

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6571075号  
(P6571075)

(45) 発行日 令和1年9月4日(2019.9.4)

(24) 登録日 令和1年8月16日(2019.8.16)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105 Z N A
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711 Z M D
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z

請求項の数 17 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2016-524795 (P2016-524795)  
 (86) (22) 出願日 平成26年7月8日(2014.7.8)  
 (65) 公表番号 特表2016-523946 (P2016-523946A)  
 (43) 公表日 平成28年8月12日(2016.8.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/064604  
 (87) 国際公開番号 W02015/004133  
 (87) 国際公開日 平成27年1月15日(2015.1.15)  
 審査請求日 平成29年6月30日(2017.6.30)  
 (31) 優先権主張番号 13305968.3  
 (32) 優先日 平成25年7月8日(2013.7.8)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591100596  
 アンスティチュ ナショナル ドウ ラ  
 サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ  
 ディカル  
 フランス国、エフー75013 パリ、リ  
 ユ・ドウ・トルビアック 101  
 (73) 特許権者 515028470  
 フォンダシオン・イマジネ  
 FONDATION IMAGINE  
 フランス国、エフー75015 パリ、ブ  
 ールヴァール・ドウ・モンパルナス 24

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングを、それを必要とする対象の網膜において行うための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングを、それを必要とする対象の光受容細胞において硝子体内注射により行うための配列番号25、配列番号30又は配列番号31からなる配列を含む、裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物であって、

対象は、光受容細胞の機能及び/又は生存に重要な遺伝子において、スプライシングを改変し、及び/又は中途終止を生成する突然変異により引き起こされる網膜疾患を患っており、

裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対象の光受容細胞内で、突然変異が網膜疾患を引き起こす遺伝子からのpre-mRNAにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングを行う、

医薬組成物。

【請求項 2】

網膜疾患が、網膜変性疾患又は網膜停止性疾患である、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項 3】

網膜疾患が、色素性網膜炎、加齢黄斑変性、錐体杆体ジストロフィー、レーバー先天黒内障、シュタルガルト病からなる群より選択される、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項 4】

網膜疾患が、c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異に関連するレーバー先天黒内障

である、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 5】

裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、オリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、ロックド核酸 (LNA) オリゴヌクレオチド、モルホリノオリゴヌクレオチド、トリシクロ-DNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド、U7-又はU1-介在性アンチセンスオリゴヌクレオチド、それらのコンジュゲート産物、例えばペプチドコンジュゲーション型、ナノパーティクル複合型アンチセンスオリゴヌクレオチド、2'-O-Me RNA/ENAキメラオリゴヌクレオチド、及び2'-O-メチル-ホスホロチオアートオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

疾患が、シュタルガルト病であり、そして裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号：25である、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

網膜疾患が、レーバー先天黒内障であり、そしてアンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングが、Cep290プレmRNAのエクソン36で行われる、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 8】

網膜疾患が、レーバー先天黒内障であり、そして裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号30又は配列番号31からなる配列を含む、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 9】

光受容細胞の機能及び/又は生存に重要な遺伝子において、スプライシングを改変し、及び/又は中途停止を生成する突然変異により引き起こされる網膜疾患のそれを必要とする対象における処置のための配列番号25、配列番号30又は配列番号31からなる配列を含む裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物であって、ある量の裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、対象の硝子体内に注射する工程を含み、

ここで、裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対象の光受容細胞内で、突然変異が網膜疾患を引き起こす遺伝子からのプレmRNAにおいてアンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングを行う、医薬組成物。

【請求項 10】

裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、対象の光受容細胞の核内でアンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングを行うために使用される、請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 11】

網膜疾患が、網膜変性又は網膜停止性疾患である、請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 12】

網膜疾患が、色素性網膜炎、加齢黄斑変性、錐体杆体ジストロフィー、レーバー先天黒内障、シュタルガルト病からなる群より選択される、請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 13】

網膜疾患が、c. 2991 + 1655 A > G突然変異に関連するレーバー先天黒内障である、請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 14】

裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、オリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、ロックド核酸 (LNA) オリゴヌクレオチド、モルホリノオリゴヌクレオチド、トリシクロ-DNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド、U7-又はU1介在性アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチドコンジュゲーション型、ナノパーティクル複合型アンチセンスオリゴヌクレオチド、2'-O-Me RNA/ENAキメラオリゴヌクレオチド、及び2'-O-メチル-ホスホロチオアートオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、請求項 9 記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

網膜疾患が、シユタルガルト病であり、そして裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 25 である、請求項 9 記載の医薬組成物。

## 【請求項 16】

網膜疾患が、レーバー先天黒内障であり、そしてアンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングが、Cep290 プレ mRNA のエクソン 36 で行われる、請求項 9 記載の医薬組成物。

## 【請求項 17】

網膜疾患が、レーバー先天黒内障であり、そして裸のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 30 又は配列番号 31 からなる配列を含む、請求項 9 記載の医薬組成物。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の分野：

本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングを、それを必要とする対象の網膜において行うための方法に関する。

## 【0002】

発明の背景：

ヒトゲノムは、タンパク質をコードする遺伝子 20,000 ~ 25,000 個からなるが、各遺伝子から発生された複数の RNA アイソフォームの結果として、mRNA 配列及びコードされるタンパク質のレパートリーは、はるかに大きい。RNA 転写物の多様性は、いくつかのメカニズムから進展するが、RNA の選択的スプライシングは、高等真核生物における表現型多様性を推進する主要な要因に相当する。実際にスプライシング事象は、高度に普及しており、全ての多エクソン遺伝子の 95% について起こると推定されている。観察される RNA 選択的スプライシングには数多くの様式があるが、そのうち最もよく見られるものは、エクソンスキッピングである。この様式では、一部の条件下又は特定の組織において特定のエクソンが mRNA 中に含まれる場合もあれば、他では mRNA から除外される場合もある。大多数のスプライシング事象は、コードされるタンパク質を変更するが、半数超が mRNA のリーディングフレームをシフトさせる。よく見られる遺伝的変異体は、選択的スプライシングにおける変化を「正常な」生理学的範囲内に収めることができる。しかし、スプライシングにおける異常な変動が、大部分のヒト遺伝障害において、特に網膜疾患において意味づけられており、遺伝要素を有する疾患の最大 50% 超がスプライシング突然変異を伴う。コドンの位相シフトが中途終止シグナルを導入するならば、異所性スプライシングを引き起こす突然変異は、典型的には、非機能性タンパク質又はナンセンス介在性 RNA 崩壊を招く。

20

30

## 【0003】

網膜内層に特異的な遺伝子における突然変異は、遺伝性網膜疾患 (IRD)、例えば先天性停止性夜盲 (双極細胞)、遺伝性視神経症 (網膜神経節細胞) を招くおそれがあるが、大部分の場合、その原因は光受容細胞又は網膜色素上皮 (RPE) 細胞において発現される遺伝子における突然変異である。200 個を超える遺伝子において IRD を引き起こす突然変異が同定されており (<http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>)、一連の遺伝パターンが表示されている。最もよく見られる IRD は、少なくとも 30 個の遺伝子が関連している色素性網膜炎である。網膜疾患の症例の約 10% は、早期発症型網膜ジストロフィーの結果である。例えば、レーバー先天黒内障 (LCA、MIM204000) は、小児における失明のよく見られる原因である (10%)。それは、出生時又は生後 1 ヶ月における失明又は重度の視覚不全の原因となる最も重症の遺伝性網膜ジストロフィーである。その疾患は、その後数ヶ月に極めて乏しい視力 (VA 光覚; I 型) を有する劇的に重症で停止性の錐体杆体疾患、又は生後 10 年を超えて測定可能な視力 (20/200 VA 60/200; II 型) を有する、進行性で、なお重症の錐体杆体ジストロフィーのいずれかとして現れる。今までに、高度に多様なパターンの組織分布及び機能を有する遺伝

40

50

子18個の変更が、LCAにおいて報告されている (Kaplan, J. *Ophthalmic Genet.* 29, 92-8 (2008); den Hollander, Al et al. *Prog Retin Eye Res.* 27, 391-419 (2008); Perrault, I et al. *Nat Genet* (2012))。西洋諸国では、中心体タンパク質290 (CEP290)を冒す突然変異が、本疾患の主因である (20%) (den Hollander, Al et al. *Am J Hum Genet.* 79, 556-61 (2006); Perrault, I et al. *Hum Mutat.* 28, 416 (2007))。それらの中で、c. 2991 + 1655 A > G突然変異は、LCAの全症例の10%超を占め、この変化を治療のための重要な標的にしている。この突然変異は、イントロン26中に深く局在し、強い隠れたアクセプタープライス部位下流に強いドナープライス部位を作る。結果として、野生型メッセンジャーに加えて突然変異型mRNAが、突然変異型対立遺伝子から転写される。突然変異型mRNAは、停止コドンコードする追加的なエクソンを含む。

10

## 【0004】

突然変異に起因するタンパク質短縮化をバイパスする手段としてのエクソンスキッピングの潜在性を考慮して、網膜疾患を患う対象の網膜における異所性プライシングを修正するためにアンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピング戦略が現在検討されている。このアプローチは、特に有望と思われる。実際に：1) DMD突然変異型エクソンをスキップするために治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドの筋肉内注射を受けたデュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する患者において目を見張る結果が最近報告された (Heemskerk et al., *Ann N Y Acad Sci.* 2009)、2) 野生型タンパク質が突然変異型対立遺伝子から (少量) 発現され、エクソンスキッピング後の免疫応答のリスクを予防しているため、LCA患者の線維芽細胞でよく見られるディープイントロンCEP290突然変異を修正するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングの概念実証が最近報告され、それらの細胞は、対照の野生型のmRNA及びタンパク質の存在量及び繊毛形成能 (ciliation ability) を回復した (Gerard et al., 2012 MTNA)、3) 眼は小型で、限られた免疫特権器官であるため、治療効果を得るために要するAONは低用量であり、それによって全身循環に生成物が散在するリスクが低下している、4) ネズミ科、ウサギ、及び霊長類において、安定化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの硝子体内注射は、全網膜層にわたり数週間濃度が持続する広い分布を可能にする (Rakoczy et al., 1996; Leeds et al., 1998; Shen et al., 2002)、5) 網膜炎に冒された免疫低下患者においてサイトメガロウイルスmRNAを干渉するためのFDA承認済みAONであるVitravene (登録商標) の硝子体内反復注射は安全及び有効である、並びに6) その代わりにAONは、独特な硝子体内注射又は網膜下注射を用いて送達することができ、その中期有効性及び安全性はRPE65臨床試験において実証されている (Bainbridge et al., *N Engl J Med.* 2008; Hauswirth et al., *Hum Gene Ther.*, 2008, Maguire et al., *N Engl J Med.*, 2008; Maguire et al., *Lancet.*, 2009)。

