

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-523648

(P2019-523648A)

(43) 公表日 令和1年8月29日 (2019. 8. 29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/864 (2006. 01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)	C 1 2 P 21/02 Z N A C	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/76 (2015. 01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)	A 6 1 P 27/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-565324 (P2018-565324)	(71) 出願人	516245900
(86) (22) 出願日	平成29年6月14日 (2017. 6. 14)		オックスフォード ユニバーシティ イノ
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月7日 (2019. 2. 7)		ベーション リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2017/051741		OXFORD UNIVERSITY I
(87) 国際公開番号	W02017/216560		NNOVATION LIMITED
(87) 国際公開日	平成29年12月21日 (2017. 12. 21)		イギリス国 オックスフォード オックス
(31) 優先権主張番号	1610448.1		フォードシャー オーエックス2 Oジ
(32) 優先日	平成28年6月15日 (2016. 6. 15)		エイビー, ウェスト ウェイ 3, バック
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		ストン コート
(31) 優先権主張番号	1707261.2	(74) 代理人	110002572
(32) 優先日	平成29年5月5日 (2017. 5. 5)		特許業務法人平木国際特許事務所
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ABC4 Aを発現させるためのデュアル重複アデノ随伴ウイルスベクターシステム

(57) 【要約】

本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列 (CDS) の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、第1の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド105～3597に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、第2の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド3806～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、第1の核酸配列及び第2の核酸配列はそれぞれ他方と配列が重複する領域を含み、並びに該配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応する核酸配列の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む、該AAVベクターシステムを提供する。疾患の予防又は治療におけるAAVベクターシステムの使用もまた提供される。

【選択図】 図 1 0

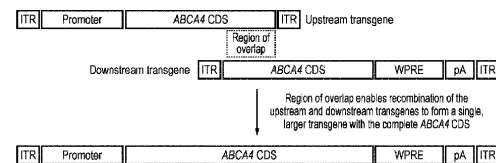


FIG. 10

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターシステムであって、前記AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、

第1の核酸配列はABCA4コーディング配列（CDS）の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、前記5'末端部分及び前記3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、

第1の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド105～3597に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、

第2の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド3806～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、

第1の核酸配列及び第2の核酸配列はそれぞれ他方と配列が重複する領域を含み、並びに前記配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応する核酸配列の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む、前記AAVベクターシステム。

【請求項 2】

前記配列が重複する領域は長さが20～550ヌクレオチド、好ましくは長さが50～250ヌクレオチド、好ましくは長さが175～225ヌクレオチド、好ましくは長さが195～215ヌクレオチドである、請求項1記載のAAVベクターシステム。

【請求項 3】

前記配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応する核酸配列の少なくとも約50個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約75個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約100個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約150個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約200個の連続ヌクレオチド、好ましくは全208個の連続ヌクレオチドを含む、請求項1又は2に記載のAAVベクターシステム。

【請求項 4】

第1の核酸配列が配列番号1のヌクレオチド105～3805に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、且つ、

第2の核酸配列が配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列を含む、

請求項1～3のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム。

【請求項 5】

第1の核酸配列がABCA4コーディング配列（CDS）の5'末端部分に作動可能に連結されたGRK1プロモーターを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム。

【請求項 6】

第1の核酸配列がABCA4コーディング配列（CDS）の5'末端部分の上流に位置する非翻訳領域（UTR）を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム。

【請求項 7】

第2の核酸配列が転写後応答エレメント（PRE）、好ましくはウッドチャック肝炎ウイルス転写後応答エレメント（WPRE）を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム。

【請求項 8】

第2の核酸配列がウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化配列を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム。

【請求項 9】

第1のAAVベクターが配列番号9の核酸配列を含み、且つ、第2のAAVベクターが配列番号10の核酸配列を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム。

【請求項 10】

標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるための方法であって、

機能的ABCA4タンパク質が標的細胞において発現されるように、請求項1～9のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に規定される第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターで標的細胞を形質導入するステップ

を含む、前記方法。

【請求項 1 1】

ABCA4 CDSの5'末端部分を含む核酸配列を含むAAVベクターであって、前記ABCA4 CDSの5'末端部分が配列番号1のヌクレオチド105～3805に対応する連続ヌクレオチドの配列から成る、前記AAVベクター。

【請求項 1 2】

配列番号9の核酸配列を含む、請求項 1 1 記載のAAVベクター。

【請求項 1 3】

ABCA4 CDSの3'末端部分を含む核酸配列を含むAAVベクターであって、前記ABCA4 CDSの3'末端部分が配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列から成る、前記AAVベクター。

【請求項 1 4】

配列番号10の核酸配列を含む、請求項 1 3 記載のAAVベクター。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に規定される第1の核酸配列を含む核酸。

【請求項 1 6】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に規定される第2の核酸配列を含む核酸。

【請求項 1 7】

配列番号9の核酸配列を含む核酸。

【請求項 1 8】

配列番号10の核酸配列を含む核酸。

【請求項 1 9】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に規定される第1のAAVベクター、及び請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に規定される第2のAAVベクターを含む、キット。

【請求項 2 0】

請求項 1 5 記載の核酸及び請求項 1 6 記載の核酸、又は請求項 1 7 記載の核酸及び請求項 1 8 記載の核酸を含む、キット。

【請求項 2 1】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 2 2】

遺伝子治療に使用するための、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム、請求項 1 9 若しくは請求項 2 0 に記載のキット、又は請求項 2 1 記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

網膜細胞の分解を特徴とする疾患の予防若しくは治療において使用するための、好ましくはシュタルガルト病の予防若しくは治療において使用するための、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム、請求項 1 9 若しくは請求項 2 0 に記載のキット、又は請求項 2 1 記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

それを必要とする対象に有効量の請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のAAVベクターシステム、請求項 1 9 若しくは請求項 2 0 に記載のキット、又は請求項 2 1 記載の医薬組成物を投与することを含む、網膜細胞の分解を特徴とする疾患、好ましくはシュタルガルト病を予防又は治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

20

30

40

50

本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターシステム及びAAVベクターに関する。本発明のAAVベクターシステム及びAAVベクターは、シュタルガルト病などの網膜細胞の分解に関連する疾患の予防又は治療において使用することができる。

【背景技術】

【0002】

シュタルガルト病は、眼における感光性視細胞の破壊により失明をもたらす網膜の遺伝性疾患である。この疾患は、一般に小児期に現れて若者に失明をもたらす。

【0003】

シュタルガルト病の最も一般的な形態は、タンパク質ATP結合カセット、サブファミリーA、メンバー4（ABCA4）をコードする遺伝子中の変異に連鎖した劣性障害である。ABCA4は、網膜細胞における感光性色素のリサイクリングにおいて役割を果たす大型の膜貫通型タンパク質である。シュタルガルト病では、ABCA4遺伝子の変異は網膜細胞における機能的ABCA4タンパク質の欠如をもたらす。これは次にビスレチノイド副産物の形成と蓄積をもたらす、網膜色素上皮（RPE）細胞においてリポフスチンの毒性顆粒を産生する。これは、RPE細胞の分解と最終的には破壊を引き起こし、これは視細胞の喪失をもたらす視覚の進行性の喪失と最終的には失明を引き起こす。

【0004】

遺伝子治療はシュタルガルト病の治療として有望である。ベクターを使用して機能的ABCA4遺伝子を罹患視細胞に導入し、それによりABCA4機能を回復させることによって、疾患の原因となる欠損を直すことが目的である。

【0005】

アデノ随伴ウイルス（AAV）由来のベクターは、網膜遺伝子治療のために現在研究されている。AAVは非常に低い免疫原性を提示する小型ウイルスであり、いかなる公知のヒト疾患にも関連していない。付随する免疫反応がないことは、眼の中に注入してもAAVは網膜損傷を引き起こさないことを意味する。

【0006】

しかし、AAVキャプシドのサイズは、その中にパッケージングされうるDNAの量に制限を課す。AAVゲノムはサイズが約4.7キロベース（kb）であり、AAVにおけるDNAパッケージングのための対応する上限サイズは、約5kbであると考えられている（Wu et al., Molecular Therapy, vol. 18, No. 1, Jan 2010）。ABCA4遺伝子のコーディング配列はサイズが約6.8kbであり（さらなる遺伝因子が遺伝子発現に必要である）、標準的AAVベクターに組み込まれるには大きすぎる。

【0007】

この上限サイズを克服しAAVベクターからABCA4などの大型遺伝子を発現させるための多くの手法が試されてきた。これらの手法は、「特大（oversize）」ベクター手法及び「デュアル」ベクター手法を含む。

【0008】

「特大」ベクター

天然の4.7kbゲノムよりもかなり大きな遺伝子をAAVベクターの中に詰め込むために多くの試みがなされ、標的細胞を形質導入することにある程度成功している。例を挙げれば、Allocca et al. (J. Clin. Invest. vol.118, No. 5, May 2008)は、マウスABCA4及びヒトMYO7A遺伝子をパッケージングする特大AAVベクターを調製し、マウス網膜細胞の形質導入後のタンパク質発現を示した。しかし、特定のAAVキャプシドは8.9kbまで収容しうることがAllocca et al.によって提案された一方で、その後の研究により、「特大」手法は実際にはパッケージング上限サイズを克服するのではなく、ランダムな様式で導入遺伝子のトランシェーションをもたらす、各々が導入遺伝子の断片を含むAAVベクターの不均一な集団をもたらすことが見出された（Dong et al., Molecular Therapy, vol. 18, No. 1, Jan 2010）。所与の集団における特大ベクターの一部は、断片間で重複する領域が存在し、標的細胞の形質導入後に全長遺伝子への再構成を可能にするような特大導入遺伝子の十分

大きな断片をパッケージングすると考えられている。しかし、この方法は予測不能で非効率的であり、パッケージング制御を欠いており、その後の組換えの失敗は一貫性で検出可能な成功への重大な障害をもたらす。

【0009】

「デュアル」ベクター

代わりの手法はデュアルベクターシステムを調製することであり、デュアルベクターシステムでは、約5kb限界よりも大きな導入遺伝子が、規定された配列の2つの別々のベクター、すなわち導入遺伝子の5'部分を含む「上流」ベクター、及び導入遺伝子の3'部分を含む「下流」ベクターへと、概ね半分に分割されている。上流ベクター及び下流ベクターの両方による標的細胞の形質導入によって、全長導入遺伝子が様々な細胞内機構を用いて2つの断片から再構成されることが可能になる。

10

【0010】

いわゆる「トランススプライシング」デュアルベクター手法では、スプライス供与シグナルが上流導入遺伝子断片の3'末端に置かれ、スプライス受容シグナルが下流導入遺伝子断片の5'末端に置かれる。デュアルベクターによって標的細胞を形質導入すると、AAVゲノム中に存在する逆方向末端反復（ITR）配列が導入遺伝子断片のヘッドトゥーテールのコンカテマー化を媒介し、転写物のトランススプライシングの結果として全長mRNA配列の生成をもたらされ、全長タンパク質の発現が可能となる。

【0011】

代わりのデュアルベクターシステムは、「重複」手法を使用する。重複デュアルベクターシステムでは、上流コーディング配列部分の3'末端におけるコーディング配列の部分は、下流コーディング配列部分の5'における相同配列と重複する。上流及び下流ベクターによって標的細胞を形質導入すると、コーディング配列の上流部分及び下流部分の間の相同組換えによって、全長導入遺伝子の再創出が可能となり、そこから対応するmRNAが転写され、全長タンパク質が発現されうる。

20

【0012】

WO 2014/170480は、ヒトABCA4タンパク質をコードするデュアルAAVベクターシステムの生成を記載する。

【0013】

したがって、ABCA4タンパク質をコードし、遺伝子治療における使用に適した、代替となる、及び/又は改善されたAAVベクターシステムのニーズが当技術分野において存在する。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】WO 2014/170480

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Wu et al., Molecular Therapy, vol. 18, No. 1, Jan 2010

【非特許文献2】Allocca et al. (J. Clin. Invest. vol.118, No. 5, May 2008)

40

【非特許文献3】Dong et al., Molecular Therapy, vol. 18, No. 1, Jan 2010

【発明の概要】

【0016】

本発明は、特許請求の範囲に記載されるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターシステムを提供することによって、上記の先行技術の問題に取り組む。

【0017】

有利な点として、本発明のAAVベクターシステムは、驚くべきことに、形質導入細胞における全長ABCA4タンパク質の高レベルの発現をもたらす、ABCA4の望まれないランケーター型断片の生成は限定的である。

【0018】

50

一態様では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのAAVベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列（CDS）の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、第1の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド105～3597に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、第2の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド3806～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、第1の核酸配列及び第2の核酸配列はそれぞれ他方と配列が重複する領域を含み、並びに該配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応する核酸配列の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む、該AAVベクターシステムを提供する。

10

【0019】

配列が重複する領域は、長さが20～550ヌクレオチド、好ましくは長さが50～250ヌクレオチド、より好ましくは長さが175～225ヌクレオチド、最も好ましくは長さが195～215ヌクレオチドであってもよい。

【0020】

配列が重複する領域はまた、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応する核酸配列の少なくとも約50個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約75個の連続ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約100個の連続ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも約150個の連続ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも約200個の連続ヌクレオチドを含んでもよい。

20

【0021】

一実施形態では、第1の核酸配列は、配列番号1のヌクレオチド105～3597からなる連続ヌクレオチドの配列を含む。一実施形態では、第2の核酸配列は、配列番号1のヌクレオチド3806～6926からなる連続ヌクレオチドの配列を含む。

【0022】

一実施形態では、第1の核酸配列は、配列番号2のヌクレオチド105～3597からなる連続ヌクレオチドの配列を含む。一実施形態では、第2の核酸配列は、配列番号2のヌクレオチド3806～6926からなる連続ヌクレオチドの配列を含む。

【0023】

一実施形態では、配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805からなる核酸配列の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む。一実施形態では、配列が重複する領域は、配列番号2のヌクレオチド3598～3805からなる核酸配列の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む。

30

【0024】

一実施形態では、配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805からなる核酸配列の少なくとも約50個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約75個の連続ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約100個の連続ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも約150個の連続ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも約200個の連続ヌクレオチドを含む。一実施形態では、配列が重複する領域は、配列番号2のヌクレオチド3598～3805からなる核酸配列の少なくとも約50個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約75個の連続ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約100個の連続ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも約150個の連続ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも約200個の連続ヌクレオチドを含む。

40

【0025】

一実施形態では、第1の核酸配列は、配列番号1のヌクレオチド105～3805に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、第2の核酸配列は、配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列を含む。

【0026】

一実施形態では、第1の核酸配列は、配列番号1のヌクレオチド105～3805からなる連続ヌクレオチドの配列を含み、第2の核酸配列は、配列番号1のヌクレオチド3598～6926から

50

なる連続ヌクレオチドの配列を含む。

【0027】

一実施形態では、第1の核酸配列は、配列番号2のヌクレオチド105～3805からなる連続ヌクレオチドの配列を含み、第2の核酸配列は、配列番号2のヌクレオチド3598～6926からなる連続ヌクレオチドの配列を含む。

【0028】

第1のAAVベクターは、ABCA4コーディング配列（CDS）の5'末端部分に作動可能に連結されたGRK1プロモーターを含んでもよい。

【0029】

第1の核酸配列は、ABCA4コーディング配列（CDS）の5'末端部分の上流に位置する非翻訳領域（UTR）を含んでもよい。

10

【0030】

第2の核酸配列は、転写後応答エレメント（PRE）、好ましくはウッドチャック肝炎ウイルス転写後応答エレメント（WPRE）を含んでもよい。

【0031】

第2の核酸配列は、ウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化配列を含んでもよい。

【0032】

別の態様では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるための方法であって、機能的ABCA4タンパク質が標的細胞において発現されるように、上記の第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターで標的細胞を形質導入するステップを含む方法を提供する。

20

【0033】

さらなる態様では、本発明は、ABCA4 CDSの5'末端部分を含む核酸配列を含むAAVベクターであって、ABCA4 CDSの5'末端部分が配列番号1のヌクレオチド105～3805に対応する連続ヌクレオチドの配列からなるAAVベクターを提供する。一実施形態では、このAAVベクターは、配列番号9の核酸配列を含む。一実施形態では、ABCA4 CDSの5'末端部分は配列番号1のヌクレオチド105～3805からなる。一実施形態では、ABCA4 CDSの5'末端部分は配列番号2のヌクレオチド105～3805からなる。

【0034】

さらなる態様では、本発明は、ABCA4 CDSの3'末端部分を含む核酸配列を含むAAVベクターであって、ABCA4 CDSの3'末端部分が配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列からなるAAVベクターを提供する。一実施形態では、このAAVベクターは、配列番号10の核酸配列を含む。一実施形態では、ABCA4 CDSの3'末端部分は配列番号1のヌクレオチド3598～6926からなる。一実施形態では、ABCA4 CDSの3'末端部分は配列番号2のヌクレオチド3598～6926からなる。

30

【0035】

別の態様では、本発明は、上に規定される第1の核酸配列を含む核酸を提供する。

【0036】

別の態様では、本発明は、上に規定される第2の核酸配列を含む核酸を提供する。

【0037】

配列番号9の核酸配列を含む核酸、及び配列番号10の核酸配列を含む核酸もまた本発明によって提供される。

40

【0038】

さらなる態様では、本発明は、上述のAAVベクターシステム、又は上述の上流AAVベクター及び下流AAVベクターを含むキットを提供する。

【0039】

本発明はまた、上述の、第1の核酸配列を含む核酸、及び第2の核酸配列を含む核酸、又は上述の、配列番号9の核酸配列を含む核酸、及び配列番号10の核酸配列を含む核酸を含むキットを提供する。

【0040】

50

さらにさらなる態様では、本発明は、上述のAAVベクターシステム及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物を提供する。

【0041】

さらにさらなる態様では、本発明は、網膜細胞の分解を特徴とする疾患の予防若しくは治療において使用するための、好ましくはシュタルガルト病の予防若しくは治療において使用するための、上述のAAVベクターシステム、上述のキット、又は上述の医薬組成物を提供する。

【0042】

別の態様では、本発明は、それを必要とする対象に有効量の上述のAAVベクターシステム、上述のキット、又は上述の医薬組成物を投与することを含む、シュタルガルト病などの網膜細胞の分解を特徴とする疾患を予防又は治療する方法を提供する。

【0043】

別の態様では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのAAVベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列(CDS)の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、第1の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド105～3597に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド3806～6926に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸配列及び第2の核酸配列はそれぞれ他方と配列が重複する領域を含み、該配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する核酸配列の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む、該AAVベクターシステムを提供する。

【0044】

別の態様では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのAAVベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列(CDS)の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、該ABCA4 CDSの5'末端部分は配列番号1のヌクレオチド105～3805に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列からなり、該ABCA4 CDSの3'末端部分は配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列からなる、該AAVベクターシステムを提供する。

【0045】

別の態様では、本発明は、ABCA4 CDSの5'末端部分を含む核酸配列を含むAAVベクターであって、該ABCA4 CDSの5'末端部分は配列番号1のヌクレオチド105～3805に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列からなる、該AAVベクターを提供する。

【0046】

別の態様では、本発明は、ABCA4 CDSの3'末端部分を含む核酸配列を含むAAVベクターであって、該ABCA4 CDSの3'末端部分は配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列からなる、該AAVベクター

ーを提供する。

【0047】

別の態様では、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのAAVベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列(CDS)の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、第1の核酸配列は配列番号2のヌクレオチド105～3597に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸配列は配列番号2のヌクレオチド3806～6926に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸配列及び第2の核酸配列はそれぞれ他方と配列が重複する領域を含み、該配列が重複する領域は、配列番号2のヌクレオチド3598～3805に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する核酸配列の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む、該AAVベクターシステムを提供する。

10

【0048】

別の態様では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのAAVベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列(CDS)の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、ABCA4 CDSの該5'末端部分は配列番号2のヌクレオチド105～3805に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列からなり、ABCA4 CDSの該3'末端部分は配列番号2のヌクレオチド3598～6926に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列からなる、該AAVベクターシステムを提供する。

20

【0049】

別の態様では、本発明は、ABCA4 CDSの5'末端部分を含む核酸配列を含むAAVベクターであって、該ABCA4 CDSの5'末端部分が配列番号2のヌクレオチド105～3805に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列からなる、該AAVベクターを提供する。

30

【0050】

別の態様では、本発明は、ABCA4 CDSの3'末端部分を含む核酸配列を含むAAVベクターであって、該ABCA4 CDSの3'末端部分が配列番号2のヌクレオチド3598～6926に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する配列からなる、該AAVベクターを提供する。

40

【0051】

配列番号9に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸、及び配列番号10に対して少なくとも90%(例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9又は100%)の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸もまた本発明によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】組み合わせさせて完全なABCA4導入遺伝子を形成する上流及び下流導入遺伝子構造

50

を示す図である。

【図2】付加的なUTR配列を有する(5'C)及び有しない(C)デュアルベクターバリエーションの注入6週後のAbca4^{-/-}網膜におけるABCA4タンパク質検出を示す図である。単位は非注入KO試料に対する倍率増加を示す。エラーバーはSEMを示す。一元配置分散分析、チューキーポストホック、 $p=^{**}0.009$ 。

【図3】重複バリエーションA、B、C、D、E、F及びXを構成する上流及び下流導入遺伝子に含まれるABCA4 CDSを示す図である。(a)インビトロ及び(b)インビボでの、異なる重複ゾーンベクターバリエーションで形質導入後のABCA4タンパク質検出。単位は未処理試料(- = 未処理HEK293T細胞; KO = 非注入Abca4^{-/-}網膜)に対する倍率増加を示す。エラーバーはSEMを示す。一元配置分散分析、チューキーポストホック解析により、インビトロでは、デュアルベクターバリエーションB及びCは他のすべての試料よりも有意に多いABCA4タンパク質を生成したが、BとCの間には有意な差はなかったことが明らかにされた。インビボでは、デュアルベクターバリエーションCは他のすべてのバリエーション(Bを除く)よりも有意に多いABCA4タンパク質を生成した。

10

【図4-1】(a)非組換え下流ベクターで処理されたHEK293T細胞において検出可能なトランケート型ABCA4タンパク質バリエーション; (b)デュアルベクター-5'B又は5'Cを注入したAbca4^{-/-}網膜試料において検出されたトランケート型及び全長ABCA4タンパク質を示す図である。

【図4-2】図4-1の続きである。(c)表は注入された網膜のウェスタンブロットによって検出される全ABCA4タンパク質集団中に存在するパーセンテージ全長ABCA4を提示する; (d)転写物及びタンパク質レベルでの、重複Cデュアルベクターバリエーションを注入した網膜と、重複Bデュアルベクターバリエーションを注入した網膜との間の、ABCA4発現の倍率変化の差。エラーバーはSEMを示す。

20

【図5-1】a)インフレームAUGコドンの前にフレーム外AUGを有する重複C配列を示す図である。

【図5-2】図5-1の続きである。b)重複ゾーンC及びBの予測二次構造を示す図である。

【図5-3】図5-2の続きである。

【図5-4】図5-3の続きである。

【図6】注入6週後に回収されたAbca4^{-/-}網膜における視細胞の外節におけるABCA4(緑色)の染色。HCN1(赤色)染色は内節を標識する。WT網膜における天然Abca4局在の染色例も含まれ、さらに非注入Abca4^{-/-}網膜において染色がないことの証拠も含まれる。

30

【図7】野生型(WT)及びAbca4^{-/-}眼におけるAbca4/ABCA4(緑色)及びHcn1(赤色)染色を示す図である。

【図8】野生型(WT)及びAbca4^{-/-}眼における視細胞外節におけるAbca4/ABCA4(緑色)及びロドプシン(赤色)染色を示す図である。

【図9】野生型(WT)及びAbca4^{-/-}眼におけるAbca4/ABCA4(緑色)及びロドプシン(赤色)頂端RPE染色を示す図である。

【図10】例示的な重複ベクターの図である。

【図11】正常レチノイドサイクルが図の左側に示される。Abca4欠損マウス及びヒトにおいて強化された度合で起きるビスレチノイド及びA2Eの生成が右側に示される。図の右側で、ボックス内で強調される分子は、Abca4^{-/-}マウスにおいて評価された(実施例6)。

