター、青オプシンプロモーター、マウスオプシンプロモーター (長型及び短型の両方、Le et al., Molecular Vision 2006;12:389-398、Beltran et al., Gene Therapy 17:1162-74, 2010)、ロドプシン (Rhodopsin) プロモーター (Mussolino et al., Gene Therapy, 18:637-45, 2011)、錐体トランスデュシンの α サブユニット (Morrissey et al., BMC Dev Biol, 11:3, 2011)、 β ホスホジエステラーゼ (PDE) プロモーター、網膜色素変性症 (RP1) プロモーター (Nicord et al., J. Gene Med. 9:1015-23, 2007)、NXNL2/NXNL1プロモーター (Lambard et al., PLoS One, 5:e13025, 2010)、RPE65プロモーター (Li et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, December 2002, Vol.43, 3640)、網膜変性スロー／ペリフェリン2 (Rds/perpH2) プロモーター (Cai et al., Exp Eye Res, 91:186-94, 2010)、VMD2プロモーター (BEST1としても知られる卵黄状黄斑ジストロフィー2、Kachi et al., Human Gene Therapy, 20:31-9, 2009)、IRBP/GNAT2プロモーター (錐体トランスデュシンの α プロモーターに融合したhIRBPエンハンサー)、網膜変性スロー (retinal degeneration slow (Rds)) プロモーター、hPDE6bプロモーター、又はVEcadプロモーター (VE-カドヘリン／カドヘリン5 (CDH5) /CD144プロモーター) が含まれる。本明細書で提示される理論的根拠及び議論に基づいて、本明細書で提供

10

20

30

40

50

される例示的なプロモーターのいずれかの代わりに、又はそれに加えて、当技術分野で他のプロモーターを使用できることは理解されるであろう。

【0344】

例示的な誘導性プロモーターとしては、限定されないが、カルシウム感受性プロモーター（例えば、NFA TPプロモーター、Gene Ther. 2013 Mar;20(3):248-54を参照）、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン（MX）プロモーター、デキサメタゾン（Dex）誘導性マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制系、テトラサイクリン誘導系、RU486誘導系、ラパマイシン誘導系、多数の市販の誘導性プロモーター、及び特定の生理学的状態（例えば、温度、急性期、細胞の特定の分化状態、又は複製中の細胞のみ）によって制御される誘導性プロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態では、前記誘導性プロモーターは、特定の眼細胞型に厳密に制御され、特異的である。

【0345】

プロモーターは、別のプロモーター及び／又は別の制御配列のハイブリッド、切断／短縮型若しくは改変型バージョンであるか、別のプロモーター及び／又は別の制御配列由来のものであってもよい。例えば、CAGプロモーターはCMV最初期（immediate early）エンハンサー、ニワトリβアクチンプロモーター、及びウサギβグロビン遺伝子のハイブリッドであり、smCBAプロモーターはCBAプロモーターの切断型である。プロモーターは、他の要素、例えばイントロン、エクソン及び／又はエンハンサー、例えばCAGプロモーターを含んでいてもよい。発現カセットで複数のプロモーターと一緒に使用してもよい。

【0346】

いくつかの例では、プロモーターにより生じる発現よりも発現を増加及び／又は安定化するためにエンハンサー配列を使用することが望ましい場合がある。代表的なエンハンサー配列としては、限定されるものではないが、転写後制御因子（例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後制御エレメント（WPREとしても知られる）、又はB型肝炎ウイルス転写後制御エレメント（HPRE又はHBVPREとしても知られる、Donello et al., J Virol. 1998 Jun;72(6):5085-92、Sun et al., DNA Cell Biol. 2009 May;28(5):233-240）、又は様々な短縮、変異体、若しくは改変型WPRE、例えば、WPREの最小γ及びα要素を含む約247bpまでの短縮型WPRE（Choi et al., Mol Brain. 2014;7:17、Donello et al., J Virol. 1998 Jun;72(6):5085-5092、Zanta-Boussif et al., Gene Therapy (2009)16, 605-619）、又は1RBPエンハンサー（Nicord et al., J. Gene Vied. 9:1015-23, 2007）、構成的輸送要素（constitutive transport element（CTE））エンハンサー（例えば、Mason-PfizerサルウイルスCTE又は鳥白血病毒ウイルスCTE）、サイトメガロウイルス（CMV）最初期（immediate early）エンハンサー、免疫グロブリン遺伝子又はSV40エンハンサーに由来するもの、又はマウス近位プロモーターで同定されたシス作用性要素、イントロン制御配列（例えば、SV-40に由来するSD-SAと称されるミニイントロンスプライスドナー／スプライスアクセプター）、単一の遺伝子転写物から複数のポリペプチドを生産するために使用できる内部リボソーム進入部位（IRES）（例えば、複数のポリペプチド鎖を含むタンパク質、又は2つの異なるタンパク質；RPE、光受容体、及び神経節細胞での導入遺伝子発現をサポートするポリオウイルスの内部リボソーム進入配列であってもよい）が挙げられる。

【0347】

転写産物のポリアデニル化は、核輸送、翻訳、mRNAの安定性にとって重要である。したがって、転写産物ポリアデニル化の効率、導入遺伝子の発現にとって重要である。代表的なポリAシグナル配列としては、限定されるものではないが、SV40ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル、SV40初期ポリAシグナル、ウシ成長ホルモンポリアデニル化（bGHポリA）シグナル、スモールポリA、又はヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル（hGHポリA）が挙げられる。いくつかの例では、ポリAシグナルの

効率を上げるために、上流エンハンサー（USE）配列を使用してもよい（例えば、SV40後期2×USE、HIV-1 USE（ヒト免疫不全ウイルス1）、GHV USE（地リス肝炎ウイルス）、アデノウイルス（L3）USE（アデノウイルス）、hTHGB USE（ヒトプロトロンビン）、又はhC2 USE（ヒトC2補体遺伝子））（Schambach A, Galla M, Maetzig T, Loew R, Baum C. Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. Mol Ther. 2007;15(6):1167-1173）。

【0348】

プロモーター配列と同様に、発現カセットで使用される他の制御配列は、制御配列のハイブリッド、切断／短縮型、改変型、又はその他の派生バージョンであってもよい。例えば、短縮型WPRE、SV40後期2×USE、SV40後期polyAである。本明細書に記載の要素に加えて、発現カセットは、他の制御配列、例えばイントロン、UTR、及びリンカー配列を含んでいてもよい。スプライス部位（すなわち、2つのイントロンが隣接するエクソン）が含まれると、発現カセットからのタンパク質の遺伝子発現を増加させるのに有用であることが実証されている。

【0349】

制御配列又はハイブリッド制御配列が複数のバージョンを有し、複数の名称を有することが一般的であることは、当技術分野で公知である。例えば、様々なプロモーター、エンハンサー、及びポリAシグナルには多くのバージョンがあり、非限定的な例として、CMVプロモーター、EF1 α プロモーター、WPREエンハンサー、及びSV40ポリAシグナルが挙げられる。CAGプロモーターは、CBAプロモーター、CBプロモーター、又はCAGGSプロモーターを含むがこれらに限定されない複数の代替名称を有する。また、制御配列を短縮、改変、又は他の配列と組み合わせ、誘導体又はバリエーションを作製することもでき、例えば、CAG（CBA、CB、又はCAGGSとしても知られる）プロモーターは、CMV最初期エンハンサー、ニワトリ β アクチンプロモーター、及びウサギ β グロビン遺伝子のハイブリッドであり、smCBAプロモーターは、切断型CAGプロモーターであり、CB^SBプロモーターは短縮型CAGプロモーターであって、CMV最初期エンハンサーの5'末端で約152bp異なるものであることも当技術分野で公知である。さらに、制御配列は別称で称されることもあり、例えば、HPRE又はWPREなどの転写後制御エレメントはエンハンサーとも称される。本明細書に記載の制御配列は、そのような制御配列のすべてのバリエーション、誘導体、及び／又はハイブリッドを想定している。制御配列に関して本明細書で提供される任意の例示的な配列は本質的に例示的なものであり、そのような制御配列の定義又は範囲を例示的な配列に示されるものに限定するものではない。

【0350】

いくつかの実施形態では、目的の発現特異性を達成するために（例えば、オフターゲット導入遺伝子発現の抑制）、microRNA（miRNA）技術を発現カセットの設計に使用してもよい。単に例として、限定されるものではないが、神経節細胞及び網膜細胞における、発現カセットに媒介されるCYP4V2タンパク質の合成を阻害するために、miR181（神経節細胞及び網膜内でのみ発現されることが示されているmiRNA）の標的配列をCYP4V2 cDNAの直下に付加してもよい。同様に、特定の細胞型における、発現カセットに媒介されるCYP4V2タンパク質の発現を抑制して、標的組織又は細胞特異的発現を達成するために、特定の細胞型でのみ発現されるmiRNAの標的配列を使用してもよい。

【0351】

D. CYP4V2遺伝子治療のための効率的な発現カセット及びデリバリーベクターの設計

CYP4V2発現カセット及び送達ベクターの設計方法及びこれらの研究のための様々な設計に関する詳細な検討は、本明細書の実施例セクションで提示される。

【0352】

眼疾患の治療における E F S プロモーター及び／又はスモールポリ A シグナル (S P A) の使用

本明細書で検討されるように、遺伝子送達ベクターにはパッケージングサイズの制限がある。例えば、一本鎖 A A V ベクターのパッケージング制限は約 4 . 7 ~ 5 . 0 k b で、これを超えると、形質導入及び発現効率が大幅に低下する。自己相補的 A A V (s c A A V) の場合、パッケージングの制限は約 2 . 4 ~ 2 . 5 k b へと半減する。したがって、ベクター媒介遺伝子送達及び遺伝子治療にとって、サイズは重要である。二本鎖自己相補的ベクターの場合、導入遺伝子 (例えば、c D N A) 用に十分なスペースを確保するために、小さなサイズの制御配列を使用することが望ましく、場合によっては重要である。このサイズ制限のため、大きなプロモーターも s c A A V での使用には適していない。C Y P 4 V 2 遺伝子治療の場合、c D N A のサイズが約 1 5 7 8 b p で、A A V I T R (変異あり) が約 2 5 8 b p であるとする、制御配列に残されているのは約 5 0 0 ~ 6 0 0 b p だけである。C Y P 4 V 2 はほぼ遍在的に発現されるため、いくつかの実施形態では、C Y P 4 V 2 導入遺伝子発現を駆動するためには構成的プロモーターを使用することが望ましい。しかしながら、一本鎖 A A V 設計で使用した約 1 . 7 k b の構成的 C A G プロモーター、約 9 5 3 b p の短縮型 C B A プロモーター (s m C B A) 、又は約 8 0 0 b p の C B h プロモーター、又は約 6 0 0 b p である C M V プロモーターなど他の多くの構成的プロモーターのためのスペースはない。その代わりに、s c A A V 設計用に短い長さの E F S プロモーターを使用することができる (例示的な配列を配列番号 3 4 に示す)。同様のサイズ制限は、ポリ A シグナルなど他の制御配列にも当てはまる。b G H ポリ A は約 2 2 5 b p 、S V 4 0 ポリ A は約 2 4 0 b p 、S V 4 0 後期ポリ A は約 1 2 0 b p である。それらのいずれも、プロモーターを含む制御配列のために残された約 5 0 0 b p の長さの大部分を占めるだろう。したがって、s c A A V 設計のために、約 5 4 b p (例示的な配列を配列番号 3 5 に示す) にすぎないスモールポリ A シグナル (S P A) が使用された。

【 0 3 5 3 】

E F S プロモーター及び S P A を使用する設計は約 3 0 0 b p を占有するにすぎず、A A V I T R とともに合計で約 6 0 0 b p を占有する。それにより、s c A A V 用に設計される発現カセット内の所望のタンパク質及び他の配列をコードする核酸配列のためには約 1 . 8 ~ 1 . 9 k b の残りのパッケージングスペースが残され、s s A A V 用に設計される発現カセット内の所望のタンパク質及び他の配列をコードする核酸配列のためには約 4 . 1 ~ 4 . 4 k b の残りのパッケージングスペースが残される。その結果、非限定的な例として C M V プロモーター、C A G プロモーター、s m C B A プロモーター、C B h プロモーター、E F 1 α プロモーター、b G H ポリ A 、S V 4 0 ポリ A 、及び S V 4 0 後期ポリ A が挙げられるより大きなプロモーター及びポリ A シグナル配列を使用する場合と比較して、E F S プロモーター及び S P A を含む r A A V ベクターには、より大きなサイズの c D N A 及び／又は他の配列をパッケージ化することができる。

【 0 3 5 4 】

E F S プロモーター及びその S P A を含む発現カセットの模式図を図 4 b に示す。図 7 b に示すコンストラクトには、C Y P 4 V 2 c D N A が含まれている。C Y P 4 V 2 c D N A は、他の導入遺伝子の発現に使用される発現カセットのために、別の目的遺伝子に置き換えてもよい。

【 0 3 5 5 】

本研究では、核酸コード配列を駆動して眼疾患を治療するための、発現カセット及び送達ベクターでの E F S プロモーター及び S P A の使用について試験を行った。E F S プロモーター、C Y P 4 V 2 c D N A 、及び S P A を含む s c A A V 2 / 1 ベクター (s c A A V 1 - E F S . C Y P 4 V 2 o p . S P A と称される) を作製した。s c A A V 1 - E F S - C Y P 4 V 2 o p - S P A を、B C D 患者の i P S - R P E 細胞に適用した。s c A A V 1 - E F S - C Y P 4 V 2 o p - S P A は、E F S プロモーター及び S P A の長さが短いにもかかわらず、わずか 4 日間で B C D 患者の i P S - R P E 細胞で高速かつロバストな作用を示した (表 3 を参照)。これは、E F S プロモーター及び／又は S P A が

、眼の遺伝子治療のための s c A A V システムで非常に有用な小さなサイズの制御配列であることを示している。さらに、s c A A V ベクターのロバストな発現により、s c A A V 設計が、網膜下送達に加えて他の投与経路（例えば、硝子体内送達）にも適したものになる。

【0356】

E F S プロモーター及び／又は S P A の使用は、C Y P 4 V 2 遺伝子治療又は s c A A V コンストラクトでの使用に限定されない。導入遺伝子のサイズ及び／又は s c A A V の設計において、高速で十分なタンパク質発現を行うためには短い長さのプロモーター及びポリ A シグナルを使用する必要がある、他の遺伝子に関係する遺伝子治療に使用することができる。

10

【0357】

E. 治療オプション、対象の選択及び投与

C Y P 4 V 2 遺伝子治療は、様々な方法で適用することができる。いくつかの例では、治療は、C Y P 4 V 2 発現カセットを含む送達ベクターを、治療の標的となる対象の細胞、組織又は臓器（例えば、R P E、光受容体、脈絡膜、角膜、リンパ球、網膜、又は眼）へ効果的に送達することにより、インビボで対象（例えば、B C D 患者）に適用してもよい。いくつかの例では、治療は、標的細胞（例えば、患者の i P S - R P E 細胞、患者の i P S - 光受容体細胞、i P S - 光受容体前駆細胞、i P S - C E C、リンパ球）にインビトロで適用してもよい。次に、治療した細胞を、必要としている対象（例えば、B C D 患者）に移植してもよい。いくつかの例では、治療は、インビボ及びインビトロの両方のアプローチを組み合わせることで適用してもよい。いくつかの例では、C Y P 4 V 2 遺伝子治療は単独で使用してもよい。いくつかの例では、C Y P 4 V 2 遺伝子治療は、別の治療オプションとともに使用してもよい。

20

【0358】

本治療方法の候補となる対象としては、B C D と診断された対象が挙げられる。C Y P 4 V 2 遺伝子の変異によって引き起こされる臨床的に定義される他の眼科的状态（例えば、遺伝性網膜変性（I R D）、網膜色素変性症（R P）、又は角膜ジストロフィー）を患っている対象も、本明細書に記載の方法を使用して治療することができる。B C D、I R D、R P、角膜ジストロフィー、又は C Y P 4 V 2 遺伝子の変異によって引き起こされる別の眼科的状态の診断は、当技術分野で公知の方法を使用して行うことができる。本明細書に記載の方法には、対象を特定すること（例えば、B C D 若しくは C Y P 4 V 2 遺伝子の変異によって引き起こされる別の眼科的状态を有する、又は B C D 若しくは C Y P 4 V 2 遺伝子の変異によって引き起こされる別の眼科的状态を有する疑いがある（例えば、状態の症状の存在に基づいており、他の明白な原因がない）、子供、青年、又は成人など）、及び対象からゲノム D N A を含む試料を取得し、公知の分子生物学的方法を使用して C Y P 4 V 2 遺伝子の変異の存在を検出すること、が含まれてもよい。

30

【0359】

C Y P 4 V 2 遺伝子には、B C D を引き起こす多数の変異が確認されており、遺伝子の 11 個のエクソンのそれぞれに少なくとも 1 つの変異が確認されている。B C D 患者の中で最も一般的な C Y P 4 V 2 変異は、c. 802-8__810 del 17 ins GC (C Y P 4 V 2 遺伝子のイントロン 6 の終端から 8 塩基で始まる場所における、17 塩基の欠失と 2 塩基 (G C) の挿入を指し、I V S 6-8 del / ins GC とも称される。この挿入-欠失変異はイントロン 6-エクソン 7 接合部にあり、17 b p の欠失にはエクソン 7 スプライスアクセプター部位が含まれ、エクソン 7 をコードする 62 アミノ酸のインフレーム欠失が生じる) であり、結果的にエクソン 7 の欠失が生じるものであることが遺伝子型分析により示されている。(Xiao et al., Biochem Biophys Res Commun. 409:181-6, 2011, Meng et al., 2014, Mol. Vis., 20:1806-14, Wada et al., Am J Ophthalmol. 139:894-9, 2005, Jiao et al., European Journal of Human Genetics (2017) 25, 461-471)。非限定的な例としてミスセンス、スプライス部位、フレームシフト、欠失、挿入、インデル（挿入欠失）、ナンセンス、多型（例えば、一塩基多型）

40

50

、及び早期終結などが挙げられる、BCDに関連する様々な種類のCYP4V2変異が発見された。ヒトBCD患者の間で選択されたCYP4V2変異の概要を、表1に示しており、これらは様々な出版物やオンラインデータベース、例えばLOVD (databases.lovd.nl/shared/genes/CYP4V2、World Wide Web)、OMIM (omim.org/allelicVariant/608614、World Wide Web)、及びClinVar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=608614[MIM]、World Wide Web)で確認できる。

【0360】

表1のヒトCYP4V2変異は網羅的ではないことに留意されたい。将来、より多くのCYP4V2変異が同定される可能性がある。参照配列に対するすべての変化が変異であるとは限らないことが理解されよう。いくつかの変化は非病的である。遺伝的变化が病的、すなわち変異であるかどうかを確認する方法は当技術分野で公知であり、非限定的な例として、以前に臨床的に同定された公知の変異と当該変異とを比較すること、及び／又は、対応する機能の変化が存在するかどうかを決定することが挙げられる。例えば、遺伝的变化が病的変化（すなわち、変異）であるかどうかを確認する方法の1つとして、本明細書に記載のように対象由来のiPS-RPE細胞系の生化学的機能を試験し、健康な対照のiPS-RPE細胞系のものと比較して、異常があるかどうかを評価することが挙げられる。

【0361】

本明細書に記載の方法を使用して治療できるBCD又はCYP4V2変異による別の眼科的状态の患者は、ある程度の光受容体及び視覚機能（例えば、視力、視野、視覚機能、及び／又は光干渉断層法（OCT、例えば、スペクトラルドメイン（Spectral Domain）-OCT（SD-OCT））により測定される）を維持していることが好ましい。

【0362】

投与前に、最終製品は臨床グレードの基準を満たすために一連の工程（例えば、超精製）を経る。臨床グレードの製品は、非限定的な例としてNIH遺伝子治療リソースプログラム（Gene Therapy Resource Program（GTRP））及び契約製造機関（CMO）の施設が挙げられる様々なGMP施設を通じて商業的に入手可能である。

【0363】

投与の前に、対象は、対象が投与を受けるAAVベクター型に対する既存の中和抗体（NAb）について試験されてもよい。一実施形態では、対象がそのようなAAV型に対して既にNAbを持っている場合、免疫反応を低下させ、AAVベクターによる充分な形質導入効率を維持するために、対象の既存のNAbとの交差反応性が低い代替のAAVベクター、又は改変されたカプシド構造を備えたAAVベクターを、かかる対象への投与に使用してもよい。免疫応答を最小化する他の方法は当技術分野で公知であり、非限定的な例として、治療前、治療中及び／又は治療後に免疫抑制剤及び免疫抑制プロトコルを適用することが挙げられる。

【0364】

ウイルス若しくは非ウイルスベクター、又はそれらの組み合わせ（例えば、ハイブリッドベクター）を、1又は複数の物理的手段を使用して対象の眼細胞に送達することができる。本明細書で使用する眼細胞としては、限定されず、網膜色素上皮（RPE）細胞、光受容体細胞、角膜上皮細胞、網膜細胞、網膜双極細胞、桿体細胞、錐体細胞、神経節細胞、脈絡膜細胞及び／又は水晶体細胞が挙げられる。加えて、又は代わりに、標的細胞の近く、近くの細胞、又は標的細胞と接触可能な細胞にベクターを送達してもよく、非限定的な例として、脳細胞、視神経細胞、又は血液細胞が挙げられる。

【0365】

インビトロでの治療では、治療の標的となる細胞（例えば、BCD患者のiPS-RPE細胞）にベクターを効果的に送達する任意の方法又は方法及び／又は薬剤の組み合わせを使用することができる。インビトロでの治療は、1回又は複数回の感染を介して行うこ

10

20

30

40

50

とができる。いくつかの例では、ベクターを培養細胞に直接適用して、細胞をトランスフェクト又は形質導入する。いくつかの例では、細胞における送達及び／又はトランスフェクション／形質導入効率を高める他の方法を使用することができ、非限定的な例として、複数回のトランスフェクション／形質導入、エレクトロポレーション、マグネトフェクション、又はソノポレーションが挙げられる。ベクター又は発現カセットで細胞を感染／トランスフェクトする際に使用される方法及び薬剤は当技術分野で公知であり、非限定的な例として、本明細書の実施例セクションに記載されるものが挙げられる。

【0366】

インビトロで治療された細胞はその後対象の目に移植してもよい。例えば、BCD患者の遺伝的に修復されたiPS-RPE細胞は、網膜下注射によって患者に移植できる。眼への細胞移植に使用される方法、薬剤、及びデバイスは、当技術分野で公知である。例えば、Wert et al., J Vis Exp. 2012;(69):4286、WO 2016/179496、Schwartz et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science April 2016, Vol.57, ORSFC1-ORSFc9を参照。

【0367】

インビボの治療の場合、ベクター及び／又は発現カセットは、（例えば、治療の標的細胞への送達のために治療を必要とする対象の眼への投与を通じて）インビボでの治療の標的細胞に送達することができる。インビボでの標的眼細胞に対する核酸分子、発現カセット、ベクターの送達方法は当技術分野で公知である。例えば、眼への投与では、治療の標的となる細胞に応じて、網膜、網膜下腔、脈絡膜、又は一般的に眼の後部、角膜、水晶体、若しくは硝子体にベクターを効果的に送達する任意の方法（若しくは方法及び／又は薬剤の組み合わせ）を使用することができる。投与は、非限定的な例として注射（例えば、網膜下注射、硝子体内注射、直接網膜注射、眼の後方脈絡膜上腔への直接注射）、点眼などが挙げられる任意の適切な手段により行うことができ、他の送達手法と組み合わせて適用してもよい（例えば、角膜上皮への電動式送達）。CYP4V2核酸、発現カセット、及び／又は送達ベクターは、例えばDNA粒子衝突（例えば、遺伝子銃による）、流体力学的遺伝子導入、点眼、エレクトロポレーション、マグネトフェクション、又はソノポレーションを用いて細胞に導入してもよい。眼への投与及び送達方法並びに手法は、当技術分野で公知である。単に例として、これに限定されるものではないが、例えば、Wert et al., J Vis Exp. 2012;(69):4286、国際公開2016/179496号、Mohan et al., Prog Retin Eye Res. 2012 Jan;31(1):43-64を参照。

【0368】

網膜下注射を用いたRPE細胞への従来の送達に加えて、本明細書で検討される方法の1つの態様としては、眼疾患の治療又は予防のための核酸分子（例えば、非変異CYP4V2核酸配列を有する）の硝子体内送達が挙げられる。いくつかのベクター（例えば、AAV2（Y-Fを4つ（quad Y-F）+T-V）及びAAV7m8など）は、硝子体内投与による網膜への効率的な形質導入に特に有用である。加えて、AAV又は他のウイルスベクターは、例えば、「定向進化法」及び「合理的設計法」を含む当技術分野で公知の技術によって改変して、従来の網膜下注射以外による1又は複数の細胞型又は組織への遺伝子送達（例えば、硝子体内注射）用ベクターとしての適合性を改善又は最適化することができる。scAAVベクターは、迅速かつロバストな発現プロファイルを有するため、網膜下送達の他に硝子体内送達にも使用することができる。CYP4V2はほぼ遍在的に分布しつつ網膜に特に高い発現を示すため、CYP4V2の遺伝的及びエピジェネティックな改変は、1又は複数のベクターの硝子体内投与による修復に特に適している。現在の遺伝子治療法は、一般にベクターの網膜下投与を必要とする。よって、本開示の材料及び方法により達成される技術的進歩の1つは、CYP4V2の核酸配列の遺伝的又はエピジェネティックな変化に関連する眼の疾患を治療及び予防するための、核酸配列（例えば、野生型若しくは非変異体核酸配列、又は遺伝子編集ポリペプチドをコードする核酸配列）及び／又はポリペプチドの硝子体内送達である。

【0369】

いくつかの技術及び薬剤を使用して、投与又は送達プロセスを促進してもよい。非限定的な例として、送達媒体（例えば、針）へのベクターの付着が回避されるような潤滑剤の使用が挙げられる。さらに、投与又は送達のプロセス前、プロセス中及び／又はプロセス後に免疫抑制剤を使用すると、感染又は形質導入の効率を高めることができる。

【0370】

ベクターは、様々な医薬的及び／又は生理学的に許容される賦形剤、希釈剤、及び／又は担体を使用して、対象の眼細胞への送達用に製剤化することができる。眼への投与に適した賦形剤、希釈剤、及び／又は担体（医薬的に許容される担体とも称される）の例には、無菌のピロジェンフリーの水、及び無菌のピロジェンフリーの緩衝生理食塩水（例えば、適切な生理学的レベルのpHを維持するためにリン酸塩又はHEPESなどの他の緩衝液で緩衝された生理食塩水）、等張性塩化ナトリウム溶液、平衡塩類溶液、エマルジョン（例えば、油／水エマルジョン）、及びさまざまな種類の湿潤剤が挙げられる。いくつかの例では、前記製剤は、他の薬剤（medical agents）、医薬品（pharmaceutical agents）、安定化剤、緩衝液、担体、アジュバント、及び希釈剤を含んでいてもよい。いくつかの例では、前記製剤は、長期保存のためにDBPS、グリセロール、又はTween 20を含んでいてもよい。

【0371】

最も効果的な投与手段及び治療上有効な投与量を決定する方法は、当業者に公知であり、ベクター、そのカプシド構造、ベクターデザイン（例えば、ssAAV vs. scAAV）、発現カセットの組成、ベクターの発現レベル、プロモーター、他の制御配列又は核酸分子、ベクター力価、標的細胞型、標的発現レベル、標的とする面積又は細胞の数、及び治療対象（例えば、治療対象の年齢、性別、体重、疾患進行度及び状態、並びに潜在的な免疫反応）、投与経路、治療の標的となる細胞の位置（例えば、網膜 vs. 角膜）、野生型の細胞及び／又は組織における関連遺伝子の性質及び発現レベル、及び必要なレジメンによっても変わり得る。治療有効用量は、疾患モデル（例えば、BCD細胞モデル（例えば、BCD患者のiPS-RPE細胞系））又は動物モデルで決定及び評価し、臨床試験で確認又は改良することができる。インビトロでの細胞の治療では、投与量は通常MOIとして表され、その後、治療される細胞の数をMOIに乗じる。MOIは通常、細胞あたり約 1×10^3 GCから約 1×10^6 GCの範囲内であるか、又は細胞あたり約100～約10,000 GCの感染性MOI（GC：ゲノムコピー、ゲノムを含むAAV粒子の測定（ベクターゲノム（vg）又はゲノム粒子（gp）としても知られる）である。インビボ治療の場合、上記の要因に加えて、実際の投与量は、投与中の各患者に固有の個々の状況（例えば、以下で説明する先天性脈絡膜欠如の症例の患者6の網膜下投与中の投与量の減少など）によっても影響を受ける可能性がある。よって、インビボでの1回の投与の治療上有効な用量は、約 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^{13}$ GCのオーダー（例えば、約 1×10^{11} GC～約 1×10^{12} GCの高用量範囲、約 1×10^{10} GC～約 1×10^{11} GCの中用量範囲、約 1×10^9 GC～約 1×10^{10} GCの低用量範囲、約 1×10^6 GC～約 1×10^9 GCの超低用量範囲、及び約 1×10^{12} GC～約 2×10^{13} GCの超高用量範囲）で、又はこれらの範囲内の用量であってかつ所望の効果を提供するのに十分な任意の用量であってよい。一実施形態では、前記組成物は、約 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^{13}$ GCの用量で投与される。別の実施形態では、インビボ投与量は、治療の標的となる細胞数に標的MOIを乗じて決定される（例えば、細胞あたり 1×10^3 GC～約 1×10^6 GC）。眼への任意の1回の投与におけるrAAVベクターを含む薬剤の体積は、約1 μ L（0.001 mL）～約1000 μ L（1 mL）の範囲内であり得る。

【0372】

本明細書に記載の組成物は、単回投与用として製剤化しても複数回投与用として製剤化してもよい。同様に、投与は1回であっても複数回（例えば、数週間、数ヶ月、又は数年にわたって）であってもよく、同一の眼に適用しても反対側の眼に適用してもよい。複数回の投与の場合、同一の又は異なるAAV血清型、及び／又は同一の又は異なる投与経路を検討することができる。異なる組織及び細胞の治療に投与を適用（例えば、RPEを標

的として1回投与し、角膜を標的としてさらに投与)することもできる。

【0373】

遺伝子治療(眼遺伝子治療など)で使用するためのウイルスベクターの作製、GMPの産生、精製、製剤化及び投与の方法は、当業者に公知であり、ウイルスベクターの調製方法は、以下のLCA-2の様々なグループの遺伝子治療研究で実証されているように、多数の企業及び方法のうち任意のものによって実施することができる。本明細書で提供される発現カセットは、以下に列挙される例示的なウイルスベクターのいずれに挿入してもよい。または、以下に示す例に基づいてウイルスベクターを作製してもよい。Bainbridge et al., 2008. N Engl J Med. 358:2231-9、Maguire et al., 2008. N Engl J Med. 358:2240-8、Hauswirth et al., Hum Gene Ther. 2008 Oct;19(10):979-990を参照。

10

【0374】

例えば、Bainbridgeの研究では、血清型2の組換えアデノ随伴ウイルスベクターであるtgAAG76ベクターが遺伝子送達に使用された。前記ベクターには、他の箇所でも説明したように、ヒトRPE65プロモーターによって駆動され、ウシ成長ホルモンポリアダニル化部位によって終結するヒトRPE65コード配列が含まれる。前記ベクターは、B50パッケージング細胞系、tgAAG76ベクターゲノムを含むアデノウイルス-アデノ随伴ウイルスハイブリッドシャトルベクター、及びアデノウイルス5ヘルパーウイルスを使用して、GMP(適正製造基準)ガイドラインに従ってTargeted Genetics Corporationによって生産された。前記ベクターは、 1×10^{11} ベクター粒子/mLの力価で緩衝生理食塩水に満ち、1mLのアリコートで-70℃で凍結された。

20

【0375】

Maguireは、LCA2のイヌモデルでAAV2-RPE65の単回網膜下注射後に視覚機能の長期的かつ持続的な(>7.5年、観察継続中)回復をもたらすことが実証されているRPE65 cDNAを含む複製欠損AAVベクターである、組換えAAV2-hRPE65v2ウイルスベクターを使用した。AAV2-RPE65の作製に使用されるシスプラスミドには、カナマイシン耐性遺伝子が含まれている。このウイルスはCenter for Cellular and Molecular TherapeuticsによってHEK293細胞のトリプルトランスフェクション後に製造され、微小溶液操作、ろ過、陽イオン交換クロマトグラフィー(POROS 50HS、GE Healthcare、ニュージャージー州ピスカタウェイ)、密度勾配超遠心分離、及びPBS内での透析ろ過によって単離及び精製された。この組み合わせにより、空のカプシドと残留塩化セシウムが効率的に除去されるなど、AAVベクター生成物の最適な純度を得ることができる。生成物の一部にPF68 NFプリルポロキサマー188(PF68、BASF、ルートヴィヒスハーフェン、ドイツ)を添加して、製品接触面に対するベクターのその後の損失を防止した。精製されたウイルスは、PF68を使用したものも使用していないものも、滅菌60mLシリンジ及びシリンジフィルターを使用して0.22µmフィルターを通過させ、使用時まで滅菌チューブ内で凍結保存(-80℃)した。プルロニックF-68 NFプリルポロキサマー188を添加した150µLのリン酸緩衝生理食塩水中のAAV2-hRPE65v2の 1.5×10^{10} ベクターゲノムの注入が、網膜下腔投与として行われた。

30

40

【0376】

Hauswirthが使用したウイルスベクターは、ヒトRPE65遺伝子を担持するように改変された組換えアデノ随伴ウイルス血清型2(rAAV2)ベクター(rAAV2-CB^{SB}-hRPE65)であり、RPE65欠乏症の動物モデルで視力を回復することが以前に実証されていた。RPE65-LCAウイルスベクターは、網膜下注射により送達された(150µLで 5.96×10^{10} ベクターゲノム)。

【0377】

治療薬(例えば、タンパク質、核酸分子、発現カセット、遺伝子治療ベクター、細胞)の、非限定的な例として眼への、投与の方法及びプロトコル、並びに他の手順及びプロト

50

コル（非限定的な例として免疫試験、眼科検査、及び免疫抑制剤）は当技術分野で公知である。例えば、以下は、MacLarenが先天性脈絡膜欠如の治療に使用したAAVベクターの網膜下注射の例である。緩衝塩類溶液（Alcon Laboratories、米国テキサス州フォートワース）を用いて、41Gテフロンカニューレ（DORC International BV、ザイドラント、オランダ）を用いて網膜を剥離する手術が最初に行われた。網膜の標的領域が下層の網膜色素上皮から剥離されると、AAV2・REP1の 1×10^{10} ゲノム粒子を含む固定容量（0.1 mL）が、最初の5人の患者において作製された網膜下腔に新しいシリンジを介して注入された。患者6では、減量された最大 6×10^9 個のゲノム粒子が注入された。ベクターは同じ網膜切開を介してゆっくりと注入され、剥離をさらに拡大させた。手術は最初の5人の患者では合併症はなかったが、患者6では、網膜の末梢黄斑からの剥離が困難であったため、中心窩に近い点から剥離を誘発する必要があると、乳頭黄斑束の明らかな伸展が生じた。視力6/7.5の患者のこの重要な構造の伸展関連の損傷に関する懸念のため、2番目の工程ではより少量のベクター（最大0.06 mL）が注入された。全ての患者で、注射器に残っている余剰のベクターは、カニューレを通してポリプロピレンバイアルに排出され、その後凍結された。この余剰ベクターは、ヒト由来のHT1080細胞系の形質導入後、ウェスタンブロットで効力について後で試験された。患者は、10日間のプレドニゾロンの経口投与のコースで治療された。これは、 1 mg/kg （70~100 mg）で7日間、手術の2日前から開始され、その後、40 mgで1日、20 mgで1日、及び10 mgで1日へと減量された。手術前、術後1週間、及び術後5~6週間の時点で免疫学的検査のために血液試料が採取された。MacLaren et al., Lancet. 2014 March 29;383(9923):1129-1137を参照。

【0378】

Hauswirthの研究では、投与は以下のように行われた。軽度の静脈内鎮静後、手術を行う眼に球後麻酔を施し、標準的な滅菌方法で準備し、ドレープをかけた。標準の3ポート23ゲージの中心部及び末梢硝子体切除術を実施した。右側の強膜切開上の結膜は、Westcottハサミ及び0.3鉗子で切断された。止血は、イレーサー（eraser）付き焼灼器によって維持された。網膜下カニューレを簡単に眼に挿入できるように、20ゲージMVRブレードで強膜切開を拡大した。ベクターを39ゲージの注入カニューレ（Synergetics、ミネソタ州オフアロン）に引き込み、網膜下腔に導入した。手順の最後に、強膜切開部位を7.0バイクリル（Vicryl）縫合糸で固定し、結膜を断続縫合で閉じた。結膜下に抗生物質及びステロイドを投与した。手術後20日間、局所の抗生物質とステロイドを使用した。Hauswirth et al., Hum Gene Ther. 2008 Oct;19(10):979-990を参照。

【0379】

CYP4V2遺伝子治療のインビトロ治療では、治療後の評価において、患者の細胞の細胞形態及び／又は生化学的機能障害を比較してもよい。例えば、細胞の形態及び／又は生化学的機能が治療後に改善したかどうかを評価するために、治療前及び治療後の、BCD患者のiPS-RPE細胞（又は該当する場合はiPS-PRC又はiPS-CEC細胞）において異常が示された化合物のレベルを比較してもよい。

【0380】

CYP4V2遺伝子治療のインビボ治療では、治療後の評価において、網膜及び角膜の疾患に関する当技術分野で公知の眼及び網膜検査（及び該当する場合は角膜検査）を使用してもよい。その非限定的な例として、暗順応、コントラスト感度、視野検査、視力検査、色覚検査、ERG、OCT、眼底イメージング、角膜検査、可動性などの機能検査などが挙げられる。有効性は、視力の改善、疾患の進行停止、又は網膜変性若しくは視力喪失の進行が予想より遅いこと、のいずれかによって検証することができる。

【0381】

ウイルスベクター媒介遺伝子治療の1つの課題は、遺伝子治療を受けている対象の免疫応答である。対象に従来関連していたリスクに加えて、免疫応答は、ウイルスベクターの

10

20

30

40

50

形質導入効率を大幅に低下させる、及び／又は長期の導入遺伝子の発現を確立し難くする可能性がある。Mingozzi F, Meulenberg JJ, Hui DJ, Basner-Tschakarjan E, Hasbrouck NC, Edmonson SA, Hutnick NA, Betts MR, Kastelein JJ, Stroes ES, High K A, AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood*. 2009 Sep 3;114(10):2077-86。

【0382】

おそらく、眼の固有な免疫学的環境のために、眼の遺伝子治療における様々な組換えウイルスベクター（例えば、AAV、レンチウイルス、アデノウイルス）の免疫学的効果はかなり良性であるようである。それにもかかわらず、アデノウイルスの眼内投与後に、重要な細胞性免疫応答が発生する可能性がある。しかし、AAVもレンチウイルスも、細胞媒介性反応を誘発しないため、慢性的な眼の（網膜の）疾患の治療のための有望なベクターである。J Bennett, Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors, *Gene Therapy* (2003)10, 977-982. doi:10.1038/sj.gt.3302030。しかし一方で、以前の研究では、AAVベクターの硝子体内投与により、非ヒト霊長類の硝子体液及び血清のいずれにおいても抗AAV抗体レベルが増加することが示された。さらに、サル血清における既存の中和抗体力価の存在は、AAVの硝子体内投与後の弱い導入遺伝子発現、減衰した導入遺伝子発現、又は導入遺伝子の無発現と強く相関した。Kotterman et al., Antibody Neutralization Poses a Barrier to Intravitreal Adeno-Associated Viral Vector Gene Delivery to Non-Human Primates, *Gene Ther.* 2015 February;22(2):116-126。したがって、眼遺伝子治療の免疫応答、特に中和抗体（NAbs）の免疫応答を低下させて、所望の形質導入効率及び／又は長期の導入遺伝子発現を維持することが望ましい。

【0383】

歴史的に、遺伝子治療分野の企業の一般的な慣行として、1つの血清型のAAVベクターを使用していた。通常、動物研究及び／又は他の遺伝子治療の臨床試験において、良好な形質導入効率及び大量の安全性データを備えたベクター型を使用する。例えば、AAV2は、臨床試験で眼の遺伝子治療に最も一般的に使用されるAAV血清型である。しかし、免疫系、例えば、既存の抗AAV抗体における個人差により、ある患者にとって最適な血清型が別の患者にとって常に最適とは限らない。例えば、特定のAAV血清型に対する既存の抗AAV中和抗体の普及は、国や集団によって異なる。さらに、免疫反応は形質導入効率を著しく低下させる可能性があり、適用される遺伝子治療の有効性を低下させたり、より高用量の投与を必要とさせたりする可能性がある。

【0384】

本明細書では、ウイルスベクター媒介遺伝子治療において、ウイルスベクターに対する免疫応答を低下させて形質導入効率を維持し、ウイルスベクター及び／又は免疫抑制剤の用量を低下させ、及び／又は同じ遺伝疾患の様々な患者に対する治療効果を最大化する方法であって、

（a）前記遺伝子治療のための標的細胞型において十分な形質導入効率を持つ複数の組換えウイルスベクター（例えば、rAAV）のプールを確立することであって、

前記ウイルスベクターのプールは、抗原領域変異若しくは他の変異を有するバリエーション又は前記ウイルスベクターのカプシドのバリエーションを、前記疾患に関連する標的細胞（例えば、BCDに対するCYP4V2遺伝子治療におけるiPS-RPE又はRPE細胞系）において上記変異又はバリエーションが十分な形質導入効率を有することが確認された後で作製することにより、拡大することができる、
前記確立すること；

（b）遺伝子治療を必要とする対象における様々なウイルスベクター血清型及び／又はカプシド変異又はバリエーションに対する既存の中和抗ウイルスベクター抗体（NAbs）を検出し、及び／又は上記対象に由来する患者特異的疾患標的細胞（例えば、iPS-RPE細胞）において様々なウイルスベクターを試験及び比較すること。

(c) 前記ウイルスベクターのプールから、

(i) 前記疾患標的細胞における十分な形質導入効率、

(ii) 前記対象の既存の N A b との低い交差反応性、及び／又は

(iii) 前記対象の患者特異的疾患標的細胞（例えば、B C D の C Y P 4 V 2 遺伝子治療における患者特異的 i P S - R P E 又は R P E 細胞系）における良好な表現型レスキュー結果、

を有するウイルスベクターを選択することであって、

上記ウイルスベクターのプールは、様々な血清型及び／又はカプシド改変ウイルスベクター（例えば、カプシド変異体 A A V 及び／又はカプシドタンパク質バリエーション A A V が挙げられるがこれらに限定されない）を含む、

前記選択すること；

(d) (c) から選択された前記ウイルスベクターを前記対象への投与に使用すること；及び

(e) 前記対象が遺伝子治療の投与を必要とするたびに、上記 (b) ~ (d)（既存の N A b に関連する部分のみ）を繰り返すこと（例えば、限定されるものではないが、同じ臓器（例えば、眼又は反対側の眼）又は別の臓器へのフォローアップ投与）、を含む、方法が提供される。

【0385】

この方法の潜在的な利点としては、免疫抑制剤の使用量の低減、r A A V ベクターの用量の低減、より高い形質導入効率、及びより長期の導入遺伝子発現、及び／又はより高い割合の患者が遺伝子治療に適格となることが挙げられる。

【0386】

この方法は、他のウイルスベクターと関連させて使用してもよいことが理解されよう。さらに、この方法は、C Y P 4 V 2 遺伝子又は別の遺伝子に関係しているか否かに関わらず、あらゆる種類の眼遺伝子治療及び非眼遺伝子治療で使用する事ができる。

【0387】

既存の抗 A A V 抗体を検出する方法は、当技術分野で公知である。抗 A A V 抗体には、中和抗体と非中和抗体の両方が含まれることは留意すべきである。既存の抗 A A V 中和抗体及び A A V に対する他の免疫応答を検出する方法は、当技術分野で公知である。Melvin Y Rincon et al., JMIR Res Protoc. 2016 Apr-Jun;5(2):e102, Hauswirth et al., Hum Gene Ther. 2008 Oct;19(10):979-990. 効果は中和抗体で最も顕著であるが、非中和抗体であっても免疫系によるベクターのクリアランスを引き起こす可能性がある。非中和抗体は E L I S A で検出することができる。Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C, Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. Hum Gene Ther. 2010 Jun;21(6):704-12.

【0388】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、物の方法及び組成が属する分野の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。本明細書で提供される用語の定義に加えて、分子生物学における一般的な用語の定義は、Glossary of Genetics: Classical and Molecular, Rieger et al., 1991, 5th Ed, Springer-Verlag, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Eds., 1998 Supplement, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino et al., Eds., 1999 Supplement, John Wiley & Sons, Inc., 及び、Current Protocols in Neuroscience, Crawley et al., Eds., 1999 Supplement, John Wiley & Sons, Inc.において確認できる。

【0389】

代表的な方法及び材料を本明細書に記載する。当技術分野で公知の他の適切な方法及び材料も使用することができる。当該方法及び材料は例示にすぎず、限定することを意図し

10

20

30

40

50

たものではない。

【実施例】

【0390】

本発明を以下の実施例でさらに説明するが、これらは本発明の範囲も特許請求の範囲も限定するものではない。

【0391】

本研究は、希少な網膜疾患を患う患者とその家族によって設立され、主導されているバイオテクノロジー企業であるReflection Biotechnologies Limited (「Reflection Bio」) によって開始、設計、組織、及び出資された。希少疾患患者は、人類の遺伝的変異の避けられない確率を背負っているが、多くの場合、社会から無視され、公共のリソースにより十分支援されていない。患者主導のバイオテクノロジー企業として、Reflection Bioは、患者が力を合わせ、希少疾患やその他の困難な疾患の科学的及び医学的研究開発を推進するためにより積極的な役割を果たすために、「患者による、患者のための」アプローチを適用している。

【0392】

BCDと診断され、様々な両アレルのCYP4V2変異（ホモ接合CYP4V2変異又は複合ヘテロ接合CYP4V2変異など）を有する患者がこの研究に参加した。特に、1人の患者（本明細書では患者1、P1、又はRB001と称する）は、ホモ接合c.802-8__810del17insGC変異を有する。c.802-8__810del17insGC変異は、62アミノ酸をコードするエクソン7のインフレーム欠失をもたらす。c.802-8__810del17insGC変異は、BCD患者の中で最も一般的な変異である。患者2（P2又はRB002）は複合ヘテロ接合CYP4V2変異を有し、各変異は単一のヌクレオチド変化であり、525アミノ酸長のCYP4V2タンパク質に1つのアミノ酸変化のみが生じる。

【0393】

インフォームドコンセントが得られた。手順はヘルシンキ宣言のガイドラインに従っており、倫理審査委員会（Institutional Review Board）によって承認された。

【0394】

BCDヒト細胞疾患モデルの例

臨床的には、BCDはRPE萎縮と関連しており、これが光受容体の死滅と視力喪失を引き起こす。したがって、BCDを研究し、BCDの治療法を開発するには、ヒトRPEモデルを作製して使用することが重要である。

【0395】

（実施例1－BCD患者由来の人工多能性幹細胞（iPSC）の作製及び特性評価）

本研究では、BCD患者からiPSCを生成するために、遺伝子挿入のない（integration-free）方法が使用された。iPSCのリプログラミングに使用される従来の技術（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス）は、標的細胞のゲノムに組み込まれる。結果として得られるiPSCと、それらのiPSCから分化した細胞には外来DNAが含まれ、細胞療法や創薬アプリケーションでの使用には安全でなく、問題となる可能性がある。さらに、組込みはゲノムの重要な領域で発生する可能性があり、無関係な発生プロセスの問題を引き起こす。従来のリプログラミング法と比較して、遺伝子挿入のないリプログラミング法では、検出可能なベクター又は導入遺伝子を含まないiPSCが生成されるため、細胞療法や創薬アプリケーションにより適している。

【0396】

本研究では、BCD患者からiPSCを作製するために、遺伝子挿入のない2つの異なるリプログラミング法（1つはセンダイウイルスを用い、もう1つはエピソームベクターを用いる）を使用した。皮膚試料（皮膚線維芽細胞）と血液試料（末梢血単核細胞（PBMC））の2種類の試料を使用した。どちらの方法でも、皮膚試料、血液試料、又は他の試料（尿や毛の試料など）からBCD患者特異的iPSCを作製することができる。

【0397】

A. 皮膚試料からのiPSCリプログラミング

BCD患者に対して皮膚生検を行い、生検によりヒト線維芽細胞を得た。次に、BCD患者特異的線維芽細胞を、宿主ゲノムを変更するリスクのないフットプリントフリー (footprint-free) RNAウイルスであるセンダイウイルスを使用して、iPSC細胞系へリプログラミングした。非限定的な例としてレンチウイルスが挙げられる他のベクターもiPSCの再プログラミングに使用可能であるが、宿主細胞のゲノムに組み込まれるリスクがある。BCD患者由来のiPSC細胞の写真については、図1を参照。健康な個体の線維芽細胞も同様にリプログラミングされ、野生型 (又は対照) iPSC細胞系を作製した。

10

【0398】

iPSCを生成するために、 5×10^4 個の線維芽細胞を播種し、細胞が接着して (約12時間) 約70%~80%コンフルエントとなるまで12ウェルプレートで培養した。培地を除去し、前記細胞に、500 μ Lの線維芽細胞培地で、Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Myc (CytoTune (登録商標-iPS 2.0センダイウイルスリプログラミングキット、A16517、Life Technologies) を発現するセンダイウイルスを、5:5:3:5のMOIでトランスフェクトした。前記細胞を、37°C、5%CO₂で一晩インキュベートした後、ウイルス含有培地を除去し、KO-DMEM培地と交換した (ノックアウトDMEM、15%ノックアウト血清代替物、1 μ Mグルタミン、1非必須アミノ酸、1ペニシリン-ストربتマイシン、0.1mM β -メルカプトエタノール、10 ng/mL塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF))。トランスフェクトされた細胞を、培地を毎日交換しながら約7日間インキュベートした。

20

【0399】

トランスフェクトされた細胞をPBSで洗浄し、トリプシンに暴露し (例えば、TrypLE Express、37°Cで4分間)、10 μ MのROCK阻害剤を含むKO-DMEM培地2mLに再懸濁した。次に、前記細胞をマイトマイシン-C処置したMEFフィーダー層に播種し、37°C、5%CO₂に戻した。24時間後、及びその後の毎日、培地を除去し、KO-DMEM培地 (ROCK阻害剤なし) で置き換えた。継代後7日~14日でコロニーを認めた。各iPSCコロニーは、10 μ MのROCK阻害剤を含むKO-DMEM培地で短時間処置した後、約100~150個の細胞の塊に顕微解剖し、その後、37°C、5%CO₂でKO-DMEM培地でさらに1週間培養した。

30

【0400】

iPSCの特性評価は、以下の多能性マーカーの一次抗体を使用して行った。

OCT4 Santa Cruz sc-9081 Rabbit poly、
SOX2 R&D Systems 245610 Mouse IgG、
TRA-1-60 Millipore (Chemicon) MAB4381、
Mouse, IgM、SSEA4 Millipore (Chemicon) MAB4304 Mouse IgG、
Nanog R&D Systems AF1997 Goat poly。

典型的なマーカーを使用した特性評価として、細胞を洗浄、ブロックし (例えば、3%血清及び0.1%Triton Xを用いて)、一次抗体 (1:200) に暴露し、室温で2~3時間インキュベートした。前記細胞を再度洗浄し、二次抗体に暴露し、室温で60分間インキュベートした。次に、細胞を核対比染色した (例えば、1:10000 DAPI含有PBSTを使用)。

40

【0401】

BCD患者の線維芽細胞から作製されたiPSC、並びにOct-4、Sox-2、SSEA-4、Nanog、及びTra-1-60マーカーによる特性評価については、図1(a)を参照。

【0402】

B. 血液試料からのiPSCリプログラミング

50

皮膚生検試料に加えて、iPSCを、BCD患者及び健康な対照の血液試料からも作製した。前記iPSCは、エピソード法を使用して末梢血単核細胞(PBMC)から作製された。プロトコルは以下の通りである。

【0403】

T細胞活性化：

a) 凍結PBMCを解凍し、製造元のプロトコルに従って磁気ビーズ(Dynabeads)(ヒトTアクチベーター、CD3/CD28、Thermo Fisher、カタログ番号11132D)を使用して、約50万個の生細胞をT細胞活性化に付した。

b) 次に、活性化されたT細胞を血液細胞培地で10～14日間増殖した。

【0404】

リプログラミング：

a) iPSC系統を生成するために、活性化されたT細胞を磁気ビーズ(dynabeads)から分離し、製造業者の指示に従ってネオトランスフェクションシステム(カタログ番号MPK10096、Invitrogen)を使用してエピソードiPSCリプログラミングベクター(カタログ番号A14703、Invitrogen、米国カリフォルニア州カールスバッド)でエレクトロポレーションした。

b) 2セットのエレクトロポレーションされた細胞を、CF1 MEFフィーダー(カタログ番号：ASF-1213、Applied StemCell、米国カリフォルニア州ミルピタス)で前培養した2セットの35mmディッシュに播種した。前記細胞に、ヒトiPSC増殖培地を毎日与えた。

c) 2～3週間後、ヒトESC様iPSCコロニーを選択し、拡大培養のためにマトリゲルコーティングした24ウェルプレートに移した。

d) その後、患者特異的ヒトiPSC系統を増殖させ、ヒトiPSCフィーダーフリー増殖培地(mTeSR(登録商標)1、カタログ番号05850、StemCell Technologies Inc.、バンクーバー、カナダ)でマトリゲル(Corning、カタログ番号354277)で、凍結保存前に十分な細胞数が得られるまで2～3回継代した。

【0405】

アルカリホスファターゼ：

a) アルカリホスファターゼ(AP)染色のため、iPSCを固定した後アルカリホスファターゼ染色溶液(ナフトール/ファストレッドバイオレット、Sigma)で染色した。

b) 細胞の画像は、オリンパス顕微鏡(IX51、オリンパス、東京、日本)を使用してキャプチャされる。

【0406】

BCD患者及び健康な対照の血液試料の末梢血単核細胞(PBMC)から作製されたiPSCの位相コントラスト画像、及びAP染色結果については、図1(b)を参照。

【0407】

正常なヒト核型を示すと考えられるBCD患者由来のiPSC核型画像については、図1(c)を参照。

【0408】

(実施例2-BCD患者のiPSCの網膜色素上皮(RPE)細胞への分化)

iPSC分化は、BCD患者及び健康な対照の全てのiPSC系統について、3～6継代目で開始した。分化では、iPSCコロニーを、1:50希釈マトリゲル(CORNING、356230)で前処理6ウェル培養ディッシュ(Costar、Corning、ニューヨーク州コーニング)で、ノックアウト(KO)DMEM(Thermo Fisher Scientific、10829018)、15%ノックアウト(KO)血清代替物(Thermo Fisher Scientific、10829028)、1%非必須アミノ酸(Thermo Fisher Scientific、11140050)、2mmol/Lグルタミン(Thermo Fisher Scientific、3

10

20

30

40

50

5050061)、50U/mLペニシリンーストレプトマイシン(Thermo Fisher Scientific、10378016)、及び10mmol/Lニコチンアミド(Sigma-Aldrich、N0636)からなる分化培地で、コンフルエントになるまで最初の14日間培養した。分化の15日目から28日目に、分化培地に100ng/mLのヒトアクチビン-A(PeproTech、120-14)を添加した。29日目から、分化が完了するまでアクチビン-Aを除去した。8~10週間後、形成された色素性クラスターを手作業で選び出し、マトリゲルコーティングディッシュに播種した。これらの細胞を、MEM(α 改変、Sigma-Aldrich、M-4526)ベースのRPE培地で維持した。この培地は、N1サプリメント(500mLの培地あたり5mL)、タウリン(500mLの培地あたり125mg)、ヒドロコルチゾン(500mLの培地あたり10 μ g)、及びトリヨードサイロニン(500mLの培地あたり0.0065 μ g)(全てSigma-Aldrich)、並びに2mmol/Lグルタミン、50U/mLペニシリンーストレプトマイシン、1%非必須アミノ酸、及び5%ウシ胎児血清(全てGIBCO-BRL)を含む。細胞をさらに6~8週間培養して、機能アッセイ用の機能性単層を形成させた。