20

30

## 【0005】

外側網膜細胞 (光受容器及びRPE) 中へのAONのアデノウイルス送達の主要な欠点は、1) 技術的偏見：重大な有害作用を有する網膜剥離を引き起こす可能性のある網膜下注射によってのみ、網膜の外側細胞の形質導入に達することだけが可能である、2) 技術的限界：網膜剥離を限定しようとする、アデノウイルス粒子の分布が限定される；標的網膜細胞に効率的に形質導入するAAV血清型を適合させる必要がある (Dalkara et al., *Gene Ther.*, 2012)、並びに3) 医学的不確実性：網膜中のアデノウイルス粒子が排除されない；網膜特異的タンパク質が異所性発現する可能性により、網膜を傷害するおそれがある抗体の増加に繋がり得る (Stieger et al., *Mol Ther.*, 2008) (例えば、腫瘍によるリカバリンの異所性発現によるガン関連網膜症、Matsubara et al., *Br J Cancer.*, 1996)。

40

## 【0006】

発明の概要：

本発明者らは、今回驚くことにアンチセンスオリゴヌクレオチドの硝子体内注射を用いて網膜におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソンスキッピングを行うこと

50

が可能であると実証することによって、これらの偏見及び限界を克服する。結果は、予備的であるものの、光受容器細胞を含む全ての網膜細胞層の核内プレmRNAのスプライシングを改変するためにこの戦略を使用するという概念実証に最初で高度に説得力のある根拠を提供している。したがって、本発明は、特許請求の範囲によって定義される。

【0007】

発明の詳細な説明：

定義：

本明細書に使用される用語「前駆mRNA」又は「プレmRNA」は、1つ以上の介在配列（イントロン）を含有するメッセンジャーリボ核酸（mRNA）の未熟1本鎖を表す。プレmRNAは、細胞核内のDNAテンプレートからRNAポリメラーゼによって転写され、イントロン及びコード領域（エクソン）の交互配列からなる。イントロンが除去され（splicing out）、エクソンが結合されることによってプレmRNAが完全にプロセシングされた後、それは、エクソンのみからなるRNAである「メッセンジャーRNA」又は「mRNA」と呼ばれる。真核生物プレmRNAは、mRNAに完全にプロセシングされる前に一過性にだけ存在する。プレmRNAがmRNA配列に適正にプロセシングされたとき、プレmRNAは核から搬出され、最終的に細胞質中のリボソームによってタンパク質に翻訳される。

【0008】

本明細書に使用される用語「スプライシング」は、イントロンが除去されエクソンが結合される、転写後のプレmRNAの改変を表す。スプライシングは、スプライセオソームと呼ばれる5つの核内小型リボ核タンパク質（snRNP）及び100個を超える他の因子から構成される大型RNA-タンパク質複合体によって触媒される一連の反応において起こる（Will et Luehrmann, Curr Opin Cell Biol. 2001）。イントロン内で、3'スプライス部位、5'スプライス部位、及び枝分かれ部位がスプライシングのために必要である。スプライシング補因子（例えばセリン-アルギニンタンパク質、SR；ヘテロ核リボヌクレオタンパク質、hnRNP）は、プレmRNAにあるそれらの認識モチーフ（イントロン及びエクソン配列）に結合し、UsnRNPの動員を管理する。snRNPのRNA成分はイントロンと相互作用し、触媒作用に関与し得る。プレmRNAのスプライシングは、2つの連続的の生化学反応を伴う。両方の反応は、RNAヌクレオチド間のスプライセオソームのエステル交換を伴う。第1の反応において、スプライセオソーム集合の途中に決定されるイントロン内の特異的枝分かれ点のヌクレオチドの2'-OHが、イントロンの第1ヌクレオチド上の5'スプライス部位で求核攻撃を行い、ラリアット中間体が形成される。第2の反応において、開放された5'エクソンの3'-OHが、イントロンの最終ヌクレオチドの3'スプライス部位で求核攻撃を行い、それによってエクソンが連結し、イントロンラリアットが開放される。プレmRNAのスプライシングは、また、イントロン及びエクソンの調節配列、すなわちイントロン配列サイレンサー（ISS）配列、イントロン配列エンハンサー（ISE）配列、エクソン配列サイレンサー（ESS）配列、エクソン配列エンハンサー（ESE）配列、及び末端ステムループ（TSL）配列によって調節される。本明細書に使用される用語「イントロン配列サイレンサー（ISS）」、「イントロン配列エンハンサー（ISE）」、「エクソン配列サイレンサー（ESS）」、「エクソン配列エンハンサー（ESE）」、及び「末端ステムループ（TSL）」は、プレmRNA内のトランス作用性タンパク質因子の結合により選択的スプライシングを制御することによってスプライス部位の差次的使用を招く、イントロン又はエクソン内の配列エレメントを表す。典型的には、イントロンのサイレンサー配列は、ヌクレオチド8個から16個の間であり、スプライス部位よりもエクソン-イントロン接合部で保存性が低い。末端ステムループ配列は、典型的にはヌクレオチド12個から24個の間であり、相補性による二次ループ構造を形成し、よってヌクレオチド12~24個の配列内に結合する。他の調節配列の存在も示されており、それらの配列は、エクソンスプライシングエンハンサー（ESE）及びエクソンスプライシングサイレンサー（ESS）を含む（Liu et al, Genes Dev., 1998 ; Cartegni et Krainer, Nat Genet, 2002 ; Wang et Burge,

10

20

30

40

50

RNA, 2008)。

【0009】

本明細書に使用される用語「エクソンスキッピング」は、1つ以上の相補的アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)を用いてプレmRNA内のスプライドナー及び/又はアクセプター並びに枝分かれ部位をターゲティングすることによる、プレmRNAのスプライシングの改変を表す。1つ以上のスプライドナー、アクセプター又は枝分かれ部位へのスプライセオソームの接近を遮断することによって、AONは、スプライシング反応を防止することができ、それにより、完全にプロセシングされたmRNAから1つ以上のエクソンの排除を引き起こす。エクソンスキッピングは、プレmRNAの成熟過程の途中に核内で達成される。エクソンスキッピングは、スプライドナー/アクセプター、枝分かれ点の配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)を使用することによって、及び/又はプレmRNA内のESE(エクソン中)/ISE(イントロン中)を重複させることによって、ターゲティングされたエクソンのスプライシングに關与する鍵配列を遮蔽することを含む。

10

【0010】

本明細書に使用される用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)」は、相補的ヌクレオチド配列を有するプレmRNA又はmRNAと相互作用及び/又はハイブリダイゼーションすることによって遺伝子発現を改変する能力があるオリゴヌクレオチドを表す。典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、隠れたエクソン、補足的なエクソン、偽エクソン又はスプライシング後に維持されたイントロン配列を含むターゲティングされたエクソンのスプライシングを防止するために必要な核酸配列に相補的である。

20

【0011】

本明細書に使用される「相補的」は、相補的ヌクレオチド又はヌクレオチド間の伝統的なワトソン-クリック塩基対形成又は他の非伝統的な種類の対形成(例えばフーグスティーン又は逆フーグスティーン水素結合)のいずれかによって別の核酸分子と水素結合を形成することができる核酸分子を表す。本開示のAONに関して、AONとその相補的配列についての結合自由エネルギーは、AONの関連機能を行わせるために十分であり、特異的結合が望ましい条件で、すなわちインビボ治療的処置の場合に生理条件で、非ターゲット配列に対するAONの非特異的結合を回避するために十分な相補度がある。核酸分子に対する結合自由エネルギーの決定は、当技術分野において周知である(例えば、Turner et al, CSH Symp. Quant. Biol. 1/7:123-133 (1987); Frier et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-77 (1986);及びTurner et al, J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785 (1987)参照)。それゆえに、「相補的」(又は「特異的にハイブリダイゼーション可能」)は、AONとプレmRNA又はmRNAターゲットとの間に安定で特異的な結合が起こるために十分な度合いの相補性又は精密な対形成を示す用語である。当技術分野において、核酸分子は、特異的にハイブリダイゼーション可能であるために、ターゲット核酸配列と100%相補的である必要がないことが了解されている。すなわち、2つ以上の核酸分子は、完全に相補的であることに満たなくてもよい。相補性は、第2の核酸分子と水素結合を形成できる核酸分子中の連続する残基のパーセンテージによって示される。例えば、第1の核酸分子がヌクレオチド10個を有し、第2の核酸分子がヌクレオチド10個を有するならば、第1の核酸分子と第2の核酸分子との間のヌクレオチド5、6、7、8、9、又は10個の塩基対形成は、それぞれ50%、60%、70%、80%、90%、及び100%の相補性を表す。「完璧に」又は「完全に」相補的な核酸分子は、第1の核酸分子の全ての連続残基が第2の核酸分子中の同数の連続残基と水素結合する核酸分子を意味し、その際、両方のどちらの核酸分子も、同数のヌクレオチドを有する(すなわち同じ長さを有する)か、又は2つの分子は異なる長さを有する。

30

40

【0012】

本発明に關連して、本明細書に使用される用語「処置する」又は「処置」は、そのような用語があてはまる障害若しくは状態、又はそのような障害若しくは状態の1つ以上の症状(例えば、網膜変性又は停止性疾患)を後退させること、緩和すること、その進行を阻

50

害すること、又は予防することを意味する。

【0013】

本発明による用語「対象」又は「それを必要とする患者」は、網膜疾患に冒された又は冒される見込みのあるヒト又は非ヒト哺乳動物を意図する。

【0014】

発明の方法：

本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチド介在性エクソスキッピングを、それを必要とする対象の網膜細胞において行うための方法であって、ある量のアンチセンスオリゴヌクレオチドを対象の硝子体内に注射する段階を含む方法に関する。

【0015】

典型的には、本発明の方法が実施され得る網膜細胞は、非限定的に、双極細胞、ミュラー細胞、光受容細胞（錐体及び杆体）、又は網膜色素上皮（RPE）細胞、神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞を含む。