40

【図12】シャム又は治療注入のいずれかを受けた13のAbca4^{-/-}マウスの眼のペアにおけるビスレチノイド及びA2Eアイソフォームのレベルを示す図である。ビスレチノイド及びA2Eレベルの有意な減少が、シャムと治療の眼の間で観察された($p=0.017$ 、 $F=5.849$)。さらに、すべてのビスレチノイド及びA2E測定では、最も低いレベルはデュアルベクター処理した眼において見られた(実施例6)。

【発明を実施するための形態】

【0053】

50

配列のリスト

配列番号1 ヒトABCA4核酸配列。配列番号1はNCBI参照配列NM_000350.2と同一である。

配列番号2 ヒトABCA4核酸配列バリエーション。配列番号2は以下の変異、ヌクレオチド1640 G>T、ヌクレオチド5279 G>A、ヌクレオチド6173 T>Cを除き、配列番号1と同一である。

配列番号3 ITR、プロモーター、CDS、ITRを含む、例示的上流ベクター配列。

配列番号4 ITR、CDS、転写後応答エレメント、ポリアデニル化配列、ITRを含む、例示的下流ベクター配列。

配列番号5 GRK1プロモーター配列。

配列番号6 UTR配列。

配列番号7 ウッドチャック肝炎ウイルス転写後応答エレメント。

10

配列番号8 ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。

配列番号9 プロモーター、CDSを含む例示的な部分的上流ベクター配列。

配列番号10 CDS、転写後応答エレメント、ポリアデニル化配列を含む、例示的な部分的下流ベクター配列。

【0054】

ウイルスベクターは、組換え核酸技術を使用して非天然核酸配列（又は導入遺伝子）をウイルスゲノム中に組み入れて改変された野生型ウイルスに由来する。特異的な細胞を標的として感染するウイルスの能力は、導入遺伝子を標的細胞に送達するために使用され、遺伝子の発現とコードされる遺伝子産物の生成をもたらす。

【0055】

20

本発明は、アデノ随伴ウイルス（AAV）に由来するベクターに関する。

【0056】

第1の態様では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列（CDS）の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、第1の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド105～3597に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、第2の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド3806～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、第1の核酸配列及び第2の核酸配列はそれぞれ他方と配列が重複する領域を含み、該配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応する核酸配列の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む、該AAVベクターシステムを提供する。

30

【0057】

AAVベクターは一般的に当技術分野において周知であり、当業者は、当技術分野におけるその技術常識から、その調製に適した一般的手法に精通している。当業者の技術常識には、目的の核酸配列をAAVベクターのゲノム中に組み込むのに適した手法が含まれる。

【0058】

「AAVベクターシステム」という用語は、第1及び第2のAAVベクターが相補的な様式で共に機能することが意図されるという事実を受容するために使用される。

40

【0059】

本発明のAAVベクターシステムの第1及び第2のAAVベクターは、合わせてABCA4導入遺伝子全体をコードする。したがって、標的細胞におけるコードされるABCA4導入遺伝子の発現には、第1（上流）及び第2（下流）のベクターの両方で標的細胞を形質導入することが必要である。

【0060】

本発明のAAVベクターシステムのAAVベクターは、典型的にはAAV粒子（ビリオンとも呼ばれる）の形態である。AAV粒子は、AAVゲノムである核酸のコアを囲むタンパク質コート（キャプシド）を含む。本発明はまた、本明細書に記載されるAAVベクターシステムのAAVベクターゲノムをコードする核酸配列を包含する。

50

【 0 0 6 1 】

配列番号1は、NCBI参照配列NM_000350.2に対応するヒトABCA4核酸配列である。配列番号1は、NCBI参照配列NM_000350.2と同一である。ABCA4コーディング配列は配列番号1のヌクレオチド105～6926に渡る。

【 0 0 6 2 】

第1のAAVベクターは、ABCA4 CDSの5'末端部分を含む第1の核酸配列を含む。ABCA4 CDSの5'末端部分は、ABCA4 CDSの5'末端を含むABCA4 CDSの部分である。これはCDSの一部に過ぎないから、ABCA4 CDSの5'末端部分は全長ABCA4 CDSではない（すなわち、ABCA4 CDS全体ではない）。したがって、第1の核酸配列（したがって、及び第1のAAVベクター）は全長ABCA4 CDSを含まない。

10

【 0 0 6 3 】

第2のAAVベクターはABCA4 CDSの3'末端部分を含む第2の核酸配列を含む。ABCA4 CDSの3'末端部分は、ABCA4 CDSの3'末端を含むABCA4 CDSの部分である。これはCDSの一部に過ぎないから、ABCA4 CDSの3'末端部分は全長ABCA4 CDSではない（すなわち、ABCA4 CDS全体ではない）。したがって、第2の核酸配列（したがって、及び第2のAAVベクター）は全長ABCA4 CDSを含まない。

【 0 0 6 4 】

5'末端部分及び3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含する（後述されるように、配列が重複する領域を有する）。したがって、全長ABCA4 CDSは本発明のAAVベクターシステムに含まれ、第1及び第2のAAVベクターに渡って分割され、第1及び第2のAAVベクターで標的細胞を形質導入後に標的細胞において再構成されうる。

20

【 0 0 6 5 】

上述の第1の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド105～3597に対応する連続ヌクレオチドの配列を含む。ABCA4 CDSは配列番号1のヌクレオチド105で始まる。

【 0 0 6 6 】

上述の第2の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド3806～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列を含む。

【 0 0 6 7 】

ABCA4 CDS全体を包含するために、第1及び第2の核酸配列は各々が配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応するABCA4 CDSの少なくとも一部をさらに含み、第1及び第2の核酸配列を整列した場合に配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応するABCA4 CDSの全体が包含されるようにする。したがって、整列した場合に、第1及び第2の核酸配列は、合わせてABCA4 CDS全体を包含する。

30

【 0 0 6 8 】

さらに、第1及び第2の核酸配列は、本発明の第1及び第2のAAVベクターで形質導入された標的細胞内で全長導入遺伝子の一部としてABCA4 CDS全体の再構成を可能とする、配列が重複する領域を含む。

【 0 0 6 9 】

第1及び第2の核酸配列が互いに整列される場合、第1の核酸配列の3'末端の領域は、第2の核酸配列の5'末端の対応する領域と重複する。したがって、第1及び第2の核酸配列の両方が、配列が重複する領域を形成するABCA4 CDSの一部を含む。

40

【 0 0 7 0 】

本発明者は、第1及び第2の核酸配列の間の重複領域が、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応するABCA4 CDSの部分の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含む場合に、特に有利な結果が得られることを見出した。

【 0 0 7 1 】

重複領域は、前記20個の連続ヌクレオチドの上流及び／又は下流に伸びてもよい。したがって、重複する領域は長さが20ヌクレオチドを超えてもよい。

【 0 0 7 2 】

重複領域は配列番号1のヌクレオチド3598に対応する位置の上流のヌクレオチドを含ん

50

でもよい。あるいは、又はその上、重複領域は、配列番号1のヌクレオチド3805に対応する位置の下流のヌクレオチドを含んでもよい。

【0073】

あるいは、核酸配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応するABCA4 CDSの部分の中に含まれてもよい。

【0074】

したがって、一実施形態では、核酸配列が重複する領域は、長さが20～550ヌクレオチド、好ましくは長さが50～250ヌクレオチド、好ましくは長さが175～225ヌクレオチド、好ましくは長さが195～215ヌクレオチドである。

【0075】

一実施形態では、核酸配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応する核酸配列の少なくとも約50個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約75個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約100個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約150個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約200個の連続ヌクレオチド、好ましくは全208個の連続ヌクレオチドを含む。

【0076】

好ましい実施形態では、核酸配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598に対応するヌクレオチドで開始する。「開始する」という用語は、核酸配列が重複する領域が配列番号1のヌクレオチド3598に対応するヌクレオチドから始まり5'から3'への方向に走ることを意味する。したがって、好ましい実施形態では、核酸配列が重複する領域の最も5'のヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド3598に対応する。

【0077】

さらに好ましい実施形態では、第1の核酸配列及び第2の核酸配列ベクターの間の核酸配列が重複する領域は、配列番号1のヌクレオチド3598～3805に対応する。

【0078】

本発明のさらなる利点は、上述の核酸配列が重複する領域を含むデュアルAAVベクターの構築物が望ましくないランケート型ABCA4ペプチドの翻訳のレベルを有利には低減しうることである。

【0079】

下流ベクターのみに由来するmRNA転写物から翻訳が開始される場合、ランケート型ABCA4ペプチドの翻訳の問題がデュアルAAVベクターシステムにおいて生じうる。この点で、AAV2 5' ITRなどのAAV ITRはプロモーター活性を有しうる。このことは、下流ベクターにおけるWPRES及びbGHポリアデニル化配列の存在と共に（後述されるように）、非組換え下流ベクターからの安定なmRNA転写物の生成をもたらす。野生型ABCA4 CDSは、その下流部分において、アミノ酸配列を変更することなく他のコドンに置換しえない、複数のインフレームAUGコドンを含む。これにより、安定な転写物から翻訳が生じランケート型ABCA4ペプチドの存在をもたらす可能性が生じる。

【0080】

核酸配列が重複する領域が配列番号1のヌクレオチド3598に対応するヌクレオチドで開始する本発明の好ましい実施形態では、重複ゾーンの開始配列は、翻訳機構が非組換え下流のみの転写物のフレーム外部位からの翻訳を開始することを促進するために、より弱いコンテキストのインフレームAUGコドンよりも前に良好なコンテキスト（潜在的なコザックコンセンサス配列に関して）のフレーム外AUG（開始）コドンを含む。本発明の特に好ましい実施形態では、インフレームAUGよりも前に様々なコンテキストの全部で4つのフレーム外AUGコドンが存在する。これらのすべてが翻訳されると10アミノ酸以内で終止コドンに翻訳され、したがって望ましくないランケート型ABCA4ペプチドの翻訳を防止する。

【0081】

好ましくは、第1の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド105～3805に対応する連続ヌクレオチドの配列を含み、第2の核酸配列は配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対応する

10

20

30

40

50

連続ヌクレオチドの配列を含み、そうして上述の特に好ましい核酸配列が重複する領域が包含される。

【0082】

したがって、好ましい実施形態では、ABCA4 CDSの5'末端部分は、配列番号1のヌクレオチド105～3805に対応する連続ヌクレオチドの配列からなり、ABCA4 CDSの3'末端部分は、配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列からなる。

【0083】

さらに好ましい実施形態では、ABCA4 CDSの5'末端部分は、配列番号1のヌクレオチド105～3805からなり、ABCA4 CDSの3'末端部分は、配列番号1のヌクレオチド3598～6926からなる。

10

【0084】

したがって、好ましい実施形態では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのAAVベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列(CDS)の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、該ABCA4 CDSの5'末端部分は配列番号1のヌクレオチド105～3805に対応する連続ヌクレオチドの配列からなり、該ABCA4 CDSの3'末端部分は配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列からなる、該AAVベクターシステムを提供する。

20

【0085】

さらに好ましい実施形態では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるためのAAVベクターシステムであって、該AAVベクターシステムは第1の核酸配列を含む第1のAAVベクターと第2の核酸配列を含む第2のAAVベクターとを含み、第1の核酸配列はABCA4コーディング配列(CDS)の5'末端部分を含み、第2の核酸配列はABCA4 CDSの3'末端部分を含み、該5'末端部分及び該3'末端部分は合わせてABCA4 CDS全体を包含し、該ABCA4 CDSの5'末端部分は配列番号1のヌクレオチド105～3805からなり、該ABCA4 CDSの3'末端部分は配列番号1のヌクレオチド3598～6926からなる、該AAVベクターシステムを提供する。

【0086】

「からなる」という用語によれば、ABCA4 CDSの5'末端部分及びABCA4 CDSの3'末端部分が上述の連続ヌクレオチドの特定の配列からなる実施形態では、第1の核酸配列及び第2の核酸配列は各々いかなる追加のABCA4 CDSも含まない。

30

【0087】

典型的には、第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターの各々は5'及び3'逆方向末端反復(ITR)を含む。

【0088】

典型的には、AAVの天然由来の血清型、単離体又はクレードのAAVゲノムは、少なくとも1つの逆方向末端反復配列(ITR)を含む。ITR配列はシスに作用して機能的な複製起点を提供し、細胞のゲノムからのベクターの組み込み及び切除を可能とする。AAV ITRは、例えば、宿主細胞DNAポリメラーゼの作用による一本鎖ベクターDNAの二本鎖DNAへの変換後、AAV感染細胞の核内でコンカテマー形成を助けると考えられている。そのようなエピソームコンカテマーの形成は宿主細胞の生涯の間にベクター構築物を保護するのに役立つものであり、それによってインビボで導入遺伝子の発現を長引かせることを可能にする。

40

【0089】

したがって、一実施形態では、ITRはAAV ITR(すなわち、AAVゲノムにおいて見出されるITR配列に由来するITR配列)である。

【0090】

本発明のAAVベクターシステムの第1及び第2のAAVベクターは合わせて、完全に機能的なABCA4導入遺伝子が両方のベクターの形質導入後に標的細胞において再構成されるのに必

50

要なすべての成分を含む。当業者は、ウイルスベクター形質導入細胞において導入遺伝子の発現を保証するのに一般に使用される追加の遺伝因子を知っている。これらは発現調節配列と呼ばれてもよい。したがって、本発明のAAVウイルスベクターシステムのAAVベクターは、通常、ABCA4導入遺伝子をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された発現調節配列（例えば、プロモーター配列を含む）を含む。

【0091】

5'発現調節配列は好適にはウイルスベクターシステムの第1（「上流」）のAAVベクター中に位置しており、一方、3'発現調節配列は好適にはウイルスベクターシステムの第2（「下流」）のAAVベクター中に位置している。

【0092】

したがって、第1のAAVベクターは、通常、ABCA4 CDSの5'末端部分に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターはその性質上ABCA4 CDSの5'に位置することが必要であり、したがって第1のAAVベクターにおけるその位置も同様である。

【0093】

任意の好適なプロモーターを使用してもよく、その選択は当業者によって容易になさるうる。プロモーター配列は、恒常活性型（すなわち、任意の宿主細胞背景で作動するもの）であってもよく、あるいは、特定の宿主細胞環境でのみ活性であり、よって特定の細胞種で導入遺伝子の標的発現を可能とするものであってもよい（例えば、組織特異的プロモーター）。プロモーターは、別の因子、例えば宿主細胞に存在する因子の存在に応じて誘導可能な発現を示してもよい。ベクターが治療用に投与されるいかなる場合においても、プロモーターが標的細胞背景において機能的であることが好ましい。

【0094】

一部の実施形態では、導入遺伝子が網膜細胞集団でのみ発現されることを可能にするために、プロモーターが網膜細胞特異的発現を示すことが好ましい。したがって、プロモーターからの発現は網膜細胞特異的、例えば網膜神経感覚上皮及び網膜色素上皮の細胞にのみ限定されるものであってもよい。

【0095】

本発明における使用に適した例示的なプロモーターは、場合によりサイトメガロウイルス（CMV）エンハンサーエレメントと組み合わせた、ニワトリベータ-アクチン（CBA）プロモーターである。本発明において使用するための別の例示的なプロモーターはハイブリッドCBA/CAGプロモーター、例えばrAVE発現カセット（GeneDetect.com）において使用されるプロモーターである。

【0096】

網膜特異的遺伝子発現を誘導しうるヒト配列に基づくプロモーターの例としては、杆体及び錐体にはロドプシンキナーゼ、錐体のみにはPR2.1、並びに網膜色素上皮にはRPE65が挙げられる。

【0097】

本発明者は、遺伝子発現の特に有利なレベルがGRK1プロモーターを使用して達成されることを見出した。したがって、好ましい実施形態では、プロモーターはヒトロドプシンキナーゼ（GRK1）プロモーターである。

【0098】

本発明のGRK1プロモーター配列は、長さが199ヌクレオチドであってもよく、GRK1遺伝子のヌクレオチド-112～+87を含んでもよい。好ましい実施形態では、プロモーターは配列番号5の核酸配列、又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4又は99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0099】

第1のAAVベクターは、プロモーターと上流ABCA4核酸配列の間に位置する非翻訳領域（UTR）（すなわち5'UTR）を含んでもよい。

【0100】

10

20

30

40

50

任意の好適なUTR配列を使用してもよく、その選択は当業者によって容易になされうる。

【0101】

UTRは以下のエレメント、ニワトリ (*Gallus gallus*) -アクチン (CBA) イントロン1断片、アナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) -グロビン (RBG) イントロン2断片、及びアナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) -グロビンエキソン3断片のうち1以上を含んでもよい。

【0102】

UTRはコザックコンセンサス配列を含んでもよい。任意の好適なコザックコンセンサス配列を使用してもよく、その選択は当業者によって容易になされうる。

10

【0103】

好ましい実施形態では、UTRは配列番号6において特定される核酸配列、又は少なくとも90% (例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%) の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0104】

配列番号6のUTRは長さが186ヌクレオチドであり、コザックコンセンサス配列の直前にニワトリ (*Gallus gallus*) -アクチン (CBA) イントロン1断片 (予測スプライス供与部位を有する)、アナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) -グロビン (RBG) イントロン2断片 (予測分岐点及びスプライス受容部位を含む)、及びアナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) -グロビンエキソン3断片を含む。

20

【0105】

本発明者は、驚くことに、上述のUTR、特に配列番号6において特定されるUTR配列又は少なくとも90%の配列同一性を有するそのバリエーションの存在が、有利な点としてABCA4導入遺伝子からの翻訳収量を増加させることを見出した。

【0106】

本発明のAAVベクターシステムの第2 (「下流」) のAAVベクターは、転写後応答エレメント (転写後調節エレメントとしても公知である) 又はPREを含んでもよい。任意の好適なPREを使用してもよく、その選択は当業者によって容易になされうる。好適なPREの存在は、ABCA4導入遺伝子の発現を増強しうる。

【0107】

好ましい実施形態では、PREはウッドチャック肝炎ウイルスPRE (WPRE) である。特に好ましい実施形態では、WPREは配列番号7、又は少なくとも90% (例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%) の配列同一性を有するそのバリエーションにおいて特定される配列を有する。

30

【0108】

第2のAAVベクターは、下流ABCA4核酸配列の3'に位置するポリアデニル化配列を含んでもよい。任意の好適なポリアデニル化配列を使用してもよく、その選択は当業者によって容易になされうる。

【0109】

好ましい実施形態では、ポリアデニル化配列は、ウシ成長ホルモン (bGH) ポリアデニル化配列である。特に好ましい実施形態では、bGHポリアデニル化配列は、配列番号8、又は少なくとも90% (例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%) の配列同一性を有するそのバリエーションにおいて特定される配列を有する。

40

【0110】

本発明のAAVベクターシステムの好ましい実施形態では、第1のAAVベクターは配列番号9の核酸配列を含み、第2のAAVベクターは配列番号10の核酸配列を含む。

【0111】

本発明のAAVベクターシステムの別の好ましい実施形態では、第1のAAVベクターは配列番号3の核酸配列を含み、第2のAAVベクターは配列番号4の核酸配列を含む。

50

【0112】

本発明のAAVベクターシステムは標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるのに適している。

【0113】

したがって、一態様では、本発明は、標的細胞においてヒトABCA4タンパク質を発現させるための方法であって、機能的ABCA4タンパク質が標的細胞において発現されるように、上述の第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターで標的細胞を形質導入するステップを含む方法を提供する。

【0114】

ヒトABCA4タンパク質の発現は、第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターの両方で標的細胞が形質導入されることを必要とするが、その順序は重要ではない。したがって、標的細胞は、任意の順番（第1のAAVベクターの後に第2のAAVベクター、又は第2のAAVベクターの後に第1のAAVベクター）で又は同時に、第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターで、形質導入することができる。

【0115】

標的細胞をAAVベクターで形質導入するための方法は、当技術分野において公知であり、当業者は精通している。

【0116】

標的細胞は好ましくは眼の細胞、好ましくは網膜細胞（例えば、神経視細胞、杆体細胞、錐体細胞、又は網膜色素上皮細胞）である。

【0117】

本発明はまた上に規定されるように第1のAAVベクターを提供する。上に規定されるように、第2のAAVベクターもまた提供される。

【0118】

別の態様では、本発明は、ABCA4 CDSの5'末端部分を含む核酸配列を含み、ABCA4 CDSの5'末端部分が配列番号1のヌクレオチド105～3805に対応する連続ヌクレオチドの配列からなる、AAVベクターを提供する。したがって、このAAVベクターは、当該連続ヌクレオチドの配列を超えていかなる追加のABCA4 CDSをも含まない。

【0119】

第1のAAVベクターは、5'及び3' ITR、好ましくはAAV ITR；プロモーター、好ましくはG RK1プロモーター；及び/又はUTRを含んでもよく、これらのエレメントは本発明のAAVベクターシステムに関連して上述されたとおりのものである。

【0120】

一実施形態では、第1のAAVベクターは、配列番号9の核酸配列を含む。

【0121】

一実施形態では、第1のAAVベクターは、配列番号9又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0122】

一実施形態では、第1のAAVベクターは、配列番号9（ただし、配列番号1のヌクレオチド1640に対応する位置のヌクレオチドがGである）、又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0123】

一実施形態では、第1のAAVベクターは配列番号3の核酸配列を含む。

【0124】

一実施形態では、第1のAAVベクターは、配列番号3、又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0125】

10

20

30

40

50

一実施形態では、第1のAAVベクターは、配列番号3（ただし、配列番号1のヌクレオチド1640に対応する位置のヌクレオチドがGである）、又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0126】

別の態様では、本発明は、ABCA4 CDSの3'末端部分を含む核酸配列を含み、該ABCA4 CDSの3'末端部分が配列番号1のヌクレオチド3598～6926に対応する連続ヌクレオチドの配列からなる、AAVベクターを提供する。したがって、このAAVベクターは、当該連続ヌクレオチドの配列を超えていかなる追加のABCA4 CDSをも含まない。

【0127】

第2のベクターは、5'及び3' ITR、好ましくはAAV ITR；PRE、好ましくはWPRES；及び／又はポリアデニル化配列、好ましくはbGHポリアデニル化配列を含んでもよく、これらのエレメントは本発明のAAVベクターシステムに関連して上述したとおりのものである。

【0128】

一実施形態では、第2のAAVベクターは、配列番号10の核酸配列を含む。

【0129】

一実施形態では、第2のAAVベクターは、配列番号10、又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0130】

一実施形態では、第2のAAVベクターは、配列番号10（ただし、配列番号1のヌクレオチド5279に対応する位置のヌクレオチドがGであり、配列番号1のヌクレオチド6173に対応する位置のヌクレオチドがTである）、又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0131】

一実施形態では、第2のAAVベクターは配列番号4の核酸配列を含む。

【0132】

一実施形態では、第2のAAVベクターは、配列番号4、又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0133】

一実施形態では、第2のAAVベクターは、配列番号4（ただし、配列番号1のヌクレオチド5279に対応する位置のヌクレオチドがGであり、配列番号1のヌクレオチド6173に対応する位置のヌクレオチドがTである）、又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0134】

本発明はまた、上述の核酸配列を含む核酸を提供する。

【0135】

本発明はまた上述のAAVベクターに由来しうるAAVベクターゲノムを提供する。

【0136】

上述の第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターを含むキットもまた提供される。AAVベクターはAAV粒子の形態のキットの中に提供されてもよい。