10

【0409】

BCD患者のiPSCから分化させたRPE細胞を光学顕微鏡下で観察し、明確なRPE色素及び六角形の細胞形状が観察された(図2を参照)。形態学的な区別に加えて、BCD患者からのiPS由来のRPE細胞は、RPE特異的マーカーである、RPE65、CRALBP、及びMITFの存在によっても検証された。RPE特異的マーカーであるRPE65、CRALBP、及びMITFの存在を示す、BCD患者のiPS-RPE細胞のRPEマーカーの結果については、図2(b)を参照。

20

【0410】

iPSCをRPE細胞に分化するためには複数のプロトコルを使用することができる。ここで説明するRPE分化プロトコルは、通常3か月以上かかる延長プロトコルである。他のプロトコルでは、2か月未満など短期間である。短いプロトコルでも延長プロトコルでもiPSCをRPE細胞に分化可能であるが、異なるプロトコルで生成されたiPSC-RPE細胞の間で腫瘍形成のリスクが異なる可能性がある。iPSC分化に関連する腫瘍形成のリスクは、プロトコル終了時に未分化又は完全に分化していないiPS細胞の一部に起因し、延長プロトコルの場合はiPSCは完全に分化して成熟RPE細胞となるため、腫瘍形成を発生させない原因となる可能性が高い。生化学及びその他のアッセイ並びに機能研究のために作製されたiPS-RPE細胞系の純度を確保し、細胞療法(非限定的な例として、自家移植)のためのiPSC-RPE細胞の安全性をサポートするために、より長期のプロトコルを使用した。

30

【0411】

(実施例3-BCD細胞モデル及びCYP4V2機能研究のための生化学的、細胞生存率及びその他のアッセイ)

脂質アッセイ:

BCD及びCYP4V2酵素の機能に関する以前の研究では、脂肪酸に焦点が当てられてきた。本研究では、脂肪酸だけでなく、セラミド(Cer)、スフィンゴミエリン(SM)、及びスフィンゴシン/スフィンガニン(SOSA)を含むより多くの脂質アッセイを使用して、BCD疾患モデルの生化学的異常/表現型を分析し、CYP4V2タンパク質の生化学的機能を分析した。

40

【0412】

遊離脂肪酸(FFA)、セラミド(Cer)、スフィンゴミエリン(SM)、及びスフィンゴシン/スフィンガニン(SOSA)の生化学アッセイを、関連するアッセイ及びプロトコルに基づいて、コロンビア大学のバイオマーカーコア研究所(Biomarkers Core Laboratory)(米国ニューヨーク州ニューヨーク)で実施した。

【0413】

遊離脂肪酸(FFA)、セラミド、スフィンゴシン、及びスフィンガニンは、クロロホ

50

ルム：メタノールを用いて抽出した。簡潔には、約100万個のiPS-RPE細胞を150 μ Lの水でホモジナイズした。100 μ Lのホモジネートを、内部標準（パルミチン酸-D31、C12セラミド、C25セラミド、C17スフィンゴシン、C17スフィンガニン）を含む3mLのクロロホルム：メタノール（v：v=2：1）と混合した。試料を十分にボルテックスし、0.5mLの水を加えて相分離させた。混合物を再度ボルテックスし、4℃で10分間、3,000gで遠心分離した。パスツールピペットを使用して、下部の有機相を2番目の清潔なガラス管に移した。2mLのクロロホルムを残りの水相に加え、ボルテックスで混合し、再度遠心分離して残りの脂質を抽出した。下部の有機相をプールし、窒素下で37℃で蒸発させた。抽出した脂質を50 μ Lのメタノール：アセトニトリル（v：v=1：1）で再構成し、注入のためLCオートサンプラーバイアルに移した。スフィンゴミエリンは他の脂質と同様にクロロホルム：メタノールでも抽出したが、スフィンゴミエリンのサンプル調製用には2 μ Lの細胞ホモジネートのみを配置した。全てのアッセイは、Waters Xevo TQ MS ACQUITY UPLC システム（Waters、米国マサチューセッツ州ミルフォード）で実施した。FFAは、100mm Waters ACQUITY UPLC HSS C18カラムで溶出した。セラミド、スフィンゴシン、スフィンガニン、スフィンゴミエリンを100mm Waters ACQUITY UPLC BEH Phenylカラムで分離した。FFAはネガティブSIR法を使用しモニタリングし、その他はポジティブMRM取得によってモニタリングした。

【0414】

生化学アッセイで試験した化合物のリストを、以下の表2に提示する。いくつかの化合物は、本研究の標準品として使用するために購入した（表2に注釈付き。Nu-Chem：Nu-Chem Prep、Inc.、米国ミネソタ州エリシアン；Cayman：Cayman Chemical Company、米国ミシガン州アナーバー）。他の化合物は、コロンビア大学のバイオマーカーコア研究所（Biomarkers Core Laboratory）（米国ニューヨーク州ニューヨーク）で入手可能な既存の標準品を使用した。全てのFFAは単一のMSで検出したが、他の種類の化合物はMS/MSで検出した。

【0415】

【表 2 A】

表 2 試験化合物リスト						

【 0 4 1 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 B】

脂肪酸 (FFA)	説明	ベンダー	カタログ 番号	セラミド (Cer)	説明
C20:5(n3) EPA	エイコサペンタエン酸 (EPA)	Nu-Chek	U-99-A	C28	C28 セラミド (d18:1/28:0)
C20:4(n6) AA	アラキドン酸 (AA)	Nu-Chek	U-71-A		
C20:4 異性体				スフィンゴミエリン (SM)	
C20:3(n6)	ホモ- γ -リノレン酸	Nu-Chek	U-69-A	C14:1	C14:1 スフィンゴミエリン (d18:1/14:1)
C20:3 異性体 1				C14	C14 スフィンゴミエリン (d18:1/14:0)
C20:3 異性体 2				C16:1	C16:1 スフィンゴミエリン (d18:1/16:1)
C20:2(n6)	11-14 イイコサジエン酸	Nu-Chek	U-68-A	C16	C16 スフィンゴミエリン (d18:1/16:0)
C20:2 異性体				C18:1	C18:1 スフィンゴミエリン (d18:1/18:1)
C20:1(n9)	11-エイコセン酸	Nu-Chek	U-66-A	C18	C18 スフィンゴミエリン (d18:1/18:0)
C20 アラキジン酸	C20:0 (アラキジン酸)			C20:5	C20:5 スフィンゴミエリン (d18:1/20:5)

【 0 4 1 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 C】

脂肪酸 (FFA)	説明	ベンダー	カタログ番号	セラミド (Cer)	説明
C21	ヘンイコサノン酸	Nu-Chek	N-21-A	C20:4	C20:4 スフィンゴミエリン (d18:1/20:4)
C22:6(n3) DHA	ドコサヘキサエン酸 (DHA)	Nu-Chek	U-84-A	C20:1	C20:1 スフィンゴミエリン (d18:1/20:1)
C22:5(n3) DPA	7-10-13-16-19ドコサペンタエン酸	Nu-Chek	U-101-A	C20	C20 スフィンゴミエリン (d18:1/20:0)
C22:5(n6)	4-7-10-13-16ドコサペンタエン酸	Nu-Chek	U-102-A	C22:6	C22:6 スフィンゴミエリン (d18:1/22:6)
C22:4(n6)	7-10-13-16ドコサテトラエン酸	Nu-Chek	U-83-A	C22:5	C22:5 スフィンゴミエリン (d18:1/22:5)
C22:1(n9)	13-ドコセン酸 (エルカ酸)			C22:1	C22:1 スフィンゴミエリン (d18:1/22:1)
C22	ベヘン酸	Nu-Chek	N-22-A	C22	C22 スフィンゴミエリン (d18:1/22:0)
C23	トリコサン酸	Nu-Chek	N-23-A	C24:1	C24:1 スフィンゴミエリン (d18:1/24:1)
C24:1(n9)	ネルボン酸	Nu-Chek	U-88-A	C24	C24 スフィンゴミエリン (d18:1/24:0)
C24	リグノセリン酸	Nu-Chek	N-24-A	C26:1	C26:1 スフィンゴミエリン (d18:1/26:1)
C25	ペンタコサン酸	Cayman	15197	C26	C26 スフィンゴミエリン (d18:1/26:0)
C26:1	C26:1(n9) (ヘキサコサン酸)			C28:1	C28:1 スフィンゴミエリン (d18:1/28:1)
C26	ヘキサコサン酸	Cayman	13354	C28	C28 スフィンゴミエリン (d18:1/28:0)
SOSA					
SO	スフィンゴシン (d18:1)				
SA	スフィンガニン (d18:0)				
SO-1P	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)				
SA-1P	スフィンガニン-1-リン酸 (d18:0)				

【0418】

ヒドロキシ脂肪酸アッセイ：

さらに、LC-MS/MSを使用して、16-HEPE、17-HEPE、18-HEPE、19-HEPE、20-HEPE、17-HDHA、18-HDHA、19-HDHA、20-HDHA、21-HDHA、22-HDHA、19(20)-EpDPA（正式名称：(±)19,20-エポキシ-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-ドコサペンタエン酸；(±)19,20-EDP、(±)19,20-エポキシドコサペンタエン酸、(±)19,20-エポキシ-DPA、(±)19,20-EpDPEとしても知られる）、及び19(20)-DiHDPA（正式名称：(±)19,20-ジヒドロ

キシ-4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z-ドコサペンタエン酸; (±) 19, 20-DiHDOPAとしても知られる)を含む、iPS-RPE細胞のヒドロキシ脂肪酸を検出した。

【0419】

HDHA化合物はDHAのヒドロキシ代謝産物であり、HEPE化合物はEPAのヒドロキシ代謝産物である。19(20)-EpDPAは、DHAの ω -3二重結合のエポキシ化を介して誘導されるDHAエポキシゲナーゼ代謝産物である。19(20)-DiHDPAはDHAの代謝物でもある。DHAは重要な脂肪酸であり、脳と網膜において最も豊富な ω -3脂肪酸である。以前の研究では、CYP4V2は ω -3脂肪酸、特にDHAのヒドロキシラーゼであることが示された。

10

【0420】

材料: ヒドロキシ脂肪酸標準品 (±) 18-HEPE (品目番号32840)、(±) 20-HDHA (品目番号33750)、(±) 19(20)-EpDPA (品目番号10175)、及び (±) 19(20)-DiHDPA (品目番号10007001) は、Cayman Chemical Company (米国ミシガン州アナーバー) から購入した。内部標準重水素化パルミチン酸 (C16-D31脂肪酸) は、C/D/N Isotopes Inc. (#D-2002、ケベック、カナダ) から購入した。

【0421】

上記のLC-MS又はLC-MS/MSの方法に加えて、研究で試験した化学種及び化合物は、他の方法を使用して検出及び/又は定量化することもできることを理解されたい。例えば、メチル化処理をしたFFAのGC-MS又はGC-MS/MS法が挙げられる。Cer及びSMの場合、FIA-MS/MS又はGC-MS/MSを使用することができる。

20

【0422】

細胞生存率アッセイ:

青色光暴露: iPS-RPE細胞を3.5cmディッシュ及び4ウェルチャンバーディッシュに播種した。2か月後、10 μ g/mLグルコースを含むPBS(+)内で1時間、1.5mW/cm²で、細胞を430 $\pm$ 20nm(青色)の光に暴露した。全ての細胞系で同じ播種密度を用いた。青色光に暴露後、処置した細胞に新しいRPE培地を供給し、5%CO₂及び37°Cのインキュベーターに一晩回収した。

30

【0423】

1時間の他に、より短い又はより長い光暴露時間を用いてもよい(例えば、暴露なし、30分、45分、75分、90分、又は120分など)。同様に、異なる波長又はより広いスペクトルの暴露光を使用してもよい。さらに、異なる培養日数(例えば、RPE培地で2か月、3か月、4か月、5か月、又は6か月)のiPS-RPE試料を使用してもよい(例えば加齢の影響を調べるため)。

【0424】

細胞生存率アッセイ: 生細胞/健康な細胞は、細胞透過性色素Calcein AM (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号: C3099、米国)で、最終濃度3 μ mol/mLのPBS(+) (各3.5cmディッシュに1mL又は各チャンバーに200 μ L)で室温で1時間標識した。死細胞/病気の細胞は、ヨウ化プロピジウム(PI) (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号: P3566、米国)で、最終濃度2 μ g/mLのPBS(+) (各3.5cmディッシュに1mL又は各チャンバーに200 μ L)で室温で1時間標識した。PIはDNA結合性であり、生細胞に浸透しないため、集団の死細胞を検出するために一般的に使用される。次にPBS(-)で洗浄した後、細胞の蛍光レベルを観察し、20倍の倍率で倒立蛍光顕微鏡(Nikon Eclipse Ts2R)で写真を撮影した。ImageJ(Fiji)によって写真を処理した後に死細胞/生細胞比を計算した。

40

【0425】

生化学アッセイ及び細胞生存率試験に加えて、BCD患者のiPS-RPE細胞でRP

50

E 機能試験を実施してもよい（食作用活性、経上皮耐性など）。

【0426】

CYP4V2 発現：

対照及びBCD患者特異的iPS-RPE細胞におけるCYP4V2発現レベルを検出及び比較するための実験を行った。細胞系でのCYP4V2発現は、抗CYP4V2抗体（ウェスタンブロット）又は定量的PCRのいずれかによって評価できる。

【0427】

CYP4V2ウェスタンブロット：各iPS-RPE試料からの45 µgの全細胞タンパク質を約7.5%SDSページゲルで泳動した後、膜に湿式転写した。前記膜を、PBST中の5%BSAで室温で1時間ブロックした後、5%BSA中に1:1000の濃度で含まれる一次抗体（ウサギで作製された抗CYP4V2、Sigma Aldrich、カタログ番号：SAB 1410565、米国）と共に4℃で一晩インキュベートした。PBSTで約3×10分間、洗浄を行った。次いで、前記膜を、5%BSA中に1:3000の濃度で含まれる二次抗体ヤギ抗ウサギIgG HRP（Santa Cruz、カタログ番号：sc-2004、米国）と共に4℃で4時間インキュベートした。PBSTで3×10分間、最終洗浄を行った。GAPDHをローディングコントロールとして使用した。

【0428】

CYP4V2ウェスタンブロットでは、対照のiPS-RPE試料でCYP4V2タンパク質の発現が検出されたが、BCD患者のiPS-RPE試料では検出されなかった。AAV、CYP4V2による処置後、BCD患者特異的iPS-RPE試料でCYP4V2タンパク質が検出された。

【0429】

リアルタイムPCR及び相対mRNA定量化：健康な対照（WT）の試料、BCD患者の試料、BCD患者のAAV、CYP4V2で処置したiPS-RPE試料を採取し、TRIzol試薬（Invitrogen）で溶解した。製造業者の指示に従って、全RNAを単離した。次に、ゲノムDNAの混入を防ぐためにDNase I（Invitrogen）処置を行った。Superscript III Reverse Transcriptionキットによって逆転写反応を実施し、ランダムヘキサマー（Invitrogen）を使用してcDNAを生成した。Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix（Fisher Scientific）及びStepOneリアルタイムPCRシステム（Invitrogen）を使用してリアルタイムPCR法を実施し、遺伝子発現レベル（38サイクル）を定量化した。それぞれCYP4V2エクソン7領域及びCYP4V2 opに特異的なプライマーを使用した。ハウスキーピング遺伝子としてアクチンを使用した。

【0430】

結果：iPS-RPE細胞試料におけるCYP4V2及びCYP4V2 opの発現を試験するために、定量的PCRを実施した。CYP4V2及びCYP4V2 opの転写レベルは、それぞれ患者試料及び対照試料によって正規化した。CYP4V2の場合、全ての非患者対照試料は、同レベルのCYP4V2発現を示し、これは患者試料のCYP4V2発現レベルよりも数百倍高かった。AAV、CYP4V2処置後、患者試料のCYP4V2発現レベルは、非患者対照試料に匹敵するレベルまで100倍以上増加した（図3）。CYP4V2 opの場合、AAVで処置した試料は全て、未処置の試料と比較してはるかに高い発現レベルを示した（図4）。これらの結果は、AAVベクターがCYP4V2 cDNAをBCD患者のiPS-RPE細胞に送達することができ、発現カセットが前記遺伝子を発現することができたことを示している。

【0431】

（実施例4-BCD細胞モデルの表現型及びCYP4V2機能に関する知見）

脂質検査結果：

BCD細胞モデル（例えば、BCD患者iPS-RPE細胞）に生化学的欠陥／異常（

10

20

30

40

50

すなわち、表現型)が存在するかどうか及びどのような欠陥／以上であるかを判断するために、BCD患者由来のiPS-RPE細胞の脂肪酸、セラミド、スフィンゴリエリン、スフィンゴシナ、スフィンガニン、及びヒドロキシ脂肪酸を、健康な対照に由来するiPS-RPE細胞のものと比較して検出及び定量するために、実施例3に記載した生化学アッセイを使用した。

【0432】

試験の前に、細胞を以下のように採取した。BCD患者由来の約100万個のiPS-RPE細胞をPBSで2回洗浄した後、プラスチック製セルリフターでディッシュから剥離し、1mLピペットを使用して1.5mLエッペンドルフチューブに移した。エッペンドルフチューブは、試験前に-80℃の冷凍庫に入れておいた。健康な対照iPS-RPE細胞も同じ方法で採取した。生化学アッセイの結果を以下の表3に示す。

【0433】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3 脂肪酸試験結果								
全脂肪酸中のモル%	WT	P1	P1 AAV2.op	P2	P2 AAV2tri. op	P2 AAV2.op	P2 AAV8.fv	P2 scAAV1. op
C12	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%
C13	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C14:1 異性体 1	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%
C14:1 異性体 2	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
C14 ミリスチン酸	1.0%	0.6%	0.6%	0.7%	0.8%	0.8%	0.8%	1.1%
C15	1.3%	0.5%	0.7%	0.5%	0.5%	0.6%	0.6%	0.7%
C16:1(n7) シス	2.7%	2.4%	1.7%	2.3%	2.9%	2.9%	2.8%	3.8%
C16:1(n9) シス	0.9%	0.9%	0.8%	1.0%	1.0%	1.1%	1.2%	1.6%
C16:1(n7) トランス	0.4%	0.5%	0.4%	0.5%	0.5%	0.4%	0.5%	0.4%
C16 パルミチン酸	20.3%	14.2%	12.7%	14.8%	17.0%	17.2%	17.9%	17.4%
C17	1.1%	0.5%	0.8%	0.5%	0.4%	0.5%	0.5%	0.4%
C18:3(n3) α	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C18:3(n6) γ	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C18:2(n6) 9,12 シス	1.6%	1.1%	0.9%	0.9%	0.9%	1.0%	1.0%	1.3%
C18:2(n6) 9,12 トランス	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%
C18:1(n9)オレイン酸	22.2%	20.9%	19.0%	18.5%	19.4%	20.8%	19.7%	28.6%
C18 ステアリン酸	26.3%	17.9%	24.2%	19.4%	16.5%	16.6%	17.7%	14.4%
C19	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
C20:5(n3) EPA	0.8%	1.9%	1.3%	1.9%	1.6%	1.7%	1.4%	1.6%
C20:4(n6) AA	5.4%	15.2%	13.3%	14.7%	14.2%	13.2%	13.0%	7.9%
C20:4 異性体	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:3(n6)	0.6%	0.8%	0.8%	0.9%	0.8%	0.9%	0.8%	0.6%
C20:3 異性体 1	0.1%	0.3%	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%	0.3%	0.1%
C20:3 異性体 2	3.8%	6.0%	5.5%	5.1%	5.5%	4.1%	4.2%	3.0%
C20:2(n6)	0.4%	0.4%	0.5%	0.3%	0.4%	0.3%	0.4%	0.6%
C20:2 異性体	0.6%	0.6%	0.8%	0.7%	0.8%	0.7%	0.7%	0.9%
C20:1(n9)	3.7%	2.9%	2.7%	2.7%	3.6%	3.4%	3.3%	6.1%
C20 アラキドン酸	0.8%	0.5%	0.5%	0.5%	0.6%	0.6%	0.5%	0.5%
C21	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:6(n3) DHA	2.2%	6.1%	5.6%	7.2%	6.2%	6.5%	6.5%	4.1%
C22:5(n3) DPA	1.0%	2.0%	2.4%	2.8%	2.1%	2.6%	2.1%	1.7%
C22:5(n6)	0.1%	0.4%	0.5%	0.4%	0.3%	0.3%	0.4%	0.2%
C22:4(n6)	0.7%	1.3%	1.7%	1.4%	1.4%	1.3%	1.3%	1.0%
C22:1(n9)	0.5%	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%	0.7%	0.9%
C22	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%
C23	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C24:1(n9)	0.3%	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	0.5%	0.3%
C24	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%
C25	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C26:1	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%
C26	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
合計	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
n-3脂肪酸の合計	4.0%	10.0%	9.4%	11.9%	9.9%	10.8%	10.1%	7.4%

【0434】

表 3 の脚注：

WT：野生型対照 iPS-RPE。P1：患者 1 の iPS-RPE。P2：患者 2 の iPS-RPE。

患者の未処置試料及び AAV 処置試料は培養日及びクローン系統で一致させた。

P1 AAV2.op 及び P2 AAV2.op の試料を AAV2.CYP4V2.op で処置し（1 日、MOI： 5×10^4 GC／細胞）、処置後 10 日で回収した。

P2 AAV2tri.op 試料を AAV2tri(Y-F).CYP4V2.op で処置し（1 日、MOI： 5×10^4 GC／細胞）、処置後 10 日で回収した。

P2 AAV8.fv 試料を AAV8.CYP4V2fv で処置し（1日、MOI：2×10⁵ GC／細胞）、処置後10日で回収した。

P2 scAAV1.op 試料を scAAV1.CYP4V2op で処置し（1日、MOI：2×10⁵ GC／細胞）、処置後4日で回収した。

【0435】

結果は、BCD患者のiPS-RPE細胞試料は、対照とは異なる脂肪酸プロファイルを有することを示した。特に、BCD患者の試料は、DHA（22：6 n3）及びオメガ3（ω-3又はn3）脂肪酸の合計（C18：3 n3α、C20：5 n3 EPA、C22：6 n3 DHA、及びC22：5 n3 DPAの合計）が、対照よりもはるかに高いレベルである。これは、CYP4V2がオメガ3脂肪酸代謝に影響するという以前の研究からの示唆を裏付けた。

【0436】

驚くべきことに、n3脂肪酸レベルの異常に加えて、BCD患者のiPS-RPE細胞ではC20：4 n6（アラキドン酸又はAA）もより高いレベルを示した。BCDに関連する以前の研究では、AAの異常なレベルは報告されていない。

【0437】

興味深いことに、n3脂肪酸（DHAを含む）及びn6脂肪酸（AAを含む）の異常は、BCD患者の血清中の脂肪酸レベルを試験した以前の研究では見出されなかった。BCD患者のiPS-RPE細胞及び血清における異なる脂肪酸プロファイルは、CYP4V2の機能が非網膜細胞又は非RPE細胞における他のCYP4酵素によって置換されるという仮説を支持している。それらのCYP4酵素の多くは、CYP4V2とともに他の臓器及び組織で発現され、CYP4V2はRPE細胞で比較的高い発現レベルを持つ唯一のCYP4酵素である。

【0438】

脂肪酸に加えて、BCD患者iPS-RPE細胞は他の化合物又は化合物クラスについての表現型も有する場合がある。非限定的な例としてコルチコステロイド、スフィンゴ脂質、及びリン脂質（スフィンゴミエリン、セラミド、スフィンゴシン、及びスフィンガニンなど）が挙げられる他の化合物クラスに関する表現型、並びに脂質シグナル伝達に関する表現型をスクリーニングするための実験が行われる。さらに、BCD患者のiPS-RPE細胞で同位体追跡実験及びプロテオーム解析（例えば、質量分析に基づくプロテオーム解析）が実施される。

【0439】

さらに、以前の研究では、CYP4V2はω-3脂肪酸（DHA及びEPA）ヒドロキシラーゼであることが見出された。興味深いことに、実施例3に記載されたヒドロキシ-DHA又はヒドロキシ-EPAは、LC-MS/MSにおいて、健康な対照及びBCD患者のiPS-RPE細胞のいずれでも検出されなかった。CYP4V2の酵素機能が生細胞と以前の研究で行われた生細胞外の化学反応とは異なるか、又はヒドロキシ脂肪酸が生細胞内で他の化合物や形態に迅速に変換される中間体であるか、又はヒドロキシ脂肪酸が試料に非常に大量の細胞が含まれている場合にのみ検出できる微量レベルである可能性がある。

【0440】

細胞生存率アッセイの結果：

臨床的には、BCDはRPE萎縮と関連しており、それが光受容体の死滅と視力喪失を引き起こす。細胞生存率アッセイ（上記の実施例3に記載）により、BCD患者のiPS-RPE細胞試料におけるRPE萎縮が明らかとなった。対照のiPS-RPE試料とBCD患者のiPS-RPE試料との細胞生存率の比較については、図5及び図6を参照（図5－青色光への暴露なし、図6－青色光への1時間暴露後）。

【0441】

重要なことに、これらの画像は以下を明らかにした。

（1）光への暴露後、BCD患者由来のiPS-RPE試料（P1及びP2）で有意な

10

20

30

40

50

レベルの細胞死が示され、対照（WT 1 及び WT 2）の細胞死よりもはるかに高かった（図 6 を参照）。例えば、WT 2 iPS-RPE の 3.0 % と比較して、P1 iPS-RPE の死細胞／生細胞比は 20.87 % であった。BCD の臨床的表現型である RPE 萎縮は、BCD 細胞モデルで明らかであった。

（2）BCD P1 及び P2 iPS-RPE 試料間で、異なるレベルの RPE 萎縮が観察された。P1 iPS-RPE は、P2 iPS-RPE よりも高い細胞死レベルを示した。

（3）青色光への暴露なしでも、BCD 患者の iPS-RPE 試料（P1）は RPE 萎縮を示した（図 5）。

【0442】

BCD 患者は、病気の発症年齢と進行が大きく異なる。BCD の発症範囲は、10 代前半～20 歳代、又は 20 歳より後であり、20 歳代～50 歳代で法的失明に至る。さらに、同じ CYP4V2 変異を有する BCD の兄弟姉妹である患者でも、病気の発症年齢及び進行に実質的な違いを有する可能性がある。以前は、これらの違いについて説明されていなかった。異なる BCD 患者の iPS-RPE 試料間の RPE 萎縮レベルの違いは、BCD 患者間の病気の発症及び進行の違いに関する細胞レベルでの指針を提供する。

【0443】

本研究では、BCD 細胞モデルに、BCD の臨床表現型（すなわち RPE 萎縮）など、複数の表現型（生化学的（脂質など）異常などの分子レベルの表現型、及び細胞生存率などの細胞レベルの表現型のいずれも）が見つかった。

【0444】

（実施例 5－薬剤候補及び投与量範囲のスクリーニングのための、BCD 及び CYP4V2 機能の研究のための、細胞療法における、並びに患者特異的応答の研究のための、BCD 対象からの iPS 細胞及び iPS-RPE 細胞の使用）

BCD 疾患のヒト細胞モデルとして、BCD 患者の iPS 細胞及び iPS-RPE 細胞には幅広い用途があり、非限定的な例として、BCD 及び CYP4V2 機能の研究（例えば、上記実施例 3 及び実施例 4 を参照）、BCD 及び関連疾患の薬物候補及び投与量範囲のスクリーニング（本明細書実施例を参照）が挙げられる。

【0445】

BCD 細胞モデル（例えば、BCD 患者特異的 iPS-RPE 細胞系又は人工的に作製された CYP4V2 変異を有する iPS-RPE 細胞系）を使用する方法及び例は、本明細書の実施例に詳細に記載されており、これらは遺伝子治療及び細胞療法における BCD 細胞モデルの使用に関係する。遺伝子治療の試験に加えて、また細胞療法の細胞基盤として、このような BCD 細胞モデルは、BCD、IRD、又は RP を治療するための、他の治療薬（例えば、薬物候補）及びその投与量、製剤及びベクター（ウイルス又は非ウイルスベクター）、又はデバイス若しくは送達メカニズムの有効性及び／又は安全性を、本明細書の実施例に詳細に記載の方法又は類似の方法でスクリーニング及び試験するために使用することができる。

【0446】

前記 BCD 細胞モデルの使用において、治療薬による治療前及び治療後において、上記実施例 3、実施例 4、及び本明細書の他の実施例に記載の様々な種及び RPE 萎縮における化合物のレベルを比較して、これらの化合物のレベルの異常、及び BCD 細胞モデルの RPE 萎縮が治療後に改善するかどうかを評価することによって、治療薬の有効性を評価することができる。同様に、治療薬の異なる用量、製剤（例えば、化学化合物、医薬品有効成分、遺伝子治療用のベクター型及び／又はカプシド、又は遺伝子編集用のベクター型の製剤）又は重要なコンストラクト（例えば、遺伝子治療の発現カセットにおけるプロモーター又は他の制御配列）を、BCD 細胞モデルを使用して比較することができる。さらに、BCD 細胞モデルを使用して、医療機器又は医療方法の有効性を試験することもできる。これには、眼細胞への治療薬の送達、又は形質導入若しくはトランスフェクション効率の改善が含まれるがこれらに限定されない。治療した細胞を、未治療の細胞又は化合物

10

20

30

40

50

への暴露の前の同じ細胞と比較することができることは理解されよう。有効な投与量範囲を決定するために様々な投与量を使用することができる（細胞あたり、細胞100万個あたり、又は細胞50万個あたりなどで測定）。健康な対照のRPE細胞又はiPS-RPE細胞のデータと比較した、BCD患者のiPS-RPE細胞（治療後 vs. 治療なし）における、上記実施例3及び実施例4で述べた脂肪酸及び他の化合物の様々な化合物並びにRPE萎縮のレベルに関するデータは、治療効果及び有効な用量範囲を評価するために用いることができる。

【0447】

さらに、BCD患者特異的なiPS細胞系、iPS-RPE細胞系、及び他のiPS由来細胞系を使用して、治療薬、用量、又はデバイスに対するそのような患者の個々の応答を評価してもよい。患者特異的なiPS細胞、iPS-RPE細胞、及び他のiPS由来細胞は、各患者に特異的な形質を持ち、その非限定的な例としては、免疫応答（例えば、細胞内免疫、RPE免疫）、遺伝子型（例えば、異なる応答を引き起こす可能性のある患者間で異なる変異）が挙げられる。そのような適応により、個別の治療薬（例えば、様々なAAVベクター血清型又はカプシド変異）、又は同じ疾患の異なる患者に合わせた最適な用量を開発及びスクリーニングすることができる。このアプローチは、他の疾患（非限定的な例として、他の眼疾患）に使用することができる。

【0448】

BCD患者特異的なiPS-RPEによりBCD患者の個人差が明らかとなったため、これは個別の最適な投与量を評価し、個別化医療を開発するために使用することができる。例えば、以下の遺伝子治療の例で見られるように、同じ用量の 1×10^5 MOIでも、AAV2.CYP4V2 opはP1とP2のiPS-RPEの間で異なるレスキューレベル（すなわち、異なる有効性レベル）のRPE萎縮を達成した。これは、BCD細胞モデルが動物モデルより優れている点である。

【0449】

BCD患者特異的なiPS-RPE細胞（すなわち、BCD細胞モデル）を使用して、インビトロでのBCD細胞モデルで決定された最適用量レベル（例えば、インビトロでの遺伝子治療においてMOIとして示される）にインビボ治療の標的となる眼細胞（例えば、RPE細胞）の推定数を乗じて、インビボで使用するための遺伝子治療ベクターの用量レベル（例えば、GC又はgp）を得ることにより、インビボ治療における治療有効量を評価及び提案することができる。このようなベクターの用量レベルを乗数によって調整することによって（例えば、1～10（例えば、網膜下注射の場合は1～5、硝子体内注射の場合は5～10；適用される前記乗数に影響を与える他の要因としては、標的領域のサイズ及び治療される対象（例えば、治療対象の年齢、体重、疾患進行度、及び状態、並びに潜在的な免疫反応（すなわち、既存のNAb））、治療の標的となる細胞の位置と密度が挙げられる）、インビボ治療の治療有効用量範囲が提案され、これは臨床試験で確認又はさらに改良することができる。この方法を使用して、個々の患者のインビボでの治療に合わせた個別の最適用量を評価又は提案することもできる。

【0450】

（実施例6－人工的に作製されたCYP4V2変異を有するBCD細胞モデル）

BCDは希少疾患であるため、患者の試料を入手するのは困難である。この困難を克服するために、CRISPRなどの遺伝子編集技術を使用して、胚性幹（ES）細胞系やBCDを有しない対象からのiPS細胞などの非BCD患者細胞のCYP4V2遺伝子に人為的な変異を作製することによって、BCD細胞モデルを作製することができる。

【0451】

例えば、本明細書に示す実施例のように、SpCas9タンパク質と組み合わせて、sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3、sgRNA4、又はsgRNA5を使用して（sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3、sgRNA4、及びsgRNA5のそれぞれのプロトスペーサーエレメント配列については、それぞれ配列番号48～配列番号52を参照；IVT sgRNAの付加配列については、配列番号55及び配列番号59を

10

20

30

40

50

参照)、c. 802-8__810del17insGC変異を含むBCD患者のゲノムDNAのCYP4V2遺伝子の領域に切断を作製した。c. 802-8__810del17insGC変異は、BCD患者の中で最も一般的なCYP4V2変異である。なかでも、sgRNA3、sgRNA4、及びsgRNA5はc. 802-8__810del17insGC変異配列に特異的ではないため、健康な細胞(例えば、CYP4V2変異を有しないES又はiPSC)のCYP4V2遺伝子に二本鎖DNA切断(DSB)を引き起こす可能性がある。特に、トランスフェクション後、sgRNA4及びCas9はCYP4V2遺伝子のエクソン7にDSBを作製する可能性があり、これは、細胞内で非相同末端結合(NHEJ)によってDNAが修復される際に、(片方又は両方のアレルにおいて)エクソン7の変異を引き起こす可能性がある。例えば、NHEJによって作製されたインデルエラーは、フレームシフト変異を引き起こす可能性がある。その結果、一部の細胞は人工的に作製されたCYP4V2変異を有し、BCD細胞疾患モデルとして使用したり、BCD細胞モデルの作製に使用したりすることができる(例えば、ES又はiPSC細胞をRPE細胞に分化させて、CYP4V2変異を含むES-RPE又はiPS-RPE細胞を作製する)。同様に、CYP4V2遺伝子の異なる領域でDSBを作製するように設計された2組のgRNAを使用して、CYP4V2遺伝子内に大きな欠失又はノックアウト変異を作製したり、細胞内のCYP4V2遺伝子全体をノックアウトしたりして、CYP4V2変異を含むBCD細胞モデルを作製することもできる。CRISPRシステムを使用して標的配列を切断及び/又は修正する方法、及び結果を検証する方法に関するより詳細な検討は、実施例及び本明細書の開示に記載されている。

【0452】

人工的に作製されたCYP4V2変異を有するこれらのBCD細胞モデルは、BCD及びCYP4V2機能の研究、並びに本明細書で説明する関連する利用方法(非限定的な例として、薬物候補の試験及び比較、用量範囲の決定、及び医療機器又は送達方法の試験など)において、BCD患者固有の細胞モデルを模倣するために使用可能である。

【0453】

同様の方法を使用して、表4に示す1又は複数の遺伝子の変異又は遺伝的欠陥に関連するものなどの眼疾患又は他の疾患の、人為的に作製された変異を有する細胞疾患モデルを作製することもできる。

【0454】

(実施例7-眼疾患のための同質遺伝子対照の生成及び使用)

疾患及び/又は特定の変異又は欠陥を有する遺伝子の意義を研究する際の同質遺伝子対照として、変異が修正された同質遺伝子の患者特異的iPS細胞系及び/又はそれに由来する他の細胞系(例えば、iPS-RPE細胞、iPS-RPC、iPS-CEC、iPS-CE細胞、又は他のiPS-眼細胞)を使用することができる。ES又は別の個体に由来する従来の対照(例えば、細胞系(ES-RPR又はiPS-RPE細胞系など))は、疾患関連遺伝子の違いに加えて、患者からの遺伝的違いを含む個人差を有する。本実施例は、対象間の個人差及びこれから生じる「バックグラウンドノイズ」を排除する方法を提供する。前記方法は、患者から変異が修正された同質遺伝子対照を作製し使用して、変異を有する同じ患者の細胞系と比較することを含む。患者特異的疾患モデルと、同じ患者由来の変異が修正された同質遺伝子対照と、には個人差がないため、それらを分析及び比較して、表現型、生化学的異常、及び患者の変異又は欠陥を有する遺伝子に関連する他の構造的及び機能的欠陥を正確に特定することができる。非限定的な例としてCRISPR、ZFN、及びTALENが挙げられる遺伝子編集技術を使用することにより、変異が修正された同質遺伝子対照を作製することができる。CRISPR遺伝子編集を使用して、BCD患者の間で最も一般的な変異であるc. 802-8__810del17insGC変異を修正し、それによってBCD患者から同質遺伝子対照を生成する方法の具体例を、本明細書の実施例で提示する。同じアプローチを使用して、他の眼疾患の同質遺伝子対照を作製してもよい。同質遺伝子対照は、従来の対照に比べて大きな利点があり、繊細な表現型の眼疾患(例えば、加齢黄斑変性(AMD))の研究に不可欠となり得る。さらに

10

20

30

40

50

、遺伝的危険因子、変異、又は修正された遺伝子のそれぞれ1つを有する同質遺伝子対照を作製して、そのような同質遺伝子対照を疾患モデルと比較して、眼疾患及び他の疾患における関連リスク因子、変異、又は遺伝子（表4に示す1又は複数の遺伝子の変異又は遺伝的欠陥に関連するものなど）の影響を決定することによって、眼疾患における複数の遺伝的危険因子、変異、及び／又は複数の遺伝子の影響の違いを比較及び特定するために同質遺伝子対照を使用することもできる。

【0455】

同質遺伝子対照を患者特異的細胞疾患モデルと比較して、表現型、生化学的異常、及び遺伝子変異及び／又は関連する欠陥タンパク質に関連する他の構造的及び機能的欠陥を特定してもよい。患者の細胞系と対照と間の生化学的異常／表現型を識別するためのバイオアッセイの方法の具体的な非限定的な例及び検討は、本明細書の上記実施例3及び実施例4に記載されており、非限定的な例としてリビドミクス、プロテオミクス、及び同位体追跡が挙げられる。

【0456】

（BCDヒト細胞疾患モデルに関する検討）

BCDは希少疾患であることを考慮すると、生検によりBCD患者からヒトRPE細胞を示す疾患を得ることは実用的ではない。実用可能なBCDヒト疾患モデルが欠如していたことから、BCDに関する以前の研究では、非BCD疾患の原因細胞（例えば、眼の一部ではない線維芽細胞やリンパ球）及びBCD患者の血清を研究対象として使用するにすぎなかった。これらの研究の結果は、脂肪酸同化作用に集中していた。

【0457】

本明細書に記載の研究では、BCD患者由来のiPS細胞系が成功裏に作製され、インビトロでBCD疾患の表現型を有する患者特異的BCD疾患RPE細胞を作製するために利用された。BCD表現型は、BCDに影響を受ける主要な細胞型であるBCD患者特異的iPS-RPE細胞で直接同定された。本研究より前には、BCDに関連する脂肪酸同化作用を一因として、iPS細胞系及びiPS-RPE細胞系が首尾よく作製できるかどうかは不明であった。

【0458】

生化学的検査により、BCD患者からのiPS-RPE細胞は、以前のBCD研究で報告されていないものを含め、健康な対照のiPS-RPE細胞の脂肪酸と比較して異常なレベルの脂肪酸を有することが示された。BCD疾患特異的iPS-RPE細胞のインビトロ表現型は、CYP4V2によって制御される経路、及び及びBCDの病因に対するより多くの洞察を提供し、BCDの病因及びCYP4V2タンパク質の機能に対する貴重な洞察を提供し、さらに、BCD患者のiPS-RPE細胞系を、実行可能でロバストなBCDヒト疾患モデルとして使用できることを支持する。

【0459】

BCD患者からのiPS細胞系、iPS-RPE細胞系、及び他のiPS-眼細胞系には、薬物スクリーニング、新規治療薬の開発、用量範囲の決定、細胞療法での使用など、さらなる用途がある。

【0460】

BCD患者特異的なiPS細胞系、iPS-RPE細胞系、及び他のiPS-眼細胞系に加えて、ES細胞又は非BCD個体のiPS細胞に由来する他の細胞系（非限定的な例としてES細胞系、iPS細胞系、及びRPE細胞系が挙げられる）に、遺伝子編集により病的CYP4V2変異を人工的に作製することでBCDヒト疾患細胞モデルを開発してもよい。

【0461】

さらに、眼疾患の同質遺伝子対照を生成する方法が提供される。同質遺伝子対照は、患者特異的疾患モデルと個人差がない。したがって、同質遺伝子対照には、従来の対照よりも眼疾患の研究において利点がある。

【0462】

CYP4V2 遺伝子治療

(実施例 8－ヒト CYP4V2 タンパク質及び機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする cDNA)

本研究では 3 つの cDNA を使用した。配列番号 1 に示す配列を有する cDNA (本明細書では CYP4V2 st と称する) 及び配列番号 2 に示す配列を有する cDNA (本明細書では CYP4V2 op と称する) はいずれもヒト CYP4V2 タンパク質 (アミノ酸配列を配列番号 4 に示す、NP_997235.3) をコードする。配列番号 3 に示す配列を有する cDNA (本明細書では CYP4V2 fv と称する) は、ヒト CYP4V2 タンパク質の機能的バリエーション (アミノ酸配列を配列番号 5 に示す) をコードする。

【0463】

配列番号 5 は、ヒト CYP4V2 タンパク質 (配列番号 4) の機能的バリエーションのアミノ酸配列である。両方のタンパク質 (配列番号 4 及び配列番号 5) は、本明細書で定義される機能的 CYP4V2 タンパク質である。配列番号 5 に示す機能的 CYP4V2 タンパク質は、配列番号 4 に示すヒト CYP4V2 タンパク質からの 1 つのアミノ酸変化を有する。機能的 CYP4V2 タンパク質 (配列番号 5) をコードする配列番号 3 に示す cDNA は、ヒト CYP4V2 タンパク質 (配列番号 4) をコードする配列番号 1 に示す cDNA と 2 つのヌクレオチドの違いを有する。配列番号 2 に示すコドン最適化 cDNA 及び配列番号 1 に示す cDNA は両方とも、ヒト CYP4V2 タンパク質 (配列番号 4) をコードし、77% の配列同一性を有する。

【0464】

配列番号 5 の機能的 CYP4V2 タンパク質をコードするコドン最適化 cDNA (CYP4V2 fv-op) を本明細書で示す。この cDNA は、CYP4V2 fv-op 配列が配列番号 1 及び配列番号 3 の間の 1 つ又は 2 つのヌクレオチドの違いを保持すること以外は、CYP4V2 op の cDNA 配列 (配列番号 2) を含むものである。

【0465】

CYP4V2 op 及び CYP4V2 fv-op に加えて、ヒト CYP4V2 タンパク質又は機能的 CYP4V2 タンパク質をコードする他のコドン最適化 cDNA 又は核酸配列 (例えば、配列番号 4～29 のいずれか) は、本開示に記載の方法により作製することができる。ヒト CYP4V2 タンパク質 (配列番号 4) 又は機能的 CYP4V2 タンパク質 (配列番号 5 又は配列番号 6～配列番号 29 のいずれか) をコードするコドン最適化核酸分子は、BCD 患者特異的 iPSC-RPE 細胞系 (又は人工的に作製された CYP4V2 変異を含む RPE 細胞) で試験して、その発現効率及び BCD を治療するためのレスキュー機能を決定及び／又は確認してもよい。そのような試験としては、限定されないが、タンパク質発現 (例えば、コードする機能的 CYP4V2 タンパク質に特異的なウェスタンブロット)、関連遺伝子発現を検出する PCR、及び／又は本明細書で提示する組成 (例えば、発現カセット及び／又はベクター内で) 若しくは方法により BCD 患者特異的 iPSC-RPE 細胞系における生化学的異常及び RPE 萎縮をレスキューする有効性が挙げられる。

【0466】

【数 1A】

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 1 (CYP4V2st cDNA, 1578 bp)

ATGGCGGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGCGCGGCGAGTGCCCT
TTCCCTGGCCGGCGCCAGTCTGGTCCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCGAGCTACGCGCGGAAAT
GGCAGCAGATGCGGCCCATCCCCACGGTGGCCCGCGCCTACCCACTGGTGGGGCCACGCGCTGCTG
ATGAAGCCGGACGGGCGAGAATTTTTTCAGCAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACCGCCACAT
GCCGCTGCTGAAGCTCTGGGTGCGGCCAGTGCCCATGGTGGCCCTTTATAATGCAGAAAATGTGG
AGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCAAATTGACAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTAGAACCATGG
CTTGGCCTAGGACTTCTTACAAGTACTGGAAACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGTTAACACC
CACTTTCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAGATATCATGAATGAACAAGCAAATATATTGG
TTAAGAACTTGAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTTAACTGCTTTTTTTACATCACTCTTTGT
GCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCTATGGGGAAGAATATTGGTGCTCAAAGTAATGATGATTC
CGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTGGAAGAATAAAGATGCCCTGGC
TTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAGAGCCTTCAGATC
CTACATACTTTTACCAACAGTGTCTCGCTGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGAAGACTG
TAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTTTCTTGACTTGCTTT
TAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAGAAGTTGACACC
TTCATGTTTGAGGGGCACGATACAACCTGCAGCTGCAATAAACTGGTCCTTATACCTGTTGGGTTT
TAACCCAGAAGTCCAGAAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTTTGGAAGTCTGACCGTC
CCGCTACAGTAGAAGACCTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTTATTAAGGAGACCCTTCGC
CTTTTTCTCTTCTGTTCTTTTATTTGCCCGTAGTGTTAGTGAAGATTGTGAAGTGGCAGGTTACAG
AGTTCTAAAAGGCACTGAAGCCGTCATCATTCCCTATGCATTGCACAGAGATCCGAGATACTTCC
CCAACCCCGAGGAGTTCCAGCCTGAGCGGTTCTTCCCCGAGAATGCACAAGGGCGCCATCCATAT
GCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGGAACTGTATAGGTCAAAAGTTTGCTGTGATGGAAGA
AAAGACCATTCTTTCTGTCATCCTGAGGCATTTTGGATAGAATCCAACCAGAAAAGAGAAGAGC
TTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGTAATGGCATCTGGATCAAGTTGAAGAGGAGA
AATGCAGATGAACGCTAA

10

20

SEQ ID NO: 2 (CYP4V2op cDNA, 1578 bp)

ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCACT
GTCAGTGGCTGGGGCTTCACTGGTGCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCCTCCTACGCCAGAAAGT
GGCAGCAGATGAGGCCCATCCCTACCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTGCTG
ATGAAGCCTGACGGCAGAGAGTTCTTTCAGCAGATCATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGCACAT

【 0 4 6 7 】

【数 1 B】

30

40

50

GCCACTGCTGAAGCTGTGGGTGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTGTACAACGCCGAGAATGTGG
AAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCAGATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCCTGGAGCCTTGG
CTGGGCCTGGGCCTGCTGACCTCTACAGGCAACAAGTGGAGGAGCCGGAGAAAAGATGCTGACCCC
AACATTCCACTTTACAATCCTGGAGGACTTCCTGGACATCATGAACGAGCAGGCCAATATCCTGG
TGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAACCAGGAGGCCTTTAATTGCTTCTTTTACATCACCCCTGTGC
GCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCTATGGGCAAGAACATCGGCGCCCAGTCTAATGACGATAG
CGAGTACGTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCATCAAGATGCCCTGGC
TGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAAAGAAGTCCCTGCAGATC
CTGCACACCTTTACAACTCTGTGATCGCCGAGAGAGCCAATGAGATGAACGCCAATGAGGACTG
TAGGGGCGATGGAAGGGGCGAGCGCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTTCTGGACCTGCTGC
TGAGCGTGACCGACGATGAGGGCAATCGCCTGTCCCACGAGGACATCCGGGAGGAGGTGGATACA
TTCATGTTTGAGGGACACGACACCACAGCCGCCGCCATCAACTGGTCCCTGTACCTGCTGGGCTC
TAATCCAGAGGTGCAGAAGAAGGTGGATCACGAGCTGGACGACGTGTTCCGGCAAGTCCGACAGGC
CAGCAACCGTGGAGGATCTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCCTGATCAAGGAGACACTGCGC
CTGTTCCCTCTGTGCCTCTGTTTGGCCGGTCCGTGTCTGAGGACTGTGAGGTGGCCGGCTATCG
CGTGCTGAAGGGCACCGAGGCCGTGATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGGACCCCAGGTATTTCC
CTAACCCAGAGGAGTTTCAGCCAGAGAGATTCTTTCCCGAGAATGCCAGGGCAGGCACCCCTTAC
GCCTATGTGCCATTCTCCGCCGACCAAGGAAGTGCATCGGACAGAAGTTTGCCGTGATGGAGGA
GAAAACCATCCTGTCTTGATCCTGAGACACTTCTGGATCGAGAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGC
TGGGCCTGGAGGGACAGCTGATCCTGCGGCCAAGCAACGGCATCTGGATCAAACCTGAAAAGAAGG
AACGCTGACGAGAGGTAA

10

20

SEQ ID NO: 3 (CYP4V2fv cDNA, 1578 bp)

ATGGCGGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAAGCTGCTGCTGTGGGGCGCGGCGAGTGCCCT
TTCCCTGGCCGGCGCCAGTCTGGTCCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCGAGCTACGCGCGGAAAT
GGCAGCAGATGCGGCCCCATCCCCACGGTGGCCCGCGCCTACCCACTGGTGGGCCACGCGCTGCTG
ATGAAGCCGGACGGGCGAGAATTTTTTTCAGCAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACCGCCACAT
GCCGCTGCTGAAGCTCTGGGTGCGGGCCAGTGCCCATGGTGGCCCTTTATAATGCAGAAAATGTGG
AGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCAAATTGACAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTTAGAACCATGG
CTTGGCCTAGGACTTCTTACAAGTACTGGAAACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAAGATGTTAACACC
CACTTTCCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAGATATCATGAATGAACAAGCAAATATATTGG
TTAAGAACTTGAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTAACTGCTTTTTTTTACATCACTCTTTGT
GCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCTATGGGGAAGAATATTGGTGCTCAAAGTAATGATGATTC
CGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTTCGAAGAATAAAGATGCCCTGGC
TTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAGAGCCTTAAGATC
CTACATACTTTTACCAACAGTGTCTATCGCGGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGAAGACTG
TAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTTTCTTGACTTGCTTT
TAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAGAAGTTGACACC
TTCATGTTTGAGGGGCACGATACAACCTGCAGCTGCAATAAACTGGTCCTTATACCTGTTGGGTTT
TAACCCAGAAGTCCAGAAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTTTGGAAGTCTGACCGTC
CCGCTACAGTAGAAGACCTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTTATTAAGGAGACCCCTTCGC
CTTTTTCTTCTGTTTCTTTATTTGCCCGTAGTGTTAGTGAAGATTGTGAAGTGGCAGGTTACAG
AGTTCTAAAAGGCACTGAAGCCGTATCATTCCTATGCATTGCACAGAGATCCGAGATACTTCC
CCAACCCGAGGAGTTCCAGCCTGAGCGGTCTTCCCCGAGAATGCACAAGGGCGCCATCCATAT
GCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGGAACTGTATAGGTCAAAGTTTGCTGTGATGGAAGA
AAAGACCATTCTTTCGTGCATCCTGAGGCACTTTTGGATAGAATCCAACCAGAAAAGAGAAGAGC

30

40

【 0 4 6 8 】

【 数 1 C 】

50

TTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGTAATGGCATCTGGATCAAGTTGAAGAGGAGA
AATGCAGATGAACGCTAA

SEQ ID NO: 4 (human CYP4V2 protein, NP_997235.3, 525 aa)
MAGLWLGLVWQKLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHALL
MKPDGREFFQQIIIEYTEEYRHMPDLLKLWVGVPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPW
LGLGLLTSTGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFCFFYITLC
ALDII CETAMGKNIGAQSNDDEYVRAVYRMSEMI FRRIKMPWLWDLWYLMFKEGW EHKHKS LQI
LHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPS KNKRR AFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREEVDT
FMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLR
LFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEAVIIPYALHRDPYFPNPEEFQPERFFFPENAQGRHPY
AYVPFSAGPRNCIGQKFVMEEEKTILSCILRHF WIESNQKREELGLEGLILRPSNGIWIWIKLR
NADER

10

SEQ ID NO: 5 (functional variant of human CYP4V2 protein; 525 aa)
MAGLWLGLVWQKLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHALL
MKPDGREFFQQIIIEYTEEYRHMPDLLKLWVGVPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPW
LGLGLLTSTGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFCFFYITLC
ALDII CETAMGKNIGAQSNDDEYVRAVYRMSEMI FRRIKMPWLWDLWYLMFKEGW EHKHKS LKI
LHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPS KNKRR AFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREEVDT
FMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLR
LFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEAVIIPYALHRDPYFPNPEEFQPERFFFPENAQGRHPY
AYVPFSAGPRNCIGQKFVMEEEKTILSCILRHF WIESNQKREELGLEGLILRPSNGIWIWIKLR
NADER

20

SEQ ID NO: 6 (fragment of CYP4V2 without transmembrane domain;
490 aa)
RVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDGREFFQQIIIEYTEEYRHMPDLLKLWVGVPVPMV
ALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPW LGLGLLTSTGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDI
MNEQANILVKKLEKHINQEAFCFFYITLCALDII CETAMGKNIGAQSNDDEYVRAVYRMSEMI
FRRIKMPWLWDLWYLMFKEGW EHKHKS LQILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPS KNK
RRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREEVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELD
DVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLR LFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEAVIIPYA
LHRDPYFPNPEEFQPERFFFPENAQGRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFVMEEEKTILSCILRHF W
IESNQKREELGLEGLILRPSNGIWIWIKLRNADER

30

【0469】

(実施例9－CYP4V2遺伝子治療のための効率的な発現カセット及びデリバリーベクターの設計)

本明細書に記載されるように、発現カセット及び送達ベクターは様々な要素を含む。結果は、設計によって大きく異なる場合がある。非限定的な例として以下に記載されるもの及びそれらの多数の組み合わせが挙げられる重要な要素のそれぞれに多くのオプションがあることを考慮すると、CYP4V2遺伝子治療を成功させるには、効率的な発現カセット及び送達ベクターの慎重な設計が必要である。さらに、設計プロセスでは、疾患の表現型及び特性（例えば、治療の標的となる細胞／組織の種類）及び安全性（例えば、毒性、免疫応答）を考慮する必要がある。最後に、妥当な疾患モデルで設計を試験及び検証する必要がある。

40

【0470】

- (a) 送達ベクターの種類、
- (b) ベクターの血清型及びカプシドの設計／選択、
- (c) さらなるベクター設計 (ssAAV vs. scAAVなど)、
- (d) cDNA設計、
- (e) プロモーター設計／選択、