【0016】

本発明の方法は、特に、網膜疾患の処置に適する。実際、本発明の方法は、特に、網膜疾患を引き起こしている突然変異遺伝子に適する。例えば網膜疾患は、非限定的に、表Aに報告された疾患を含む。一実施態様では、網膜疾患は、網膜停止性疾患又は網膜変性疾患である。

【0017】

網膜変性疾患は、非限定的に、色素性網膜炎、加齢黄斑変性、バルデー - ビードル症候群、パッセン - コーンツヴァイク症候群、ベスト病、脈絡膜欠如（choroidema）、脳回転状萎縮症、レーバー先天黒内障、レフサム症候群（Refsun syndrome）、シュタルガルト病、アッシャー症候群又は遺伝性視神経症（HON）を含む。停止性網膜疾患は、非限定的に、先天性停止性夜盲（CSNB）、色覚異常又は1色覚を含む。

【0018】

一実施態様では、網膜疾患は、c . 2991 + 1655 A > G突然変異に関連するレーバー先天黒内障である。

【0019】

本発明の実施に使用されるAONは、任意の適切な種類、例えばオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、モルホリノ、トリシクロ - DNA - アンチセンスオリゴヌクレオチド、U7 - 若しくはU1 - 介在性AON又はペプチド性コンジュゲーション型若しくはナノパーティクル複合型AONなどのそのコンジュゲート生成物であり得る。本発明の実施に採用されるAONは、一般的に約10 ~ 約50ヌクレオチド長であり、例えば約10以下、又は約15、又は約20又は約30以上のヌクレオチド長であり得る。ターゲティングされた相補的配列に最適なAONの長さは、一般的に、使用される化学骨格及びターゲット配列に応じて約15 ~ 約30ヌクレオチド長の範囲である。典型的には、モルホリノ - AONは、約25ヌクレオチド長であり、2' PMO - AONは約20ヌクレオチド長であり、トリシクロ - AONは、約15ヌクレオチド長である。

【0020】

本発明に使用するために、本発明のAONは、当技術分野において周知の任意のいくつかの手順を使用してデオボ合成することができる。例えば、b - シアノエチルホスホルアミダイト法（Beaucage et al., 1981）；ヌクレオシドH - ホスホナート法（Garegg et al., 1986; Froehler et al., 1986, Garegg et al., 1986, Gaffney et al., 1988）。これらの化学反応は、市販されている多様な自動核酸合成装置によって行うことができる。これらの核酸は合成核酸と呼ばれ得る。あるいは、AONを、プラスミドの状態で大規模産生させることができる（Sambrook, et al., 1989参照）。AONを、制限酵素、エクソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼを採用している技法などの、公知の技法を用いて既存の核酸配列から調製することができる。このように調製されたAONは、単離された核酸と呼ばれ得る。

【0021】

10

20

30

40

50

インビボ使用のために、AONは、安定化され得るか、又は安定化される。「安定化された」AONは、インビボ分解（例えばエクソヌクラーゼ又はエンドヌクラーゼによる）に比較的耐性のAONを表す。安定化は、長さ又は二次構造の関数であり得る。あるいは、AONの安定化を、リン酸エステル骨格の改変を介して果たすことができる。本発明の好ましい安定化されたAONは、改変された骨格を有し、例えば、最大の活性を与え、細胞内エクソヌクラーゼ及びエンドヌクラーゼによる分解からAONを保護するためにホスホロチオアート結合を有する。他の可能な安定化改変は、ホスホジエステル改変、ホスホジエステル改変とホスホロチオアート改変の組み合わせ、メチルホスホナート、メチルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、p-エトキシ、及びそれらの組み合わせを含む。AONの化学的に安定化された改変バージョンは、また、「モルホリノ」(ホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー、PMO)、2'-O-Me tオリゴマー、トリシクロ(tc)-DNA、U7核内低分子(sn)RNA、又はトリシクロ-DNA-オリゴアンチセンス分子(米国仮特許出願第61/212,384号、名称:Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides, Compositions and Methods for the Treatment of Disease、2009年4月10日出願、その全内容は、参照により本明細書に組み入れられる)を含む。

10

## 【0022】

特定の一実施態様では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'-O-Me RNA/ENAキメラオリゴヌクレオチドであり得る(Takagi M, Yagi M, Ishibashi K, Takeshima Y, Surono A, Matsuo M, Koizumi M. Design of 2'-O-Me RNA/ENA chimera oligonucleotides to induce exon skipping in dystrophin pre-mRNA. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2004;(48):297-8)。

20

## 【0023】

この効果のために使用され得る他の形態のAONは、非限定的にレンチウイルス又はアデノ随伴ウイルスに基づくウイルス導入法と組み合わせた、U1又はU7などの核内低分子RNA分子と結合されたAON配列である(Denti, MA, et al, 2008; Goyenvalle, A, et al, 2004)。

## 【0024】

特定の一実施態様では、AONは、また、ペプチドと結合されて(例えば透過性ペプチド)、細胞取り込みを促進し得る(Fletcher et al. *Mol Ther* 2007)。

30

## 【0025】

別の特定の実施態様では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'-O-メチル-ホスホロチオアートオリゴヌクレオチドである。

## 【0026】

当業者は、本発明の方法を実施するために適し得るアンチセンスオリゴヌクレオチドを容易に同定し得る。述べられた多数の方法が、実際、関心対象のエクソンをターゲティングすることができるAONを設計するために開発されている。例えば、mfoldソフトウェア及びESEfinderプログラム(詳細にはGerard et al., 2012参照)が使用され得る。さらに、多数の適切なアンチセンスオリゴヌクレオチドも、先行技術において記載されている。例えば、国際公開公報第2012168435号に記載されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、c. 2991+1655 A>Gをターゲティングするために適切であり得る。

40

## 【0027】

本発明の不可欠な一特徴は、アンチセンスオリゴヌクレオチドがウイルスベクターに関連して送達されないことである。したがって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、患者の硝子体内に単独で(すなわち「裸で」)注射され、ウイルスベクターの使用は本発明の範囲から除外される。典型的には、ウイルスベクターは、非限定的に、以下のウイルスからの核酸配列を含む: レトロウイルス(例えばモロニー Maus 白血病ウイルス及びレンチウイルス由来ベクターのような)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス、Maus 乳がんウイルス、及びラウス肉腫ウイルスなどのRNAウイルス; アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス

50

; S V 4 0 型ウイルス; ポリオーマウイルス; エプスタイン - バーウイルス; パピローマウイルス; ヘルペスウイルス; ワクシニアウイルス; ポリオウイルス。特に、遺伝子療法におけるヒトへの使用について既に承認されている D N A ウイルスであるアデノウイルス及びアデノ随伴 ( A A V ) ウイルスの使用は、本発明の範囲から除外される。

【 0 0 2 8 】

典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、患者の硝子体内に治療有効量で注射される。本明細書に使用される「治療有効量」という用語は、網膜疾患を治療又は予防するために A O N が投与される対象 ( 例えばヒト ) において十分であるその量を意味する。当業者は、投与されるべき A O N の量が、望まれない疾患症状の改善を誘導するために十分な量であることを認識している。そのような量は、とりわけ、患者の性別、年齢、体重、全身の状態などの要因に応じて変動し得るし、ケースバイケースで決定され得る。量は、また、処置される状態の種類及び処置プロトコルの他の要素 ( 例えば、ステロイドなどの他の医薬の投与 ) に応じて変動し得る。

10

【 0 0 2 9 】

当業者は、そのようなパラメーターが普通は臨床試験の途中でチェックされる ( worked out ) ことを認識している。さらに、当業者は、疾患の症状が本明細書記載の処置によって完全に緩和される場合があるものの、そうである必要はないことを認識している。症状の部分的又は間欠的な軽減でさえも、レシピエントに大きな利益になり得る。加えて、患者の処置は、通常、単一の事象ではない。それどころか、本発明の A O N は、得られた結果に応じて数日間隔、数週間隔、若しくは数ヶ月間隔で、又は数年間隔でさえあり得る、複数の機会に注射される見込みがある。実際、アンチセンスオリゴヌクレオチドの長期硝子体内注射は、長期的に治療効果に達するために必要であり得る。これは、レーバー先天黒内障の処置が関係する場合に特にあてはまる。それは、この疾患がその処置によって治癒されず、すなわち、タンパク質をコードする遺伝子にまだ欠陥があり、本発明の A O N が投与されない限り、コードタンパク質が、露出したタンパク質分解性認識部位などの望まれない不安定化な特徴をまだ有するからである。

20

【 0 0 3 0 】

本発明は、また、硝子体内注射にとって適合性の本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する医薬組成物を提供する。典型的には、本発明の医薬組成物は、食塩水、リン酸ナトリウムなどの薬学的又は生理学的に許容される担体を含む。とはいえ、これは、必ずしもあてはまる必要はない。適切な担体、賦形剤及び希釈剤は、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、シロップ水、メチルセルロース、ヒドロキシ安息香酸メチル及びヒドロキシ安息香酸プロピル、ミネラルオイルなどを含む。製剤は、また、滑沢剤、湿潤剤、乳化剤、保存料、緩衝剤などを含むことができる。

30

【 0 0 3 1 】

本発明は、以下の図面及び実施例によってさらに例示される。しかし、これらの実施例及び図面は、決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 3 2 】

【 図 1 】 マウスにおける野生型 C e p 2 9 0 プレ m R N A に対する 2 ' - O M e P S オリゴヌクレオチドによって誘導されるエクソン 2 3 ( A ) 及びエクソン 3 6 ( B ) のスキッピングを示す図である。言及された各エクソンについて、2 種の A O N を設計してドナープライス部位及びエクソンプライスエンハンサー ( E S E ) 配列をターゲティングした。これ以降、m 2 3 D ( + 1 1 - 1 8 ) 5 ' - G U U U U C A A A A U A U A A A U A C C U U A G G U A U U C - 3 ' ( 配列番号 2 8 )、m 2 3 E S E ( + 5 0 + 7 0 ) 5 ' - G A U G A C G A A U C A C U G C A A A C - 3 ' ( 配列番号 2 9 )、m 3 6 D ( + 8 - 1 6 ) 5 ' - G U U C U C A G A A U C U U A C C U G A G C U G - 3 ' ( 配列番号 3 0 ) 及び m 3 6 E S E ( + 2 3 + 4 4 ) 5 ' - C A U G A A G G U C U U C C U C A U G C - 3