【0137】

上述のように、第1の核酸配列を含む核酸と第2の核酸配列を含む核酸とを含むキットがさらに提供される。

【0138】

本発明はまた上述のAAVベクターシステム及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0139】

本発明のAAVベクターシステム、本発明のキット、本発明の医薬組成物を遺伝子治療において使用してもよい。例えば、本発明のAAVベクターシステム、本発明のキット、本発明の医薬組成物を疾患の予防又は治療において使用してもよい。

【0140】

疾患を予防又は治療するための本発明の使用には、ABCA4タンパク質の発現をもたらすために、第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターを標的細胞に投与することが必要である。

【0141】

好ましくは、予防又は治療されるべき疾患は、網膜細胞の分解を特徴とする。そのような疾患の例は、シュタルガルト病である。したがって、本発明の第1及び第2のAAVベクターは、機能的なABCA4タンパク質が発現されて当該疾患に存在する変異（単数又は複数）が補償されるように、患者の眼に、好ましくは眼の網膜組織に投与されてもよい。

【0142】

本発明のAAVベクターは、医薬組成物又は医薬として製剤化されてもよい。

【0143】

本発明の例示的AAVベクターシステムは、第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターを含み、第1のAAVベクターは配列番号9の核酸配列を含み、第2のAAVベクターは配列番号10の核酸配列を含む。

【0144】

本発明のさらなる例示的AAVベクターシステムは、第1のAAVベクター及び第2のAAVベクターを含み、第1のAAVベクターは配列番号9又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含み、第2のAAVベクターは配列番号10又は少なくとも90%（例えば、少なくとも90、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%）の配列同一性を有するそのバリエーションの核酸配列を含む。

【0145】

本発明はまた、配列番号1の代わりに配列番号2が参照配列として使用される状況で実施されてもよい。

【0146】

この点では、配列番号2は以下の変異、ヌクレオチド1640 G>T、ヌクレオチド5279 G>A、ヌクレオチド6173 T>Cを除き、配列番号1と同一である。これらの変異はコードされるアミノ酸配列を変更せず、したがって、配列番号2にコードされるABCA4タンパク質は配列番号1にコードされるABCA4タンパク質と同一である。

【0147】

したがって、本発明の代替的な実施形態では、配列番号1への上記参照は、配列番号2への参照と置換されてもよい。

【0148】

配列の対応

本明細書で使用される場合、所与の核酸配列中のヌクレオチドに関して使用される場合の「に対応する」という用語は、特定の配列番号への参照によってヌクレオチドの位置を規定する。しかし、そのような参照がなされる場合、発明は、参照される特定の配列番号に示される正確な配列に限定されるものではなく、そのバリエーション配列を含むことが理解される。配列番号1におけるヌクレオチドの位置に対応するヌクレオチドは、配列アライメントによって、例えば配列アラインメントプログラムを使用することによって容易に決定されるものであり、その使用は当技術分野において周知である。この点について、当業者であれば、遺伝暗号の縮重性質は、所与のポリペプチドをコードする様々な核酸配列が、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させることなく存在しうることを

10

20

30

40

50

意味することを容易に理解するだろう。したがって、他のABCA4コーディング配列におけるヌクレオチドの位置の同定が考えられる（すなわち、当業者が考えうる位置のヌクレオチドは、例えば配列番号1において同定される位置に対応する）。

【0149】

例を挙げると、配列番号2は、上述のように、3つの特定の変異を除き、配列番号1と同一である（これらの3つの変異は、コードされるABCA4ポリペプチドのアミノ酸配列を変更しない）。したがって、この場合、当業者であれば、配列番号2における所与のヌクレオチドの位置は、配列番号1において同等に番号を割り振られたヌクレオチドの位置に対応すると考えるだろう。

【0150】

AAVベクター

本発明のウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。本発明のAAVベクターは成熟AAV粒子又はビリオン、すなわちAAVタンパク質キャプシドによって囲まれた核酸の形態でありうる。

【0151】

AAVベクターはAAVゲノム又はその派生体を含みうる。

【0152】

AAVゲノムは、AAV粒子の生成に必要な機能をコードするポリヌクレオチド配列である。これらの機能には、AAVゲノムのAAV粒子へのキャプシド形成を含む、宿主細胞におけるAAVの複製及びパッケージングサイクルにおいて働く機能が含まれる。天然に存在するAAVは、複製欠損であり、複製及びパッケージングサイクルの完了にはトランスのヘルパー機能の提供に依存する。したがって、本発明のベクターのAAVゲノムは典型的には複製欠損である。

【0153】

AAVゲノムは、ポジティブ若しくはネガティブセンスのいずれかの一本鎖形態、あるいは二本鎖形態でありうる。二本鎖形態の使用により、標的細胞におけるDNA複製ステップを省くことが可能になり、よって導入遺伝子発現を加速しうる。

【0154】

本発明のベクターのAAVゲノムは通常一本鎖形態である。

【0155】

AAVゲノムは、AAVの任意の天然由来の血清型、単離体又はクレードに由来しうる。したがって、AAVゲノムは天然に存在するAAVの完全ゲノムでありうる。当業者に知られているように、天然に存在するAAVは様々な生物学的システムに従って分類されうる。

【0156】

一般に、AAVはその血清型に関して参照される。血清型は、そのキャプシド表面抗原の発現プロファイルにより、それを他のバリエーションと区別するために使用することができる特徴的な反応性を有する、AAVの変異亜種に対応する。通常、特定のAAV血清型を有するウイルスは他のいずれのAAV血清型に特異的な中和抗体とも効率的に交差反応しない。

【0157】

AAV血清型には、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10及びAAV11、並びに近年霊長類脳から同定されたRec2及びRec3などの組換え血清型も含まれる。これらのAAV血清型のいずれも本発明において使用することができる。したがって、本発明の一実施形態では、本発明のAAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rec2又はRec3 AAVに由来してもよい。

【0158】

AAV血清型の総説は、Choi et al. (2005) Curr. Gene Ther. 5: 299-310及びWu et al. (2006) Molecular Therapy 14: 316-27に見出すことができる。AAVゲノムの配列、又はLTR配列、rep又はcap遺伝子を含むAAVゲノムのエレメントの配列は、AAV全ゲノム配列についての以下のアクセッション番号に由来してもよい：アデノ随伴ウイルス1 NC_002077、AF063497；アデノ随伴ウイルス2 NC_001401；アデノ随伴ウイルス3 NC_001729；アデノ随

10

20

30

40

50

伴ウイルス3B NC_001863；アデノ随伴ウイルス4 NC_001829；アデノ随伴ウイルス5 Y1806 5、AF085716；アデノ随伴ウイルス6 NC_001862；トリ（Avian）AAV ATCC VR-865 AY18619 8、AY629583、NC_004828；トリ（Avian）AAV株DA-1 NC_006263、AY629583；ウシ（Bovine）AAV NC_005889、AY388617。

【0159】

AAVはまた、クレード又はクローンに関しても参照されうる。これは、天然由来AAVの系統学的関係、そして典型的には共通の祖先まで遡ることができるAAVの系統群をいい、そしてそれらのすべての子孫を含む。さらに、AAVは特定の単離体、すなわち天然に見出される特定のAAVの遺伝的単離体に関しても参照されうる。遺伝的単離体という用語は、他の天然に存在するAAVとの限定的な遺伝的混合を受け、それによって遺伝的レベルで認識可能に異なる集団を定義するAAVの集団を表す。

10

【0160】

当業者であれば、その技術常識に基づいて、本発明における使用のためのAAVの適切な血清型、クレード、クローン又は単離体を選択することができる。例えば、遺伝的色覚異常の矯正が成功したことによって証明されるように、AAV5キャプシドは霊長類錐体視細胞に効率的に形質導入することが示されている（Mancuso et al. (2009) Nature 461: 784-7）。

【0161】

AAV血清型は、AAVウイルスの感染の組織特異性（又はトロピズム）を決定する。したがって、本発明に従って患者に投与されるAAVにおいて使用するための好ましいAAV血清型は、眼内の標的細胞に対する天然トロピズム又は高い感染効率を有するものである。一実施形態では、本発明で使用するためのAAV血清型は、網膜神経感覚上皮、網膜色素上皮及び／又は脈絡膜の細胞に感染するものである。

20

【0162】

典型的には、AAVの天然由来の血清型、単離体又はクレードのAAVゲノムは少なくとも1つの逆方向末端反復配列（ITR）を含む。ITR配列はシスで作用して機能的な複製起点を提供し、細胞のゲノムからのベクターの組込み及び切除を可能にする。AAVゲノムは通常、AAV粒子のパッケージング機能をコードするrep及び／又はcap遺伝子などのパッケージング遺伝子も含む。rep遺伝子は、タンパク質Rep78、Rep68、Rep52及びRep40又はそれらのバリエーションのうちの1つ以上をコードする。cap遺伝子は、VP1、VP2及びVP3などの1つ以上のキャプシドタンパク質又はそれらのバリエーションをコードする。これらのタンパク質はAAV粒子のキャプシドを構成する。キャプシドバリエーションは以下に議論される。

30

【0163】

プロモーターは、パッケージング遺伝子の各々に作動可能に連結される。そのようなプロモーターの具体例には、p5、p19及びp40プロモーターが含まれる（Laughlin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5567-5571）。例えば、p5及びp19プロモーターは一般にrep遺伝子を発現させるために使用され、一方p40プロモーターは一般にcap遺伝子を発現させるために使用される。

【0164】

したがって、本発明のベクターに使用されるAAVゲノムは、天然に存在するAAVの完全ゲノムでありうる。例えば、完全AAVゲノムを含むベクターを使用してインビトロでAAVベクターを調製することができる。しかし、そのようなベクターは原則として患者に投与することができる一方で、これは実際には滅多に行われない。好ましくは、AAVゲノムは患者への投与の目的のために派生体化される。そのような派生体化は当技術分野において標準的であり、本発明は、AAVゲノムの任意の公知の派生体、及び当技術分野において公知の技術を適用することによって生成しうる派生体の使用を包含する。AAVゲノム及びAAVキャプシドの派生体化は、Coura and Nardi (2007) Virology Journal 4: 99並びに上記で参照されたChoi et al.及びWu et al.に概説されている。

40

【0165】

AAVゲノムの派生体には、インビボで本発明のベクターからの導入遺伝子の発現を可能

50

にするAAVゲノムの任意のトランケート型又は改変型が含まれる。典型的には、最小のウイルス配列を含むが上記の機能を保持するようにAAVゲノムを大幅にトランケートすることが可能である。これは、ベクターと野生型ウイルスとの組換えの危険性を低減し、また標的細胞中のウイルス遺伝子タンパク質の存在による細胞性免疫応答の誘発を回避する安全性の理由から好ましい。

【0166】

典型的には、AAVゲノムの派生体は少なくとも1つの逆方向末端反復配列（ITR）、好ましくは1より多いITR、例えば2つ以上のITRを含む。1つ以上のITRは、異なる血清型を有するAAVゲノムに由来しうるか、又はキメラ若しくは変異型ITRでありうる。好ましい変異型ITRはtrs（末端分解部位）の欠失を有するものである。この欠失は、ゲノムの継続的な複製を可能にし、コーディング配列と相補的配列の両方を含む一本鎖ゲノム、すなわち自己相補的AAVゲノムを生成する。これは、標的細胞におけるDNA複製を省くことを可能にし、よって導入遺伝子発現の加速を可能にする。

10

【0167】

例えば、宿主細胞DNAポリメラーゼの作用による一本鎖ベクターDNAの二本鎖DNAへの変換の後に、宿主細胞の核内で本発明のベクターのコンカテマー形成を助けるために、1つ以上のITRを含めることが好ましい。そのようなエピソームコンカテマーの形成は、宿主細胞の生存期間にベクター構築物を保護し、それによってインビボでの導入遺伝子の長期発現を可能にする。

20

【0168】

好ましい実施形態では、ITRエレメントは、派生体中で天然AAVゲノムから保持されている唯一の配列である。したがって、派生体は、好ましくは、天然ゲノムのrep及び/又はcap遺伝子並びに天然ゲノムの他のいかなる配列も含まない。これは、上記の理由から、そして宿主細胞ゲノムへのベクターの組み込みの可能性を低減するためにも好ましい。さらに、AAVゲノムのサイズを減少させることにより、導入遺伝子に加えて他の配列エレメント（例えば、調節エレメント）をベクター内に組み込む際の柔軟性の増大が可能になる。

30

【0169】

したがって、本発明の派生体では、以下の部分を除去することができる：1つの逆方向末端反復（ITR）配列、複製（rep）及びキャプシド（cap）遺伝子。しかし、一部の実施形態では、派生体は、1つ以上のrep及び/若しくはcap遺伝子又はAAVゲノムの他のウイルス配列をさらに含む。天然に存在するAAVは、ヒト第19染色体上の特定の部位に高頻度で組み込まれ、無視できる頻度のランダム組み込みを示すため、組み込み能力がベクター中に保持されることは治療の状況では許容されうる。

40

【0170】

派生体がキャプシドタンパク質、すなわちVP1、VP2及び/又はVP3を含む場合、その派生体は1つ以上の天然に存在するAAVのキメラ、シャッフル又はキャプシド改変派生体でありうる。特に、本発明は、同じベクター（すなわちシュードタイプベクター）内に、AAVの異なる血清型、クレード、クローン、又は単離体に由来するキャプシドタンパク質配列の提供を包含する。

50

【0171】

キメラ、シャッフル又はキャプシド改変派生体は、典型的にはウイルスベクターに1つ以上の所望の機能性を提供するように選択される。したがって、これらの派生体は、AAV2のゲノムなどの天然に存在するAAVゲノムを含むAAVベクターと比較して、遺伝子送達効率の増加、免疫原性（体液性又は細胞性）の低下、トロピズム範囲の変化、及び/又は特定の細胞種の標的化の改善を示しうる。遺伝子送達の効率の増加は、細胞表面での受容体又は共受容体の結合の改善、内在化の改善、細胞内及び核への輸送の改善、ウイルス粒子のアンコーティングの改善及び一本鎖ゲノムの二本鎖型への変換の改善によってもたらされうる。効率の増加はまた、トロピズム範囲の変更又は特定の細胞集団の標的化にも関連しうるものであり、よって、ベクター用量はそれが必要とされない組織への投与によって希釈されない。

50

【0172】

キメラキャプシドタンパク質は、天然に存在するAAV血清型の2つ以上のキャプシドコーディング配列間の組換えによって生成されるものを含む。これは、例えば、ある血清型の非感染性キャプシド配列が異なる血清型のキャプシド配列と同時トランスフェクトされるマーカーレスキュー手法によって実施されうるものであり、所望の特性を有するキャプシド配列に向けて選択するために定方向選択が使用される。異なる血清型のキャプシド配列を細胞内での相同組換えによって変化させて新規のキメラキャプシドタンパク質を生成することができる。

【0173】

キメラキャプシドタンパク質はまた、2つ以上のキャプシドタンパク質の間、例えば異なる血清型の2つ以上のキャプシドタンパク質の間で特定のキャプシドタンパク質ドメイン、表面ループ又は特定のアミノ酸残基を転移するキャプシドタンパク質配列の操作によって生成されるものを含む。

【0174】

シャッフル又はキメラキャプシドタンパク質は、DNAシャッフリング又はエラーブローンPCRによっても生成されうる。ハイブリッドAAVキャプシド遺伝子は、関連するAAV遺伝子、例えば複数の異なる血清型のキャプシドタンパク質をコードするものの配列を無作為に断片化し、次いでその後自己プライミングポリメラーゼ反応（これもまた配列相同性の領域における交差を引き起こしうる）において断片を再構成することによって創出することができる。いくつかの血清型のキャプシド遺伝子をシャッフルすることによってこのようにして創出されたハイブリッドAAV遺伝子のライブラリーは、所望の機能性を有するウイルスクローンを同定するためにスクリーニングされうる。同様に、エラーブローンPCRを使用してAAVキャプシド遺伝子をランダムに変異させて、その後、所望の特性について選択することができる多様なバリエーションのライブラリーを創出することができる。

【0175】

キャプシド遺伝子の配列はまた、天然野生型配列に対して特異的な欠失、置換又は挿入を導入するように遺伝的に改変されてもよい。特に、キャプシド遺伝子は、キャプシドコーディング配列のオープンリーディングフレーム内、又はキャプシドコーディング配列のN末端及び/又はC末端に無関係のタンパク質又はペプチドの配列を挿入することによって改変することができる。

【0176】

無関係のタンパク質又はペプチドは、有利な点として、特定の細胞種に対するリガンドとして作用し、それによって標的細胞への改善された結合を与えるか又は特定の細胞集団へのベクターの標的化の特異性を改善するものでありうる。無関係のタンパク質はまた、製造工程の一部としてウイルス粒子の精製を補助するもの、すなわちエピトープ又はアフィニティータグでありうる。挿入部位は、典型的にはウイルス粒子の他の機能、例えば内在化、ウイルス粒子の輸送と干渉しないように選択される。当業者であれば、その技術常識に基づいて挿入に適した部位を同定することができる。特定の部位は、上記で参照されたChoi et al.に開示されている。

【0177】

本発明はさらに、天然AAVゲノムの配列とは異なる順序及び構成でAAVゲノムの配列を提供することを包含する。本発明はまた、1以上のAAV配列又は遺伝子を別のウイルス由来の配列又は1より多いウイルス由来の配列から構成されるキメラ遺伝子で置換することも包含する。そのようなキメラ遺伝子は、異なるウイルス種の2つ以上の関連ウイルスタンパク質由来の配列から構成されうる。

【0178】

本発明のAAVベクターは、ある血清型のITRを有するAAVゲノム又は派生体が異なる血清型のキャプシドにパッケージングされているトランスキャプシド化型を含む。本発明のAAVベクターは、2つ以上の異なる血清型由来の非改変キャプシドタンパク質の混合物がウイルスキャプシドを構成するモザイク形態も含む。AAVベクターはまた、キャプシド表面に

10

20

30

40

50

吸着されたりガンドを担持する化学的改変形態を含みうる。例えば、そのようなりガンドは、特定の細胞表面受容体を標的とするための抗体を含みうる。

【0179】

したがって、例えば、本発明のAAVベクターは、AAV2ゲノム及びAAV2キャプシドタンパク質を有するもの（AAV2/2）、AAV2ゲノム及びAAV5キャプシドタンパク質を有するもの（AAV2/5）、並びにAAV2ゲノム及びAAV8キャプシドタンパク質を有するもの（AAV2/8）を含む。

【0180】

本発明のAAVベクターは、変異型AAVキャプシドタンパク質を含みうる。一実施形態では、本発明のAAVベクターは、変異型AAV8キャプシドタンパク質を含む。好ましくは、変異型AAV8キャプシドタンパク質は、AAV8 Y733Fキャプシドタンパク質である。

10

【0181】

投与方法

本発明のウイルスベクターは網膜下注入、網膜への直接注入又は硝子体内注入により対象の眼に投与されうる。

【0182】

当業者は個々の網膜下注入、網膜への直接注入又は硝子体内注入を熟知しており首尾よく実行することができる。

【0183】

網膜下注入

20

網膜下注入は網膜下腔、すなわち網膜神経感覚上皮の下への注入である。網膜下注入の間、注入される物質は視細胞と網膜色素上皮（RPE）層に向けられ、その間に空間を生じる。

【0184】

注入が小さな網膜切開術により実施される場合、網膜剥離が生じてもよい。注入物質により生じた網膜の剥離して上昇した層は「ブレブ」と呼ばれる。

【0185】

網膜下注入により生じた穴は、注入された溶液が投与後に硝子体腔中に著しく逆流しないように十分小さくしなければならない。医薬の効果が標的領域から逸れうるため、そのような逆流は医薬が注入された時に特に問題になるだろう。好ましくは、注入が網膜神経感覚上皮中に自己閉鎖する入口を生じる、すなわち、注入針が除去されると、注入物質がその穴からほとんど放出されないか又は実質的に全く放出されないように針によって生じた穴が再閉鎖する。

30

【0186】

この過程を容易にするために、専用の網膜下注入針が市販されている（例えば、DORC 41Gテフロン（登録商標）網膜下注入針、Dutch Ophthalmic Research Center International BV、Zuidland、The Netherlands）。これらは網膜下注入を実施するために設計された針である。

【0187】

注入中に網膜への損傷が生じない限り、及び十分に小さい針が使用される限り、実質的にすべての注入物質は、局所的な網膜剥離の場所で剥離された神経感覚上皮とRPEの間に局在したままである（すなわち、硝子体腔中に逆流しない）。実際、短い期間に典型的にはブレブが残っていることは、通常は注入物質が硝子体にほとんど逃げていかないことを示す。ブレブは注入物質が吸収されるにつれてより長期的には消えうる。

40

【0188】

眼、特に網膜の可視化が、例えば光干渉断層法を使用して手術前に行われてもよい。

【0189】

2ステップ網膜下注入

本発明のAAVベクターは、局所的な網膜剥離が第1液の網膜下注入により生じる2ステップ法を使用することによって正確性と安全性を高めて送達されてもよい。第1液はベクタ

50

ーを含まない。2回目の網膜下注入は、次いで、1回目の網膜下注入により生じたブレブの網膜下液中にベクターを含む医薬を送達するために使用される。医薬を送達する注入は網膜を剥離するために使用されないため、特定の容量の溶液がこの第2ステップにおいて注入されてもよい。

【0190】

本発明のAAVベクターは以下の：

(a) 少なくとも部分的に網膜を剥離し網膜下ブレブを形成するのに有効な量の溶液の網膜下注入による対象への投与ステップであって、溶液がベクターを含まない投与ステップ；及び

(b) ステップ(a)により形成されたブレブ中への網膜下注入による医薬組成物の投与ステップであって、医薬がベクターを含む投与ステップによって送達されてもよい。

10

【0191】

少なくとも部分的に網膜を剥離するためにステップ(a)において注入される溶液の容量は、例えば約10~1000 μ L、例えば約50~1000、100~1000、250~1000、500~1000、10~500、50~500、100~500、250~500 μ Lであってもよい。容量は例えば約10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900又は1000 μ Lであってもよい。

【0192】

ステップ(b)において注入される医薬組成物の容量は、例えば約10~500 μ L、例えば約50~500、100~500、200~500、300~500、400~500、50~250、100~250、200~250又は50~150 μ Lであってもよい。容量は例えば約10、50、100、150、200、250、300、350、400、450又は500 μ Lであってもよい。好ましくは、ステップ(b)において注入される医薬組成物の容量は100 μ Lである。容量を大きくすると網膜が引き伸ばされるリスクが増大しうるものであり、一方で容量が小さくすると見るのが困難になりうる。

20

【0193】

医薬を含まない溶液(すなわちステップ(a)の「第1液」)は後述のように医薬を含む溶液と同様に製剤化することができる。医薬を含まない好ましい溶液は生理的食塩水(BS)又は網膜下腔のpH及び浸透圧に一致した同様の緩衝液である。

【0194】

手術中における網膜の可視化

30

網膜は薄く透明であり網膜の下にある乱れて重度に色素が沈着した上皮に対して見るのが困難であるため、例えば末期の網膜変性中など、特定の状況下では、網膜の同定は困難である。青色生体色素(例えばBrilliant Peel(登録商標)、Geuder; MembraneBlue-Dual(登録商標)、ドルク)の使用により、網膜剥離手順(すなわち、本発明の2ステップ網膜下注入法におけるステップ(a))において生じた網膜の穴の同定を容易にし、硝子体腔中に逆流するリスク無しに同一の穴を通じて医薬を投与できるようにすることができる。

【0195】

肥厚した内境界膜又は網膜上膜のいずれかを通る注入は網膜下腔中へきれいに到達するのを妨げうるため、青色生体色素の使用はまた、これらの構造のある網膜中のあらゆる領域を同定する。さらに、これらの構造のいずれかが手術直後の時期において収縮すると、網膜の入口の穴の伸長をもたらし、硝子体腔中への医薬の逆流をもたらしうる。

40

【0196】

医薬組成物及び注入溶液

本発明のAAVベクター及びAAVベクターシステムは医薬組成物に製剤化してもよい。これらの組成物は、医薬に加えて薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、緩衝剤、安定剤又は当技術分野において周知の他の物質を含んでもよい。そのような物質は無毒性であるべきであり、活性成分の有効性に干渉すべきではない。担体又は他の物質の正確な性質は、当業者が投与経路、例えば網膜下注入、網膜への直接注入又は硝子体内注入に従って決定することができる。

50

【0197】

医薬組成物は典型的には液体形態である。液体医薬組成物は一般的に、例えば水、石油、動物若しくは植物油、ミネラルオイル又は合成油などの液体担体を含む。生理食塩水、塩化マグネシウム、ブドウ糖若しくは他の糖類溶液、又はエチレングリコール、プロピレングリコール若しくはポリエチレングリコールなどのグリコールが含まれてもよい。一部の場合では、プルロン酸（PF68）0.001%などの界面活性剤が使用されてもよい。

【0198】

苦痛部位での注入には、活性成分は発熱性物質を含まず、好適なpH、浸透圧及び安定性を有する水溶液の形態であってもよい。当業者であれば、例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液又は乳酸リンゲル注射液などの等張ビヒクルを使用して好適な溶液を首尾よく調製することができる。保存料、安定剤、緩衝剤、酸化防止剤及び/又は他の添加剤が必要に応じて含まれてもよい。

10

【0199】

遅延放出のためには、医薬は、徐放用に調製された医薬組成物、例えば生体適合性ポリマーから形成されたマイクロカプセル又は当技術分野で公知の方法に従ったリポソーム担体系に含まれてもよい。

【0200】

治療方法

本明細書における治療に関するすべての言及は、根治の、対症的な及び予防的な治療を含むが、本発明の文脈において、防ぐこと（予防）に関する言及は、予防的な治療により一般的に関連することが理解される。治療はまた、疾患の重症度の進行を停止することを含みうる。

20

【0201】

哺乳類、特にヒトの治療が好ましい。しかし、ヒトの治療及び獣医学的治療の両方が本発明の範囲内である。

【0202】

バリエーション、派生体、アナログ、ホモログ及び断片

本明細書において言及される特定のタンパク質及びヌクレオチドに加えて、本発明はまた、バリエーション、派生体、アナログ、ホモログ及びそれらの断片の使用も包含する。本発明の文脈では、いかなる所与の配列のバリエーションは、問題になっているポリペプチド又はポリヌクレオチドが実質的にその機能を保持するように特定の残基（アミノ酸残基又は核酸残基）配列が改変されている配列である。バリエーション配列は、天然に発生するタンパク質に存在する少なくとも1個の残基の付加、欠失、置換、改変、交換及び/又は変化により得られうる。

30

【0203】

本明細書で使用される「派生体」という用語は、本発明のタンパク質又はポリペプチドに関係して、結果として生じるタンパク質又はポリペプチドがその内在的な機能のうち少なくとも1つを実質的に保持する条件で、その配列からの又はその配列への1個の（又はそれより多い）アミノ酸残基の任意の置換、変化、改変、交換、欠失及び/又は付加を含む。

40

【0204】

本明細書において使用される「アナログ」という用語は、ポリペプチド又はポリヌクレオチドに関係して、任意の模倣物、すなわち、それが模倣するポリペプチド又はポリヌクレオチドの内在的な機能のうち少なくとも1つを有する化学物質を含む。

【0205】

典型的には、アミノ酸置換、例えば1、2又は3個から10又は20個の置換は、改変される配列が必要な活性又は能力を実質的に保持する条件で、なされてもよい。アミノ酸置換は天然には存在しないアナログの使用を含んでもよい。本発明において使用されるタンパク質はまた、サイレントな変化を生み機能的に同等なタンパク質をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入又は置換を有してもよい。計画的なアミノ酸置換は、内在的な機能が保持され

50

る限りにおいて、その残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性及び／又は両親媒性の性質の類似性に基づいてなされてもよい。例えば、負に荷電したアミノ酸はアスパラギン酸及びグルタミン酸を含み、正に荷電したアミノ酸はリジン及びアルギニンを含み、類似した親水性値を有する非荷電性極性頭部基を有するアミノ酸はアスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン及びチロシンを含む。

【0206】

保存的置換は、例えば下の表に従って行うことができる。2番目の列における同じ区分にあり、好ましくは3番目の列の同じ行にあるアミノ酸は互いに置換されうる。

脂肪族	非極性	G A P
		I L V
	極性 - 非荷電	C S T M
		N Q
	極性 - 荷電	D E
		K R H
芳香族		F W Y

10

【0207】

「ホモログ」という用語は、本明細書において使用される場合、野生型アミノ酸配列及び野生型ヌクレオチド配列と一定の相同性を有する存在物を意味する。「相同性」という用語は「同一性」と同一視されうる。

20

【0208】

相同配列は対象配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%又は90%同一、好ましくは少なくとも95%又は97%又は99%同一であってもよいアミノ酸配列を含んでもよい。典型的には、ホモログは対象アミノ酸配列と同じ活性部位等を含む。相同性はまた類似性（すなわち、類似した化学的性質／機能を有するアミノ酸残基）に関して考慮されうるが、本発明の文脈においては配列同一性に関して相同性を表現することが好まれる。

【0209】

相同配列は対象配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%又は90%同一、好ましくは少なくとも95%又は97%又は99%同一であってもよいヌクレオチド配列を含んでもよい。相同性は類似性に関して考慮されうるが、本発明の文脈においては配列同一性に関して相同性を表現することが好まれる。

30

【0210】

好ましくは、本明細書で詳述される配列番号のいずれか1つに対して何らかのパーセント同一性を有する配列への言及は、言及された配列番号の全長に渡り記載されたパーセント同一性を有する配列を指す。

【0211】

相同性比較は、眼によって、又はより通常は容易に利用できる配列比較プログラムの助けを得て実施されうる。これらの市販のコンピュータプログラムは2個以上の配列間のパーセント相同性又は同一性を計算することができる。

40

【0212】

パーセント相同性は連続的な配列に対して計算されてもよく、すなわち、1つの配列が他方の配列と整列させられて、1つの配列の各アミノ酸は他方の配列の対応するアミノ酸に直接、1度に1残基が比較される。これは「ギャップ無し」アラインメントと呼ばれる。典型的には、このようなギャップ無しアラインメントは比較的短い数の残基に対してのみ行われる。

【0213】

これは非常に単純で一貫性のある方法であるが、例えば、他については同一な1対の配列においてヌクレオチド配列中の1つの挿入又は欠失が以降のコドンのアラインメントの

50

外に出すかもしれず、よって結果的に全体のアラインメントが行われるときにパーセント相同性が大きく減少する可能性があることを考慮に入れていない。それ故に、多くの配列比較法は、全体の相同性スコアを不当に損なうことなく可能性のある挿入及び欠失を考慮に入れる最適なアラインメントを生じるように設計されている。これは、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入して局所的な相同性を最大化するように試みることによって達成される。

【0214】

しかし、これらのより複雑な方法はアラインメント中に発生する各ギャップに「ギャップペナルティ」を割り当てることで、比較される2つの配列間のより高度な関連性を反映するようなどけ少ないギャップを有する配列アラインメントは、同一アミノ酸の数が同数である場合に、多数のギャップを有するものよりも高いスコアを達成する。ギャップの存在に対しては比較的高い負担をかけ、そのギャップ中の後の各残基に対してはより小さいペナルティを与える「アフィンギャップコスト」が通常は使用される。これが最も一般的に使用されるギャップ点数化システムである。高いギャップペナルティは当然にギャップがより少ない最適化アラインメントを生じる。多くのアラインメントプログラムではギャップペナルティの変更が許容される。しかし、そのようなソフトウェアを配列比較に使用する際には初期値を使用することが好まれる。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージを使用する際には、アミノ酸配列の初期値のギャップペナルティはギャップ1つに対して-12であり、各伸長に対しては-4である。

【0215】

最大パーセント相同性の計算は故に、ギャップペナルティを考慮に入れた最適アラインメント作製を最初に必要とする。そのようなアラインメントを実行するのに適したコンピュータプログラムはGCG Wisconsin Bestfitパッケージ (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 387) である。配列比較を行うことができる他のソフトウェアの例は、以下に限定されないが、BLASTパッケージ (Ausubel et al. (1999) *ibid* - Ch. 18を参照)、FASTA (Atschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 403-410) 及び比較ツールのGENEWORKSスイートを含む。BLASTとFASTAはいずれもオフライン及びオンラインの検索のために利用可能である (Ausubel et al. (1999) *ibid*, pages 7-58 ~ 7-60を参照)。しかし、一部の用途では、GCG Bestfitプログラムを使用することが好まれる。BLAST 2 Sequencesと呼ばれる別のツールもまたタンパク質配列及びヌクレオチド配列を比較するために利用できる (FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174: 247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177: 187-8を参照)。最終的なパーセント相同性は同一性に関して測定されうるが、アラインメントの過程自体は典型的には全か無かのペア比較に基づかない。その代わりに、各対ごとの比較に化学的類似性又は進化的距離に基づくスコアを割り当てる、スケールされた類似性スコアマトリクスが一般的に使用される。一般的に使用されるそのようなマトリクスの例は、BLOSUM62マトリクス-BLASTスイートのプログラムのための初期マトリクスである。GCG Wisconsinプログラムは一般的に公の初期値又は提供された場合にはあつらえの記号比較表のいずれかを使用する (さらなる詳細についてはユーザーマニュアルを参照)。一部の用途ではGCGパッケージには公の初期値を使用し、又は他のソフトウェアの場合にはBLOSUM62などの初期マトリクスを使用することが好まれる。

【0216】

ソフトウェアが最適アラインメントを生成すれば、パーセント相同性、好ましくはパーセント配列同一性を計算することが可能である。ソフトウェアは典型的には配列比較の一部としてこれを行い、数値結果を生じる。

【0217】

「断片」もまたバリエーションであり、この用語は典型的には、機能的に又は例えば分析において目的であるポリペプチド又はポリヌクレオチドの選択された領域を指す。「断片」はしたがって全長ポリペプチド又はポリヌクレオチドの一部であるアミノ酸又は核酸配列を指す。

【0218】

そのようなバリエーションは部位特異的変異導入などの標準的な組換えDNA技術を使用して調製することができる。挿入がなされる場合には、挿入位置のいずれかの側で天然に存在する配列に対応する5'及び3'隣接領域と共に挿入をコードする合成DNAが作製されてもよい。隣接領域は、その配列が適切な酵素（単数又は複数）で切断され合成DNAが切断部に連結されるように、天然に存在する配列における部位に対応する便利な制限部位を含む。DNAは次に、コードされるタンパク質を作るために本発明に従って発現される。これらの方法はDNA配列操作のための当技術分野で公知の多数の標準的手法を例示するものに過ぎず、他の公知の手法もまた使用されてもよい。

【0219】

コドン最適化

本発明は、本明細書中に記載される核酸配列のコドン最適化バリエーションを包含する。

【0220】

コドン最適化は、遺伝暗号の縮重性の利点を活かし、コードされるタンパク質の同じアミノ酸配列を維持しながらヌクレオチド配列が変更されることを可能にする。

【0221】

典型的にはコドン最適化は、コードされるタンパク質の発現の増加又は減少を促すために実施される。これはヌクレオチド配列中のコドン使用頻度を特定の細胞種のものに合わせるによりもたらされ、よってその細胞種における特定のtRNAの相対存在量の偏りに対応する細胞のコドンの偏りを利用する。ヌクレオチド配列中のコドンを変化させ、対応するtRNAの相対的存在量に一致するようにコドンを調整することにより、発現を増大させることが可能である。逆に、対応するtRNAが特定の細胞種で希少であることが知られるコドンを選択することによって、発現を減少させることが可能である。

【0222】

核酸配列のコドン最適化のための方法は当技術分野で公知であり、当業者であれば精通している。

【0223】

配列

配列番号1

10

20

AGGACACAGCGTCCGGAGCCAGAGGCGCTCTTAACGGCGTTTATGTCTTTTGCTGTCTGAGGGGCTCAGCTCTG
ACCAATCTGGTCTTCGTGTGGTCATTAGCATGGGCTTCGTGAGACAGATACAGCTTTTGCTCTGGAAGAACGGGA
CCCTGCGGAAAAGGCAAAAGATTGCTTTGTGGTGGAACCTGCTGTGGCCTTTATCTTTATTICTGGTCTTGATCT
GGTTAAGGAATGCCAACCCGCTCTACAGCCATCATGAATGCCATTTCCCCAACAAAGGCGATGCCCTCAGCAGGAA
TGCTGCCGTGGCTCCAGSGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCAAAGCCCCACCCAGGAGAATCTC
CTGGAATTTGTGTCAAACATAACAACCTCCATCTTTGGCAAGGGTATATCGAGATTTTCAAGAACTCCTCATGAATG
CACCAGAGAGCCAGCACCTTGGCCGTATTTGGACAGAGCTACACATCTTGTCCCAATTCATGGACACCCTCCGGA
CTCACCCGGAGAGAATTGCAGGAAGAGGAATACGAATAAGGGATATCTTGAAGATGAAGAAACACTCACACTAT
TTCTCATTAACAAATCAGGCTGTCTGACTCAGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTCCGTCCAGAGCAGT
TCGCTCATGGAGTCCCGGACCTGGCGCTGAAGGACATCGCTGCAGCGAGGCCCTCCTGGAGCGCTTCATCATCT
TCAGCCAGAGACGCGGGGCAAGACGCTGCGCTATGCCCTGTGCTCCCTCTCCAGGGCACCCCTACAGTGGATAG
AAGACACTCTGTATGCCAACGTGGACTTCTTCAAGCTCTTCCGTGTGCTTCCACACTCTAGACAGCCGTCTC
AAGGATCAATCTGAGATCTTGGGGAGGAATATTATCTGATACTGTCACCAAGAATTCAGAGTTTATCCATCGGC
CCACTATCCAGACTTCTCTCGCTCACCAGCCCCCTCATCCACAATCGTGTCCACACACCTTTACAAACCTCA
TGGGCATCCTGTCTGACCTCCTGTGTGGCTACCCCGAGGGAGGTGGCTCTCGGGTGTCTCTCTTCAACTGGTATG
AAGACAATAACTATAAGGCCCTTTCTGGGATTGACTCCACAAGGAAGGATCTATCTATTCTTATGACAGAAGAA
CAACATCCTTTTGTAAATGCATTGATCCAGAGCCTGGAGTCAAATCCTTTAACCAAAATCGCTTGGAGGGCGGCAA
AGCCTTTGCTGTATGGGAAAAATCCTGTACACTCCTGATTACCTGCAGCACGAAGGATACTGAAGAAIGCCAACT
CAACTTTTGAAGAACTGGAACACGTTAGGAAGTTGGTCAAAGCCTGGGAAGAAGTAGGGCCCCAGATCTGGTACT
TCTTTGACAACAGCACACAGATGAACATGATCAGAGATACCTTGGGSAACCCACAGTAAAGACTTTTGAATA
GGCAGCTTGGTGAAGAAGGTATTACTGCTGAAGCCATCTTAAACTTCTCTACAAGGGCCCTCGGGAAGCCAGG
CTGACGACATGGCCAACCTTCGACTGGAGGGACATATTTAACAATCACTGATCGCACCCCTCCGCTGGTCAATCAAT
ACCTGGAGTGTCTGGTCTTGGATAAGTTTGAAGCTACAATGATGAAACTCAGCTCACCCAACGTGCCCTCTCTC
TACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCCGGAGTGGTATTCCCTGACATGTATCCCTGGACCAGCTCTCTACCACCCC
ACGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACATAGACGTGGTGGAGAAAACCAATAAGATTAAAGACAGGTATTGGGATT
CTGGTCCCAGAGCTGATCCCGTGGAAAGATTTCGGGTACATCTGGGGCGGGTTTGCCTATCTGCAGGACATGGTTG
AACAGGGGATCACAAGGAGCCAGGTGCAGGCGGAGGCTCCAGTTGGAACTACCTCCAGCAGATGCCCTACCCCT
GCTTCGTGGACGATTCTTTCATGATCATCCTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCATGGTGTCTGGCATGCATCTACT
CTGTCTCCATGACTGTGAAGAGCATCGTCTTGGAGAAGGAGTTGCGACTGAAGGAGACCTTGAAGAAATCAGGGTG
TCTCCAAATGCAGTGATTGGTGTACCTGGTTCTCTGGACAGCTCTCCATCATGTGATGAGCATCTTCTCTCTGA
CGATATTCTCATGCATGGAAGAATCTTACATTACAGCAGCCATTCACTCTCTCTCTTCTTGTGGCTTTCT
CCACTGCCACCATGCTGTGCTTTCTGTCTGCTGACACCTTCTCTCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTGTATGT
GTGTCTATCTATTTACCCCTCTACCTGCCACACATCCTGTGCTTCCGCTGGCAGGACCGCATACCCGCTGAGCTGA
AGAAGGCTGTGAGCTTACTGTCTCCGGTGGCATTGATTTGGATTGGCACTGAGTACCTGGTTTCGCTTTGAAGAGCAAG
GCCTGGGGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAGTCCACGGAAGGGGACGAATTCAGCTTCTGTCTCTCATGC
AGATGATGCTCCTTGATGCTGTCTATGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGGTGTTTCCAGGAGACTATG
GAACCCCACTTCTTGGTACTTTCTTCTACAAGAGTCTGATTGGCTTGGCGGTGAAGGGTGTTCAACCAGAGAAG
AAAGAGCCCTGGAAGAGCCGAGCCCTAACAGAGGAAACGAGGATCCAGAGCACCCAGAAGGAATACACGACT
CCTTCTTTGAACGTGAGCATCCAGGGTGGGTTCTTGGGGTATGCGTGAAGAATCTGGTAAAGATTTTGGAGCCCT
GTGGCCGGCCAGCTGTGGACCGTCTGAACATCACCTTCTACGAGAACCAGATCACCGCATCTCTGGGCCACAATG
GAGCTGGGAAAACACCACCTTGTCCATCCTGACGGGTCTGTGTCACCAACCTCTGGGACTGTGCTCGTTGGGG
GAAGGGACATTGAACAGCCTGGATGCAGTCCGGCAGAGCCTTGGCATGTGTCCACAGCACAAATCCTGTCTCC
ACCACCTCACGCTGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCAGCTGAAAGGAAAGTCCAGGAGGAGGCCAGCTGG
AGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCTCCACCACAAGCGGAATGAAGAGGCTCAGGACCTATCAGGTGGCA
TGCAGAGAAAGCTGTGCTTGCATTGCCCTTTGTGGGAGATGCCAAGGTGGTGATTCTGGACGAACCCACCTCTG
GGGTGGACCCTTACTCGAGACGCTCAATCTGGGATCTGCTCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGT
CCACTCACACATGGACGAGGCCGACCTCCTTGGGGACCGCATGCCATCATGCCCAGGGAAGGCTCTACTGCT
CAGGCACCCCACTCTTCTGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTGTACTTAACCTTGGTGGCAAGATGAAGAAACA
TCCAGAGCCAAAGGAAGGACGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGCTCAAGGGTTCTCCACCACGTGTCAGCCC
ACGTGATGACCTAACTCCAGAACAACTCCTGGATGGGGATGTAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATG
TCCAGAGGCAAGCTGGTGGAGTGCAATTGGTCAAGAACTTATCTTCTTCTCCAAATAAGAACTTCAAGCACA
GAGCATACTCCAGCCTTTTTCAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTTTGAATTTCTG
ACACTCCCCTGGAAGAGATTTTTCTGAAGGTACAGGAGGATTCTGATTACGACCTCTGTTTGGGGTGGCGCTC
AGCAGAAAAGAGAAAACSTCAACCCCGACACCCCTGCTTGGGTCCAGAGAGAAGGCTGGACAGACACCCAGG

10

20

30

40

ACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCGCCGGCTGCTCACCCAGAGGGCCAGCCTCCCCAGAGCCAGAGTGCCAG
 GCGCCGACGCTCAACACGGGGACACAGCTGGTCTCCAGCATGTGCAGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACA
 CCATCCGACGCCACAAGGACTTCTGGCGCAGATCGTGCTCCCGGCTACCTTTGTGTTTTGGCTCTGATGCTTT
 CTATTGTTATCCCTCCTTTTGGCGAATACCCCGCTTTGACCTTACCCCTGGATATATGGGCAGCAGTACACCT
 TCTTCAGCATGGATGAACAGGCAAGTGAAGCACTTACCGGTACTTGACAGCTCCTCCTGAATAAGCCAGGCTTTG
 GCAACCGCTGCTGAAGGAAGGGTGGCTTCCGGAGTACCCTGTGGCAACTCAACACCTGGAAGACTCCTTCTG
 TGTCCCCAAACATCACCCAGCTGTTCCAGAAGCAGAAATGGACACAGGTCAACCTTACCATCCTGCAGGTGCA
 GCACCAGGGAGAAGCTCACCATGCTGCCAGAGTCCCCGAGGGTGGCGGGGGCCTCCCGCCCCCCCCAGAGAACAC
 AGCGCAGCACGAAATTCTACAAGACCTGACCGACAGGAACATCTCCGACTTCTTGGTAAAAACGTATCCTGCTC
 TTATAAGAAGCAGCTTAAAGAGCAAATTCTGGGTCAATGAACAGAGGTATGGAGGAATTTCCATTGGAGGAAAGC
 TCCCAGTCGTCCCCATCACGGGGGAAGCACTTGTGGGTTTTTAAGCGACCTTGGCCGGATCATGAATGTGAGCG
 GGGGCCCTATCACTAAGAGGGCTCTAAAGAAATACCTGATTTCTTAAACATCTAGAACTGAAGACAACATTA
 AGGTGTGGTTTTAATAACAAAGGCTGGCATGCCCTGGTCAGCTTTCTCAATGTGGCCCAACGCCATCTTACGGG
 CCAGCCTGCTTAAGGACAGGAGCCCCGAGGAGTATGGAATCACCGTCAATAGCCAACCCCTGAACCTGACCAAGG
 AGCAGCTCTCAGAGATTACAGTGTGACCACITCAGTGGATGCTGTGGTTGCCATCTGCGTGATTTTCTCCATGT
 CTTTCGTCCAGCCA3CTTTGTCTTTATTTGATCCAGGAGCGGGTGAACAAATCCAAGCACCTCCAGTTTATCA
 GTGGAGTGAGCCCCACACCTACTGGGTGACCAACTTCTCTGGGACATCATGAATTATTCGTGAGTGCTGGGC
 TGGTGGTGGGCATCTTCATCGGGTTTCAGAAAGAAAGCCTACACTTCTCCAGAAAACCTTCTGCCCTTGTGGCAC
 TGCTCCTGCTGTATG3ATGGGCGGTCAATCCCATGATGTACCCAGCATCCTTCTGTGATGTCCCGAGCACAG
 CCAATGTGGCTTTATCTTGTGCTAATCTGTTTATCGGCATCAACAGCAGTGCTATTACCTTCATCTTGAATAT
 TTGAGAATAACCGGACGCTGCTCAGGTTCAACGCCGTGCTGAGGAAGCTGCTCATTGTCTTCCCCACTTCTGCC
 TGGGCCGGGGCTCATTGACCTTGCACTGAGCCAGGCTGTGACAGATGTCTATGCCCGTTTGGTGAGGAGCACT
 CTGCAAAATCCGTCCACTGGGACCTGATTGGCAAGAACTGTTTGGCATGGTGGTGGAAAGGGGTGGTGTACTTCC
 TCCTGACCCTGCTGGTCCAGCGCCACTTCTTCTCTCCCAATGGATTGCCGAGCCCACTAAGGAGCCCATTTGTG
 ATGAAGATGATGATGTTGGCTGAAGAAAGACAAAGAAATTATTACTGGTGGAAATAAAACTGACATCTTAAGGCTAC
 ATGAACATAACCAAGATTTATCCAGGCACCTCCAGCCAGCAGTGGACAGGCTGTGTGTCGGAGTTTGCCTTGGAG
 AGTGCTTTGGCTCCTGGGAGTGAATGGTGGCGGCAAAACAACCACATTCAGATGCTCACTGGGGACACCACAG
 TGACCTCAGGGGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTATTTTAACCAATAATTTCTGAAGTCCATCAAAATATGGGCT
 ACTCTCCTCAGTTTGATGCAATTGATGAGCTCCTCACAGCAGGAGAAACATCTTTACCTTTATCCCCGGCTTCCAG
 GTGTACCAGCAGAAAGAAATCGAAAAGGTTGCAAACTGGAGTATTAAGAGCCTGGGCTGACTGTCTACGCCGACT
 GCCTGGCTGGCAGCTACAGTGGGGGCAACAAGCGGAACTCTCCACAGCCATCGCACTCATTGGCTGCCACCCGC
 TGGTGTGCTGGATGAGCCCAACACAGGGATGACCCCAAGGCACGCCGATGCTGTGGAACGTATCGTGAGCA
 TCATCAGAGAAGGCAAGGCTGTGGTCTCACATCCACAGCATGGAAGAATGTGAGGCACTGTGTACCCGGCTGG
 CCATCATGGTAAAGG3CGCCTTTTCGATGTATGGGCACCATTCAGCATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATA
 TCGTCACAATGAAGAICAAATCCCCGAAGGACGACCTGCTTCTTGACCTGAACCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGG
 CCAACTTCCAGCCACTGTCCACAGCGACAGCCACTACAACATCTCCACTTCCAGCTCTCCTCCTCCTCCTCG
 CGAGGATCTTCCAGCTCCTCCTCTCCACAAAGGACAGCCTGCTCATCGAGGAGTACTCAGTCACACAGACCACAC
 TGGACCAGGTGTTTGTAATTTTGTAAACAGCAGACTGAAAGTCATGACCTCCTCTGCACCCCTCGAGCTGCTG
 GAGCCAGTCGACAAG3CCAGGACTGATCTTTACACCGCTCGTTCTGTCAGCCAGAAAGGAACTCTGGGCAGCTG
 GAGGCGCAGGAGCCT3TGCCCATATGGTCAATCCAAATGGACTGGCCAGCGTAAATGACCCCACTGCAGCAGAAAA
 CAAACACACGAGGAGCATGCAGCGAATTCAGAAAGAGGTCTTTTCAAGGAAACCGAAACTGACTTGCTCACCTG
 GAACACCTGATGGTGAACCAAAACAAATACAAAATCTTCTCCAGACCCAGAACTAGAAACCCCGGGCCATCCC
 ACTAGCAGCTTTCCCTCCATATTCCTCTCAITTCAGCCAGATCTGCTTTTCTGCATGTTTGTCTGTCTGTCTGC
 GTTGTGTGTGATTTTCATGGAATAAAATGCAATGCACTCATCAAAA