50

(f) ポリAシグナル設計／選択、及び

(g) その他の制御配列、例えばエンハンサー、ジャンクション／リンカー配列。

【0471】

(a) については、標的細胞（例えば、ヒトRPE）で高い形質導入効率を達成するために、ウイルスベクターが選択された。様々な種類のウイルスベクターの中で、AAVベクターは、その安全性プロファイル、及びCYP4V2をコードする核酸（例えば、CYP4V2 cDNA）のサイズがAAVベクターのパッケージング制限に適合することから選択された。例えば、HSVベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルス又はアデノウイルスベクターなど、より大きなパッケージング制限のあるベクターもCYP4V2遺伝子治療に使用できる。ウイルスベクターに加えて、非ウイルスベクター、例えばナノ粒子（非限定的な例として、リポソームナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リポソームプロタミン／DNAリポプレックス（LPD）が挙げられる）も、CYP4V2遺伝子治療に使用することができる。

10

【0472】

(b) については、RPE細胞はBCDのCYP4V2遺伝子治療での治療の標的となる主要な細胞型であるため、RPE細胞で十分な形質導入効率を持つAAV血清型が好ましい。さらに、次の要因が考慮された。CYP4V2の発現は、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、網膜、RPE、角膜、及びリンパ球など様々なヒト組織及び臓器で広く観察され、BCDはRPEに加えて、脈絡膜、光受容体、及び一部の患者では角膜にも影響を及ぼすこと、過去にBCD患者の皮膚線維芽細胞、リンパ球、及び血清でも異常が報告されていることから、RPE細胞で形質導入効率の良いAAV血清型及びカプシド構造に加えて、RPE細胞のみでのAAV形質導入に制限されず、他の細胞／組織、例えば光受容体、脈絡膜、及び／又は角膜を形質導入することができるAAV血清型及びカプシド構造を設計及び／又は選択することができる。結果として、広範囲のAAV血清型及びカプシド構造が適するものとなり、これらを使用することができる。AAV2、AAV5、AAV8、AAV1、AAV9、及びカプシド変異体AAVベクター（AAV2（Y444F+Y500F+Y730F））を研究のために選択した。形質導入効率に加えて、他に考慮された要因は、様々なAAV血清型に対する一般的集団の既存のNAB、及び患者間のその他の潜在的な個人差（非限定的な例として、他の種類の免疫応答（例えば、細胞内免疫又はRPE免疫）又は遺伝子型の違いによるもの（例えば、異なる変異）など）である。本設計では、潜在的な免疫応答を低下させ、様々な患者に対する治療効果を最大化するために、NABとの低い交差反応性を共有する種類を含む複数のAAV型を使用及び試験した。

20

30

【0473】

(c) については、全長CYP4V2 cDNAは1578bp（開始コドン及び停止コドンを含む）であるため、ssAAV及びscAAVのいずれの設計もCYP4V2遺伝子治療に使用することができる。ssAAV及びscAAVの設計には、それぞれ、本明細書に記載のように独自の長所と短所がある。ssAAVと比較して、scAAV設計は発現が迅速でありDNA安定性が高い。ただし、パッケージングの制限（約2.4kb～2.5kb）から、よりサイズが大きく、潜在的に活性の高い制御配列（例えば、プロモーター、PolyAシグナル）の使用は制限される。さらに、使用するプロモーターのサイズに応じて、scAAV設計では、オプションな制御配列（例えば、エンハンサー）を短くしたり、省略したりする必要がある場合がある。CYP4V2遺伝子治療で使用するために、ssAAVベクター及びscAAVベクターの両方を設計及び作製した。AAV2ゲノム（例えば、AAV2 ITR（配列番号42及び配列番号43））及び上記(b)に記載された各AAV型からのカプシドを含む様々な偽型AAVを作製した。scAAVについては、2つのAAV2 ITRのうちの1つが切断された／変異したものであった（配列番号44）。

40

【0474】

(d) については、本明細書に記載されるように、機能的CYP4V2タンパク質は複

50

数存在する。さらに、多くの核酸配列が同じタンパク質をコードし得る。本研究では3つのcDNAを作製した。1つ目は、ヒトCYP4V2タンパク質（配列番号4）をコードするcDNA（配列番号1、CYP4V2stと称する）、2つ目は、ヒトCYP4V2タンパク質（配列番号4）をコードするコドン最適化cDNA（配列番号2、CYP4V2opと称する）、3つ目は、ヒトCYP4V2タンパク質の機能的バリエーション（配列番号5）をコードするcDNA（配列番号3、CYP4V2fvと称する）である。cDNA開始コドンの前にコザック配列（例示的な配列を配列番号37又は配列番号38に示す）が挿入された。

【0475】

(e) については、(b) の理論的根拠と同様に、プロモーターは標的細胞（例えば、治療の標的細胞型がRPEの場合はRPE細胞、標的細胞型が角膜細胞の場合は角膜細胞）の発現を促進するためにうまく機能する必要がある。プロモーターは、遺伝子治療ベクターの発現力セットの主要な要素である。最適なプロモーター選択により、標的特異性及び遺伝子発現を高めることができる。治療の対象となる細胞型又は組織型に応じて、CYP4V2遺伝子治療で使用されるプロモーターは、構成的プロモーターであっても細胞特異的プロモーターであってもよい（例えば、RPE細胞に特異的なプロモーター、RPE及び光受容体の両方に特異的なプロモーター、RPE細胞及び脈絡膜細胞に特異的なプロモーター、RPE、光受容体細胞、及び脈絡膜細胞に特異的なプロモーター、角膜細胞に特異的なプロモーター、RPE、光受容体細胞、脈絡膜、及び角膜細胞に特異的なプロモーター、又は眼細胞に特異的なプロモーター）。CYP4V2はほぼ普遍的に発現しており、複数の細胞型がBCDで影響を受ける（主要なものはRPEであり、他の細胞型には、例えば、角膜、網膜、リンパ球が含まれる）ので、この設計では、複数の組織型及び細胞型における発現力セット及び送達ベクターの効果を広げるために、構成的プロモーターを選択した。ssAAVベクターで使用される発現力セットには、強力な構成的プロモーターである、長さ約1.7kbであるCAGプロモーターを使用した（例示的な配列を配列番号32に示す）。CAGプロモーター（CBA、CAGGS、又はCBプロモーターとしても知られる）は強力な合成プロモーターである。CAGプロモーターは、次の制御要素で構成されている：

(C) サイトメガロウイルス（CMV）初期エンハンサー要素、

(A) ニワトリβアクチン遺伝子のプロモーター領域と1番目のエクソン、及びニワトリのβアクチン遺伝子とウサギのβグロビン遺伝子からのキメライントロン、並びに

(G) ウサギβグロビン遺伝子のスプライスアクセプター。

CAGプロモーターは、哺乳動物細胞で発現を駆動するために最も一般的に使用される構成的プロモーターであるCMVプロモーター（例示的な配列を配列番号40に示す）よりも強力な持続的な活性を有するため使用された。ssAAVベクターで使用される発現力セットには、ssAAVのパッケージングサイズの制限により、はるかに短い構成的プロモーターである伸長因子1α短（EFS）プロモーターを使用した（例示的な配列を配列番号35に示す）。EFSプロモーターは、EF-1αプロモーター（約1.2kb、例示的な配列を配列番号41に示す）の小型化バージョンである。EF-1αプロモーターは、ヒト伸長因子-1α（EF-1α）に由来する構成的プロモーターである。EFSプロモーターは、ssAAVの発現力セット設計にも使用できる。CAGプロモーター、CMVプロモーター、EF1αプロモーター、及びEFSプロモーターに加えて、他の構成的プロモーターを使用してもよく、非限定的な例として、CMVプロモーターなどの別のウイルスプロモーター；smCBAプロモータープロモーター、CB^SBプロモーター、又はCBhプロモーターなどのCAG（CBA、CAGGS、又はCBプロモーターとしても知られる）の誘導体又はバリエーション；その他のβアクチンプロモーター（例えば、ヒトβアクチンプロモーター）；EF-1αプロモーターの誘導体又はバリエーション；PGKプロモーター；UBCプロモーター；GUSBプロモーター；UCOEプロモーター；又は本明細書に記載の他のプロモーターが挙げられる。さらに、RPEにおける発現を駆動するために、細胞特異的プロモーターを用いることもでき、非限定的な例として、本明

10

20

30

40

50

細書に記載の眼細胞特異的プロモーター、例えばVMD2 (BEST1としても知られる) プロモーター又はRPE65プロモーターが挙げられる。

【0476】

(f) については、ssAAVで使用される発現カセット設計には、bGHポリA (例示的な配列を配列番号34に示す) を使用し、scAAVで使用される発現カセット設計には、より短いポリAシグナルであるスモールポリA (SPA) (例示的な配列を配列番号36に示す) を使用した。SPAはssAAVの発現カセットでも使用することができる。代わりに、他のpolyAシグナル (誘導体又はバリエーションを含む) も使用可能であり、非限定的な例として、SV40ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル (例示的な配列を配列番号39に示す)、又は本明細書に記載の他のポリAシグナル (非限定的な例として、上流エンハンサー (USE) と組み合わせて使用されるポリAシグナルなど) が挙げられる。

【0477】

(g) については、ssAAVで使用される発現カセットでは、WPREエンハンサーを使用した (例示的な配列を配列番号33に示す)。scAAVで使用される発現カセットの設計では、サイズ制限があるため、エンハンサーは含めなかった。エンハンサーは、ssAAVでのCYP4V2発現カセットでもscAAVのCYP4V2発現カセットでもオプションであることに留意されたい。一方、scAAV CYP4V2発現カセットに、小型プロモーター及びポリAシグナルと組み合わせて、短い長さのエンハンサー配列 (例えば、WPREの最小γ及びα要素を含む短いWPRE) を含めることが可能であることにも留意されたい。WPREに加えて、HPREエンハンサー又はCTEエンハンサーなど、本明細書に記載の他のエンハンサーを使用してもよい。

【0478】

いくつかの例では、CYP4V2発現カセットは、プロモーター (例えば、CAG (CBA、CAGGS、CBとしても知られる) プロモーター、EF-1αプロモーター、smCBAプロモーター、CBhプロモーター、EFSプロモーター、ヒトβアクチンプロモーター、CMVプロモーター、VMD2プロモーター、又はRPE65プロモーター)、エンハンサー配列 (例えば、WPREエンハンサー、HPREエンハンサー、又は短縮型WPRE若しくはHPREエンハンサー) と所望により結合している機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸配列 (例えば、ヒトCYP4V2タンパク質又はその機能的バリエーション若しくは断片をコードするcDNA)、及びポリAシグナル (例えば、bGHポリA、SPA、SV40ポリA、又はそれらの断片又は誘導体 (SV40後期ポリAなど))、並びに他の制御配列 (例えば、コザック配列) を含む。例示的な配列については、配列番号1~41を参照。

【0479】

(i) 配列 (SEQ) セクションで提示される様々な制御配列の例示的な配列は本質的に例示的なものであり、同じ又は類似の機能を達成可能なこれらの制御配列の様々なバリエーションがあること、及び(ii) 使用可能なこれらの配列の様々なバリエーション、断片、及び/又は誘導体 (切断型CAGプロモーター、短縮型WPREエンハンサー、SV40後期ポリAなど) があることを理解されたい。

【0480】

上記の設計アプローチに基づいて、CYP4V2遺伝子治療で使用する、以下を含む複数のCYP4V2 cDNA、CYP4V2発現カセット、及びrAAVベクターを作製した。

(1) 配列番号1、配列番号2、及び配列番号3にそれぞれ示す3つのCYP4V2。cDNA、CYP4V2st (配列番号1) 及びCYP4V2op (配列番号2) はいずれもヒトCYP4V2タンパク質 (配列番号4) をコードする。CYP4V2fv (配列番号3) は、ヒトCYP4V2タンパク質の機能的バリエーション (配列番号5) をコードする。

(2) 2つのCYP4V2発現カセット (CYP4V2は、ヒトCYP4V2タンパク

10

20

30

40

50

質又は機能的CYP4V2タンパク質をコードする核酸配列を表す。模式図は図7を参照)

(i) CAG-CYP4V2-WPRE-bGHポリA

(ii) EFS-CYP4V2-SPA

(3) 上記のCYP4V2 cDNA及びCYP4V2発現カセットを6つの異なるAAVベクター(AAV2、AAV5、AAV8、AAV1、AAV2(Y444F+Y500F+Y730F)、及びAAV9)にパッケージングし、CYP4V2 cDNA及び発現カセットを含む以下のrAAVベクターを作製した。これらにはscAAV及びscAAVベクターコンストラクトの両方を含む。

(i) 組換えAAV2/2-CAG-CYP4V2op-WPRE-bGHポリA (本明細書ではAAV2.CYP4V2opと称する)、

(ii) 組換えAAV2/2(Y444F+Y500F+Y730F)-CAG-CYP4V2op-WPRE-bGHポリA (本明細書ではAAV2tri(Y-F).CYP4V2op又はAAV2tri.CYP4V2opと称する)、

(iii) 組換えAAV2/5-CAG-CYP4V2op-WPRE-bGHポリA (本明細書ではAAV5.CYP4V2opと称する)、

(iv) 組換えAAV2/5-CAG-CYP4V2st-WPRE-bGHポリA (本明細書ではAAV5.CYP4V2stと称する)、

(v) 組換えAAV2/8-CAG-CYP4V2fv-WPRE-bGHポリA (本明細書ではAAV8.CYP4V2fvと称する)、

(vi) 組換え自己相補的AAV2/1-EFS-CYP4V2op-SPA (本明細書ではscAAV1.CYP4V2opと称する)、

(vii) 組換え自己相補的AAV2/5-EFS-CYP4V2op-SPA (本明細書ではscAAV5.CYP4V2opと称する)、及び

(viii) 組換え自己相補的AAV2/9-EFS-CYP4V2op-SPA (本明細書ではscAAV9.CYP4V2opと称する)。

【0481】

rAAVベクターにパッケージングする際、発現カセットは2つのAAV2 ITR (配列番号42及び配列番号43)に隣接させた。scAAVの場合、AAV2 ITRの1つは切断されている/変異している(配列番号44)。非AAV2 ITRなどの非AAV2ゲノムも発現カセットをパッケージングするために使用できることは理解されるであろう。CYP4V2 cDNAの直前にはコザック配列(配列番号37又は配列番号38)が挿入された。これらの発現カセットの設計を示す模式図については、図7を参照。CYP4V2 cDNAは異なる発現カセットにパッケージングしてもよいこと、またCYP4V2発現カセットは異なるAAVベクターにパッケージングしてもよいことは理解されよう。例えば、CYP4V2op cDNAは、CAG-CYP4V2-WPRE-bGHポリA発現カセットにおいてもEFS-CYP4V2-SPA発現カセットにおいても使用できる。CAG-CYP4V2-WPRE-bGHポリA発現カセット又はEFS-CYP4V2-SPA発現カセットは、いかなる適切なAAVベクターにもパッケージング可能であり、非限定的な例としてAAV1、AAV2、AAV2(Y444F+Y500F+Y730F)、AAV5、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV6、AAV7、AAV4、AAV12、AAV-PHP.B、及び他のベクターが挙げられる。組換えscAAVベクターを作製するために、scAAV設計を任意の適切なAAVベクター(例えば、scAAV1、scAAV2、scAAV2(Y444F+Y500F+Y730F)、scAAV5、scAAV8、scAAV8(Y733F)、scAAV3、scAAV4、scAAV6、scAAV7、scAAV9、scAAV12など)で使用してもよい。

【0482】

CYP4V2遺伝子治療のために他のベクター(例えば、レンチウイルスベクター又はプラスミド)を設計する際にも、同様の設計プロセスを使用できることが理解されよう。ベクターの種類に応じて、上記の特定の要素は必須ではないこともあり、また状況に応じ

10

20

30

40

50

て調整される必要がある場合もある（例えば、プロモーター配列）。

【0483】

本明細書で規定される cDNA、制御配列、AAV型及び設計に加えて、CYP4V2 発現カセット及び送達ベクターの各主要要素の他の設計オプションを使用することもできる。標的細胞型における様々な AAV 型の形質導入効率及び様々なプロモーターの強度を比較する方法の例は本明細書の実施例セクションに記載されている。発現カセット及び送達ベクターにおける他の主要な要素の設計オプションを評価及び比較するために同様の方法を用いることもできる（例えば、cDNA、エンハンサー、ポリAシグナル、ssAAV vs. scAAV、AAV vs. HSV など）。さらに、本明細書で提示されるように、CYP4V2 発現カセット及び送達ベクターの効率は、BCD 細胞モデル（例えば、BCD 患者の iPS-RPE 細胞）での試験を通じて、本明細書に記載の方法、及び／又は、生化学的異常、RPE 機能若しくは萎縮を評価する他の方法を用いて評価及び比較することができる。

10

【0484】

上述の CYP4V2 cDNA、発現カセット、及び送達ベクターを、BCD 患者特異的ヒト iPS-RPE 細胞系で試験した。結果を以下の実施例で示し検討する。

【0485】

さらに、様々な制御因子配列間（非限定的な例として、ITR とプロモーターとの間、エンハンサーとポリAシグナルとの間、又はポリAシグナルと ITR との間）又は制御配列と cDNA との間（非限定的な例として、プロモーターと cDNA との間、cDNA とエンハンサーとの間、又は cDNA とポリAシグナルとの間）のジャンクション／リンカー配列も、標的遺伝子（CYP4V2 など）の発現を制御する役割を果たしている可能性がある。本研究で使用した異なる CYP4V2 発現カセットの配列（ITR 及びジャンクション／リンカー配列を含む）を、後述の実施例 11 に挙げる。

20

【0486】

本実施例で検討される特定の制御配列及び ITR 配列の例示的な配列を、以下に提示する。

【0487】

【数2A】

SEQ ID NO: 32 (CAG promoter, 1715 bp)

30

```
GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGAC
CCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG
ACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC
CAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATG
ACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGC
AGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTAT
TTATTTATTTTAAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCG
```

【0488】

40

【数2B】

50

GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGC
 GGC GCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAG
 CGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCC
 GCCCCCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCT
 CCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCT
 TAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTTGTG
 TCGTGCGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCCGCGTGCCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCG
 GGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGG
 GGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTG
 GGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCG
 CTTGCGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGG
 CAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGG
 CGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATC
 GTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCG
 CCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGA
 GGGCCTTCGTGCGTGCGCGCGCCGCGTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGCAGGG
 GGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTAACGGCGGCT
 CTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTG
 GTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAA

10

SEQ ID NO: 33 (WPRE enhancer, 589 bp)

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCT
 CCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGC
 TTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTG
 TCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCC
 ACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCAT
 CGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGTTGGTGT
 TGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGG
 ACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCC
 GGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCG
 CCTCCCCG

20

SEQ ID NO: 34 (bGH polyA, 225 bp)

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCTTCCTTGACCC
 TGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTTGTCTGAGT
 AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA
 TAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG

30

SEQ ID NO: 35 (EFS promoter, 235 bp)

g attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc
 cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt ggcgcggggg
 aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgaggggtg ggggagaacc
 gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac
 acag

40

【 0 4 8 9 】

【 数 2 C 】

50

SEQ ID NO: 36 (SPA, 54 bp)

GATCCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG

SEQ ID NO: 37 (Kozak sequence, 6 bp)

GCCACC

SEQ ID NO: 38 (Kozak sequence, 5 bp)

CCACC

SEQ ID NO: 39 (SV40 late PolyA, 120 bp)

TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAT
AAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTAT

10

SEQ ID NO: 40 (CMV promoter, 576 bp)

TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAA
CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGAC
GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGT
AAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGC
GTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTG
TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAT
GGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAG

20

SEQ ID NO: 41 (EF-1 alpha promoter, 1184 bp)

cgtgaggctccgggtgcccgctcagtgggcagagcgcacatcgccacagtcctccgagaagt
tggtggggaggggtcggaattgaaccgggtgcctagagaagggtggcgcggggtaaactgggaaagt
gatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagt
cgccgtgaacgtttctttttcgcaacgggtttgccgccagaaacacaggtaagtgcggtgtgtggtt
cccgcgggcctggcctcttttacgggttatggcccttgcggtgccttgaattacttccacctggctg
cagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcg
ttaaggagcccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgcgcgctgc
gaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgctttcgataagtctctagccatttaaaat
tgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtccttgtaaagtcgggccaagatctgca
cactggtatctcggttttttggggccgcgggcggcgacggggcccggtgcgtccagcgcacatggt
cggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccgg
cctgctctggtgcctggcctcgcgcgcgcgtgtatcgcccgccctgggcggcaaggctggcccg
gtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccgccctgctgcaggagctcaaaat
ggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaaggccctttccg
tcctcagccgtcgttcatgtgactccacggagtagccgggcgcgtccaggcacctcgattagtt
ctcgagcttttggagtacgtcgtcttttaggttggggggaggggttttatgcatggagtttcccc
aactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaattt
gccctttttgagtttgatcttgggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttct
tccatttcagggtgctcgtga

30

【 0 4 9 0 】

【 数 2 D 】

40

50

SEQ ID NO: 42 (AAV2 5' Left-ITR, 141 bp)

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag
cccgggcgtc gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag
ggagtggcca actccatcac taggggttcc t

SEQ ID NO: 43 (AAV2 3' Right-ITR, 141 bp)

ag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctgcctcgct
cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc ttgcccggg cggcctcagt
gagcgagcga gcgcgcagct gcctgcagg

SEQ ID NO: 44 (mutant AAV2 5' ITR in scAAV construct, 117 bp)

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag
cccgggcgtc gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag
ggagtgg

SEQ ID NO: 45 (AAV2 3' ITR in scAAV construct, 141 bp)

aggaacc ctatgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct
cgctcactga ggccgggcca ccaaggctcg ccgacgccc gggttttgcc cgggcggcct
cagtgcgcga gcgagcgcg agctgcctgc agg

【0491】

(実施例10－BCD細胞モデルを使用して、AAV血清型とキャプシド構造、プロモーターと他の制御配列活性、及びcDNA発現量、並びにCYP4V2遺伝子治療におけるベクターの全体的な有効性及び投与量を試験、比較、スクリーニングし、様々な患者毎に個別化された最適なベクター及び投与量を評価する方法)

BCD細胞モデル(例えば、BCD患者特異的iPS-RPE細胞系、又は人工的に作製されたCYP4V2変異を含むES-RPE、iPS-RPE、若しくはRPE細胞系)は、薬物及び用量のスクリーニングに使用することができる。CYP4V2遺伝子治療の様々な構成要素と投与量を試験、比較、及びスクリーニングするために、BCD患者特異的iPS-RPE試料を使用した(例えば、CYP4V2発現カセットとCYP4V2 cDNAにおける、ベクター型(AAV血清型やカプシド構造など)、プロモーター、エンハンサー、ポリAシグナル、及び他の配列、並びにベクターの全体的な有効性及び投与量など)。表現型レスキューを用いて、有効性を試験及び比較した。

【0492】

様々な血清型のベクター(例えば、AAV1、AAV2、AAV5、AAV8、AAV9)、カプシド(例えば、カプシド変異を有するAAV(AAV2 vs. AAV2 tri(Y-F)など)、又は構造(例えば、scAAV vs. ssAAV)を、同じ発現カセットを持つ異なるベクターを使用して比較して、試験することができる。例えば、AAV2.CYP4V2 op、AAV2 tri(Y-F).CYP4V2 op、及びAAV5.CYP4V2 opは全て同じ発現カセットを持っているが、AAV血清型/カプシドが異なる。scAAV1.CYP4V2 op、scAAV5.CYP4V2 op、及びssAAV9.CYP4V2 opは全て同じ発現カセットを共有しているが、AAV血清型は異なる。表現型レスキュー結果を使用して、CYP4V2 cDNAをBCD患者RPE細胞に伝達及び送達する際の、AAV血清型/カプシド(例えば、AAV2 vs. AAV2 tri(Y-F) vs. AAV5)及び構造(例えば、scAAV5 vs. ssAAV5)の効率の違いを試験及び比較することができる。

【0493】

(試験及び比較された要素以外は)同じコンストラクトのrAAVベクターの表現型レスキュー効力を試験することにより、同じ方法を使用して、異なる発現カセット、cDNA、又は制御配列若しくは他の配列(例えば、ジャンクション/リンカー配列)の活性レベルを試験及び比較することができる。

【0494】

さらに、実施例に記載の通り、治療有効用量範囲（細胞あたりのMOIで測定）を評価するために、同じベクター（例えば、rAAVベクター（scAAV1.CYP4V2opなど））の異なる用量（例えば、 1×10^4 及び 1×10^5 ）を同じ患者のiPS-RPE試料に適用してもよい。

【0495】

さらに、BCD細胞モデルが個人差を示した場合、これを使用して、各患者に個別化した最適な投与量及びベクターコンストラクトを個別に評価及び発見することもできる。

【0496】

より関連のある検討については、本明細書の関連する実施例及び開示を参照。

【0497】

（実施例11－機能的なCYP4V2をコードする核酸配列及び発現カセットを保有する様々な組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターの作製）

AAV2.CYP4V2op、AAV2tri(Y-F).CYP4V2op、AAV5.CYP4V2st、AAV5.CYP4V2op、AAV8.CYP4V2fv、及びscAAV1.CYP4V2opを含む、本研究用に設計された様々なAAV.CYP4V2ベクター（本明細書の実施例を参照）は、Vector BioLabs（米国ペンシルベニア州マルバーン）に特注した。Vector BioLabsの組換えAAVベクターはヘルパーフリーである。製造プロセスは以下を含む：

（1）関連するCYP4V2 cDNA（すなわち、CYP4V2st、CYP4V2op、又はCYP4V2fv）及びCYP4V2発現カセットの制御配列を含むAAV2 ITR含有プラスミドであるpAAVシスプラスミドをクローニングすること、

（2）Qiagen Endo-free Mega Prepキットを使用した、pAAVシスプラスミド及び補充プラスミド（関連するAAV Rep-Cap遺伝子を保有するプラスミド、及びアデノウイルスから分離されたヘルパー遺伝子を提供するプラスミド）の大規模な調製、

（3）上記の3つのプラスミドのHEK293細胞のプレートへの大規模なコトランスフェクション、

（4）トランスフェクションの2日後、細胞ペレットを回収し、3サイクルの凍結／解凍を使用してウイルスを放出した。CsCl勾配超遠心分離を使用してAAVウイルスを精製した後、脱塩した。さらに、

（5）リアルタイムPCRを使用してウイルス力価（ゲノムコピー（GC）／mL）を決定した。

精製したrAAVベクターは、使用するまで -80°C で保存した。

【0498】

本研究用の様々なAAV.CYP4V2ベクターにパッケージングされた様々なCYP4V2発現カセット（ITR及びジャンクション／リンカー配列を含む）の配列を以下に示す。

【0499】

【数1】

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 60 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op, and AAV5.CYP4V2op.:

Left-ITR: 1-141

CAG promoter: 237-1951

CYP4V2op cDNA: 2002-3579

WPRES enhancer: 3736-4324

bGH polyA: 4350-4574

Right-ITR 4659-4799

```

1  CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51  CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC TCGGGCCAAT
151 TCAGTCGATA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGATTAAAT TACGCGCTCT
201 CTTAAGGTAG CCCCCGGACG CGTCAATTGA GATCTCGACA TTGATTATTG
251 ACTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCATA
301 TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC
351 CGCCCAACGA CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCACATA
401 GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG
451 GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC
501 CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCAG
551 TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT
601 CATCGCTATT ACCATGGGTC GAGGTGAGCC CCACGTTCTG CTTCACTCTC
651 CCCATCTCCC CCCCCTCCCC ACCCCCAATT TTGTATTTAT TTATTTTTTA
701 ATTATTTTGT GCAGCGATGG GGGCGGGGGG GGGGGGGGCG CGCGCCAGGC
751 GGGGCGGGGC GGGGCGAGGG GCGGGGCGGG GCGAGGCGGA GAGGTGCGGC
801 GGCAGCCAAT CAGAGCGGCG CGCTCCGAAA GTTTCCTTTT ATGGCGAGGC
851 GGCAGCGGCG GCGGCCCTAT AAAAAGCGAA GCGCGCGGCG GGCAGGAGTC
901 GCTGCGTTGC CTTCGCCCCG TGCCCCGCTC CGCGCCGCCCT CGCGCCGCCCT
951 GCCCCGGCTC TGAATGACCG CGTTACTCCC ACAGGTGAGC GGGCGGGACG
1001 GCCCTTCTCC TCCGGGCTGT AATTAGCGCT TGGTTAATG ACGGCTCGTT
1051 TCTTTTCTGT GGCTGCGTGA AAGCCTTAAA GGGCTCCGGG AGGGCCCTTT
1101 GTGCGGGGGG GAGCGGCTCG GGGGGTGCCT GCGTGTGTGT GTGCGTGGGG
1151 AGCGCCGCGT GCGGCCCGCG CTGCCCCGGC GCTGTGAGCG CTGCGGGGCG
1201 GGCAGGGGGG TTTGTGCGCT CCGCGTGTGC GCGAGGGGAG CGCGGCCGGG
1251 GGCAGTGCCC CGCGGTGCGG GGGGGCTGCG AGGGGAACAA AGGCTGCGTG
1301 CGGGGTGTGT GCGTGGGGGG GTGAGCAGGG GGTGTGGGCG CGCGGTCGCG
1351 GCTGTAACCC CCCCCTGCAC CCCCCTCCCC GAGTTGCTGA GCACGGCCCG
1401 GCTTCGGGTG CGGGGCTCCG TGCGGGGCGT GGCAGGGGGC TCGCCGTGCC
1451 GGGCGGGGGG TGGCGGCAGG TGGGGGTGCC GGGCGGGGCG GGGCCGCCTC
1501 GGGCCGGGGA GGGCTCGGGG GAGGGGCGCG GCGGCCCGCG AGCGCCGGCG
1551 GCTGTCGAGG CGCGGCGAGC CGCAGCCATT GCCTTTTATG GTAATCGTGC
1601 GAGAGGGGCG AGGGACTTCC TTTGTCCCAA ATCTGGCGGA GCCGAAATCT

```

10

20

30

【0500】

【数2】

40

50

1651 GGGAGGCGCC GCCGCACCCC CTCTAGCGGG CGCGGGCGAA GCGGTGCGGC
 1701 GCCGGCAGGA AGGAAATGGG CGGGGAGGGC CTTCGTGCGT CGCCGCGCCG
 1751 CCGTCCCCCTT CTCCATCTCC AGCCTCGGGG CTGCCGCAGG GGGACGGCTG
 1801 CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG
 1851 GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT AACCATGTTC ATGCCTTCTT CTTTTTCCTA
 1901 CAGCTCCTGG GCAACGTGCT GGTTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA
 1951 AGAATTCTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA CCCAAGCTGG CTAGAGCCAC
 2001 CATGGCTGGA CTGTGGCTGG GACTGGTGTG GCAGAACTG CTGCTGTGGG
 2051 GGGCCGCTTC CGCACTGTCA CTGGCTGGGG CTTCCTGGT GCTGAGCCTG
 2101 CTGCAGAGGG TGGCCTCCTA CGCCAGAAAG TGGCAGCAGA TGAGGCCCAT
 2151 CCCTACCGTG GCCAGAGCCT ATCCACTGGT GGGACACGCA CTGCTGATGA
 2201 AGCCTGACGG CAGAGAGTTC TTTCAGCAGA TCATCGAGTA CACAGAGGAG
 2251 TATAGGCACA TGCCACTGCT GAAGCTGTGG GTGGGACCCG TGCCTATGGT
 2301 GGCCCTGTAC AACGCCGAGA ATGTGGAAGT GATCCTGACC AGCAGCAAGC
 2351 AGATCGATAA GTCTAGCATG TATAAGTTCC TGGAGCCTTG GCTGGGCCCTG
 2401 GGCCTGCTGA CCTCTACAGG CAACAAGTGG AGGAGCCGGA GAAAGATGCT
 2451 GACCCCAACA TTCCACTTTA CAATCCTGGA GGACTTCCTG GACATCATGA
 2501 ACGAGCAGGC CAATATCCTG GTGAAGAAGC TGGAGAAGCA CATCAACCAG
 2551 GAGGCCTTTA ATTGCTTCTT TTACATCACC CTGTGCGCCC TGGACATCAT
 2601 CTGTGAGACA GCTATGGGCA AGAACATCGG CGCCCAGTCT AATGACGATA
 2651 GCGAGTACGT CCGGGCCGTG TATAGAATGA GCGAGATGAT CTTTAGGCCG
 2701 ATCAAGATGC CCTGGCTGTG GCTGGATCTG TGGTATCTGA TGTTCAAGGA
 2751 GGGCTGGGAG CACAAGAAGT CCCTGCAGAT CCTGCACACC TTTACAACT
 2801 CTGTGATCGC CGAGAGAGCC AATGAGATGA ACGCCAATGA GGAAGTAGG
 2851 GGCGATGGAA GGGGCAGCGC CCCTTCCAAG AACAAGCGGA GAGCCTTCCT
 2901 GGACCTGCTG CTGAGCGTGA CCGACGATGA GGGCAATCGC CTGTCCCACG
 2951 AGGACATCCG GGAGGAGGTG GATACATTCA TGTTTGAGGG ACACGACACC
 3001 ACAGCCGCCG CCATCAACTG GTCCCTGTAC CTGCTGGGCT CTAATCCAGA
 3051 GGTGCAGAAAG AAGGTGGATC ACGAGCTGGA CGACGTGTTT GGCAAGTCCG
 3101 ACAGGCCAGC AACCCTGGAG GATCTGAAGA AGCTGAGATA CCTGGAGTGC
 3151 GTGATCAAGG AGACACTGCG CCTGTTCCCC TCTGTGCCTC TGTTTGCCCG
 3201 GTCCGTGTCT GAGGACTGTG AGGTGGCCGG CTATCGCGTG CTGAAGGGCA
 3251 CCGAGGCCGT GATCATCCCT TACGCCCTGC ACCGGGACCC CAGGTATTTT
 3301 CCTAACCCAG AGGAGTTTCA GCCAGAGAGA TTCTTTCCCG AGAATGCCCA
 3351 GGGCAGGCAC CCTTACGCCT ATGTGCCATT CTCCGCCGGA CCAAGGAACT
 3401 GCATCGGACA GAAGTTTGCC GTGATGGAGG AGAAAACCAT CCTGTCTTGT
 3451 ATCCTGAGAC ACTTCTGGAT CGAGAGCAAT CAGAAGAGGG AGGAGCTGGG
 3501 CCTGGAGGGA CAGCTGATCC TGCGGCCAAG CAACGGCATC TGGATCAAAC
 3551 TGAAAAGAAG GAACGCTGAC GAGAGGTAAA AGCTTGGTAC CGATATCGCG
 3601 GCCGCCCTAG GGAGCTCCTC GAGGCGGCCC GCTCGAGTCT AGAGGGCCCT
 3651 TCGAAGGTAA GCCTATCCCT AACCCTCTCC TCGGTCTCGA TTCTACGCGT
 3701 ACCGGTCATC ATCACCATCA CCATTGAGTT TCGATAATCA ACCTCTGGAT
 3751 TACAAAATTT GTGAAAGATT GACTGGTATT CTTAACATATG TTGCTCCTTT
 3801 TACGCTATGT GGATACGCTG CTTTAATGCC TTTGTATCAT GCTATTGCTT
 3851 CCCGTATGGC TTTCATTTTC TCCTCCTTGT ATAAATCCTG GTTGCTGTCT
 3901 CTTTATGAGG AGTTGTGGCC CGTTGTGAGG CAACGTGGCG TGGTGTGCAC
 3951 TGTGTTTGCT GACGCAACCC CCACTGGTTG GGGCATTGCC ACCACCTGTC
 4001 AGCTCCTTTT CGGGACTTTC GCTTTCCCCC TCCCTATTGC CACGGCGGAA
 4051 CTCATCGCCG CCTGCCTTGC CCGCTGCTGG ACAGGGGCTC GGCTGTTGGG
 4101 CACTGACAAT TCCGTGGTGT TGTCGGGGAA ATCATCGTCC TTTCTTGGC
 4151 TGCTCGCCTG TGTGGCCACC TGGATTCTGC GCGGGACGTC CTTCTGCTAC
 4201 GTCCCTTTCG CCCTCAATCC AGCGGACCTT CCTTCCCGCG GCCTGCTGCC
 4251 GGCTCTGCGG CCTCTTCCGC GTCTTCGCCT TCGCCCTCAG ACGAGTCGGA
 4301 TCTCCCTTTG GGCCGCCTCC CCGCATCGAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC
 4351 TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCCCTC CCCGTGCCTT

10

20

30

40

【0501】

【数3】

```

4401 CCTTGACCTT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG TCCTTTCCTA ATAAAATGAG
4451 GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG
4501 GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG
4551 CTGGGGATGC GGTGGGCTCT ATGGCTTCTG AGGCGGAAAG AACAGATCC
4601 TCTCTTAAGG TAGCATCGAG ATTTAAATTA GGGATAACAG GGTAAATGGCG
4651 CGGGCCGCAG GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG
4701 CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC
4751 TTTGCCCGGG CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

SEQ ID NO: 61 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV5.CYP4V2st.
 AAV5.CYP4V2st has the same promoter (CAG), enhancer (WPRE) and polyA (bGH-polyA) as AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op and AAV5.CYP4V2op (SEQ ID NO: 60) but different CYP4V2 cDNA and junction/linker sequences:

Left-ITR: 1-141

CAG promoter: 166-1880

CYP4V2st cDNA: 1938-3515

WPRE enhancer: 3551-4139

bGH polyA: 4163-4387

Right-ITR: 4399-4539

```

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TCGGGCCTAA
151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
251 ACTTACGGTA AATGGCCCCG CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT
301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCC ACTTGCCAGT
401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCTG
551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTTACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
601 CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
651 GCGGGGGGGG GGGGGGGGCG GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
701 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
751 GCTCCGAAAG TTTCCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA
801 AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
851 GCCCCGCTCC GCGCCGCCTC GCGCCGCCCG CCCCGGCTCT GACTGACCGC
901 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCTTCTCCT CCGGGCTGTA
951 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTCTGTG GCTGCGTGAA
1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TCGGGGGGGG AGCGGCTCGG
1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TCGTGGGGA GCGCGCGGTG CGGCCGCGC
1101 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TCGGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
1201 GGGGTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTGCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
1301 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCCG CTTGCGGTGC GGGGCTCCGT
1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCGAGGT
1401 GGGGGTGCCG GCGGGGGCGG GCGCGCCTCG GCGGGGGAG GGCTCGGGGG
1451 AGGGGCGCGG CGGCCCGGGA GCGCCGCGCG CTGTGAGGCG GCGGCGAGCC
1501 GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
1551 TTGTCCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCCG CCGCACCCCC
1601 TCTAGCGGGG GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAATGGGC
1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGCCGCG GTTCCCTTTC TCCATCTCCA
1701 GCCTCGGGGC TGCCGCAGGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG

```

【0502】

【数4】

10

20

30

40

1751 GGCGGGGTTT GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
 1801 ACCATGTTTCA TGCCTTCTTC TTTTCTCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
 1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
 1901 ATAGGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT
 1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGC GGCGAGTGCC
 2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCTTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGCC
 2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCCATCCCC ACGGTGGCCC
 2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
 2151 GAATTTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
 2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTGCG GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG
 2251 CAGAAAATGT GGAGGTAATT TTAAGTAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
 2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
 2351 TACTGGAAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTTCC
 2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT
 2451 ATATTGGTTA AGAAACTTGA AAAACACATT AACCAAGAAG CATTTAAGT
 2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
 2551 TGGGGAAGAA TATTGGTGCT CAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCGT
 2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG
 2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
 2701 AAAAGAGCCT TCAGATCCTA CATACTTTTA CCAACAGTGT CATCGCTGAA
 2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG
 2801 CTCTGCCCCC TCCAAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
 2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTGAGAAA
 2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGCAC GATACAACTG CAGCTGCAAT
 2951 AAAGTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG
 3001 TGGATCATGA ATTGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCGCTACA
 3051 GTAGAAGACC TGAAGAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
 3101 CCTTCGCTT TTTCTTCTG TTCTTTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG
 3151 ATTGTGAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC
 3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCCA ACCCCGAGGA
 3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
 3301 ATGCCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAAG
 3351 TTTGCTGTGA TGGAAGAAAA GACCATTCTT TCGTGATCC TGAGGCACTT
 3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
 3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCATCTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
 3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
 3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
 3601 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
 3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
 3701 TCCTGCTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
 3751 TGGCGTGGTG TGCACTGTGT TTGCTGACGC AACCCTTACT GGTGAGGCA
 3801 TTGCCACAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCTGCTT CCCCCTCCCT
 3851 ATTGCCACGG CGGAACCTAT CGCCGCTGCT CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
 3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTG GGGAAATCAT
 3951 CGTCCCTTTC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
 4001 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TCGGCCCCC AATCCAGCGG ACCTTCTTTC
 4051 CCGCGGCTG CTGCGGCTC TGCGGCTCT TCCGCGTCT CGCCTTCGCC
 4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCGG CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
 4151 CTGACTAGAC GACTGTGCC TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
 4201 TCCCCGCTG CTTCCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
 4251 CTAATAAAAT GAGGAAATG CATCGCATG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
 4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
 4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCGA
 4401 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
 4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG

10

20

30

40

【0503】

【数5】

4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

SEQ ID NO: 62 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV8.CYP4V2fv. AAV8.CYP4V2fv has the same promoter (CAG), enhancer (WPRE) and polyA (bGH-polyA) and junction/linker sequences as AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) and differs only in CYP4V2 cDNA sequence:

Left-ITR: 1-141

CAG promoter: 166-1880

CYP4V2fv cDNA: 1938-3515

WPRE enhancer: 3551-4139

bGH polyA: 4163-4387

Right-ITR: 4399-4539

```

1  CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51  CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGCCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TCGGGCCTAA
151 GGC AATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
251 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT
301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCTG
551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
601 CCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTAA TTATTTGTG CAGCGATGGG
651 GGC GGGGGG GGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
701 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
751 GCTCCGAAAG TTTCCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA
801 AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
851 GCCCCGCTCC GCGCCGCTC GCGCCGCCCC CCCCGGCTCT GACTGACCGC
901 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
951 ATTAGCGCTT GGTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTCTGTG GCTGCGTGAA
1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGA GGGCCCTTTC TGCGGGGGGG AGCGGCTCGG
1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGGA GCGCCGCGTG CGGCCGCGC
1101 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGCCGCGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
1201 GGGGTGCGGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTGCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
1301 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTGCGGTGC GGGGCTCCGT
1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCGAGGT
1401 GGGGGTGCCG GCGGGGCGG GCGCCCTCG GCGGGGGAG GGCTCGGGGG
1451 AGGGGCGCGG CGGCCCGGA GCGCGGCGG CTGTGAGGCG GCGGCGAGCC
1501 GCAGCCATTG CCTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
1551 TTGTCCTCAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCCG CCGCACCCCC
1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGCGCGC CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
1701 GCCTCGGGGC TGCCGAGGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG
1751 GCGGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
1801 ACCATGTTCA TGCCTCTTTC TTTTCTCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGCAAA GAATCTAAT ACGACTCACT
1901 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT

```

【0504】

【数6】

10

20

30

40

50

```

1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGC GCGAGTGCC
2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGGC
2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCCATCCCC ACGGTGGCCC
2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTCG GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG
2251 CAGAAAATGT GGAGGTAATT TTAAGTAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
2351 TACTGGAAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTTCC
2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT
2451 ATATTGGTTA AGAACTTGA AAAACACATT AACCAAGAAG CATTTAACTG
2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
2551 TGGGGAAGAA TATTGGTGCT CAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCGT
2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG
2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
2701 AAAAGAGCCT TAAGATCCTA CATACTTTTA CCAACAGTGT CATCGCGGAA
2751 CGGGCCAAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAAGAGGTG ATGGCAGGGG
2801 CTCTGCCCCC TCCAAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTCGAGAA
2901 GAAGTTGACA CTTTCATGTT TGAGGGGCAC GATACAACTG CAGCTGCAAT
2951 AAAGTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG
3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCCTACA
3051 GTAGAAGACC TGAAGAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
3101 CCTTCGCTT TTTCTTCTG TTCCTTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG
3151 ATTGTGAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC
3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCCA ACCCCGAGGA
3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
3301 ATGCCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAG
3351 TTTGCTGTGA TGGGAAGAAA GACCATTCTT TCGTGCATCC TGAGGCACTT
3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCATCTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
3601 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCTTTGT
3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
3701 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
3751 TGGCGTGGTG TGCATGTGT TTGCTGACGC ACCCCCACT GGTGGGGCA
3801 TTGCCACCAC CTGTACGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
3851 ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTCG GGGAAATCAT
3951 CGTCCCTTCT TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
4001 ACGTCCCTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
4051 CCGCGGCCCTG CTGCCGGCTC TGCGGCCTCT TCCGCGTCTT CGCCTTCGCC
4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCCG CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
4151 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
4201 TCCCCCGTGC CTTCTTGGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
4251 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCAG
4401 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG
4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

10

20

30

SEQ ID NO: 63 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV5.CYP4V2op (new).
AAV5.CYP4V2op (new) has the same promoter (CAG), enhancer (WPRE) and polyA

40

【 0 5 0 5 】

【数 7】

(bGH-polyA) and the same junction/linker sequences as AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) and AAV8.CYP4V2fv (SEQ ID NO: 62) but different CYP4V2 cDNA sequences:
 Left-ITR: 1-141
 CAG promoter: 166-1880
 CYP4V2op cDNA: 1938-3515
 WPRE enhancer: 3551-4139
 bGH polyA: 4163-4387
 Right-ITR: 4399-4539

```

CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
CCCCGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC TGCGGCCTAA
GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCGCAACGAC CCGCGCCCAT
TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCTG
AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
CCCCCAATT TGTATTTAT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
GGCGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
GCTCCGAAAG TTTCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA
AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCGGT
GCCCCGCTCC GCGCCGCCCT GCGCCGCCCG CCGCGGCTCT GACTGACCGC
GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTCTGTG GCTGCGTGAA
AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTGT TGCGGGGGGG AGCGGCTCGG
GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGGA GCGCGCGTG CGGCCGCGC
TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGGCGG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
GGGGTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
TGAGCAGGGG GTGTGGGCGG GCGGTGCGG CTGTAACCCC CCCTGCACC
CCCTCCCGG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTGCGGTGC GGGGCTCCGT
GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCGAGGT
GGGGGTGCCG GCGGGGGCGG GGCGCCCTCG GGCGGGGAG GGCTCGGGGG
AGGGGCGCGG CGGCCCGGGA GCGCCGCGCG CTGTGAGGCG GCGGCGAGCC
GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
TTGTCCCAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCGG CCGCACCCCC
TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGCGCGC CGTCCCTTC TCCATCTCCA
GCCTCGGGGC TGCCGAGGGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG
GGCGGGGTTT GGCTTCTGCG GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTCTCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACC
ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCACTGTCACTGGCTGGG
GCTTCACTGGTGCTGAGCCTGCTGACAGAGGGTGGCCTCCTACGCCAGAAAGTGGCAGCAGATGAGGCCCATCCCTACC
GTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTGCTGATGAAGCTGACGGCAGAGAGTTCTTTGAGCAGATCATC
GAGTACACAGAGGAGTATAGGCACATGCCACTGCTGAAGCTGTGGGTGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTGTACAAC
GCCGAGAAATGTGGAAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCAGATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCTGGAGCCTTGG
CTGGGCCCTGGGCCTGCTGACCTCTACAGGCAACAAGTGGAGGAGCCGGAGAAAGATGCTGACCCCAACATTCCACTTT
ACAATCCTGGAGGACTTCTTGACATCATGAACGAGCAGGCCAATATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAAC

```

【0506】

【数8】

10

20

30

40

50

CAGGAGGCCTTTAATTGCTTCTTTTACATCACCCTGTGCGCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCTATGGGCAAGAAC
 ATCGGCGCCAGTCTAATGACGATAGCGAGTACGTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCATC
 AAGATGCCCTGGCTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAAGAAGTCCCTGCAGATC
 CTGCACACCTTTACAACTCTGTGATCGCCGAGAGAGCCAATGAGATGAACGCCAATGAGGACTGTAGGGGCGATGGF
 AGGGGCAGCGCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTTCCTGGACCTGCTGCTGAGCGTGACCGACGATGAGGGCAA
 CGCCTGTCCCACGAGGACATCCGGGAGGAGGTGGATACATTGTTTGGGGACACGACACCACAGCCGCCGCCATC
 AACTGGTCCCTGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAGGTGCAGAAGAAGGTGGATCACGAGCTGGACGACGTGTTTCGGC
 AAGTCCGACAGGCCAGCAACCGTGGAGGATCTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCGTGATCAAGGAGACACTGCGC
 CTGTTCCCTCTGTGCTCTGTTTGGCCGGTCCGTGTCTGAGGACTGTGAGGTGGCCGGCTATCGCGTGCTGAAGGGC
 ACCGAGGCCGTGATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGACCCAGGTATTTCCCTAACCCAGAGGAGTTTCAGCCAGAC
 AGATTCTTTCCCGAATGCCAGGGCAGGCACCCCTACGCCTATGTGCCATTCTCCGCCGGACCAAGGAAGTGCATC
 GGACAGAAGTTTGCCGTGATGGAGGAGAAAACCATCTGTCTTGTATCCTGAGACACTTCTGGATCGAGAGCAATCAG
 AAGAGGGAGGAGCTGGGCTGGAGGGACAGCTGATCTGCGGCCAAGCAACGGCATCTGGATCAAACCTGAAAAGAAGC
 AACGCTGACGAGGTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
 CTATGTTGCT CTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
 TGGCGTGGTG TGCACTGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
 TTGCCACCAC CTGTCACTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
 ATTGCCACGG CGGAACCTCAT CGCCGCCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTG GGGAAATCAT
 CGTCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
 ACGTCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
 CCGCGGCCTG CTGCCGGCTC TGCGGCCTCT TCCGCGTCTT CGCTTCGCC
 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCGG CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
 CTGACTAGAC GACTGTGCTT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTGTGCCCC
 TCCCCGCTGC CTTCCCTTAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCCTTC
 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
 AATAGCAGGC ATGTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCAG
 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGTTCGCCC ACGCCCGGG TTTGCCCGGG
 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

10

20

SEQ ID NO: 64 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in scAAV1.CYP4V2op,
 scAAV5.CYP4V2op, and scAAV9.CYP4V2op.