50

' (配列番号 3 1) A O N をそれぞれ m 2 3 D、m 2 3 E S E、m 3 6 D 及び m 3 6 E S E と呼んだ。m 2 3 E S E s e n s e は、m 2 3 E S E ( + 5 0 + 7 0 ) 5 ' - G U U U G C A G U G A U U C G U C A U C - 3 ' (配列番号 3 2) のセンスバージョンであり、対照として使用する。

【図 2 A】野生型メッセンジャーRNA ( mRNA ) に対する C e p 2 9 0 エクソン 2 3 及び 3 6 の A O N 介在性スキッピングの作用を示す図である。( A ) それぞれ無処理 N I H 3 T 3、1 5 0 nM m 2 3 E S E A O N、m 2 3 D A O N 及び m 2 3 E S E s e n s e O N 対照をトランスフェクションされた細胞 [ 左 ] ; 並びに 1 5 0 nM m 3 6 E S E 及び m 3 6 D をトランスフェクションされた細胞 [ 右 ] からトランスフェクションの 2 4 時間後に抽出された mRNA の P C R 分析の提示。処理後のエクソン 2 3 及び 3 6 の特異的スキッピングを確認するために、バンドを配列決定により分析した。

10

【図 2 B】野生型メッセンジャーRNA ( mRNA ) に対する C e p 2 9 0 エクソン 2 3 及び 3 6 の A O N 介在性スキッピングの作用を示す図である。( B ) 上記と同じ条件下における未処理 N I H 3 T 3 に比したトランスフェクション済み細胞における C e p 2 9 0 遺伝子の野生型 ( W T ) 及び突然変異型 ( e x 2 3 [ 左 ] ; e x 3 6 [ 右 ] ) 転写物の相対発現を示す R T - q P C R 分析。エラーバーは、3 つの独立した実験から導き出された平均の標準偏差を表す。参照として G u s b 及び P p i a 遺伝子を使用して結果を規準化した。

【図 2 C】野生型メッセンジャーRNA ( mRNA ) に対する C e p 2 9 0 エクソン 2 3 及び 3 6 の A O N 介在性スキッピングの作用を示す図である。( C ) c e p 2 9 0 ( + ) の C 末端残基に対して産生されたウサギポリクローナル抗体を使用したウエスタンブロット ( W B ) 分析。未処理 N I H 3 T 3 細胞又は m 2 3 E S E A O N をトランスフェクションされた 2 4 時間後の細胞からの総タンパク質 1 5 0 μ g の古典的ウエスタンブロット分析が適切な結果を与えなかったため ( - )、両方の条件について総タンパク質 8 0 0 μ g を免疫沈降 ( I P ) に供した ( + )。少なくとも 3 つの独立した実験から類似の結果を得た。

20

【図 3 A】C 5 7 B L / 6 J マウスの硝子体内への単回注射後の A O N の動態を示す図である。( A ) 未処理の網膜及び m 2 3 D A O N 1 0 n m o l を含有する食塩水 1 μ l を注射後の網膜から抽出された、それぞれ注射の 2、6 又は 1 0 日後に採取された C e p 2 9 0 mRNA の R T - P C R 分析。上のバンドは、野生型 C e p 2 9 0 のスプライス産物を表し、下のバンドは突然変異型 e x 2 3 C e p 2 9 0 スプライス産物を表す。処理後のエクソン 2 3 の特異的スキッピングを確認するために、バンドを配列分析により解析した。

30

【図 3 B】C 5 7 B L / 6 J マウスの硝子体内への単回注射後の A O N の動態を示す図である。( B ) C 5 7 B L / 6 J マウス、1、2 又は 3 匹のシリーズを未処置とするか、又は上記のように注射を行った。対照網膜及び注射後網膜における C e p 2 9 0 遺伝子の野生型 ( W T ) 及び突然変異型 ( e x 2 3 ) 転写物の相対発現を示す R T - q P C R 解析。参照として T b p 及び H p r t 1 遺伝子を使用して結果を規準化した。

【図 4】注射 2 日後の A O N の用量依存的な作用及び分布を示す図である。C 5 7 B L / 6 J マウス、2 又は 3 匹のシリーズに、蛍光標識 ( 6 - F A M ) m 2 3 D A O N を 1 n m o l、5 n m o l 又は 1 0 n m o l 含有する食塩水 1 μ l を硝子体内注射した。対照網膜及び注射後網膜における C e p 2 9 0 遺伝子の野生型 ( W T ) 及び突然変異型 ( e x 2 3 ) 転写物の相対発現を示す R T - q P C R 分析。参照として T b p 及び H p r t 1 遺伝子を使用して結果を規準化した。

40

【図 5】光受容器におけるエクソンスキッピングを示す図である。注射されていない対照網膜に比した、1 0 n m o l A O N 注射から 2、6 及び 1 0 日後の 2 匹の異なるマウスの網膜から抽出された mRNA の P C R 分析の提示。処置後の A b c a 4 転写物に対する特異的作用を確認するために、配列決定によってバンドを分析した。

【 0 0 3 3 】

実施例 :

50

ここで、本発明者らは、所与の網膜細胞型の機能及び/又は生存に重要な遺伝子においてスプライシングを改変及び/又は中途終止を生成する突然変異による網膜疾患を患う患者を処置する新しい方法を説明する。該方法は、網膜表面全体に到達するための、及び突然変異が遺伝性網膜疾患を引き起こす遺伝子からのプレmRNAをターゲティングするための、安定化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの硝子体内注射によって、ヌクレオチド配列をスキッピングすることにある。

#### 【0034】

この新規な治療戦略の実現可能性を実証するために、本発明者らは、マウスにターゲティングするために、広範に発現される遺伝子及び網膜細胞特異的な発現パターンを有する遺伝子を選択した。

- CEP290: 本遺伝子は、エクソン54個にまたがり、290kDaの中心体タンパク質をコードする7.9kb mRNAとして転写される。網膜において、該遺伝子は、少なくとも神経節細胞層、内顆粒層及び光受容細胞層に発現される (Baye et al., 2011)。光受容細胞に関して、該タンパク質は、内節と外節との間の分子輸送を可能にする結合繊毛の構造及び機能を維持することに重要な役割を果たす。CEP290は、最も早期で最も重症の網膜ジストロフィーであるレーバー先天黒内障に関与することが最も多い (Perrault et al., 2007)。

- ABCA4: 本遺伝子は、エクソン50個にあり、分子量256kDaを有するタンパク質をコードする7.3kbのメッセンジャーに転写される。ABCA4の発現は光受容細胞(杆体及び錐体)に限られる。最もよく見られる黄斑ジストロフィーであるシュタルガルト病は、光受容器ATP結合カセット(ABC)輸送体であるABCA4をコードする遺伝子における突然変異によって引き起こされる。該タンパク質は、光励起後の光受容器からの潜在的に毒性のレチナル化合物の除去を促進するフリッパーゼとして介在する (Molday et al., 2004)。

- TMEM126A: エクソン5個にある本遺伝子は、21.5kDaの膜貫通ミトコンドリアタンパク質をコードする0.7kbメッセンジャーに転写される。網膜において、TMEM126Aは、ミトコンドリア中に特に濃縮されている神経節細胞層、視神経乳頭、内顆粒層、及び外網状層に強く発現される。これまでのところ、TMEM126Aの機能は未知であるが、その変化は、視神経線維の変性によって特徴付けられる常染色体劣性視神経症の原因である (Hanein et al., 2013)。

- GRM6: 代謝型グルタミン酸受容体6遺伝子は、10個のエクソンを含有し、95.5kDaと予想される分子量を有するタンパク質をコードする6kbのメッセンジャーに転写される。GRM6の局在は、双極細胞のシナプス後終末に限定される。このグルタミン酸受容体は、光受容器から隣接する双極細胞へのシグナル伝達に関与し、その破壊は先天性停止性夜盲に至る (Maddox et al., 2008)。

#### 【0035】

実施例1: Cep290 mRNAのスプライスマジュレーション

材料及び方法

Cep290エクソン23及びエクソン36のスキッピングに対するターゲット配列の同定。Cep290プレmRNAのエクソン23及びエクソン36並びにそれらの周辺イントロン配列(スプライス部位)内からターゲティング可能な配列を見つけるためのバイオインフォマティクス解析を、<http://mfold.rna.albany.edu/>及び<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>を使用して実現した。

#### 【0036】

マウス線維芽細胞培養物。NIH-3T3細胞(マウス線維芽細胞系)を、American Type Culture Collection (Rockville, Md.) から得た。これらの細胞を、10% FCS、50U/mlペニシリン及び50mg/mlストレプトマイシン (Invitrogen) を含有するDMEM (Invitrogen) からなる標準培地中で培養した。15回よりも少ない継代回数の細胞培養物のみを本発明者らの研究に使用した。

#### 【0037】

AON及びトランスフェクション。ドナースプライス部位及び2個のエクソン周囲のESEに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを、ESEfinder 3.0プログラム (Cartegni and Krainer, 2003) によって同定した。対応する選択された配列を図1に示す。全てのAONを、Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) が合成したが、これらのAONは、2'-O-メチルRNA及び全長ホスホロチオアート骨格を含有する。DMEM中でLipofectamine2000 (Invitrogen) を使用して、製造業者の説明書に従って、集密度80%のNIH-3T3細胞にトランスフェクションを行った。少なくとも3回の別々の実験において各2'-OMePS AONを150nmol/lでトランスフェクションした。AONの特異性を判断するために各ESE AONのセンスバージョンを対照として使用した(図1)。37°Cで4時間インキュベーション後に、トランスフェクション培地を新鮮な培養培地と交換した。

10

#### 【0038】

トランスフェクション効率。トランスフェクションの24時間前に、12ウェルプレート内のカバーガラス上にNIH-3T3細胞を蒔いた。5'末端フルオレセイン基を担持するアンチセンスm23D(xx)、m23ESE(xx)、m36D(xx)及びセンスm23ESEsense(xx)オリゴヌクレオチドを、Sigma Aldrichから得た。前記のように線維芽細胞にトランスフェクションを行った。未処理の線維芽細胞を同条件で加工した。4時間インキュベーション後に、細胞をPFA 4% (室温で15分) で固定し、PBS中で2回洗浄した。4', 6'-ジアミジノ-2'-フェニルインドール(DAPI)を含有する封入剤(DAPI含有ProLong Gold褪色防止試薬; Invitrogen) を核標識のために使用した。免疫蛍光像を、ZEISS LSM700共焦点顕微鏡(Carl Zeiss, Germany) を使用して得た。最終的な画像をImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA) を使用して作製した。各オリゴヌクレオチドのトランスフェクションについて3回の独立した実験から蛍光細胞のパーセンテージを計算した(全細胞の90%超が標識された)(各トランスフェクションについて計数された細胞数 $n > 100$ )。