10

20

30

40

配列番号2

AGGACACAGCGTCCGGAGCCAGAGGCGCTCTTAACGGCGTTTATGTCTTTGCTGTCTGAGGGGGCTCAGCTCTG
 ACCAATCTGGTCTTCTGTCTGCTCATTAGCATCGGCTTCTCTCAGACACATACACCTTTTCTCTGCAACAACTGCA
 CCTGCGGAAAAGGCAAAAGATTGCTTTGTGGTGGAACTCGTGTGGCCTTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCT
 GGTTAAGGAATGCCAACCCGCTCTACAGCCATCATGAATGCCATTTCCCCAACAAGGCGATGCCCTCAGCAGGAA
 TGCTGCCGTGGCTCCAGGGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCAAGCCCCACCCAGGAGAATCTC
 CTGGAATTGTGTCAAACATAACAACCCATCTTGGCAAGGGTATATCGAGATTTTCAAGAACTCCTCATGAATG
 CACCAGAGAGCCAGCACCTTGGCCGTATTTGGACAGAGCTACACATCTTGTCCTCAATCATGGACACCCTCCGGA
 CTCACCCGGAGAGAATTGCAGGAAGAGGAATACGAATAAGGGATATCTTGAAAGATGAAGAAACACTGACACTAT
 TTCTCATTAAAAACATCGGCCTGTCTGACTCAGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTCCGTCCAGAGCAGT
 TCGCTCATGGAGTCCCGGACCTGGCGCTGAAGGACATCGCTGCAGCGAGGCCCTCCTGGAGCGCTTCATCATCT
 TCAGCCAGAGACGCGGGGCAAGACGGTGGCTATGCCCTGTGCTCCCTCTCCAGGGCACCCCTACAGTGGATAG
 AAGACACTCTGTATGCCAACGTGGACTTCTTCAAGCTCTTCCGTGTGCTTCCACACTCTTAGACAGCGTTCTC

AAGGTATCAATCTGAGATCTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTCACCAAGAATTCAAGAGTTTATCCATCGGC
CGAGTATGCAGGACTTGCTGTGGGTGACCAGGCCCTCATGCAGAATSGTGGTCCAGAGACCTTTACAAAGCTGA
TGGGCATCCTGTCTGACCTCCTGTGTGGCTACCCCCAGGGAGGTGGCTCTCGGGTGCTCTCCTTCAACTGGTATG
AAGACAAATACTATAAGGCCCTTTCTGGGGATTGACTCCACAAGGAAGGATCCTATCTATTCTTATGACAGAAGAA
CAACATCCTTTTTGTAATGCATTGATCCAGAGCCTGAGTCAAATCCTTTAACCAAAATCGCTTGGAGGGCGGCAA
AGCCTTTGCTGATGGGAAAAATCCTGTACACTCCTGATTCACCTGCAGCAGCAAGGATACTGAAGAATGCCAACT
CAACTTTTGAAGAACTGGAACACGTAGGAAGTTGGTCAAAGCCTGGGAAGAAGTAGGGCCCCAGATCTGGTACT
TCTTTGACAACAGCACACAGATGAACATGATCAGAGATACCCTGGGGAACCCACAGTAAAGAGCTTTTTGAATA
GGCAGCTTGGTGAAGAAGGTATTACTGCTGAAGCCATCTTAACTTCTCTACAAGGGCCCTCGGGAAGGCCAGG
CTGACGACATGGCCAACCTTCGACTGGAGGGACATATTTAACATCACTGATCGCACCCCTCCGCCCTTGTCAATCAAT
ACCTGGAGTGCTTGGTCTGGATAAGTTTGAAGCTACAATGATGAACTCAGCTCACCCAAAGTGCCTCTCTC
TACTGGAGGAAAAACATGTTCTGGGCCGGAGTGGTATTCCCTGACATGTATCCCTGGACCAGCTCTCTACCACCCC
ACGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACATAGACGTGGTGGAGAAAAACCAATAAGATTAAAGACAGGTATTGGGATT
CTGGTCCCAGAGCTGATCCCGTGGAAAGATTTCGGGTACATCTGGGGCGGGTTTSCCTATCTGCAGGACATGGTTG
AACAGGGGATCACAAGGAGCCAGGTGCAGGCGGAGGCTCCAGTTGGAATCTACCTCCAGCAGATGCCCTACCCCT
GCTTCGTGGACGATCTTTTCATGATCATCCTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCATGGTGCTGGCATGGATCTACT
CTGTCTCCATGACGTGAAGAGCATCGTCTTGGAGAAGGAGTTGGGACTGAAGSAGACCTTGAAAAATCAGGGTG
TCTCCAAATGCAGTGATTGGTGTACCTGGTTCCTGGACAGCTTCTCCATCATGTGATGAGCATCTTCTCTCTGA
CGATATTATCATGATGGAAGAACTCTACATTACAGCGACCCATTTCATCCTCTTCTGTCTTGTGTGGCTTTCT
CCACTGCCACCATCATGCTGTGCTTCTGCTCAGCACCTTCTTCTCCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTGTAGTG
GTGTCTATCTATTTACCCCTCTACCTGCCACACATCCTGTGCTTCCGCTGGCAGSACCCGATGACCGCTGAGCTGA
AGAAGGCTGTGAGCTTACTGTCTCCGGTGGCATTGATTGTCCTGACTGAGTACCTGGTTCGCTTTGAAGAGCAAG
GCCTGGGGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAGTCCACGSAAGGGGACGAATTCAGCTTCTGTCTGTCATGC
AGATGATGCTCCTTGATGCTGCTGTCTATGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGGTGTTTTCCAGGAGACTATG
GAACCCCACTTCTTGGTACTTTCTTCTACAAGAGTCTGATTGGCTTGGCGGTGAAGGGTGTTCACCCAGAGAAG
AAAGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCCTAACAGAGGAAACGAGGATCCAGAGCACCCAGAAGGAATACACGACT
CCTTCTTTGAAGCTGAGCATCCAGGGTGGGTTCCTGGGGTATGCGTGAAGAACTCGGTAAAGATTTTTGAGCCCT
GTGGCCGGCCAGCTGTGGACCGTCTGAACATCACCTTCTACGAGAACCCAGATCACCGCATTCCTGGGCCACAATG
GAGCTGGGAAAAACCAACCTTGTCCATCCTGACGCGTGTGTTGCCACCAACCTCTGGGACTGTGCTGTGGGG
GAAGGGACATTGAAGCCAGCCTGGATGCAGTCCGGCGAGAGCCTTGGCATGTGTCCACAGCACAAACATCCTGTTC
ACCACCTCACGGTGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCAGCTGAAAGGAAAGTCCAGGAGGAGGCCAGCTGG
AGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCCTCCACCACAAGCGGAATGAAGAGGCTCAGGACCTATCAGGTGGCA
TGCAGAGAAAGCTGTGGTGTGCCATGCTTTGTGGGAGATGCCAAGGTGGTGAATCTGGACGAACCCACCTCTG
GGGTGGACCCCTTACTCGAGACGCTCAATCTGGGATCTGCTCCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGT
CCACTCACACATGGACGAGGCCGACCTCCTTGGGGACCGCATTGCCATCATTGCCAGGGAAGGCTCTACTGCT
CAGGCACCCCACTCTTCTGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTTGTACTTAACCTTGGTGGCGAAGATGAAAAACA
TCCAGAGCCAAAGGAAGGCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCTAAGGGTTTCTCCACCACGTGTCCAGCCC
ACGTGATGACCTAACTCCAGAACAAGTCTGGATGGGGATGTAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATTG
TCCAGAGGCAAAAGCTGGTGGAGTGCAATGGTCAAGAACTTATCTTCTTCCAAATAAGAACTTCAAGCACA
GAGCATAAGCCAGCCTTTTCAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTTTGAATTTCTG
ACACTCCCCTGGAAGAGATTTTTCTGAAGGTCACGAGGATTCTGATTACAGGACCTCTGTTTGGGGTGGCGCTC
AGCAGAAAAGAGAAAACGTCAACCCCGACACCCCTGCTTGGGTCCCAGAGAGAAGGCTGGACAGACACCCCAAG
ACTCCAAATGCTGTCTCCCAAGGGGCGCGGCTGCTCACCCAGAGGGCCAGCTTCCCAAGAGCCAGAGTGGCCAG
CCCCCACTCAACACGGGACACAGCTGCTCTCCACCATGTGCAGCGCTCTCTCTCAACACATTCCAAACACA
CCATCCGCAGCCACAAGGACTTCTGGCGCAGATCGTGCTCCCGGCTACCTTTGTGTTTTTGGCTCTGATGCTTT
CTATTGTATCTCTCTTTTGGCGAATACCCCGCTTTGACCTTACCCCTGGATATATGGGCAGCAGTACACCT
TCTTCAGCATGGAATGAACCAGGCAGTGAGCAGTTACCGGTACTTGCAGACGCTCTCTCTGAATAAGCCAGGCTTTG
GCAACCGCTGCTGAAGGAAGGGTGGCTTCCGGAGTACCCCTGTGGCACTCAACACCCCTGGAAGACTCTTCTCT
TGTCCCCAAACATCACCCAGCTGTTCAGAGAGCAGAAATGGACACAGGTCAACCCCTTACCATCCTGCAGGTGCA
GCACCAGGGAGAAGCTCACCATGCTGCCASAGTGGCCGAGGCTGCCGGGGCTTCCCGCCCCCAGAGAACAC
AGCGCAGCACGGAATTTCTACAAGACCTGACGGACAGGAACATCTCCGACTTCTTGGTAAAAACGTATCTGCTC
TTATAAGAAGCAGCTTAAAGAGCAAATCTGGGTCAATGAACAGAGGTATGGAGGAATTTCCATTGGAGGAAAGC
TCCCAGTCTGCTCCCATCACGGGGGAAGCACTTGTGTTGGTTTTTAAGCGACCTTGGCCGGATCATGAATGTGAGCG
GGGGCCCTATCACTAGAGAGGCCTTAAAGAAATACCTGATTTCTTAAACATCTAGAAACTGAAGACAACATTA
AGGTGTGGTTTTAAATAACAAAGGCTGGCATGCCCTGGTCAGCTTTCTCAATGTGSCCCACAACGCCATCTTACGGG
CCAGCCTGCCTAAGGACAGGAGCCCGAGSAGTATGGAATCACCGTCAATTAGCCAACCCCTGAACCTGACCAAGG
AGCAGCTCTCAGAGATTACAGTGTGACCACTTCASTGGATCTGTGTTGCCATCTGCGTGATTTTCTTCCATGT
CCTTCGTCCCAGCCAGCTTTGTCTTTATTTGATCCAGGAGCGGGTGAACAAATCCAAGCACCTCCAGTTTATCA
CTGGAGTGAGCCCCACCACCTACTGGGTAAACCAACTTCTCTGGGACATCATGAATTATTCCGTGAGTGCTGGGC
TGGTGGTGGGCATCTTCATCGGGTTTCAAGAAAGCCTACACTTCTCCAGAAAACCTTCTGCCCTTGTGGCAC
TGCTCCTGCTGTAATGGATGGGCGGTCAATCCATGATGTACCCAGCATCCTTCTGTGTTGATGTCCCAGCACAG

10

20

30

40

CCTATGTGGCTTTTATCTTGTGCTAATCTGTTTCATCGGCATCAACAGCAGTGCTATTACCTTTCATCTTGGAAATTAT
TTGAGAATAACCGGACGCTGCTCAGGTTCAACGCCGTGCTGAGGAAGCTGCTCATTGTCTTCCCCACTTCTGCC
TGGGCCGGGGCCTCATTGACCTTGCAGTGAAGCCAGGCTGTGACAGATGTCTATGCCCGGTTTGGTGAGGAGCACT
CTGCAAATCCGTTCCACTGGGACCTGATTGGGAAGAACCTGTTTGGCATGGTGGTGAAGGGTGGTGTACTTCC
TCCTGACCCCTGCTGGTCCAGCGCCACTTCTTCTCTCCCAATGGATTGCCGAGCCCACTAAGGAGCCCATTTGTTG
ATGAAGATGATGATGTGSCGTGAAGAAAGACAAAGAATTATTACTGGTGGAAATAAACTGACATCTTAAGGCATAC
ATCAACTAACCAACATTTATCCAGCCACCTCCACCCAGCAGTGGACAGCCTCTGTGTGGAGTTCCCTCCGAG
AGTGCTTTTGGCCTCCTGGGAGTGAATGGTGCCGGCAAAACAACCACATTCAAGATGCTCACTGGGGACACCACAG
TGACCTCAGGGGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTATTTAAACCAATATTTCTGAAGTCCATCAAAATATGGGCT
ACTGTCTCAGTTTGATGCAATCGATGAGCTGCTCACAGGACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCCAG
GTGTACCAGCAGAAGAAATCGAAAAGGTTGCAAACTGGAGTATTAAGAGCCTGGGCTGACTGTCTACGCCGACT
GCCTGGCTGGCAGCTACAGTGGGGGCAACAAGCGGAAACTCTCCACAGCCATCGCACTCAATTGGCTGCCACCGC
TGGTGCTGCTGGATGAGCCACCACAGGGATGGACCCCGAGGCACGCCGATGCTGTGGAACGTCACTGTA3CA
TCATCAGAGAAGGGAGGGCTGTGGTCTCACATCCACAGCATGGAAGAATGTGAGGCACTGTGTACCCGGCTGG
CCATCATGGTAAAGGGCGCTTTTGATGTATGGGCACCATTGAGCATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATA
TCGTCACAATGAAGATCAAAATCCCGAAGGACGACCTGCTTCTGACCTGAACCCCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGG
GGAACCTTCCAGGCACTGTGACAGGGGAGAGGCACTACAACATGCTCCAGTTCAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTG
CGAGGATCTTCCAGCTCTCTCTCTCTCCACAAGGACAGCCTGCTCATCGAGGAGTACTCAGTACACAGACCACAC
TGGACCCAGGTGTTTGTAAATTTTGCTAACAAGCAGACCTGAAGTCTATGACCTCCCTCTGACCCCTC3AGCTGCTG
GAGCCAGTCGACAAGCCAGGACTGATCTTTACACCCGCTCGTTCCTGACGCCAGAAAGGAACCTCTGGGAGCTG
GAGGCGCAGGAGCCTGTGCCATATGGTTCATCAAACTGGAGTGGCCAGCGTAAATGACCCCACTGACGAGAAAA
CAACACACGAGGAGCATGCGAGCGAATTCAGAAAGAGGTCCTTCAGAAAGGAAACCGAAACTGACTT3CTCACCTG
GAACACCTGATGGTGAACCAAAACAAATACAAAATCTTCTCCAGACCCAGAACTAGAAACCCCGGGCCATCCC
ACTAGCAGCTTTGGCCTCCATATTGCTCTCATTTCAAGCAGATCTGCTTTTCTGCATGTTTGTCTGTGTCTGCTG
GTTGTGTGTGATTTTCAATGAAAAATAAAATGCAATGCACTCATCACAAA

10

20

配列番号3

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTT
GCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGCGGC
AATTCAAGTCGATAACTATAACGGTCCCTAAGGTAGCGATTTAAATGGTACCGGGCCCCAGAAAGCCTGGTGGTTGTT
TGTCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGAAGGGCCGGGCGAGAATGATCTAATCGGATTCCAAG
CAGCTCAGGGGATGTCTTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCTTAAGCGTCTCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTA
GCCTGGCTGTGTGACGGCCGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTTACAGCTCC
GCTTCTGCGGTGTGACGGCGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTTACAGCTCC
TGGGCAACGTGCTGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTACCACCATGGGCTTCTGAGACAGAT
ACAGCTTTTGTCTGGAAGAACTGGACCTGCGGAAAAGGCAAAAGATTGCTTTTGTGGTGAACCTCGTGTGGCC
TTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCTGGTTAAGGAATGCCAACCCGCTCTACAGCCATCATGAATGCCATTTCCC
CAACAAGGCGATGCCCTCAGCAGGAATGCTGCCGTGGCTCCAGGGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTT
TCAAAGCCCCACCCAGGAGAATCTCTGGAATTGTGTCAAACATATAACAACCTCCATCTTGGCAAGGGTATATCG
AGATTTTCAAGAACTCCTCATGAATGCACCAGAGAGCCAGCACCTTGGCCGTATTTGGACAGAGCTACACATCTT
GTCCCAATTCAATGGACACCCCTCCGACTCACCCGGAGAGAATTGCAGGAAGAGGAATACGAATAAGGGATATCTT
GAAAGATGAAGAAACACTGACACTATTTCTCATTAATAAACATCGGCCTGTCTGACTCAGTGGTCTACCTTCTGAT
CAACTCTCAAGTCCGTCCAGAGCAGTTTCGCTCATGGAGTCCCGACCTGGCGCTGAAGGACATCGCCTGCGACCGA
GGCCCTCTCTGGAGCGCTTCATCATCTTCAGCCAGAGACGCGGGCAAGACGGTGCCTATGCCCTGTGCTCCCT
CTCCAGGGCACCCCTACAGTGGATAGAAGACACTCTGTATGCCAACGTGGACTTCTTCAAGCTCTTCCGTGTGCT
TCCCACACTCCTAGACAGCCGTTCTCAAGGTATCAATCTGAGATCTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTCACC
AAGAATTCAAGAGTTTATCCATCGGCCGAGTATGCAGGACTTGTCTGGGTGACCAGGCCCTCATGCAGAATGG
TGGTCCAGAGACCTTTACAAAGCTGATGGGCATCCTGTCTGACCTCCTGTGTGGCTACCCGAGGGAGGTGGCTC
TCGGGTGCTCTCCTTCAACTGGTATGAAGACAATAACTATAAGGCCTTCTGGGGATTGACTCCACAAGGAAGGA
TCCTATCTATTCTTATGACAGAAGAAACATCCTTTTGTAAATGCATTGATCCAGAGCCTGGAGTCAAATCCTTT
AACCAAAATCGCTTGGAGGGCGGCAAGCCTTTGCTGATGGGAAAAATCCTGTACACTCCTGATTACCTGCGAGC
ACGAAGGATACTGAAGAAATGCCAACTCAACTTTTGAAGAACTGGAACACGTTAGGAAGTTGGTCAAAGCCTGGGA
AGAAGTAGGGCCCCAGATCTGGTACTTCTTTGCAACAGCACACAGATGAACATGATCAGAGATACCTTGGGGAA
CCCAACAGTAAAAGACTTTTGAATAGGCAGCTTGGTGAAGAAGGTATTACTGCTGAAGCCATCCTAAACTTCT
CTACAAGGGCCCTCGGGAAAGCCAGGCTGACGACATGGCCAACTTCGACTGGAGGGACATATTTAATCACTGA
TCGACCCCTCCGCTTGTCAATCAATACCTGGAGTGTCTGGTCTGGATAAGTTTGAAGCTACAATGATGAAAC
TCAGCTCACCAACGTGCCCTCTCTACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCCGGAGTGGTATTCCCTGACATGTA
TCCCTGGACCAGCTCTTACCACCCACGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACATAGACGTGGTGGAGAAAACCAA

30

40

TAAGATTAAAGACAGGTAATTGGGATTTCTGSTCCAGAGCTGATCCCGTGGAGATTTCGGGTACATCTGGGGCGG
GTTTCCCTATCTGCAGGACATGCTTGAACAGCGCATCACAAGGAGCCAGCTCCAGGCCCCA3CCTCCACTTCGAAT
CTACCTCCAGCAGATGCCCTACCCCTGCTTCGTGGACGATTCTTTCATGATCATCCTGAACCGCTGTTTCCCTAT
CTTCATGGTGCTGGCATGGATCTACTCTGTCTCCATGACTGTGAAGAGCATCGTCTTGGASAAGGASTTGGGACT
GAAGGAGACCTTGAAAAATCAGGGTGTCTCCAATGCAGTGATTGGTGTACCTGGTTCTCTGGACAGCTTCTCCA
CATGTCCGATGAGCATCTTCTCTGACGATAATTCATCATGCATGGGAAGATCCTACATTACAGCGACCCATTCA
CCTCTTCTGTTCTTGTGGCTTTCTCCACTGCCACCATCATGCTGTGCTTTCTGCTCAGCACCTTCTTCTCCAA
GGCCAGTCTGGUAGCAGGCTGTAGTGGTGTATCTATTTACCCCTCTACCTGCCACACATCTGTGCTTGGCTG
GCAGGACCCGATGACCCCTGACCTGAAGAAGGCTGTGAGCTTACTGCTCTCCGCTGCCATTTCGATTTCGGCAGTGA
GTACCTGGTTTCGCTTTGAAGAGCAAGGCTTGGGGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAGTCCCACGGAAGGSGA
CGATTCAGCTTCTGCTGCTCCATGCAGATGCTCCTTGATGCTGCTGCTATGGCTTACTCGCTTGGTACCT
TGATCAGGTGTTTCCAGGAGACTATGGAACCCCACTTCTTGGTACTTCTTCTACAAGA3TCGTATTGGCTTGG
CGGTGAAGGTGTTCAACCAGAGAAGAAAGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCCTAACAGA3GAAAC3GAGGATCC
AGAGCACCAGAAAGGAATACAGACTCCTTCTTGAACGTGAGCATCCAGGGTGGGTCTCTGGGGTATGCGT3AA
GAATCTGGTAAAGATTTTGGAGGCTGTGGCGGGCAGCTGTGGACCGTCTGAACATCACTTCTACGAGAACA
GATCACCAGCATCTCTGGGCCACAATGGACCTGGGAAAACCAACCTTCTCCATCCTCAC3GGTCTCTTGGCCACC
AACCTCTGGGACTGTGCTCGTTGGGGGAAGGGACATTGAAACCAGCCTGGATGCAGTCCG3CAGAGCCTTGGCAT
GTGTCCACAGCACAACATCTGTTCACCACTCACGGTGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCAGCTGAAAGG
AAAGTCCCAGGAGGAGGCCAGCTGGAGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCCTCCACCAACA3CGGAATGA
AGAGGCTCAGGACCTATCAGGTGGCATGCAGAGAAAGCTGTGGTGGCATTCGCTTGT3GGAGATGCCAA3GT
GGTATTCTGGACGAAACCACTCTGGGGTGGACCTTACTCGAGACGCTCAATCTGGGATCTGCTCCTGGAATA
TCGCTCAGGCAGAACCATCATGTCCACTCACCACATGGACGAGGCGGACCTCTCTGG3GACCGCATTCGCA
CATTGCCAGGGAAGGCTCTACTGCTCAGGCACCCCACTCTCTGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTTGTACTT
AACCTTGGTGGCAAGATGAAAAACATCCAGAGCCAAAGGAAAGGCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCTAA
GGGTTTCTCCACCAGTGTCCAGCCACGTCGATGACCTAACTCCAGAACAGTCTTGGATGGGGATGTAAATGA
GCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCTGGTGGAGTGCATTGGTCAAGAACTTATCTTCT
CTTCCATTTAAATTAGGGATAACAGGGTAATGGCGCGGGCCGAGGAACCCCTAGTGAT3GAGTT3GCCACTCC
CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCGCGGGCAAAGCCCGGCGCTCGGGCGACCTTTGGTTCGCC3GC
CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

10

20

配列番号4

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTTCGCCCGACGCCCGGGCTTT
GCCCCGGCGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCTCGGC
AATTCAGTCGATAACTATAACGGTCTTAAGGTAGCGATTTAAATAACATCCAGAGCCAAAGGAAAGGCGAGT
GGACCTGCAGCTGCTCGTCTAAGGGTTTCTCCACCACGTGTCCAGCCACGTCGATGACCTAACTCCAGAACAAAG
TCCTGGATGGGGATGTAAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCTGGTGGAGTGCA
TTGGTCAAGAACTTATCTTCTTCTCCAAATAAGAACTTCAAGCACAGAGCATATGCCAGCCTTTTTCAGAGAGC
TGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTGGGAATTTCTGACACTCCCCTGGAAGAGATTTTCTGA
AGGTACAGGAGGATTCTGATTCAGGACCTCTGTTTGGCGGTGGCGCTCAGCAGAAAAGAGAAAACGTCACCCCC
GACACCCCTGCTTGGGTCCAGAGAGAAGGCTGGACAGACACCCAGGACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCGC
CGGCTGCTCACCAGAGGGCCAGCCTCCCCCAGAGCCAGAGTGCCAGGCCCGCAGCTCAACACGGGGACACAGC
TGGTCTCCAGCATGTGCAGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACACCATCCGCAGCCACAAGGACTTCTGG
CGCAGATCGTGCTCCCGGTACCTTTGTGTTTTTGGCTCTGATGCTTCTATTGTTATCCCTCCTTTTGGCGAAT
ACCCCGCTTTGACCTTACCCCTGGATATATGGGAGCAGTACACCTTCTTCAGCATGGATGAACCAGGCGAGTG
AGCAGTTACAGGTACTTGCAGACGTCCTCCTGAATAAGCCAGGCTTTGGCAACCGCTGCCTGAAGGAAGGGTGGC
TTCCGGAGTACCCCTGTGGCAACTCAACACCCCTGGAAGACTCCTTCTGTGTCCCCAAACATCACCAGCTGTTC
AGAAGCAGAAATGGACACAGGTCAACCCCTTACCATCCTGCAGGTGCAGCACCAGGGAGAAGCTCACCATGCTGC
CAGAGTGCCCCGAGGGTGCCGGGGGCTCCCGCCCCCAGAGAACACAGCGCAGCACGGAATTTTACAAGACC
TGACGGACAGGAACATCTCCGACTTCTTGGTAAAAACGTATCCTGCTCTTATAAGAAGCAGCTTAAAGAGCAAA
TCTGGGTCAATGAACAGAGGTATGGAGGAATTTCCATTGGAGGAAAGCTCCAGTCTGTCCTCCATCACGGGGGAAG
CACTTGTGGGTTTTTAAGCGACCTTGGCCGGATCATGAATGTGAGCGGGGGCCCTATCACTAGAGAGGCCCTTA
AAGAAATACCTGATTTCTTAACATCTAGAACTCAACACAACATTAACCTCTGCTTTAATAACAAACGCTGCC
ATGCCCTGGTCAGCTTTCTCAATGTGGCCCAACAGCCATCTTACGGGCCAGCCTGCCTAAGGACAGGAGCCCCG
AGGAGTATGGAATCACCGTCATTAGCCAACCCCTGAACCTGACCAAGGAGCAGCTCTCAGAGATTACAGTGCTGA
CCACTTCAGTGGATGCTGTGGTTGCCATCTGCGTGATTTTCTCCATGTCCTTCGTCCAGCCAGCTTTGTCTTT
ATTTGATCCAGGAGCGGGTGAACAAATCCAAGCACCTCCAGTTTATCAGTGGAGTGAGCCCCACCACCTACTGGG
TAACCAACTTCTCTGGGACATCATGAATTATTCGCTGAGTGTGGCTGGTGGTGGGCATCTTCATCGGCTTTC
AGAAGAAAGCCTACACTTCTCCAGAAAACCTTCTGCCCTTGTGGCACTGCTCCTGCTGTATGGATGGGCGGTCA

30

40

TTCCCATGATGTACCCAGCATCCTTCCTGTTTGATGTCCCCAGCACAGCCTATGTGGCTTTATCTTGTGCTAATC
TGTTTCATCGGCATCAACAGCAGTGTCTATTACCTTCATCTTGGAATTATTTGAGAATAAACC3GACGCTGCTCAGGT
TCAACGCCGCTGTGAGGAAGCTGCTCATTGTCTTCCCCACTTCTGCCTGGGCGCGGGGCTCATTGACCTTGAC
TGAGCCAGGCTGTGACAGATGTCTATGCCCGGTTTGGTGAGGAGCACTCTGCAAATCCGTTCCACT3GGACCTGA
TTGGGAAGAACCTGTTTGGCATGSGTGGTGAAGGGGTGGTGTACTTCCCTCCTGACCCCTGCTGGTCCAGCGCCAC
TCTTCTCTCCCCAATGGATTGCCAGCCCCACTAAGGAGCCCATTTGTTGATGAAGATGATGATGTGGCTGAAGAAA
GACAAAGAATTATTACTGGTGGAAATAAAACCTGACATCTTAAGGCTACATGAACTAACCAAGATTTATCCAGGCA
CCTCCAGCCCCAGCAGTGGACAGGCTGTGTGTGCGGAGTTCCGCCCTGGAGAGTGCTTTGGGCTCCTGG3AGTGAATG
CTGCCCGCAAAACAACCACATTCAACATGCTCACTGGCGACACCACAGTCACCTCAGCCGATGCCACCGTAGCAG
GCAAGAGTATTTTTAACCAATATTTCTGAAGTCCATCAAAATATGGGCTACTGTCTCAGTTTGATGCAATCGATG
AGCTGCTCAGAGGACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCGAGGTGTACCAGCAGAAGAAATCGAAAGG
TTGCAAACATGGAGTATTAAGAGCCTGGGCGCTGACTGTCTACGCCGACTGCTGGCTGGCACTGATACAGTGGGGCA
ACAAGCGGAAACTCTCCACAGCCATCGCACTCATTGGCTGCCACCCTGGTGTCTGCTGGATGAGCCACCCACAG
GGATGGACCCCCAGGCACGCCGATGCTGTGGAACGTCTCTGTAGCATCATCAGAGAAG3GAGGGCTGTGGTCC
TCACATCCACAGCATGGAAGAATGTGAGGCACTGTGTACCCGGCTGGCCATCATGGTAAAGGGCGCTTTTCAT
GTATGGGCACCATTCAGCATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATATCGTCACAATGAAGATCAAAATCCCCGA
AGGACGACCTGCTTCCTGACCTGAACCCCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGGGGAACCTTCCAG3CAGTGTGAGAGGG
AGAGGCACTACAACATGCTCCAGTTCCAGGTCTCCTCCTCCTCCTGGCGAGGATCTTCCAGCTCCTCCTCCTCC
ACAAGGACAGCCTGCTCATCGAGGAGTACTCAGTCACACAGACCACACTGGACCAGGTGTTTGTAATTTTGCTA
AACAGCAGACTGAAAGTCATGACCTCCCTCTGCACCCCTCGAGCTGCTGGAGCCAGTCGACAAGCCCAGGACT3AA
AGCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGCTATTCTTAACATATGTTGCTCCT
TTACGCTATGGGATACGCTCTTAATGCTTTTGAATCATGCTATTGCTTCCGTAAGGCTTTTCAATTTTCTCCT
CCTTGATATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAAC3TGCGGTGGTGT3CA
CTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTTCCGGGACTTTTCGCT
TCCCCCTCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAG3GGCTCGGCTGTGG
GCACTGACAATTCGCTGGTGTGTGCGGGGAAATCATCGTCTCTTCTTGGCTGCTCGCCT3TGTTGCCACCT3GA
TTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAA¹CCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCG3CCTGCTGC
CGGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTCCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTTGGGCG3CCTCCCGC
ATGCCGCTGATCAGCCTCGACTGIGCTTCTAGTTGCCAGCCA²CTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGT3CCTTCTT
GACCTTGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTCTAA³AAAATGAGGAAATGCA⁴TCGATTGTCT3AGTAG3TG
TCATTTCTATTCIGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG3CATGCTGG
GGATCGCGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGCGGGAAGAACCAAGCTGGGATTAAATAGG3ATAACAGGCTAATG
GCGCGGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC3CTCACTGAGGC3GC
CCGGGCAAAGCCCGGGCTCGGGCGACCTTTGGTGC⁵CCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGC3CGCAGAGAGGGAGT
GGCCAA

10

20

配列番号5

GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGAAGGGGCGGG
CAGAATGATCTAA¹CGGATT²CCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCTAAGCGT
CCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTAGCCTGGTGTGTGTAGCCCCGG

30

配列番号6

GTGCCGAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGC
TCTAGAGCCTCTGCTAACCAATGTT¹CATGCCTTCTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTG
CTGTCTCATCATTTTGGCAAGAATTACCACCAATG

配列番号7

ATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACG
CTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTG
TATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTG
TTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCC
CTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACT

40

GACAATTCGTTGGTGTGTGCGGGGAAATCATCGTCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTG
CGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCGGGCTGCTGCCGGCT
CTGCGGCTCTTCCGCTCTTCCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCC

配列番号8

CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCCTTCTTGACC
CTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTAT
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAT
CGGTTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGG

配列番号9

50

GGTACCGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGAAGGG
GCCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCGAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCCT
AAGCCTCCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGCTGTGTACGCCCCGGGTGCCGCAGGGGGACGGGTGC
CTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCAI
GTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAA
GAATTACCACCATGGGCTTCGTGAGACAGATACAGCTTTTGTCTCGAAGAAGTGGACCCTGCGGAAAAGGCAAA
AGATTGCTTTGTGGTGGAACTCGTGTGGCCTTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCTGGTTAAGGAATGCCAACC
CGCTCTACAGCCATCATGAATGCCATTTCCCAACAAGGCGATGCCCTCAGCAGGAATGCTGCCGTGGCTCCAGG
GGATCTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCAAAGCCCCACCCAGGAGAATCTCCTGGAATTGTGTCAAAC
ATAACAACCTCCATCTTGGCAAGGGTATATCGAGATTTTCAAGAACTCCTCATGAATGCACCAGAGAGCCAGCACC
TTGGCGGTATTTGGACAGAGCTACACATCTTGTCCCAATTCATGGACACCTTCGGGACTCACCCGGAGAGAAATTG
CAGGAAGAGGAATACCAATAACGGATATCTTCAAAGATCAAGAAACACTGACACTATTTCTCATTAAAAACATCC
GCCTGTCTGACTCAGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTCCGTCCAGAGCAGTTGCTCATGGAGTCCCGG
ACCTGGCGCTGAAGGACATCGCCTGCAGCGAGGCCCTCCTGGAGCGCTTCATCATCTTCAGCCAGAGACGCGGGG
CAAAGACGGTSCGCTATGCCCTGTGCTCCCTCTCCAGGGCACCTTACAGTGGATAGAAGACACTCTGTATGCCA
ACGTGGACTTCTTCAAGCTCTTCCGTGTGCTTCCACACTCCTAGACAGCCGTTCTCAAGGTATCAATCTGAGAT
CTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTACCAAGAATTCAAGAGTTTATCCATCGGCCGAGTATGCAGGACTTGC
TGTGGGTGACCAGGCCCTTCATGCAGAATGGTGGTCCAGAGACCTTTACAAAGCTGATGGGCATCCTGTCTGACC
TCTGTGTGGCTACCCCGAGGGAGGTGGCTCTCGGGTGTCTCTCTTCAACTGGTATGAAGACAATAACTATAAGG
CCTTTCTGGGGAATGACTCCACAAGGAAGGATCCTATCTATTCTTATGACAGAAGAACACATCCTTTTGTAAATG
CATTGATCCAGAGCCTGGAGTCAAATCCTTTAAACAAAATCGCTTGGAGGGCGGCAAAGCCTTTGTGATGGGAA
AAATCCTGTACACTCCTGATTACCTGCAGCAGCAAGGATACCTGAAGAATGCCAACTCAACTTTTGAAGAACTGG
AACACGTTAGGAAGTTGGTCAAAGCCTGGGAAGAAGTAGGGCCCCAGATCTGGTACTTCTTTGACAACAGCACAC
AGATGAACATGATCAGAGATACCTGGGGAACCCAAACAGTAAAAGACTTTTGAATAGGCAGCTTGGTGAAGAAG
GTATTACTGCTGAAGCCAATCTAAACTTCTCTACAAGGGCCCTCGGGAAAGCCAGGCTGACGACATGGCCAACT
TCGACTGGAGGGACATATTTAAACATCACTGATCGCACCTTCCGCTTGTCAATCAATACCTGGAGTGTCTGGTCC
TGGATAAGTTTGAAGCTACAATGATGAAACTCAGCTCACCCAACTGCCCCCTCTCTCTACTGGAGGAAAACATGT
TCTGGGCCGGAGTGGTATTCCTTGACATGTATCCCTGGACCAGCTCTCTACCAACCCACGTGAAGTATAAGATCC
GAATGGACATAGACGTGGTGGAGAAAACCAATAAGATTAAAGACAGGTATTGGGATTCTGGTCCCAGAGCTGATC
CCGTGGAAGATTTCGGTACATCTGGGGCGGGTTTGCCTATCTGCAGGACATGGTTGAACAGGGGATCACAAAGGA
GCCAGGTGCAGGCGGAGGCTCCAGTTGGAATCTACCTCCAGCAGATGCCCTACCCCTGCTTCGTGGACGATTCTT
TCATGATCATCTTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCAATGGTGTGGCATGATCTACTGTCTCCATGACTGTGA
AGAGCATCGTCTTGGAGAAGGAGTTGCGACTGAAGGAGACCTTGAAAAATCAGGGTGTCTCCAATGCAGTGATTT
GGTGTACCTGGTTCCTGGACAGCTTCTCCATCATGTGATGAGCATCTTCTCTCTGACGATATTTCATCATGCATG
GAAGAACTCTACATTACAGCGACCCATTATCTCTTCTTCTTGTGGCTTTCTCCACTGCCACCATCATGC
TGTGCTTTCTGCTCAGCACCTTCTTCTCCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTGTAGTGGTGTCTATCTATTTACCC
TCTACCTGCCACACATCTCTGTCTTCCGCTGGCAGGACCGCATGACCGCTGAGCTGAAGAAGGCTGTGAGCTTAC
TGTCTCCGGTGGCATTGGATTGGCACTGAGTACCTGGTTCTGCTTTGAAGAGCAAGGCCTGGGGCTGCAGTGGGA
GCAACATCGGGAACAGTCCACCGGAAGGGGACGAATTCAGCTTCTGTCTGTCATGCAGATGATGCTCCTTGATG
CTGCTGTCTATGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGGTGTTTCCAGGAGACTATGGAACCCCACTTCTTGGT
ACTTTCTTCTACAAGAGTCTGATTGGCTTGGCGGTGAAGGTGTTCAACCAGAGAAAGAAAGAGCCCTGGAAAAGA
CCGAGCCCTAACAGAGGAAACGGAGGATCCAGAGCACCCAGAAGGAATACACGACTCTTCTTTGAACGTGAGC
ATCCAGGGTGGGTCTCTGGGGTATGCGTGAAGAATCTGGTAAAGATTTTGTAGCCCTGTGGCCGGCCAGCTGTGG
ACCGTCTGAACATCACCTTCTACGAGAACCAGATCACCGCATTCCTGGGCCACAATGGAGCTGGGAAAACCACCA

10

20

30

40

CCTTGTCCAATCCGACGGGTCTGTTGCCACCAACCTCTGGGACTGIGCTCGTTGGGGGAAGGGACATTGAAACCA
GCCTGGATGCAGTCCGGCAGAGCCTTGGCAATGTGTCCACAGCACAAACATCCTGTTCACACCTCACGGTGGCTG
AGCATATGCTGTTCTATGCCAGCTGAAAGGAAAAGTCCAGGAGGAGGCCAGCTGGAGATGGAAGCCATGTTGG
AGGACACAGGCCCTCCACCACAAGCGGAATGAAGAGGCTCAGGACCTATCAGGTGSCATGCAGAGAAAGCTGTCCG
TTGCCATTGCCTTTGTGGGAGATGCCAAGGTGGTGATTCTGGACGAACCCACCTCTGGGGTGGACCCTTACTCGA
GACGCTCAATCTGGGATCTGCTCCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGTCACCTCACACATGGACG
AGGCCGACCTCCTTGGGGACCGCATTGCCATCATTTGCCAGGGAAGGCTCTACT3CTCAGGCACCCCACTCTTCC
TGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTTGTACTTAACCTTGGTGC3CAAGATGAAAAACATCCAGAGCCAAAGGAAAG
GCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCTAAGGGTTTCTCCACCAGTGTCCAGCCACGTGCGATGACCTAATC
CAGAACAAGTCTGGATGGGGATGTAAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCTGG
TGGAGTGCAATGGTCAAGAACTTATCTTCTTCTTCC

ACATCCAGAGCCAAAGGAAAGGCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCTAAGGGTTTCTCCACCACGTGT
CCAGCCCCACGTGATGACCTAACTCCAGAACAAGTCCTGGATGGGGATGTAAATGAGCTGATGGATGTAGT
TCTCCACCATGTTCCAGAGGCCAAAGCTGGTGGAGTGCATTGGTCAAGAACTTATCTTCCTTCTTCCAAATA
AGAACTTCAAGCACAGAGCATATGCCAGCCTTTTTCAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTC
AGCAGTTTTTGAATTTCTGACACTCCCCCTGGAAGAGATTTTTCTGAAGGTCACGGAGGATTCTGATTCAGG
ACCTCTGTTTGGGGTGGCGCTCAGCAGAAAAGAGAAAACGTCAACCCCCGACACCCCTGCTTGGGTCCCA
GAGAGAAGGCTGGACAGACACCCAGGACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCGCCGGCTGCTCACCAGAG
GGCCAGCCTCCCCAGAGCCAGAGTGCCAGGCCCCGAGCTCAACACGGGGACACAGCTGGTCTCTCCAGCA
TGTGCAGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACACCATCCGCAGCCACAAGGACTTCTGGCGCAGATCG
TGCTCCCGCTACCTTTGTGTTTTTGGCTCTGATGCTTTCTATTGTTATCCCTCCTTTTGGCGAATACCCC
GCTTTGACCCCTTCAACCCCTGGATATATGGGCAGCAGTACACCTTCTTCAGCATGGATGAACCAGGCAGTGA
GCAGTTCACGGTACTTGCAGACGTCTCTCTGAATAAGCCAGGCTTTGGCAACCGCTGCCTGAAGGAAGGGT
GGCTTCCGGAGTACCCCTGTGGCAACTCAACACCCCTGGAAGACTCCTTCTGTGTCCCCAAACATCACCCAG
CTGTTCCAGAAGCAGAAATGGACACAGGTCAACCCCTTACCATCCTGCAGGTGCAGCACCAGGGAGAAGCT
CACCATGCTGCCAGAGTGCCCCGAGGGTGGCGGGGGCCTCCCGCCCCCAGAGAACACAGCGCAGCACGG
AAATTCTACAAGACCTGACGGACAGGAACATCTCCGACTTCTTGGTAAAAACGTATCCTGCTCTTATAAGA
AGCAGCTTAAAGAGCAAATTTCTGGGTCAATGAACAGAGGATGAGGAAATTTCCATTGGAGGAAAGCTCCC
AGTCGTCCCCATACAGGGGGAGCAGCTTGTGGGTTTTTAAAGCAGCTTGGCGGATCAGTAATGTGAGCG
GGGGCCCTATCAGTAGGAGGCTCTAAAGAAATACCTGATTTCTTAAACAICTAGAACTGAAGACAAC
ATTAAGGTGTGGTTTAATAACAAAGGCTGGCATGCCCTGGTCAGCTTTCTCAATGTGGCCCAACGCCAT
CTTACGGGGCCAGCCTGCCTAAGGACAGGAGCCCCGAGGAGTATGGAATCACCGTCAATTAGCCAACCCCTGA
ACCTGACCAAGGAGCAGCTCTCAGAGATTACAGTGCTGACCACTTCAGTGGAIGCTGTGGTTGCCATCTGC
GTGATTTTCTCCATGTCTTCTGCTCCAGCCAGCTTTGTCTTTTATTTGATCCAGGAGCGGGTGAACAAATC
CAAGCACCTCCAGTTTATCAGTGGAGTGAGCCCCACCACCTACTGGGTAACCAACTTCTCTGGGACATCA
TGAATTATTCGTGAGTGCTGGGCTGGTGGTGGGCATCTTCATCGGGTTTCAGAAGAAAGCCTACACTTCT
CCAGAAAACCTTCTGCCCCGTGGTGGCACTGCTCCTGCTGTATGGATGGGCGGTCAATCCCATGATGTACCC
AGCATCCTTCTGTTTGAATGTCCCCAGCACAGCCTATGTGGCTTTATCTTGTGCTAATCTGTTTCATCGCA
TCAACAGCAGTGCTATTACCTTCATCTTGGAAATTATTTGAGAATAACCGGACGCTGCTCAGGTTCAACGCC
GTGCTGAGGAAGCTGCTCATTGTCTTCCCCCACTTCTGCTGGGCGGGGCCCTCATTGACCTTGCACIGAG
CCAGGCTGTGACAGATGTCTATGCCCGGTTTGGTGAGGAGCACTCTGCAATCCGTTCCACTGGGACCTGA
TTGGGAAGAACTGTTTGGCATGGTGGTGGAAAGGGTGGTGTACTTCTCTCTGACCCCTGCTGGTCCAGCGC
CACTTCTTCTCTCCCAATGGATTGCCGAGCCCACTAAGGAGCCCAATTGTTGATGAAGATGATGATGTGGC
TGAAGAAAGACAAAGAATTATTACTGGTGGAAATAAACTGACATCTTAAGGCTACATGAACCTAACCAAGA
TTTATCCAGGCACCTCCAGCCCAGCAGTGSACAGGCTGTGTGTCGGAGTTCCGCTTGGAGAGTGCTTTGGC
CTCTGGGAGTGAATGGTGGCGGCAAAACAACCATTCAGATGCTCACTGGGGACACCAAGTGAACCTC
AGGGGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTATTTTAAACCAATATTTCTGAAGTCCATCAAAATATGGGCTACT
GTCTCAGTTTGATGCAATCGATGAGCTGCTCACAGGACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCGA
GGTGTACCAGCAGAAGAAATCGAAAAGGTTGCAAACTGGAGTATTAAGAGCCTGGGCCTGACTGTCTACGC
CGACTGCCTGGCTGGCACGTACAGTGGGGGCAACAAGCGGAACTCTCCACAGCCATCGCACTCATTGGCT
GCCACCGCTGGTGTGCTGGATGAGCCCACCACAGGGATGGACCCCCAGGCACGCCGCATGCTGTGSAAC
GTCATCGTGAGCATCATCAGAGAAGGGAGGGCTGTGGTCTCACATCCACAGCATGGAAGAATGTGAGGC
ACTGTGTACCCGGCTGGCCATCATGGTAAAGGGCGCCTTTTCATGTATGGGCACCATTACGATCTCAAGT
CCAAATTTGGAGATGGCTATATCGTCACAATGAAGATCAATCCCCGAAGGACGACCTGCTTCTGACCTG
AACCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGGGGAACCTCCAGGCAGTGTGCAGAGGGAGAGGCACCTACAACATGCT

10

20

30

40

CCAGTTCCAGGTCTCCTCCTCCTCCCTGGCGAGGATCTTCCAGCTCCTCCTCTCCACAAGGACAGCCTGC
TCATCGAGGAGTACTCAGTCACACAGACCACAGCTGGACCGGTGTTGTAAATTTTGCTAAACAGCAGACT
GAAAGTCAAGACCTCCTCTGCACCCCTCGAGCTGGAGCCAGTGCACAAGCCCAGGACTGAAAGCTTAT
CGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGCTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTA
CGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCAATTTCTCC
TCTTGTATTAATCCTGGTGTCTCTCTTTATGAGGAGTTGTGCCCCGTTGTCAGGCAACGTGCGTGGT
GTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGA
CTTTGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCAGGCGGAACTCATCGCCGCTGCTTGGCGCTGCTGSAACAGG
GCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGTGGTGTGTGCGGGGAAATCATCGTCTTTCTTGGCTGCTCGC
CTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGCTCTTCTGCTACGICCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACC
TCTCTTCCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTCCGCTTCCGCTCAGACGAGTGG
ATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCCGATGCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCT
GTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTCTTCTTAATAAAA
TGAGGAAAATGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
AGCGCGAGCATTCGGAAGACAATACCACCCATCCTGCGGATCGGCTGGGCTCTATGGCTTCTGAGCGCGAA
AGAACCAGCTGGGG

【 0 2 2 4 】

〔 実施例 1 : 上流及び下流AAVベクターの調製 〕

所与のAAVベクターの生成には3つのプラスミド : pTransgene、pRepCap及びpHelperが必要である。以下に詳述するように、pTransgeneは上流又は下流のいずれかのABCA4導入遺伝子を含む (ITRの完全性が確認された)。pRepCapはAAVゲノムのrep及びcap遺伝子を含む。rep遺伝子はAAV2ゲノム由来であり、一方cap遺伝子は血清型要件に依存して変わる。pHelperはAAV生成の成功に必要なアデノウイルス遺伝子を含む。HEK293T細胞に適用される3重トランスフェクションミックスのために、プラスミドをポリエチレンジオキサン (PEG) と複合化する。トランスフェクションの3日後、細胞を回収して溶解する。15 %、25 %、40 % 及び60 % 相から構成されるイオジキサノール勾配にかける前に、溶解物をベンゾナーゼで処理して清澄化する。勾配を59,000rpmで1時間30分回転させ、次いで40 % 画分を回収する。次いでこのAAV相をAmicon Ultra 100Kフィルターユニットを使用して精製し濃縮する。この工程の後、100 ~ 200 μ l の精製AAVがPBS中に得られる。

10

【 0 2 2 5 】

〔 実施例 2 : 例示的AAVベクターの構造 〕

上流ベクター

このベクターは、プロモーター、非翻訳領域 (UTR) 及びABCA4 CDSの上流セグメントを含み、導入遺伝子の各末端にAAV2 ITRを有する (図 1)。ABCA4は網膜の視細胞において発現され、したがってヒトロドプシンキナーゼ (GRK1) プロモーターエレメントが組み込まれている。上流ベクターに含まれる特定のGRK1プロモーター配列は、Khan et al. (Investigative Ophthalmology and Visual Science, 48(9), 3954-3961, 2007) に記載されるようにGRK1遺伝子のヌクレオチド-112から+87までを含み、視細胞を標的とする遺伝子治療のための前臨床試験で使用されてきた。

20

【 0 2 2 6 】

GRK1プロモーターの199ヌクレオチドには、長さが186ヌクレオチドの非翻訳領域 (UTR) が続く。このヌクレオチド配列は、REP1臨床試験ベクターに含まれるより大きなUTR (443ヌクレオチド) から選択された (MacLaren et al., 2014)。具体的には、選択された配列は、コザックコンセンサスの直前にニワトリ (Gallus gallus) -アクチン (CBA) イントロン1断片 (予測スプライス供与部位を有する)、アナウサギ (Oryctolagus cuniculus) -グロビン (RBG) イントロン2断片 (予測分岐点及びスプライス受容部位を含む) 及びアナウサギ (Oryctolagus cuniculus) -グロビンエキソン3断片を含み、これがABCA4 CDSにつながる。このUTR断片は、翻訳収率を増加させるために元のGRK1プロモーターエレメントに追加されている (Rafiq et al., 1997 ; Chatterjee et al., 2009)。それ自体では、GRK1プロモーターは視細胞において非常に良好な遺伝子発現能力を示しており、これは発現を阻害する大きな特徴がないことを示唆している。

30

【 0 2 2 7 】

デュアルベクター注入Abca4^{-/-}網膜の比較により、GRK1プロモーターエレメント単独と比較して、上流ベクターがGRK1.5'UTRエレメントを担持する眼から生成されるABCA4タンパク質が有意に多いことが明らかになる (図 2)。

【 0 2 2 8 】

上流ベクターにおけるコザックコンセンサスに続くのは、ヌクレオチド1から3,701まで (NCB1参照ファイルNM_000350中の105から3,805) のABCA4 CDSである。ABCA4 CDSの最後の208ヌクレオチドは、下流ベクターに含まれるCDSの最初の208ヌクレオチドを形成し、重複ゾーンとして働く。上流ベクターに含まれるコーディング配列断片は、ヌクレオチド1,536 (NM_000350 1,640) における塩基変化G>Tを除いて、参照配列NM_000350と一致する。これはコドンの3番目の塩基であり、アミノ酸配列の変化をもたらさない。ABCA4 CDSはエクソン25内でその下流の3' ITRによりトランケートされている。

40

【 0 2 2 9 】

下流ベクター

このベクターは、ABCA4 CDSの下流セグメント、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後応

50

答エレメント (WPRES) 及びウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル (bGH polyA) 配列を含み、導入遺伝子の各末端にAAV2 ITRを有する (図1)。ABCA4 CDSは5' ITRの下流の位置3,494 (NM_000350 3,598) で始まり、6,822 (NM_000350 6,926) の終止コドンまで続く。ABCA4 CDSの最初の208ヌクレオチドは上流ベクターに含まれる最後の208 ABCA4 CDSヌクレオチドと同じであり、導入遺伝子間の重複ゾーンとして働く。下流ベクターに含まれるコーディング配列断片は、ヌクレオチド5,175 (NM_000350 5,279) の塩基変化G>A及び6,069 (NM_000350 6,173) の塩基変化T>Cを除いて参照配列NM_000350と一致する。これらの変化はいずれもコドンの3番目の塩基で起きるものであり、アミノ酸配列の変化をもたらさない。

【0230】

制限部位HindIIIはABCA4 CDS終止コドン WPRESから分離する。このエレメントは長さが593ヌクレオチドであり、REP1臨床試験ベクターに含まれるX抗原不活化WPRESと一致する。次いで、SphIに対する制限部位が、長さが269ヌクレオチドであり、REP1臨床試験ベクターに存在するbGHポリAシグナルと一致するbGHポリAシグナルからWPRESを分離する。次いで3' ITRはpolyAシグナルの下流にある。

【0231】

AAV2 5' ITRはプロモーター活性を有することが知られており、下流の導入遺伝子内のWPRESとbGHポリAシグナルにより、安定な転写物が非組換え下流ベクターから生成される。下流導入遺伝子に含まれる野生型ABCA4 CDSは、アミノ酸配列を変えことなく他のコドンに置換されえない複数のインフレームAUGコドン を有する。これにより、安定な転写物から翻訳が起こる可能性が生まれ、ウエスタンブロットで検出可能なトランケート型ABCA4ペプチドの存在がもたらされる (図4a)。選択された重複ゾーンの開始配列は、翻訳機構がフレーム外部位から開始するのを促進するために、より弱いコンテキスト (図5a) のインフレームAUGコドンよりも前に良好なコンテキスト (潜在的なコザックコンセンサス配列に関して) のフレーム外AUGコドンを含むように、注意深く選択される。インフレームAUGの前には、様々なコンテキストで合計4つのフレーム外AUGコドンがある。これらすべては、10アミノ酸以内に終止コドンに翻訳されるだろう。これらのフレーム外AUGコドンの存在は、非組換え下流導入遺伝子からのトランケート型ABCA4タンパク質の翻訳を妨げうる。

【0232】

〔実施例3：重複ゾーンの評価〕

6つの重複バリエーションのインビトロ及びインビボ評価に従って、最適な重複ゾーンを決定した (それぞれ図3a & 3b)。これらは、A、B、C、D、E及びFと呼ばれ、以下の重複ゾーンを表す (Xは重複なしを表す) : A. 1,173ヌクレオチド (3259~4430) ; B. 506ヌクレオチド (3300~3805) ; C. 208ヌクレオチド (3598~3805) ; D. 99ヌクレオチド (3707~3805) ; E. 49ヌクレオチド (3757~3805) 及び ; F. 24ヌクレオチド (3782~3805)。重複ゾーンB~Xについての下流導入遺伝子は、全て同じ上流導入遺伝子と対になっている。重複バリエーションB及びCは、他のすべてのバリエーションよりも良好に機能し、同程度に機能したが、デュアルベクターバージョンCが種々の理由から選択された。第1は、非組換え下流導入遺伝子からのトランケート型ABCA4の生成が限定されているためである (図4a)。C、D、E、F及びXバリエーション由来の非組換え下流導入遺伝子は、A又はBバージョンよりも有意に低下したレベルのトランケート型ABCA4タンパク質を生成する。デュアルベクターのコンテキストでは、重複Cは、全長ABCA4と比較して最も低い割合のトランケート型ABCA4を生成する (図4b及び4c)。これは、重複C導入遺伝子の設計が、非組換え導入遺伝子からの望ましくない発現を制限するだけでなく、重複Bよりも高い効率で組み換っていることを示唆する。このことのさらなる証拠は、重複C及びB注入ABCA4^{-/-}網膜の間で転写物の倍率変化とタンパク質の倍率変化を比較することによって生じる。ABCA4 CDSの上流部分を標的とするプライマー (したがって、組み換え導入遺伝子からの全長ABCA4転写物に加えて非組換え上流導入遺伝子からの転写物を検出する) は、重複B及びCデュアルベクター注入網膜の両方に存在する非常に高いレベルの転写物を検出した。しかし、重

10

20

30

40

50

重複Cは重複Bの半分未満の転写物レベルを生成したが、1.5倍のレベルのABCA4タンパク質を産生した（図4d）。両者が同じ上流ベクターを共有し、それらの下流導入遺伝子配列のみが異なることを考えると、これは、重複Cのために選択された重複ゾーンが重複Bよりも高い効率で組み換えることを示唆する。

【0233】

選択された重複ゾーンは52%のGC含量及び-19.60kcal/molの自由エネルギー予測を有し、-55.60kcal/mol（53%GC含量）の重複ゾーンBの自由エネルギー予測よりほぼ3倍低い、図5b。この自由エネルギーの減少は、非組み換え重複Cによって形成される2次構造が、重複Bに比べて分離し易いことを示唆し、これにより重複Cが他方の導入遺伝子上の重複ゾーンとの相互作用により利用しやすくなると出願人は予測する。

10

【0234】

〔実施例4：実験プロトコル〕

図2

Abca4^{-/-}マウスはデュアルベクターミックス（1:1）の2μl網膜下注入を受けて、眼1つ当たり1E+9ゲノムコピーの各ベクターが送達された。注入の6週後に眼球摘出を行い、神経網膜を眼杯から分離しRIPA緩衝液中で溶解した。組織をホモジナイズして、遠心後に上清を抽出した。上清を変性ローディング緩衝液と混合し、変性条件下で7.5%TGXゲルに流した。タンパク質をPVDF膜に移し、ABCA4をウサギポリクローナル抗ABCA4（Abcam）で検出し、Gapdhをマウスモノクローナル抗GAPDH（Origene）で検出した。バンドはLICORイメージングシステムを使用して可視化し解析した。ABCA4レベルを各サンプルについてGapdh

20

【0235】

図3a

HEK293T細胞を用いて6ウェル培養プレートに1ウェル当たり2E5細胞で播種した。24時間後、1ウェルの細胞を浮揚させてカウントした。このカウントを使用して、各ウェルに1ベクター当たり10,000の感染多重度（MOI）を与えるのに適当な量のベクターを決定した。培地を除去してウシ胎児血清（FBS）を含有しない1mlの培地にAAVを添加した。細胞を37℃で1時間インキュベートした後20%FBSを含有する1mlの培地を添加した。形質導入の48時間後、培地を除き10%FBSを含有する新しい培地を与えた。細胞をさらに48時間インキュベートした後、もう1度培地交換を行った。24時間後、細胞を回収し、穏やかな遠心サイ

30

【0236】

図3b

図2と同様である。

【0237】

図4a

HEK293T細胞を用いて6ウェル培養プレートに1ウェル当たり1E6細胞で播種した。24時間後、トランスフェクション試薬LT1（GeneFlow）と複合化した1μgのプラスミドを含有するトランスフェクションミックスを細胞に与えた。試験プラスミドはAAVベクターの創出に使用された下流導入遺伝子を担持した。トランスフェクションの48時間後、上述のように細胞を洗浄し、回収し、ウエスタンブロットにより評価した。

40

【0238】

図4b

図2と同様である。

【0239】

図4d

ABCA4タンパク質レベルは、図2に記載されているようにウエスタンブロット分析から得られ、倍率変化は重複バリエーションC及びBデュアルベクター処理の間で比較された。転写物

50

レベルの比較のために、組織試料をRNAlater (Ambion) 中に回収し、そしてmRNAをDynabeads-oligo dT mRNA DIRECT (Life Technologies) を使用して抽出した。cDNA合成は、oligo dTプライマー及びSuperScript III (Life Technologies) を用いて500ng mRNAで行った。試料をPCR Purification Spin Columns (QIAGEN) を用いて洗浄し、50 μ lのDEPC処理水で溶出した。cDNAをABCA4 CDSの上流部分を標的とするqPCRによって評価した。ABCA4のレベルをアクチンレベルに対して標準化し、非注入Abca4^{-/-}試料に対して相対的に表した。次いで、重複バリエーションC及びBのデュアルベクター処理の間のABCA4転写物レベルの倍率変化を比較した。

【0240】

〔実施例5-重複デュアルベクター戦略を使用した、Abca4^{-/-}マウスの視細胞へのABCA4のAAV媒介性送達〕

10

この実施例に提示されたデータは、本発明の重複デュアルベクターシステムを用いた網膜下注入後にAbca4^{-/-}マウスモデルの視細胞外節に特異的に局在するABCA4タンパク質の発現を示す。

【0241】

導入遺伝子の設計と生成：

重複ABCA4導入遺伝子をAAV8 Y733Fキャプシドにパッケージングした。上流導入遺伝子は、AAV2逆方向末端反復配列 (ITR) の間に、ヒトロドプシンキナーゼ (GRK1) プロモーター及びABCA4コーディング配列 (CDS) の上流部分を含んでいた。下流導入遺伝子は、ABCA4 CDSの下流部分、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) 及びポリAシグナル (pA) を含んでいた。上流及び下流導入遺伝子の両方がABCA4 CDS重複を有していた。

20

【0242】

注入：

Abca4^{-/-}マウスに、4~5終齢で、上流及び下流ベクター (1x10¹³gc/ml) の1:1ミックスを含有する2 μ l網膜下注入を与えた。免疫組織化学的 (IHC) 評価のために注入の6週後に眼を回収した。

【0243】

免疫組織化学染色：

レンズを取り外した眼杯全体を4%パラホルムアルデヒド (PFA) 中で20分間固定し、次いで30%スクロース中で4 hにて一晩インキュベートした。切片にする前に眼を封入剤中で凍結させた。組織スライス室温で一晩乾燥させた後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で5分間、3回すすいだ。試料を0.2% Triton-X-100で20分間透過処理し、次いでPBS中で3回洗浄した後、10% ロバ血清 (DS)、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% Triton-X-100と共に1時間インキュベートした。抗体を1% DS、0.1% BSAで1/200希釈し、切片に付与し、室温で2時間放置した。Abca4/ABCA4検出はヤギ抗ABCA4 (AntibodiesOnline) で達成し、過分極活性化環状ヌクレオチドゲートカリウムチャネル1 (Hcn1) 検出をマウス抗Hcn1 (Abcam) で、ロドプシン検出をマウス抗1D4 (Abcam) で行った。切片を0.05% Tween-20で3回すすぎ、次いで二次抗体を暗条件下で1時間付与した (1/400希釈)。切片を0.05% Tween-20で2回すすぎ、次にHoescht染色 (1/1,000) で15分間インキュベートした。切片をPBS中ですすぎ、次に風乾させた。ダイヤモンド褪色防止封入剤を各切片に与え、スライドをイメージング前に一晩放置した。

30

40

【0244】

結果

ABCA4発現は視細胞外節に局在した。

図7は、野生型 (WT) 及びAbca4^{-/-}の眼におけるAbca4/ABCA4 (緑色) 及びHcn1 (赤色) 染色を示す。WT SVEV 129、非注入及び注入Abca4^{-/-}眼を、視細胞内節マーカーHcn1及びAbca4/ABCA4について染色した。WT及びデュアルベクター処理Abca4^{-/-}眼は、視細胞外節におけるAbca4/ABCA4の特異的局在を明らかにした。

【0245】

50

ABCA4のロドプシンとの共局在

図8は、野生型(WT)及びAbca4^{-/-}の眼の視細胞外節におけるAbca4/ABCA4(緑色)及びロドプシン(赤色)染色を示す。WT及びデュアルベクター処理Abca4^{-/-}眼は、視細胞外節におけるロドプシン及びAbca4/ABCA4の共局在を明らかにした。

【0246】

図9は、野生型(WT)及びAbca4^{-/-}の眼におけるAbca4/ABCA4(緑色)及びロドプシン(赤色)頂端RPE染色を示す。WT及びデュアルベクター処置Abca4^{-/-}眼は、RPE細胞の頂端領域におけるロドプシン及びAbca4/ABCA4の共局在を明らかにし、これは脱落した外節円板から生じるといふ仮説が立てられた。デュアルベクターで処理しなかったAbca4^{-/-}眼は、RPE細胞の頂端領域においてロドプシン染色のみを示した。囲み画像Aは、形質導入されたRPE細胞から達成された発現パターンを示し、Abca4/ABCA4/rho染色とは対照的に、びまん性染色パターンを明らかにする。画像Bは、GRK1プロモーターからのRPE発現がないことを確認する。

【0247】

結論

最適化重複デュアルベクターシステムは、視細胞においてABCA4発現を生成するために使用することが可能であり、視細胞ではABCA4はIHCによって検出可能なレベルで所望の外節構造に輸送される。

【0248】

〔実施例6-デュアルベクター処理Abca4^{-/-}マウスにおけるビスレチノイド/A2Eの評価〕

Abca4^{-/-}マウスモデルは、野生型マウスに比べて加齢とともにビスレチノイド及びA2Eのレベルの増加を示す。しかし、ヒトとは対照的に、ビスレチノイドの増加は、有意な網膜変性を引き起こすのに必要なレベルには達しない。これは、ABCA4欠損マウスの眼には他の補償機構が存在しうること示唆する。野生型網膜では、Abca4は、リサイクリングのために視細胞外節円板膜から外へのレチナールの動きを促進する。Abca4^{-/-}マウスモデルにおけるように、機能的なAbca4がない場合、レチナールは外節円板膜で維持され、そこで様々なビスレチノイド形態への生化学的変化を受ける(図11)。視細胞は絶えず新しい外節円板を生成し、そしてその際に、より古くより遠位の円板のRPE細胞への移動があり、RPE細胞はその後それらを食作用により分解する。Abca4欠損マウスでは、貪食された円板は高レベルのビスレチノイドを含む。RPE細胞内で、これらはさらにA2Eアイソフォームに変換され、その蓄積はリポフスチンをもたらす。したがって、Abca4欠損マウスにおけるビスレチノイド蓄積は網膜変性を引き起こすのに不十分であるが、それにもかかわらず、結果としてもたらされるベースラインを超える上昇レベルは定量化されうるものであり、よってAbca4機能のバイオマーカーを提供しうる。

【0249】

ビスレチノイド及びA2E化合物は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって正確に測定することができる。したがって、ABCA4遺伝子治療で処置されたマウスにおける治療効果の尺度は、未処置の眼と比較してビスレチノイド及びA2Eのレベルの減少を達成することであろう。ただし、検討を要する考慮事項が2つある。第1には、臨床応用のために、出願人はヒトABCA4コーディング配列及びヒト視細胞プロモーターを使用する必要があり、これはマウスにおいて同程度に有効ではなさそうである。さらに、HPLC測定は、網膜下注射によってベクターに曝された領域だけではなく、眼全体から行われる。したがって、Abca4欠損マウスにおけるビスレチノイドの全体的な減少は、野生型レベルに達しそうにない。2番目の考慮事項は網膜下注射で、これは外節円板の損傷をもたらす。これらの構造はビスレチノイドに富んでいるので、ABCA4遺伝子治療の効果は同様のシャム注入と比較する必要がある。理想的には、同じマウスの反対側の眼をこのために使用して、ビスレチノイドの蓄積にも影響しうる、眼の大きさ及び一生の露光量の対照とすべきである。

【0250】

この理由のために、出願人は、片方の眼にシャム注入を受け、反対側の眼に似たような治療注入を受けたAbca4^{-/-}マウスのコホートにおけるビスレチノイド/A2Eレベルを比較し

た。各シャム眼は、対となるデュアルベクター治療眼で受けたものと同じ全AAV用量で上流ベクターを与えられた。したがって、各マウスの両眼に2 μ lの網膜下注入を与え、2x10¹⁰ゲノム粒子のAAVベクターを含むプレブを形成させた。

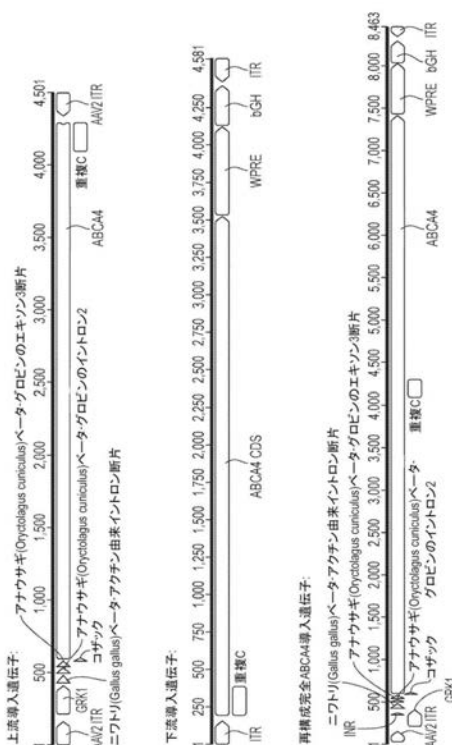
【0251】

合計13匹のAbca4ノックアウトマウスに4~5週齢で注入し、注入3月後に眼を採取した。マウスを組織採取前に16時間暗順応させ、組織採取は薄暗い赤色光の下で暗所で行った。次に、確立されたHPLCアッセイを用いたビスレチノイド/A2E評価のために全眼を非特定化し、そしてJules Stein Eye Instituteに凍結出荷した。各全眼を摘出し解剖せずに処理した。26個全ての眼のHPLC評価の後、続いて正体を明らかにして、各治療眼のビスレチノイド/A2Eレベルをそれらの対のシャム注入眼と比較した。二元配置分散分析により、対のシャム注入眼と比較してデュアルベクター治療眼においてビスレチノイド/A2Eの減少が観察され、当該治療がビスレチノイド/A2Eのレベルに対して有意な効果を有することが決定された(p=0.0171)、図12。

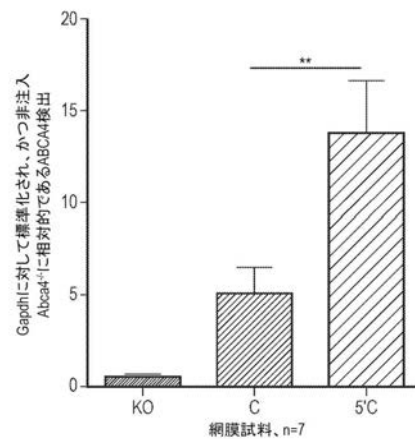
【0252】

上記の明細書で言及された全ての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、本発明の記載された製品、システム、使用、プロセス及び方法の様々な改変及び変形が当業者には明らかである。本発明は特定の好ましい実施形態に関連して記載されているが、特許請求の範囲に記載の本発明は、そのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際、生化学及びバイオテクノロジー又は関連分野の当業者に明らかである、本発明を実施するための記載された様式の種々の改変は、以下の特許請求の範囲内にあることが意図される。

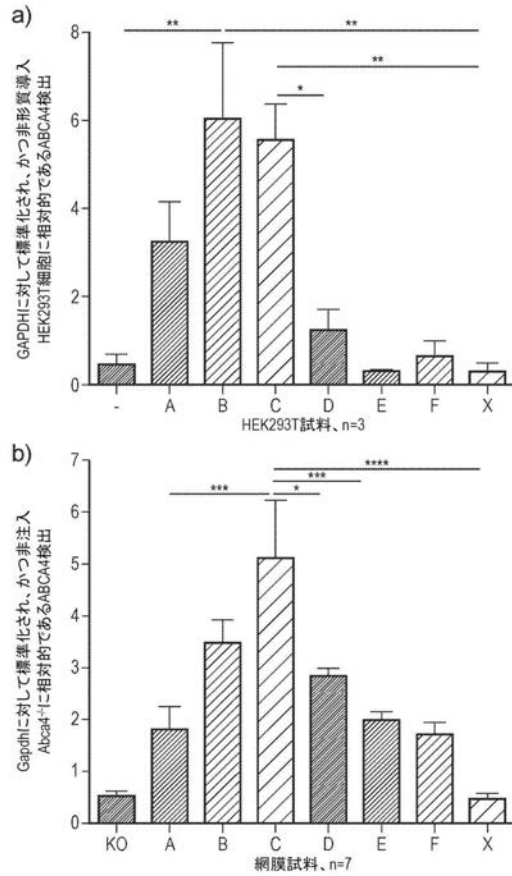
【図1】



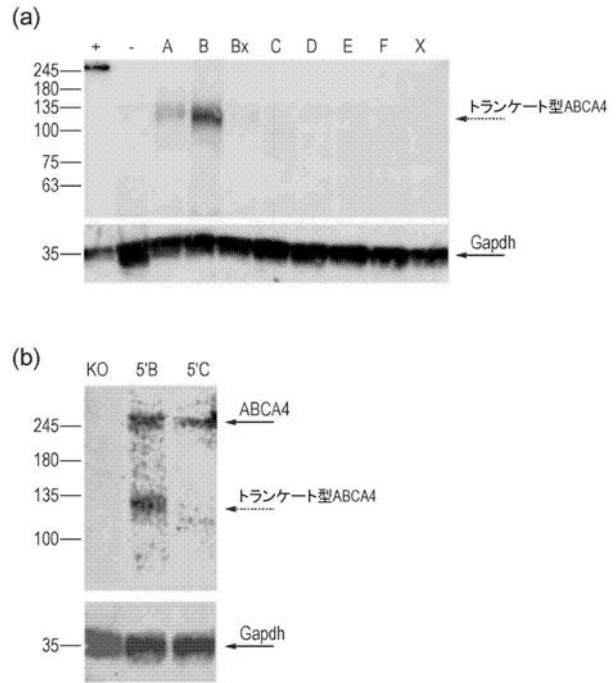
【図2】



【 図 3 】



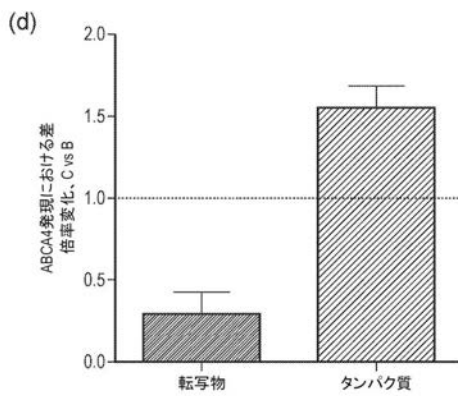
【 図 4 - 1 】



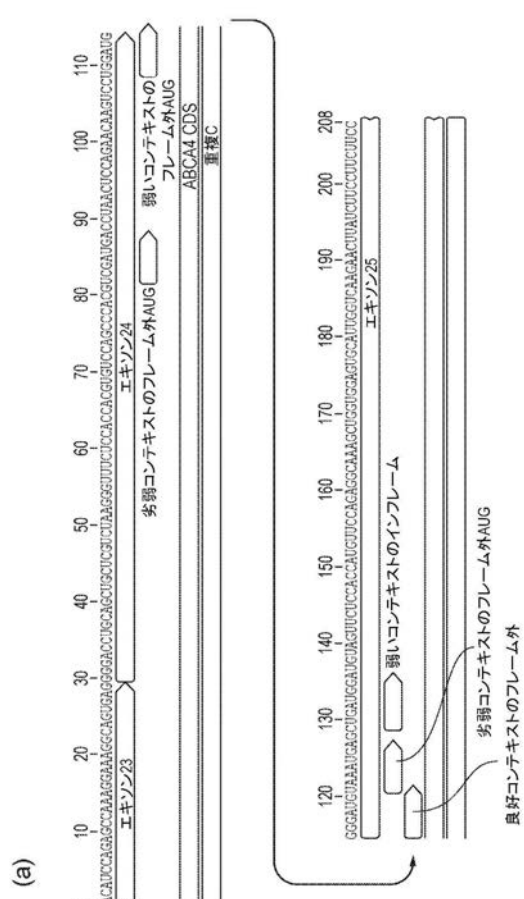
【 図 4 - 2 】

(c)

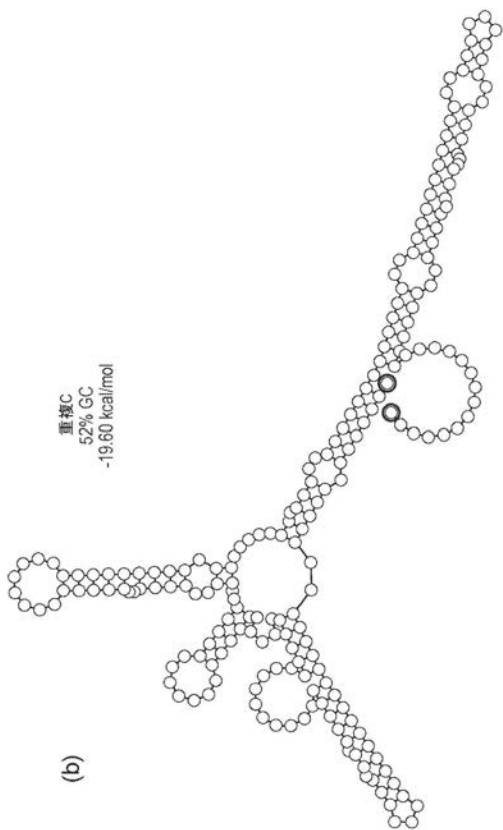
重複	全検出ABCA4 (全長+トランケート型) におけるパーセンテージ 全長ABCA4
B	48%
C	83%
5'B	53%
5'C	89%



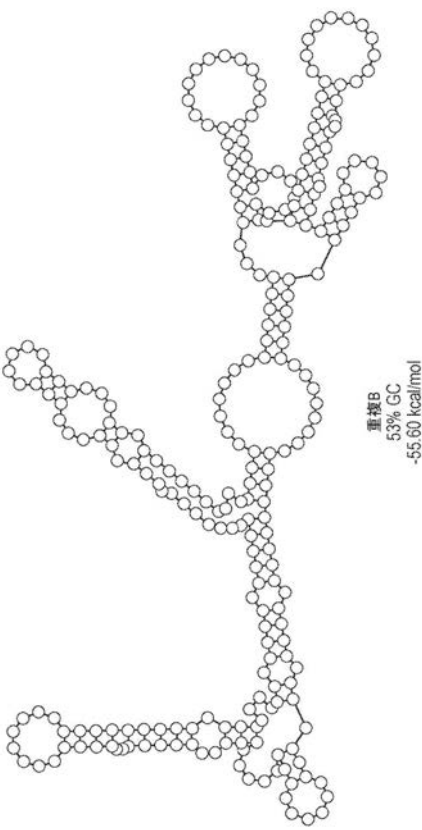
【 図 5 - 1 】



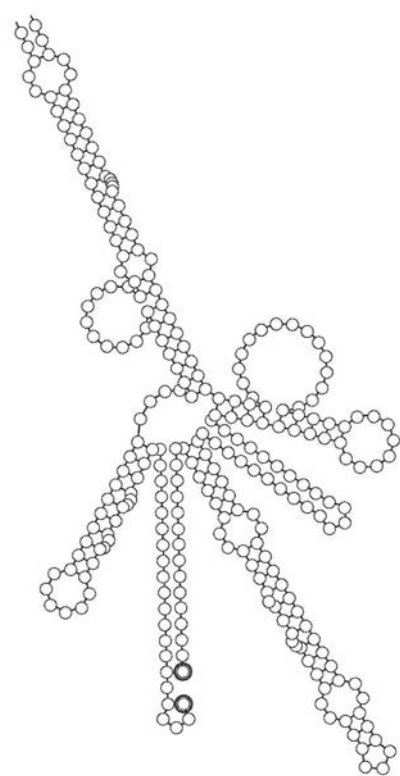
【 図 5 - 2 】



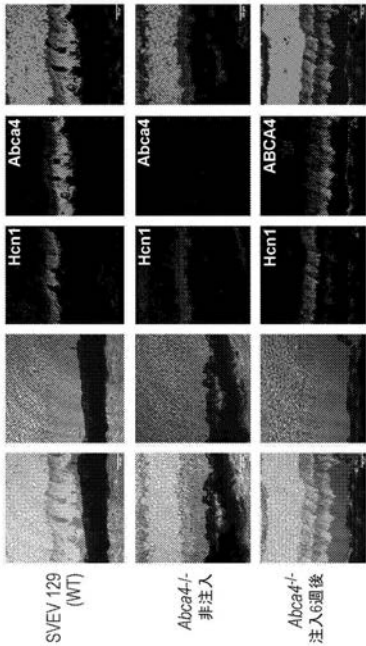
【 図 5 - 3 】



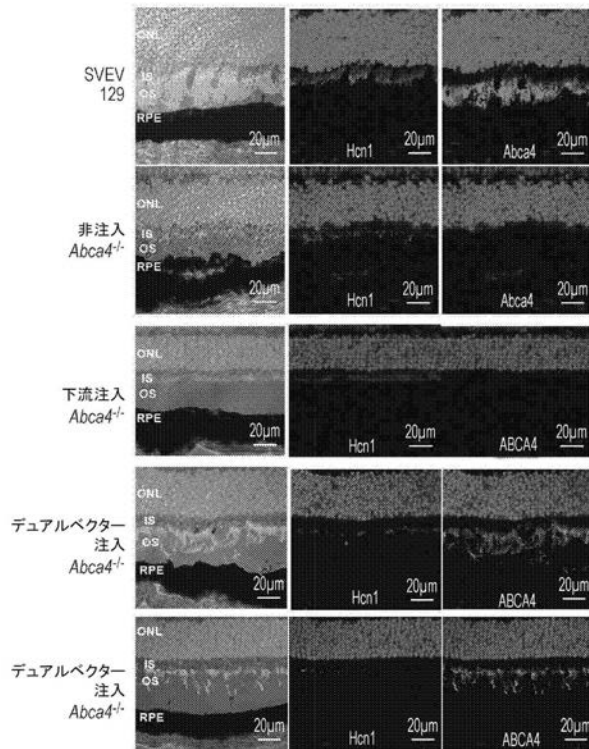
【 図 5 - 4 】



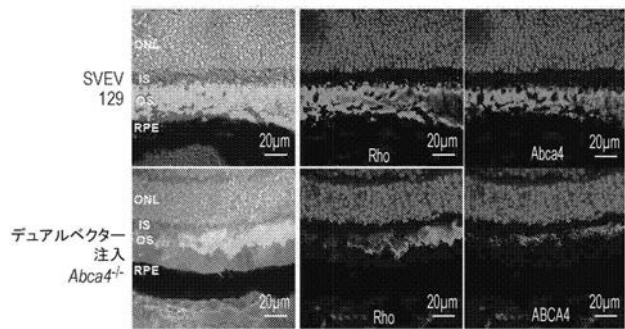
【 図 6 】



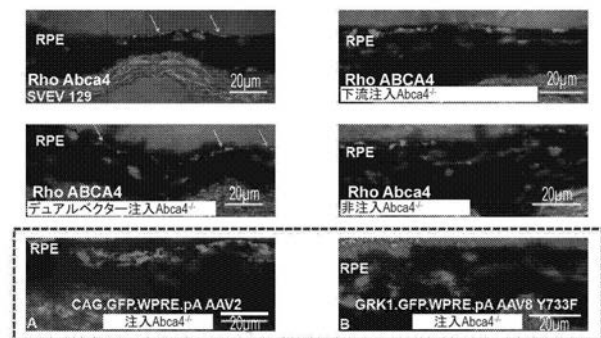
【図 7】



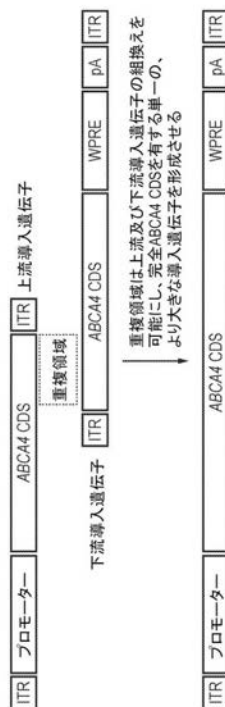
【図 8】



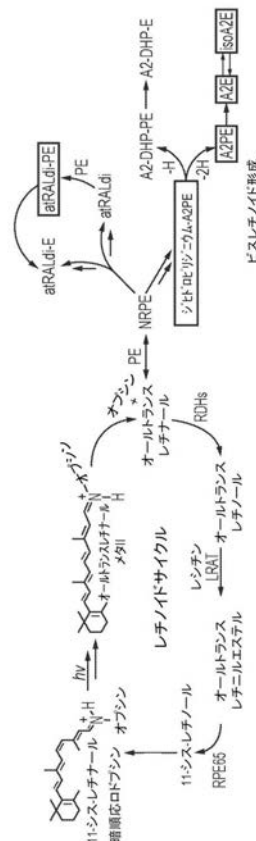
【図 9】



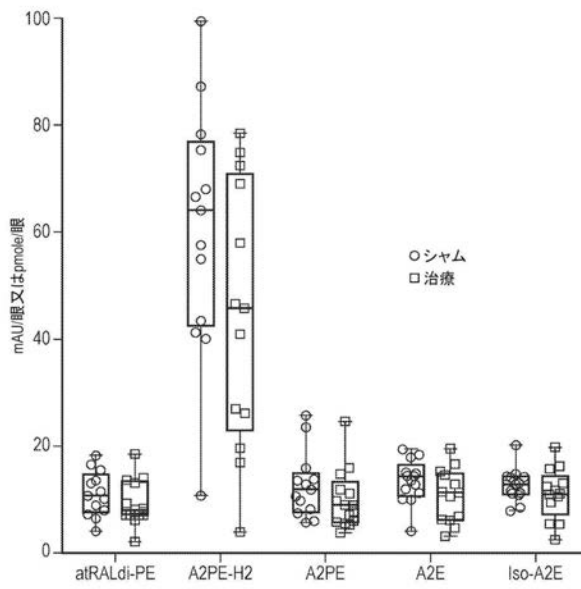
【図 10】



【図 11】



【図 1 2】



【配列表】

2019523648000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2017/051741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/86
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MICHELLE E MCCLEMENTS ET AL: "A Fragmented Adeno-Associated Viral Dual Vector Strategy for Treatment of Diseases Caused by Mutations in Large Genes Leads to Expression of Hybrid Transcripts", JOURNAL OF GENETIC SYNDROMES & GENE THERAPY, vol. 7, no. 5, 14 November 2016 (2016-11-14), XP055399608, DOI: 10.4172/2157-7412.1000311 the whole document	1-4,7, 10-12, 14-16, 19-24
Y,P		1-4,7, 10-12, 14-16, 19-24
A,P		5,6,8,9, 13,17,18
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 2017

Date of mailing of the international search report

12/09/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/051741

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2014/170480 A1 (FOND TELETHON [IT]) 23 October 2014 (2014-10-23) cited in the application	1-4,10, 15,16, 19,21-24
Y	page 20, line 10 - page 24, line 23 page 52, line 11 - page 58, line 12; claims; figures 1, 2B,2E,3,7,8,13-17; table 1	1-24
X	----- IVANA TRAPANI ET AL: "Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors", EMBO MOLECULAR MEDICINE 2014, vol. 6, no. 2, 16 December 2013 (2013-12-16), pages n/a-n/a, XP055127533, ISSN: 1757-4676, DOI: 10.1002/emm.201302948	1-4,10, 15,16, 19,21-24
Y	page 204, left-hand column, last paragraph - page 205, left-hand column, paragraph 3rda	1-24
Y	----- IVANA TRAPANI ET AL: "Improved dual AAV vectors with reduced expression of truncated proteins are safe and effective in the retina of a mouse model of Stargardt disease", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 24, no. 23, 29 September 2015 (2015-09-29), pages 6811-6825, XP055254224, gb ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddv386 the whole document & IVANA TRAPANI ET AL: "Supplementary material", 29 September 2015 (2015-09-29), Retrieved from the Internet: URL:https://academic.oup.com/hmg/article/2 4/23/6811/2385867/Improved-dual-AAV-vector s-with-reduced-expression#supplementary-da ta [retrieved on 2017-08-24]	1-5, 10-23
A	----- A. AURICCHIO ET AL: "Gene Therapy of ABCA4-Associated Diseases", COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN MEDICINE, vol. 5, no. 5, 8 January 2015 (2015-01-08) , pages a017301-a017301, XP055399609, DOI: 10.1101/cshperspect.a017301 page a017303, left-hand column, last paragraph, page a017305, left-hand column, last paragraph; table 1 ----- -/--	1

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/051741

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MCCLEMENTS M. E. & MACLAREN R. E.: "Gene therapy for retinal disease", TRANSLATIONAL RESEARCH, vol. 161, no. 4, 2013, pages 241-254, XP002773218, page 247, left-hand column, last paragraph - page 248, left-hand column, paragraph 2nd	1
Y	----- WO 2013/075008 A1 (UNIV FLORIDA [US]) 23 May 2013 (2013-05-23) claims 1-4, 9,19, 26	1-4
Y	----- ARKASUBHRA GHOSH ET AL: "Viral serotype and the transgene sequence influence overlapping adeno-associated viral (AAV) vector-mediated gene transfer in skeletal muscle", THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, vol. 8, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 298-305, XP055088270, ISSN: 1099-498X, DOI: 10.1002/jgm.835 the whole document	1-4
A	----- MARINA PRYADKINA ET AL: "A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence", MOLECULAR THERAPY - METHODS AND CLINICAL DEVELOPMENT, vol. 2, 25 March 2015 (2015-03-25), page 15009, XP055400448, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1038/mtm.2015.9 figure 1	1
A	----- KYLE CHAMBERLAIN ET AL: "Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids", HUMAN GENE THERAPY METHODS, vol. 27, no. 1, February 2016 (2016-02), pages 1-12, XP055396908, ISSN: 1946-6536, DOI: 10.1089/hgtb.2015.140 page 4, right-hand column, paragraph 2nd - page 6, right-hand column, paragraph 2nd; figure 1 ----- -/--	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/051741

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ARKASUBHRA GHOSH ET AL: "Efficient Transgene Reconstitution with Hybrid Dual AAV Vectors Carrying the Minimized Bridging Sequences", HUMAN GENE THERAPY, 2011, vol. 22, no. 1, 27 July 2010 (2010-07-27), pages 77-83, XP055397050, US</p> <p>ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2010.122 page 81, right-hand column, last paragraph - page 82, last paragraph; figure 1A; table 1</p> <p>-----</p>	1
Y	<p>SARA KATHLEEN POWELL ET AL: "Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy", DISCOVERY MEDICINE, vol. 19, no. 102, 1 January 2015 (2015-01-01), page 49, XP055272358, United States</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2017/051741

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014170480 A1	23-10-2014	AU 2014255665 A1	12-11-2015
		CA 2909733 A1	23-10-2014
		CN 105408352 A	16-03-2016
		EA 201591992 A1	29-04-2016
		EP 2986635 A1	24-02-2016
		JP 2016516424 A	09-06-2016
		US 2016076054 A1	17-03-2016
		WO 2014170480 A1	23-10-2014
WO 2013075008 A1	23-05-2013	US 2014256802 A1	11-09-2014
		WO 2013075008 A1	23-05-2013

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01) A 6 1 K 31/7088

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. TRITON
2. TWEEN

(72)発明者 マクラーレン, ロバート
 イギリス国 オーエックス3 9ディーユー オックスフォード ヘディントン, ヘッドリー ウ
 ェイ, ジョン ラドクリフ ホスピタル, ウェスト ウィング, レベルズ 5 アンド 6, ナッ
 フィールド ラボラトリー オブ オフサルモロジー

(72)発明者 マックレメンツ, ミシェル
 イギリス国 オーエックス3 9ディーユー オックスフォード ヘディントン, ヘッドリー ウ
 ェイ, ジョン ラドクリフ ホスピタル, ウェスト ウィング, レベルズ 5 アンド 6, ナッ
 フィールド ラボラトリー オブ オフサルモロジー

Fターム(参考) 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01
 4C084 AA13 NA20 ZA331 ZA332
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA20 ZA33
 4C087 AA01 BC83 NA20 ZA33