Left-ITR (truncated): 1-117

EFS promoter: 130-364

CYP4V2op cDNA: 520-2097

SPA: 2116-2169

Right-ITR: 2263-2403

30

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccggggcgtc
 61 gggcgacctt tggctgcccg gectcagtga gcgagcgagc ggcagagag ggagtggacg
 121 cgtaggcctg attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtcce
 181 cgagaagttg gggggagggg tggccaattg aaccgggtgc tagagaaggt ggcgcggggt
 241 aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgctttttt cccgaggggtg ggggagaacc
 301 gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tcttttttgc aacgggtttg ccgccagaa
 361 acaggtgtcg tgacgcgacc aggtatgcat ctgcagctct aaggtaaata taaaattttt
 421 aagtgtataa tgtgtaaac tactgattct aattgtttct ctcttttaga ttccaacctt
 481 tggaaactgac tgcagggatc caagctttct agagccacca tggctggact gtggtcggga
 541 ctggtgtggc agaaactgct gctgtggggg gccgcttccg cactgtcact ggcgtgggct
 601 tcaactgtgc tgagcctgct gcagaggggt gcctctacg ccagaaagtg gcagcagatg
 661 aggeccatcc ctaccgtggc cagagcctat ccaactgggtg gacacgcact gctgatgaag
 721 cctgacggca gagagttctt tcagcagatc atcgagtaca cagaggagta taggcacatg

40

【 0 5 0 7 】

【 数 9 】

```

781 ccactgctga agctgtgggt gggacccgtg cctatggtgg ccctgtacaa cgccgagaat
841 gtggaagtga tcctgaccag cagcaagcag atcgataagt ctagcatgta taagttcctg
901 gagccttggc tgggcctggg cctgctgacc tctacaggca acaagtggag gagccggaga
961 aagatgctga cccaacatt ccactttaca atcctggagg acttcctgga catcatgaac
1021 gagcaggcca atatcctggt gaagaagctg gagaagcaca tcaaccaggga ggcccttaaat
1081 tgcttctttt acatcacccct gtgcgccctg gacatcatct gtgagacagc tatgggcaag
1141 aacatcggcg cccagtctaa tgacgatagc gagtacgtgc gggccgtgta tagaatgagc
1201 gagatgatct ttaggcgcat caagatgccc tggctgtggc tggatctgtg gtatctgatg
1261 ttcaaggagg gctgggagca caagaagtcc ctgcagatcc tgcacacctt tacaaactct
1321 gtgatcgccg agagagccaa tgagatgaac gccaatgagg actgtagggg cgatggaagg
1381 ggcagcgccc cttccaagaa caagcggaga gccttcctgg acctgctgct gagcgtgacc
1441 gacgatgagg gcaatcgctt gtcccacgag gacatccggg aggaggtgga tacattcatg
1501 tttgagggac acgacaccac agccgcgcgc atcaactggg ccctgtacct gctgggctct
1561 aatccagagg tgcagaagaa ggtggatcac gagctggacg acgtgttcgg caagtccgac
1621 aggccagcaa ccgtggaggga tctgaagaag ctgagatacc tggagtgcgt gatcaaggag
1681 aactgogcc tgttcccctc tgtgcctctg tttgcccggt ccgtgtctga ggactgtgag
1741 gtggccggct atcgcgctgct gaagggcacc gaggcctgta tcatccctta cgccctgcac
1801 cgggacccca ggtatttccc taaccagag gagtttcagc cagagagatt ctttcccag
1861 aatgccagag gcaggcacc ttacgcctat gtgccattct ccgccgacc aaggaactgc
1921 atcgacaga agtttgccgt gatggaggag aaaaccatcc tgtcttgat cctgagacac
1981 ttctggatcg agagcaatca gaagaggagg gagctgggcc tggagggaca gctgatcctg
2041 cggccaagca acggcatctg gatcaaactg aaaagaagga acgctgacga gaggtaaaag
2101 cttgaattcc tcgaggatcc aataaaagat ctttattttc attagatctg tgtgttggtt
2161 ttttgtgtgt ctagttgcca gccatctgtt gtttgccctt ccccgctgcc ttccttgacc
2221 ctggaagggt ccactcccag tttaaactta attaagggcc gcaggaaacc ctagtgatgg
2281 agttggccac tccctctctg cgcgctcgt cgctcactga ggccgggcca ccaaaggctg
2341 cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcg agctgcctgc
2401 agg

```

10

20

【0508】

CYP4V2 遺伝子治療におけるCYP4V2stとCYP4V2opとのcDNAの有効性の違いを評価するために、同じプロモーター（CAG）、エンハンサー（WPRE）、及びポリA（bGH-polyA）並びに同じジャンクション／リンカー配列を持ち、1つはCYP4V2st cDNA（AAV5・CYP4V2st（配列番号61））を保有し、もう1つはCYP4V2op cDNA（AAV5・CYP4V2op（新規）（配列番号63））を保有する、2つのAAV5ベクターを、本明細書に記載の細胞生存率アッセイを用いて、BCD患者由来iPS-RPEでのRPE萎縮のレスキューの有効性について比較する。

30

【0509】

配列番号60及び配列番号63で使用される異なるジャンクション／リンカー配列がCYP4V2 cDNA又は発現カセットの発現に影響を及ぼすかどうかを評価するため、同じプロモーター（CAG）、エンハンサー（WPRE）、及びポリA（bGH-ポリA）並びに同じCYP4V2 cDNA（CYP4V2op（配列番号2））を有するがジャンクション／リンカー配列は異なる2つのAAV5ベクター（AAV5・CYP4V2op（配列番号60）及びAAV5・CYP4V2op（新規）（配列番号63））を、本明細書に記載の細胞生存率アッセイを用いて、BCD患者由来iPS-RPEでのRPE萎縮のレスキューの有効性について比較する。

40

【0510】

本明細書で提示される発現カセット配列に含まれるCYP4V2 cDNAの代わりに、異なるCYP4V2 cDNA（配列番号1、2、3、又はその他）を、CYP4V2 遺伝子治療での使用目的で、本明細書に記載の任意のCYP4V2 発現カセットで利用できることを理解されたい。本明細書に記載の各CYP4V2 発現カセットは、CYP4V2 遺伝子治療で使用するための、本研究で使用したもの（例えば、AAV1、AAV2、AAV2（Y444F+Y500F+Y730F）、AAV5、AAV8、及びAAV9

50

）とは異なるものを含む様々な血清型／カプシドのrAAVベクターにパッケージングすることができることを理解されたい。そして、CYP4V2遺伝子治療で使用するために、本研究で使用したscAAVベクターにパッケージングされたCYP4V2発現カセットを、scAAVコンストラクトで使用される変異体AAV ITRをssAAVコンストラクトで使用される非変異体AAV ITRに変更した後、ssAAVベクターにパッケージングしてもよい。さらに、本明細書に記載のCYP4V2 cDNA又は発現カセット（AAV ITRを有するもの、又は有しないもの）を、CYP4V2遺伝子治療で使用するために、他のウイルスベクター（すなわち、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、又はその他のウイルスベクターなどの非AAVベクター）又は非ウイルスベクター（例えば、プラスミド、ナノ粒子、又は脂質ベースのナノ粒子（例えば、リポソーム-プロタミン-DNA複合体（LPD））にパッケージングしてもよい。

10

【0511】

（実施例12-AAV、CYP4V2によるBCD患者由来iPS-RPE細胞の治療）
無血清RPE培地中で、BCD患者由来のiPS-RPE細胞に上記の様々なAAV、CYP4V2ベクターを感染させた。1日後、ウイルス含有培地を新鮮な血清含有RPE培地と交換してRPE培養を続けた。異なる用量の治療効果を評価するために、異なる感染多重度（MOI）、ゲノムコピー（GC）／細胞を試験した。

【0512】

（実施例13-AAV、CYP4V2遺伝子治療の効果を評価するためのアッセイ）
AAV、CYP4V2感染後、BCD患者のiPS-RPE細胞を、試験のために細胞を収集する前に、scAAVの場合は少なくとも4日間、ssAAVの場合は少なくとも10日間RPE培地で培養した。その後、前述の通り、細胞採取プロトコル及び試料調製プロトコルを行った。

20

【0513】

AAV、CYP4V2処置BCD患者iPS-RPE細胞において、脂肪酸、セラミド（Cer）、スフィンゴミエリン（SM）、及びスフィンゴシンとスフィンガニン（SO SA）を検出するための本明細書の実施例に記載されている生化学的試験を実施した。その後、LC-MSを使用して同じ生化学的試験プロトコルを実施した。上記の表3は、健康な対照のiPS-RPE細胞；AAV、CYP4V2処置なしのBCD患者のiPS-RPE細胞、及びAAV、CYP4V2処置後のBCD患者のiPS-RPE細胞における結果を示す。

30

【0514】

結果は、BCD患者iPS-RPE細胞の表現型（例えば、対照と比較した異常な脂肪酸レベル（例えば、DHA、AA、及びn3脂肪酸の合計））がAAV、CYP4V2遺伝子治療によって改善又は修正されたことを示した。これにより、BCD患者由来のiPS-RPE細胞系におけるAAV、CYP4V2遺伝子治療の有効性が証明された。BCDは主にRPE変性によって引き起こされるため、BCD患者特異的iPS-RPE細胞系におけるAAV、CYP4V2遺伝子治療の有効性は、BCD患者に対するAAV、CYP4V2遺伝子治療の有効性を証明した。

40

【0515】

重要なことに、scAAV1、CYP4V2 opによる処置により、非常に短い期間（処置後わずか4日）で最も顕著な改善が達成された。これは、scAAVが相補DNA鎖を合成するための細胞機構を必要としないため、速効性であることを証明している。同じ理由で、AAV、CYP4V2処置と試験用の細胞収集との間の時間枠が長くなると（特にssAAVベクターにパッケージングされたCYP4V2遺伝子治療の場合）、結果が大幅に改善されることが予想される。

【0516】

ヒトRPE細胞でscAAVベクターによって達成された迅速且つロバストな結果は、scAAVベクターがRPE又は網膜変性の早期発症疾患及び／又は後期段階のヒト患者

50

のレスキューに特に有用となり得ることを証明した。さらに、*scAAV*ベクターのロバストな発現プロファイルにより、網膜への送達のための硝子体内投与にも適するものとなっている。

【0517】

AAV. *CYP4V2* による *RPE* 萎縮のレスキュー

BCD 患者由来の *iPS-RPE* 試料を1時間青色光に暴露し、次いで翌日、本明細書で前述したように試料で細胞生存率アッセイを実施した。

【0518】

AAV. *CYP4V2* 処置を行った場合と行っていない場合の患者 *iPS-RPE* 試料を比較した細胞生存画像を、本明細書の図面に示す。

【0519】

BCD 患者由来の *iPS-RPE* 試料において、*AAV2*. *CYP4V2 op* 及び *scAAV1*. *CYP4V2 op* による処置はいずれも、未処置の患者試料と比較して、*RPE* 萎縮のレスキューを示した（図8、 $MOI = 1 \times 10^5 GC / 細胞$ ）。興味深いことに、 $1 \times 10^5 MOI$ での *AAV2*. *CYP4V2 op* 及び *scAAV1*. *CYP4V2 op* によるレスキュー効果は、*P1 iPS-RPE* よりも *P2 iPS-RPE* の方が高くなっている。これは、*BCD* を治療するための *AAV*. *CYP4V2* 遺伝子治療の使用に最適な投与量は、患者間の個人差によって異なる可能性があり、*BCD* 患者特異的 *iPS-RPE* は、様々な患者の個別化した最適投与量を評価するのに役立つツールであることを示唆している。

【0520】

BCD 患者由来の *iPS-RPE* 試料において、*AAV5*. *CYP4V2 op*、*AAV5*. *CYP4V2 st*、及び *AAV8*. *CYP4V2 fv* による処置はいずれも、未処置の患者試料と比較して、*RPE* 萎縮をレスキューした（図9、 $MOI = 1 \times 10^5$ ）。

【0521】

BCD 患者由来の *iPS-RPE* 試料において、*AAV5*. *CYP4V2 op*、*scAAV1*. *CYP4V2 op*、及び *scAAV5*. *CYP4V2 op* による処置はいずれも、未処置の患者試料と比較して、*RPE* 萎縮をレスキューした（図10、 $MOI = 1 \times 10^4$ ）。

【0522】

BCD 患者由来の *iPS-RPE* 試料において、*scAAV9*. *CYP4V2 op* による処置は、未処置の患者試料と比較して、*RPE* 萎縮をレスキューした（図11、 $MOI = 1 \times 10^5$ 、処置後2週間）。

【0523】

重要なことに、*P2* 試料での低用量（ $MOI = 1 \times 10^4$ ）での *AAV*. *CYP4V2* 処置は、*P1* 試料での同じベクターによる高用量（ $MOI = 1 \times 10^5 GC / 細胞$ ）の処置と同様又はより良い結果を達成した。これは、細胞レベルで、*RPE* 萎縮のレスキューにおいて同じ又は同様の効果を達成するために、異なる患者は異なる投与量を必要とする可能性があることを実証した。言い換えれば、同じ病気の全ての患者に対する1つのベクターと1つの同様の用量レベルは、遺伝子治療のための医学的又は経済的に最も効率的なアプローチではない可能性がある。*BCD* 細胞モデル及び他の眼疾患の同様の細胞モデルは、個別化した最適な用量に関する指針を提供することができる。

【0524】

他の *AAV*. *CYP4V2* ベクターも試験され、*AAV2 tri (Y-F)*. *CYP4V2 op* 処置（ $MOI = 1 \times 10^4$ ）及び異なる MOI レベル（ $1 \times 10^4 GC / 細胞$ 及び $1 \times 10^5 GC / 細胞$ ）での *AAV5*. *CYP4V2 op*（新規）（配列番号63）処置したものを含む、*BCD* 患者 *iPS-RPE* 試料で *RPE* 萎縮の改善が示された。

【0525】

さらに、*iPS-RPE* 試料の死細胞数及び生細胞数をカウントするために、*ImageJ (Fiji)* によって細胞生存画像を画像処理した。各試料の4つの異なる領域／画

10

20

30

40

50

像を使用してカウントし、同じ試料の複数の画像の死細胞／生細胞比を平均化した。死細胞／生細胞比は、AAV．CYP4V2処置がBCD患者由来iPS－RPEのRPE細胞萎縮をレスキューしたことを実証した。例えば、WT2の死細胞／生細胞比は3．0％、P1（AAV．CYP4V2処置なし）では20．87％、AAV5．CYP4V2setで処置されたP1では9．69％である。他のAAV．CYP42ベクターによる処置も、BCD患者iPS－RPE試料の死細胞／生細胞比を低下させた。

【0526】

これらの結果により、

(1) 様々なAAV．CYP4V2ベクター、発現カセット、及びCYP4V2 cDNAがBCDのRPE萎縮をレスキューしたこと、

(2) 自己相補的なAAVベクター（scAAV）はレスキュー効果の達成が速いこと、及び

(3) 有効性は異なる用量レベルで達成される可能性があることが実証された。

【0527】

(実施例14－AAV．CYP4V2ベクターの安全性、及び临床上の使用のためのGMP製造)

過去の研究では、CYP4V2は人間の臓器でほぼ遍在的に発現され、眼のなかでは網膜で高発現レベルであることが示されてきた。さらに、他の疾患の遺伝子治療研究及び臨床試験において、AAVベクターの安全性が確立されている。したがって、AAV．CYP4V2ベクターは遺伝子治療で安全に使用できると予想することは妥当である。

【0528】

本研究では、様々なAAV．CYP4V2ベクターを使用して、高用量（例えば、 1×10^5 MOI）でヒトiPS－RPE試料を処置した。上記実施例で説明したように、AAV．CYP4V2がBCD患者由来iPS－RPE試料のRPE萎縮をレスキューしたことを除いて、未処置試料とAAV．CYP4V2処置試料との間で細胞死に関する重要な違いは観察されなかった。これにより、AAV．CYP4V2ベクターの安全性が実証され、毒性の顕著な証拠なしに、形質導入されたCYP4V2をコードする遺伝子の高レベルの発現を達成できることが実証された。

【0529】

細胞系での試験に加えて、AAV．CYP4V2遺伝子治療の安全性は、マウス、ラット、又は非ヒト霊長類などの動物において、及び／又はヒト臨床試験によっても試験することができる。

【0530】

ヒトの臨床使用のための組換えAAVベクターを生産するための様々な製造方法及びプラットフォームが利用可能である。例えば、限定されるものではないが、rAAVベクターのGMP製造では、2プラスミドトランスフェクション法又は3プラスミドトランスフェクション法を使用可能であり、HEK293、A459、又は293Tなどの哺乳類細胞系、又はバキュロウイルス／Sf9細胞プラットフォームなどの昆虫細胞系を使用可能であり、接着細胞培養又は浮遊細胞培養を使用可能である。さらに、非限定的な例として、単純ヘルペスウイルス（HSV）ベースの生産システム、使い捨てバイオリアクター（例えば、iCELLis）、HYPERStack容器、ローラーボトル、カラムクロマトグラフィーなどの様々な方法、プロセス、及び／又はプラットフォームを使用して、収量又は力価を増加したり、純度を向上させたり、コンタミネーションの可能性を回避したりすることができる。これらのrAAVベクターの临床上の生産方法、プロセス、技術、及びプラットフォームは、当技術分野で公知であり、例えば、Lonza（米国）、Cobra Biologics（イギリス）、Nationwide Children's Hospital（NCH；米国オハイオ州）、Children's Hospital of Philadelphia（CHOP；米国）、WuXi Biologics（中国及び米国）などの受託製造機関（CMO）又は学術GMP施設を介して利用可能である

10

20

30

40

50

。ヒト臨床使用のための AAV・CYP4V2 ベクターは、本明細書に記載の方法、プロセス、技術、プラットフォーム、及び GMP 施設の任意の 1 又は複数、及び／又は当技術分野で公知又は将来開発される他のものを使用して製造することができる。

【0531】

（実施例 15－BCD を治療するための被験者選択及びインビボでの AAV・CYP4V2 投与）

AAV・CYP4V2 ヒト臨床試験の被験者の例示的な適格基準は以下の通りである。

選択基準

被験者は、以下の選択基準の全てを満たしている場合、研究参加に適格である。

1. 研究への参加についてインフォームドコンセントを提供する意思があり、提供が可能である。

2. 18 歳以上である。

3. 両アレル CYP4V2 変異の遺伝的に確認された診断を有する。

4. 研究対象の眼の黄斑部に臨床的に視認可能な活動性の疾患を有する。

5. 研究対象の眼における最高矯正視力（best corrected visual acuity (BCVA)）が ETDRS 視力検査表で 34～73 文字である（20/40 スネレン視力以下 20/200 スネレン視力以上）。

【0532】

除外基準

被験者は、以下の除外基準のいずれかに該当する場合、研究参加に不適格である。

1. 対象の眼に弱視の既往歴がある。

2. AAV で治療した場合、3 か月間、バリア避妊法を使用する意思がない。

3. 最初の来院前 3 か月以内に研究対象の眼で眼内手術が行われた。

4. 治験責任医師の意見で、研究へ参加することで被験者を危険にさらしたり、研究の結果や被験者の研究参加能力に影響を与えたりする可能性のある他の重大な眼又は眼以外の疾患／障害がある。これには、以下の被験者が含まれるが、これに限定されない：

・経口コルチコステロイド（プレドニゾン／プレドニゾンなど）が禁忌である。

・臨床的に重要な白内障を有する。

・治験責任医師の臨床的意見では、手術（例えば、網膜下手術）の適切な候補者ではない。

5. 過去 12 週間に治験薬に関する別の研究に参加した、又は以前に遺伝子／細胞ベースの治療を受けた。

【0533】

AAV・CYP4V2 を使用して BCD を治療する場合、患者は遺伝的又は分子的に確認された BCD の診断、つまり、遺伝子検査（単一遺伝子検査、又は医学的に必要な場合は複数遺伝子パネル検査）による両アレル CYP4V2 変異の確認を受ける必要がある。BCD は遺伝性網膜障害（IRD）、網膜変性（RD）、又は網膜色素変性症（RP）と診断されることがあるため、AAV・CYP4V2 は、遺伝的に確認された両アレル CYP4V2 変異を有する IRD、RD、又は RP の患者の治療にも使用しうる。

【0534】

インビボでの AAV・CYP4V2 治療の場合、患者は光干渉断層法（OCT）及び／又は検眼鏡検査で判定される生存網膜細胞を持っている必要がある。患者には、治療対象の眼ではいくらかの視力が残っていることが好ましい（例えば、最高矯正視力（BCVA）が 20/200（小数では 0.1）以上）。

【0535】

インビボで AAV・CYP4V2 ベクターを標的細胞（例えば、網膜細胞又は角膜細胞）に送達するためには様々な手段／投与経路を使用することができ、限定されるものではないが、網膜への投与は、網膜下注射、硝子体内注射（AAV2（Y444F＋Y500＋Y730F）、AAV7m8、又はそれらの誘導体などの硝子体内送達に適した AAV ベクターを使用）を介して行ってもよく、血流を介した送達（例えば、AAV9 又は A

10

20

30

40

50

AAV-PHP.Bなどの血液網膜関門を貫通できるAAVベクターを使用)を介して行ってもよい。さらに、AAV.CYP4V2ベクターは、投与方法として硝子体内に埋め込むためのデバイスにカプセル化してもよい。

【0536】

遺伝子治療に関連する外科的／投与方法、並びに送達／形質導入効率を改善するいくつかの技術(例えば、内境界膜(ILM)剥離及び硝子体切除術(VIT))は、当技術分野で公知である。免疫応答を最小限に抑えるために、AAV投与前、投与時及び／又は投与後に免疫抑制剤(コルチコステロイドなど)を使用してもよい。

【0537】

インビボで患者を治療することに加えて、細胞療法として標的細胞(例えば、BCD患者のiPS由来のRPE細胞、網膜細胞、角膜上皮細胞、又は角膜細胞)をインビトロで治療し、その後そのような細胞を患者に移植するためにCYP4V2遺伝子治療(AAV.CYP4V2遺伝子治療など)を使用してもよい。AAV.CYP4V2ベクターを使用してBCD患者iPS-RPE細胞を治療する方法は、本明細書の実施例及び開示で提供される。網膜や角膜などへの細胞移植(implantation/transplantation)の方法は、当技術分野で公知である。例えば、ES-RPE細胞を網膜に移植するためのものと同じ又は類似の方法及び外科技術を使用して、BCD患者のiPS-RPE細胞を移植することができる。

【0538】

治療有効用量は、疾患モデル(例えば、BCD細胞モデル(例えば、BCD患者由来のiPS-RPE細胞系))又は動物モデルで決定及び評価し、臨床試験で確認又は改良することができる。インビトロでの細胞の治療では、投与量は通常MOIとして表され、その後、治療される細胞の数をMOIに乗じる。MOIは通常、細胞あたり約 1×10^3 GCから約 1×10^6 GCの範囲内であるか、又は細胞あたり約100～約10,000 GCの感染性MOI(GC:ゲノムコピー、ゲノムを含むAAV粒子(ベクターゲノム(vg)又はゲノム粒子(gp)としても知られる)を測定する)の範囲内である。インビボ治療では、用量を決定するために、投与経路、標的とする領域の面積又は細胞の数、及び治療対象(例えば、治療対象の年齢、体重、疾患進行度、及び状態、並びに潜在的な免疫反応)、並びに治療の対象となる細胞の位置(例えば、網膜 vs. 角膜)などの代表的な臨床的要因を考慮する必要がある。さらに、使用するAAV.CYP4V2ベクターの形質導入効率及びレスキューの有効性も考慮する必要がある。最後に、可能であれば、患者間の細胞レベルでの最適用量の個人差も考慮する必要がある、これは患者特異的iPS-RPE細胞で評価することができる。よって、インビボでの眼への1回の局所投与の治療上有効な用量は、約 1×10^6 GC～約 2×10^{13} GCのオーダー(例えば、約 1×10^{11} GC～約 1×10^{12} GCの高用量範囲、約 1×10^{10} GC～約 1×10^{11} GCの中用量範囲、約 1×10^9 GC～約 1×10^{10} GCの低用量範囲、約 1×10^6 GC～約 1×10^9 GCの超低用量範囲、及び約 1×10^{12} GC～約 2×10^{13} GCの超高用量範囲)、又はこれらの範囲内であって所望の効果を提供するのに十分な任意の用量であってよい。一実施形態では、組成物は、約 1×10^6 GC～約 2×10^{13} GCの用量で投与される。別の実施形態では、インビボ投与量は、治療の標的となる細胞数に標的MOI(例えば、細胞あたり約 1×10^3 GC～約 1×10^6 GC)を乗じて決定される。眼への任意の1回の局所投与におけるrAAVベクターを含む薬剤の体積は、約 $1 \mu\text{L}$ (0.001 mL)～約 $1000 \mu\text{L}$ (1 mL)の範囲内であり得る。血流を介した送達による治療は、はるかに高い用量を必要とし、体重1 kgあたり約 1×10^6 ～約 2×10^{14} GCの範囲内となりえる。

【0539】

詳細については「E. 治療オプション、対象の選択及び投与」及び本明細書の他の開示を参照。

【0540】

(実施例16-治療後の評価)

10

20

30

40

50

B C Dの臨床症状は、例えば、視力の低下、視野の制限、夜間失明、暗順応、コントラスト感度及び色覚の低下、網膜の変化（及び一部の患者では角膜）、網膜電図（E R G）の反応低下などの他の多くの種類のI R D、R D、及びR Pの臨床症状と類似しているため、関連する評価基準を使用してB C D患者の治療前後の病状及び進行を評価することによって治療結果を評価することができる。これらの評価基準並びに関連する検査及び試験は、網膜疾患及び角膜疾患について当技術分野で公知である。例えば、限定されるものではないが、最高矯正視力（視力チャートを使用）は、B C D遺伝子治療の主要評価項目として使用することができ、また次の1又は複数を副次的評価項目として使用することができる：微小視野測定（感度の変化）、眼底自発蛍光（A F）（A Fの変化）、光干渉断層法（O C T）（楕円体領域及び網膜の厚さ）、コントラスト感度（P e l l i - R o b s o nチャート）、色覚（F a r n s w o r t h - M u n s e l l 100ヒューテスト）、及びE R G（E R Gの変更）。さらに、モビリティテストなどの機能テストを主要評価項目又は副次的評価項目として使用してもよい。評価は、治療後の異なる時点、例えば、2週間、1か月、2か月、3か月、6か月、及び12か月の時点で実施することができる。結果は治療結果を評価するために使用することができる。有効性は、次のいずれかとして示すことができる：主要評価項目及び副次的評価項目の1又は複数の改善、病気の進行停止、又は網膜変性若しくは視力喪失の予想より遅い進行（必要であれば、自然経過の研究からデータを使用）。

10

【0541】

（実施例17：免疫応答を低減し遺伝子治療の個人差に対処する方法）

20

ウイルスベクター媒介遺伝子治療は、細胞性、局所性、又は全身性の免疫応答を引き起こし、安全性のリスクを生じる可能性がある。免疫反応はまた、形質導入効率を低下させ、それによりウイルスベクター媒介遺伝子治療の治療効果を低下させる可能性がある。免疫応答は、リンパ液又は血液中の抗原又は病原体を認識する「体液性応答」（すなわち抗体媒介性応答）、及び／又は細胞性免疫の形で発生する可能性がある。免疫応答を最小限に抑えるために、遺伝子治療の投与に伴ってコルチコステロイドなどの免疫抑制剤がよく使用される。免疫抑制剤は、眼圧上昇、白内障、その他の有害事象（例えば、免疫抑制剤の長期使用は癌のリスクを高める可能性がある）などの影響をひきおこす。免疫応答に加えて、例えば、異なる種類のベクター（異なる血清型又は異なるカプシド変異／構造など）に対する応答、又は同じ用量の同じベクターに対する応答などにおける、他の患者間の個人差が存在する。

30

【0542】

ウイルスベクター媒介遺伝子治療において、ウイルスベクターに対する免疫応答を低下させ、形質導入効率を維持し、ウイルスベクター及び／又は免疫抑制剤の用量を低下させ、及び／又は同じ遺伝疾患の様々な患者に対する治療効果を最大化する方法であって、

（a）前記遺伝子治療のための標的細胞型において十分な形質導入効率を持つ複数の組換えウイルスベクター（例えば、r A A V）のプールを確立すること（ウイルスベクターのプールは、抗原領域変異若しくは他の変異を有するバリエーション又は前記ウイルスベクターのカプシドのバリエーションを、前記疾患に関連する標的細胞（例えば、B C Dに対するC Y P 4 V 2 遺伝子治療におけるi P S - R P E又はR P E細胞系）において上記変異又はバリエーションが十分な形質導入効率を有することが確認された後で作製することにより拡大できる）、

40

（b）遺伝子治療を必要とする対象における様々なウイルスベクター血清型及び／又はカプシド変異又はバリエーションに対する既存の中和抗ウイルスベクター抗体（N A b）を検出し、及び／又は上記対象に由来する患者特異的疾患標的細胞（例えば、i P S - R P E細胞）において様々なウイルスベクターを試験及び比較すること、

（c）前記ウイルスベクターのプールから、

（i）前記疾患標的細胞における十分な形質導入効率、

（i i）前記対象の既存のN A bとの低い交差反応性、及び／又は

（i i i）前記対象の患者特異的疾患標的細胞（例えば、B C DのC Y P 4 V 2 遺伝

50

子治療における患者特異的 i P S - R P E 又は R P E 細胞系) における良好な表現型レスキュー結果、

を有するウイルスベクターを選択することであって、

上記ウイルスベクターのプールは、様々な血清型及び／又はカプシド改変ウイルスベクター（例えば、カプシド変異体 A A V 及び／又はカプシドタンパク質バリエーション A A V が挙げられるがこれらに限定されない）を含む、

前記選択すること、

(d) (c) から選択された前記ウイルスベクターを前記対象への投与に使用すること、及び

(e) 前記対象が遺伝子治療の投与を必要とするたびに、上記 (b) ~ (d) (既存の N A b に関連する部分のみ) を繰り返すこと (例えば、限定されるものではないが、同じ臓器 (例えば、眼又は反対側の眼) 又は別の臓器へのフォローアップ投与)、を含む、

方法。

【0543】

具体的には、5つの異なる A A V (A A V 1、A A V 2、A A V 5、A A V 8、及び A A V 9) 血清型及びカプシド変異 A A V (A A V 2 . t r i (Y - F)) を含む様々な r A A V ベクターを作製し、本研究で異なる患者の細胞系間の違いを評価するために試験した。

【0544】

(実施例 18 : 網膜疾患の迅速なレスキューにおける s c A A V の使用、及び眼疾患の治療における s c A A V 又は A A V ベクターにおける E F S 及び／又は S P A の使用)

上記の実施例 13 で実証されているように、s c A A V . C Y P 4 V 2 処置は、非常に短い時間 (わずか 4 日間) で、B C D 患者 i P S - R P E 細胞における生化学的表現型の強力なレスキューを達成した。さらに、s c A A V . C Y P 4 V 2 は、A A V 処置の 2 週間後に B C D 患者 i P S - R P E 細胞系で R P E 萎縮のレスキューを示した (図 11 を参照)。s c A A V ベクターにおける E F S プロモーター (例示的な配列を配列番号 35 に示す) 及び S P A (例示的な配列を配列番号 36 に示す) によって駆動される、ヒト i P S - R P E 細胞における迅速かつ口バストな発現は、E F S プロモーター及び／又は S P A がヒト眼細胞における導入遺伝子発現の促進及びヒト眼疾患の治療に適していることを実証した。E F S プロモーター及び S P A を備えた s c A A V ベクターによって達成された迅速なレスキューにより、s c A A V ベクターは急速に進行する疾患又は進行した疾患段階の患者の治療に特に有用になる。

【0545】

さらに、本研究により、ヒト網膜細胞における s c A A V 設計の迅速かつ口バストな発現が証明された。これにより s c A A V を介した遺伝子治療は、早期発症の網膜疾患患者の治療や、迅速なレスキューを必要とする後期患者の治療に特に役立つものとなる。

【0546】

(C Y P 4 V 2 遺伝子治療についての検討)

B C D は希少な、失明に至る疾患であり、現在承認された治療法は存在しない。B C D 患者特異的 i P S - R P E 細胞系の使用を含む臨床研究において、本研究では、B C D 患者特異的 i P S - R P E 細胞の表現型をレスキューするための様々な A A V . C Y P 4 V 2 ベクター及び発現カセットの設計の有効性が、脂肪酸及び脂質アッセイによる評価により証明された。さらに、異なる用量 (M O I) で試験を実施した。これは、インビボでの治療の用量範囲を決定するための指針となる。最後に、A A V . C Y P 4 V 2 遺伝子治療に関連する毒性の有意な証拠は認められていない。

【0547】

細胞療法及び C R I S P R 遺伝子編集療法の例

(実施例 19 - 細胞療法における B C D 被験者からの i P S C、i P S - R P E、又は i P S - 眼細胞の使用)

10

20

30

40

50

B C Dは比較的発症が遅い疾患である。B C D患者の症状は、通常、10歳代、20歳代、さらには30歳代に発症する。さらに、i P Sのリプログラミングプロセスには、「時計のリセット」効果がある。したがって、B C D患者由来のi P S-R P E細胞及び他のi P S-眼細胞は、i P S-R P E細胞におけるC Y P 4 V 2変異の遺伝子修復を行わなくても、B C D患者へ移植するための細胞療法として使用することができる。

【0548】

または、B C D患者に由来する、i P S C、i P S-R P E細胞、i P S-P R C、i P S-C E細胞、i P S-C E C、及び／又は他のi P S-眼細胞は、細胞療法の移植前に遺伝的に修復することもできる。遺伝子修復は、上記実施例で説明したC Y P 4 V 2遺伝子治療により達成してもよく、遺伝子編集によって達成してもよい。遺伝子編集の詳細については、本明細書の実施例を参照。

10

【0549】

(実施例20-眼細胞療法のための遺伝的に修復された患者の自家細胞)

患者特異的i P S C由来細胞(例えば、i P S-R P E細胞、i P S-C E C、i P S-C E細胞、i P S-P R C、又はi P S-眼細胞)を、眼疾患(非限定的な例として、網膜疾患及び角膜疾患)の細胞療法における移植のための自家細胞の供給源として使用することができる。E S細胞(例えば、E S-R P E細胞、E S-C E C又はE S-P R C、及びそのようなE S由来細胞で構成された組織)又は別の個人のi P S細胞などの、同種(アロジェニックな)起源から作製された細胞と比較して、そのような患者特異的i P S由来の自家細胞及びそのような細胞から作られた組織は、通常、患者の免疫抑制をほとんど又はまったく必要とせず、E S及びE S由来細胞の使用に関連する倫理的問題もない。

20

【0550】

しかしながら、患者を供給源とする細胞(例えば、線維芽細胞又は血液細胞)から作製されたi P S C及びそのような患者特異的i P S Cに由来する細胞及び組織(例えば、患者特異的i P S-R P E細胞、i P S-P R C、i P S-C E C、i P S-C E細胞及びi P S-眼細胞)は、依然として病気を引き起こす変異及び関連した表現型を有している。健康な患者由来の細胞及び／又は組織を作製するには、遺伝子編集技術により病的変異を遺伝的に修復又は修正してもよい(非限定的な例として、患者の細胞の標的変異を修正するように設計可能な、クラスター化規則的間隔占有短鎖パリンドローム反復(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)(C R I S P R)が挙げられる)。これらの遺伝的に修復された健康なi P S Cは、その後、患者の病的変異をもはや含まない様々な細胞型(例えば、i P S-R P E細胞、i P S-C E C、i P S-C E細胞、i P S-P R C、又は他のi P S-眼細胞)を作製するために使用することができる。

30

【0551】

さらに、この概念実証研究は、これらの遺伝子修正i P S C及び／又は遺伝子修正i P S由来細胞(例えば、i P S-R P E細胞)がもはや、患者からの(未修正の)i P S由来細胞で見られるような表現型(例えば、リポドミクス及び／又はプロテオミクスなどのバイオアッセイによって評価される異常な生化学的プロファイル)を有しないことを実証する。したがって、これらの遺伝子修正された細胞は、細胞療法で置換細胞として使用可能な、再生可能かつ遺伝的に修復された自家細胞の供給源として機能する。遺伝子修正された患者の自家細胞に関する組成物及び方法は、本明細書及び以下の実施例で詳細に説明されている。

40

【0552】

遺伝的に修復された患者細胞の別の種類として、上述のように遺伝子補充療法(例えば、C Y P 4 V 2遺伝子治療)で治療された、患者のi P S C又はi P S由来細胞(例えば、i P S-R P E細胞、i P S-P R C、i P S-C E細胞、i P S-C E C及びi P S-眼細胞、i P S-ニューロン細胞)が挙げられる。遺伝子治療処置後、患者特異的細胞は、変異遺伝子の健全なコピー(例c D N Aなど)を保有し、及び／又は健全な導入遺伝子によってコードされる機能的タンパク質を発現する。さらに、遺伝子治療で処置された

50

患者特異的細胞は、未処置の患者細胞で見られる生化学的プロファイル又はその他の表現型の改善又は正常化を示した。よって、そうした細胞を、細胞療法の置換細胞として使用するために、遺伝的に修復された自家細胞の供給源として使用することができる（例えば、BCDの細胞療法で使用するための遺伝的に修復された患者自家細胞として、CYP4V2遺伝子治療で処置された、BCD患者特異的iPSC-RPE細胞、iPSC-PRC、iPSC-CEC、iPSC-CE細胞、及びiPSC-眼細胞）。CYP4V2遺伝子治療で処置されたBCD患者特異的細胞に関する組成及び方法は、上記実施例で詳細に説明されている。以下の説明は、ゲノムDNAの変異を修正することによる遺伝子修復の種類に焦点を当てている。

【0553】

遺伝子変異に関連する眼及び網膜の変性疾患に対する自家細胞置換は、移植前に、遺伝子編集を介して変異を遺伝的に修正することにより、又は変異の結果を（例えば、CYP4V2遺伝子治療など、疾患遺伝子に関連する導入遺伝子の健全なコピーの送達を介して）修復又は軽減することにより、患者の病的変異を修復する能力によって決まる。本明細書では、最も一般的なCYP4V2変異（c. 802-8__810del17insGC）を有するBCD患者の患者特異的iPSCを作製し、この変異を修正するためのCRISPR遺伝子編集成分（CRISPRガイドRNA及びドナー鋳型）及び様々なコンストラクト（プラスミド及びRNP）を開発した。本明細書では遺伝子編集の手段としてCRISPR/Cas9が使用されているが、同じ又は同様の結果を達成するために、他のCRISPRシステム（Cpf1など）及び他の遺伝子編集技術（非限定的な例としてTALEN）、並びにCRISPR/Cpf1などの新しい及び将来の遺伝子編集技術を使用することができることが予想される。また、iPSCだけでなく、iPSCを作製するために使用される元の供給源細胞、及びiPSCから作製された細胞でも、そのような細胞の病的変異を修正するために遺伝子編集を適用できることが予想される。

【0554】

iPSC由来の細胞系は患者特異的に作製されるが、細胞療法への応用はそうである必要はない。iPSCベースの細胞療法の広範な使用を制限する重要な要因は、ヒト個人の免疫学的な違いである。この問題を解決するアプローチは複数ある。例えば、1つのアプローチは、患者集団の大部分と免疫学的マッチングを達成するように設計された、一般的なHLAハプロタイプを持つ限られた数の系統を含む多数の細胞バンクを開発することである。このような細胞バンクは、選択されたハプロタイプを有する患者からiPSCを生成するか、HLA遺伝子型の遺伝子操作によって作製することができる。別のアプローチとしては、患者の遺伝子型に関係なく免疫学的にサイレントな細胞型を作製することが挙げられる。

【0555】

遺伝的に修復された患者特異的の自家細胞を作製する方法、細胞内の遺伝子修復の効果を評価する方法、及び細胞療法でそれらを使用する方法について、以下説明する。本明細書で提供される例は、BCD患者の間で最も一般的な変異である、CYP4V2遺伝子のc. 802-8__810del17insGC変異を有するBCD患者からの遺伝的に修復された患者自家細胞の作製に関連している。CYP4V2に異なる変異を有する患者から、又は眼疾患に関連する別の遺伝子に変異がある患者から、又は他の種類の疾患に関連する遺伝子に変異がある患者から（非限定的な例として、表4に記載の任意の遺伝子）、遺伝的に修復された患者の自家細胞を作製するために、同じ方法を使用することもできる。

【0556】

10

20

30

40

50

【表 4】

標的配列リスト

ABCA4, ABCC6, ABHD12, ADAM9, AHI1, AIPL1, ALMS1, ARL13B, ARL6, ARMS2, ATXN7, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BEST1, C1QTNF5, C2, C2orf71, C3, C5orf42, C8orf37, CA4, CABP4, CACNA1F, CACNA2D4, CAPN5, CC2D2A, CDH23, CDH3, CDHR1, CEP164, CEP290, CEP41, CERKL, CFB, CFH, CHM, CHR2, CIB2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CLRN1, CNGA1, CNGA3, CNGB1, CNGB3, CNNM4, COL11A1, COL2A1, COL9A1, CRB1, CRX, CYP4V2, DFN3B1, DHDDS, EFEMP1, ELOVL4, ERCC6, EYS, FAM161A, FBLN5, FLVCR1, FSCN2, FZD4, GNAT1, GNAT2, GNPTG, GPR143, GPR179, GPR98, GRK1, GRM6, GRN, GUCA1A, GUCA1B, GUCY2D, HARS, HMCN1, HTRA1, IDH3B, IFT140, IFT80, IMPDH1, IMPG2, INPP5E, INVS, IQCB1, ITM2B, JAG1, KCNJ13, KCNV2, KCTD7, KIF11, KLHL7, LCA5, LRAT, LRIT3, LRP5, LZTFL1, MAK, MERTK, MFN2, MFRP, MFSB8, MKKS, MKS1, MT-ND4, MTPP, MYO7A, NDP, NEK4, NEK8, NMNAT1, NPHP1, NPHP3, NPHP4, NR2E3, NRL, NUB1, NYX, OAI, OAT, OCA1, OCA2, OFD1, OPA1, OPA3, OPN1LW, OPN1MW, OPN1SW, OTX2, PANK2, PAX2, PCDH15, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE6G, PDE6H, PDGF, PDZD7, PEX1, PEX10, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX5, PEX6, PEX7, PGK1, PHYH, PITPNM3, PLA2G5, PPT1, PRCD, PROM1, PRPF3, PRPF31, PRPF6, PRPF8, PRPH2, RAB28, RAX2, RBP3, RBP4, RD3, RDH12, RDH5, RDS, RGR, RGS9, RGS9BP, RHO, RIMS1, RLBP1, ROM1, RP1, RP1L1, RP2, RP9, RPE65, RPGR, RPGRIP1, RPGRIP1L, RS1, SAG, SDCCAG8, SEMA4A, SLC24A1, SLC45A2, SNRNP200, SPATA7, TEAD1, TIMM8A, TIMP3, TLR3, TLR4, TMEM126A, TMEM231, TMEM237, TMEM67, TOPORS, TPP1, TREX1, TRIM32, TRPM1, TSPAN12, TTC21B, TTC8, TTPA, TULP1, TYR, TYRP1, UNC119, USH1C, USH1G, USH2A, VCAN, VPS13B, WDPCP, WDR19, WFS1, WHRN, ZNF423, ZNF513, ACO2, AFG3L2, AUH, C12orf65, CISD2, CYP11B1, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPTN, PAX6, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, ATXN2, ROBO3, PHOX2A, HOXA1, SALL4, CHN1, TUBB3, KIF21A, HOXB1, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1, CYP46A1

【0557】

CYP4V2 変異を伴う疾患である BCD を例として用い、BCD 患者の特定の変異を保有する患者特異的細胞から iPSC を作製した。患者特異的 iPSC に、CRISPR ガイド RNA (gRNA)、Cas9 エンドヌクレアーゼ、及びドナー相同鋳型をトランスフェクトする。CYP4V2 遺伝子のコピーは、変異の修正及び野生型アレルへの変換を示す。修正された iPSC は、さらに遺伝子修正された iPSC-RPE 細胞を生成するために使用される。次に、遺伝子修正された iPSC-RPE 細胞を、もはや表現型（例えば、異常な生化学的プロファイル（脂肪酸プロファイルなど））を持たないことを確認するために試験する。これらの遺伝的に修復された患者の自家細胞は、BCD の自家細胞療法として、同じ患者に（直接（例えば、細胞懸濁液）、又は層、シート、マトリックス、足場、又は組織の一部などの他の形態で）移植することができる。

【0558】

(i) BCD 患者特異的 iPSC 系統の作製：

本明細書に記載されるように、CYP4V2 遺伝子にホモ接合性の c. 802-8__810del17insGC 変異を有する BCD 患者からの患者特異的細胞から iPSC を作製した。患者特異的 iPSC を生成する方法については、実施例 1 を参照。シーケンシングによって BCD 患者の変異を特定した。

【0559】

(i i) 変異を標的とする C R I S P R 遺伝子編集成分及びコンストラクトの設計、スクリーニング及び選択：

詳細な説明については、C R I S P R 遺伝子編集療法に関する本明細書の実施例を参照。

(オフターゲット編集を最小限に抑え、変異部位で直接中心となっている標的配列に対する特異性を最大化するために C R I S P R g R N A を選択した。患者特異的 C Y P 4 V 2 変異を含む領域に対して高い特異性を持つ複数の g R N A をスクリーニングした。候補 g R N A は、標的 D N A 切断の媒介に関与する C a s 9 エンドヌクレアーゼも含む発現ベクターに個別に挿入し、293細胞系にトランスフェクトした。患者のゲノム D N A を C Y P 4 V 2 領域のプライマーを使用した P C R で増幅し、P C R 産物の D N A 切断活性を分析した。どの g R N A 候補が変異部位に対して比較的高い活性を持っているかを評価するために調査分析を行った。切断効率が最も高い g R N A を遺伝子編集に使用する。)

10

【 0 5 6 0 】

(i i i) i P S C での遺伝子編集：

詳細な説明については、C R I S P R 遺伝子編集療法に関する実施例を参照。

【 0 5 6 1 】

B C D のような遺伝的劣性疾患の場合、1つのアレル又は変異の遺伝子修正で充分である。細胞が有する複数の変異を修正するために、異なる変異を標的とする複数の C R I S P R コンストラクトを使用することができる。

【 0 5 6 2 】

(i v) 遺伝子修正 i P S C からの i P S - R P E 細胞又は他の i P S - 眼細胞の作製：

20

オフターゲット編集を伴わず、又は最小限のオフターゲット編集を伴って病的変異が正確に修正されたことをシーケンシングにより確認した後、遺伝子編集によって修正された i P S C を、分化させて、本明細書に記載の関連疾患の影響を受ける i P S - R P E 細胞又はその他の種類の i P S - 眼細胞 (例えば、P S - P R C、i P S - C E C、又は i P S - C E 細胞) を作製するために使用した。次に、B C D 患者に由来する修正された i P S - R P E 細胞を、同じ R P E としての細胞運命の確認 (例えば、明確な R P E 形態 (例えば、色素及び／又は六角形) 及び／又は R P E 特異的マーカー) に供する。

【 0 5 6 3 】

(v) 表現型を持たないことを確認するためのバイオアッセイ

これらの遺伝子修正 i P S C 及び／又は遺伝子補正 i P S 由来細胞 (例えば、i P S - R P E 細胞) が、患者の (修正されていない) i P S 由来細胞に見られるような表現型を持たないことを確認するために、バイオアッセイを使用する。バイオアッセイは、特定の疾患に関連する患者細胞の細胞レベル及び／又は分子レベルの表現型を同定及び評価することができるいかなる種類の生物学的アッセイであってもよい。例えば、非限定的な例として、リポミクス、プロテオミクス、タンパク質発現、及び／又は他の生化学的試験が挙げられる。B C D では、バイオアッセイとしては、本明細書の実施例に記載のように、脂肪酸及びセラミド試験が挙げられる。結果は、B C D 患者由来のこれらの遺伝子修正 i P S - R P E 細胞は、B C D 患者由来の未修正 i P S - R P E 細胞で見られるような関連する生化学的欠陥／機能障害をもはや有しないことを示す。これは、遺伝子修正 i P S - R P E 細胞が表現型を含まないため、細胞療法に適した置換細胞の供給源であることを証明している。

30

【 0 5 6 4 】

(v i) 移植：

これらの遺伝的に修復された患者の自家細胞 (例えば、i P S - R P E 細胞、i P S - P R C、i P S - C E 細胞、i P S - C E C、及び他の i P S - 眼細胞) は、B C D の細胞療法として、(直接又は層、シート、マトリックス、足場、又は組織の一部として) 同じ患者へ移植することができる。

40

【 0 5 6 5 】

(実施例 21 - 眼疾患に対する C R I S P R 遺伝子編集療法の具体例)

C R I S P R / C a s 9 は、g R N A が正しく設計されている場合は非常に特異的であ

50

るが、特にCRISPRは臨床用に開発されているため、特異性及びオフターゲット編集は依然として大きな懸念事項である。以下の実施例では、眼疾患の治療に使用するための高いオンターゲット特異性及び低いオフターゲット編集リスクを備えたCRISPR遺伝子編集療法コンストラクトを開発する方法を詳細に説明する。また、c. 802-8__810del17insGC変異は、全ての公知のCYP4V2変異及び他の遺伝性眼疾患の中で修正することが最も困難な変異の1つである。ほとんどのCYP4V2変異は単一ヌクレオチドの変化、挿入、又は欠失（表1：BCD患者における選択されたCYP4V2変異を参照）であるが、c. 802-8__810del17insGC変異は17bpの欠失と2bpの挿入を伴い、イントロンとエクソンの両方に関係する。

【0566】

最も一般的な病的CYP4V2変異（c. 802-8__810del17insGC変異）を修正するためのCRISPR遺伝子編集療法コンストラクトのいくつかのセットを設計及び構築した。以下は、変異を修正してBCDを治療するための、これらのCRISPR CYP4V2遺伝子編集コンストラクトの設計、組成物、及び使用方法に関する詳細な説明である。

【0567】

（a）変異の分析

c. 802-8__810del17insGC変異は、イントロンとエクソンの両方に関係し、欠失と挿入の両方を含み、スプライスアクセプター部位に影響を与える。

【0568】

c. 802-8__810del17insGC変異とは、CYP4V2遺伝子のイントロン6の終端から8塩基で始まる場所における、17塩基の欠失と2塩基（GC）の挿入を指し、IVS6-8 del/insGCとも称される。c. 802-8__810del17insGC変異を含むヒトCYP4V2ゲノムDNA領域の配列を示す配列番号46、及び対応する野生型配列を示す配列番号47を参照。c. 802-8__810del17insGC変異を、ヒトCYP4V2イントロン6-エクソン7接合部を示す以下の配列に示す。Intron6配列を小文字で、エクソン7配列を大文字で示す。17bpの欠失及びGCの挿入を括弧内に示す：caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca tac agG TCA TCG CT) (GC) GAA CGG GCC AAT GAA ATG AAC GCC AAT GA)は、エクソン7のスキップに至ると予測される。野生型CYP4V2は、以下の配列を有し：CAA ACA GAA GCA TGT GAT TAT CAT TCA AA (T C AT ACA GGT CAT CGC T) GA ACG GGC CAA TGA AAT GAA CGC CAA TGA (配列番号47)、c. 802-8__810del17insGC変異CYP4V2は、以下の配列を有する：CAA ACA GAA GCA TGT GAT TAT CAT TCA AA (G C) GA ACG GGC CAA TGA AAT GAA CGC CAA TGA (配列番号46)。野生型配列の括弧で囲まれたヌクレオチドは欠失する17ヌクレオチドであり、変異体配列の括弧で囲まれたヌクレオチドは17塩基対の欠失に続いて挿入される2ヌクレオチドである。

【0569】

CRISPRを使用して良好な修復率を実現するには、Casで作製された、変異配列に可能な限り近い切断が望ましい。c. 802-8__810del17insGC変異を含むCYP4V2ゲノムDNAの領域には、複数のSpCas9 PAM部位（NGG）がある。したがって、通常のSpCas9を使用してこの変異を修正可能である。または、c. 802-8__810del17insGC変異及び／又は他の変異を修正するために、他の種のCas9、変異Cas9、又は異なるPAM（例えば、Cpf1では、変異配列に存在するTTTN）を有する他のCRISPRヌクレアーゼ（Cpf1など）を使用してもよい。

【0570】

（b）CRISPR gRNA設計及び選択

CYP4V2遺伝子のc. 802-8__810del17insGC変異領域に存在する様々なPAM部位に基づいて、複数の関連するプロトスペーサーエレメント配列（本明細書ではgRNAと称する；典型的には20ntの長さであるが、異なる長さ（例えばCas9との使用では17nt～22nt）であってもよい）を、DeskGenソフトウェアを使用してスクリーニングした。次の基準を使用して、5つのgRNA候補を選択した：

a) gRNA/Cas9切断部位が標的修正部位へ近接していること、及び

b) gRNAの予測されるオフターゲットプロファイル

（表5及び図12を参照、gRNA配列については、配列番号48～配列番号52を参照）。

【0571】

【表5】

gRNA	オフターゲットスコア	配列
CYP4V2 g1	87	5'-TGA TTA TCA TTC AAA GCG AA CGG -3'
CYP4V2 g2	98	5'-GAT TAT CAT TCA AAG CGA AC GGG -3'
CYP4V2 g3	73	5'-GAT AAT CAC ATG CTT CTG TT TGG -3'
CYP4V2 g4	70	5'-TTC ATT GGC GTT CAT TTC AT TGG -3'
CYP4V2 g5	32	5'-CAC ATG CTT CTG TTT GGA CT TGG -3'

【0572】

各gRNA候補に対応するPAM部位は太字で強調表示されている。混乱を避けるために述べると、PAM配列はgRNA（プロトスペーサーエレメント）配列の一部ではない。

【0573】

（c）患者ゲノムDNAを使用したgRNA検証

gRNAを選択及び検証するために、ホモ接合c. 802-8__810del17insGC変異を有するBCD患者（P1）のゲノムDNAを使用した。プライマーを使用して、変異部位及び様々な標的部位を含むCYP4V2の領域に隣接するDNAアンプリコンを準備した（表6及び図12を参照）。DNAアンプリコン、インビトロ転写（IVT）によって準備されたシングルガイドRNA（sgRNA）（それぞれgRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4、又はgRNA5のいずれかを含む）、及びSpCas9タンパク質を混合し、37℃で1時間インキュベートした。活性型sgRNAはCas9タンパク質を媒介して、アンプリコンに二本鎖切断を作製し、様々な断片パターンを表示した（表7）。反応物をロードし、DNA断片を1.5%アガロースゲルで分離した（図13）。

【0574】

【表6】

表6. gRNAの検証に用いたプライマー

	配列	アンプリコン (bp)
CYP4V2 1F	5'-CAG AAA TCG CAA GCA TAG AGG GTG AAT TCA-3'	1062bp
CYP4V2 1R	5'-CTG TTG GAG GGC TCT TAA CTG TCC-3'	

【0575】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7. 活性 gRNA により作製される予測される DNA 断片

gRNA	DNA アンプリコンのサイズ (bp)	断片サイズ (bp)	
g1	1062bp	442	620
g2		443	619
g3		416	646
g4		455	607
g5		410	652

10

【0576】

断片がアンプリコンにたしかに由来することを確認するために、未処置のアンプリコンの DNA 試料（図 16、上のパネル）及び g2 処置の最小断片（図 16、中央のパネル）をサンガー法シーケンシングに供した（図 14）。5 つの gRNA は全て、予測された切断活性を示した。

【0577】

変異を含む患者のゲノム DNA の検証に加えて、又はその代わりに、非限定的な例として体細胞、幹細胞、iPSC、又は幹細胞由来の細胞が挙げられる患者の細胞で gRNA の活性を検証してもよい。

20

【0578】

(d) gRNA 発現ベクターの構築

最も高い活性及び最も高いオフターゲットスコアを持つ 3 つの gRNA (g1、g2、g3) を、各活性 gRNA の二本鎖オリゴカセットを挿入することにより、pX-U6-CBh-Cas9-Puro gRNA 発現ベクターにクローニングした。各カセットは、g1、g2、及び g3 の gRNA 配列の 1 つに基づいて合成した。発現ベクターのコンストラクト及び gRNA の挿入部位を示す模式図を図 15 及び図 16 に示す。U6 プロモーターに続く IVTS gRNA 配列全体（配列番号 55（プロトスペーサーエレメント配列やオプショナルな「G」は含まない））を示すより詳細な図（例として g1 を使用）

30

については、図 17 を参照。各プロトスペーサーエレメント (gRNA) 配列の先頭に挿入される「G」ヌクレオチド（配列番号 59）はオプショナルである。これは主に U6 プロモーターの転写効率を高めることを目的とする。プロトスペーサーエレメント配列が「G」残基で始まる場合、又は UT プロモーター以外のプロモーター（例えば、H1 プロモーター）が使用される場合は、これは必要ない。制限酵素消化及びシーケンシングの両方によって全ての gRNA コンストラクトを検証した。

【0579】

トップ gRNA (g1、g2、又は g3) をそれぞれ発現し、hSpCas9 及びピューロマイシン耐性遺伝子を共発現する 3 つのプラスミド（すなわち pX459-hSpCas9-2A-Puro）を開発し（図 15 及び図 16）、c. 802-8_810del17insGC 変異の遺伝子修正のためのコンストラクトの 1 つとした（下記表 8 参照）。

40

【0580】

ガイド RNA、Cas タンパク質及び／又は選択マーカー（例えば、ピューロマイシン耐性遺伝子、及び／又は GFP、EGFP 又は RFP）は、1 つのプラスミドにパッケージングしてもよく、別のプラスミドにパッケージングしてもよいことは理解されよう。また、複数の gRNA を使用する場合（複数の変異を修正するため、又は同じ変異を修正するため（例えば Cas9 ニッカーゼで使用する gRNA のペアリング））、これらは同じベクターにパッケージングしてもよく別々のベクターにパッケージングしてもよい。

【0581】

50

CRISPR遺伝子編集成分（ガイドRNA及び／又はCasタンパク質）、及び／又は選択マーカーをパッケージングするためには、本明細書に記載のプラスミドベクターに加えて、他の様々なベクターを使用することができる（非限定的な例として、pX458プラスミドベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、及び／又はレンチウイルスベクターが挙げられる）。CRISPR成分をコードするDNAコンストラクトに加えて、ガイドRNA、Casタンパク質、及び／又は選択マーカーは直接使用してもよく、mRNAコンストラクト又はRNPコンストラクトで使用してもよい。

【0582】

（e）CRISPR RNPの構築及び検証

ベクターのDNAコンストラクト（例えば、上記のpX459プラスミド）に加えて、g1、g2、g3、g4、及びg5のそれぞれについてCRISPRリボ核タンパク質（RNP）コンストラクトが開発された（表5及び表8を参照）。各RNPコンストラクトは、

（i）関連するプロトスペーサーエレメントを含むキメラシングルガイドRNA（sgRNA）（表5及び表8、及び本明細書の詳細な説明を参照）、及び

（ii）リボ核タンパク質（RNP）複合体を形成するSpCas9タンパク質を含む。CYP4V2遺伝子の標的部位での様々なRNPコンストラクト（sgRNA1：Cas9、sgRNA2：Cas9、sgRNA3：Cas9、sgRNA4：Cas9、sgRNA5：Cas9）の切断活性を、上記段落（c）で説明した通り、患者のゲノムDNAで検証した（図12、図13、図14を参照）。

【0583】

sgRNAの長さは典型的には約100ntであるが、長さは変わることがあり、17nt～22ntのプロトスペーサーエレメント配列を含む。sgRNAはIVTに由来するものであっても合成であってもよい。g1、g2、g3、g4、及びg5に対応するIVT sgRNAを生成し、上記のように検証した。以下に説明するように、g1及びg2に対応する合成sgRNAは、Synthego Corporation（米国カリフォルニア州シリコンバレー）に特注した。

【0584】

sgRNAの代わりに、crRNA（例示的配列を配列番号53に示す）とtracrRNA（例示的配列を配列番号54に示す）との複合体（duplex）をCasタンパク質（例えば、Cas9）と一緒に使用して、CRISPR RNP複合体（crRNA：tracrRNA：Cas9）を形成してもよい。Cpf1タンパク質を使用する場合、tracrRNAは必要ではない。

【0585】

sgRNA又はcrRNA：tracrRNAは、細胞内RNA分解から保護するために化学的に修飾してもよい。例えば、化学修飾された合成RNAは、2'-O-メチルアナログ、及びgRNAの5'末端と3'末端の3塩基に3'ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含んでいてもよい（Synthego Corporation（米国カリフォルニア州シリコンバレー））。所望により利用可能な化学修飾を有する、所定のプロトスペーサーエレメント配列（例えば、CRISPR g1、g2、g3、g4、又はg5（配列番号48～配列番号52を参照））に基づく合成sgRNA又はcrRNA及びtracrRNAは、例えば、Synthego Corporation（米国カリフォルニア州シリコンバレー）やIDTから市販されている。

【0586】

（f）ドナー鋳型の構築

相同組換え修復（HDR）では、標的遺伝子の変異配列を修正するために必要なドナー核酸配列を提供するために、ドナー鋳型を使用する。一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN）の形態で、HDRの2つの別個のドナー鋳型を作製した。1つ目の、CYP4V2ドナー鋳型1又はCYP4V2 ssODN 1と称されるもの（配列番号56）は、17bpの修正を含み、以下の配列を有する：5'-AGA AAA ATA AAT G