20

#### 【0039】

実験動物のAON硝子体内注射。全ての動物実験は、眼及び視力の研究における動物の使用について、視覚と眼科学研究協会会議(Association for Research in Vision and Ophthalmology)の声明書に準拠した。8週齢のC57BL/6Jマウスをこれらの実験のために使用した。ケタミン(100mg/kg)及びキシラジン(10mg/kg)の混合溶液の筋肉内注射によって動物に麻酔した。10%フェニレフリン及び0.5%トロピカミドで瞳孔を散大させた。30ゲージ針を使用して強膜の最初の穿刺を行った。5 $\mu$ lハミルトンシリンジに装着された33ゲージ針を、この穴を通して硝子体腔内に通過させた。針の先端が硝子体腔内にあるときに、針の進行を両眼で直接観察した。6-FAMオリゴヌクレオチド(m23D)をそれぞれ1、5又は10nmol含有する食塩水(NaCl 9g/l、pH=8.7)1 $\mu$ lを左眼に硝子体内注射した。針を硝子体腔内に約20秒間保ち、次に静かに引き抜き、感染を予防するために抗生物質軟膏を塗布した。右眼には注射せず、対側の対照として使用した。注射の2、6又は10日後に、注射された眼及び対側の眼を摘出し、さらなる分析のために加工した。採取された眼は、4%PFA中で浸漬して切断し、ガラススライド上に乗せ、DAPI(DAPI含有ProLong Gold褪色防止試薬; Invitrogen) を使用して核染色後に共焦点顕微鏡法(ZEISS LSM700)によって検査するか; 又は網膜を取り出して下記のようにARNを回収するかのいずれかとした。2から5匹の間の動物を各実験設定のために使用した。

30

40

#### 【0040】

RNAの抽出及びcDNAの合成。トランスフェクションの24時間後に、トランスフェクションされた細胞及び未処理の細胞を加工した。同様に、注射された眼及び注射されていない眼の両方について、注射の2、6及び10日後に下記のように網膜からのRNAを得た。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) を製造業者のプロトコールに従って使用して総RNAを抽出した。RNaseフリーDNaseセット(Qiagen, Courtaboeuf, France) によって全ての試料をDNase処理した。-80°Cで保存する前に

50

、Nanodrop-1000分光光度計 (Fisher Scientific, Illkirch, France) を使用して総 RNA の濃度及び純度を判定した。Verso cDNAキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して、ランダムヘキサマー：アンカーオリゴ (dT) プライマーを 3 : 1 (vol:vol) で用いて、製造業者の説明書に従って抽出された総 RNA 500 ng から第一鎖 cDNA 合成を行った。試料 1 つについて非 RT 反応 (酵素なし) を調製して、RT-qPCR 実験における対照として役立てた。

#### 【0041】

逆転写 PCR (RT-PCR)。AON 介在性エクソンスキッピングの有効性を判定するために、5 mM dNTP (Fischer Scientific, Illkirch, France)、Phusion ハイフィデリティー DNA ポリメラーゼ 0.02 ユニット (Fischer Scientific, Illkirch, France)、並びに Cep290 (ex22) フォワード、5' - g a c c a c c t t g a g a a g g a a a c - 3' (配列番号 1) 及び Cep290 (ex24) リバース、5' - c a t c c t g c t c a g c t t g a t c - 3' (配列番号 2)、又は Cep290 (ex35) フォワード、5' - c c c a c c a a a c t a t t g c c a a c - 3' (配列番号 3) 及び Cep290 (ex37) リバース、5' - g a g a g t c a t c t t g t t c t g c t a c - 3' (配列番号 4) の各プライマー 10 μM を含有する 1 × Phusion HF 緩衝液 50 μl 中で cDNA (5 μl) を増幅させた。2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) を用いて以下の条件で PCR を実施した：初回変性 98 °C で 5 分、続いて 98 °C で 10 秒変性、60 °C で 30 秒アニーリング及び 72 °C で 30 秒伸長を 30 サイクル。3% アガロースゲルでの電気泳動によって PCR 産物を分離し (20 μl)、エチジウムブロマイドで染色し、UV 光下で可視化した。陰性対照としてテンプレートなし (NTC) の反応を使用した。これらの産物の同一性の最終確認を、サンガー配列決定によって実施して、正確で予想通りのエクソン接合部が維持されていることを確認した。

#### 【0042】

リアルタイム定量 PCR (RT-qPCR)。Cep290 mRNA の発現レベルを測定するために、野生型及び突然変異型転写物をそれぞれ 102 及び 75 bp のフラグメント (エクソン 23 のスキッピング) として増幅させるか；又は野生型及び突然変異型転写物をそれぞれ 100 及び 62 bp のフラグメント (エクソン 36 のスキッピング) として増幅させた。マウス TATA ボックス結合タンパク質 mRNA (Tbp)、マウス α2 ミクログロブリン mRNA (B2m)、マウス α グルクロニダーゼ mRNA (Gusb)、マウス ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 mRNA (Hprt1)、及びマウス ペプチジルプロリルイソメラーゼ A mRNA (Ppia) を規準化のために使用した。マウスアルブミン遺伝子 (Alb) を使用して、cDNA にゲノム DNA が混入していないことを管理した。<http://www.oligo.net> から入手可能な Oligo Primer Analysis Software v.7 を使用してプライマーを設計した。PCR テンプレート配列に対するプライマー対の特異性を、Primer-BLAST ソフトウェア (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) を使用して NCBI データベースに対してチェックした。プライマー配列は以下の通りであった：Cep290 ex23 wt フォワード、5' - t g a c t g c t a a g t a c a g g g a c a t c t t g - 3' (配列番号 5)；Cep290 ex23 wt リバース、5' - a g g a g a t g t t t t c a c a c t c c a g g t - 3' (配列番号 6)；Cep290 ex23 mt フォワード、5' - c t g g c c c c a g t t g t a a t t t g t g a - 3' (配列番号 7)；Cep290 ex23 mt リバース、5' - c t g t t c c c a g g c t t g t t c a a t a g t - 3' (配列番号 8)；Cep290 ex36 wt フォワード、5' - t g a c t g c t a a g t a c a g g g a c a t c t t g - 3' (配列番号 9)；Cep290 ex36 wt リバース、5' - a g g a g a t g t t t t c a c a c t c c a g g t - 3' (配列番号 10)；Cep290 ex36 mt フォワード、5' - c t g g c c c c a g t t g t a a t t t g t g a - 3' (配列番号 11)；Cep290 ex36 mt リバース、5' - c t g t t c c c a g g c t t g t t c a a t a g t - 3' (配列番号 12)；参照遺伝子 Tbp フォワード、5' - t

g a c c t a a a g a c c a t t g c a c t t c g t - 3 ' ( 配列番号 1 3 ) ; T b p リ  
 パース、5 ' - c t g c a g c a a a t c g c t t g g a - 3 ' ( 配列番号 1 4 ) ; B  
 2 m フォワード、5 ' - c c t g t a t g c t a t c c a g a a a a c c c c t - 3 ' ( 配列番号 1 5 ) ; B 2 m リパース、5 ' - c g t a g c a g t t c a g t a t g t t c g g  
 c t t - 3 ' ( 配列番号 1 6 ) ; G u s b フォワード、5 ' - c t g c g g t t g t g a  
 t g t g g t c t g t - 3 ' ( 配列番号 1 7 ) ; G u s b リパース、5 ' - t g t g g g  
 t g a t c a g c g t c t t a a a g t - 3 ' ( 配列番号 1 8 ) ; H p r t 1 フォワード  
 、5 ' - g t t g g a t a c a g g c c a g a c t t t g t t - 3 ' ( 配列番号 1 9 ) ;  
 H p r t 1 リパース、5 ' - a a a c g t g a t t c a a a t c c c c t g a a g t a - 3  
 ' ( 配列番号 2 0 ) ; P p i a フォワード、5 ' - c c a a a c a c a a a c g g t t c  
 c c a g t - 3 ' ( 配列番号 2 1 ) ; P p i a リパース、5 ' - g c t t g c c a t c c  
 a g c c a t t c a - 3 ' ( 配列番号 2 2 ) ; A l b フォワード、5 ' - g g g a c a g t  
 g a g t a c c c a g a c a t c t a - 3 ' ( 配列番号 2 3 ) ; A l b リパース、5 ' - c  
 c a g a c t t g g t g t t g g a t g c t t - 3 ' ( 配列番号 2 4 ) 。 MasterCycler e  
 pgradients Realplex<sup>2</sup> (Eppendorf, Germany) を用いて以下の条件で、cDNA (ヌクレ  
 アーゼ不含水に 1 : 25 希釈したもの 5 μl) を、SYBR GREEN PCR マスターミックス (
 Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) 及び 300 nmol/l のフォワード及びリパー  
 スプライマーを含有する緩衝液 (20 μl) 中でリアルタイム PCR 増幅に供した : T a  
 q ポリメラーゼ活性化及び初回変性 95 15 分、続いて 95 15 秒及び 62 1 分を  
 50 サイクル。増幅産物の特異性を、95 15 秒、60 15 秒、及び 95 15 秒の  
 サイクルを用いた各運転の終わりに行われた融解曲線解析から決定した。Realplexソフト  
 ウェア (Eppendorf, Germany) を使用してデータを解析した。各 cDNA 試料について、  
 定量サイクル (Cq) 値の平均を 3 つ組から計算した (SD < 0.5 Cq)。4 倍系列希  
 釈曲線 (1 : 5、1 : 25、1 : 125、1 : 625) を使用して各プライマー対につい  
 て計算された最も安定な参照遺伝子及び増幅効率の推定値を利用する、Microsoft Excel  
 用 geNorm ソフトウェアから得られた「規準化因数」に対して Cep290 の発現レベルを  
 規準化した。逆転写酵素なし (non-RT)、テンプレートなし対照 (NTC) 反応、  
 及びゲノム DNA による cDNA の非混入 (ALBh) を各運転における陰性対照として  
 使用した (Cq 値 : NTC = 未決定、non-RT > 38 及び ALBh > 38)。定量デー  
 タは、3 つの独立した実験の平均 ± SD であり、これらを、個別の mRNA についての  
 値の間の比として表す。

#### 【0043】

タンパク質の抽出、免疫沈降及びウエスタンブロット分析。トランスフェクションの 2  
 4 時間後に細胞を採集し、コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテル (1% ; Sigma) を  
 含有する R I P A 緩衝液 (Sigma) 中で氷上において 1 時間繰り返し混合しながら細胞を溶  
 解させた。氷上での 15 秒の超音波処理 (Bioblock Scientific VibraCell 72434) によ  
 って溶解を行い、溶解液を遠心分離した (13,000 rpm、4 10 分)。タンパク質  
 抽出物 800 μg を、μMacs 分離カラム及び μMacs プロテイン G マイクロビーズ (Milteny  
 i Biotec) をウサギポリクローナル抗 cep290 (1 : 100 ; Novus Biologicals, L  
 ittleton, CO) と共に供給業者の推奨に従って使用する免疫沈降法 (IP) によって分  
 析した。初回タンパク質抽出物 150 μg (10% -メルカプトエタノールを有する L  
 D S 試料緩衝液 1 × (Life Technologies, USA) で再懸濁) 及び免疫沈降物を 90 で 1  
 0 分間加熱し、4 ~ 15 % Mini-PROTEAN TGX プレキャストポリアクリルアミドゲル (BioR  
 ad) 上にロードした。電気泳動後に、Trans-Blot Turbo 移行システム (BioRad) を使用し  
 てタンパク質を 0.2 μm P V D F メンブランに移行させ、そのメンブランを以下の一次  
 抗体 : ウサギポリクローナル抗ヒト Cep290 (1:1800; Novus Biologicals, Littlet  
 own, CO) 及び二次抗体 : ヤギ抗ウサギ IgG - HRP (1 : 5,000、Abcam, France  
 ) で探索した。SuperSignal (登録商標) West Dura Extended Duration Substrate (Ther  
 mo Scientific, USA) 及び ChemiDoc XRS+ イメージングシステム (Bio-Rad, USA) を使用  
 してプロットを明らかにした。Image Lab ソフトウェア 3.0.1 ビルド 18 (Bio-Rad, USA) を

用いてウエスタンブロット像を取得及び解析した。

【0044】

結果

治療用 A O N の単回硝子体内注射の安全性及び有効性の評価

ヒト突然変異型イントロン 26 ( c . 2991 + 1655 A > G ) を有するトランスジェニックマウス系統がまだ入手できないことを考慮して、本発明者らは、A O N 配列を設計して野生型マウスエクソンをスキップした。本発明者らは、それぞれエクソン 23 及びエクソン 36 をスキップすることを選択した。エクソン 23 のスキッピングは、リーディングフレームの移動及び安定ならば切断型タンパク質の産生を招くと予想される ( 図 1 A ) 。対照的に、エクソン 36 のスキッピングは、リーディングフレームを保存すると予想される ( 図 1 B ) 。

10

【0045】

N I H - 3 T 3 マウス線維芽細胞系を使用して M T N A で報告された本発明者らのプロトコルに従って ( Gerard et al., 2012 ) 、 2 つのエクソン周辺のドナースプライス部位及び E S E に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド ( m 23 E S E 、 m 23 D 、 m 36 E S E 、 m 36 D ; 図 2 ) をインピットロで試験した。未処理 N I H - 3 T 3 細胞及びトランスフェクションされた N I H - 3 T 3 細胞から抽出された m R N A を使用する逆転写 P C R ( R T - P C R ) 分析によって、A O N がスキッピングを誘発する潜在性を最初に決定した。サンガー配列決定がそれぞれエクソン 23 及び 36 の欠失を実証した、より短い P C R バンドの出現によって示されたように、150 nM A O N を使用した N I H - 3 T 3 細胞のトランスフェクションは、スキッピングを招いた。

20

【0046】

トランスフェクションされていない N I H 3 T 3 線維芽細胞に対してトランスフェクションされた N I H 3 T 3 線維芽細胞における野生型及び突然変異型転写物の発現レベルを、リアルタイム定量 P C R ( R T - q P C R ) を使用して測定することによって、スキッピング効率を定量した。トランスフェクションされていない細胞又はセンス O N をトランスフェクションされた細胞に比べて、A O N で処理された N I H - 3 T 3 細胞は、野生型 m R N A 発現の有意な減少を示し、効率的なスキッピングを裏付けた。したがって、処理された細胞系において突然変異型 m R N A が検出された。エクソン 23 を欠如する突然変異型 m R N A の存在度は、可能性のあるナンセンス介在性 m R N A 分解、すなわち N M D ( 中途終止コドンの出現に伴うフレームシフトのスキッピング ) により過小評価されるおそれがある。加えて、これらの結果がセンスオリゴヌクレオチドの送達減少が原因でなかったことを確かめるために、蛍光標識された m 23 D 及び m 36 D アンチセンスオリゴヌクレオチド並びに m 23 E S E センスオリゴヌクレオチドを使用して N I H - 3 T 3 にトランスフェクションした。類似のトランスフェクション効率が測定された ( > 90 % ) 。

30

【0047】

免疫沈降した c e p 290 ( プルダウンアッセイ法 ) のウエスタンブロット分析は、m 23 E S E A O N を使用した細胞のトランスフェクションが c e p 290 の存在度における減少を引き起こしたことを示したが、そのことは、野生型転写物レベルの低下がタンパク質の量の低下を招いたという見解の強固な裏付けを与えている。

40

【0048】

全体的に見て、本発明者らの結果は、同定された A O N がスキッピングを誘導する有効性及び配列依存的能力を実証している。

【0049】

マウス光受容器における C e p 290 m R N A に対する A O N 誘導型改変

硝子体内注射後のスキッピング効率を判断するために、本発明者らは、蛍光標識 m 23 D A O N を使用した。A O N 10 nmol を 8 週齢 C 57 B L / 6 J マウスの左眼の硝子体内に注射した。注射の 2、6 及び 10 日後に動物を屠殺し、注射された ( 左 ) 眼及び注射されていない ( 右 ) 眼の両方を解剖して視神経網膜を単離した。処置された網膜及び未処置の網膜からメッセンジャー R N A を調製した。野生型及び改変型 C e p 290 転写物の

50

両方を増幅することができるプライマーを使用してRT-PCRを行い、一方で、エクソン23を欠如する野生型mRNA及び突然変異型転写物に特異的なプライマーを使用してRT-qPCRを行った。RT-PCR産物のアガロース電気泳動分析から、注射されていない眼とは対照的に、2、6及び10日処置された眼は、野生型産物に加えてサイズのより小さな産物を表したことが示された(図3A)。サンガー配列決定から、両方の産物(野生型mRNA及びエクソン23を欠如する突然変異型mRNA)の同一性が確認された。

#### 【0050】

RT-qPCR分析は、RT-PCRの結果と一致しており、処置されていない眼に比べて処置された眼において野生型mRNAの発現が減少し、処置されていない眼ではなく、処置された眼において突然変異型mRNAが検出可能であった(図3B)。

10

#### 【0051】

続いて、同じ手順を用いて漸増用量の蛍光標識m23DAON(1、5、10nmol)を注射した。注射の2日後に動物を屠殺した。注射された眼及び注射されていない眼を取り出し、解剖して網膜を回収するか、又はPFA中で固定し、組織分析のためにパラフィン中に包含させた。RT-qPCR分析は、スキッピング効率とAONの注射用量との間の相関関係を証明した(図4)。組織分析から、網膜切片全体にわたるAONの広い分布が示された(全載網膜の組織分析が予定されている)。

#### 【0052】

Cep290は、至る所に発現されている(Papon et al., 2010)。網膜においてCep290は、神経節細胞層、内顆粒層及び光受容細胞層を含むいくつかの細胞層中に発現されている(Baye et al., 2011)。しかし、CEP290タンパク質の量が最も豊富であるのは、網膜のこの最後の細胞層の中である(Chang et al., 2006)。網膜中の蛍光AONの分布の組織分析から、光受容器顆粒層における蛍光の存在が実証された(図4B)。しかし、スキッピングが光受容器において起こったことを確認するために、本発明者らは、注射されていない眼及び注射された眼の光受容器層を、ピプラトームを使用して単離するために、M.P. Felder (Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, CNRS UPR 3212, University of Strasbourg)との共同研究を準備した。これは、次の数週間に行われる。

20

#### 【0053】

全体的に、本発明者らの結果は、m23ESE AONが網膜細胞におけるスキッピングを誘発する有効性を実証している。

30

#### 【0054】

実施例2：Abca4 mRNAのスプライス改変  
材料及び方法

Abca4エクソン10のスキッピングに対するターゲット配列の同定。http://mfold.rna.albany.edu/及びhttp://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgiを使用して、Abca4プレmRNAのエクソン10及びそれらの周辺イントロン配列(スプライス部位)内のターゲティング可能な配列を見出すためのバイオインフォマティクス解析を実現した。

40

#### 【0055】

AON。エクソン10上のESE部位に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを、ESEfinder 3.0プログラム(Cartegni and Krainer, 2003)によって同定した。対応する選択された配列：m10ESE(+60+88)5'-CAAAGAAGTACCAGATCTGGGGCCCTAC-3'。AONは、Sigma-Aldrich(St Quentin Fallavier, France)によって合成されたが、2'-O-メチルRNA及び全長ホスホロチオアート骨格を含有する。

#### 【0056】

実験動物のAON硝子体内注射。全ての動物実験は、眼及び視力の研究における動物の使用について、視覚と眼科学研究協会会議の声明書に準拠した。8週齢のC57BL/6

50

Jマウスをこれらの実験のために使用した。ケタミン(100 mg/kg)及びキシラジン(10 mg/kg)の混合溶液の筋肉内注射によって動物に麻酔した。10% フェニレフリン及び0.5% トロピカミドで瞳孔を散大させた。30ゲージ針を使用して強膜の最初の穿刺を行った。5 µlハミルトンシリンジに装着された33ゲージ針を、この穴を通して硝子体腔内に通過させた。針の先端が硝子体腔内にあるときに、針の進行を両眼下で直接観察した。オリゴヌクレオチド(m10ESE)を10 nmol含有する食塩水(NaCl 9g/l、pH = 8.7) 1 µlを左眼に硝子体内注射した。針を硝子体腔内に約20秒間保ち、次に静かに引き抜き、感染を予防するために抗生物質軟膏を塗布した。右眼には注射せず、対側の対照として使用した。注射の2、6又は10日後に、注射された眼及び対側の眼を摘出し、さらなる分析のために加工した。網膜を取り出して下記のようにARNを回収した。動物2匹を各実験設定のために使用した。