AA AGA AAC TAG CAT ATT TTA TAA GAA AAT GTG
TTA ACT AGG GTG CAT CCA AGT CCA AAC AGA AGC
ATG TGA TTA TCA TTC AAA TCA TAC AGG TCA TCG
CTG AAC GGG CCA ATG AAA TGA ACG CCA ATG AAG
ACT GTA GAG GTG ATG GCA GGG GCT CTG CCC CCT
CCA AAA ATA AAC GCA GGG CCT TT-3'。一方、CYP4V
2ドナー鑄型2又はCYP4V2 ssODN 2（配列番号57）と称される2つ目のド
ナー鑄型は、CYP4V2ドナー鑄型1の逆相補鎖である。

【0587】

標的CYP4V2（c. 802-8_810del17insGC）変異を修正するた
めの相同組換え修復（HDR）を起こすために、上記の任意のgRNA又はsgRNA（g
1、g2、g3、g4、又はg5）及びCas9タンパク質と共に、上記いずれのドナー
鑄型を使用してもよい。

【0588】

本明細書で提供されるドナー鑄型は、長さが200ntである。様々な長さのドナー鑄
型を使用することができる。ドナー鑄型は、標的部位に対して対称であっても非対称であ
ってもよい。ドナー鑄型は、ssDNA、ssODN、又はドナー核酸配列を含む又はコ
ードするベクター（プラスミド又はAAVベクターなど）によって提供することができる
。ドナー鑄型が、CRISPRガイドRNAのプロトスペーサーエレメント及びCas
タンパク質の標的となるPAM配列に相補的なインタクトな（無傷の）配列を持っている場
合、このドナー鑄型が細胞内のCasタンパク質（Cas9など）によって分解されるの
を防ぐため、ドナー鑄型に変異を加えてもよい（例えば、ドナー鑄型のCas PAM
「NGG」を変異させて、これを「NGT」又は別の非PAM配列に変更する）。ただし
、ドナー鑄型によって導入される意図したPAM変異がコーディング領域内にある場合は
、それがサイレント変異であることを保証するために注意を払う必要がある。

【0589】

ドナー鑄型は合成的に作製することができ、商業的に入手可能である。例えば、特定の
配列のオリゴDNAを特注してもよい（Ultramer（登録商標）DNAオリゴヌク
レオチド、Integrated DNA Technologies（IDT）、米国ア
イオワ州コーラルビル）。

【0590】

（g）Casタンパク質及び選択マーカー

CRISPR関連タンパク質／ヌクレアーゼ（Cas）（Cas9又はCpf1など）
は市販されており、非限定的な例として、プラスミドによってコードされたもの、又はR
NPコンストラクトで使用する組換えタンパク質が挙げられる。Casタンパク質には、
1つ、2つ、又はそれ以上の核局在化配列（NLS）がさらに含まれていてもよく（例え
ば、カタログ番号1074182、Integrated DNA Technologies（IDT）、米国アイオワ州コーラルビル；カタログ番号A034a-a-1000
、Feldan（カナダケベック州）；Cpf1：カタログ番号1076158（IDT
））、選択マーカーと融合されていてもよい（例えば、EGFPと融合したSpCas9
タンパク質、カタログ番号PR-137211-E（Novatein Biosciences、米国マサチューセッツ州ウーバン））。

【0591】

CRISPR遺伝子編集コンストラクトをインビトロで細胞にトランスフェクトする場合
、トランスフェクション率を評価したり、次の工程の処置用に細胞を選択する補助とし
たりするために、選択マーカーを使用してもよい。非限定的な例として蛍光（例えば、G
FP、EGFP、RFP）及び／又はピューロマイシンが挙げられる様々な選択マーカー
を前記プロセスにおいて使用することができる。選択マーカーは、CRISPRコンスト
ラクトの任意の成分と統合されていてもよく、トランスフェクションのプロセスで個別に
提供してもよい。例えば、トランスフェクションされた細胞のイメージング及びマニユア

10

20

30

40

50

ルソート又はFACSソートを簡便に行うために、tracrRNA (IDT) 又はCas9タンパク質 (Novatein Biosciences、カタログ番号PR-137211-E) に蛍光標識を組み合わせてもよい。ピューロマイシンを使用して選択するために、CRISPRコンストラクトと同時トランスフェクトされるベクター中にピューロマイシン耐性遺伝子を含めてもよい。ピューロマイシンを使用した選択については、実施例で説明している。ピューロマイシンなどの抗生物質選択マーカー、又は蛍光標識など様々な種類の選択マーカーが市販で入手可能であり、CRISPR成分 (例えば、Cas9タンパク質又はCRISPRガイドRNA) に統合してもよく、別々に (例えば、ピューロマイシン耐性遺伝子を発現する発現プラスミド) 提供してもよい (非限定的な例として、IDT、Sigma Aldrich、Novatein Biosciences、Clontech Laboratories、及びInvivoGenが挙げられる)。

10

【0592】

(h) コンストラクト及び推奨されるプロトコル

以下の表 (表8) は、3つのgRNA (gRNA1、gRNA2、及びgRNA3) のそれぞれについて作製されたCRISPR遺伝子編集コンストラクト (プラスミド及びRNP) を示す。これには、3つのgRNAプラスミドコンストラクト又はそれぞれのsgRNA、2つのドナー鋳型 (順方向相補的及び逆方向相補的)、及びSpCas9タンパク質が含まれる。

20

【0593】

【表8】

表8. CYP4V2 変異のためのプラスミド及びRNPコンストラクト (c.802-8_810del17insGC)
CRISPR 遺伝子修正治療¹

品目番号	種類	名称
1	DNA コンストラクト/プラスミド ²	CYP4V2-g1 (配列は表5及び配列番号48を参照)
2	DNA コンストラクト/プラスミド ²	CYP4V2-g2 (配列は表5及び配列番号49を参照)
3	DNA コンストラクト/プラスミド ²	CYP4V2-g3 (配列は表5及び配列番号50を参照)
4	sgRNA ³	CYP4V2-g1 (配列は表5及び配列番号48を参照)
5	sgRNA ³	CYP4V2-g2 (配列は表5及び配列番号49を参照)
6	sgRNA ³	CYP4V2-g3 (配列は表5及び配列番号50を参照)
7	ドナー鋳型 ⁴	CYP4V2 ドナー鋳型1 (段落 (f) 及び配列番号56を参照)
8	ドナー鋳型 ⁴	CYP4V2 ドナー鋳型2 (段落 (f) 及び配列番号57を参照))
9	タンパク質	SpCas9 (例示配列は配列番号58を参照)

30

【0594】

1 BCD患者の間で最も一般的なCYP4V2変異であるc.802-8_810del17insGC変異を修正するためのコンストラクト。他のCYP4V2変異を修正するためのCRISPR gRNA及びコンストラクトを、本明細書に記載の方法により設計及び検証することもできる。プラスミド及びRNPコンストラクトのほか、他のコンストラクト (非限定的な例としてmRNA及びウイルスベクター) を使用して1又は複数のCRISPR成分を提供/発現することもできる。

40

2 CRISPR成分 (sgRNA及びSpCas9タンパク質)、及び選択マーカーとしてのピューロマイシン (Puro) 耐性遺伝子をコードするpX459プラスミド。DNAコンストラクト及びsgRNAをコードする配列を示す図17を参照 (例としてg1を使用している。ベクターコンストラクト及びマップについては図15及び図16を使用)。各sgRNA配列は、

(a) 20ntのプロトスペーサーエレメント (g1、g2、g3についてはそれぞれ

50

配列番号 48、配列番号 49、又は配列番号 50）、及び

(b) 82ntの配列（配列番号55（配列はプラスミドDNAに含まれるDNAの形式で示される。RNA配列については、DNA配列の「T」を「U」に置換する。）を含む。pX459ベクターは、U6プロモーターにより駆動される転写効率を増強するために、ヒトU6プロモーター配列の直後、プロトスペーサーエレメント配列の前に、「G」ヌクレオチド（配列番号59及び図17）を含む。これはIVTにより得られたsgRNAにも含まれる。CRISPR成分（gRNA及びCasタンパク質）は他のベクターにクローニングすることもできる（非限定的な例として、レンチウイルスベクター又はAAVベクターなどのウイルスベクターが挙げられる）。CRISPR gRNA及びCasタンパク質（例えば、Cas9タンパク質）は、別々のベクターにクローニングしてもよく、1つのベクターにクローニングしてもよい。

10

3 様々なプロトスペーサーエレメントに基づくsgRNA（CYP4V2 g1、CYP4V2 g2、又はCYP4V2 g3；表5、及びそれぞれ配列番号48、配列番号49、又は配列番号50を参照）。IVT sgRNAについては、上記の説明を参照。IVT sgRNAに加えて、化学修飾された合成sgRNAをSynthego Corporation（米国カリフォルニア州シリコンバレー）に注文した。sgRNAに代えて、crRNA（CYP4V2 g1、CYP4V2 g2、又はCYP4V2 g3の20ntプロトスペーサー配列、及びcrRNAの残りの配列（例示的な配列を配列番号53に示す）を含む）とtracrRNA（例示的な配列を配列番号54に示す）との複合体（duplex）を使用してもよい。

20

4 相同組換え修復（HDR）のドナー鋳型。異なる長さのドナー鋳型を使用してもよく、異なる形で構築してもよい（非限定的な例として、ssODNや、ベクター内（例えばアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（AAV2又はAAV6など））が挙げられる）。

【0595】

各試薬の濃度は約1000（ng/μL）である。

【0596】

以下のプロトコルは、エレクトロポレーション及びヌクレオフェクションによってCYP4V2変異CRISPR遺伝子修復コンストラクトを患者iPSCに送達するためのものである。他の方法（非限定的な例として、リポフェクション、ウイルスベクター形質導入（例えば、レンチウイルス又はAAVベクター（例えば、AAV6を使用してドナー鋳型を送達））、又はマイクロジェクションが挙げられる）を使用してもよい。第11継代目～第14継代目のP1 iPSCを使用する。

30

【0597】

プロトコル番号1（プラスミドを用いたエレクトロポレーション）：

1. Neon（登録商標）トランスフェクションシステム（Life Technologies）の説明書に従って、約100万個の細胞に対して、2.5μg（2.5μLのストック）のpX459.gRNA（品目番号1、2、又は3；gRNAは組み合わせないこと）及び2.5μg（2.5μLのストック）のssODN（品目番号7又は8）を含む混合物を使用する。

2. エレクトロポレーション（EP）条件を適用する：

40

a) 1100V、30ms、1パルス又は

b) 1200V、30ms、1パルス。

3. EP後、細胞をRock阻害剤（10μM）と共に6ウェルプレートの3ウェルに均等に分割する。

4. 播種の2日後、表9に示すようにピューロマイシンを添加する。

5. ピューロマイシンを添加してから2日後に、使用済みの培地をピューロマイシンを含まない新鮮な培地と交換する。

6. 2週間培養を維持して、コロニーを選択する。

【0598】

50

【表 9】

表 9. 病的 i P S C についての条件及びピューロマイシン濃度

	ピューロマイシン濃度 (μg/ml)		
1100V 30ms 1p	0.1	0.15	0.2
1200V 30ms 1p	0.1	0.15	0.2

10

【0599】

プロトコル番号 2 (RNP を用いたエレクトロポレーション) :

1. 氷入りバケツを使用する。1つの sgRNA (品目番号 4、5、又は 6 ; gRNA は組み合わせないこと)、1つの ssODN ドナー鑄型 (品目番号 7 又は 8)、SpCas9 タンパク質 (品目番号 9)、及び Cas9-Puro 発現ベクターを氷上で解凍する。Cas9-Puro 発現ベクターは、選択マーカーとして使用される。これは pX459-hSpCas9-2A-Puro プラスミドであり、gRNA にクローニングしなかったことを除いて、図 15 に示す構造を有する。

2. 1. 7mL エッペンドルフチューブ及び 6 ウェルプレートに明確にラベルを付ける。サンプル毎に 1 本のエッペンドルフチューブ及び 1 個のウェルを準備する。各ウェルに 3mL の培地 (StemCell Technologies の TeSR-E8 (カタログ番号 05940)) を加える。

20

3. 25mL の PBS 入りの 10cm ディッシュを 1 個準備して、Neon (登録商標) チップを洗浄する。

4. エレクトロポレーションされた細胞を入れるための 6 ウェルプレートを準備する。各ウェルに 3mL の培地を加える。

5. 各エッペンドルフチューブに、4 μg (4 μL のストック) sgRNA (品目番号 4、5、又は 6) 及び 10 μg (10 μL のストック) の SpCas9 タンパク質 (品目番号 9) を追加し、チューブを室温で少なくとも 10 分間置く。

30

6. 5 μg (5 μL のストック) の ssODN (品目番号 7 又は 8) 及び 2.5 μg (2.5 μL のストック) の Cas9-Puro 発現ベクターを各チューブに追加する。

7. 適切な Neon (登録商標) EP バッファァー R で細胞を再懸濁し、最終密度 1×10^7 細胞/mL とする。

8. 105 μL の細胞懸濁液を分注し、CRISPR RNP 混合物とともに各エッペンドルフチューブに加える。

9. 3mL の Buffer E2 を Neon (登録商標) ピペットに添加し、Neon (登録商標) ピペットを Neon (登録商標) ピペットステーションに置く。

10. 100 μL の Neon (登録商標) チップを使用する。各エッペンドルフチューブから 100 μL の EP 混合液を吸引し、Neon (登録商標) ピペットに挿入する。

40

11. 上記表 9 の EP 条件のうちの 1 つを適用し、上記のプロトコル番号 1 の工程 3 ~ 6 を行う。

【0600】

注記: iPSC がうまく増殖しない場合は、コンディショニング培地を推奨する。使用済み培地 (ピューロマイシンを含まない) を収集し、ろ過して細胞破片を取り除く。使用済み培地と新鮮培地を比率 1 : 1 で混合する。遺伝子編集プロセス全体を通してフィーダーフリー条件でヒト iPSC を培養するには、マトリゲル (Corning カタログ番号 354277) 及び StemCell Technologies の TeSR-E8 (カタログ番号 05940) の使用が推奨される。EP 後に細胞をプレーティングする際に、48 時間培地に ROCK 阻害剤 (最終濃度 10 μM) を加えると、細胞の生存率を維持す

50

るのに役立つ。

【0601】

プロトコル番号3（RNPを用いたヌクレオフェクション）：

1. Lonza 4D-nucleofector、パラメーター設定：Lonzaプログラム、DS-150

2. RNP（cas9+gRNA）及びssODNを別々に準備し（最大10μLに容量を調整）、使用前に混合する。表10を参照。

(1) gRNA1+CYP4V2フォワードssODN

(2) gRNA2+CYP4V2フォワードssODN

(3) gRNA1+CYP4V2リバーズssODN

(4) gRNA2+CYP4V2リバーズssODN

【0602】

【表10】

各グループ反応	gRNA 30μM (μL)	Cas9 20μM(μL)	ssODN 30μM(μL)	PBS (μL)
P1 iPS細胞	4	1	4	1

各グループあたりの キットバッファ ー	サンプルあたりの 体積(μL)	4サンプル(μL) 10
溶液	16.4	65.6
補充	3.6	14.4

【0603】

3. 細胞を採取しカウントする： 5×10^5 iPS細胞

4. 3～5回静かに上下にピペティングして、RNP+ssODN（10μL）と共に細胞を懸濁する。

5. 20μLのLonzaキットバッファを細胞懸濁液に添加し、ヌクレオフェクション前のインキュベーション時間を最小限にする。

6. 混合物（30μL）をLonzaキットウェルにロードする。インピーダンスを確認する。

7. 設定パラメーター（DS150）を使用して細胞をエレクトロポレーションする。

8. 70μLのmTESR（ROCK阻害剤を含む）をキットのウェルに直接添加して、エレクトロポレーションした細胞を静かに再懸濁する。

9. 6ウェルプレートの1つのウェルで細胞を継代培地中に播種する。

10. エレクトロポレーションの24時間後に細胞の生存率を観察し、培地を培養培地に交換する。

【0604】

注記：このプロトコルでは選択マーカーは使用しない。ヌクレオフェクション後生存している細胞を単一細胞増殖のために選択する。Lonza DS-150プログラムの他、CB-150などの他のパラメーターを使用してもよい。

【0605】

（実施例22—遺伝的に修復された患者細胞系の作製、並びに遺伝的に修復された患者細胞系の作製及び眼細胞療法におけるRNPの使用）

CRISPR g1又はCRISPR g2（品目番号1又は2）を含む発現プラスミドコンストラクトと、sgRNA1又はsgRNA2（品目番号4又は5、Synthego、米国カリフォルニア州シリコンバレー）及びSpCas9（品目番号9、カタログ番号A034a-a-1000、Feldan（ケベック、カナダ）又はSynthego（例えば、Cas9ヌクレアーゼ2NLS、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Stre

ptococcus pyogenes))) を含むCRISPR RNPコンストラクトとを、CYP4V2ドナー鑄型（品目番号7又は8、ssODN、Ultramer（登録商標）DNAオリゴヌクレオチド、Integrated DNA Technologies（IDT）、米国アイオワ州コーラルビル）と併せてそれぞれ使用して、c. 802-8__810del17insGC変異を有する患者iPSCをトランスフェクトする。【0606】

相同組換え修復（HDR）による遺伝子修正の評価：

トランスフェクション後、CYP4V2領域の遺伝子修正を評価するために、選択した細胞を収集して、PCR、及び引き続くc. 802-8__810del17insGC変異を含む標的アンプリコンのシーケンシングに供する。トランスフェクトされた細胞のディープシーケンシングにより、リードに17bpの「TCATACAGGTCAATCGCT」の挿入及び「GC」の欠失を伴う変異の正確な修正が含まれており、野生型配列（配列番号47）へと変異が修正されていることが分かった。変異の修正は、トランスフェクトされていないいずれの対照iPSCでも見られない。この結果は、トランスフェクトされた細胞間のHDR頻度の指標としても機能する。

【0607】

オフターゲット編集が最小限である、又はオフターゲット編集を伴わないiPSCクローンの取得：

HDRを評価した後、c. 802-8__810del17insGC変異を有する患者のiPSCでトランスフェクションを再度行う。トランスフェクトした細胞を、単一細胞クローニング及び単一細胞増殖する。次に、オンターゲットHDRが確認されたクローン細胞系を、シーケンシングによってオフターゲット編集について評価する。臨床応用には、全ゲノムシーケンシング（カバー率60倍）を使用して、同じ患者における編集された細胞系とトランスフェクトされていない細胞系とを比較する。ゲノムに公知の実質的な悪影響がない、オフターゲット編集が最小限である、又はオフターゲット編集を伴わない、編集されたクローナルiPSC細胞系が選択される。

【0608】

遺伝的に修正されたiPSCを目的の種類細胞に分化

次いで、選択したiPSCクローン細胞系をiPSC-RPE細胞に分化させる（本明細書の実施例を参照）。選択したiPSCクローン細胞系は、細胞療法での使用が望まれる他の種類の細胞に分化させることができる（例えば、iPSC-RPE細胞、iPSC-PRC、iPSC-CE細胞、iPSC-CEC、又は他のiPSC-眼細胞）。

【0609】

遺伝学的に修復されたiPSC又はiPSC由来の細胞が表現型を有しないことを確認するためのバイオアッセイ

遺伝的に修正された（又は遺伝的に修復された）iPSC-RPE細胞の生化学的機能を試験し（本明細書の実施例を参照）、未治療の患者iPSC-RPE細胞で見られるような表現型を持たないことを確認する。遺伝的に修復された患者のiPSC-RPE細胞ではCYP4V2の発現が検出される。

【0610】

コードするCRISPR成分（例えば、gRNA、Casヌクレアーゼ、及び／又はドナー鑄型）の持続的な発現をもたらすプラスミド又は他のベクターコンストラクト（AAV、レンチウイルスなど）とは異なり、CRISPR RNPコンストラクトは、オンとオフが迅速である。RNPコンストラクトの成分は、トランスフェクトされた細胞で比較的急速に分解される。したがって、RNPコンストラクトを使用すると、プラスミドや他のコンストラクトと比較して、オフターゲット編集のリスクが低くなる。これにより、RNPコンストラクトは、例えば、移植に適した遺伝的に修復された患者細胞の作製や、インビボ治療（例えば、インビボ遺伝子修正のために、RNPコンストラクトを対象の目に注入する）などの、臨床応用に特に適したものになる。本明細書で提供されるCRISPR RNPコンストラクト及び方法は、BCDの治療の他、表4に示す変異又は欠陥を有

する遺伝子に関連する疾患などの他の疾患の治療にも使用することができる。

【0611】

(実施例23：眼細胞療法における遺伝子修復細胞の使用)

遺伝的に修復されたiPS-RPE細胞、iPS-PRC、iPS-CEC、iPS-CE細胞、又は他のiPS-眼細胞は、眼細胞療法として患者の目に移植することができる。例えば、BCD患者の死滅又は変性したRPE細胞、光受容体細胞、又は他の眼細胞の自己置換細胞として使用してもよい。遺伝的に修復された細胞は、直接移植してもよく（例えば、細胞懸濁液）、他の方法で移植してもよい（非限定的な例として、層、シート、マトリックス、足場、又は組織の一部など）。移植に使用される遺伝的に修復された細胞の量は、置換の対象となる細胞型、置換細胞を必要とする領域のサイズ、及び治療対象（例えば、治療対象の年齢、性別、体重、疾患の進行度、及び状態）、投与経路、移植の場所（網膜 vs. 角膜など）、移植の形態（例えば、細胞懸濁液 vs. 層；シート、マトリックス、足場又は組織の一部として、など）、及び必要なレジメンによって異なる。特定の細胞型（例えば、RPE細胞、光受容体、CEC、又はCE細胞）の片眼への1回の移植における細胞量は、約1,000個～約1,000万個の細胞の範囲内であってよい。

10

【0612】

必要に応じて、細胞は臨床使用のためにGMP施設で製造してもよい。細胞療法製品のGMP施設は、例えば、ケース・ウェスタン・リザーブ大学の細胞療法統合サービス（Cellular Therapy Integrated Services）、ベイラー医科大学のCenter for Cell and Gene Therapy、CELLforCURE、ニューヨーク幹細胞財団（New York Stem Cell Foundation）、及びLonzaなどの研究機関、受託製造機関（CMO）、及び受託研究機関（CRO）において商業的に利用可能である。

20

【0613】

患者特異的自家投与では、網膜変性疾患（加齢黄斑変性（AMD）などのRPE変性の影響を受けた網膜変性疾患など）の同種（アロジェニック）眼細胞療法（胚性幹細胞由来RPE（ES-RPE）移植など）で使用されるものと同じ投与／送達方法を使用することができる。そのような投与／外科的方法は当技術分野で公知である。

【0614】

(実施例24－眼疾患の遺伝子治療と細胞療法との併用治療)

本開示では、BCDの遺伝子治療及び細胞療法で使用するための組成物及び方法を記載してきた。眼疾患の場合、遺伝子治療及び細胞療法にはそれぞれ長所と短所がある。一方で、遺伝子治療は、患者に遺伝子治療を受けてレスキューされるまだ多くの網膜（又は眼）細胞が残っている初期～中期段階でより効果を発揮する。ただし、遺伝子治療は、関連する眼細胞（例えば、RPEやPRC）が残っていない後期段階の患者ではうまく機能しないか、全く効果を発揮しない可能性がある。一方、細胞療法は、患者の目における死滅細胞又は変性細胞を置換する置換細胞を提供し、特に後期患者及び優性遺伝疾患において、遺伝子治療よりも有益である。しかし、細胞療法では、生存していれば患者の残存視力を維持させたり置換細胞の統合に役立ったりする、患者の眼に残存する「元の」細胞をレスキューすることができない。

30

40

【0615】

遺伝子治療及び細胞療法の限界を克服し、患者に最大の利益をもたらすために、BCDに対して、遺伝子治療と細胞療法との併用治療法が開発された。この併用治療法は、他の眼疾患にも使用可能である。そのような方法は、

(a) 遺伝子治療（例えば、AAV、CYP4V2遺伝子治療又はCRISPR遺伝子修正療法）をインビボで患者の眼に適用すること、及び

(b) 遺伝的に修復された患者特異的自家iPS-眼細胞（例えば、iPS-RPE細胞、iPS-PRC、iPS-CE細胞、iPS-CEC、又は疾患の影響を受けたその他の種類の眼細胞）のインビトロでの作製及びこれらの細胞を患者の眼に移植すること、

50

を含み、

(a) 及び (b) は、順次 (最初に (a) 次に (b)、又は最初に (b) 次に (a)) 適用してもよく、同時に (例えば、1 回の投与で遺伝子治療ベクター及び細胞を注入する) 適用してもよい。(a) 又は (b) のそれぞれは、同じ眼に 1 又は複数回適用できる。疾患、病期、及び患者の個々の状況に応じて、(a) と (b) とは同じ種類の眼細胞を標的としてもよく、異なる種類の眼細胞を標的化してもよい。例えば、BCD の場合、ユビキタスプロモーターによって駆動される遺伝子治療用ベクターは、RPE 細胞、光受容体細胞、及びその他の網膜細胞で CYP4V2 発現をもたらしうるが、細胞療法は再生 RPE 細胞及び／又は光受容体の提供に焦点を当ててもよい。

【0616】

この場合、細胞療法は新しい細胞 (例えば、RPE 又は光受容体細胞) を提供することにより有益となるが、遺伝子治療は残りの RPE 又は光受容体細胞をレスキューすることにより、及び／又は眼細胞の状態に影響を与える脈絡膜細胞の健康状態を改善することにより、細胞療法の効果を改善することができる。遺伝子治療及び細胞療法のそれぞれの「レスキュー (救済)」効果及び「置換」効果の組み合わせにより、併用治療は、遺伝子治療又は細胞療法のいずれか一方と比べて優れたものとなっている。この併用治療は、1 又は複数の遺伝子変異によって引き起こされる眼疾患及びその他の疾患 (非限定的な例として、表 4 に示す変異又は欠陥を有する遺伝子に関連する疾患) に適用することができる。

【0617】

前記方法及び物の組成は、多くの異なる態様と併せて本明細書に記載されているが、様々な態様の前述の説明は例示的に説明することを意図し、前記方法及び物の組成の範囲を限定するものではないことを理解されたい。その他の態様、利点、及び変更も、以下の特許請求の範囲内にある。

【0618】

本明細書は、生成物の作製に組み合わせて使用可能な方法及び組成、並びに前記方法及び組成による生成物を開示する。これら及び他の材料が本明細書に開示されており、これらの方法及び組成の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示されていることが理解される。すなわち、これらの組成及び方法の様々な個々の及び集合的な組み合わせ並びに変更への具体的な言及は明示的に開示されていない可能性もあるが、それぞれ本明細書で具体的に意図及び説明される。例えば、特定の物の組成又は特定の方法が開示及び考察され、多くの組成物や方法が説明されている場合、特に反対の指示がない限り、その組成及び方法のありとあらゆる組み合わせ及び変更が具体的に想定されている。同様に、これらの任意のサブセット又は組み合わせも具体的に想定され、開示されている。

(付記) 本開示は以下の実施形態を含む。

< 1 >

ヒト対象の眼疾患を治療又は予防するための組成物であって、

前記組成物は発現カセットを含むベクターを含み、

前記発現カセットは、1 又は複数の制御配列に作動可能に連結された、機能的又は非変異 CYP4V2 タンパク質をコードする核酸分子又はその非病原性バリエーションを含み、

前記疾患は、眼細胞の機能障害、ジストロフィー、障害、変性、萎縮及び／又は死滅に関連している、

組成物。

< 2 >

眼細胞の機能障害、ジストロフィー、障害、変性、萎縮及び／又は死滅を予防、阻止、進行遅延、治療、又は改善するための組成物であって、

前記組成物は発現カセットを含むベクターを含み、

前記発現カセットは、1 又は複数の制御配列に作動可能に連結された、機能的又は非変異 CYP4V2 タンパク質をコードする核酸分子又はその非病原性バリエーションを含む、

組成物。

疾患：

10

20

30

40

50

< 3 >

前記眼疾患又は眼細胞変性は、CYP4V2遺伝子に両アレル変異を有する遺伝性網膜変性（IRD）又は網膜色素変性症（RP）である、< 1 >又は< 2 >に記載の組成物。

< 4 >

前記疾患、又は前記眼細胞変性は、クリスタリン網膜症（BCD、Bietti結晶性角膜網膜ジストロフィーとしても知られる）に関連する、< 1 >、< 2 >、又は< 3 >に記載の組成物。

< 5 >

前記ベクターはウイルスベクター、プラスミド、又は非ウイルスベクターである、< 1 >～< 4 >のいずれか一項に記載の組成物。

10

< 6 >

前記ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、及びレトロウイルスベクターからなる群から選択される、< 5 >に記載の組成物。

< 7 >

前記ベクターは、組換えAAVベクター（rAAV）である、< 5 >又は< 6 >に記載の組成物。

< 8 >

前記rAAVにおけるAAVゲノム又はAAVカプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、又はその他のAAVの血清型、分離株、若しくは分岐群、又はそれらの誘導体、バリエーション、若しくはハイブリッドのいずれか1つに由来する、< 5 >、< 6 >、又は< 7 >に記載の組成物。

20

< 9 >

前記rAAVは、偽型AAV（例えば、AAV2/5、AAV2/8、AAV2/1、AAV2/9、AAV2/6、AAV2/4、AAV2/6、AAV5/2、AAV8/1、AAV8/2、AAV2/7、AAV2/12、及びAAV2/10）又はハイブリッドAAV（例えば、AAV-DJ、AAV-DJ/8、又はAAV-DJ/9）である、< 5 >～< 8 >のいずれか一項に記載の組成物。

30

< 10 >

前記rAAVは、1又は複数のカプシド変異（例えば、Y-F、K-R、T-A、S-A及び／又はT-V変異（例えば、Y444F、Y500F、Y730F、Y252F、Y272F、Y700F、Y704F、及びT491V）からの1又は複数のカプシド変異を有するAAV2、又は異なるAAV血清型における対応する変異（例えば、AAV2（Y444F+Y500F+Y730F）、AAV2（Y-Fを4つ（quadY-F）+T-V）、又はAAV2/8（Y733F）））を含む、< 5 >～< 9 >のいずれか一項に記載の組成物。

< 11 >

前記rAAVの血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Anc80、rh10、及び／又はShH10からなる群から選択される又は由来する、< 5 >～< 10 >のいずれか一項に記載の組成物。

40

< 12 >

前記rAAVは、AAV2/5、AAV2/8、AAV2/2、AAV2（Y444F+Y500F+Y730F）、AAV2/1、AAV2/9、AAV2/8（Y733F）、AAV2/6、AAV2/4、AAV2/7、AAV5、AAV2、AAV8、AAV1、AAV9、AAV6、AAV10、AAV4、AAV7、AAV12、Anc80、AAV7m8、AAV-DJ、ShH10、AAV-PHP.B、又はそれらのハイブリッド、誘導体、若しくはバリエーションからなる群から選択される又は由来する、< 5 >

50

～＜ 1 1 ＞のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 1 3 ＞

前記 r A A V ベクターは、一本鎖 A A V ベクター又は自己相補的 A A V (s c A A V) ベクターである、＜ 5 ＞～＜ 1 2 ＞のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 1 4 ＞

前記ベクターは、プラスミド、裸の (n a k e d) 核酸、リボソーム (例えば、カチオン性又はアニオン性リボソーム)、デンドリマー、ナノ粒子、ポリマー (例えば、ポリプレックス)、脂質ポリマー系、固体脂質ナノ粒子、又はリボソームプロタミン／DNAリポプレックス (L P D) である、＜ 5 ＞に記載の組成物。

＜ 1 5 ＞

前記核酸配列にコードされる前記機能的又は非変異 C Y P 4 V 2 タンパク質は、配列番号 4 ～ 6 からなる群から選択される配列のいずれかに対して少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性 (例えば、少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の配列同一性) を有するポリペプチドを含む、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 1 6 ＞

前記核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 に示す配列のいずれかと少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 1 7 ＞

前記核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 に示す配列のいずれかと少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 1 8 ＞

前記核酸分子は、配列番号 1、2、又は 3 に示す配列を含む、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 1 9 ＞

前記核酸分子は、配列番号 4、5、及び 6 から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするコドン最適化配列を含む、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 2 0 ＞

前記制御配列は、プロモーターを含む、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 2 1 ＞

前記プロモーターは、R P E 細胞特異的プロモーター、網膜細胞特異的プロモーター、角膜細胞特異的プロモーター、眼細胞特異的プロモーター、又は構成的プロモーターである、＜ 2 0 ＞に記載の組成物。

＜ 2 2 ＞

前記プロモーターは、β アクチンプロモーター若しくはウイルスプロモーター又はそれらのハイブリッドである、＜ 2 0 ＞に記載の組成物。

＜ 2 3 ＞

前記プロモーターは、C A G プロモーター (ハイブリッド C M V 初期エンハンサー／ニワトリβ アクチンプロモーター (C A G G S プロモーター、C B プロモーター又は C B A プロモーターとしても知られる))、ニワトリβ アクチンプロモーター、小型 C B A (s m C B A) プロモーター、C B ^S ^B プロモーター、又は C B ^h プロモーター、その他のβ アクチンプロモーター (例えば、ヒトβ アクチンプロモーター)、伸長因子 1 α 短 (E F S : e l o n g a t i o n f a c t o r 1 α s h o r t) プロモーター、伸長因子 1 α (E F - 1 α) プロモーター、C M V プロモーター、P G K プロモーター、U B C プロモーター、G U S B プロモーター、U C O E プロモーター、V M D 2 (卵黄斑黄斑ジストロフィー 2、B E S T 1 としても知られる) プロモーター、R P E 6 5 プロモーター、又はそれらのハイブリッド、バリエーション、若しくは誘導体からなる群から選択される、＜ 2 0 ＞に記載の組成物。

＜ 2 4 ＞

前記制御配列は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（bGHポリA）、スモールポリAシグナル（SPA）、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル（hGHポリA）、SV40ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル、又はそれらの誘導体、ハイブリッド、若しくはバリエーションからなる群から選択されるポリAシグナルである、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

<25>

前記制御配列は、コザック（Kozak）配列を含む、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

<26>

前記制御配列は、エンハンサーを含む、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

<27>

前記エンハンサーは、非限定的な例としてWPREエンハンサー、HPREエンハンサー、CTEエンハンサー又はそれらの誘導体、ハイブリッド、若しくはバリエーションが挙げられるウイルスエンハンサーである、<26>に記載の組成物。

<28>

配列番号60～64に示すCYP4V2発現カセット配列のいずれかと少なくとも80%の配列同一性を有する核酸分子を含む、BCDを治療若しくは予防するための組成物、又はBCDを治療若しくは予防するための組成物を製造するための組成物。

<29>

医薬的に許容される担体と、特定の投与経路に適した追加の成分とで製剤化されている、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

<30>

発現カセットを含むベクターを対象に投与することを含み、

前記発現カセットは1又は複数の制御配列に作動可能に連結された機能的又は非変異CYP4V2タンパク質をコードする核酸分子又はその非病原性バリエーションを含み、

前記疾患は、眼細胞の機能障害、ジストロフィー、障害、変性、萎縮及び／又は死滅に関連している、

ヒト対象の眼疾患を治療又は予防するための方法。

<31>

発現カセットを含むベクターを前記眼細胞へ送達することを含み、

前記発現カセットは1又は複数の制御配列に作動可能に連結された機能的又は非変異CYP4V2タンパク質をコードする核酸分子又はその非病原性バリエーションを含む、眼細胞の機能障害、ジストロフィー、障害、変性、萎縮及び／又は死滅を予防、阻止、進行遅延、治療、又は改善するための方法。

<32>

前記眼細胞は、網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、網膜色素上皮（RPE）細胞、光受容体細胞、及び／又は脈絡膜上皮細胞である、<30>又は<31>に記載の方法。

<33>

前記眼疾患又は眼細胞変性は、CYP4V2遺伝子に両アレル変異を有する遺伝性網膜変性（IRD）又は網膜色素変性症（RP）である、<30>又は<31>に記載の方法。

<34>

前記疾患又は前記眼細胞変性は、クリスタリン網膜症（BCD、Bietti結晶性角膜網膜ジストロフィーとしても知られる）に関連する、<30>又は<31>に記載の方法。

<35>

前記ベクターはウイルスベクター、プラスミド、又は非ウイルスベクターである、<30>～<34>のいずれか一項に記載の方法。

<36>

前記ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、バキュロウイルスベ

10

20

30

40

50

クター、センダイウイルスベクター、及びレトロウイルスベクターからなる群から選択される、＜35＞に記載の方法。

＜37＞

前記ベクターは、組換えAAVベクター（rAAV）である、＜36＞に記載の方法。

＜38＞

前記rAAVは、AAVゲノム又はその誘導体、及び／又はAAVカプシドタンパク質又はその誘導体若しくはバリエーションを含む、＜37＞に記載の方法。

＜39＞

前記rAAVは、キメラAAV、シャッフルAAV、又はカプシド改変AAVである、＜37＞又は＜38＞に記載の方法。

＜40＞

前記rAAVにおけるAAVゲノム又はAAVカプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、又はその他のAAVの血清型、分離株、若しくは分岐群、又はそれらの誘導体、バリエーション、若しくはハイブリッドのいずれか1つに由来する、＜36＞、＜37＞、＜38＞、又は＜39＞に記載の方法。

＜41＞

前記rAAVは、偽型AAV（例えば、AAV2／5、AAV2／8、AAV2／1、AAV2／9、AAV2／6、AAV2／4、AAV2／6、AAV5／2、AAV8／1、AAV8／2、AAV2／7、AAV2／12、及びAAV2／10）又はハイブリッドAAV（例えば、AAV-DJ、AAV-DJ／8、又はAAV-DJ／9）である、＜37＞～＜40＞のいずれか一項に記載の方法。

＜42＞

前記rAAVは、1又は複数のカプシド変異（例えば、Y-F、K-R、T-A、S-A及び／又はT-V変異（例えば、Y444F、Y500F、Y730F、Y252F、Y272F、Y700F、Y704F、及びT491Vからの1又は複数のカプシド変異を有するAAV2、又は異なるAAV血清型における対応する変異（例えば、AAV2（Y444F+Y500F+Y730F）、AAV2（Y-Fを4つ（quadY-F）+T-V）、又はAAV2／8（Y733F））を含む、＜37＞～＜41＞のいずれか一項に記載の方法。

＜43＞

前記rAAVの血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Anc80、rh10、及び／又はShH10からなる群から選択される又は由来する、＜37＞～＜42＞のいずれか一項に記載の方法。

＜44＞

前記rAAVは、AAV2／5、AAV2／8、AAV2／2、AAV2（Y444F+Y500F+Y730F）、AAV2／1、AAV2／9、AAV2／8（Y733F）、AAV2／6、AAV2／4、AAV2／7、AAV5、AAV2、AAV8、AAV1、AAV9、AAV6、AAV10、AAV4、AAV7、AAV12、Anc80、AAV7m8、AAV-DJ、ShH10、AAV-PHP.B、又はそれらのハイブリッド、誘導体、若しくはバリエーションからなる群から選択される又は由来する、＜37＞～＜43＞のいずれか一項に記載の方法。

＜45＞

前記rAAVベクターは、一本鎖AAVベクター又は自己相補的AAV（scAAV）ベクターである、＜37＞～＜44＞のいずれか一項に記載の方法。

＜46＞

前記ベクターは、プラスミド、裸の（naked）核酸、リボソーム（例えば、カチオン性又はアニオン性リボソーム）、デンドリマー、ナノ粒子、ポリマー（例えば、ポリプレックス）、脂質ポリマー系、固体脂質ナノ粒子、又はリボソームプロタミン／DNAリ

10

20

30

40

50

ポブレックス（LPD）である、＜30＞～＜34＞のいずれか一項に記載の方法。

＜47＞

前記核酸配列にコードされる前記機能的又は非変異CYP4V2タンパク質は、配列番号4～6からなる群から選択される配列のいずれかに対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性）を有するポリペプチドを含む、＜30＞～＜46＞のいずれか一項に記載の方法。

＜48＞

前記核酸分子は、配列番号1、2、又は3に示す配列のいずれかと少なくとも75%の配列同一性を有する、＜30＞～＜47＞のいずれか一項に記載の方法。

10

＜49＞

前記核酸分子は、配列番号1、2、又は3に示す配列のいずれかと少なくとも80%の配列同一性を有する、＜30＞～＜48＞のいずれか一項に記載の方法。

＜50＞

前記核酸分子は、配列番号1、2、又は3に示す配列を含む、＜30＞～＜49＞のいずれか一項に記載の方法。

＜51＞

前記核酸分子は、配列番号4、5、及び6から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするコドン最適化配列を含む、＜30＞～＜50＞のいずれか一項に記載の方法。

20

＜52＞

前記制御配列は、プロモーターを含む、＜30＞～＜51＞のいずれか一項に記載の方法。

＜53＞

前記プロモーターは、RPE細胞特異的プロモーター、網膜細胞特異的プロモーター、角膜細胞特異的プロモーター、眼細胞特異的プロモーター、又は構成的プロモーターである、＜52＞に記載の方法。

＜54＞

前記プロモーターは、βアクチンプロモーター若しくはウイルスプロモーター又はそれらのハイブリッドである、＜52＞に記載の方法。

30

＜55＞

前記プロモーターは、CAGプロモーター（ハイブリッドCMV初期エンハンサー／ニワトリβアクチンプロモーター（CAGGSプロモーター、CBプロモーター又はCBAプロモーターとしても知られる））、ニワトリβアクチンプロモーター、小型CBA（smCBA）プロモーター、CB^SBプロモーター、又はCB^hプロモーター、その他のβアクチンプロモーター（例えば、ヒトβアクチンプロモーター）、伸長因子1α短（EF S : e l o n g a t i o n f a c t o r 1 a l p h a s h o r t）プロモーター、伸長因子1α（EF-1α）プロモーター、CMVプロモーター、PGKプロモーター、UBCプロモーター、GUSBプロモーター、UCOEプロモーター、VMD2（卵黄状黄斑ジストロフィー2、BEST1としても知られる）プロモーター、RPE65プロモーター、又はそれらのハイブリッド、バリエーション、若しくは誘導体からなる群から選択される、＜52＞に記載の方法。

40

＜56＞

前記制御配列は、ポリアデニル化（ポリA）シグナルを含む、＜30＞～＜55＞のいずれか一項に記載の方法。

＜57＞

前記ポリAシグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（bGHポリA）、スモールポリAシグナル（SPA）、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル（hGHポリA）、SV40ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル、又はそれらの誘導体

50

、ハイブリッド、若しくはバリエーションである、＜56＞に記載の方法。

＜58＞

前記制御配列は、コザック（Kozak）配列を含む、＜30＞～＜57＞のいずれか一項に記載の方法。

＜59＞

前記制御配列は、エンハンサーを含む、＜30＞～＜57＞のいずれか一項に記載の方法。

＜60＞

前記エンハンサーは、WPREエンハンサー、HPREエンハンサー、CTEエンハンサー又はそれらの誘導体、ハイブリッド、若しくはバリエーションが挙げられるがこれらに限定されないウイルスエンハンサーである、＜59＞に記載の方法。

10

＜61＞

配列番号60～64に示すCYP4V2発現カセット配列のいずれかと少なくとも80%の配列同一性を有する核酸分子を含むベクターを投与することを含む、BCDを治療又は予防するための方法。

＜62＞

前記組成物は、医薬的に許容される担体と、特定の投与経路に適した追加の成分とで製剤化されている、＜30＞～＜61＞のいずれか一項に記載の方法。

＜63＞

配列番号60～64に示すCYP4V2発現カセット配列のいずれかと少なくとも80%の配列同一性を有する核酸分子を含む組成物であって、BCDを治療又は予防するためのベクターの製造に使用する組成物。

20

＜64＞

インビトロ治療のために、細胞あたり約 1×10^3 GC～約 1×10^6 GC（GC：ゲノムコピー；ゲノムを含むAAV粒子を測定する）の量（MOI：感染多重度）で前記標的細胞の感染が行われる、＜30＞～＜63＞のいずれか一項に記載の方法。

＜65＞

対象の眼へのインビボ投与のために、1回の投与は、約 1×10^6 GC～約 2×10^{13} GCのオーダー（例えば、約 1×10^{11} GC～約 1×10^{12} GCの高用量範囲、約 1×10^{10} GC～約 1×10^{11} GCの中用量範囲、約 1×10^9 GC～約 1×10^{10} GCの低用量範囲、約 1×10^6 GC～約 1×10^9 GCの超低用量範囲、及び約 1×10^{12} GC～約 2×10^{13} GCの超高用量範囲）で、又はこれらの範囲内の用量であってかつ所望の効果を提供するのに十分な任意の用量で実施できる、＜30＞～＜64＞のいずれか一項に記載の方法。

30

＜66＞

前記投与工程は、疾患症状の発現前又は疾患症状の発現後に行われる、＜30＞～＜65＞のいずれか一項に記載の方法。

＜67＞

前記投与及び／又は標的化送達は、眼及び／又は眼細胞に対するものである、＜30＞～＜66＞のいずれか一項に記載の方法。

＜68＞

前記投与は、網膜下注射、硝子体内注射によるか、又は前記ベクターを封入したデバイスを硝子体内に埋め込むことによるものである、＜30＞～＜67＞のいずれか一項に記載の方法。

40

＜69＞

前記投与は、前記ベクターを対象の網膜下、眼の後部、角膜、網膜、脈絡膜、RPE細胞、光受容体若しくは角膜上皮細胞、又はCE細胞に効果的に送達するその他の任意の投与方法によるものである、＜30＞～＜68＞のいずれか一項に記載の方法。

＜70＞

前記眼への投与は、血流を介した送達によって達成される、＜67＞に記載の方法。

＜71＞

50

前記眼細胞は、網膜色素上皮（RPE）細胞、光受容体細胞（PRC）、角膜上皮細胞（CEC）、脈絡膜内皮（CE）細胞、網膜細胞、角膜細胞、水晶体細胞、神経節細胞、視神経細胞、及び／又は脈絡膜細胞、並びに幹細胞（例えば、iPSC、ES細胞、MSC、成体幹細胞及び／又は組織特異的幹細胞が挙げられるがこれらに限定されない）に由来するこれらの種類の細胞からなる群から選択される、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 7 2 >

前記ベクターは、医薬的に許容される担体と、特定の投与経路に適した追加の成分とで製剤化されている、< 3 0 >～< 7 1 >のいずれか一項に記載の方法。

< 7 3 >

BCDを有する、BCDを発症するリスクがある、又は両アレルCYP4V2変異を有する対象を同定することをさらに含む、< 3 0 >～< 7 2 >のいずれか一項に記載の方法。

< 7 4 >

1又は複数の制御配列に作動可能に連結された、ヒトCYP4V2タンパク質をコードする配列番号2の核酸配列又は配列番号2の前記核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸分子を含むベクターを前記対象の眼細胞に送達することを、ヒト対象のクリスタリン網膜症（BCD）を治療又は予防する方法。

< 7 5 >

前記ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、< 7 4 >に記載の方法。

< 7 6 >

前記制御配列は、プロモーターである、< 7 4 >及び< 7 5 >に記載の方法。

< 7 7 >

ヒトCYP4V2タンパク質をコードする配列番号2の核酸配列又は配列番号2の前記核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸分子。

< 7 8 >

< 7 7 >に記載の核酸分子と、該核酸配列に作動可能に連結された1又は複数の制御配列とを含む発現カセット。

< 7 9 >

< 7 7 >の核酸分子又は< 7 8 >の発現カセットを含むベクター。

< 8 0 >

ウイルスベクターであるか、又は組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクター、組換え単純ヘルペスウイルスベクター、組換えバキュロウイルスベクター、組換えセンダイウイルスベクター、及び組換えレトロウイルスベクターからなる群から選択される、< 7 9 >に記載のベクター。

< 8 1 >

プラスミド又は非ウイルスベクターである、< 7 9 >に記載のベクター。

< 8 2 >

前記非ウイルスベクターは、裸の（naked）核酸、リボソーム（例えば、カチオン性又はアニオン性リボソーム）、デンドリマー、ナノ粒子、ポリマー（例えば、ポリプレックス）、脂質ポリマー系、固体脂質ナノ粒子、又はリボソームプロタミン／DNAリボプレックス（LPD）からなる群から選択される、< 8 1 >に記載のベクター。

< 8 3 >

< 7 7 >に記載の核酸分子及び／又は< 7 9 >～< 8 2 >のいずれか一項に記載のベクターを含む宿主細胞。

< 8 4 >

ウイルスベクター媒介遺伝子治療において、ウイルスベクターに対する免疫応答を低下させ、形質導入効率を維持し、ウイルスベクター及び／又は免疫抑制剤の用量を低下させ、及び／又は同じ遺伝疾患の様々な患者に対する治療効果を最大化する方法であって、

（a）抗原領域変異若しくは他の変異を有するバリエーション又は前記ウイルスベクターの

10

20

30

40

50

カプシドのバリエーションを作製することによる、前記遺伝子治療のための標的細胞型において十分な形質導入効率を持つ複数の組換えウイルスベクター（例えば、rAAV）のプールの確立を、前記疾患に関連する標的細胞（例えば、BCDに対するCYP4V2遺伝子治療におけるiPS-RPE又はRPE細胞系）において上記変異又はバリエーションが十分な形質導入効率を有することが確認された後で行うこと、

（b）遺伝子治療を必要とする対象における様々なウイルスベクター血清型及び／又はカプシド変異又はバリエーションに対する既存の中和抗ウイルスベクター抗体（NAb）を検出し、及び／又は上記対象に由来する患者特異的疾患標的細胞（例えば、iPS-RPE細胞）において様々なウイルスベクターを試験及び比較すること、

（c）前記ウイルスベクターのプールから、

（i）前記疾患標的細胞における十分な形質導入効率、

（ii）前記対象の既存のNAbとの低い交差反応性、及び／又は

（iii）前記対象の患者特異的疾患標的細胞（例えば、BCDのCYP4V2遺伝子治療における患者特異的iPS-RPE又はRPE細胞系）における良好な表現型レスキュー結果、

を有するウイルスベクターを選択することであって、

上記ウイルスベクターのプールは、様々な血清型及び／又はカプシド改変ウイルスベクター（例えば、カプシド変異体AAV及び／又はカプシドタンパク質バリエーションAAVが挙げられるがこれらに限定されない）を含む、

前記選択すること、

（d）（c）から選択された前記ウイルスベクターを前記対象への投与に使用すること、及び

（e）前記対象が遺伝子治療の投与を必要とするたびに、上記（b）～（d）（既存のNAbに関連する部分のみ）を繰り返すこと（例えば、限定されるものではないが、同じ臓器（例えば、眼又は反対側の眼）又は別の臓器へのフォローアップ投与）、を含む、方法。

< 85 >

ヒト網膜疾患の治療又は予防にAAVベクター媒介遺伝子治療を使用する方法であって、前記AAVベクターは、治療用導入遺伝子に作動可能に連結されたEFSプロモーター（配列番号35）及び／又はスモールポリA（配列番号36）を含む核酸分子、又は配列番号35との間で少なくとも90%の配列同一性を有するか、若しくは配列番号36との間で少なくとも85%の配列同一性を有する核酸分子、を含む、方法。

< 86 >

前記AAVベクターは、一本鎖AAVである、< 85 >に記載の方法。

< 87 >

前記AAVベクターは、自己相補的AAV（scAAV）である、< 85 >に記載の方法。

< 88 >

標的遺伝子に1又は複数の変異を含む、

（a）対象から提供された幹細胞、若しくは対象から提供された細胞からリプログラミングされた幹細胞、又は

（2）対象から提供された幹細胞に由来する細胞、若しくは対象から提供された細胞からリプログラミングされた幹細胞に由来する細胞、を含む、細胞系の組成物を含む細胞疾患モデル。

< 89 >

前記幹細胞は、人工多能性幹（iPS）細胞である、< 88 >に記載の組成物。

< 90 >

前記幹細胞は、胚性幹（ES）細胞、体性（又は成体）幹細胞、組織特異的幹細胞、又は間葉系幹細胞（MSC）である、< 88 >に記載の組成物。

< 91 >

前記対象から提供される細胞は、体細胞である、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 9 2 ＞

前記対象から提供される細胞は、皮膚細胞、線維芽細胞、又は血液細胞である、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 9 3 ＞

対象から提供される前記細胞は、皮膚線維芽細胞又は末梢血単核細胞（P B M C）である、＜ 8 8 ＞又は＜ 9 2 ＞に記載の組成物。

＜ 9 4 ＞

対象から提供される前記細胞は、尿細胞、腎上皮細胞、毛包、又は真皮乳頭細胞である、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 9 5 ＞

幹細胞に由来する前記細胞は、眼細胞である、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 9 6 ＞

前記眼細胞は、網膜色素上皮（R P E）細胞、光受容体細胞（P R C、例えば、桿体細胞、錐体細胞、及び光受容体前駆細胞）、網膜細胞、角膜細胞、角膜上皮細胞（C E C）、視神経細胞、水晶体細胞、脈絡膜内皮（C E）細胞、視神経細胞、又は脈絡膜細胞である、＜ 9 5 ＞に記載の組成物。

＜ 9 7 ＞

前記幹細胞に由来する細胞は、ニューロン細胞である、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 9 8 ＞

前記変異は、前記対象にとって内因性である、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 9 9 ＞

前記変異は、遺伝子編集又は遺伝子操作を介して人工的に導入される、＜ 8 8 ＞又は＜ 9 8 ＞に記載の組成物。

＜ 1 0 0 ＞

前記細胞系は、前記対象にとって内因性及び／又は外因性である複数の変異を含む、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 1 0 1 ＞

前記対象は、哺乳動物である、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 1 0 2 ＞

前記対象は、ヒトである、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 1 0 3 ＞

前記標的遺伝子は、表 4 に示す遺伝子を含む、＜ 8 8 ＞に記載の組成物。

＜ 1 0 4 ＞

前記標的遺伝子は、

変異若しくは欠陥を有する、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子、又は

不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、

10

20

30

40

50

NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子を含む、＜88＞に記載の組成物。

＜105＞

前記標的遺伝子は、CYP4V2である、＜88＞に記載の組成物。

10

＜106＞

前記細胞系は、iPS細胞を含む、＜105＞に記載の組成物。

＜107＞

前記細胞系は、iPS-RPE細胞を含む、＜105＞に記載の組成物。

＜108＞

前記細胞系は、iPS-光受容体(iPS-PRC)細胞、iPS-角膜上皮細胞(iPS-CEC)、iPS-脈絡膜内皮(CE)細胞、iPS-角膜細胞、iPS-脈絡膜細胞、iPS-視神経細胞、iPS-眼細胞、又はiPS-ニューロン細胞を含む、＜105＞に記載の組成物。

20

＜109＞

前記細胞系におけるCYP4V2変異は対象にとって内因性である、＜88＞又は＜105＞～＜108＞のいずれか一項に記載の組成物。

＜110＞

前記対象は、CYP4V2遺伝子又はCYP4V2遺伝子のオーソログに病的変異を有する、＜88＞又は＜109＞に記載の組成物。

＜111＞

前記対象は、表1に示す少なくとも1つのホモ接合性変異又は複合した2つのヘテロ接合性変異を有する、＜88＞又は＜109＞に記載の組成物。

＜112＞

前記対象は、遺伝性網膜変性(IRD)又は網膜色素変性症(RP)を有する、＜88＞に記載の組成物。

30

＜113＞

前記対象は、クリスタリン網膜症(BCD; Bietti結晶性角膜網膜ジストロフィー、Bietti結晶性網膜症、Bietti網膜ジストロフィーとしても知られる)を有するか、又はBCDを発症するリスクがある、＜88＞に記載の組成物。

＜114＞

前記細胞系は、前記対象にとって外因性であり、遺伝子編集又は遺伝子操作を介して人工的に導入される少なくとも1つのCYP4V2変異を含む、＜88＞又は＜105＞に記載の組成物。

＜115＞

前記細胞系は、

iPS細胞、ES細胞、MSC、組織特異的幹細胞、若しくは成体幹細胞、又はiPS細胞、ES細胞、MSC、組織特異的幹細胞、若しくは成体幹細胞に由来する、RPE細胞、光受容体細胞、角膜上皮細胞、脈絡膜内皮(CE)細胞若しくは脈絡膜細胞、を含む、＜88＞又は＜114＞に記載の組成物。

40

＜116＞

BCD患者の細胞若しくは細胞系に由来する、又は人工的に作製された両アレルCYP4V2変異を有する細胞若しくは細胞系に由来する、iPS細胞若しくはiPS細胞系又はiPS-RPE細胞若しくはiPS-RPE細胞系を含む、BCDヒト細胞モデル組成物又はCYP4V2機能不全細胞モデル組成物。

50

< 1 1 7 >

前記細胞系は、健康な対照の対応する細胞系と比較して、以下の化合物群の1又は複数の化合物について異常な生化学的プロファイルを有するか、異常なR P E機能、又はより高い細胞萎縮、細胞変性、若しくは細胞死レベルを有する、< 8 8 >又は< 1 0 5 >～< 1 1 6 >のいずれか一項に記載の組成物。

- (i) 脂肪酸、
- (i i) セラミド、
- (i i i) スフィンゴミエリン、
- (i v) スフィンゴシン、
- (v) スフィンガニン、
- (v i) ヒドロキシ脂肪酸、
- (v i i) コルチコステロイド、又は
- (v i i i) タンパク質 (C Y P 4 V 2 以外)

10

< 1 1 8 >

前記細胞系は、健康な対照の対応する細胞系と比較して、表2に示す1又は複数の化合物について異常な生化学的プロファイルを有する、< 8 8 >又は< 1 0 5 >～< 1 1 7 >のいずれか一項に記載の組成物。

< 1 1 9 >

患者の細胞系（又はその疾患を引き起こす遺伝子の外因性変異を含む、遺伝子編集又は遺伝子操作された細胞系）と健康な対照とにおける細胞生存率レベルを評価及び比較することを含む、疾患細胞モデルにおける異常又は表現型を発見する方法。

20

< 1 2 0 >

患者の細胞系（又はその疾患を引き起こす遺伝子の外因性変異を含む、遺伝子編集又は遺伝子操作された細胞系）と健康な対照とにおけるR P E機能レベル（例えば、食作用活性、経上皮耐性）を評価及び比較することを含み、

前記細胞系はR P E細胞系である（幹細胞由来のR P E細胞系でもよい）、疾患細胞モデルにおける異常又は表現型を発見する方法。

< 1 2 1 >

細胞系間の比較が、光への暴露なしで行われる、< 1 1 9 >又は< 1 2 0 >に記載の方法。

30

< 1 2 2 >

細胞系間の比較が、光への暴露後に行われる、< 1 1 9 >又は< 1 2 0 >に記載の方法。

< 1 2 3 >

細胞系間の比較が、青色光への暴露後に行われる、< 1 1 9 >、< 1 2 0 >、又は< 1 2 2 >に記載の方法。

< 1 2 4 >

細胞生存率が、死細胞／生細胞比、病気の細胞／健康な細胞の比若しくはこれらに類似の比；又は死細胞／全体の細胞若しくは生細胞／全体の細胞の百分率によって測定される、< 1 1 9 >、< 1 2 1 >、< 1 2 2 >、又は< 1 2 3 >に記載の方法。

< 1 2 5 >

40

患者の細胞系（又はその疾患を引き起こす遺伝子の外因性変異を含む、遺伝子編集又は遺伝子操作された細胞系）と健康な対照との間で、1又は複数の化合物のレベルを評価及び比較することを含み、

前記1又は複数の化合物は以下の群から選択される、疾患細胞モデルにおける異常又は表現型を発見する方法。

- (i) 脂肪酸、
- (i i) セラミド、
- (i i i) スフィンゴミエリン、
- (i v) スフィンゴシン、
- (v) スフィンガニン、

50

- (v i) ヒドロキシ脂肪酸、
- (v i i) コルチコステロイド、及び／又は
- (v i i i) タンパク質

< 1 2 6 >

評価される化合物のうち 1 又は複数は、表 2 に示されている、< 1 2 5 > に記載の方法。

< 1 2 7 >

化合物レベルの識別及び／又は評価が、LC-MS、LC-MS/MS、GC-MS、GC-MS/MS、及び／又はFIA-MS/MSを使用して実施される、< 1 2 5 > 又は< 1 2 6 > に記載の方法。

< 1 2 8 >

前記疾患細胞モデルは、表 4 に示される変異又は欠陥を有する遺伝子を少なくとも 1 つ含む、< 1 1 9 >、< 1 2 0 >、又は< 1 2 5 > の方法。

< 1 2 9 >

前記疾患細胞モデルは、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、又はCYP46Aの遺伝子の中からの、変異又は欠陥を有する遺伝子を含む、< 1 1 9 >、< 1 2 0 >、又は< 1 2 5 > の方法。

< 1 3 0 >

BCD患者由来のiPS-RPE細胞系に由来する細胞、又は人工の遺伝子編集若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有するCYP4V2遺伝子を含んでいるiPS-RPE細胞系に由来する細胞を、試験薬に接触させることと、

上記試験薬による接触前と比較した、表 2 に示す 1 又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥CYP4V2核酸配列の増加；前記細胞内のCYP4V2ポリペプチドの量の増加；及び／又は細胞構造、細胞形態若しくは細胞機能の改善、又は細胞生存率の改善、について前記細胞を評価することと、
を含み、

上記試験薬による処理前と比較した、表 2 に示す 1 又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥CYP4V2核酸配列の増加；前記細胞内のCYP4V2ポリペプチドの量の増加；及び／又は細胞構造、細胞形態、細胞機能、又は細胞生存率の改善、は、試験薬がBCDに対して治療効果を有することの指標となり、

細胞系間の比較は、光への暴露後及び／又は光への暴露なしで行うことができる、BCDに対する治療効果について試験薬をスクリーニングする方法。

< 1 3 1 >

前記試験薬は、核酸又はそのアナログ、核酸配列を含む又はポリペプチドをコードするベクター、ポリペプチド又はそのアナログ、抗体、化学物質、小分子、及び／又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、< 1 3 0 > に記載の方法。

< 1 3 2 >

前記細胞は、PCR技術、イムノアッセイ、シークエンシング、生化学アッセイ、機能アッセイ、細胞生存率アッセイ、顕微鏡検査、又はそれらの組み合わせを用いて評価される、< 1 3 0 > に記載の方法。

< 1 3 3 >

BCD患者由来のiPS-RPE細胞系からの複数の細胞試料、又は人工の遺伝子編集

10

20

30

40

50

若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有するCYP4V2遺伝子を含んでいるiPS-RPE細胞系からの複数の細胞試料を、様々な製剤、ベクター、又はコンストラクトに製剤化又はパッケージングされた試験薬に接触させることと、

上記試験薬による処理前と比較した、及び／又は同じ試験薬ではあるものの異なる製剤、ベクター、又はコンストラクトに製剤化又はパッケージングされた試験薬で処理された細胞試料と比較した、表2に記載の1又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥CYP4V2核酸配列の増加；前記細胞内のCYP4V2ポリペプチドの量の増加；細胞構造、細胞形態、細胞機能、又は細胞生存率の改善；及び／又は細胞耐性若しくは細胞死、について前記細胞試料を評価することによって、上記製剤、ベクター、又はコンストラクトの効率又は有効性を決定及び比較することと、
を含み、

10

前記細胞は、PCR技術、免疫アッセイ、シーケンシング、生化学アッセイ、細胞生存率アッセイ、顕微鏡検査、又はそれらの組み合わせを用いて評価され、

細胞系間の比較は、光への暴露後及び／又は光への暴露なしで行うことができる、BCDの試験薬を含む製剤、ベクター、又はコンストラクトの有効性又は効率をスクリーニングする方法。

<134>

BCD患者由来のiPS-RPE細胞系からの複数の細胞試料、又は人工の遺伝子編集若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有するCYP4V2遺伝子を含んでいるiPS-RPE細胞系からの複数の細胞試料を、細胞試料ごとに異なる用量で、試験薬に接触させることと、

20

上記試験薬による処理前と比較した、及び／又は同じ試験薬ではあるものの異なる用量の試験薬で処理された細胞試料と比較した、表2に記載の1又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥CYP4V2核酸配列の増加；前記細胞内のCYP4V2ポリペプチドの量の増加；細胞構造、細胞形態、細胞生存率若しくは細胞機能の改善；及び／又は細胞耐性若しくは細胞死、について前記細胞試料を評価することによって、異なる用量の有効性及び安全性を決定及び比較し、それにより適切な用量範囲を決定することと、
を含み、

前記細胞は、PCR技術、免疫アッセイ、シーケンシング、生化学アッセイ、機能アッセイ、細胞生存率アッセイ、顕微鏡検査、又はそれらの組み合わせを用いて評価され、

30

細胞系間の比較は、光への暴露後及び／又は光への暴露なしで行うことができる、BCDのための試験薬の効果的かつ安全な投与量範囲をスクリーニングする方法。

<135>

網膜又は網膜細胞に治療薬を送達するための送達デバイス又は送達方法の有効性又は効率をスクリーニング又は評価する方法であって、

(i) BCD患者由来のiPS-RPE細胞系からの細胞試料、又は人工の遺伝子編集若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有するCYP4V2遺伝子を含んでいるiPS-RPE細胞系からの細胞試料を、前記送達デバイス又は送達方法を使用せずに、試験薬に接触させることと、

(ii) BCD患者由来のiPS-RPE細胞系からの別個の細胞試料、又は人工の遺伝子編集若しくは遺伝子操作の結果として変異若しくは欠陥を有するCYP4V2遺伝子を含んでいるiPS-RPE細胞系からの別個の細胞試料を、前記送達デバイス又は送達方法を使用して、(i)と同じ用量の前記試験薬に接触させることと、

40

(iii) 上記試験薬による処理前と比較した、及び／又は同じ用量の同じ試験薬による処理であって前記送達デバイス又は送達方法を使用していない処理と比較した、表2に示す1又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥CYP4V2核酸配列の増加；前記細胞内のCYP4V2ポリペプチドの量の増加；細胞構造、細胞形態若しくは細胞機能の改善；細胞耐性若しくは細胞死；及び／又は前記細胞内の前記試験薬のレベル、について(i)及び(ii)からの前記細胞試料を評価及び比較することによって、上記送達デバイス又は送達方法の有効性又は効率を決定及び比較することと、

50

を含み、

前記細胞は、P C R技術、イムノアッセイ、シーケンシング、生化学アッセイ、機能アッセイ、細胞生存率、顕微鏡検査、又はそれらの組み合わせを用いて評価され、

細胞系間の比較は、光への暴露後及び／又は光への暴露なしで行うことができる、方法。

< 1 3 6 >

前記網膜細胞は、R P E細胞である、< 1 3 5 >に記載の方法。

< 1 3 7 >

本願の遺伝子編集療法に係る項又はR N Pに係る項のいずれか1つによって患者の細胞系の変異を遺伝的に修正することを含む、同質遺伝子対照を生成する方法。

< 1 3 8 >

インビトロで患者特異的i P S－眼細胞モデルで決定された最適用量レベル（例えば、インビトロでの遺伝子治療のM O Iとして示される）に、インビボ治療の標的となる眼細胞（例えば、R P E細胞、光受容体細胞、又はR P E細胞と光受容体細胞）の推定数を乗じることにより、インビボで使用するための遺伝子治療ベクターの用量レベル（例えば、G C又はg p）を得ること、

を含み、

上記ベクターの用量レベルが、乗数（例えば、1～10（例えば、網膜下注射の場合は1～5、硝子体内注射の場合は5～10）；適用される前記乗数に影響を与える他の要因としては、標的領域のサイズ及び治療される対象（例えば、治療対象の年齢、体重、並びに疾患進行度、及び状態、並びに潜在的な免疫反応（すなわち、既存のN A b）、治療の標的となる眼細胞の位置と密度）が挙げられる）によって調整されることによって、インビボ治療の治療有効用量範囲を提案し、該治療有効用量範囲は臨床試験で確認又はさらに改良可能である、

患者特異的i P S－眼細胞を使用して、インビボでの治療の治療有効量を評価及び提案する方法。

< 1 3 9 >

前記方法は、個々の患者のインビボでの治療に使用される個別化した最適用量を評価又は提案するために使用される、< 1 3 8 >に記載の方法。

< 1 4 0 >

前記疾患は、遺伝性網膜障害（I R D）又は網膜色素変性症（R P）である、< 1 3 8 >又は< 1 3 9 >に記載の方法。

< 1 4 1 >

前記疾患はB C Dであり、

前記i P S－眼細胞はi P S－R P E細胞であり、

インビボでの治療の標的となる前記眼細胞はR P E細胞である、

< 1 3 8 >又は< 1 3 9 >に記載の方法。

< 1 4 2 >

（a）C Y P 4 V 2遺伝子の核酸配列、又はC Y P 4 V 2遺伝子の隣接100bp以内の核酸配列を（「標的配列」を）標的とするC R I S P RガイドRNA、及び

（b）機能的C R I S P R関連タンパク質（C a s）を含む組成物。

< 1 4 3 >

（c）C Y P 4 V 2遺伝子又はその一部の修正、破壊、又は置換のための、C Y P 4 V 2遺伝子の野生型配列又は機能的配列の全部又は一部を含むドナー核酸配列、をさらに含む、< 1 4 2 >に記載の組成物。

< 1 4 4 >

前記組成物の1又は複数の成分は、該成分をコードするDNA分子、該成分をコードするmRNA分子、RNA分子、ポリペプチド、及び／又はリボ核タンパク質（R N P）、又はタンパク質－RNA複合体の形態で提供される、< 1 4 2 >又は< 1 4 3 >に記載の

10

20

30

40

50

組成物。

< 1 4 5 >

前記組成物の2以上の成分は、別々の分子にある又は1つの分子若しくは1つの複合体に組み合わされているか、別々のベクターにある又は1つのベクターに組み合わされているか、1又は複数の核酸複合体にあるか、1又は複数のRNP複合体にある、< 1 4 2 >又は< 1 4 3 >に記載の組成物。

< 1 4 6 >

前記ドナー核酸配列は、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチド (ssODN) 又はベクター中に提供される、< 1 4 3 >に記載の組成物。

< 1 4 7 >

前記ベクターがプラスミド、組換えAAVベクター、組換えレンチウイルスベクター、及び／又はそれらの組み合わせである、< 1 4 2 >～< 1 4 6 >のいずれか一項に記載の組成物。

< 1 4 8 >

< 1 4 2 >～< 1 4 7 >のいずれか一項に記載の組成物を含む病的CYP4V2変異を有する細胞を含む組成物。

< 1 4 9 >

(a) 前記CRISPRガイドRNAは、

(i) 標的遺伝子(「標的遺伝子」)中又は標的遺伝子の隣接100bp以内にある標的配列に相補的であるプロトスペーサーエレメント配列、及びtrans-activating crRNA (tracrRNA)の相補的な領域に対応する配列、を含むCRISPR RNA (crRNA)と、

(ii) 前記crRNAの対応する領域に相補的な領域、及びCRISPR関連タンパク質9 (Cas9)と相互作用する配列、を含むtracrRNAと、を含み、

(b) 前記機能的CRISPR関連タンパク質はCas9を含む、

< 1 4 2 >～< 1 4 8 >のいずれか一項に記載の組成物。

< 1 5 0 >

前記プロトスペーサーエレメントは、約20塩基、約19塩基、約21塩基、約19～21塩基、約18～22塩基、又は約16～24塩基である、< 1 4 9 >に記載の組成物。

< 1 5 1 >

前記crRNA及び前記tracrRNAは、別々の分子内にある、< 1 4 9 >又は< 1 5 0 >に記載の組成物。

< 1 5 2 >

前記crRNA及び前記tracrRNAは、シングルガイドRNA (sgRNA) において組み合わされている、< 1 4 9 >又は< 1 5 0 >に記載の組成物。

< 1 5 3 >

前記sgRNAは、約88～150bpである、< 1 5 2 >に記載の組成物。

< 1 5 4 >

前記Cas9が、ストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes) (SpCas9)、SpCas9ニッカーゼ (Cas9n D10A)、SpCas9 (D1135E)、eSpCas9、SpCas9-HF1、SpCas9 VREER、SpCas9 VQQR、SpCas9 EQQR、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) (SaCas9)、ナイセリア・メニンギチジス (Neisseria Meningitidis)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae)、カンピロバクター・コリ (Campylobacter coli)、カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni)、ストレプトコッカス・ミュータンズ (Streptococcus mutans)、パストツレラ・ムルトシ

10

20

30

40

50

ダ (*Pasteurella multocida*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、バチルス・スミシー (*Bacillus smithii*)、トレポネーマ・デンティコーラ (*Treponema denticola*)、マイコプラズマ・カニス (*Mycoplasma canis*)、及びエンテロコッカス・ファエカリス (*enterococcus faecalis*) から選択される Cas9 オーソログ又は変異体 Cas9 を含む、＜149＞～＜153＞のいずれか一項に記載の組成物。

＜155＞

(a) 前記 CRISPR ガイド RNA は、標的遺伝子中又は標的遺伝子の隣接 100 bp 以内にある標的配列に相補的であるプロトスペーサーエレメント配列を含む crRNA を含む、

10

(b) 前記機能的 CRISPR 関連タンパク質は Cpf1 を含む、

＜142＞～＜148＞のいずれか一項に記載の組成物。

＜156＞

前記 CRISPR 関連タンパク質である Cas9 又は Cpf1 は、1、2、3 又はそれ以上の核局在化配列 (NLS) を N 末端及び／又は C 末端にさらに含む、及び／又は、非限定的な例として GFP 又は EGFP が挙げられる選択マーカーをさらに含む、＜142＞～＜155＞のいずれか一項に記載の組成物。

＜157＞

前記プロトスペーサーエレメント配列は、配列番号 48～52 からなる群から選択されるか、配列番号 48～52 のいずれか一つとの間で少なくとも 85% の配列同一性を有し、CYP4V2 遺伝子の c. 802-8__810del17insGC 変異を標的とするために、NGG をプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) とする Cas タンパク質と共に使用される、＜142＞に記載の組成物。

20

＜158＞

前記ドナー核酸配列は、配列番号 56 及び 57 からなる群から選択されるか、配列番号 56 及び 57 のいずれか又はその相補的な配列との間で少なくとも 90% の配列同一性を有し、CYP4V2 遺伝子の c. 802-8__810del17insGC 変異を修正、破壊、又は置換するために使用される、＜142＞、＜143＞、又は＜157＞に記載の組成物。

30

＜159＞

変異した CYP4V2 遺伝子を持つ対象又は細胞における BCD を治療又は予防する方法であって、

(i) シークエンシングによって前記対象又は細胞における病的変異を特定すること、

(ii) 前記変異に関与する最初のヌクレオチドの上流約 100 bp から、前記変異に関与する最後のヌクレオチドの下流約 100 bp までに及ぶ領域内の Cas 関連 PAM 部位を見つけること、

(iii) (ii) で特定された各 PAM 部位に関連する CYP4V2 配列を標的とする様々なプロトスペーサーエレメント配列を特定すること、

(iv) (iii) で特定されたプロトスペーサーエレメント配列を含む各 CRISPR ガイド RNA の活性レベルと、オフターゲット編集のプロファイルとを、前記プロトスペーサーエレメント配列及び PAM について評価すること、

40

(v) (iv) に基づいて 1 又は複数の CRISPR ガイド RNA 設計を選択すること、

(vi) 標的 CYP4V2 変異を修正、破壊、又は置換するための相同組換え修復 (HDR) に基づく 1 又は複数のドナー核酸配列を設計すること、

(vii) 組成物に関する＜1＞～＜18＞で提供される、CRISPR ガイド RNA、Cas、及びドナー核酸配列を構築すること、

(viii) 所望により、活性レベル及び／又はオフターゲット編集プロファイルを評価するために、前記対象から単離された細胞；前記対象由来の iPS 細胞、若しくは前記対象由来の幹細胞から分化した細胞；又は前記対象から単離されたゲノム DNA、におけ

50

る (v i i) の成分を検証し、さらに選択すること、及び

(i x) リボ核タンパク質又はタンパク質-RNA 複合体、ベクター、タンパク質、核酸分子、ナノ粒子、リポソーム、ミセル、ウィロソーム、核酸複合体、及び／又はそれらの組み合わせからなる群から選択される送達システムによって、前記対象又は前記細胞に (v i i i) の成分を投与することであって、前記送達は、エレクトロポレーションにより、若しくは、脂質媒介トランスフェクション、ヌクレオフェクション、ウイルス形質導入若しくはインジェクション、又はそれらの組み合わせによって行われる、前記投与すること、

を含む、変異した C Y P 4 V 2 遺伝子を持つ対象又は細胞における B C D を治療又は予防する方法。

< 1 6 0 >

(i) 配列番号 4 8 ~ 5 2 の 1 つから選択されるか、配列番号 4 8 ~ 5 2 の配列の 1 つとの間で少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するプロトスペーサーエレメント配列を含む、C R I S P R ガイド RNA、

(i i) 配列番号 5 6 及び 5 7 の 1 つから選択されるか、配列番号 5 6 及び 5 7 の 1 つ又はその相補的な配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するドナー核酸配列、及び

(i i i) C a s 9 タンパク質 (例示的な配列を配列番号 5 8 に示す) (所望により、1、2、3 又はそれ以上の N L S、非限定的な例として G F P 又は E G F P が挙げられる選択マーカーを含む)、

を含む、インビボで対象における又はインビトロで細胞における C Y P 4 V 2 遺伝子の c . 8 0 2 - 8 _ _ 8 1 0 d e l 1 7 i n s G C 変異を修正又は置換するための遺伝子編集組成物。

< 1 6 1 >

前記プロトスペーサーエレメント配列の前に所望によるヌクレオチド G (配列番号 5 9) が付加される、< 1 6 0 > に記載の組成物。

< 1 6 2 >

前記 C R I S P R ガイド RNA は、c r RNA (例示的な配列 (ただし、5' プロトスペーサーエレメント配列は含めていない) を配列番号 5 3 に示す)、及び t r a c r RNA (例示的な配列を配列番号 5 4 に示す) を含む、

前記プロトスペーサーエレメント配列は前記 c r RNA に含まれる、

< 1 6 0 又は < 1 6 1 > に記載の組成物。

< 1 6 3 >

前記 C R I S P R ガイド RNA は、前記プロトスペーサーエレメント配列を含むシングルガイド RNA (s g RNA) (例示的な s g RNA 配列 (ただし、5' プロトスペーサーエレメント配列は含めていない) を配列番号 5 5 に示す) を含む、< 1 6 0 > ~ < 1 6 2 > のいずれか一項に記載の組成物。

< 1 6 4 >

(i)、(i i)、及び (i i i) の 1 又は複数の成分は、当該成分をコードする D N A 分子、当該成分をコードする m R N A 分子、核酸分子、ベクター、RNA 分子、ポリペプチド、リボ核タンパク質 (R N P)、又はタンパク質-RNA 複合体、及び／又はそれらの組み合わせの形態で提供される、< 1 6 0 > ~ < 1 6 3 > のいずれか一項に記載の組成物。

< 1 6 5 >

対象における眼の疾患を治療又は予防する方法であって、

前記疾患は C Y P 4 V 2 遺伝子の病的な遺伝的又はエピジェネティックな変化と関連しており、

前記方法は、前記対象に細胞組成物を投与することを含み、

前記細胞組成物は、幹細胞由来の、網膜色素上皮 (R P E) 細胞、光受容体又は光受容体前駆細胞 (P R C)、角膜上皮細胞 (C E C)、脈絡膜内皮 (C E) 細胞、及び／又はその他の眼細胞若しくはその他の細胞を含む、

10

20

30

40

50

対象における眼の疾患を治療又は予防する方法。

< 1 6 6 >

前記幹細胞は、胚性幹（E S）細胞、i P C細胞、M S C、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である、< 1 6 5 >に記載の方法。

< 1 6 7 >

前記幹細胞は、B C Dを有しない又は病的C Y P 4 V 2 遺伝子を有しない1又は複数の対象からのものであるか、又はB C Dを有しない又は病的C Y P 4 V 2 遺伝子を有しない1又は複数の対象に由来するものである、< 1 6 5 >に記載の方法。

< 1 6 8 >

前記幹細胞は、C Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する1又は複数の対象からのものであるか、又はC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する1又は複数の対象に由来するものである、< 1 6 5 >に記載の方法。

< 1 6 9 >

前記対象は、ヒト対象である、< 1 6 5 >～< 1 6 8 >のいずれか一項に記載の方法。

< 1 7 0 >

（a）B C Dに罹患したかC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞、若しくはB C Dに罹患したかC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単離された幹細胞、又は

（2）B C Dに罹患したかC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単離された幹細胞から分化した細胞、若しくはB C Dに罹患したかC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞から分化した細胞、を含む細胞組成物。

< 1 7 1 >

前記対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞は、i P C細胞である、< 1 7 0 >に記載の組成物。

< 1 7 2 >

前記i P S細胞は、前記対象の体細胞からリプログラミングされる、< 1 7 0 >に記載の組成物。

< 1 7 3 >

前記i P S細胞は、皮膚細胞、血液細胞、尿細胞、有毛細胞、線維芽細胞、末梢血単核細胞（P B M C）、腎上皮細胞、毛包、又は真皮乳頭細胞からリプログラミングされる、< 1 7 0 >に記載の組成物。

< 1 7 4 >

前記対象から単離された幹細胞は、M S C、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である、< 1 7 0 >に記載の組成物。

< 1 7 5 >

前記幹細胞から分化した細胞は、眼細胞である、< 1 7 0 >に記載の組成物。

< 1 7 6 >

前記幹細胞から分化した細胞は、R P E細胞、P R C、網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、C E C、又はC E細胞である、< 1 7 0 >又は< 1 7 5 >に記載の組成物。

< 1 7 7 >

前記幹細胞から分化した細胞は、i P S－R P E、i P S－P R C、i P S－C E C、又はi P S－C E細胞である、< 1 7 0 >に記載の組成物。

< 1 7 8 >

（i）i P S Cへリプログラミングするために使用される、前記B C Dに罹患したかC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞、

（i i）前記B C Dに罹患したかC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単離された幹細胞、若しくは前記B C Dに罹患したかC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞からリプログラミングされたi P S細胞、又は

（i i i）前記B C Dに罹患したかC Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単

10

20

30

40

50

離された幹細胞から分化した細胞、若しくは前記 B C D に罹患したか C Y P 4 V 2 遺伝子に病的変異を有する対象から単離された細胞からリプログラミングされた i P S 細胞から分化した細胞、
は、変異 C Y P 4 V 2 遺伝子の影響を緩和するために遺伝的に修復される、＜ 1 7 0 ＞に記載の組成物。

＜ 1 7 9 ＞

遺伝子修復は、遺伝子導入療法によって行われる、＜ 1 7 8 ＞に記載の組成物。

＜ 1 8 0 ＞

遺伝子修復は、遺伝子治療に関する項のいずれか一項に記載の任意の組成物又は方法を使用することにより、遺伝子導入療法によって行われる、＜ 1 7 8 ＞に記載の組成物。

＜ 1 8 1 ＞

遺伝子修復は、遺伝子編集療法によって行われる、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜ 1 8 2 ＞

遺伝子修復は、C R I S P R 遺伝子治療に関する項のいずれか一項に記載の任意の組成物又は方法を使用することにより、遺伝子編集療法によって行われる、＜ 1 8 1 ＞に記載の組成物。

＜ 1 8 3 ＞

C Y P 4 V 2 自家細胞組成物に関連する項のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含み、

前記細胞組成物は、前記対象の幹細胞由来の、網膜色素上皮（R P E）細胞、光受容体又は光受容体前駆細胞（P R C）、角膜上皮細胞（C E C）、脈絡膜内皮（C E）細胞、及び／又はその他の眼細胞若しくはその他の細胞を含む遺伝的に修復された細胞を含む、B C D に罹患したか C Y P 4 V 2 遺伝子に病的な遺伝的又はエピジェネティックな変化を有する対象における眼の疾患を治療又は予防する方法。

＜ 1 8 4 ＞

前記幹細胞は、i P C 細胞、M S C、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である、＜ 1 8 3 ＞に記載の方法。

＜ 1 8 5 ＞

前記 i P S 細胞は、転写因子 O C T 4、S O X 2、K L F 4、及び c - M Y C のうち 1 又は複数を使用してリプログラミングされる、＜ 1 8 4 ＞に記載の方法。

＜ 1 8 6 ＞

前記遺伝的に修復された細胞は、遺伝子修復を行う前と比較した場合の、表 2 に示す 1 又は複数の化合物のレベルの正常化；前記細胞内の非欠陥 C Y P 4 V 2 核酸配列の増加；前記細胞内の機能的 C Y P 4 V 2 ポリペプチドの量の増加；及び／又は細胞構造、細胞形態、細胞生存率、又は細胞機能の改善、の 1 又は複数を示す、先行項のいずれか一項に記載の方法。

＜ 1 8 7 ＞

投与される細胞の量は、1 回の投与で約 1, 0 0 0 ～約 1 0 0 0 万個の細胞である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

＜ 1 8 8 ＞

投与は注射、網膜下注射、又は硝子体内注射による、先行項のいずれか一項に記載の方法。

＜ 1 8 9 ＞

投与は、前記対象の眼の網膜下の場所、後部、又は角膜に細胞を効果的に送達するその他の任意の投与方法による、先行項のいずれか一項に記載の方法。

＜ 1 9 0 ＞

細胞懸濁液の注射によって前記細胞が投与される、先行項のいずれか一項に記載の方法。

＜ 1 9 1 ＞

前記細胞は、シート、マトリックス、足場、組織、又は三次元（3 D）網膜構造の一部

10

20

30

40

50

として投与される、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 1 9 2 >

前記 R P E 細胞は、天然及び／又は合成の足場を使用して投与され、機能的な R P E 単層を生成する、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 1 9 3 >

前記対象はヒト対象である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 1 9 4 >

(a) 変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞、又は、

変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全又は部分的な機能又は活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された幹細胞、又は

(2) 変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された幹細胞から分化した細胞、又は

変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞から分化した細胞、を含む細胞組成物。

< 1 9 5 >

前記対象から単離された細胞からリプログラミングされた幹細胞は、i P S 細胞である、< 1 9 4 >に記載の組成物。

< 1 9 6 >

前記 i P S 細胞は、前記対象の体細胞からリプログラミングされる、< 1 9 5 >に記載の組成物。

< 1 9 7 >

前記 i P S 細胞は、皮膚細胞、血液細胞、尿細胞、有毛細胞、線維芽細胞、末梢血単核細胞 (P B M C)、腎上皮細胞、毛包、又は真皮乳頭細胞からリプログラミングされる、< 1 9 5 >又は< 1 9 6 >に記載の組成物。

< 1 9 8 >

前記対象から単離された幹細胞は、M S C、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である、< 1 9 4 >に記載の組成物。

< 1 9 9 >

前記遺伝子は眼の発達又は機能に関与する、及び／又は前記遺伝子の変異が眼疾患を引き起こすか眼疾患を引き起こす危険因子である、< 1 9 4 >に記載の組成物。

< 2 0 0 >

前記遺伝子は神経の発達又は機能に関与する、及び／又は前記遺伝子の変異が神経変性疾患を引き起こすか神経変性疾患を引き起こす危険因子である、< 1 9 4 >に記載の組成物。

< 2 0 1 >

前記遺伝子は、シトクロム P 4 5 0 遺伝子である、< 1 9 4 >に記載の組成物。

< 2 0 2 >

前記遺伝子は表 4 に示す 1 つの遺伝子である、< 1 9 4 >に記載の組成物。

< 2 0 3 >

前記遺伝子は、

変異若しくは欠陥を有する、C Y P 4 V 2、C Y P 1 B 1、M Y O 7 A、D F N B 3 1、U S H 1 C、U S H 1 G、C D H 2 3、P C D H 1 5、C L R N 1、A C O 2、A F G 3 L 2、A T X N 2、A U H、C 1 2 o r f 6 5、C I S D 2、F O X C 1、F O X F 2、L T B P 2、M T P A P、M Y O C、N D U F S 1、N R 2 F 1、O P A 1、O P A 3

10

20

30

40

50

、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子、又は

不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子、を含む、＜194＞に記載の組成物。

＜204＞

前記幹細胞から分化した細胞は、任意の種類の細胞である、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜205＞

前記幹細胞から分化した細胞は、眼細胞である、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜206＞

前記幹細胞から分化した細胞は、RPE細胞、PRC、網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、CEC、CE細胞、又は視神経細胞である、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜207＞

前記幹細胞から分化した細胞は、iPS-RPE、iPS-PRC、iPS-CEC、又はiPS-CE細胞である、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜208＞

前記幹細胞から分化した細胞は、ニューロンである、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

＜209＞

(i) iPSCヘリプログラミングするために使用される、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された前記細胞、

(ii) 変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された前記幹細胞、又は

変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞からリプログラミングされたiPS細胞、又は

(iii) 変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された幹細胞から分化した前記細胞、又は

変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象から単離された細胞からリプログラミングされたiPS細胞、

は、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子の影響を緩和するために遺伝的に修復される、

10

20

30

40

50

先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 1 0 >

遺伝子修復は、遺伝子導入療法によって行われる、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 1 1 >

遺伝子修復は、遺伝子治療に関する項のいずれか一項に記載の任意の組成物又は方法を使用することにより、遺伝子導入療法によって行われる、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 1 2 >

遺伝子修復は、遺伝子編集療法を介して行われる、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 1 3 >

遺伝子修復は、C R I S P R 遺伝子編集療法に関する項のいずれか一項に記載の任意の組成物又は方法を使用することにより、遺伝子編集療法によって行われる、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 1 4 >

自家細胞組成物に関連する項のいずれか一項に記載の細胞組成物を対象に投与することを含み、

前記細胞組成物は、前記対象の幹細胞由来の、網膜色素上皮（R P E）細胞、光受容体又は光受容体前駆細胞（P R C）、角膜上皮細胞（C E C）、ニューロン、脈絡膜内皮（C E）細胞、及び／又は他の眼細胞若しくは他の細胞を含む、遺伝的に修復された細胞を含み、

前記細胞組成物の変異又は欠陥を有する遺伝子が遺伝的に修復済みである、

表 4 に記載の、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、によって引き起こされる疾患に罹患した対象における疾患を治療又は予防する方法。

< 2 1 5 >

（i）眼疾患に罹患した対象からの細胞を準備すること、

（i i）前記対象からの前記細胞に多能性を誘導して i P S C を生成すること、

（i i i）遺伝子編集療法により、前記対象に由来する前記 i P S C における、表 4 に示され変異又は欠陥を有する遺伝子の 1 又は複数の変異を遺伝的に修復すること、

（i v）必要に応じて、置換移植のために前記 i P S C を眼細胞又は他の細胞に分化させること、

（v）工程（i i i）の代わりに、遺伝子導入療法によって前記 i P S 由来細胞を遺伝的に修復すること、

（v i）前記 i P S 由来細胞を前記対象に導入し、それにより、変異又は欠陥を有する遺伝子（「標的遺伝子」）に関連する疾患を有する前記対象を自家治療すること、を含む、対象を自家治療する方法。

< 2 1 6 >

前記幹細胞は、i P C 細胞、M S C、成体幹細胞、又は組織特異的幹細胞である、< 2 1 4 > 又は < 2 1 5 > に記載の方法。

< 2 1 7 >

前記 i P S 細胞は、転写因子 O C T 4、S O X 2、K L F 4、及び c - M Y C のうち 1 又は複数を使用してリプログラミングされる、< 2 1 6 > に記載の方法。

< 2 1 8 >

前記遺伝的に修復された細胞は、遺伝子修復を行う前と比較して、前記細胞内の非欠陥標的遺伝子核酸配列の増加；前記細胞内の前記標的遺伝子にコードされる機能的ポリペプチドの量の増加；前記細胞における細胞構造、細胞形態、細胞生存率、若しくは細胞機能の改善、及び／又は生化学的機能の改善若しくは正常化、のうち 1 又は複数を示す、< 2 1 4 > 又は < 2 1 5 > に記載の方法。

10

20

30

40

50

< 2 1 9 >

投与される細胞の量は、1回の投与で約1,000～約1000万個の細胞である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 2 0 >

前記投与は注射、網膜下注射、又は硝子体内注射による、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 2 1 >

前記投与は、前記対象の眼の網膜下の場所、後部、若しくは角膜、又は前記置換細胞を必要とする組織若しくは臓器に細胞を効果的に送達するその他の任意の投与方法による、先行項のいずれか一項に記載の方法。

10

< 2 2 2 >

細胞懸濁液の注射によって前記細胞が投与される、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 2 3 >

前記細胞は、シート、マトリックス、足場、組織、又は三次元（3D）網膜構造の一部として投与される、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 2 4 >

前記RPE細胞は、天然及び／又は合成の足場を使用して投与され、機能的なRPE単層を生成する、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 2 5 >

前記対象はヒト対象である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

20

< 2 2 6 >

前記疾患は、表4に示す1つ以上の遺伝子における前記対象の遺伝的又はエピジェネティックな変化又は危険因子に関連している、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 2 7 >

前記疾患は、光受容体変性、網膜色素上皮細胞変性、網膜変性、角膜変性、及び／又は脈絡膜障害である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 2 8 >

前記疾患は、遺伝性網膜変性（IRD）である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 2 9 >

前記疾患は、網膜色素変性症（RP）である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

30

< 2 3 0 >

前記疾患は、クリスタリン網膜症（BCD；Bietti結晶性角膜網膜ジストロフィーとしても知られる）である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 3 1 >

前記疾患は、神経変性に関連している、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 3 2 >

前記疾患は、角膜ジストロフィーである、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 3 3 >

前記対象は、BCDに罹患しているかBCDを発症するリスクがある、先行項のいずれか一項に記載の方法。

40

< 2 3 4 >

前記細胞は、線維芽細胞、血液細胞、又は眼細胞である、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 3 5 >

前記細胞は、尿、毛、又は毛包から得られる、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 3 6 >

前記眼細胞は、網膜色素上皮（RPE）細胞、角膜上皮細胞（CEC）、脈絡膜内皮（CE）細胞、又は光受容体細胞（PRC）である、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 3 7 >

前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、変異、挿入、一塩基多型、不適当なメチ

50

ル化、不適当な脱メチル化、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 3 8 >

前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、変異である、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 3 9 >

前記対象からの前記 i P S - 眼細胞における前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、遺伝子編集療法を使用して遺伝的に修復済みである、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 4 0 >

前記遺伝子編集療法は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、T A L E N テクノロジー、又は C R I S P R テクノロジーを利用している、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 4 1 >

前記対象からの前記 i P S C - 眼細胞における前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、遺伝子導入療法を使用して遺伝的に修復済みである、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 4 2 >

前記遺伝子導入療法は、組換え A A V ベクター又は別のウイルスベクター又は非ウイルスベクターを利用して、移植される前記細胞に前記標的遺伝子の健全なコピー（例えば、c D N A）を送達する、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 4 3 >

前記投与工程は、疾患症状の発現前又は疾患症状の発現後に行われる、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 4 4 >

投与は、眼、又はニューロンを含む別の臓器若しくは組織に対するものである、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 4 5 >

投与は、注射、網膜下注射若しくは硝子体内注射、又は網膜への直接注射によるものである、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 4 6 >

投与は、前記対象の眼の網膜下の場所、後部、若しくは角膜、又は置換細胞を必要とする組織若しくは臓器に細胞を効果的に送達するその他の任意の投与方法による、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 4 7 >

投与又は移植の前に、前記細胞の遺伝子型分析を行って、表 4 に示す 1 又は複数の遺伝子の遺伝的又はエピジェネティックな変化の有無を確認すること、をさらに含む、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 4 8 >

前記遺伝的又はエピジェネティックな変化は、変異である、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 4 9 >

前記変異は、前記 C Y P 4 V 2 核酸分子に存在する、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 5 0 >

投与前に、前記対象の眼を評価して、損傷した又は維持されている光受容体、網膜細胞、又は角膜細胞の領域及び程度を特定すること、をさらに含む、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 5 1 >

投与後に、前記対象をモニタリングすることをさらに含む、先行項のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

< 2 5 2 >

前記モニタリングには、非侵襲的網膜イメージング、角膜検査、暗順応、コントラスト感度、視野測定、ERG、OCT、視力検査、及び／又は機能検査を実施することが含まれる、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 5 3 >

前記モニタリングは、免疫応答について前記対象を評価することを含む、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 5 4 >

投与後に、前記対象の眼を評価して、損傷した又は維持されている光受容体、網膜細胞、又は角膜細胞の領域及び程度を特定すること、をさらに含む、先行項のいずれか一項に記載の方法。

< 2 5 5 >

(a) 標的遺伝子(「標的遺伝子」)中又は標的遺伝子の隣接100bp以内にある標的配列を(「標的配列」を)標的とするCRISPRガイドRNA、及び

(b) 機能的CRISPR関連タンパク質を、リボ核タンパク質(RNP)又はタンパク質RNA複合体内に含む組成物。

< 2 5 6 >

(c) 前記標的遺伝子又はその一部の修正又は置換のための、前記標的遺伝子の野生型配列又は機能的配列の全部又は一部を含むドナー核酸配列をさらに含む、< 2 5 5 >に記載の組成物。

< 2 5 7 >

前記標的遺伝子は眼の発達又は機能に関与する、及び／又は前記標的遺伝子の変異が眼疾患を引き起こすか眼疾患を引き起こす危険因子である、< 2 5 5 >又は< 2 5 6 >に記載の組成物。

< 2 5 8 >

前記標的遺伝子は神経の発達又は機能に関与する、及び／又は前記標的遺伝子の変異が神経変性疾患を引き起こすか神経変性疾患を引き起こす危険因子である、< 2 5 5 >又は< 2 5 6 >に記載の組成物。

< 2 5 9 >

前記標的遺伝子は、シトクロムP450遺伝子である、< 2 5 5 >又は< 2 5 6 >に記載の組成物。

< 2 6 0 >

前記標的遺伝子は、変異若しくは欠陥を有する、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする、表4に記載の少なくとも1つの遺伝子を含む、< 2 5 5 >又は< 2 5 6 >に記載の組成物。

< 2 6 1 >

前記ドナー核酸配列は、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチド(ssODN)又はベクターに含まれて提供される、< 2 5 6 >に記載の組成物。

< 2 6 2 >

(a) 前記CRISPRガイドRNAは、(i) 標的遺伝子中又は標的遺伝子の隣接100bp以内にある標的配列に相補的であるプロトスペーサーエレメント配列と、trans-activating crRNA(tracrRNA)の相補的な領域に対応する配列と、を含むCRISPR RNA(crRNA)、及び(ii) 前記crRNAの対応する領域に相補的な領域と、CRISPR関連タンパク質9(Cas9)と相互作用する配列と、を含むtracrRNA、を含み、

(b) 前記機能的CRISPR関連タンパク質はCas9を含む、< 2 5 5 >～< 2 6 1 >のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 6 3 >

前記crRNA及び前記tracrRNAは、異なる核酸分子内にある、< 2 6 1 >又は< 2 6 2 >に記載の組成物。

10

20

30

40

50

< 2 6 4 >

前記 *crRNA* 及び前記 *tracrRNA* は、シングルガイド *RNA* (*sgRNA*) に組み合わされる、< 2 6 1 > 又は < 2 6 2 > に記載の組成物。

< 2 6 5 >

前記 *Cas9* が、*Streptococcus pyogenes* (*SpCas9*)、*SpCas9* ニッカーゼ (*Cas9n D10A*)、*SpCas9* (*D1135E*)、*eSpCas9*、*SpCas9-HF1*、*SpCas9 VRER*、*SpCas9 VQR*、*SpCas9 EQR*、*Staphylococcus aureus* (*SaCas9*)、*Neisseria Meningitidis*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Campylobacter coli*、*Campylobacter jejuni*、*Streptococcus mutans*、*Pasteurella multocida*、*Bifidobacterium longum*、*Bacillus smithii*、*Treponema denticola*、*Mycoplasma canis*、及び *Enterococcus faecalis* から選択される *Cas9* オーソログ又は変異体 *Cas9* を含む、< 2 6 1 > ~ < 2 6 4 > のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 6 6 >

(a) 前記 *CRISPR* ガイド *RNA* は、標的遺伝子中又は標的遺伝子の隣接 100 bp 以内にある標的配列に相補的であるプロトスペーサーエレメント配列を含む *crRNA* を含む、

(b) 前記機能的 *CRISPR* 関連タンパク質は *Cpf1* を含む、

< 2 5 5 > ~ < 2 6 5 > のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 6 7 >

前記 *CRISPR* 関連タンパク質である *Cas9* 又は *Cpf1* は、1、2、3 又はそれ以上の核局在化配列 (*NLS*) を *N* 末端及び／又は *C* 末端にさらに含む、及び／又は非限定的な例として *GFP* 又は *EGFP* が挙げられる選択マーカーをさらに含む、< 2 5 5 > ~ < 2 6 6 > のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 6 8 >

前記プロトスペーサーエレメントは、前記標的配列に 100% 相補的であるか、標的配列に対応させると 1、2、3、4、又は 5 個のヌクレオチドミスマッチを含む、< 2 5 5 > ~ < 2 6 7 > のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 6 9 >

前記 *crRNA* 配列は、前記プロトスペーサーエレメントの直前に、前記 *crRNA* 配列に所望により追加された *G* ヌクレオチドをさらに含む、< 2 5 5 > 又は < 2 5 6 > に記載の組成物。

< 2 7 0 >

前記 *CRISPR* ガイド *RNA*、*crRNA*、及び／又は *tracrRNA*、又は *sgRNA* は、化学修飾されている、< 2 5 5 > ~ < 2 6 9 > のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 7 1 >

前記標的遺伝子の野生型バージョンは、酵素をコードする、< 2 5 5 > ~ < 2 7 0 > のいずれか一項に記載の組成物。

< 2 7 2 >

前記標的遺伝子は、

変異若しくは欠陥を有する *CYP4V2*、*CYP1B1*、*MYO7A*、*DFNB31*、

10

20

30

40

50

USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、若しくはCYP46Aの遺伝子、又は

10

不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする、CYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、

20

<273>

前記CRISPRガイドRNA、CRISPR関連タンパク質、及び／又は前記ドナー核酸配列を含む1又は複数の成分は、当該成分に転写及び／又は翻訳できるベクター、DNA、及び／又はmRNAに別々に及び／又は追加的に提供されている、<255>～<272>のいずれか一項に記載の組成物。

<274>

<255>又は<273>に記載の組成物を含む医薬的に許容可能な製剤。

<275>

30

<255>～<274>のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含む、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子によって引き起こされる対象の疾患を治療する方法。

<276>

<255>～<157>のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含む、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子によって引き起こされる対象の眼疾患を治療する又は関連する危険因子を緩和する方法。

<277>

<255>、<256>、又は<258>～<276>のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含む、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子によって引き起こされる対象の神経変性疾患を治療する又は関連する危険因子を緩和する方法。

40

<278>

<255>～<277>のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含む、変異若しくは欠陥を有するシトクロムP450遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードするシトクロムP450遺伝子によって引き起こされる対象の疾患を治療する又は関連する危険因子を緩和する方法。

<279>

破壊、修正、若しくは置換される、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子又は不完全若

50

しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、表 4 に示す少なくとも 1 つの遺伝子の変異若しくは欠陥があるバージョン、又は表 4 に示す少なくとも 1 つの遺伝子の不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードするバージョンである、＜ 2 7 8 ＞に記載の方法。

＜ 2 8 0 ＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、線維芽細胞、血液、R P E、光受容体、網膜、角膜、脈絡膜、眼、視神経、ニューロン、若しくは幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の種類の細胞に存在する、＜ 2 7 8 ＞に記載の方法。

＜ 2 8 1 ＞

前記組成物は、線維芽細胞、血液、R P E、光受容体、網膜、角膜、脈絡膜、眼、視神経、ニューロン、若しくは幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の種類の細胞に送達される、＜ 2 7 8 又は＜ 2 7 9 ＞に記載の方法。

＜ 2 8 2 ＞

送達は、エレクトロポレーションにより、若しくは脂質媒介トランスフェクション、ヌクレオフェクション、ウイルス形質導入、若しくはインジェクション、又はそれらの組み合わせにより行われる、＜ 2 8 1 ＞に記載の方法。

＜ 2 8 3 ＞

前記 C R I S P R ガイド RNA、C R I S P R 関連タンパク質、及び／又は前記ドナー核酸配列を含む 1 又は複数の成分は、リボ核タンパク質又はタンパク質-R N A 複合体、ナノ粒子、リボソーム、ミセル、ウイロソーム、核酸複合体、及び／又はそれらの組み合わせからなる群から選択される送達システムを介して前記対象又は前記細胞に投与される、＜ 2 7 8 ＞～＜ 2 8 2 ＞のいずれか一項に記載の方法。

＜ 2 8 4 ＞

前記治療はインビボで対象に対して行われる、＜ 2 7 8 ＞～＜ 2 8 3 ＞のいずれか一項に記載の方法。

＜ 2 8 5 ＞

前記治療は、インビトロで、線維芽細胞、血液、R P E、光受容体、網膜、角膜、脈絡膜、眼、視神経、ニューロン、若しくは幹細胞、又は幹細胞に由来する任意の種類の細胞に対して行われる、＜ 2 7 8 ＞～＜ 2 8 3 ＞のいずれか一項に記載の方法。

＜ 2 8 6 ＞

前記治療した細胞は、インビボで対象に移植される、又は前記治療した細胞が幹細胞である場合、該幹細胞は移植のための所望の種類の細胞に分化させられ、その後分化した細胞はインビボで対象に移植される、＜ 2 8 5 ＞に記載の方法。

＜ 2 8 7 ＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、置換される、＜ 2 7 8 ＞～＜ 2 8 0 ＞のいずれか一項に記載の方法。

＜ 2 8 8 ＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子において、1 又は複数の変異が修正又は置換される、＜ 2 7 8 ＞～＜ 2 8 0 ＞のいずれか一項に記載の方法。

＜ 2 8 9 ＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、破壊される、＜ 2 7 8 ＞～＜ 2 8 0 ＞のいずれか一項に記載の方法。

＜ 2 9 0 ＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子において、1 ～ 2 0、2 1 ～ 4 0、4 1 ～ 6 0、6 1 ～ 8 0、8 1 ～ 1 0 0、1 0 1 ～ 1 0 0 0、又は 1 0 0 1 ～ 1 0 0 0 0 塩基対のヌク

10

20

30

40

50

レオチド又は変異が破壊、修正、又は置換される、＜278＞～＜280＞のいずれか一項に記載の方法。

＜291＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の領域が、破壊、修正、又は置換される、＜278＞～＜280＞のいずれか一項に記載の方法。

＜292＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の約10、8、6、4、2、又は1kb未満である領域が、破壊、修正、又は置換される、＜278＞～＜280＞のいずれか一項に記載の方法。

10

＜293＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、ヌクレオチドの挿入及び／又は欠失によって破壊、修正、又は置換される、＜278＞～＜280＞のいずれか一項に記載の方法。

＜294＞

前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、片方又は両方のアレルにおいて破壊、修正、又は置換される、＜278＞～＜280＞のいずれか一項に記載の方法。

＜295＞

2以上の異なるCRISPRガイドRNA、2以上の異なるCRISPR関連タンパク質及び／又は2以上の異なるドナー核酸配列を使用して、前記変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子において、1又は複数の変異若しくは欠陥を破壊、修正、又は置換する、＜278＞～＜280＞のいずれか一項に記載の方法。

20

＜296＞

前記対象は、哺乳動物である、＜278＞に記載の方法。

＜297＞

前記対象は、ヒトである、＜278＞に記載の方法。

＜298＞

前記方法は、眼の発達又は機能を改善するか、眼、網膜、又は角膜の変性を予防する、＜278＞に記載の方法。

30

＜299＞

前記方法は、神経学的発達又は機能を改善するか、神経変性を予防する、＜278＞に記載の方法。

＜300＞

P450酵素の発現又は機能を改善する、＜278＞に記載の方法。

＜301＞

さらに(c)変異又は変化された標的遺伝子又はその一部の生成のための、変異又は変化を有する表4に示す少なくとも1つの標的遺伝子の全部又は一部を含むドナー核酸配列を含む、＜255＞、＜257＞、＜258＞、又は＜259＞のいずれか一項に記載の組成物。

40

＜302＞

変異又は欠陥を有する表4に示す遺伝子を有する細胞を含む組成物。

＜303＞

本願の項のいずれか一項に記載の組成物を含む、変異又は欠陥を有するCYP4V2、CYP1B1、MYO7A、DFNB31、USH1C、USH1G、CDH23、PCDH15、CLRN1、ACO2、AFG3L2、ATXN2、AUH、C12orf65、CISD2、FOXC1、FOXF2、LTBP2、MTPAP、MYOC、NDUFS1、NR2F1、OPA1、OPA3、OPTN、PAX6、PDGF、PITX2

50

、POLG、SPG7、TEK、TXNRD2、WFS1、ABCA4、REP-1、RPE65、CEP290、PDE6B、RPGR、MERTK、MT-ND4、FAM47E、GBA、GCH1、HTRA2、LRRK2、PARK2、PINK1、SNCA、SYNJ1、NPC1、NPC2、CYP4A11、CYP4A22、CYP4B1、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22、CYP4X1、CYP4Z1、又はCYP46Aの遺伝子を有する細胞を含む組成物。

<304>

前記ベクターは、AAVベクターである、<303>に記載の組成物。

<305>

前記プロトスペーサーエレメント配列は、配列番号48～52からなる群から選択されるか、配列番号48～52の一つと少なくとも80%の配列同一性を有し、CYP4V2遺伝子のc. 802-8__810del17insGC変異を標的とするために、NGGをプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)とするCasタンパク質と共に使用される、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

<306>

前記ドナー核酸配列は、配列番号56及び57からなる群から選択されるか、配列番号56及び57のいずれか又はその相補的な配列との間で少なくとも90%の配列同一性を有し、CYP4V2遺伝子のc. 802-8__810del17insGC変異を修正、破壊、又は置換するために使用される、先行項のいずれか一項に記載の組成物。

<307>

対象に(i)遺伝子編集療法組成物又は遺伝子導入療法組成物を含む、前記対象における既存の疾患細胞を標的とする組成物と、(ii)置換細胞を含む細胞組成物と、の組み合わせを投与すること、を含む、変異若しくは欠陥を有する遺伝子、又は不完全若しくは部分的な機能若しくは活性を有するタンパク質をコードする遺伝子によって引き起こされる対象の疾患を治療する方法。

<308>

前記対象は、ヒトである、<307>に記載の方法。

<309>

前記疾患は、前記対象の細胞に変性を引き起す、<307>に記載の方法。

<310>

前記変性は、RPE細胞、RPC、CEC、CE細胞、網膜細胞、角膜細胞、脈絡膜細胞、視神経細胞、眼細胞、ニューロン、神経細胞、脳細胞、肝細胞、肺細胞、及び心臓細胞で起こる、<307>及び<308>に記載の方法。

<311>

前記疾患は、表4に示す少なくとも1つの遺伝子によって引き起こされる、<307>に記載の方法。

<312>

前記遺伝子編集療法組成物は、遺伝子編集療法に関するいずれか一項の項に記載の組成物である、<307>に記載の方法。

<313>

前記遺伝子導入療法組成物は、遺伝子導入療法に関するいずれか一項の項に記載の組成物である、<307>に記載の方法。

<314>

前記細胞組成物は、細胞療法に関する項又は自家細胞療法に関する項のいずれか一項に記載の組成物を含む、<307>に記載の方法。

<315>

前記細胞組成物は、治療される対象に対して同種(アロジェニック)である、<307>に記載の方法。

<316>

10

20

30

40

50

前記細胞組成物は、治療される前記対象にとって自家性である、＜307＞に記載の方法。

＜317＞

前記細胞組成物は、前記対象への投与前に遺伝的に修復される、＜307＞又は＜314＞に記載の方法。

＜318＞

前記遺伝子修復は、遺伝子編集療法によるものである、＜307＞又は＜317＞に記載の方法。

＜319＞

前記遺伝子編集療法は、遺伝子編集療法に関する項のいずれか一項に記載されるものによるものである、＜307＞又は＜318＞に記載の方法。

10

＜320＞

前記遺伝子編集療法は、CRISPR RNPに関する項のいずれか一項に記載されるものによるものである、＜307＞、＜318＞、又は＜319＞に記載の方法。

＜321＞

前記遺伝子修復は、遺伝子導入療法によるものである、＜307＞又は＜317＞に記載の方法。

＜322＞

前記遺伝子導入療法は、遺伝子導入療法又は遺伝子治療に関する項のいずれか一項に記載されるものによるものである、＜307＞又は＜321＞に記載の方法。

20

＜323＞

前記（i）及び（ii）の組成物は、1回の投与で両方が投与される、＜307＞に記載の方法。

＜324＞

前記（i）及び（ii）の組成物は、別々に投与又は別々の投与回で投与される、＜307＞に記載の方法。

＜325＞

前記置換細胞は、幹細胞に由来する、＜307＞に記載の方法。

＜326＞

前記置換細胞は、iPS細胞に由来する、＜307＞及び＜325＞に記載の方法。

30

＜327＞

前記iPS細胞は、治療される対象と同じ対象に由来する、＜307＞又は＜326＞に記載の方法。

＜328＞

前記置換細胞は、iPS-RPE、iPS-PRC、iPS-CEC、又はiPS-CE細胞である、＜307＞又は＜326＞に記載の方法。

＜329＞

前記置換細胞は、iPS-眼細胞である、＜307＞又は＜326＞に記載の方法。

＜330＞

前記置換細胞は、iPS-ニューロン細胞である、＜307＞又は＜326＞に記載の方法。

40

＜331＞

前記対象における眼の発達又は機能を改善するか、眼、網膜、又は角膜の変性を予防する、＜307＞に記載の方法。

＜332＞

前記対象における神経学的発達又は機能を改善するか、神経変性を予防する、＜307＞に記載の方法。

＜333＞

前記対象におけるP450酵素の発現又は機能を改善する、＜307＞に記載の方法。

＜334＞

50

前記対象は、眼、網膜、角膜、脈絡膜、又は神経の変性を患っている、＜307＞～＜332＞のいずれか一項に記載の方法。

【0619】

配列表

【0620】

【数10】

LIST OF SEQUENCES

* All reference numbers used in the sequences are NCBI reference numbers unless otherwise annotated.

Part I: Gene Therapy Sequences

A. cDNA and functional CYP4V2 protein sequences

SEQ ID NO:1 - a cDNA sequence (1578 bp) encoding the human CYP4V2 protein (SEQ ID NO:4), referred to as CYP4V2st herein.

SEQ ID NO:2 - a codon-optimized cDNA sequence (1578 bp) encoding the human CYP4V2 protein (SEQ ID NO:4), referred to as CYP4V2op herein.

SEQ ID NO:3 - a cDNA sequence (1578 bp) encoding a functional CYP4V2 protein (SEQ ID NO:5), referred to as CYP4V2fv herein.

SEQ ID NO:4 - amino acid sequence (525 aa) of the human CYP4V2 protein (NP_997235.3)

SEQ ID NO:5 - amino acid sequence (525 aa) of a functional variant of the human CYP4V2 protein

SEQ ID NO:6 - fragment of human CYP4V2 protein without transmembrane domain (490 aa)

SEQ ID NO:7 - amino acid sequence of human CYP46A1

SEQ ID NO:8 - amino acid sequence of human CYP4A11

SEQ ID NO:9 - amino acid sequence of human CYP4A22

SEQ ID NO:10 - amino acid sequence of human CYP4B1

SEQ ID NO:11 - amino acid sequence of human CYP4F2

SEQ ID NO:12 - amino acid sequence of human CYP4F3

SEQ ID NO:13 - amino acid sequence of human CYP4F8

SEQ ID NO:14 - amino acid sequence of human CYP4F11

SEQ ID NO:15 - amino acid sequence of human CYP4F12

SEQ ID NO:16 - amino acid sequence of human CYP4F22

SEQ ID NO:17 - amino acid sequence of human CYP4X1

SEQ ID NO:18 - amino acid sequence of human CYP4Z1

SEQ ID NO:19 - amino acid sequence of CYP4V2 chimpanzee

SEQ ID NO:20 - amino acid sequence of CYP4V2 Rhesus Monkey

SEQ ID NO:21 - amino acid sequence of CYP4V2 dog

SEQ ID NO:22 - amino acid sequence of CYP4V2 cattle

SEQ ID NO:23 - amino acid sequence of CYP4V2 house mouse

SEQ ID NO:24 - amino acid sequence of CYP4V2 Norway rat

SEQ ID NO:25 - amino acid sequence of CYP4V2 chicken

SEQ ID NO:26 - amino acid sequence of CYP4V2 tropical clawed frog

SEQ ID NO:27 - amino acid sequence of CYP4V2 horse

SEQ ID NO:28 - amino acid sequence of CYP4V2 rabbit

SEQ ID NO:29 - amino acid sequence of CYP4V2 fruit fly

SEQ ID NO:30 - P450 signature element sequence

SEQ ID NO:31 - P450 signature element sequence

B. Exemplary regulatory sequences and ITR sequences

SEQ ID NO:32 - CAG promoter sequence

SEQ ID NO:33 - WPRE enhancer sequence

【0621】

【数11】

SEQ ID NO:34 - bGH PolyA sequence
 SEQ ID NO:35 - EFS promoter sequence
 SEQ ID NO:36 - small polyA (SPA) sequence
 SEQ ID NO:37 - Kozak sequence
 SEQ ID NO:38 - Kozak sequence
 SEQ ID NO:39 - SV40 late PolyA sequence
 SEQ ID NO:40 - CMV promoter sequence
 SEQ ID NO:41 - EF-1 alpha promoter sequence
 SEQ ID NO:42 - AAV2 5' Left-ITR sequence
 SEQ ID NO:43 - AAV2 3' Right-ITR sequence
 SEQ ID NO:44 - mutant AAV2 5' ITR sequence used in scAAV
 SEQ ID NO:45 - AAV2 3' ITR sequence used in scAAV

10

Part II. Cell Therapy Sequences

SEQ ID NO:46 - region of human CYP4V2 gene containing c.802-8_810del17insGC mutation
 SEQ ID NO:47 - region of wild-type human CYP4V2 gene without the c.802-8_810del17insGC mutation
 SEQ ID NO:48 - gRNA 1
 SEQ ID NO:49 - gRNA 2
 SEQ ID NO:50 - gRNA 3
 SEQ ID NO:51 - gRNA 4
 SEQ ID NO:52 - gRNA 5
 SEQ ID NO:53 - crRNA exemplary sequence
 SEQ ID NO:54 - tracrRNA exemplary sequence
 SEQ ID NO:55 - sgRNA exemplary sequence
 SEQ ID NO:56 - donor template 1 sequence
 SEQ ID NO:57 - donor template 2 sequence
 SEQ ID NO:58 - SpCas9 amino acid sequence
 SEQ ID NO:59 - additional nucleotide inserted immediately after the U6 promoter sequence and before the protospacer element sequence in a plasmid construct and in an IVT sgRNA

20

Part III: CYP4V2 Expression Cassette Sequences (inclusive of AAV ITRs and junction/linker sequences).

30

SEQ ID NO: 60 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op, and AAV5.CYP4V2op.
 SEQ ID NO: 61 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV5.CYP4V2st. AAV5.CYP4V2st has the same promoter (CAG), enhancer (WPRES) and polyA (bGH-polyA) as AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op and AAV5.CYP4V2op (SEQ ID NO: 60) but different CYP4V2 cDNA and junction/linker sequences.
 SEQ ID NO: 62 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV8.CYP4V2fv. AAV8.CYP4V2fv has the same promoter (CAG), enhancer (WPRES) and polyA (bGH-polyA) and junction/linker sequences as AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) and differs only in CYP4V2 cDNA sequence.

40

[0 6 2 2]

[数 1 2]

SEQ ID NO: 63 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV5.CYP4V2op (new). AAV5.CYP4V2op (new) has the same promoter (CAG), enhancer (WPRES) and polyA (bGH-polyA) and the same junction/linker sequences as AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) and AAV8.CYP4V2fv (SEQ ID NO: 62) but different CYP4V2 cDNA sequences.

SEQ ID NO: 64 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in scAAV1.CYP4V2op, scAAV5.CYP4V2op, and scAAV9.CYP4V2op.

SEQUENCES

SEQ ID NO: 1 (CYP4V2st cDNA, 1578 bp)

ATGGCGGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGCGCGGCGAGTGCCCTTTCCC
TGGCGGGCGCCAGTCTGGTCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCGAGCTACGCGCGGAAATGGCAGCAGAT
GCGGCCCATCCCCACGGTGGCCCCGCGCCTACCCACTGGTGGGCCACGCGCTGCTGATGAAGCCGGACGGG
CGAGAATTTTTTTCAGCAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACCGCCACATGCCGCTGCTGAAGCTCTGGG
TCGGGCCAGTGCCCATGGTGGCCCTTTATAATGCAGAAAATGTGGAGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCA
AATTGACAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTGAACCATGGCTTGGCCTAGGACTTCTTACAAGTACTGGA
AACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGTTAACACCCACTTTCCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAG
ATATCATGAATGAACAAGCAAATATATTGGTTAAGAACTTGAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTTAA
CTGCTTTTTTTTACATCACTCTTTGTGCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCTATGGGGAAGAATATTGGT
GCTCAAAGTAATGATGATTCCGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTTGAAGAA
TAAAGATGCCCTGGCTTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAGAG
CCTTCAGATCCTACATACTTTTACCAACAGTGTCTATCGCTGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGAA
GACTGTAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTTTCTTGACTTGCTTT
TAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAGAAGTTGACACCTTCAT
GTTTGAGGGGCACGATACAACCTGCAGCTGCAATAAACTGGTCCCTTATACCTGTTGGGTTCTAACCCAGAA
GTCCAGAAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTTTGGGAAGTCTGACCGTCCCGCTACAGTAGAAG
ACCTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTTATTAAGGAGACCCTTCGCCTTTTTCTCTGTTCCCTTT
ATTTGCGCGTAGTGTTAGTGAAGATTGTGAAGTGGCAGGTTACAGAGTTCTAAAAGGCACTGAAGCCGTC
ATCATTCCCTATGCATTGCACAGAGATCCGAGATACTTCCCCAACCCCGAGGAGTTCCAGCCTGAGCGGT
TCTTCCCCGAGAATGCACAAGGGCGCCATCCATATGCCATACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGGAACGT
TATAGGTCAAAAGTTTGCTGTGATGGAAGAAAAAGACCATTCTTTTCGTGCATCCTGAGGCACTTTGGATA
GAATCCAACCAGAAAAGAGAAGAGCTTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGTAATGGCATCT
GGATCAAGTTGAAGAGGAGAAATGCAGATGAACGCTAA

SEQ ID NO: 2 (CYP4V2op cDNA, 1578 bp)

ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCACTGTCAC
TGGCTGGGGCTTCACTGGTGTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCCTCCTACGCCAGAAAGTGGCAGCAGAT
GAGGCCCATCCCTACCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTGCTGATGAAGCCTGACGGC
AGAGAGTTCTTTTCAGCAGATCATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGCACATGCCACTGCTGAAGCTGTGGG
TGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTGTACAACGCCGAGAATGTGGAAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCA
GATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCTTGAGCCTTGGCTGGGCCTGGGCCTGCTGACCTCTACAGGC
AACAAAGTGGAGGAGCCGAGAAAGATGCTGACCCCAACATTCACCTTTACAATCCTGGAGGACTTCTTG
ACATCATGAACGAGCAGGCCAATATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAACCAGGAGGCCCTTTAA
TTGCTTCTTTTACATCACCTGTGCGCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCTATGGGCAAGAACATCGGC
TGCCAGTCTAATGACGATAGCGATACGTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCA
TCAAGATGCCCTGGCTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAAAGAAGTC
CCTGCAGATCCTGCACACCTTTACAAACTCTGTGATCGCCGAGAGAGCCAATGAGATGAACGCCAATGAG
GACTGTAGGGGCGATGGAAGGGGCAGCGCCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTTCTTGACCTGCTGC

【0623】

【数13】

10

20

30

40

50

TGAGCGTGACCGACGATGAGGGCAATCGCCTGTCCCACGAGGACATCCGGGAGGAGGTGGATACATTTCAT
GTTTGGGGACACGACACCACAGCCGCCGATCAACTGGTCCCTGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAG
GTGCAGAAGAAGGTGGATCACGAGCTGGACGACGTGTTTCGGCAAGTCCGACAGGCCAGCAACCGTGGAGG
ATCTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCCTGATCAAGGAGACACTGCGCCTGTTCCCTCTGTGCCTCT
GTTTGGCCGGTCCGTGTCTGAGGACTGTGAGGTGGCCGGCTATCGCGTGCTGAAGGGCACCGAGGCCGTG
ATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGGACCCAGGTATTTCCCTAACCCAGAGGAGTTTCAGCCAGAGAGAT
TCTTTCCCGAGAATGCCAGGGCAGGCACCCTTACGCCTATGTGCCATTCTCCGCCGACCAAGGAAGT
CATCGGACAGAAGTTTGGCGTGATGGAGGAGAAAACCATCCTGTCTTGTATCCTGAGACACTTCTGGATC
GAGAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGCTGGGCCTGGAGGGACAGCTGATCCTGCGGCCAAGCAACGGCATCT
GGATCAAACCTGAAAAGAAGGAACGCTGACGAGAGGTAA

10

SEQ ID NO: 3 (CYP4V2fv cDNA, 1578 bp)

ATGGCGGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAAGCTGCTGCTGTGGGGCGCGGCGAGTGGCCTTTCCC
TGGCCGGCGCCAGTCTGGTCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCGAGCTACGCGCGGAAATGGCAGCAGAT
GCGGCCCATCCCCACGGTGGCCCGCGCCTACCCACTGGTGGGCCACGCGCTGCTGATGAAGCCGGACGGG
CGAGAATTTTTTACGACAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACCGCCACATGCCGCTGCTGAAGCTCTGGG
TCGGGCCAGTGGCCATGGTGGCCCTTTATAATGCAGAAAATGTGGAGGTAATTTTAAGTCTCAAGCA
AATTGACAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTGAACCATGGCTTGGCCTAGGACTTCTTACAAGTACTGGA
AACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGTTAACACCCACTTTCCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAG
ATATCATGAATGAACAAGCAAATATATTGGTTAAGAACTTGAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTTAA
CTGCTTTTTTTTACATCACTCTTTGTGCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCTATGGGGAAGAATATTGGT
GCTCAAAGTAATGATGATTCGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTTGAAGAA
TAAAGATGCCCTGGCTTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAGAG
CCTTAAGATCCTACATACTTTTACCAACAGTGTCTATCGCGGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGAA
GACTGTAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTTTCTTGACTTGCTTT
TAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAGAAGTTGACACCTTCAT
GTTTGGGGGACACGATACAACCTGCAGCTGCAATAAACTGGTCTTTATACCTGTTGGGTTCTAACCCAGAA
GTCCAGAAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTTTGGGAAGTCTGACCGTCCCGCTACAGTAGAAG
ACCTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTTATTAAGGAGACCCTTCGCCTTTTTCTTCTGTTCCCTTT
ATTTGCCCCGTAGTGTTAGTGAAGATTGTGAAGTGGCAGGTTACAGAGTTCTAAAAGGCACTGAAGCCGTC
ATCATTCCTTATGCATTGCACAGAGATCCGAGATACTTCCCCAACCCGAGGAGTTCCAGCCTGAGCGGT
TCTTCCCCGAGAATGCACAAGGGCGCCATCCATATGCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGGAAGT
TATAGTCAAAAAGTTTGTGTGATGGAAGAAAAGACATTCTTTCTGTCATCCTGAGGCACTTTTGGATA
GAATCCAACCGAGAAAAGAGAAGAGCTTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGTAATGGCATCT
GGATCAAGTTGAAGAGGAGAAATGCAGATGAACGCTAA

20

SEQ ID NO: 4 (human CYP4V2 protein, NP_997235.3, 525 aa)

MAGLWLGLVWQKLLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDG
REFFQQIIIEYTEEYRHMPLLLKLVGPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPWLGLGLLTSTG
NKRWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFFNYITLCALDIICETAMGKNIG
AQSNDSEYVRAYRMSEMIFFRIKMPWLWLDLWYLMFKEGWEHKKSLQILHTFTNSVIAERANEMNANE
DCRGDGRGSAPSKNKRRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPE
VQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEAV
IIPYALHRDPRYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFVMEEEKTILSCILRHFWI
ESNQKREELGLEQLILRPSNGIWIWIKLRNADER

30

SEQ ID NO: 5 (functional variant of human CYP4V2 protein; 525 aa)

MAGLWLGLVWQKLLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDG
REFFQQIIIEYTEEYRHMPLLLKLVGPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPWLGLGLLTSTG
NKRWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFFNYITLCALDIICETAMGKNIG

40

【 0 6 2 4 】

【 数 1 4 】

50

AQSNDDSEYVRAVYRMSEMIFFRIKMPWLWLDLWYLMFKEGWEHKKSLKILHTFTNSVIAERANEMNANE
DCRGDGRGSAPSKNKRRRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREEVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPE
VQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLFARVSSEDCEVAGYRVLKGTEAV
IIPYALHRDPRYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPYAYVPSAGPRNCIGQKFAVMEEKTILSCILRHFWI
ESNQKREELGLEGLILRPSNGIWIKLKRRNADER

SEQ ID NO: 6 (functional fragment of CYP4V2 (lacking transmembrane domain; 490 aa)

RVASYARKWQOMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDGREFFQQIIIEYTEEYRHMPLLLKLWVGVPVPMVALYNA
ENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPWGLGLLTSTGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVK
KLEKHINQEAFFNCFFYITLCALDIICETAMGKNIGAQSNDDSEYVRAVYRMSEMIFFRIKMPWLWLDLWY
LMFKEGWEHKKSLQILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPSKNKRRRAFLDLLSVTDDEGNRLS
HEDIREEVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVI
KETLRLFPSVPLFARVSSEDCEVAGYRVLKGTEAVIIPYALHRDPRYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPY
AYVPSAGPRNCIGQKFAVMEEKTILSCILRHFWIESNQKREELGLEGLILRPSNGIWIKLKRRNADER

10

SEQ ID NO: 7 (CYP46A1, NP_006659, 500 aa)

MSPGLLLLGSVALLAFLCCTFVHRARSRYEHIPGPPRPSFLLGHLPCFWKKDEVGGRVLQDVFLDWAKK
YGPVVRVNVFHKTSVIVTSPESVKKFLMSTKYNKDSKMYRALQTVFGERLFGQGLVSECNYERWHKQRRV
IDLAFSRSSSLVSLMETFNEKAEQLVEILEAKADGQTPVSMQDMLTYTAMDILAKAAFGMETSMLLGAQKP
LSQAVKLMLEGITASRNTLAKFLPGKRKQLREVRESIRFLRQVGRDWVQRRREALKRGEVVPADILTQIL
KAEEGAQDDEGLLDNFVTFIAGHETSANHLAFTVMELSRQPEIVARLQAEVDEVIGSKRYLDFEDLGR
QYLSQVLKESLRLYPWAGTFRLLLEEETLIDGVRVPGNTPLLFSTYVMGRMDTYFEDPLTFNPDRFGPGA
PKPRFTYFPFSLGHRSCIGQQFAQMEVKVVMALLQRLERLVPQGQRFGLQEATLKPLDPVLCTLRPRG
WQPAPPPPPC

20

SEQ ID NO: 8 (CYP4A11, NP_000769, 519 aa)

msvsvlpsr llgdvsgilq aaslllllll likavqlylh rqwllkalqg fpcppshwlf
ghigelfqddq elqrigkwve tfpsacphwl wggkvrqly dpdymkvilg rsdpkshgys
rflapwigyg llllmgqtwf qhrrmltpaf hydilkpyvg lmadsrvml dkweellgqd
splevfqhvs lmtldtimkc afshggsiqv drnsqsyiga isdlnlvfs rvrnafhqnd
tiysltsagr wthracqlah qhtdqviglr kaqlqkegel ekikrkrhld fldilllakm
engsilskdkd lraevdtfmf eghdttasgi swilyalath pkhqercree ihslldgdgas
itwnhldqmp yttmcikeal rlyppvpgig relstpvtfp dgrslpkgim vllsiyglhh
npkvwpnpev fdpfrfapgs aghshafllpf sggsrncigk qfamnelkva taltllrfel
lpdptripip iarlvlskn gihlrlrrlp npcedkdql

30

SEQ ID NO: 9 (CYP4A22, NP_001010969, 519 aa)

msvsvlpsr rlggvsgilq vtslllllll likaaqlylh rqwllkalqg fpcppshwlf
ghigelfqhdq elqrigervk tfpsacpywi wggkvrqly dpdymkvilg rsdpkshgys
kflaprigyg llllmgqtwf qhrrmltpaf hndilkpyvg lmadsrvml dkweellgqd
splevfqhvs lmtldtimks afshggsiqv drnsqsyiga isdlnslvfc cmrnafhend
tiysltsagr wthracqlah qhtdqviglr kaqlqkegel ekikrkrhld fldilllakm
engsilskdkd lraevdtfmf eghdttasgi swilyalath pkhqercree ihgllgdgas
itwnhldqmp yttmcikeal rlyppvpgig relstpvtfp dgrslpkgim vllsiyglhh
npkvwpnlev fdpsrfapgs aghshafllpf sggsrncigk qfamnlkva raltllrfel
lpdptripip marlvlskn gihlrlrrlp npcedkdql

SEQ ID NO: 10 (CYP4B1, NP_000770, 511 aa)

40

【 0 6 2 5 】

【 数 1 5 】

mvpsflslsf sslglwasgl ilvlglflkli hlllrrqtla kamdkfpgpp thwlfghale
 iquetgsldkv vswahqfpya hplwfgqfig flniyepdya kavysrgdpk apdvdydfflq
 wigrgllvle gpkwlqhrkl ltpgfhydv l kpyvavftes trimldkwee karegksfdi
 fcdvghmaln tlmkctfgrg dtglghrdss yylavsdltl lmqgrlvsfq yhndfiywlt
 phgrrflrac qvahdhtdqv irerkaalqd ekvrkkiqnr rhldfldill gardeddikl
 sdadlraevd tfmfeghdt tsgiswflyc malypehqhr creevreilg dqgdfqgwdl
 gkmtyltmc i kesfrlyppv pqvyrlskp vtfvdgrslp agslismhiy alhrnsavwp
 dpevfdsrlf stenaskrhp fafmpfsagp rncigqqfam semkvvtamc llrfefsldep
 srlpikmpql vlrsknghl hlkplpgpgs k

SEQ ID NO: 11 (CYP4F2, NP_001073, 520 aa)

msqlslswlg lwpvaaspwl llllvgaswl lahvlawtya fydncrrlrc fpqpprrnwf
 wghqgmvnpt eegmrvtql vatypqgfkv wmgpispills lchpdiirsv inasaaiaipk
 dkffysflep wlgdglillsa gdwksrhrm ltpafhfnil kpymkifnes vnimhakwql
 lasegsacld mfehislm t dslqkcvfsf dshcgekpse yiaailelsa lvskrhheil
 lhidfilylt pdgqrfr rac rlvhdftdav iqerrrtlps qgvddflqak aksktldfid
 vlllskdedg kklstdedira eadt fmfegh dttasglswv lyhlakhpey qercrqevqe
 llkdropkei ewddlahlpf ltmcmkeslr lhppvpvisr hvtqdivlpd grvipkgiic
 lisvfgthhn pavwpdpevy dpfrfdpeni kersplafip fsagprncig qtfamaemkv
 vlatlllrfr vlpdhteprr kpelvlraeg glwlrvepls

10

SEQ ID NO: 12 (CYP4F3, NP_000887, 520 aa)

mpqlslswlg lwpmaaspwl llllvgaswl larilawtyt fydncrrlrc fpqppkrnwf
 lghlglihs eeglltql actfgdmccw wvgpwhaivr ifhptyikpv lfapaaivpk
 dkvfysflkp wlgdglillsa gekwsrhrm ltpafhfnil kpymkifnes vnimhakwql
 lasegsarld mfehislm t dslqkcvfsf dshcgekpse yiaailelsa lvtkrhqqil
 lyidfilylt pdgqrfr rac rlvhdftdav iqerrrtlps qgvddflqak aksktldfid
 vlllskdedg kklstdedira eadt fmfegh dttasglswv lyhlakhpey qercrqevqe
 llkdropkei ewddlaqlpf ltmckeslr lhppvpavsr cctqdivlpd grvipkgiic
 lisvfgthhn pavwpdpevy dpfrfdpkn i kersplafip fsagprncig qafamaemkv
 vlgltllrfr vlpdhteprr kpelvlraeg glwlrvepls

20

SEQ ID NO: 13 (CYP4F8, NP_009184, 520 aa)

msllslswlg lrpvaaspwl llllvgaswl larilawtya fyhngrrlrc fpqprkqnwf
 lghlgltvpt eeglrvltql vatypqgfvr wlgpitiin lchpdivrsv intsdaitdk
 divfyktl k wlgdglillsa gdwksrhrm ltpafhfnil kpyikifsk animhakwqr
 lamegstcl d vfehislm t dslqkcifsf dsncgekpse yitaimelsa lvvkrnnqff
 rykdflyflt pcgrrfhrac rlvhdftdav iqerrrtlts qgvddflqak aksktldfid
 vlllsedkng kelsdedira eadt fmfegh dttasglswv lynlarhpey qercrqevqe
 llkdropkei ewddlaqlpf ltmclkeslr lhppiptfar gctqdvlpd srvipkgnvc
 ninifaihn psvwpdpevy dpfrfdpena qkrspmafip fsagprncig qkfamaemkv
 vlatlllrfr ilpdhreppr tpeivlraed glwlrveplg

30

SEQ ID NO: 14 (CYP4F11, NP_067010, 524 aa)

mpqlslswlg lgpvaaspwl llllvggswl larvlawtyt fydncrrlrc fpqppkqnwf
 wghqglvtpt eegmktltql vttypqgfk l wlgptfplli lchpdiirpi tsasaavap k
 dmifygflkp wlgdglillsa gdwksrhrm ltpafhfnil kpymkifnks vnimhdkwqr
 lasegsarld mfehislm t dslqkcvfsf esncgekpse yiaailelsa fvekrnqqil
 lhtdflylt pdgqrfr rac hlvhdftdav iqerrctlp t qgiddf lknk aksktldfid
 vlllskdedg kelsdedira eadt fmfegh dttasglswv lyhlakhpey qeqcrqevqe

40

【0 6 2 6】

【数 1 6】

llkdrepiei ewddlaqlpf ltmcikeslr lhppvpvisr cctqdfvlpd grvipkgivc
 liniigihyn ptvwpdpevy dpfrfdqeni kersplafip fsagprncig qafamaemkv
 vlaltllhfr ilphtteprk kpelilraeg glwlrveplg ansq

SEQ ID NO: 15 (CYP4F12, NP_076433, 524 aa)

msllslpwlq lrpvatspwl llllvvgswl larilawtya fyynnrrrlqc fpqppkrnwf
 wghlglitpt eeglknstqm satysqgftv wlgpiipfiv lchpdtirsi tnasaaiapk
 dnlfirflkp wlgegillsg gdkwsrhrm ltpafhfnil ksyitifnks animldkwqh
 lasegssrld mfehislmtl dslqkcifsf dshcgerpse yiatilelsa lvekrsqhil
 qhmdflyyys hdgrrfhrac rlvhdftdav irerrrtlpt qgidddffkdk aksktldfid
 vlllskdedg kalsdedira eadtfrmfggh dttasglswv lynlarhpey qercrqevqe
 llkdrdpkei ewddlaqlpf ltmcvkeslr lhppapfisir cctqdivlpd grvipkgitc
 lidiigvhhn ptvwpdpevy dpfrfdpens kgrsplafip fsagprncig qafamaemkv
 vlalmllhfr flpdhteprr klelimraeg glwlrvepln vslq

10

SEQ ID NO: 16 (CYP4F22, NP_775754, 531 aa)

mlpitdrllh llglektafr iyavstlllf llfflfrlll rflrlcrsfy itcrrrlrcfp
 qprrnwlhg hlgmylpnea glqdekkvld nmhhvllvwm gpvlppllv lv hpdylkpllg
 asaaiapkdd lfygflkpwl gdglillskgd kwsrhrllt pafhfdilkp ymkifnqsad
 imhakwrhla egsavslmdf ehislmtlds lqkcvfsyns ncqekmsdyi saiielsals
 vrrqyrlhhy ldfiyyrsad grrfrqacdm vhhftteviq errralrqgg aeawlkakqg
 ktldfidvll lardedgkel sdediraeat tfmfeghdt ssqiswmlfn lakypeyqek
 creeiqevmk greleelewd dltqlpfttm cikeslrqyp pvtlvrsqct ediklpdgri
 ipkgiiclvv iygthhnptv wpdskvynpy rfdpdpnpqr splayvpfsa gprncigqsf
 amaelrvvva ltlrlfrlsv drtrkvrrkp elilrtengl wlkveplppr a

20

SEQ ID NO: 17 (CYP4X1, NP_828847, 509 aa)

mefswletrw arpfylafvf clalglgqai klylrrqrll rdlrpfppapp thwflghqkf
 iqddnmekle eiiekypraf pfwigpfqaf fciydpdyak tllsrtdpks qylqkfsppl
 lgkglaaldg pkwfqhrll tpgfhfnilk ayievmahsv kmmldkweki cstqdtsevev
 yehinsrld iimkcafske tncqtnsthd pyakaifels kiifhrlysl lyhsdiifkl
 spqgyrfqkl srvlngytdt iiqerksklq agvkqdnptk rkyqdfldiv lsakdesgss
 fsdidvhsev stfllaghd tlaasiswily clalnpehge rcreevrgil gdgssitwdq
 lgmsyttmc iketcrlipe vpsisrdlsk pltfpdgctl pagitvvlsv wglhnpavw
 knpkvfdplr fsqensdqrh pyaylpfsag srncigqefa mielkvtila illhfrvtpd
 ptrpltfpnh filkpknngmy lhlklksec

30

SEQ ID NO: 18 (CYP4Z1, NP_835235, 505 aa)

mepswlqelm ahpflillil cmslllfqvi rlyqrrrwm ralhlfppapp ahwfyghkef
 ypvkefevyh klmekypcav plwvgpftmf fsvhdpdyak illkrqdpks avshkilesw
 vgrglvtldg skwkkhrqiv kpgfnisilk ifitmmesv rmmlnkweeh iaqnsrlelf
 ghvslmtlds imkcafshqg siqldstlds ylkavfnlsk isnqrmnnfl hhndlvfkfs
 sggqifskfn gelhgftkv iqdrkeslkd klkqdtgkr rwdfldills aksentkdfs
 eadlqaevkt fmfaghdttt saiwilycl akypehqqr rdeirellgd gssitwehls
 qmpyttmcik eclrllyapv nlsrlldkpi tfpdgrslpa gitvfiniwa lhhnpyfwd
 pqvfnplrfs rensekihy afipfsaglr ncigghfai eckvavaltl lrfklapdhs
 rppqpvrqvv lkskngihvf akkvc

SEQ ID NO: 19 (cytochrome P450 4V2 isoform X1 [Pan troglodytes
 chimpanzee)], XP_001165629.1, 525 aa)

40

【 0 6 2 7 】

【 数 1 7 】

```

maglwlglvw qkllllwgaas avslagaslv lsllqrvaty arkwqgmрпи ptvarayplv
ghallmkpdg reffqqiiey teeyrhmp11 klwvgpvpmv alynaenvev iltsskqidk
ssmykflepwl lglgl1ltstg nkwsrrrkml tptfhftile dfldimnega ntlvkklekh
ingeafncff yitlcaldii cetamgknig aqsnddseyv ravymsemi frrikmpwlw
ldlwylmfke gwehkslki lhtftnsvia eranemnane dcrgdgrgsa psknkrrafl
d111svtdde gnrlshedir eevdtfmfeg hdttaaa1nw slyllgsnpe vqkkvdheld
dvfgksdrpa tvedlklkry lecviketlr lfpsvplfar svsedcevag yrvlkgteav
iipyalhrdp ryfnppeefq perffpknag grhpyayvpf sagprncigq kfavmeekti
lscilrhfw1 esnqkreelg legqlilrps ngiwiklkr nader

```

SEQ ID NO: 20 (cytochrome P450 4V2 [Macaca mulatta (Rhesus Macaque, Rhesus Monkey)], NP_001180767.1, 525 aa)

10

```

magiwlglvw qkllllwgaas avslagaslv lsllqrvasy vrkwqgmрпи ptvarayplv
ghallmkrdg reffqqiiey teeyrhmp11 klwvgpvpmv alynaenvev iltsskqidk
ssmykflepwl lglgl1ltstg nkwsrrrkml tptfhftile dfldimnega nilvkklekh
vngeafncfv yitlcaldii cetamgknig aqsnddseyv ravymsemi frrikmpwlw
ldlwylmfke gwehkslki lhaftnnvia eranemn1vde dcrgdgrdsa psknkrrafl
d111svtdde gnrlshedir eevdtfmfeg hdttaaa1mw slyllgsnpe vqkkvdheld
dvfgrsdrpa tvedlklkry lecviketlr lfpsvplfar svsedcevag yrvlkgteav
iipyalhrdp ryfnppeefr perffpenag grhpyayvpf sagprncigq kfavmeekti
lscilrhfw1 esnqkreelg legqlilrpt ngiwiklkr nadep

```

SEQ ID NO: 21 (cytochrome P450 4V2 [Canis lupus familiaris (dog)], XP_013975571.1, 539 aa)

20

```

mlkvkwkenv fregdkdsnm ldavqlpsik vesalsdaea ggspggrpv ltvergrlaq
gsmssllknp kdttrns1ki kyflpeffqg vilyseesrh lp11klwlgp ipivaiysae
nveviltssr qidksyvykf lepwlgl1l tstgnkwsr rkmltptfhf tiledfldvm
nehanilv1k lekhnveaf nccfyitlca ldiicetamg knigaqnned seyvr1ayrm
sdtihrrmk1 pwlwldflfl mfkegrehkr nleilhnftn nviterasel krdeehgsad
kdcspsknkr rafld111lv tddeg1klrh edvreevdtf mfeghdttaa ainwslyllg
syevqkqv1d seledvfgks drpatledlk klkylecvik eslrlfpsvp lfarnlnedc
vvagykv1kg sqaiiipyal hrdpryfpnp eefqperffp enlggrhpya yipfsagprn
cigqrfai1me ektvlscv1r hfwvesnqkr eelglageli lrptngiwik lkrnades

```

SEQ ID NO: 22 (cytochrome P450 4V2 [Bos taurus (cattle)], NP_001029545, 527 aa)

30

```

mlapwllsvg pkllllwsglc avslagatl1 lnllkmvasy arkwrqmrpv ptigdpyp1lv
ghallmkpda rddffqqi1df teecrh1p11 klwlgpvp1lv alynaetvev ilssskhie1k
symykflepwl lglgl1ltstg nkwsrrrkml tptfhftile dfldv1m1nega nilvt1klekh
vngeafncff yvtlctldii cetamgknig aqrnddseyv ravyrmsdsi hqrmkmpwlw
ldlifymfkn grehrrs1ki vhdftnnvit eranemkrhe egtsndkekd fpprktkcra
fld111lnvtd dqgnk1shed ireevdtfmf eghdttaaai nwslyllgwy pevqqrvdte
leevfgksdr pvtledlkl kyldcvikes lrlfpsvpff arnl1tedcev aghkivqgcq
viivpyalhr dpkyfpdpee fkperffpen lkgrhtyayv pfsagprnci gqkfai1meek
tilscilrhf wvesnqkree lg1lagelilr psngiwiklkr rntdes

```

SEQ ID NO: 23 (Cyp4v3, cytochrome P450 4V2 [Mus musculus (house mouse)], NP_598730.1, 525 aa)

40

```

mlwlwlglsg qkllllwgaas avslagatil isifpmlvsy arkwqgmrsi psvarayplv
ghalymkpnn aeffqqliy1y teefrh1pii klwigpvplv alykaenvev iltsskqidk

```

[0 6 2 8]

```

sflykflqpw lglglltstg skwrtrrkml tptfhftile nfldvmneqa nilvnklekh
vngeafncff yitlcaldii cetamgknig aqsnndseyv rtvyrmsdmi yrrmkmpwlw
fdlwlvlfke grdhkrglkc lhtftnnvia ervkerkaee dwtgagrgpi psknkrkafl
dlllsvtdee gnrlsgedir eevdtfmfeg hdttaaaainw slyllgtnepe vqrkvdgeld
evfgrshrpv tledlklky ldcviketlr vfpsvplfar slsedcevvg ykvtkgteai
iipyalhrdp ryfpdpeefr perffpensq grhpyayvpf sagprncigq kfavmeekti
lacilrqfwv esnqkreelg lagdlilrpn ngiwiklkr heddp

```

SEQ ID NO: 24 (Cyp4v3, cytochrome P450 4V2 [Rattus norvegicus (Norway rat)], NP_001129072, 525 aa)

```

mlwlwlglsq qklillwgaas avsvagatvl lnilqmlvsy arkwqgmрпи psvarayplv
ghalfmkpnn teffqqiigq teefrhlpil klwigpvplv alykaenvev iltsskqidk
sfmykflqpw lglglltstg skwrtrrkml tpsfhftile dflldvmneqa nilvnklekh
vngeafncff pitlcaldii cetamgknig aqsnngdseyv rtvyrmsdmi yrrmkmpwfw
fdlwlvmfke grdhkkgkls lhtftnnvia ervnarkaeq dcigagrgpl psktkrkafl
dlllsvtdee gnklshedir eevdtfmfeg hdttaaaainw slyllgsnpe vqrkvdkeld
dvfgrshrpv tledlklky ldcviketlr vfpsvplfar slsedcevag ykiskgteav
iipyalhrdp ryfpdpeefq perffpensq grhpyayvpf sagprncigq kfavmeekti
lacilrefwi esnqkreelg lagdlilrpn ngiwiklkr heddp

```

10

SEQ ID NO: 25 (cytochrome P450 4V2 [Gallus gallus (chicken)], NP_001001879, 530 aa)

```

mameitlgs m egtqllpwva gaitllltvv tvhflpslln ywwwvwmkp ipgirpcypf
vgnalllern gegffkqlqg yadefrkmpm fklwlgplpv tvlfhpdsve vilssskhik
ksflytflhp wlggtlltst gdwrsrrkm itptfhfail ndflevmneq ggvllekkek
hvdkepfnif tditlcaldi icetamgknl gaqdnkdsey vravyrmsdl iqqrqkspwl
whdlmyllfk egrehernlk ilhgftdtvi aekvaalent kltkhdtvdn teesgskkr
eafldmllna tddegkklly kdierevdtf mfeghdttaa amnwvlyllg hhpeaqkkvh
qeldevfgnt erpvtvddlk klrylecvcv ealrlfsvp mfarslqedc yisgyklpkg
tnvlvltvyvl hrdpeifpep defrperffp enskgrhpya yvpfsagprn cigqrfaqme
ektllalilr rfwdcsqkp eelglsgeli lrpnnngiwvq lkrpkrptvte

```

20

SEQ ID NO: 26 (cytochrome P450 family 4 subfamily V member 2 [Xenopus tropicalis (tropical clawed frog)], NP_001072667.1, 523 aa)

```

melggevhll vwvaavvll tllalsilpa lqdyvrkrri lkpipgpgpn ypligdalfl
knnggdfflq iceytesyrl qpllkwigt ipfivvyhad tvepvlsssk hmdkaflykf
lhpwlkgkll tstgekwsr rkmitptfhf ailseflevm neqskilvek lqthvdgesf
dcfmdvtlca ldiisetamg rkigagsnrd seyvgaiykm sdiiqrrqkm pwlwldflya
hlrdgkehdk nlkilhsftd kaileraeel kkmgeqkkeh cdsdpesdkp kkrasafldml
lmatddagnk msymdireev dtfmfeghdt taaalnswlf llgshpeaqr qvhkeldevf
gksdrpvtmd dlklrlylea vikeslriyp svplfgrtvt edcsirgfhv pkgvnnvviip
yalhrdpeyf pepeefrper ffpenasgrn pyayipfsag lncigqrfa lmeekvvlls
ilrnyweas qkreelcllg elilrpqdg mwiklknreta pta

```

30

SEQ ID NO: 27 (cytochrome P450 4V2 [Equus caballus (horse)], XP_014592182.1, 469 aa)

```

mfvliefkik yslsdfqql iyyteenrhl plllklwlgpv pvvifynaen veviltssrq
idksymykfl kpwlglglit stgnkwsrr kmltptfhft nledfldvmn eqanilvnlk
ekhvngeafn cflyitlcal diicetamgk nigaqrnnds eyvravyrms dmihrrmkmp
wlwldiffml fkegrehrrl lkilhnftnn viverasemk kdeersrsdd ggsapsknkr

```

40

【0629】

【数18】

rafldl1llnv tddegnklsh edirgevdft mfeghdttaa ainwslyllg cypevqkkvd
seleevfgks drpatledlk klkylecvmk etlrlfsvp lfarnlnedc evagyktivk
sqaiivsyal hrdstryfnp eefkperffp ensqgrhpya yvpfsagprn cigqkfavme
ekiilscilr hfwvesnqkr eelglageli lrpsngiwik lkrntees

SEQ ID NO: 28 (cytochrome P450 4V2 [*Oryctolagus cuniculus* (rabbit)],
XP_002709379.1, 524 aa)

mwlwlglvvg kllfwgaasa vslagaslfl nllqmvasya rkwwgmrip tigrpyplvg
halympsgk effqqliqyt eeyrhlpilk lwlglpiva lynaenvevi lnsskqinks
smyqflepwl glglitstgy kwrsrrkmlt ptfhftiled fldimneqan ilvhklekhv
dqeafncffy itlcaldiic etamgkniga qsnedseyvr avyrmsdvif rrmkmpwlwl
dlwylmfkeg wehkrclkil hrftnnviae rvsemktdee hrdadsncap stmkrfafld
llltvtdeeg nklshedire evdtfmfegh dttaaaainws lylgshpev qrkvddelde
vfgksdrpat sedlkklyl ecviketlrl fpsvplfars lsddcevagf rvvkgqtavi
vpyalhrdpk yfpnpfeefr erffpenagg rhpyayvpfs agprncigqk faimeektil
scilrklwve snqkmeelgl agelilrptn giwiklkrn adka

10

SEQ ID: 29 (cytochrome P450-4c3 [*Drosophila melanogaster* (fruit fly)],
NP_524598, 535 aa)

msskvitslm aesillskvg qvisgyspit vlllgsilif lvvynkrssr lvkyiekipg
paampflgna iemnvhdhel fnrvigmqkl wgtriginrv wqgtaprll fepetvepil
nsqkfvnksh dydylhpwlgl eglltstdrk whsrrkilt afhfkilddf idvfneqsav
larklavevg seafnlfpv tlctldivce tamgrriyaq snseseyvka vygigsivqs
rqakiwlqsd fifsltaeyk lhqsyintl gfsnmvire kaelailqen nnnnnnnapd
ayddvgkkkr lafldllida skegtvlsne direevdtfm feghdttsaa iswtlflllgc
hpeyqervve eldsifgddk etpatmknlm dmryleccik dslrlfsvp mmarmvgedv
niggkivpag tqaiimtyal hrnprvfcp eqfnpdnflp encagrhpfa yipfsagprn
cigqkfaile ekavistvrl kykieavdr edltllgeli lrpkdglrvk itprd

20

SEQ ID NO: 30 (P450 signature element, "x" denotes any amino acid)
FxxGxxxCxG

SEQ ID NO: 31 (P450 signature element, "x" denotes any amino acid)
ExxR

SEQ ID NO: 32 (CAG promoter, 1715 bp)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
GTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACG
TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA
TGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTAC
ATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATC
TCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGG
GGGGGGGGGGGGCGCGCCAGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGG
CGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGGAGTCTGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCC
GCCTCGCGCGCCCGCCCGGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTT
CTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCT
TAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGT
GGGGAGCGCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGGCGGTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGCTTTGTG

30

40

【0 6 3 0】

【数 1 9】

CGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGA
 ACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTGTA
 ACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGGCTCCGTGCGGG
 GCGTGCGCGGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCG
 CCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCGGAGCGCCGGGCGGTGTGAGGCGCGGC
 GAGCCGCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGG
 CGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGC
 AGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGC CGCGCGCCGCGTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTC
 GGGGCTGCCGCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTG
 ACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATTGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAGCTCCTGGGCAACG
 TGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAA

10

SEQ ID NO: 33 (WPRE enhancer, 589 bp)
 AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGC
 TATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTC
 CTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTG
 TGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGA
 CTTTCGCTTTCCCTTCCCTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG
 GGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGAAATCATCGTCCTTTCTTGGCTGCTC
 GCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGG
 ACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAG
 TCGGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCCG

SEQ ID NO: 34 (bGH polyA, 225 bp)
 CTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
 CACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT
 CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG
 CGGTGGGCTCTATGG

20

SEQ ID NO: 35 (EFS promoter, 235 bp)
 g attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg
 gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt ggcgcggggg aaactgggaa
 agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt ccgagggtg ggggagaacc gtatataagt
 gcagtagtcg ccgtgaacgt tcttttttcgc aacgggtttg ccgccagaac acag

SEQ ID NO: 36 (SPA, 54 bp)
 GATCCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTTGTGTG

30

SEQ ID NO: 37 (Kozak sequence, 6 bp)
 GCCACC

SEQ ID NO: 38 (Kozak sequence, 5 bp)
 CCACC

SEQ ID NO: 39 (SV40 late PolyA, 120 bp)
 TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTT
 TTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTAT

SEQ ID NO: 40 (CMV promoter, 576 bp)

40

【 0 6 3 1 】

【 数 2 0 】

50

TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAA
 ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
 AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTA
 CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
 ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
 CATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGT
 CTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTA
 ACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGG
 TTTAGTGAACCGTCAG

SEQ ID NO: 41 (EF-1 alpha promoter, 1184 bp)

10

cgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccccgagaagttggggggagg
 ggtcggaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggttaaactgggaaagtgatgtcgtgtactgg
 ctccgcctttttcccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgcctgaacgttctttttc
 gcaacgggttttgcgcgcagaaacacaggtaagtgcctgtgtgtgttcccgcgggcctggcctctttacggg
 ttatggcccttgctgtgccttgaattacttccacctggctgcagtagctgattcttgatcccgagcttcgg
 gttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccttcgcctcgtgcttgagttgagg
 cctggcctggcgctggggcgcgcgctgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgctttcga
 taagtctctagccattttaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgta
 aatgcggggccaagatctgcacactgggtatttctggtttttggggcgcgggcgggcgacggggcccggtgcgt
 cccagcgcacatgttcggcgagggcggggctgcgagcgcgggccaccgagaatcggaacgggggtagtctca
 agctggccggcctgctctggtgcctggcctgcgcgcgcgctgtatcgccccgcctggcgcggaaggtg
 gcccggtcggcaccagttgctgagcggaaagatggccgcttcccgggcctgctgcagggagctcaaaat
 ggaggacgcggcgctcgggagagcgggcggggtgagtcacccacacaaaggaaaaggggccttttcgctcctc
 agccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccggggcgcgctccaggcacctcgattagttctcgagcttt
 tggagtacgtcgtcttttaggttggggggaggggttttatgcatggagtttccccacactgagtggttg
 agactgaagttagccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgccttttttgagtttggtg
 ttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcagggtgctgta

20

SEQ ID NO: 42 (AAV2 5' Left-ITR, 141 bp)

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccggggcgtc
 gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca
 actccatcac taggggttcc t

SEQ ID NO: 43 (AAV2 3' Right-ITR, 141 bp)

ag gaacccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgeg ctgcctcgt cactgaggee
 gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga
 gcgcgcagct gctgcagg

30

SEQ ID NO: 44 (mutant AAV2 5' ITR in scAAV construct, 117 bp)

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccggggcgtc
 gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtgg

SEQ ID NO: 45 (AAV2 3' ITR in scAAV construct, 141 bp)

aggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgt cgctcactga
 ggccggggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cggcgggcct cagtgcgcga
 gcgagcgcg agctgcctgc agg

SEQ ID NO: 46 (region of human CYP4V2 gene containing c.802-
 8_810del17insGC mutation)

40

【 0 6 3 2 】

【 数 2 1 】

CAAACAGAAGCATGTGATTATCATTCAAAGCGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGA

SEQ ID NO: 47 (region of wild-type human CYP4V2 gene without the c.802-8_810del17insGC mutation)

CAAACAGAAGCATGTGATTATCATTCAAATCATAACAGGTCATCGCTGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGA

SEQ ID NO: 48 (g1 protospacer element, RNA sequence, 20 nt)
UGAUUAUCAUUCAAAGCGAA

SEQ ID NO: 49 (g2 protospacer element, RNA sequence, 20 nt)
GAUUAUCAUUCAAAGCGAAC

SEQ ID NO: 50 (g3 protospacer element, RNA sequence, 20 nt)
GAUAAUCACAUGCUUCUGUU

SEQ ID NO: 51 (g4 protospacer element, RNA sequence, 20 nt)
UUCAUUGGCGUUCAUUUCAU

SEQ ID NO: 52 (g5 protospacer element, RNA sequence, 20 nt)
CACAUUCUUCUGUUUGGACU

SEQ ID NO: 53 (crRNA exemplary sequence (excluding the 5' protospacer element sequence, 16 nt)
GUUUUAGAGCUAUGCU

SEQ ID NO: 54 (tracrRNA exemplary sequence, 67 nt)

AGCAUAGCAAGUUAUUAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU

SEQ ID NO: 55 (sgRNA exemplary sequence, excluding 5' protospacer element sequence and the optional "G" before the protospacer element. Sequence shown in DNA format as in a plasmid construct. For sequence in RNA format, use "U" to replace "T", 82 nt)

gttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtggcaccogagt
cgggtgctttttt

SEQ ID NO: 56 (CYP4V2 donor template 1 sequence, 200 bases)

AGA AAA ATA AAT GAA AGA AAC TAG CAT ATT TTA TAA GAA AAT GTG TTA ACT
AGG GTG CAT CCA AGT CCA AAC AGA AGC ATG TGA TTA TCA TTC AAA TCA TAC
AGG TCA TCG CTG AAC GGG CCA ATG AAA TGA ACG CCA ATG AAG ACT GTA GAG
GTG ATG GCA GGG GCT CTG CCC CCT CCA AAA ATA AAC GCA GGG CCT TT

SEQ ID NO: 57 (CYP4V2 donor template 2 sequence, the reverse complement of CYP4V2 donor template 1 sequence, 200 bases)

AA AGG CCC TGC GTT TAT TTT TGG AGG GGG CAG AGC CCC TGC CAT CAC CTC TAC
AGT CTT CAT TGG CGT TCA TTT CAT TGG CCC GTT CAG CGA TGA CCT GTA TGA
TTT GAA TGA TAA TCA CAT GCT TCT GTT TGG ACT TGG ATG CAC CCT GTT TAA
CAC ATT TTC TTA TAA AAT ATG CTA GTT TCT TTC ATT TAT TTT TCT

SEQ ID NO: 58 (SpCas9 exemplary amino acid sequence (1368 aa))

【0 6 3 3】

【数 2 2】

10

20

30

40

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARR
 RYTRRNKRNICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK
 KLVDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA
 ILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNLPGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA
 QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI
 FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH
 AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVKGASAQ
 FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVT
 VKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDRE
 MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDD
 SLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAICKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT
 QKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDH
 IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGSNDNPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGGLSE
 LDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINN
 YHHAHDAYLNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEI
 TLANGIEIRKPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
 ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEV
 KKDIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVE
 QHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTT
 IDRKYRSTKEVLDTLHQSITGLYETRIDLSQLGGD

10

SEQ ID NO: 59 (additional nucleotide inserted immediately after the U6
 promoter sequence and before the protospacer element sequence in a
 plasmid construct and in an IVT sgRNA, 1 nt)
 G

20

SEQ ID NO: 60 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in
 AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op, and AAV5.CYP4V2op.:
 Left-ITR: 1-141
 CAG promoter: 237-1951
 CYP4V2op cDNA: 2002-3579
 WPRE enhancer: 3736-4324
 bGH polyA: 4350-4574
 Right-ITR 4659-4799

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
 51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
 101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC TGCGGCCAAT
 151 TCAGTCGATA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGATTTAAA TACGCGCTCT
 201 CTTAAGGTAG CCCCGGGACG CGTCAATTGA GATCTCGACA TTGATTATTG
 251 ACTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATA
 301 TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC
 351 CGCCCAACGA CCCCGGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATA
 401 GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG
 451 GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC
 501 CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCAG
 551 TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT
 601 CATCGCTATT ACCATGGGTC GAGGTGAGCC CCACGTTCTG CTTCACTCTC
 651 CCCATCTCCC CCCCTCCCC ACCCCCAATT TTGTATTTAT TTATTTTTTA
 701 ATTATTTTGT GCAGCGATGG GGGCGGGGGG GGGGGGGGCG CGCGCCAGGC

30

40

【0 6 3 4】

【数 2 3】

751 GGGGCGGGGC GGGGCGAGGG GCGGGGCGGG GCGAGGCGGA GAGGTGCGGC
 801 GGCAGCCAAT CAGAGCGGCG CGCTCCGAAA GTTTCCTTTT ATGGCGAGGC
 851 GGCGGCGGCG GCGGCCCTAT AAAAAGCGAA GCGCGCGGCG GGCGGGAGTC
 901 GCTGCGTTGC CTTCGCCCCG TGCCCCGCTC CGCGCCGCCT CGCGCCGCCC
 951 GCCCCGGCTC TGA CTGACCG CGTTACTCCC ACAGGTGAGC GGGCGGGACG
 1001 GCCCTTCTCC TCCGGGCTGT AATTAGCGCT TGGTTTAATG ACGGCTCGTT
 1051 TCTTTTCTGT GGCTGCGTGA AAGCCTTAAA GGGCTCCGGG AGGGCCCTTT
 1101 GTGCGGGGGG GAGCGGCTCG GGGGGTGCGT GCGTGTGTGT GTGCGTGGGG
 1151 AGCGCCGCGT GCGGCCCGCG CTGCCCCGCG GCTGTGAGCG CTGCGGGCGC
 1201 GGC GCGGGG TTTGTGCGCT CCGCGTGTGC GCGAGGGGAG CGCGGCCGGG
 1251 GCGCGTGCCC CGCGGTGCGG GGGGGCTGCG AGGGGAACAA AGGCTGCGTG
 1301 CGGGGTGTGT GCGTGGGGGG GTGAGCAGGG GGTGTGGGCG CGGCGGTGCG
 1351 GCTGTAACCC CCCCCTGCAC CCCCCTCCCC GAGTTGCTGA GCACGGCCCCG
 1401 GCTTCGGGTG CGGGGCTCCG TGCGGGGCGT GCGCGGGGCG TCGCCGTGCC
 1451 GGGCGGGGGG TGGCGGCAGG TGGGGGTGCC GGGCGGGGCG GGGCCGCCTC
 1501 GGGCGGGGGA GGGCTCGGGG GAGGGGCGCG GCGGCCCCGG AGCGCCGCG
 1551 GCTGTGAGG CGCGGCGAGC CGCAGCCATT GCCTTTTATG GTAATCGTGC
 1601 GAGAGGGCGC AGGGACTTCC TTTGTCCCAA ATCTGGCGGA GCCGAAATCT
 1651 GGGAGGCGCC GCCGCACCCC CTCTAGCGGG CGCGGGCGAA GCGGTGCGGC
 1701 GCCGGCAGGA AGGAAATGGG CGGGGAGGGC CTTCGTGCGT CGCCGCGCCG
 1751 CCGTCCCCTT CTCCATCTCC AGCCTCGGGG CTGCCGAGG GGGACGGCTG
 1801 CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG
 1851 GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCCTA
 1901 CAGCTCCTGG GCAACGTGCT GGTTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA
 1951 AGAATTCTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA CCAAGCTGG CTAGAGCCAC
 2001 CATGGCTGGA CTGTGGCTGG GACTGGTGTG GCAGAACTG CTGCTGTGGG
 2051 GGGCCGCTTC CGCACTGTCA CTGGCTGGGG CTTCACTGGT GCTGAGCCTG
 2101 CTGCAGAGGG TGGCCTCCTA CGCCAGAAAG TGGCAGCAGA TGAGGCCCAT
 2151 CCCTACCGTG GCCAGAGCCT ATCCACTGGT GGGACACGCA CTGCTGATGA
 2201 AGCCTGACGG CAGAGAGTTC TTTCAGCAGA TCATCGAGTA CACAGAGGAG
 2251 TATAGGCACA TGCCACTGCT GAAGCTGTGG GTGGGACCCG TGCCTATGGT
 2301 GGCCCTGTAC AACGCCGAGA ATGTGGAAGT GATCCTGACC AGCAGCAAGC
 2351 AGATGATAA GTCTAGCATG TATAAGTTCC TGGAGCCTTG GCTGGGCTTG
 2401 GGCCTGCTGA CCTCTACAGG CAACAAGTGG AGGAGCCGGA GAAAGATGCT
 2451 GACCCCAACA TTCCACTTTA CAATCCTGGA GGA CTTCCTG GACATCATGA
 2501 ACGAGCAGGC CAATATCCTG GTGAAGAAGC TGGAGAAGCA CATCAACCAG
 2551 GAGGCCTTTA ATTGCTTCTT TTACATCACC CTGTGCGCCC TGGACATCAT
 2601 CTGTGAGACA GCTATGGGCA AGAACATCGG CGCCCAGTCT AATGACGATA
 2651 GCGAGTACGT GCGGGCCGTG TATAGAATGA GCGAGATGAT CTTTAGGCGC
 2701 ATCAAGATGC CCTGGCTGTG GCTGGATCTG TGGTATCTGA TGTTCAAGGA
 2751 GGGCTGGGAG CACAAGAAGT CCCTGCAGAT CCTGCACACC TTTACAACT
 2801 CTGTGATCGC CGAGAGAGCC AATGAGATGA ACGCCAATGA GGACTGTAGG
 2851 GGCGATGGAA GGGGCAGCGC CCCTTCCAAG AACAAGCGGA GAGCCTTCCT
 2901 GGACCTGCTG CTGAGCGTGA CCGACGATGA GGGCAATCGC CTGTCCCACG
 2951 AGGACATCCG GGAGGAGGTG GATACATTCA TGTTTGAGGG ACACGACACC
 3001 ACAGCCGCCG CCATCAACTG GTCCCTGTAC CTGCTGGGCT CTAATCCAGA
 3051 GGTGCAGAAG AAGGTGGATC ACGAGCTGGA CGACGTGTTT GGCAAGTCCG
 3101 ACAGGCCAGC AACCCTGGAG GATCTGAAGA AGCTGAGATA CCTGGAGTGC
 3151 GTGATCAAGG AGACACTGCG CCTGTTCCCC TCTGTGCCTC TGTTTGCCCG
 3201 GTCCGTGTCT GAGGACTGTG AGGTGGCCGG CTATCGCGTG CTGAAGGGCA

10

20

30

40

【 0 6 3 5 】

【 数 2 4 】

```

3251 CCGAGGCCCGT GATCATCCCT TACGCCCTGC ACCGGGACCC CAGGTATTTTC
3301 CCTAACCCAG AGGAGTTTCA GCCAGAGAGA TTCTTTCCCG AGAATGCCCA
3351 GGGCAGGCAC CCTTACGCCT ATGTGCCATT CTCCGCCGGA CCAAGGAACT
3401 GCATCGGACA GAAGTTTGCC GTGATGGAGG AGAAAACCAT CCTGTCTTGT
3451 ATCCTGAGAC ACTTCTGGAT CGAGAGCAAT CAGAAGAGGG AGGAGCTGGG
3501 CCTGGAGGGA CAGCTGATCC TGCGGCCAAG CAACGGCATC TGGATCAAAC
3551 TGAAAAGAAG GAACGCTGAC GAGAGGTAAA AGCTTGGTAC CGATATCGCG
3601 GCCGCCCTAG GGAGCTCCTC GAGGCGGCCC GCTCGAGTCT AGAGGGCCCT
3651 TCGAAGGTAA GCCTATCCCT AACCTCTCTC TCGGTCTCGA TTCTACGCGT
3701 ACCGGTCATC ATCACCATCA CCATTGAGTT TCGATAATCA ACCTCTGGAT
3751 TACAAAATTT GTGAAAGATT GACTGGTATT CTTAACTATG TTGCTCCTTT
3801 TACGCTATGT GGATACGCTG CTTTAATGCC TTTGTATCAT GCTATTGCTT
3851 CCCGTATGGC TTTCATTTTC TCCTCCTTGT ATAAATCCTG GTTGCTGTCT
3901 CTTTATGAGG AGTTGTGGCC CGTTGTGAGG CAACGTGGCG TGGTGTGCAC
3951 TGTGTTTGCT GACGCAACCC CCACTGGTTG GGGCATTGCC ACCACCTGTC
4001 AGCTCCTTTC CGGGACTTTC GCTTTCCCCC TCCCTATTGC CACGGCGGAA
4051 CTCATCGCCG CCTGCCTTGC CCGCTGCTGG ACAGGGGCTC GGCTGTTGGG
4101 CACTGACAAT TCCGTGGTGT TGTCGGGGAA ATCATCGTCC TTTCTTGGC
4151 TGCTCGCCTG TGTTGCCACC TGGATTCTGC GCGGGACGTC CTTCTGCTAC
4201 GTCCCTTCGG CCTCAATCC AGCGGACCTT CCTTCCGCG GCCTGCTGCC
4251 GGCTCTGCGG CCTCTTCCGC GTCTTCGCCT TCGCCCTCAG ACGAGTCGGA
4301 TCTCCCTTTG GGCCGCCTCC CCGCATCGAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC
4351 TGTGCCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCCCTC CCCGTGCCTT
4401 CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG TCCTTTTCTA ATAAAATGAG
4451 GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG
4501 GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG
4551 CTGGGGATGC GGTGGGCTCT ATGGCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGATCC
4601 TCTCTTAAGG TAGCATCGAG ATTTAAATTA GGGATAACAG GGTAATGGCG
4651 CGGGCCGCAG GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG
4701 CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC
4751 TTTGCCCGGG CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

10

20

SEQ ID NO: 61 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV5.CYP4V2st. AAV5.CYP4V2st has the same promoter (CAG), enhancer (WPRE) and polyA (bGH-polyA) as AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op and AAV5.CYP4V2op (SEQ ID NO: 60) but different CYP4V2 cDNA and junction/linker sequences:

30

Left-ITR: 1-141

CAG promoter: 166-1880

CYP4V2st cDNA: 1938-3515

WPRE enhancer: 3551-4139

bGH polyA: 4163-4387

Right-ITR: 4399-4539

```

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGCTCGCCCG GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGCCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC TGCGGCCTAA
151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
251 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCC GCCCAT

```

40

【 0 6 3 6 】

【 数 2 5 】

301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
 351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
 401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
 451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
 501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTGCG
 551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
 601 CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
 651 GCGGGGGGGG GGGGGGGGCG GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
 701 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGGCG
 751 GCTCCGAAAG TTTCTTTTAA TGGCGAGGCG GCGGCGGGCG CGGCCCTATA
 801 AAAAGCGAAG CGCGCGGGCG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
 851 GCCCCGCTCC GCGCCGCCTC GCGCCGCCCG CCCC GGCTCT GACTGACCGC
 901 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCTTCTCCT CCGGGCTGTA
 951 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GCTGCGTGAA
 1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TCGGGGGGGG AGCGGCTCGG
 1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGC GTGGGGA GCGCCGCGTG CGGCCCGCGC
 1101 TGCCCCGGCG CTGTGAGCGC TCGGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
 1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCG GCGGTGCGGG
 1201 GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
 1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTGCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
 1301 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTGCGGTGC GGGGCTCCGT
 1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGGCAGGT
 1401 GGGGGTGCCG GCGGGGGCGG GGCCGCCTCG GGCCGGGGAG GGCTCGGGGG
 1451 AGGGGCGCGG CGGCCCGGGA GCGCCGGCGG CTGTCGAGGC GCGGCAGACC
 1501 GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
 1551 TTGTCCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCCG CCGCACCCCC
 1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CCGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
 1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGGCGCCGC CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
 1701 GCCTCGGGGG TGCCGCAGGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG
 1751 GCGGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
 1801 ACCATGCTTC TTTTTCCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
 1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
 1901 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT
 1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGGCG GGCGAGTGCC
 2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGGC
 2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCCATCCCC ACGGTGGCCC
 2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
 2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
 2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTGCG GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG
 2251 CAGAAAATGT GGAGGTAATT TTAAGTAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
 2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
 2351 TACTGGAAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTTCC
 2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT
 2451 ATATTGGTTA AGAACTTGA AAAACACATT AACCAAGAAG CATTTAACTG
 2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
 2551 TGGGGAAGAA TATTGGTGCT CAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCTG
 2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG
 2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
 2701 AAAAGAGCCT TCAGATCCTA CATACTTTTA CCAACAGTGT CATCGCTGAA
 2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG

10

20

30

40

【0 6 3 7】

【数 2 6】

```

2801 CTCTGCCCCC TCCAAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTGAGAA
2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGCAC GATACAACTG CAGCTGCAAT
2951 AAACCTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG
3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCGCTACA
3051 GTAGAAGACC TGAAGAAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
3101 CCTTCGCCTT TTTCTTCTG TTTCTTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG
3151 ATTGTGAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC
3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCCA ACCCCGAGGA
3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
3301 ATGCCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAAG
3351 TTTGCTGTGA TGGAAGAAAA GACCATTCTT TCGTGCATCC TGAGGCACTT
3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCATCTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
3601 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
3701 TCCTGGTTGT TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
3751 TGGCGTGGTG TGCATGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTTGGGGCA
3801 TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
3851 ATTGCCACGG CGGAACCTCAT CGCCGCCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTCG GGGAAATCAT
3951 CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
4001 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
4051 CCGCGGCTG CTGCGGCTC TGCGGCTCT TCCGCTCTT CGCCTTCGCC
4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCGC CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
4151 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
4201 TCCCCCGTGC CTTCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTTC
4251 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCAG
4401 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG
4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

10

20

30

SEQ ID NO: 62 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV8.CYP4V2fv. AAV8.CYP4V2fv has the same promoter (CAG), enhancer (WPRES) and polyA (bGH-polyA) and junction/linker sequences as AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) and differs only in CYP4V2 cDNA sequence:

```

Left-ITR: 1-141
CAG promoter: 166-1880
CYP4V2fv cDNA: 1938-3515
WPRES enhancer: 3551-4139
bGH polyA: 4163-4387
Right-ITR: 4399-4539

```

40

【 0 6 3 8 】

【 数 2 7 】

50

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
 51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
 101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC TCGGGCCTAA
 151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
 201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
 251 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCC GCCCAT
 301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
 351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGCGAGT
 401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
 451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
 501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCG
 551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
 601 CCCCCAATT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
 651 GCGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
 701 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGGCG
 751 GCTCCGAAAG TTTCCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGGCG CGGCCCTATA
 801 AAAAGCGAAG CGCGCGGGCG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
 851 GCCCCGCTCC GCGCCGCCCT GCGCCGCCCG CCCC GGCTCT GACTGACCGC
 901 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
 951 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GCTGCGTGAA
 1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TCGGGGGGGG AGCGGCTCGG
 1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TCGTGGGGA GCGCCGCGTG CCGCCCGCGC
 1101 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TCGGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
 1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC CCGGTGCGGG
 1201 GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
 1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
 1301 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTGCGGTGC GGGGCTCCGT
 1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGGT GGCGGCAGGT
 1401 GGGGGTGCCG GCGGGGGCGG GGCCGCCTCG GGCCGGGGAG GGCTCGGGGG
 1451 AGGGGCGCGG CGGCCCCGGA GCGCCGGCGG CTGTGAGGCG GCGGCGAGCC
 1501 GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
 1551 TTGTCCCAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGGCGCG CCGCACCCCC
 1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
 1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCCGCGCCGC CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
 1701 GCCTCGGGGC TGCCGCAGGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG
 1751 GCGGGGGTTC GGCTTCTGCG GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
 1801 ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTTCCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
 1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
 1901 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT
 1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGC GGCGAGTGCC
 2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGGC
 2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCCATCCCC ACGGTGGCCC
 2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
 2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
 2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTCG GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG
 2251 CAGAAAATGT GTAGGTAATT TTAAC TAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
 2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
 2351 TACTGGAAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTTCC
 2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT

10

20

30

40

【0 6 3 9】

【数 2 8】

```

2451 ATATTGGTTA AGAAACTTGA AAAACACATT AACCAAGAAG CATTTAACTG
2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
2551 TGGGGAAGAA TATTGGTGCT CAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCGT
2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG
2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
2701 AAAAGAGCCT TAAGATCCTA CATACTTTTA CCAACAGTGT CATCGCGGAA
2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG
2801 CTCTGCCCCC TCCAAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTCGAGAA
2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGCAC GATACAACTG CAGCTGCAAT
2951 AAAGTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCCTAA CCCAGAAAGTC CAGAAAAAAG
3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCGCTACA
3051 GTAGAAGACC TGAAGAAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
3101 CCTTCGCCTT TTTCTTCTG TTTCTTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG
3151 ATTGTTGAAGT GGCAGGTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC
3201 ATTCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCCA ACCCGGAGGA
3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
3301 ATGCTTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAAG
3351 TTTGCTGTGA TGGGAAGAAA GACCATTCTT TCGTGCATCC TGAGGCAGCT
3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCATCTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
3601 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
3701 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
3751 TGGCGTGGTG TGCAGTGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
3801 TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
3851 ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTCG GGGAAATCAT
3951 CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
4001 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
4051 CCGCGGCTCT CTGCCGCTC TGCGGCTCT TCCGCGTCTT CGCTTCGCTC
4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCGG CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
4151 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
4201 TCCCCCGTGC CTTCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
4251 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCAG
4401 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCG ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG
4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

10

20

30

SEQ ID NO: 63 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in AAV5.CYP4V2op (new). AAV5.CYP4V2op (new) has the same promoter (CAG), enhancer (WPRE) and polyA (bGH-polyA) and the same junction/linker sequences as AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) and AAV8.CYP4V2fv (SEQ ID NO: 62) but different CYP4V2 cDNA sequences:

Left-ITR: 1-141

CAG promoter: 166-1880

40

【 0 6 4 0 】

【 数 2 9 】

CYP4V2op cDNA: 1938-3515
 WPRE enhancer: 3551-4139
 bGH polyA: 4163-4387
 Right-ITR: 4399-4539

```

CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TGCGGCCTAA
GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT
TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCG
AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
CCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
GGCGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
GCTCCGAAAAG TTTCTTTTAA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA
AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCGT
GCCCCGCTCC GCGCGGCCTC GCGCCGCCCG CCCC GGCTCT GACTGACCGC
GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTCTGTG GCTGCGTGAA
AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TCGGGGGGGG AGCGGCTCGG
GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGGTGGGGA GCGCCGCGTG CCGCCCGCGC
TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGGGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTCGGGTGC GGGGCTCCGT
GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCGAGGT
GGGGGTGCCG GCGGGGCGG GCGCGCCTCG GCGCGGGGAG GGCTCGGGGG
AGGGGCGCGG CGGCCCGGA GCGCGGCGG CTGTGAGGC GCGGCGAGCC
GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
TTGTCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCGG CCGCACCCCC
TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CCGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGCGCGC CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
GCCTCGGGGC TGCCGCGAGG GGACGGCTGC CTTCGGGGGG GACGGGGCAG
GGCGGGGTTT GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTTCCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACC
ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCACTGTCAC
TGGCTGGGGCTTCACTGGTGTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCCTCCTACGCCAGAAAGTGGCAGCAGAT
GAGGCCCATCCCTACCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTGCTGATGAAGCCTGACGGC
AGAGAGTTCTTTTTCAGCAGATCATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGCACATGCCACTGCTGAAGCTGTGGG
TGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTGTACAACGCCGAGAATGTGGAAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCA
GATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCCCTGGAGCCTTGGCTGGGCTGGGCTGCTGACCTCTACAGGC

```

10

20

30

40

【0 6 4 1】

【数 3 0】

AACAAGTGGAGGAGCCGGAGAAAGATGCTGACCCCAACATTCCACTTTACAATCCTGGAGGACTTCCTGG
 ACATCATGAACGAGCAGGCCAATATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAACCAGGAGGCCCTTTAA
 TTGCTTCTTTTACATCACCCTGTGCGCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCTATGGGCAAGAACATCGGC
 GCCCAGTCTAATGACGATAGCGAGTACGTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCA
 TCAAGATGCCCTGGCTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAAGAAGTC
 CCTGCAGATCCTGCACACCTTTACAACTCTGTGATCGCCGAGAGAGCCAATGAGATGAACGCCAATGAG
 GACTGTAGGGGCGATGGAAGGGGCGAGCGCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTTCCTGGACCTGCTGC
 TGAGCGTGACCGACGATGAGGGCAATCGCCTGTCCCACGAGGACATCCGGGAGGAGGTGGATACATTCAT
 GTTTGAGGGACACGACACCACAGCCGCCGCCATCAACTGGTCCCTGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAG
 GTGCAGAAGAAGGTGGATCACGAGCTGGACGACGTGTTCCGCAAGTCCGACAGGCCAGCAACCCTGGAGG
 ATCTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCCTGATCAAGGAGACACTGCGCCTGTTCCCTCTGTGCCCTCT
 GTTTGCCCGGTCCGTGTCTGAGGACTGTGAGGTGGCCGGCTATCGCGTGCTGAAGGGCACCGAGGCCCTG
 ATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGGACCCAGGTATTTCCCTAACCAGAGGAGTTTCAGCCAGAGAGAT
 TCTTTCCCGAGAATGCCAGGGCAGGCACCTTACGCCTATGTGCCATTCTCCGCCGACCAAGGAAGTC
 CATCGGACAGAAGTTTGCCGTGATGGAGGAGAAAACCATCCTGTCTTGTATCCTGAGACACTTCTGGATC
 GAGAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGCTGGGCCTGGAGGGACAGCTGATCCTGCGGCCAAGCAACGGCATCT
 GGATCAAACCTGAAAAGAAGGAACGCTGACGAGAGGTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG
 GTTAATCGAT

AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
 TGGCGTGGTG TGCATGTGT TTGCTGACGC AACCCCCACT GGTTGGGGCA
 TTGCCACCAC CTGTGAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
 ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTG GGGAAATCAT
 CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
 CCGCGGCCTG CTGCGGCTC TGCGGCCTCT TCCGCGTCTT CGCCTTCGCC
 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCCG CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
 TCCCCCGTGC CTTTCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
 AATAGCAGG ATGCTGGGGA TGCGGTGGG TCTATGGCCG CGGGCCGCAG
 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG
 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

SEQ ID NO: 64 - Sequence of CYP4V2 expression cassette in
 scAAV1.CYP4V2op, scAAV5.CYP4V2op, and scAAV9.CYP4V2op.
 Left-ITR (truncated): 1-117

EFS promoter: 130-364

CYP4V2op cDNA: 520-2097

SPA: 2116-2169

Right-ITR: 2263-2403

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc cggggcaaaag
 cccgggcgctc
 61 gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag
 ggagtggacg

【 0 6 4 2 】

【数 3 1】

10

20

30

40

50

121 cgtaggcctg attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc
 ccacagtccc
 181 cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt
 ggcgcggggt
 241 aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgaggggtg
 ggggagaacc
 301 gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg
 ccgccagaac
 361 acagggtgtcg tgacgcgacc aggtatgcat ctgcagctct aaggtaaata
 taaaattttt
 421 aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttct ctcttttaga
 ttccaacctt
 481 tggaactgac tgcagggatc caagctttct agagccacca tggctggact
 gtggctggga
 541 ctggtgtggc agaaactgct gctgtggggg gccgcttccg cactgtcact
 ggctggggct
 601 tcaactggtgc tgagcctgct gcagaggggtg gcctcctacg ccagaaagtg
 gcagcagatg
 661 aggcccatcc ctaccgtggc cagagcctat ccactggtgg gacacgcact
 gctgatgaag
 721 cctgacggca gagagttctt tcagcagatc atcgagtaca cagaggagta
 taggcacatg
 781 ccaactgctga agctgtgggt gggaccctg cctatggtgg ccctgtacaa
 cgccgagaat
 841 gtggaagtga tcctgaccag cagcaagcag atcgataagt ctagcatgta
 taagttcctg
 901 gagccttggc tgggcctggg cctgctgacc tctacaggca acaagtggag
 gagccggaga
 961 aagatgctga ccccaacatt ccactttaca atcctggagg acttcctgga
 catcatgaac
 1021 gagcaggcca atatcctggg gaagaagctg gagaagcaca tcaaccagga
 ggcctttaat
 1081 tgcttctttt acatcaccct gtgcgccctg gacatcatct gtgagacagc
 tatgggcaag
 1141 aacatcggcg ccagtcctaa tgacgatagc gagtacgtgc gggccgtgta
 tagaatgagc
 1201 gagatgatct ttaggcgcat caagatgccc tggctgtggc tggatctgtg
 gtatctgatg
 1261 ttcaaggagg gctgggagca caagaagtcc ctgcagatcc tgcacacctt
 taaaaactct
 1321 gtgatcgccg agagagccaa tgagatgaac gccaatgagg actgtagggg
 cgatggaagg
 1381 ggcagcgccc cttccaagaa caagcggaga gccttcctgg acctgctgct
 gagcgtgacc
 1441 gacgatgagg gcaatcgctt gtcccacgag gacatccggg aggaggtgga
 tacattcatg
 1501 tttgagggac acgacaccac agccgccgcc atcaactggg ccctgtacct
 gctgggctct
 1561 aatccagagg tgcagaagaa ggtggatcac gagctggacg acgtgttcgg
 caagtccgac

10

20

30

40

【0 6 4 3】

【数 3 2】

50

1621 aggccagcaa ccgtggagga tctgaagaag ctgagatacc tggagtgcgt
gatcaaggag
1681 aactgcgcc tgttcccctc tgtgcctctg tttgcccggt ccgtgtctga
ggactgtgag
1741 gtggccggct atcgctgct gaagggcacc gaggccgtga tcatccctta
cgccctgcac
1801 cgggacccca ggtatttccc taaccagag gagtttcagc cagagagatt
ctttcccgag
1861 aatgccagc gcaggcacc ttacgcctat gtgccattct ccgccggacc
aaggaactgc
1921 atcggacaga agtttgccgt gatggaggag aaaaccatcc tgtcttgtat
cctgagacac
1981 ttctggatcg agagcaatca gaagaggag gagctgggcc tggagggaca
gctgatcctg
2041 cggccaagca acggcatctg gatcaaactg aaaagaagga acgctgacga
gaggtaaaag
2101 cttgaattcc tcgaggatcc aataaaagat ctttattttc attagatctg
tgtgttggtt
2161 ttttgtgtgt ctagttgcca gccatctggt gtttgccct ccccgctgcc
ttccttgacc
2221 ctggaaggct ccactcccag tttaaactta attaagggcc gcaggaacc
ctagtatgg
2281 agttggccac tccctctctg cgcgctcgt cgctcactga ggccgggcca
ccaaaggctg
2341 cccgacgcc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc
agctgctgc
2401 agg

10

20

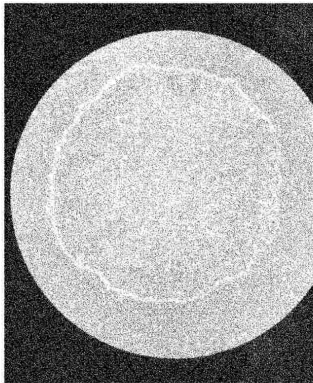
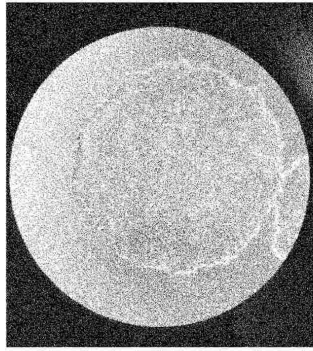
30

40

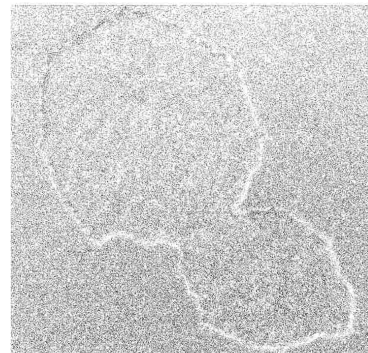
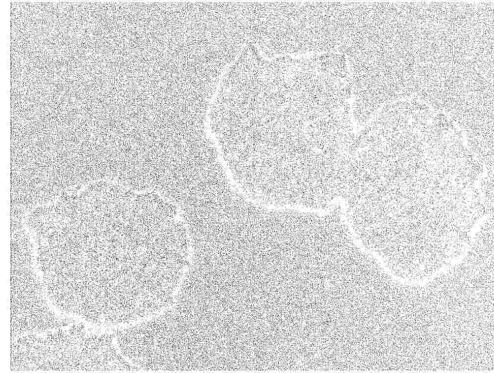
50

【図面】

【図1A (i)】



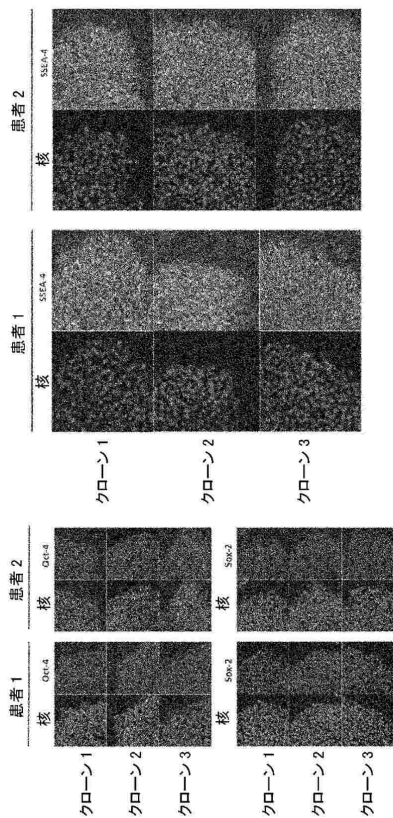
【図1A (ii)】



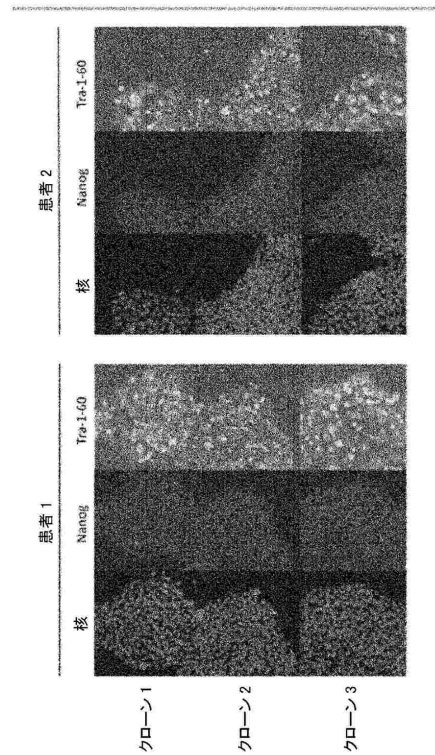
10

20

【図1A (iii)】



【図1A (iv)】

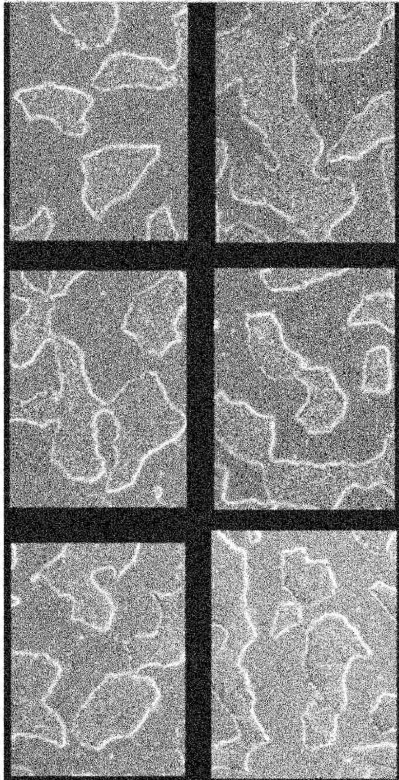


30

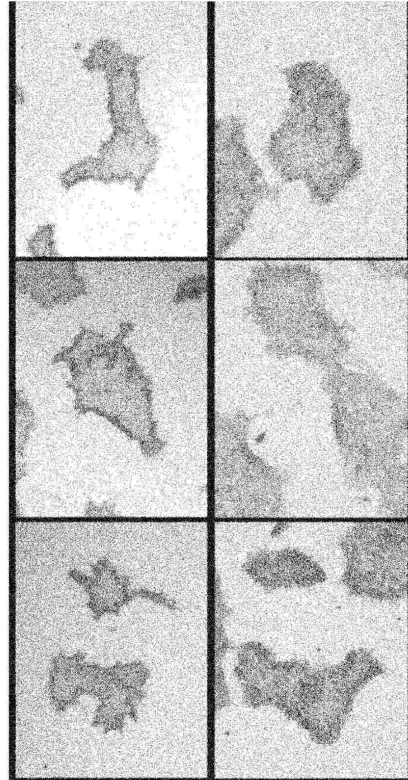
40

50

【図 1 B (i)】



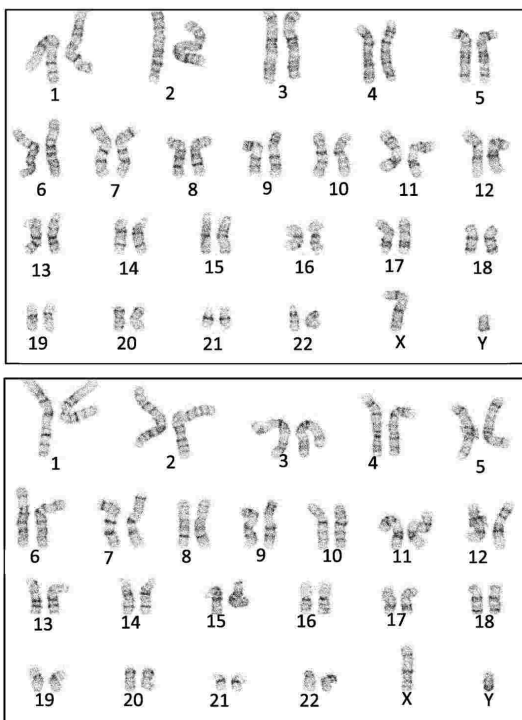
【図 1 B (i i)】



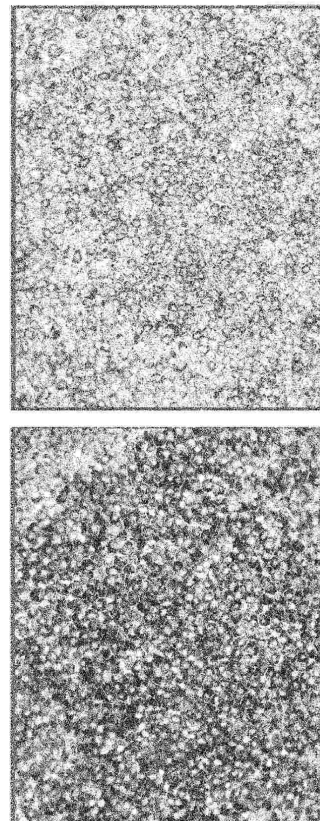
10

20

【図 1 C】



【図 2 A (i)】

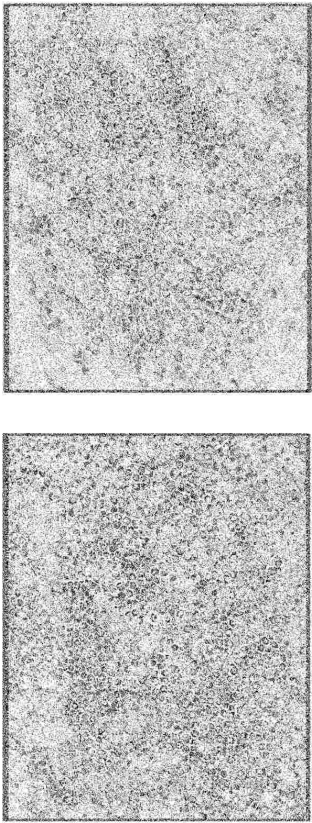


30

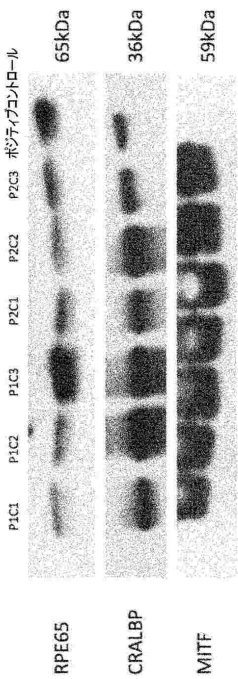
40

50

【図 2 A (i i)】



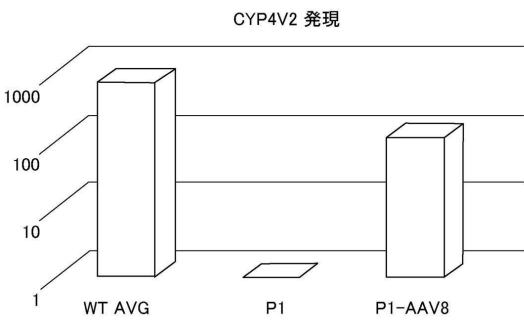
【図 2 B】



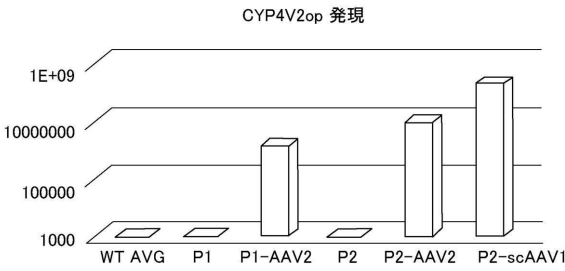
10

20

【図 3】



【図 4】

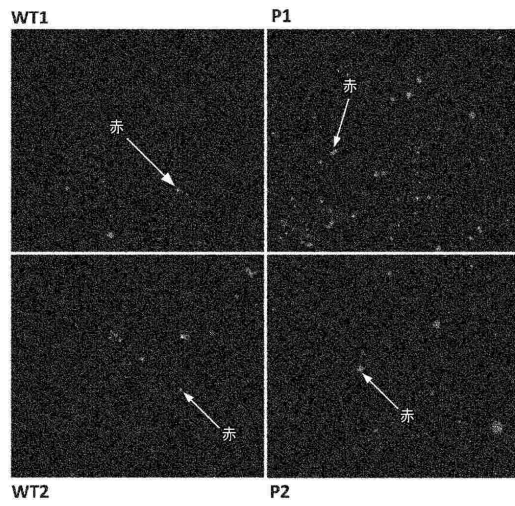


30

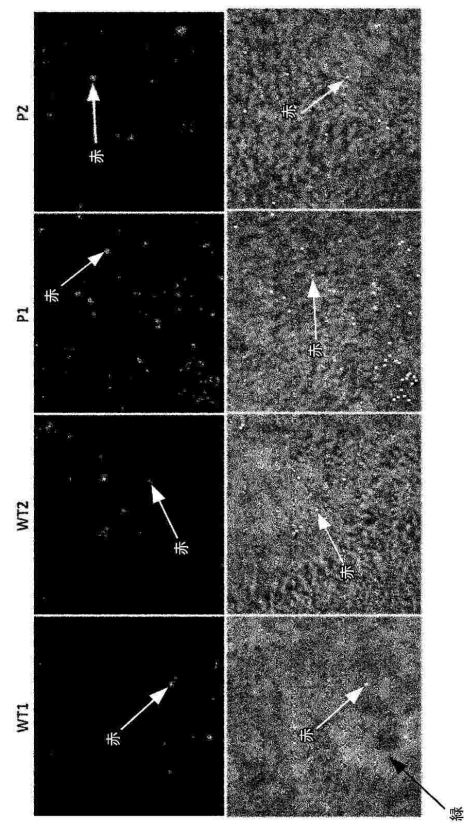
40

50

【図 5 A】



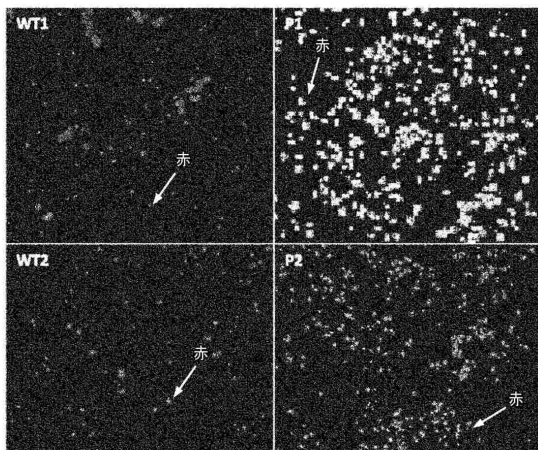
【図 5 B】



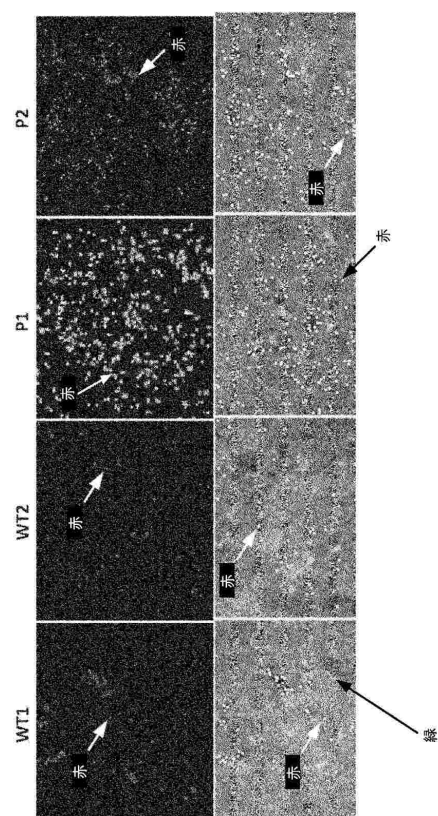
10

20

【図 6 A】



【図 6 B】

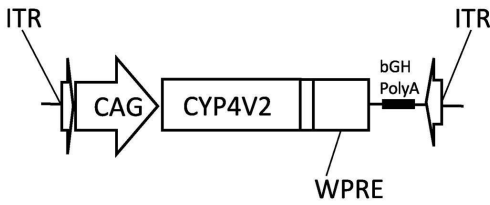


30

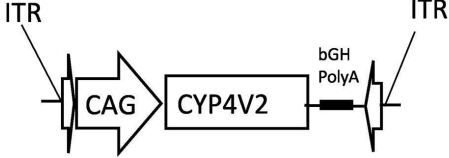
40

50

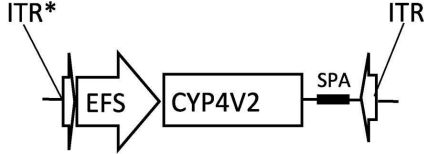
【図 7 A】



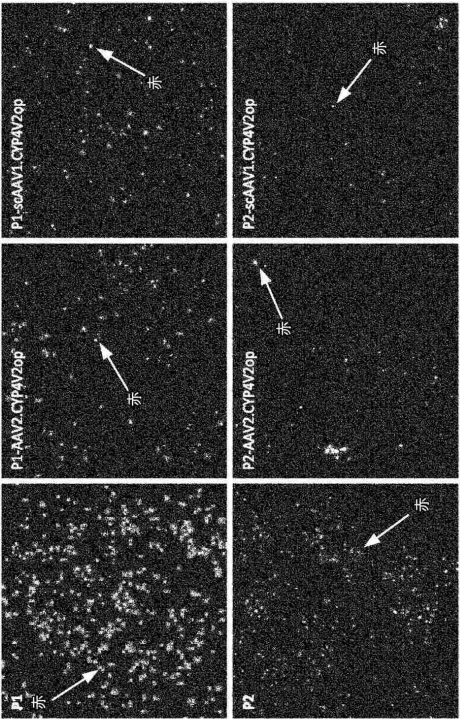
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 8 A】



10

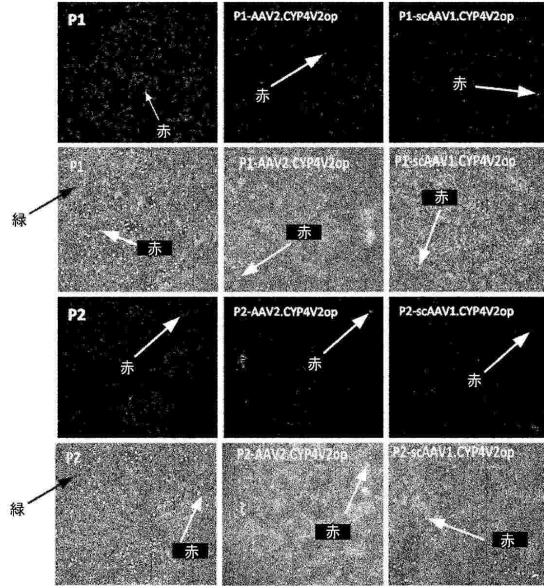
20

30

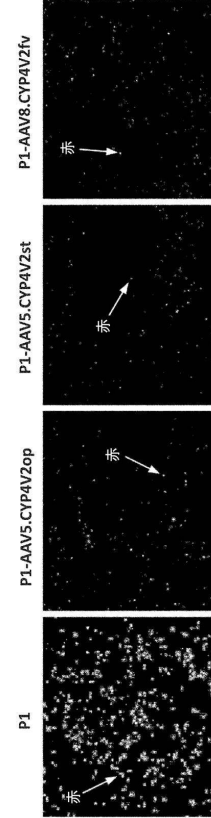
40

50

【図 8 B】



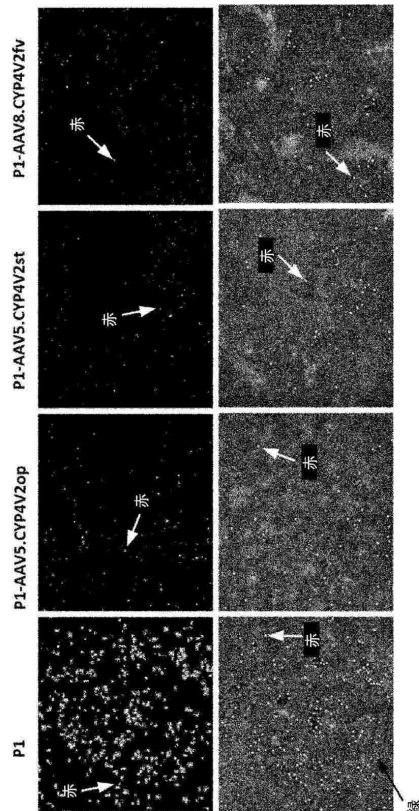
【図 9 A】



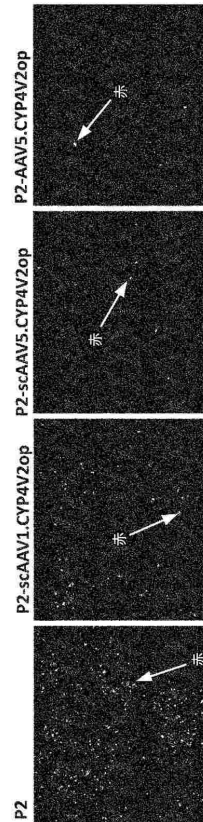
10

20

【図 9 B】



【図 10 A】

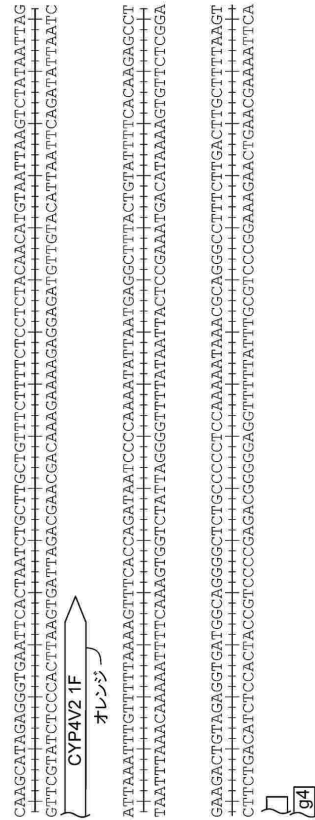


30

40

50

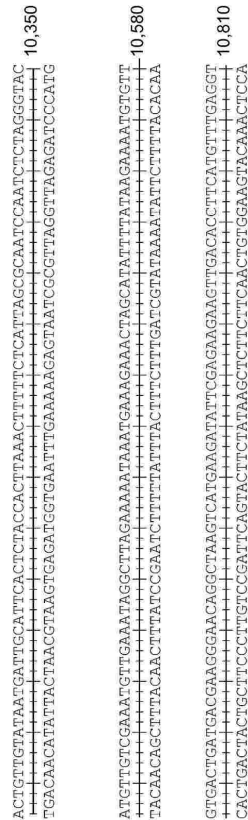
【図 1 2 - 2】



ATCAAAATTTAAAGTAGTTTAACTAAGAAGATTTCATTATATTAAATTAAGAAATTTAAGAAACTGATTAA
TAGTTTAAATTTCAACAAATTGATTCTCTTAAGTAATATAAATTAATCTTTAAIGTTTTAAATTCCTTTGACTAAT

CAGGCTTCCTTCTAAOCTCCAGACATGCAAGTCCACTTCCTCAACACCTGCTTTCTGAGGTTCCAGCAGATGAGCAC
GTCCGAAGGAAGATTGAGGGTCTGTACGTTGAGGTGAAGGAGTGGTGGACGAAAGACTCCAAGGTCGCTACTCGTG

【図 1 2 - 3】



ACTACAGCTCAACTCTCTCAGAAACGATTTTGACTAGTCTGGCGCAGCAGCAGATTTGTTTTCCT
TCAATGTCGAGTTGAAGAGTCTTTTCTTAACCTGATCAGACCGCTGCTGCTCATCTGTGTAAACAAAAAGGA
11,040

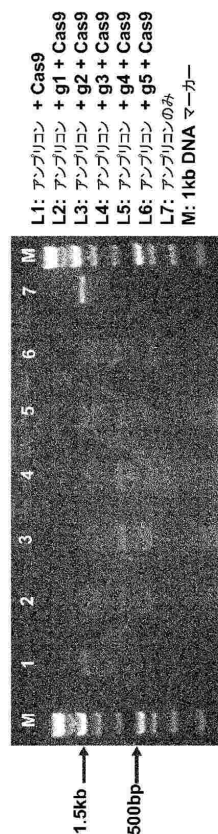
TTAGTGTGCCATGAGTACTCTACCTAGAGGACAGTTAAGAGCCCTCCACAGAAATCAGCCAGTTCATGA
AATCAGCAGGCTACTCGATGAGATGATCTCTGTCATTTCTGGGAGGTTGCTCTTAGTCGGTCAAGTACT
11,270

オレンジ
CYP4V2 1R

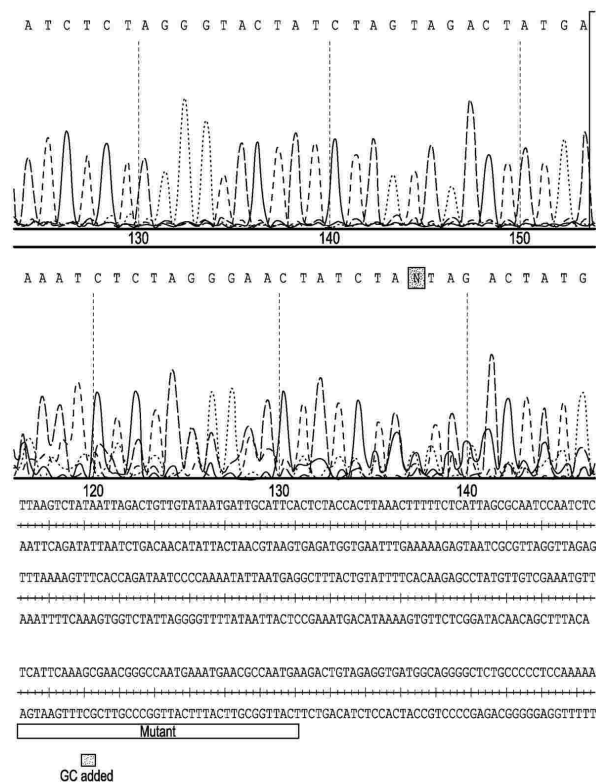
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】

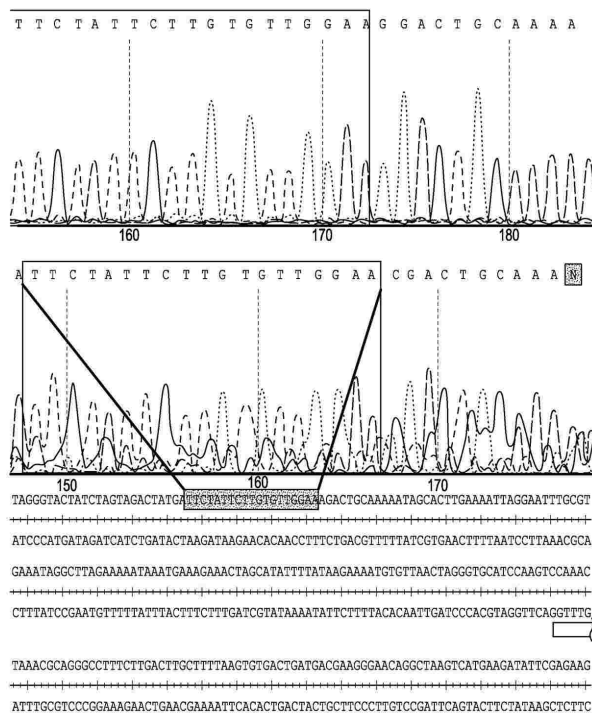


30

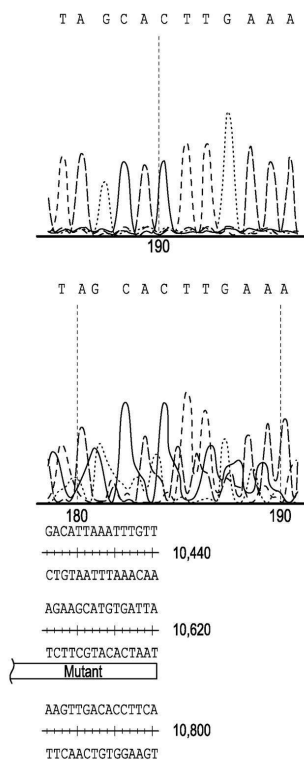
40

50

【圖 14-2】



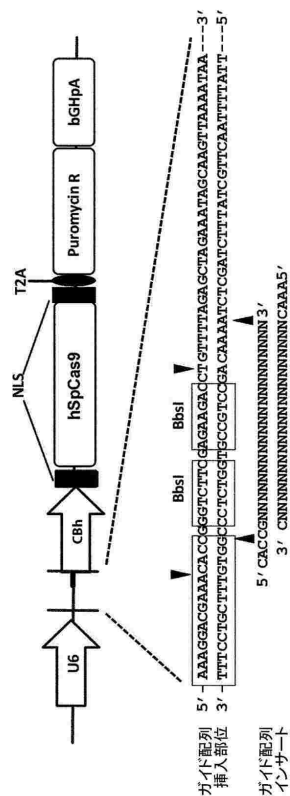
【圖 14-3】



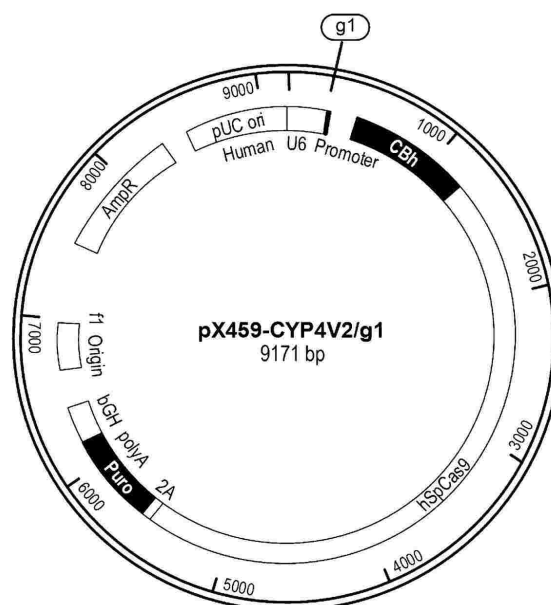
10

20

【図 15】



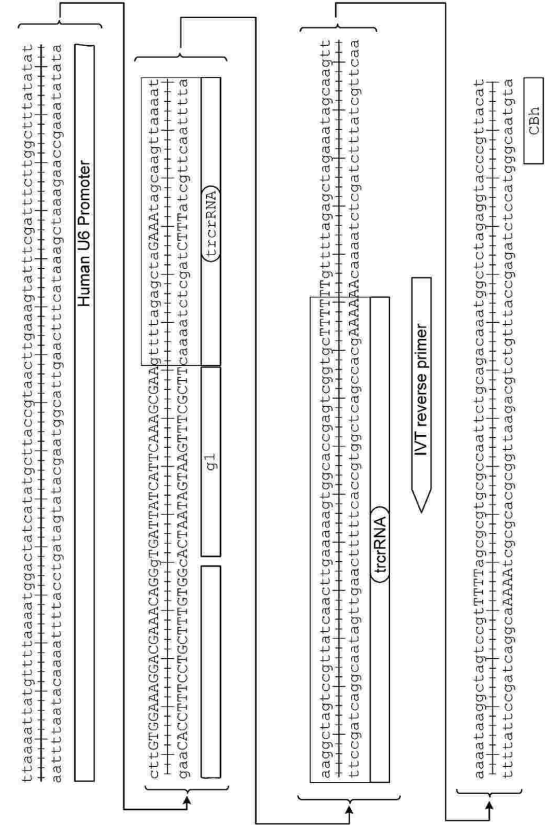
【図 16】



30

40

【 17 】



【配列表】

0007448953000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
C 1 2 N	15/53	(2006.01)	C 1 2 N	15/53	Z N A

アメリカ合衆国 1 0 0 3 2 ニューヨーク州 ニューヨーク # 6 イー ヘブン アベニュー 7 0

審査官 西 賢二

(56)参考文献

中国特許出願公開第 1 0 3 3 7 4 5 7 4 (C N, A)

特表 2 0 1 7 - 5 0 0 0 6 0 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 7 1 8 3 (W O, A 1)

Nakano, M. et al., "CYP4V2 in Bietti's crystalline dystrophy: ocular localization, metabolism of ω -3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.H331P variant", Mol. Pharmacol., 2012年, Vol. 82, pp. 679-686

五十嵐勉 ほか, "眼科分野における遺伝子導入法の開発", 日医大医学会誌, 2017年04月, Vol. 13, pp. 88-96

Nakano, M. et al., "Expression and characterization of CYP4V2 as a fatty acid omega-hydroxylase", Drug Metab. Dispos., 2009年, Vol. 37, pp. 2119-2122

GenBank, [online], Accession No: BC060857, Homo sapiens cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 2, mRNA (cDNA clone MGC:71790 IMAGE:30333559), complete cds, Internet, [retrieved on 2022.08.04], <URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BC060857>>

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 / 9 9

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q