10

#### 【0057】

RNAの抽出及びcDNAの合成。注射された眼及び注射されていない眼の両方について、注射の2、6及び10日後に、RNeasy Mini Kit(Qiagen, Courtaboeuf, France)を製造業者のプロトコールに従って使用して、網膜から総RNAを抽出した。RNase free-DNaseセット(Qiagen, Courtaboeuf, France)によって全ての試料をDNase処理した。-80℃で保存する前に、Nanodrop-1000分光光度計(Fisher Scientific, Illkirch, France)を使用して総RNAの濃度及び純度を判定した。Verso cDNAキット(Thermo Fisher Scientific)を使用して、ランダムヘキサマー：アンカーオリゴ(dT)プライマーを3：1(vol:vol)比で用いて、製造業者の説明書に従って抽出された総RNA 500 ngから第一鎖cDNA合成を行った。

20

#### 【0058】

逆転写PCR(RT-PCR)。AON介在性エクソンスキッピングの有効性を判定するために、5mM dNTP(Fisher Scientific, Illkirch, France)、PhusionハイフィデリティーDNAポリメラーゼ0.02ユニット(Fisher Scientific, Illkirch, France)、並びにAbca4(ex9)フォワード、5'-tgatccagagccctggagtc aa-3'及びAbca4(ex11)リバーズ、5'-ttcttctccgagcctgacctt-3'の各プライマー10 µMを含有する1×Phusion HF緩衝液50 µl中でcDNA(5 µl)を増幅させた。2720サーマルサイクラー(Applied Biosystems, Courtaboeuf, France)を用いて以下の条件でPCRを実施した：初回変性98℃ 5分、続いて98℃ 10秒変性、60℃ 30秒アニーリング及び72℃ 30秒伸長を30サイクル。3% アガロースゲルでの電気泳動によってPCR産物を分離し(20 µl)、エチジウムブロマイドで染色し、UV光下で可視化した。陰性対照としてプレートなし(NTC)の反応を使用した。これらの産物の同一性の最終確認を、サンガー配列決定によって実施して、正確で予想通りのエクソン接合部が維持されていることを確認した。

30

#### 【0059】

##### 結果

マウス光受容器におけるAbca4 mRNAに対するAON誘導型改変

本発明者らは、光受容器特異的Abca4遺伝子のプレmRNAのスプライシングを妨害するために2'-OMePS AONを設計した(Molday et al., 2000)。mfoldソフトウェア及びESEfinderプログラムを使用して(詳細についてはGerard et al., 2012参照)、本発明者らは、エクソン10をターゲティングするAONを設計した。研究所で光受容細胞系統が入手できないので、本発明者らは、予めインビトロ検証を行わずにC57BL/6Jマウスの左眼の硝子体内に2'-OMePS AON 10 nmolを硝子体内注射することに着手した。注射の2、6及び10日後にマウスを屠殺し、注射された眼及び注射されていない眼の両方の網膜を前記のように調製した。それぞれエクソン9(フォワード)及びエクソン11(リバーズ)において設計されたプライマーを使用したRT-PCR分析によってスキッピングを分析した。アガロースゲル電気泳動によって、全ての処置後の眼においてスキッピングの成功が裏付けられ、未処置の眼に不在のより短いPCR産物が出現していた(図5)。そのことをサンガー配列決定によって確認した。

40

50

【 0 0 6 0 】

【 表 1 】

表 A: アイソフォーム比の変化に至る選択的スプライシングのモジュレーションが治療の結果を担い得る選ばれた一遺伝子性病理

遺伝子	Nb エクソン	疾患	説明	
ABCA4	50			
		ARMD2	加齢性黄斑ジストロフィー2 (ヘテロ接合性 ABCA4 欠損)。STGD1 も参照	10
		CORD4	錐体-杆体ジストロフィー4。視力の初期喪失及び黄斑網脈絡膜萎縮に続く周辺視野の狭窄によって特徴付けられる	
		RP19	色素性網膜炎 19、網膜錐体-杆体ジストロフィー、常染色体劣性。最初の 10 年における初期夜盲に続く次の 10 年における脈絡毛細管板萎縮の顕著な特徴を伴う視力低下によって特徴付けられる	20
		STGD1	シュタルガルト病、若年性黄斑ジストロフィー1、常染色体劣性。中心視覚の低下、黄斑及び基礎をなす網膜色素上皮の萎縮並びに遅発性黄色斑眼底を含む網膜の後極におけるしばしば黄色の「黄色斑(flavimaculatus fleck)」によって特徴付けられる	
AIPL1	6			30
		CORD3	網膜錐体-杆体ジストロフィー3	
		LCA4	レーバー先天黒内障 4 型、常染色体劣性。振子様眼振、前方円錐角膜、眼球彷徨、追跡眼球運動不在及び指眼現象、重症羞明、遠視、出生時の正常眼底に続く網膜のごま塩状外観及び典型的 RP、記録不能の ERG を伴う先天性非進展性(non evolutive)失明によって特徴付けられる	
APC	15			40
		CHRPE	先天性網膜色素上皮肥大、ターコット症候群を含むガードナー症候群(CNS の悪性腫瘍と関連)	
CDH23	13			

遺伝子	Nb エクソン	疾患	説明
		USH1D	アッシャー症候群 ID 型、著明な先天性感音難聴、持続性前庭機能障害及び失明に至る思春期前発症型色素性網膜炎によって特徴付けられる
COL11A1	66		
		AOM2	スティックラー症候群 2、常染色体優性。先天性近視、正中裂、平坦な顔面中部外観、感音難聴及び関節の過可動性並びに後年の変性関節症(関節眼症)に関連する膜型又は 1 型硝子体表現型によって特徴付けられる
		MRSH	マーシャル症候群。顔面中部低形成、鞍鼻、近視、早期発症白内障、骨迷路の形態形成欠損を有さない進行性の主に蝸牛型の感音難聴、低身長によって特徴付けられる
CRB1	11		
		LCA8	レーバー先天黒内障 8 型、常染色体劣性。振子様眼振、前方円錐角膜、眼球彷徨、追跡眼球運動不在及び指眼現象、重症羞明、遠視、出生時の正常眼底に続く網膜のごま塩状外観及び典型的 RP、記録不能の ERG を伴う先天性非進展性失明によって特徴付けられる
		RP12	色素性網膜炎 12、常染色体劣性、早期発症型。RPE の細動脈近傍の保存を伴う
DMD	86		
		OED	先天停止性夜盲 2、わずかな杆体機能の遺残を伴ういくつかの不完全型(ジストロフィン欠損)
EYA1	16		
		ASMD4	前眼部間葉異発生 4、ペーテルス異常及び先天性白内障を含む、常染色体優性
GUCY2D	20		
		CORD6	網膜錐体杆体ジストロフィー6。視力の初期喪失及び異常色覚に続く夜盲及び周辺視野喪失によって特徴付けられる

10

20

30

40

遺伝子	Nb エクソン	疾患	説明
		LCA1	レーバー先天黒内障 1 型、常染色体劣性。振子様眼振、眼球彷徨、追跡眼球運動不在及び指眼現象、重症羞明及び遠視、出生時の正常眼底に続く網膜のごま塩状外観及び典型的 RP、記録不能の ERG を伴う先天性非進展性失明によって特徴付けられる
LCAT	6		
		FED	異常リポタンパク血症性角膜ジストロフィー、魚眼病
		LCAT	非エステル型高コレステロール血症。角膜混濁、標的赤血球溶血性貧血、腎不全を伴うタンパク尿、家族性複合高脂血症及び若年性冠動脈疾患への罹患性を含むノルム病によって特徴付けられる
MYO7A	49		
		USH1B	アッシャー症候群 IB 型、常染色体劣性。著明な先天性感音性難聴、持続性前庭機能障害及び失明に至る思春期前発症型色素性網膜炎によって特徴付けられる(DFNB2 参照)
NDP	3		
		COATS	コーツ症候群。大量の網膜下脂質蓄積(滲出性網膜剥離)を招く異常網膜発生(網膜毛細血管拡張症)、ほぼ常に孤立性、片眼、男性、ノリエ病に冒された息子を生む異型の女性に見られることによって特徴付けられる
		EVR2	硝子体網膜症、滲出性、希少 X 連鎖型(NDP の対立形質、希少症例で連鎖遺伝子と関係し得る)
		NDP	ノリエ病(偽神経膠腫)。先天性網膜形成異常、精神遅滞及び難聴によって特徴付けられる
NPHP1	4?20?		
		SLSN1	シーニアーローケン症候群 1。レーバー先天黒内障とは異なる網膜ジストロフィーを伴う若年性髄質性嚢胞腎
PANK2	8		
		HARP	低プレ β リポタンパク血症、有棘赤血球増加症、色素性網膜炎及び淡蒼球変性症

10

20

30

40

遺伝子	Nb エクソン	疾患	説明
		PANK2	ハレルフォルデンーシュパッツ病。進行性筋強剛、ジストニア、色素性網膜炎、脳内鉄蓄積を伴う。タウ及び $\alpha$ -シヌクレチンの両方の広範な蓄積を伴う形態を含む。低プレ $\beta$ リポタンパク血症、有棘赤血球増加症、色素性網膜炎、及び淡蒼球変性によって特徴付けられる HARP 症候群
PAX6	14		
		AN	無虹彩(aniridia)。マウススモールアイ、ドロソフィラ ( <i>Drosophila</i> ) アイレスと相同。複合ヘテロ接合体における眼欠損症並びに無眼球症、中心窩形成不全及び中枢神経系欠損などの非定型表現型も含む
		ASMD3	前眼部間葉異発生 3、ペーテルス異常、アクセンフェルト異常、先天性白内障を伴う角膜ジストロフィーを含む。常染色体優性
		ECTP	瞳孔転位
		FVH	中心窩低形成、単独
		OPNAB	視神経低形成及び無形成、両側。朝顔乳頭異常を含む
		WAGR	腎芽細胞腫(ウィルムス腫瘍)、無虹彩、泌尿生殖器奇形、精神遅滞の素因によって特徴付けられる隣接遺伝子症候群
PDE6B	22		
		ARRP2	常染色体劣性色素性網膜炎 2 (PDE6B)。マウス rd のホモログ
		CSNB3	先天性停止性夜盲 3、常染色体優性
PEX7	10		
		PBD7	レフサム病、フィタン酸オキシダーゼ欠乏症、遺伝性運動感覚性ニューロパチー4。運動失調、色素性網膜炎、及び多発ニューロパチーを伴う、相補性群 11 又は R
PITX2	3		
		IHG2	常染色体優性虹彩低形成。隅角異発生(虹彩隅角異発生)、眼内圧上昇及び続発性緑内障(RIEG1 参照)

10

20

30

40

遺伝子	Nb エクソン	疾患	説明
		RIEG1	前眼部間葉異発生、アクセンフェルトーリーガー症候群。後部胎生環、虹彩実質低形成並びに瞳孔の形状(瞳孔変位)及び数(多瞳症)の異常並びに他の異常に関連する続発性緑内障、最も頻繁に無歯症/歯数不足、小上顎症、臍周囲の皮膚の退縮障害による臍ヘルニア、IHG2も参照
RDS	3		
		MDBS1	黄斑ジストロフィー、常染色体優性、蝶形色素沈着黄斑ジストロフィー1。ツェルマット黄斑ジストロフィー、標的黃斑症を伴う色素性網膜炎及び他のパターンのジストロフィーを含む
		RP7	色素性網膜炎 7。白点状網膜炎を含む
RHO	5		
		ARRP1	常染色体劣性色素性網膜炎 1
		CSNB6	先天性停止性夜盲 6、常染色体優性
		RP4	色素性網膜炎 4、常染色体優性、I型及びその他。一部の白点状網膜炎を含む、最初の最もよく見られる ADRP 遺伝子座(20~31%)
RLBP1	9		
		ARRP7	常染色体劣性色素性網膜炎 8、早期発症型、視神経乳頭部萎縮及び黄斑変性を伴う
		NFRCD	ニューファンランド杆体-錐体ジストロフィー、早期発症型網膜ジストロフィー、重症。早発失明を伴う
		RPALB	白点状網膜炎。先天性停止性夜盲及び網膜全体に散乱する均一な黄白色点状物質を伴う視物質の異常に遅い再生、常染色体劣性、ボスニアジストロフィー(北スウェーデンにおいて高い有病率)を含むことによって特徴付けられる
RPE65	14		

10

20

30

40

遺伝子	Nb エクソン	疾患	説明
		LCA2	レーバー先天黒内障 2 型、常染色体劣性。振子様眼振、眼球彷徨、追跡眼球運動不在及び指眼現象、夜盲、出生時の正常眼底に続く網膜のごま塩状外観及び典型的 RP の外観、記録不能の ERG、進展途中に一過性改善を表すことによって特徴付けられる
		RP20	多様な重症度(expression)の網膜ジストロフィー、小児期発症、常染色体劣性 8、杆体及び錐体光受容器を冒す
RPGR	19		
		CORDX1	錐体-杆体ジストロフィー1 (RP2 及び RP3 を除く)、進行性の網膜変性。進行性羞明、中心視覚減少及び色覚異常によって特徴付けられる
		MDXA1	X連鎖型劣性萎縮型黄斑変性
		RP15	色素性網膜炎 15、X連鎖型優性。視力及び色覚の初期喪失に続く夜盲及び周辺視野喪失によって特徴付けられる (OMIM300029 参照)
		RP3	色素性網膜炎 3。輝板様網膜反射のヘテロ接合性女性における存在により他のタイプと識別されるX連鎖劣性型の脈絡膜網膜変性。再発性呼吸器感染症を伴う色素性網膜炎を含む
<i>TULP1</i>	<i>14</i>		
		LCA10	レーバー先天黒内障 10 型、常染色体劣性。眼振、夜盲、顕著な視覚障害を伴い、遠視、杆体錐体ジストロフィーを伴わない
		RP14	色素性網膜炎、常染色体劣性 4、重症、早期発症型。眼振、視力減退、色覚障害、標的黃斑症及び末梢色素性網膜炎、記録不能の ERG を伴うことによって特徴付けられる
USH2A	21		
		ARRP15	常染色体劣性色素性網膜炎 15、非症候性

10

20

30

40

遺伝子	Nb エクソン	疾患	説明
		USH2A	アッシュャー症候群 IIA 型、常染色体劣性、先天性、中等度～重度感音難聴、年齢と共に進行性、正常な前庭機能及び色素性網膜炎。前庭機能不全を伴う非定型症例を含み、非症候性色素性網膜炎の症例を含む表現型の多様性を示す

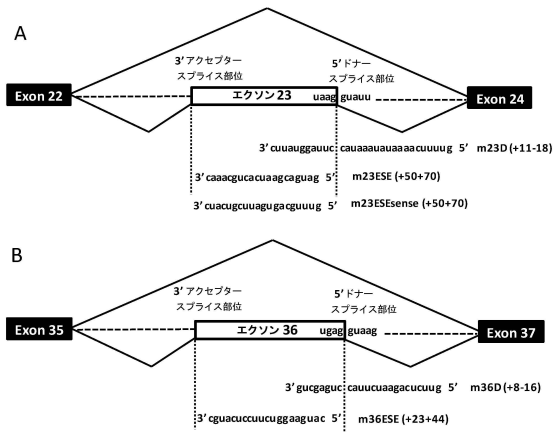
【 0 0 6 1 】

10

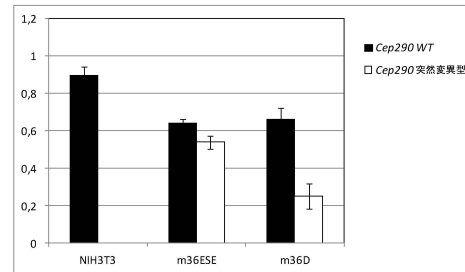
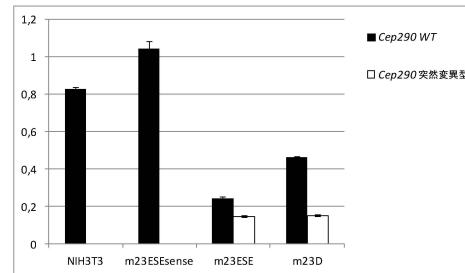
参考文献：

本出願にわたり、本発明が属する技術分野の現状を様々な参考文献が説明している。これらの参考文献の開示は、本開示の参照により本明細書に組み入れられる。

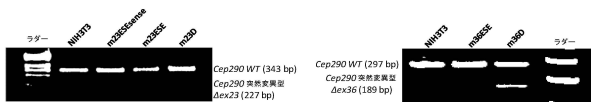
【 図 1 】



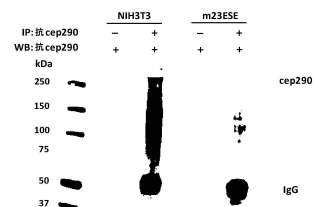
【 図 2 B 】



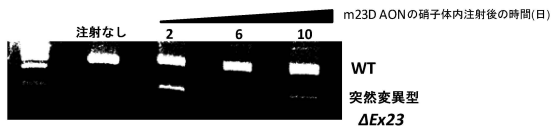
【 図 2 A 】



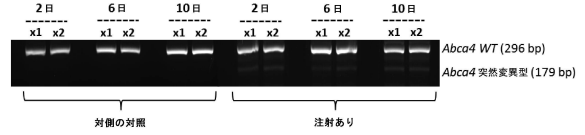
【 図 2 C 】



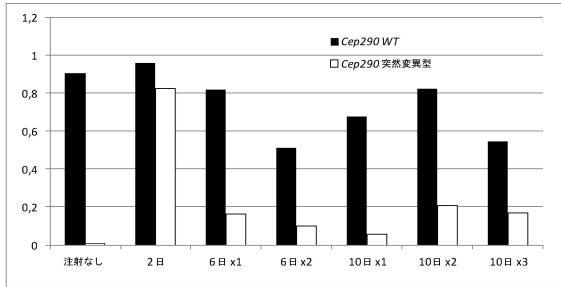
【 図 3 A 】



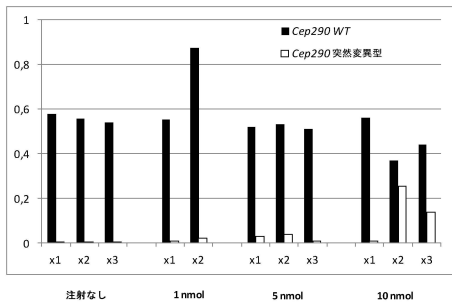
【 図 5 】



【 図 3 B 】



【 図 4 】



【 配列表 】

0006571075000001.app

## フロントページの続き

(73)特許権者 509033033

ユニベルシテ・パリ・デカルト

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

フランス国、エフ - 7 5 2 7 0 パリ・セデックス 0 6、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥ  
シーヌ 1 2

(73)特許権者 591140123

アシスタンス ピュブリク - オピトー ドゥ パリ

ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS

フランス国、7 5 0 0 4 パリ、アベニュー ビクトリア 3番地

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 ロゼ, ジャン - ミシェル

フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・ドゥ・ヴォージラール 1 5 6、キャンパス・ネッ  
カー、イアッシュユ・イマジネ、アンセルム・ユ1 1 6 3

(72)発明者 ペロー, イザベル

フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・ドゥ・ヴォージラール 1 5 6、キャンパス・ネッ  
カー、イアッシュユ・イマジネ、アンセルム・ユ1 1 6 3

(72)発明者 ジェラル, グザヴィエ

フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・ドゥ・ヴォージラール 1 5 6、キャンパス・ネッ  
カー、イアッシュユ・イマジネ、アンセルム・ユ1 1 6 3

(72)発明者 カブラン, ジョスリーヌ

フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・ドゥ・ヴォージラール 1 5 6、キャンパス・ネッ  
カー、イアッシュユ・イマジネ、アンセルム・ユ1 1 6 3

(72)発明者 ミュニ, アーノルド

フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・ドゥ・ヴォージラール 1 5 6、キャンパス・ネッ  
カー、イアッシュユ・イマジネ、アンセルム・ユ1 1 6 3

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 8 4 3 5 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 3 6 1 0 5 (WO, A 1)

特表 2 0 1 1 - 5 1 2 1 4 5 (JP, A)

Am.J.Hum.Genet., 2 0 0 0年, Vol.67, p.800-813

GENOMICS, 1 9 9 8年, Vol.48, p.139-142

nature genetics, 1 9 9 7年, Vol.15, No.3, p.236-246

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5

A 6 1 K 3 1 / 7 1 1

A 6 1 K 3 1 / 7 1 2 5

A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8

A 6 1 P 2 7 / 0 2

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3

CAplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq