

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6199965号
(P6199965)

(45) 発行日 平成29年9月20日 (2017.9.20)

(24) 登録日 平成29年9月1日 (2017.9.1)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 7/01 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)

C 1 2 N 7/01 Z N A
 C 1 2 N 15/00 A
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 P 27/02

請求項の数 12 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-521593 (P2015-521593)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月23日 (2013.1.23)
 (65) 公表番号 特表2015-523379 (P2015-523379A)
 (43) 公表日 平成27年8月13日 (2015.8.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/022628
 (87) 国際公開番号 W02014/011210
 (87) 国際公開日 平成26年1月16日 (2014.1.16)
 審査請求日 平成28年1月13日 (2016.1.13)
 (31) 優先権主張番号 61/670,355
 (32) 優先日 平成24年7月11日 (2012.7.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502409813
 ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバー
 シテイ・オブ・ペンシルベニア
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0
 4 フイラデルフィア・スイート 2 0 0 ・チ
 エスナツトストリート 3 1 6 0
 (73) 特許権者 315007905
 ユニバーシテイ・オブ・フロリダ・リサー
 チ・ファンデーション・インコーポレーテ
 ヲド
 アメリカ合衆国フロリダ州 3 2 6 1 1 ゲイ
 ンズビル・グリンターホール 2 2 3
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R P G R X 連鎖性網膜変性の A A V 媒介型遺伝子治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R P G R 遺伝子産物またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、該 R P G R 遺伝子産物を、該産物を必要とする個体の光受容細胞中で発現する調節配列の制御下に担持する組換えアデノ随伴ウイルス (A A V) であって、該核酸配列が配列番号1またはそのコドン最適化配列を含んでなる、前記 A A V。

【請求項 2】

R P G R 配列が配列番号5をコードする請求項1に記載の A A V。

【請求項 3】

調節配列が I R B P プロモーターまたは G R K 1 プロモーターを含んでなる請求項 1 ~ 2 のいずれかに記載の A A V。

【請求項 4】

A A V が偽型 A A V であり、そして場合により A A V 2 / 5 偽型 A A V である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の A A V。

【請求項 5】

A A V キャプシドが A A V 2 又は A A V 5 からのものである請求項 1 に記載の A A V。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組換え A A V および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の A A V を有効成分として含んでなる、治療において使用するための製薬学的配合物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の A A V を有効成分として含んでなる網膜色素変性症に伴う視覚喪失を防ぎ、進行を阻止し、または改善する際に使用するための製薬学的配合物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の A A V を毛様体神経栄養因子 (C N T F) と併用するための製薬学的配合物。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の製薬学的配合物であって、該 A A V が同じ目および/または反対側の目に少なくとも 1 回再投与される療法で使用するためのものである、製薬学的配合物。

【請求項 11】

請求項 7 に記載の製薬学的配合物であって、該 A A V の用量が 1 ミリリットル (m L) 当たり $10^9 \sim 10^{13}$ ベクターゲノム (v g) の濃度を含む、製薬学的配合物。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の製薬学的配合物であって、該用量が $50 \mu L \sim 1 mL$ の容量で投与されるためのものである、製薬学的配合物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

光受容体は網膜色素上皮 (R P E) と共同的に機能してフォトンのキャッチ (p h o t o n c a t c h) を最適化し、そしてシグナルを生成し、これがより高度な中心視野 (v i s i o n c e n t e r) に伝えられ、そして視覚像として知覚される。網膜の光受容体における視覚過程の破壊は、失明を生じる可能性がある。網膜の遺伝子異常は、多数のメカニズムにより相当数の視力障害疾患をもたらす。

【0002】

光受容体ジストロフィーの中で、網膜色素変性の X 連鎖形 (X L R P) は重篤な視覚喪失 (v i s i o n l o s s) の最もよくある原因の一つである。25 年以上も前に、遺伝子座が同定され、そして根本にある遺伝子異常の知見が追跡された。網膜色素変性 G T P a s e 調節物質 (R e t i n i t i s P i g m e n t o s a G T P a s e R e g u l a t o r (R P G R)) 遺伝子における突然変異により生じるヒト X L R P は、ほとんどの X L R P の原因となる重篤な早期発生の網膜変性疾患である。網膜色素変性 G T P a s e 調節物質 (R P G R) 遺伝子における突然変異は、X L R P の原因の 70 % より多くを占め、R P G R 中の突然変異多発点であるエキソン O R F 15 は、患者の 22 ~ 60 % で突然変異している。この疾患は容赦なく進行し、そして 40 代の終わりまでにほとんどの患者が法的盲となる。

【0003】

最近まで、突然変異から R P 変性を導く分子メカニズムの解明、および R P G R - X L R P を含むほとんどの形態の R P に関する効果的処置の開発は遅々としていた。疾患に関連する動物モデルが、新たな治療の開発および確認には決定的であった。R P G R - X L R P については、マウスおよびイヌの両モデルが存在する。イヌでは、O R F 15 中の二つの自然に存在する顕著な微小欠損が、異なる疾患表現型をもたらす。X 連鎖性進行性網膜萎縮症 1 (X L P R A 1 ; d e l 1028 - 1032) は、230 残基の C 末端先断 (t r u n c a t i o n) を有し、この疾患は若年性であるが、発症後に発達し、そして数年にわたって進行する。対照的に X L P R A 2 (d e l 1084 - 1085) に関連する二つのヌクレオチド欠損は、フレイムシフトおよび推定タンパク質の等電点を変える 34 個の塩基性アミノ酸の包含を引き起し、そして末端の 161 残基を切断する。この疾患は早期に発症し、そして急速に進行する。両モデルがヒト X L R P の疾患スペクトラムに対

10

20

30

40

50

応し、そして相対的重篤度に変化があるが、それらは10代で発症するヒトの疾患に等しい。

【0004】

この疾患に罹患しているヒト患者が現在利用できるXLRPの成功裏な処置はない。必要とされているのは効果的で、安全かつ長期安定性を有するRPGR-XLRPのための処置である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第7,561,972号明細書

10

【特許文献2】米国特許第7,561,973号明細書

【特許文献3】米国特許第7,888,112号明細書

【特許文献4】国際公開第2005/033321号パンフレット

【特許文献5】米国特許第7,282,199号明細書

【特許文献6】米国特許第5,478,745号明細書

【特許文献7】米国特許第7,629,322号明細書

【特許文献8】米国特許仮出願第61/670,335号明細書

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, & Bhattacharya SS (2010) Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. Nat Rev Genet 11:273-284.

20

【非特許文献2】Bramall AN, Wright AF, Jacobson SG, & McInnes RR (2010) The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. Annu Rev Neurosci 33:441-472.

30

【非特許文献3】Acland GM, et al. (2001) Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nature Genetics 28:92-95.

【非特許文献4】Cideciyan AV (2010) Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. Prog Retin Eye Res 29:398-427.

【非特許文献5】Bird AC (1975) X-linked retinitis pigmentosa. Br J Ophthalmol 59:177-199.

40

【非特許文献6】Bhattacharya SS, et al. (1984) Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and a restriction fragment length polymorphism identified by recombinant DNA probe L1.28. Nature 309:253-255.

【非特許文献7】Meindl A, et al. (1996) A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked

50

nked retinitis pigmentosa (RP3). Nat Genet 13:35-42.

【非特許文献8】Schwahn U, et al. (1998) Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. Nat Genet 19:327-332.

【非特許文献9】Bader I, et al. (2003) X-linked retinitis pigmentosa: RPGR mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44:1458-1463.

10

【非特許文献10】Sharon D, et al. (2003) RP2 and RPGR Mutations and Clinical Correlations in Patients with X-Linked Retinitis Pigmentosa. Am J Hum Genet 73:1131-1146.

【非特許文献11】Pelletier V, et al. (2007) Comprehensive survey of mutations in RP2 and RPGR in patients affected with distinct retinal dystrophies: genotype-phenotype correlations and impact on genetic counseling. Hum Mutat 28:81-91.

20

【非特許文献12】Vervoorst R, et al. (2000) Mutation hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. Nat Genet 25:462-466.

【非特許文献13】Breuer DK, et al. (2002) A comprehensive mutation analysis of RP2 and RPGR in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa. Am J Hum Genet 70:1545-1554.

30

【非特許文献14】Jacobson SG, et al. (1997) Disease expression in X-linked retinitis pigmentosa caused by a putative null mutation in the RPGR gene. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:1983-1997.

【非特許文献15】Sandberg MA, Rosner B, Weigel-DiFranco C, Dryja TP, & Berson EL (2007) Disease course of patients with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR gene mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:1298-1304.

40

【非特許文献16】Aleman TS, et al. (2007) Inner retinal abnormalities in X-linked retinitis pigmentosa with RPGR mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:4759-4765.

【非特許文献17】Hong DH, et al. (2000) A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). Proc Natl Acad Sci U S A 97:3649-3654.

50

【非特許文献18】Chang B, et al. (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42:517-525.

【非特許文献19】Hong DH, Pawlyk BS, Adamian M, & Li T (2004) Dominant, gain-of-function mutant produced by truncation of RPGR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:36-41.

【非特許文献20】Zhang Q, et al. (2002) Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. *Human Molecular Genetics* 11:993-1003.

10

【非特許文献21】Zeiss CJ, Acland GM, & Aguirre GD (1999) Retinal pathology of canine X-linked progressive retinal atrophy, the locus homologue of RP3. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40:3292-3304.

【非特許文献22】Beltran WA, Hammond P, Acland GM, & Aguirre GD (2006) A frameshift mutation in RPGR exon ORF15 causes photoreceptor degeneration and inner retina remodeling in a model of X-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1669-1681.

20

【非特許文献23】Wright AF, et al. (2004) Lifespan and mitochondrial control of neurodegeneration. *Nat Genet* 36:1153-1158.

【非特許文献24】Jacobson SG, et al. (2011) Human retinal disease from AIPL1 gene mutations: foveal cone loss with minimal macular photoreceptors and rod function remaining. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:70-79.

30

【非特許文献25】Ayyagari R, et al. (2002) X-linked recessive atrophic macular degeneration from RPGR mutation. *Genomics* 80:166-171.

【非特許文献26】Ebenezer ND, et al. (2005) Identification of novel RPGR ORF15 mutations in Xlinked progressive cone-rod dystrophy (XLCORD) families. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1891-1898.

40

【非特許文献27】Shu X, et al. (2007) RPGR mutation analysis and disease: an update. *Hum Mutat* 28:322-328.

【非特許文献28】Walia S, et al. (2008) Discordant phenotypes in fraternal twins having an identical mutation in exon ORF15 of the RPGR gene. *Arch Ophthalmol* 126:379-384.

【非特許文献29】Ruddle JB, et al. (2009) RPGR ORF15 genotype and clinical variability of retinal degeneration in an Australian pop

50

ulation. Br J Ophthalmol 93:1151-1154.

【非特許文献30】Fahim AT, et al. (2011) Allelic heterogeneity and genetic modifier loci contribute to clinical variation in males with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR mutations. PLoS One 6:e23021.

【非特許文献31】Mowat FM, et al. (2008) Topographical characterization of cone photoreceptors and the area centralis of the canine retina. Mol Vis 14:2518-2527.

10

【非特許文献32】Acland GM, et al. (2005) Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. Mol Ther 12:1072-1082.

【非特許文献33】Khanna H, et al. (2005) RPGR-ORF15, which is mutated in retinitis pigmentosa, associates with SMC1, SMC3, and microtubule transport proteins. J Biol Chem 280:33580-33587.

20

【非特許文献34】Adamian M, Pawlyk BS, Hong DH, & Berson EL (2006) Rod and cone opsin mislocalization in an autopsy eye from a carrier of X-linked retinitis pigmentosa with a Gly436Asp mutation in the RPGR gene. Am J Ophthalmol 142:515-518.

【非特許文献35】Beltran WA, Acland GM, & Aguirre GD (2009) Age-dependent disease expression determines remodeling of the retinal mosaic in carriers of RPGR exon ORF15 mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:3985-3995.

30

【非特許文献36】Aguirre GD, et al. (2002) Retinal histopathology of an XLRP carrier with a mutation in the RPGR exon ORF15. Exp Eye Res 75:431-443.

【非特許文献37】Li ZY, Kljavin IJ, & Milam AH (1995) Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. J Neurosci 15:5429-5438.

40

【非特許文献38】Geiger K, et al. (1994) Transgenic mice expressing IFN-gamma in the retina develop inflammation of the eye and photoreceptor loss. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2667-2681.

【非特許文献39】Jacobson SG & Cideciyan AV (2010) Treatment possibilities for retinitis pigmentosa. N Engl J Med 363:1669-1671.

【非特許文献40】Wright AF & Shu X (2007) Focus on Molecules: RPGR. Exp Eye Res 85:1-2.

50

【非特許文献41】Simons DL, Boye SL, Hauswirth WW, & Wu SM (2011) Gene therapy prevents photo receptor death and preserves retinal function in a Bardet-Biedl syndrome mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:6276-6281.

【非特許文献42】Guyon R, Pearce-Kelling SE, Zeiss CJ, Acland GM, & Aguirre GD (2007) Analysis of six candidate genes as potential modifiers of disease expression in canine X 10
LPR A1, a model for human X-linked retinitis pigmentosa 3. *Mol Vis* 13:1094-1105.

【非特許文献43】Demirci FY, et al. (2002) X-linked cone-rod dystrophy (locus COD1): identification of mutations in RPGR exon ORF15. *Am J Hum Genet* 70:1049-1053.

【非特許文献44】Yang Z, et al. (2002) Mutations in the RPGR gene cause X-linked cone dystrophy. *Hum Mol Genet* 11:605-611.

【非特許文献45】Demirci FY, et al. (2005) Histopathologic study of X-linked cone-rod dystrophy (CORDX1) caused by a mutation in the RPGR exon ORF15. *Am J Ophthalmol* 139:386-388. 20

【非特許文献46】Alexander JJ, et al. (2007) Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med* 13:685-687.

【非特許文献47】Komaromy AM, et al. (2010) Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum Mol Genet* 19:2581-2593. 30

【非特許文献48】Michalakis S, et al. (2010) Restoration of cone vision in the CNGA3-/- mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function. *Mol Ther* 18:2057-2063.

【非特許文献49】Carvalho LS, et al. (2011) Long-term and age-dependent restoration of visual function in a mouse model of CNGB3-associated achromatopsia following gene therapy. *Hum Mol Genet* 20:3161-3175. 40

【非特許文献50】Jacobson SG, et al. (2011) Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by RPE65 Mutations: Safety and Efficacy in 15 Children and Adults Followed Up to 3 Years. *Arch Ophthalmol* E published ahead of print.

【非特許文献51】Petrus-Silva H, et al. (2011) Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol Ther* 19:293- 50

301.

【非特許文献52】He S, et al. (2008) Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) protein isoforms in mammalian retina: insights into X-linked Retinitis Pigmentosa and associated ciliopathies. *Vision Res* 48:366-376.

【非特許文献53】Murga-Zamalloa CA, Desai NJ, Hildebrandt F, & Khanna H (2010) Interaction of ciliary disease protein retinitis pigmentosa GTPase regulator with nephronophth

10

10 isis-associated proteins in mammalian retinas. *Mol Vis* 16:1373-1381.

【非特許文献54】Shu X, et al. (2005) RPGR ORF15 isoform co-localizes with RPGRIP1 at centrioles and basal bodies and interacts with nucleophosmin. *Hum Mol Genet* 14:1183-1197.

20

【非特許文献55】Murga-Zamalloa CA, Atkins SJ, Peranen J, Swaroop A, & Khanna H (2010) Interaction of retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) with RAB8A GTPase: implications for cilia dysfunction and photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet* 19:3591-3598.

【非特許文献56】Ghosh AK, et al. (2010) Human retinopathy-associated ciliary protein Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator mediates cilia-dependent vertebrate development. *Hum Mol Genet* 19:90-98.

30

【非特許文献57】Porrello K, Bhat SP, & Bok D (1991) Detection of interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) mRNA in human and cone-dominant squirrel retinas by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 39:171-176.

【非特許文献58】Alfinito PD & Townes-Anderson E (2002) Activation of mislocalized opsin kills rod cells: a novel mechanism for rod cell death in retinal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5655-5660.

40

【非特許文献59】Zhang T, Zhang N, Baehr W, & Fu Y (2011) Cone opsin determines the time course of cone photoreceptor degeneration in Leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8879-8884.

【非特許文献60】Jacobson SG, et al. (2009) Disease boundaries in the retina of patients with Usher syndrome caused by MYO7A gene mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:1886-1894.

50

【非特許文献61】Jacobson SG, et al. (2008) Photoreceptor layer topography in children with leber congenital amaurosis caused by RP E65 mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 49: 4573 - 4577.

【非特許文献62】Beltran WA, et al. (2010) rAAV2/5 gene-targeting to rods: dose-dependent efficiency and complications associated with different promoters. Gene Ther 17: 1162 - 1174.

10

【非特許文献63】Zhang Q, et al. (2002) Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. Human Molecular Genetics 11: 993 - 1003.

【非特許文献64】Hong DH, Pawlyk BS, Adamian M, Sandberg MA, & Li T (2005) A single, abbreviated RPGR-ORF15 variant reconstitutes RPGR function in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci 46: 435 - 441.

20

【非特許文献65】Beltran WA, et al. (2010) rAAV2/5 gene-targeting to rods: dose-dependent efficiency and complications associated with different promoters. Gene Ther 17: 1162 - 1174.

【非特許文献66】Hong and Li, Invest Ophthalmology Vis Sci, 43(11): 3373 - 82.

【非特許文献67】Vervoort and Wright, Hum Mutat. 2002 May, 19(5): 486 - 500.

【非特許文献68】Neidhardt et al, Hum Mutat. 2007, 28(8): 797 - 807.

30

【非特許文献69】Kozak et al, Nucleic Acids Res. 15(20): 8125 - 8148.

【非特許文献70】Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

【非特許文献71】K. Fisher et al, 1993 J. Virol., 70: 520 - 532

【非特許文献72】L. Wang and I. Verma, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96: 3906 - 3910.

40

【非特許文献73】Shu et al, IOVS, May 2102

【非特許文献74】Mussolino et al, Gene Ther, July 2011, 18(7): 637 - 45

【非特許文献75】Morrissey et al, BMC Dev Biol, Jan 2011, 11: 3)

【非特許文献76】Nicord et al, J. Gene Med, Dec 2007, 9(12): 1015 - 23

【非特許文献77】Lambard et al, PLoS One, Oct. 2010, 5(10): e13025

【非特許文献78】Cai et al, Exp Eye Res. 2010 Aug;

50

91(2):186-94

【非特許文献79】Kachi et al, Human Gene Therapy, 2009(20:31-9

【非特許文献80】Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989

【非特許文献81】S.K. McLaughlin et al, 1988 J. Virol., 62:1963

【非特許文献82】Sieving, P.A. et al, 2006. Proc Natl Acad Sci U S A 103(10):3896-3901.

【非特許文献83】al-Ubaidi MR, et al. (1992), J Cell Biol 119:1681-1687

【非特許文献84】Boatright JH, et al. (1997) Mol Vis 3:15

【非特許文献85】Zolotukhin S, et al. (1999) Gene Ther 6:973-985

【非特許文献86】Kijas JW, et al. (2002) Proc Natl Acad Sci U S A 99:6328-6333

【非特許文献87】Beltran WA, et al, (2012 Jan) Proc Natl Acad Sci USA, 109(6):2132-7 (Beltran 2012)

【非特許文献88】Weiss, E.R. et al, 2001. J Neurosci 21(23):9175-9184

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

一つの態様では、本発明は個体の網膜色素変性に伴う視覚喪失を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。この方法は、正常RPGR遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞(ocular cells)に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つ組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含む。

【0008】

別の態様では、光受容体機能の喪失を防ぎ、進行を阻止し、または光受容体機能を上げることが必要な個体の光受容体機能の喪失を防ぎ、進行を阻止し、または光受容体機能を上げる方法が提供される。この方法は、正常RPGR遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つrAAV、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ/または改善される。

【0009】

別の態様では、本発明は光受容体構造の向上が必要な個体の光受容体構造を向上する方法を提供する。本発明は、正常RPGR遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つrAAV、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ/または改善される。

【0010】

さらに別の態様では、個体の外網状層(OPL)異常を防ぎ、その進行を阻止し、また

10

20

30

40

50

は改善することが必要な個体の外網状層（O P L）異常を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法が提供される。この方法は、正常R P G R遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つr A A V、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ／または改善される。

【0011】

別の態様では、本発明は双極細胞のデンドライト収縮を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体の双極細胞のデンドライト収縮を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。この方法は正常R P G R遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つr A A V、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ／または改善される。

10

【0012】

別の態様では、双極細胞機能の喪失を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体の双極細胞機能の喪失を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法が提供される。この方法は、正常R P G R遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つr A A V、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を該個体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ／または改善される。

20

【0013】

さらに別の態様では、本発明はニューロフィラメントの過剰発現により特徴付けられる軸索損傷を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体のニューロフィラメントの過剰発現により特徴付けられる軸索損傷を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。この方法は、正常R P G R遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つr A A V、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ／または改善される。

30

【0014】

別の態様では、X L R Pを発症する危険性がある個体のX L R Pを防ぐ方法が提供される。この方法は、正常R P G R遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つr A A V、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含む。

【0015】

さらに別の態様では、本発明は桿体（r o d）および／またはR / G錐体（c o n e）オプシンの誤局在化を防ぎ、阻止し、または改善することが必要な個体の桿体および／またはR / G錐体オプシンの誤局在化（m i s l o c a l i z a t i o n）を防ぎ、阻止し、または改善する方法を提供する。この方法は、正常R P G R遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つr A A V、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ／または改善される。

40

【0016】

別の態様では、本発明はX連鎖性網膜色素変性症（X L R P）に伴うO P Lシナプス変化、双極細胞異常または内網膜異常を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体のX連鎖性網膜色素変性症に関連するO P Lシナプス変化、双極細胞異常または内網膜異常を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。この方法は、正

50

常 R P G R 遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つ r A A V、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ/または改善される。

【 0 0 1 7 】

さらに別の態様では、本発明は X L R P に伴う O N L 厚の増加、または保存が必要な個体の X L R P に伴う O N L 厚の増加、または保存方法を提供する。この方法は、正常 R P G R 遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つ r A A V、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を該個体に投与することを含む。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ/または改善される。

10

【 0 0 1 8 】

別の態様では、X L R P を処置または防ぐ必要がある個体の X L R P を処置または防ぐ方法が提供される。この方法は、(a) X L R P に罹患しているか、またはそれを発症する危険性がある個体を同定し；(b) 遺伝子型分析を行い、そして R P G R 遺伝子の突然変異を同定し；(c) 非侵襲的網膜撮像および機能試験を行い、そして治療の標的にできる保持されている光受容体の領域を同定し；そして(d) 正常光受容細胞 (p h o t o r e c e p t o r c e l l s) 特異的遺伝子をコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に該遺伝子産物を発現するプロモーター配列の制御下に持つ組換えウイルス、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効濃度を個体に投与することを含み、これにより X L R P を防ぎ、進行を阻止し、または改善する。

20

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は正常 R P G R 遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つ組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V)、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物を提供する。

【 0 0 2 0 】

別の態様では、本発明は正常 R P G R 遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物の発現を向けるヒト I R B P またはヒト G R K 1 プロモーターの制御下に持つ組換え A A V 2 / 5 偽型アデノ随伴ウイルスを、担体および注入に適する追加成分と配合して含む組成物を提供する。別の態様では、上記の任意の方法はこの組成物を使用する。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】h I R P B プロモーター (配列番号 : 2) および h R P G R 1 - O R F 1 5 遺伝子を包含する A A V 2 / 5 ベクターのプラスミドマップである。このプラスミド中の I R B P プロモーターは、ヒト I R B P 遺伝子の近位プロモーター領域の 2 4 1 b p フラグメントである。

【図 2】h G R K 1 プロモーター (配列番号 : 3) および h R P G R 1 - O R F 1 5 遺伝子を包含する A A V 2 / 5 ベクターのプラスミドマップである。

40

【図 3】ヒト R P G R バリエント配列番号 : 1 (下) をコードする核酸配列、およびバリエント B K 0 0 5 7 1 1 (W r i g h t) 配列番号 : 4 (上) をコードする核酸配列のアライメントである。

【図 4】ヒト R P G R バリエント配列番号 : 5 (上) のアミノ酸配列およびバリエント B K 0 0 5 7 1 1 (W r i g h t) 配列番号 : 6 (下) のアミノ酸配列のアライメントである。

【図 5】配列番号 : 5 の h R P G R バリエントのアミノ酸残基 a a 8 4 5 - 1 0 3 9 と、配列番号 : 5 のバリエント B K 0 0 5 7 1 1 のアミノ酸残基 8 4 5 - 1 0 5 2 と、そしてさらにコンセンサス配列配列番号 : 7 を形成する共通のアミノ酸とのアライメントを示す。アライメント中のコンセンサス配列は、非コンセンサスアミノ酸の位置にギャップを含

50

んで現れる。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

本発明は、正常 R P G R 遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物の発現を向ける調節配列の制御下に持つ有効濃度の組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) を、担体および注入に適する追加成分と配合して含んでなる種々の組成物およびそれを使用した処置法に関する。処置法は、目の障害およびそれに関連する付随状態を対象とする。

【0023】

他に定義しない限り、本明細書で使用する技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者に一般に理解され、そして本出願で使用する多くの用語に対する一般的指針を当業者に与える公開されている教科書を参照にすることにより、一般に理解されている意味と同じ意味を有する。以下の定義は明瞭性のためにのみ提供し、請求する発明を限定することを意図していない。

【0024】

用語 “ a ” または “ a n ” は、1もしくは複数を指し、例えば「遺伝子 (a g e n e) 」は、1もしくは複数のそのような遺伝子を表すと理解される。このように用語 “ a ” (または “ a n ”) 、 「 1 もしくは複数 」 、 および 「 少なくとも一つ 」 は本明細書では互換的に使用されている。本明細書で使用する用語「約」は、他に特定しない限り、与えた引例から 10 % の変動を意味する。以下の記載に関して、本明細書に記載する各組成物は、本発明の方法の別の態様で有用であることを意図している。さらにまた、本明細書のこの方法に有用と記載された各組成物は、別の態様では、それ自体が本発明の態様である。本明細書の様々な態様は、「含んでなる」という言葉を使用して表現されているが、他の状況では関連する態様が「からなる」または「から本質的になる」という言葉を使用して解釈され、そして記載されることも意図している。

【0025】

A . 哺乳動物個体

本明細書で使用する用語「哺乳動物個体」または「個体」には、特にヒトを含めこのような処置または予防の方法が必要な任意の哺乳動物を含む。そのような処置または予防が必要な他の哺乳動物には、イヌ、ネコまたは他の飼育動物、ウマ、家畜、ヒトではない霊長類を含む実験動物等がある。個体は雄または雌でよい。一つの態様では、個体は R P 、そしてより特別には X L R P を罹患しているか、または発症する危険性がある。別の態様では、個体は X L R P の「キャリアー」であり、すなわち少なくとも一つの X 染色体に少なくとも一つの R P G R 突然変異を有する。X L R P は X 連鎖性疾患であるので、通常は二つの X 染色体を有する雌は R P G R 遺伝子の特異的な突然変異について同型接合体または異型接合体であるか、または各 X 染色体上の R P G R 遺伝子に異なる突然変異を有する複合異型接合体であり得る。R P G R 遺伝子に一つの突然変異を含む唯一の X 染色体を有する正常な雄は半接合体と呼ばれる。一つの態様では、X L R P に罹患しているか、またはそれを発症する危険性がある個体は半接合体の雄である。別の態様では、X L R P を罹患しているか、またはそれを発症する危険性がある個体は、同型接合体の雌または異型接合体の雌である。別の態様では X L R P を発症する危険性がある個体には X L R P の家族歴を有する個体、R P G R 遺伝子に 1 もしくは複数の確認されている突然変異を有する個体、R P G R 突然変異の雌のキャリアー (異型接合体の雌) の子孫、または両 X 染色体上に R P G R 突然変異を持つ雌の子孫を含む。

【0026】

別の態様では、個体は X L R P の臨床的兆候を有する。X L R P の臨床的兆候には、限定するわけではないが、周辺視覚の低下、中心 (読み取り) 視覚の低下、夜間視覚の低下、色覚の喪失、視力低下、光受容体機能の低下、色素変化を含む。さらに別の態様では、個体はすでに X L R P と診断されている。別の態様では個体は X L R P の臨床的兆候を未

10

20

30

40

50

だ示していない。

【 0 0 2 7 】

さらに別の態様では、個体は 1 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。別の態様では、個体は 2 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。別の態様では、個体は 3 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。別の態様では、個体は 4 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。別の態様では、個体は 5 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。別の態様では、個体は 6 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。別の態様では、個体は 7 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。別の態様では、個体は 8 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。別の態様では、個体は 9 0 % 以上の光受容体傷害 / 喪失を有する。

【 0 0 2 8 】

B . X L R P および R P G R

一つの態様では、本明細書に記載する方法は網膜色素変性症 (R P) の処置または防止に関する。一態様では網膜色素変性症は、X連鎖性網膜色素変性症 (X L R P) である。X L R P は R P の最も重篤な形態の一つであり、若年での発症 (通常、1 0 歳以内)、そして疾患の急速な進行を示す。この疾患はX連鎖性なので、同型接合体の雌は稀であり、通常は小さな隔離集団で現れるだけである。すなわちこの疾患は主に雄に発症するが、キャリアー (異型接合体) の雌にも発症し、様々なレベルの網膜変性を表す。この疾患は家族間および内で広いスペクトラムの疾患重篤度を表す。

【 0 0 2 9 】

網膜色素変性 G T P a s e 調節物質 (R P G R) は X L R P に関与する 8 1 5 a a タンパク質である (非特許文献 7 および非特許文献 1 2、これらは引用により本明細書に編入する)。R P G R 中の 2 9 0 より多い突然変異 (<http://rpgr.hgu.mrc.ac.uk/supplementary/>、および「R P G R 突然変異および多型の要約」という表題の文書、これは引用により本明細書に編入する) が X L R P 患者の 7 0 % より多くを占める。このタンパク質は、高度に保存されたグアニンヌクレオチド交換因子の特徴である R C C - 1 様ドメインを含む。1 9 エキソンを含む R P G R の構成的転写物は、広範な組織で発現される (非特許文献 6 6、引用により本明細書に編入する)。R P G R バリエントは R P G R 遺伝子のイントロン 1 5 で終結する。別の末端エキソンは構成的エキソン 1 5 およびイントロン 1 5 の一部からなり、そして O R F 1 5 と呼ばれている。エキソン 1 から O R F 1 5 によりコードされているこのタンパク質アイソフォームが一般的に光受容体で使用され、そして多数の疾患を生じる突然変異が O R F 1 5 中に見出された (非特許文献 6 7、非特許文献 3 6 および非特許文献 6 8、それぞれ引用により本明細書に編入する)。

【 0 0 3 0 】

一つの態様では、この方法は正常 R P G R 遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を使用する。本明細書で使用する用語「R P G R」は、以下に詳細に記載するように、完全長の遺伝子自体、または機能的フラグメントを称する。正常 R P G R 遺伝子をコードする核酸配列は、自然に R P G R 遺伝子またはその相同体を発現する任意の哺乳動物に由来することができる。別の態様では、R P G R 遺伝子配列は、組成物が処置することを意図する同じ哺乳動物に由来する。別の態様では、R P G R はヒトに由来する。別の態様では、R P G R 配列はエキソン 1 から O R F 1 5 を含む完全長のヒト R P G R O R F 1 5 クローンの配列である (非特許文献 1 2、引用により本明細書に編入する)。別の態様では、R P G R 配列は配列番号 1 に示す配列である。別の態様では R P G R 配列は R P G R O R F 1 5 クローンの機能的フラグメントである。用語「フラグメント」または「機能的フラグメント」とは、必ずしも同じレベルの発現または活性ではないが、完全長クローンの機能を保持する任意のフラグメントを意味する。例えば R P G R - O R F 1 5 を表すが、反復領域が 6 5 4 b p 短縮された a c D N A は、マウスで R P G R 機能を再構成することが示されている (非特許文献 6 4、これは引用により本明細書に編入する)。ヒトの同様な機能的フラグメント、または他の R P G R 配列は、当業者により決定され得る。別の態様では、R P G R はイヌに由来する。別の態様では、標的細胞中での発現を強化す

10

20

30

40

50

るために、特定の修飾が R P G R 配列に作成される。そのような修飾にはコドン最適化（例えば引用により本明細書に編入する特許文献 1、2 および 3 を参照にされたい）、および翻訳開始部位を囲む配列のコンセンサス K o z a k 配列：g c c R c c A T G R への転換がある。例えば非特許文献 6 9 を参照にされたい。

【0031】

本明細書で使用する用語「眼球細胞」とは目の中の、または目の機能に関連する任意の細胞を称する。この用語は、桿体、錐体および光感受性ガングリオン細胞または網膜色素上皮（R P E）細胞を含む任意の光受容細胞を指すことができる。一つの態様では、眼球細胞は光受容細胞である。

【0032】

C . A A V ベクターおよび組成物

本発明の特定の態様では、R P G R 核酸配列、またはそのフラグメントがウイルスベクターによる処置が必要な眼球細胞に送達され、そのベクターの多くは当該技術分野で知られており、そして利用可能である。眼球細胞への送達には、治療用ベクターは非毒性、非免疫原性で、産生し易く、しかも D N A の保護と標的細胞への送達が効率的であることが望ましい。一つの特定の態様では、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルスベクターである。別の態様では、本発明は R P G R 配列を適切なプロモーターの制御下に含んでなるアデノ随伴ウイルスベクターを含んでなる治療用組成物を提供する。一つの態様では、R P G R 配列は配列番号 1 によりコードされる。

【0033】

30 種より多くの自然に存在する A A V の血清型を利用することができる。A A V キャプシド中に多くの天然のバリエーションが存在し、眼球細胞に特に適する特性を持つ A A V の同定および使用が可能になる。A A V ウイルスは通常分子生物学的技法により操作することができ、免疫原性を最少とし、粒子の安定性および寿命を調整し（t u n i n g）、効率的に分解し、核への正確な送達などのために、これらの粒子を R P G R 核酸配列の細胞特異的送達に最適化することが可能である。

【0034】

このように R P G R の過剰発現は、R P G R をコードする配列を含む組換え操作した A A V または人工 A A V による送達を介して眼球細胞で達成することができる。A A V は比較的非毒性であり、効率的な遺伝子導入を提供し、そして具体的な目的に容易に最適化できるので、A A V の使用は D N A の外因性送達の一般的様式である。ヒトまたはヒトではない霊長類（N H P）から単離され、そして十分に特性決定された A A V の血清型の中で、ヒト血清型 2 は遺伝子導入ベクターとして開発された最初の A A V であり、これは種々の標的組織および動物モデルで効率的な遺伝子導入実験に広く使用されてきた。幾つかのヒトの疾患モデルに対して、A A V 2 に基づくベクターの実験的応用の臨床試験が進行中であり、そしてそれには嚢胞性線維症および血友病 B のような疾患を含む。他の A A V 血清型には限定するわけではないが、A A V 1、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8 および A A V 9 がある。例えば引用により本明細書に編入する特許文献 4 を参照にされたい。

【0035】

ベクターに集成するために望ましい A A V フラグメントには、v p 1、v p 2、v p 3 および高度可変領域を含む c a p タンパク質、r e p 7 8、r e p 6 8、r e p 5 2 および r e p 4 0 を含む r e p タンパク質、およびこれらのタンパク質をコードする配列を含む。これらのフラグメントは、様々なベクター系および宿主細胞で容易に利用することができる。そのようなフラグメントは単独で、他の A A V 血清型配列またはフラグメントと組み合わせて、または他の A A V または非 A A V ウイルス配列由来の要素と組み合わせて使用することができる。本明細書で使用する人工 A A V 血清型には、限定せずに自然には存在しないキャプシドタンパク質を持つ A A V がある。そのような人工キャプシドは、選択した A A V 配列（例えば v p 1 キャプシドタンパク質のフラグメント）を、異なる選択した A A V 血清型から、同じ A A V 血清型の非連続部分から、非 - A A V ウイルス源から

、または非・ウイルス源から得ることができるヘテロロガス配列と組み合わせて使用して任意の適切な技法により作成することができる。人工 AAV 血清型は、限定するわけではないが、偽型 AAV、キメラ AAV キャプシド、組換え AAV キャプシド、または「ヒト化」 AAV キャプシドでよい。一つの AAV のキャプシドがヘテロロガスなキャプシドタンパク質に置き換えられた偽型ベクターは、本発明に有用である。説明の目的で、AAV 2/5 が以下に記載する実施例では使用される。好適な態様では、AAV は AAV 2/5 である。別の好適な態様では、AAV は AAV 2/8 である。例えば上で引用した *Mussolino et al.* を参照にされたい。

【0036】

一つの態様では、本明細書に記載する組成物および方法に有用なベクターは、最低でも選択した AAV 血清型のキャプシド、例えば AAV 5 キャプシドまたはそのフラグメントをコードする配列を含む。別の態様では、有用ベクターは最低でも選択した AAV 血清型 *rep* タンパク質、例えば AAV 5 *rep* タンパク質またはそのフラグメントをコードする配列を含む。場合によりそのようなベクターは AAV *cap* および *rep* タンパク質の両方を含むことができる。AAV *rep* および *cap* の両方が与えられたベクターでは、AAV *rep* および *cap* 配列が両方とも一つの血清型起源、例えば全て AAV 5 起源であることができる。あるいは *rep* 配列が *cap* 配列を提供するものとは異なる AAV 血清型に由来するベクターを使用することができる。一つの態様では、*rep* および *cap* 配列は別の起源から発現される（例えば別のベクター、または宿主細胞およびベクター）。別の態様ではこれらの *rep* 配列は異なる AAV 血清型の *cap* 配列とインフレイムに融合されてキメラ AAV ベクター、例えば特許文献 5（引用により本明細書に編入する）に記載されている AAV 2/8 を形成する。

【0037】

適切な組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）は、本明細書で定義するアデノ随伴ウイルス（AAV）の血清型キャプシドタンパク質、またはそのフラグメントをコードする核酸配列；機能的 *rep* 遺伝子；最低でも AAV 逆方向末端反復（ITR）および RPR 核酸配列からなるミニ遺伝子；およびミニ遺伝子を AAV キャプシドタンパク質にパッケージングできるようにする十分なヘルパー機能を含む宿主細胞を培養することにより産生される。AAV ミニ遺伝子を AAV キャプシドにパッケージングするために、宿主細胞中で培養されるために必要な成分は、宿主細胞にトランスで提供することができる。あるいは 1 もしくは複数の必要な成分（例えばミニ遺伝子、*rep* 配列、*cap* 配列、および/またはヘルパー機能）は、当該技術分野で知られている方法を使用して 1 もしくは複数の必要な成分を含むように操作した安定な宿主細胞により提供することができる。

【0038】

そのような安定な宿主細胞は、必要な構成要素（1 もしくは複数）を誘導性プロモーターの制御下を含むことが最適である。しかし必要な構成要素（1 もしくは複数）は構成的プロモーターの制御下でもよい。適切な誘導性および構成的プロモーターの例は、導入遺伝子、すなわち RPR と使用するために適する調節要素についての以下の考察で本明細書に提供される。さらに別の方法では、選択した安定な宿主細胞は選択した構成要素（1 もしくは複数）を構成的プロモーターの制御下に、そして他の選択した構成要素（1 もしくは複数）を 1 もしくは複数の誘導性プロモーターの制御下を含むことができる。例えば 293 細胞（これは構成的プロモーターの制御下に E1 ヘルパー機能を含む）に由来する安定な宿主細胞を作成することができるが、これは *rep* および/または *cap* タンパク質を誘導性プロモーターの制御下を含む。さらに他の安定な宿主細胞が当業者により作成され得る。

【0039】

本発明の rAAV を産生するために必要なミニ遺伝子、*rep* 配列、*cap* 配列およびヘルパー機能は、遺伝子要素上の配列を導入する任意の遺伝子要素の形態でパッケージング宿主細胞に送達することができる。選択された遺伝要素は本明細書に記載されているような方法を含め、任意の適切な方法により送達され得る。本発明の態様を構築するために

使用する方法は、核酸の操作における当業者には知られており、そして遺伝子工学、組換え工学および合成技術を含む。例えば非特許文献70を参照にされたい。同様にrAAVビリオンを生産する方法も周知であり、そして適切な方法の選択は本発明を限定しない。例えばとりわけ非特許文献71、および特許文献6を参照にされたい。これらの公報は引用により本明細書に編入する。

【0040】

特に明記しない限り、本明細書に記載するAAV ITRおよび他の選択したAAV構成要素は、限定するわけではないが、AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9または他の既知の、および未知のAAV血清型を含む任意のAAV血清型の中から容易に選択することができる。これらのITRまたは他のAAV構成要素は、当業者が利用可能な技術を使用してAAV血清型の中から容易に単離することができる。そのようなAAVは単離でき、あるいは学術的、商業的または公的な供給源（例えばバージニア州、マナッサスのアメリカンタイプカルチャーコレクション）から得ることができる。あるいはAAV配列は、例えば文献またはGeneBank, PubMed等のようなデータベースのような公開された配列を参照することにより、合成または他の適切な手段を介して得ることができる。

10

【0041】

ミニ遺伝子は、最低でも上記のRPGR核酸配列（導入遺伝子）、およびその調節配列、および5'および3' AAV逆方向末端反復（ITR）からなる。一つの望ましい態様では、AAV血清型2のITRが使用される。しかし他の適切な血清型由来のITRも選択することができる。キャプシドタンパク質にパッケージングされ、そして選択した宿主細胞に送達されるのはこのミニ遺伝子である。

20

【0042】

調節配列には、本発明で産生したベクターでトランスフェクトした細胞、またはウイルスで感染した細胞中で転写、翻訳および/または発現を可能とする様式で、RPGR遺伝子に操作可能に連結される通例の制御要素を含む。本明細書で使用する「操作可能に連結される」配列には、目的遺伝子に連続する発現制御配列、およびトランスに作用するか、または目的遺伝子の制御から離れた発現制御配列の両方を含む。

【0043】

発現制御配列は、適切な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニレーション（poly A）シグナルのような効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を強化する配列（すなわちKozakコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を強化する配列；および所望により、コードされた産物の分泌を強化する配列を含む。プロモーターを含む膨大な数の発現制御配列が当該技術分野で知られており、そして利用することができる。

30

【0044】

本発明の構築物に有用な調節配列は、望ましくはプロモーター/エンハンサー配列と遺伝子との間に配置されたイントロンを含むことができる。一つの望ましいイントロン配列は、SV-40に由来し、そしてSD-SAと呼ばれている100bpのミニ-イントロンスプライドナー/スプライスアクセプターである。別の適切な配列にはウッドチャック肝炎ウイルス転写後要素（例えば非特許文献72を参照にされたい）がある。Poly Aシグナルは限定するわけではないが、SV-40、ヒトおよびウシを含む多くの適切な種に由来することができる。

40

【0045】

本発明の方法で有用なrAAVの別の調節構成要素は、内部リボソーム侵入部位（IRES）である。IRES配列または他の適切な系を、一つの遺伝子転写産物から1より多くのポリペプチドを産生するために使用することができる。1より多くのポリペプチド鎖を含むタンパク質を産生するために、あるいは同じ細胞から、またはその中に二つの異なるタンパク質を発現するために、IRES（または他の適切な配列）を使用する。一例のIRESはポリオウイルス内部リボソーム侵入部位配列であり、これは光受容体、RPE

50

およびガングリオン細胞での導入遺伝子発現を支持する。好ましくはI R E Sはr A A Vベクター中の導入遺伝子の3'に位置する。

【0046】

r A A V中で使用されることになるプロモーターの選択は、選択した導入遺伝子を所望する眼球細胞内に発現できる広範な数の構成的または誘導性プロモーターの中から行うことができる。別の態様では、プロモーターは細胞 - 特異的である。用語「細胞 - 特異的」とは、組換えベクター用に選択された特定のプロモーターが、選択した導入遺伝子の発現を特定の眼球細胞型の中へ向けることができることを意味する。一つの態様では、プロモーターは光受容細胞中での導入遺伝子の発現に特異的である。別の態様では、プロモーターは桿体細胞および錐体細胞中での発現に特異的である。別の態様では、プロモーターは桿体細胞中での発現に特異的である。別の態様では、プロモーターは錐体細胞中での発現に特異的である。別の態様では、プロモーターはR P E細胞中で導入遺伝子の発現に特異的である。別の態様では、導入遺伝子は任意の上記眼球細胞内で発現される。

【0047】

プロモーターは任意の種に由来することができる。別の態様では、プロモーターはヒトG - タンパク質共役受容体プロテインキナーゼ1 (G R K 1) プロモーター (G e n e b a n k 寄託番号 A Y 3 2 7 5 8 0) である。別の態様では、プロモーターはG R K 1 プロモーター (配列番号 : 2) の292 n t フラグメント (1 7 9 3 2 0 8 7 位) である (また非特許文献62も参照にされたい。これは引用により本明細書に編入する) 。別の好適な態様では、プロモーターはヒト光受容体間レチノイド - 結合タンパク質近位 (I R B P) プロモーターである。一つの態様ではプロモーターはh I R B P プロモーター (配列番号 : 3) の235 n t フラグメントである。別の態様では、プロモーターは発現される遺伝子に自然なプロモーターである。一つの態様では、プロモーターはR P G R 近位プロモーターである (非特許文献73、これは引用により本明細書に編入する) 。本発明に有用な他のプロモーターには、限定するわけではないが、桿体オブシンプロモーター、赤 - 緑オブシンプロモーター、青オブシンプロモーター、c G M P - ホスホジエステラーゼプロモーター、マウスオブシンプロモーター (上記で引用した非特許文献62) 、ロドプシンプロモーター (非特許文献74) ; 錐体トランスデュシンのアルファ - サブユニット (非特許文献75) ; ベータ ホスホジエステラーゼ (P D E) プロモーター ; 網膜色素変性 (R P 1) プロモーター (非特許文献76) ; N X N L 2 / N X N L 1 プロモーター (非特許文献77) ; R P E 6 5 プロモーター ; 網膜変性スロー / ペリフェリン2 (R d s / p e r p h 2) プロモーター (非特許文献78) ; およびV M D 2 プロモーター (非特許文献79) がある。これらの文書は引用により本明細書に編入する。一つの態様では、プロモーターはA A Vベクターのサイズ限界から、1000 b p 未満の小サイズのものである。別の態様では、プロモーターは400 b p 未満である。

【0048】

本発明に有用な構成的プロモーターの例には、限定するわけではないが、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス (R S V) L T R プロモーター (場合によりR S V エンハンサーを含む) 、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーター (場合によりC M V エンハンサーを含む) 、S V 4 0 プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ニワトリアクチン (C B A) プロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ (P G K) プロモーター、E F 1 プロモーター (I n v i t r o g e n) 、およびC B A プロモーターと共役する前初期C M V エンハンサー (上に引用した非特許文献62, 65) がある。

【0049】

誘導性プロモーターは遺伝子発現の調節を可能とし、そして外から供給される化合物、温度のような環境因子、または特異的な生理学的状態の存在、例えば急性期、細胞の特定の分化状態、または複製している細胞のみにより調節され得る。誘導性プロモーターおよび誘導性の系は、限定するわけではないが、I n v i t r o g e n 、C l o n t e c h およびA r i a d を含む様々な商業的供給元から入手できる。多くの他の系が記載され、そして当業者により容易に選択され得る。外から供給される化合物により調節される誘導性

10

20

30

40

50

プロモーターの例には、亜鉛 - 誘導性ヒツジメタロチオネイン (MT) プロモーター、デキサメタゾン (Dex) - 誘導性マウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系；エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン - 抑制系、テトラサイクリン - 誘導系、RU486 - 誘導系およびラパマイシン - 誘導系がある。本内容で有用となり得る他の種類の誘導性プロモーターは、特異的な生理学的状態、例えば温度、急性期、細胞の特定の分化状態、または複製している細胞のみにより調節されるものである。厳しく調節され、しかも特定の標的眼球細胞型に特異的な任意の種類の誘導性プロモーターを使用することができる。

【0050】

本発明に有用な他の調節配列は、エンハンサー配列を含む。本発明に有用なエンハンサー配列には、IRBPエンハンサー（上に引用した非特許文献76）、前初期サイトメガロウイルスエンハンサー、免疫グロブリン遺伝子に由来するもの、またはSV40エンハンサー、マウス近位プロモーターに同定されるシス 作用要素 (cis-acting element) などを含む。

【0051】

これらおよび他の一般的ベクターおよび調節要素の選択は通例であり、そして多くのそのような配列を利用することができる。例えば非特許文献70およびその中に引用されている文献、例えば第3.18-3.26および16.17-16.27ページ、および非特許文献80を参照にされたい。もちろん全てのベクターおよび発現制御配列が本発明の全ての導入遺伝子を等しく良好に発現するように機能するわけではない。しかし当業者は本発明の範囲から逸脱せずに、これらの、そして他の発現制御配列の中から選択を行うことができる。

【0052】

D. 製薬学組成物および投与

上記のように、標的眼球細胞で使用するために所望の導入遺伝子および細胞 特異的プロモーターを含む組換えAAVは、通例の方法によりコンタミネーションを評価し、次いで網膜下注入を意図する製薬学的組成物に配合することが好ましい。そのような製剤には製薬学的および/または生理学的に許容され得る賦形剤または担体、生理食塩水または他のバッファーのような特に例えば網膜下注入により目に投与することが適するもの、例えば適切な生理学的レベルでpHを維持するためにHEPES、および任意に他の薬剤、医薬品、安定化剤、バッファー、担体、補助剤、希釈剤等の使用が関与する。注入には、担体は典型的には液体になる。例示的な生理学的に許容され得る担体には、滅菌された、発熱物質を含まない水、および滅菌された、発熱物質を含まないリン酸緩衝生理食塩水がある。そのような様々な既知の担体が、引用により本明細書に編入する特許文献7に与えられている。一つの態様では、担体は生理食塩水である。別の態様では、担体は緩衝塩溶液である。一つの態様では、担体はtweenを含む。ウイルスが長期間、保存されることになるならば、グリセロールまたはTween20の存在下で凍結してもよい。

【0053】

本発明の方法の特定の態様では、上記の製薬学的組成物は網膜下注入により個体に投与される。送達の経路としての網膜下注入の使用は、硝子体内の投与が現在、同じ治療効果を可能にできないので、本方法の重要な構成要素となる。

【0054】

さらに本発明の特定の態様では、治療の標的となるべき保持されている光受容体の領域を同定するために、非侵襲的な網膜撮像および機能的実験を行うことが望ましい。このような態様では、臨床的な診断試験が採用されて、1もしくは複数の網膜下注入に関する正確な位置（1もしくは複数）を決定する。これらの試験には網膜電図法 (ERG)、視野測定法、網膜の層のトポグラフィカルマッピング (topographical mapping) そして共焦点走査型レーザー検眼鏡 (CSLO) および光干渉断層計 (OCT) によるその層の厚さの測定、補償光学 (AO) を介する錐体密度のトポグラフィカルマッピング、機能的な目の試験などを含むことができる。これらの、および他の望ましい試

験は以下の実施例に記載される。撮像および機能的実験の視点では、本発明の幾つかの態様において、保持されている光受容体の異なる領域を標的とするために、1もしくは複数の注入が同じ目に行われる。各注入の容量およびウイルス力価は、以下にさらに記載するように個別に決定され、そして同じ目または反対の目に行われる他の注入と同じでも異なってもよい。別の態様では、目全体を処置するために単回の大容量の注入がなされる。一つの態様では、r A A V 組成物の容量および濃度は、傷害された光受容体の領域のみに影響を及ぼすように選択される。別の態様では、r A A V 組成物の容量および/または濃度は、傷害を受けていない光受容体を含む目の大部分に到達するためにより大量となる。

【 0 0 5 5 】

組成物は、処置すべき領域のサイズ、使用するウイルス力価、投与経路、および方法の所望する効果に依存して、間の全ての数値を含む約 $50 \mu\text{L}$ ~ 約 1 mL の容量で送達することができる。一つの態様では、容量は約 $50 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $70 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $100 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $125 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $150 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $175 \mu\text{L}$ である。さらに別の態様では、容量は約 $200 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $250 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $300 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $450 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $500 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $600 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $750 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $850 \mu\text{L}$ である。別の態様では、容量は約 $1000 \mu\text{L}$ である。所望する導入遺伝子をコードする核酸配列を、細胞 - 特異的プロモーター配列の制御下に持つ組換えアデノ随伴ウイルスの有効濃度は、望ましくは1ミリリットルあたり約 10^8 から 10^{13} のベクターゲノム (vg/mL) の間の範囲である。r A A V 感染単位は、特許文献 81 に記載されているように測定される。好ましくは、濃度は約 $1.5 \times 10^9 \text{ vg/mL}$ ~ 約 $1.5 \times 10^{12} \text{ vg/mL}$ 、そしてより好ましくは約 $1.5 \times 10^9 \text{ vg/mL}$ ~ 約 $1.5 \times 10^{11} \text{ vg/mL}$ である。一つの態様では、有効濃度は約 $1.5 \times 10^{10} \text{ vg/mL}$ である。別の態様では、有効濃度は約 $1.5 \times 10^{11} \text{ vg/mL}$ である。別の態様では、有効濃度は約 $2.8 \times 10^{11} \text{ vg/mL}$ である。さらに別の態様では、有効濃度は約 $1.5 \times 10^{12} \text{ vg/mL}$ である。別の態様では、有効濃度は約 $1.5 \times 10^{13} \text{ vg/mL}$ である。毒性、網膜異形成および剥離のような望ましくない影響の危険性を下げるために、最低有効濃度のウイルスを使用することが望ましい。さらにこれらの範囲中の他の投薬用量を、個体の、好ましくは処置するヒトの身体状態、個体の年齢、特定の目の障害および進行した場合に発症する障害の程度を考慮して、担当医師が選択できる。

【 0 0 5 6 】

E . 処置 / 予防法

本発明は、上記の目の疾患およびそれに付随する網膜の変化を防ぎ、処置し、進行を阻止し、または改善する様々な方法を提供する。一般的に、この方法にはそれらが必要な哺乳動物個体に、正常 R P G R 遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の眼球細胞に遺伝子産物を発現する調節配列の制御下に持つ組換えアデノ随伴ウイルス (A A V)、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる組成物の有効量を投与することを含む。

【 0 0 5 7 】

R P、より詳細には X L R P は多くの網膜変化に関連する。これらには光受容体構造または機能の喪失；外顆粒層 (O N L) の薄化 (t h i n n i n g) または肥厚化；外網状層 (O P L) の薄化または肥厚化；破壊 (d i s o r g a n i z a t i o n) に続く桿体および錐体外節の喪失；桿体および錐体内節の短縮；双極細胞デンドライトの収縮；内顆粒層、内網状層、ガングリオン細胞層および神経線維層を含む内網膜層の薄化または肥厚化；オプシンの誤局在化；ニューロフィラメントの過剰発現；E R G 機能の喪失；視力およびコントラスト感度の喪失；および視覚誘導行動の喪失がある。一つの態様では、本発明は X L R P に伴う任意の網膜変化を防ぎ、進行を阻止し、または改善する方法を提供する。結果として個体の視覚が向上し、または視覚喪失が阻止され、かつ/または改善され

る。

【0058】

特定の態様では、本発明は個体の網膜色素変性に伴う視覚の喪失を防ぎ、進行を阻止し、または改善する方法を提供する。網膜色素変性に伴う視覚の喪失とは、周辺視覚の低下、中心（読み取り）視覚の低下、夜間視覚の低下、昼間視覚の低下、色覚の喪失、コントラスト感度の喪失、または視力の低下を指す。

【0059】

別の態様では、本発明は個体の光受容体機能の喪失を防ぎ、または阻止し、あるいは光受容体機能を上げる方法を提供する。光受容体機能は上記または以下の実施例に記載する機能的実験、例えば当該技術分野では通例のERGまたは視野測定法を使用して評価することができる。本明細書で使用する「光受容体機能の喪失」とは、正常な罹患していない目、またはより早い時点の同じ目と比べて、光受容体機能の低下を意味する。本明細書で使用する「光受容体機能を上げる」とは、罹患している目（同じ目の疾患を有する）、以前の同じ目、同じ目の未処置部分、または同じ患者の反対側の目と比較して、光受容体の機能の改善、または機能的光受容体の数または割合の上昇を意味する。

【0060】

別の態様では、本発明は個体の光受容体構造を改善する方法を提供する。本明細書で使用する「光受容体構造を改善する」（処置する網膜の領域の）とは、外顆粒層（ONL）厚の増加または低下、あるいは全網膜、または中心網膜、もしくは周辺のONLの薄化もしくは肥厚化の進行の阻止；外網状層（OPL）厚の増加または低下、あるいは全網膜、または中心網膜、もしくは周辺のOPLの薄化もしくは肥厚化の進行の阻止；桿体および錐体内節（IS）短縮の減少；外節（OS）の短縮および喪失の減少；双極細胞デンドライト収縮の減少、または双極細胞デンドライト長または量の増加；およびオプシン誤局在化の逆転（reversal）の1もしくは複数を指す。

【0061】

別の態様では、本発明は外網状層（OPL）の異常を防ぎ、進行を阻止し、または改善する必要がある個体の、外網状層（OPL）の異常を防ぎ、進行を阻止し、または改善する方法を提供する。本明細書で使用するOPLの異常を改善するとは、（処置する網膜の領域の）OPL厚を上げる、または下げること、あるいは全網膜をわたる、中心網膜の、もしくは周辺のOPL厚の変化を阻止することを意味する。別の態様では、本発明は網膜色素変性症のX連鎖型（XLRP）に伴うONL厚を上げ、下げ、または保護することが必要な個体の網膜色素変性症のX連鎖型に伴うONL厚を上げ、下げ、または保護する方法を提供する。進行性のONL薄化は、全ての種類の表現型のXLRPに共通し、そして異常なONL肥厚化により進行することがある。本明細書で使用する「ONL厚を上げ、下げ、または保護する」とは、ONL厚が標準よりも薄ければそれを上げ、もしONL厚が標準よりも厚ければそれを下げ、あるいは全網膜をわたる、中心網膜、もしくは周辺のONL薄化の進行を阻止することを意味する。別の態様では、本発明は双極細胞のデンドライト収縮を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体の双極細胞のデンドライト収縮を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。XLRPの進行の過程で、双極細胞デンドライトは収縮し、そして光受容細胞に接続できなくなる。本発明者は、上記rAAV-RPGR構築物で処置した後に、双極細胞の傷害領域が新たなデンドライトを形成し、これが光受容細胞と接続し、そして機能を改善できるという驚くべき知見を得た。このように別の態様では、本発明は双極細胞機能の喪失を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体の双極細胞機能の喪失を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。また双極細胞機能の強化は、改善された暗順応（桿体媒介型）ERG-b波の増幅も導く。別の態様では、本発明はERGにより記録される桿体細胞および錐体細胞に関するレセプター後の応答（post-receptoral response）を改善する方法を提供する。別の態様では、本発明はニューロフィラメントの過剰発現により特徴付けられる軸索損傷を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体のニューロフィラメントの過剰発現により特徴付けられる

10

20

30

40

50

軸索損傷を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。

【 0 0 6 2 】

別の態様では、本発明は X 連鎖性網膜色素変性症 (X L R P) を発症する危険性がある個体の X 連鎖性網膜色素変性症を防ぐ方法を提供する。X L R P を発症する危険性がある個体には、X L R P の家族歴を有する個体、R P G R 遺伝子に 1 もしくは複数の確認されている突然変異を有する個体、R P G R 突然変異の雌のキャリアー (異型接合体の雌) の子孫、または両 X 染色体上に R P G R 突然変異を持つ雌の子孫を含む。

【 0 0 6 3 】

別の態様では、本発明は桿体および / または R / G 錐体オプシンの誤局在化を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体の桿体および / または R / G 錐体オプシンの誤局在化を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。正常な目では、ロドプシンおよび R / G 錐体オプシンは主に桿体細胞外節の膜に見出されるが、X L R P を含む多くの網膜疾患および損傷では内節、O N L および / またはシナプス末端に誤局在化ようになる。

【 0 0 6 4 】

別の態様では、本発明は疾患後期の網膜下空間に食細胞の増加を防ぎ、阻止し、または改善する方法を提供する。引用により本明細書に編入する非特許文献 2 2 を参照にされたい。

【 0 0 6 5 】

別の態様では、本発明は X L R P に伴う O P L シナプス変化、双極細胞異常または網膜異常を防ぎ、その進行を阻止し、または改善することが必要な個体の X L R P に伴う O P L シナプス変化、双極細胞異常または内網膜異常を防ぎ、その進行を阻止し、または改善する方法を提供する。O P L シナプス変化には、圧縮された光受容体シナプス末端に伴う O P L の狭窄化 (n a r r o w i n g)、および桿体および錐体末端での C t B P 2 - 標識シナプスリボン数の減少を含む。双極細胞異常には、双極細胞デンドライトの収縮を含む。内網膜異常には、内網膜超肥厚化 (h y p e r t h i c k n e s s)、桿体光受容体神経突起発芽、桿体双極細胞デンドライト収縮、上昇した G A B A - 免疫反応性アマクリン細胞、およびミューラーグリア細胞反応性の変化、カルピンディン抗体で標識できる水平細胞の軸索分岐の平坦化 ; G A B A 抗体で標識できる内網膜状層 (I P L) の薄化および重層化の喪失 (疾患後期で) がある。引用により本明細書に編入する上記非特許文献 2 2 および非特許文献 1 6 を参照にされたい。

【 0 0 6 6 】

記載した各方法について、処置を使用して網膜傷害の発生を防ぐか、または軽い、もしくは進んだ疾患をもつ目を救済することができる。本明細書で使用する用語「救済」とは、疾患が全盲へ進行することを防ぎ、傷害が非損傷光受容細胞に広がることを防ぎ、または損傷した光受容細胞の傷害を改善することを意味する。このように一つの態様では、組成物が疾患の発症前に投与される。別の態様では、組成物がオプシン誤局在化の開始後に投与される。別の態様では、組成物が光受容体喪失の開始前に投与される。別の態様では、組成物が光受容体喪失の開始後に投与される。さらに別の態様では、組成物是非疾患の目と比べて 9 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。別の態様では、組成物は 8 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。別の態様では、組成物は 7 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。別の態様では、組成物は 6 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。別の態様では、組成物は 5 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。別の態様では、組成物は 4 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。別の態様では、組成物は 3 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。別の態様では、組成物は 2 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。別の態様では、組成物は 1 0 % 未満の光受容体が機能しているか、または残っている場合に投与される。一つの態様では、組成物が目の 1 もしくは複数の領域

10

20

30

40

50

、例えば保持された光受容体を有する領域に投与される。別の態様では、組成物が目全体に投与される。

【0067】

別の態様では、XLRPを処置または防ぐ必要がある個体のXLRPを処置または防ぐ方法が提供される。この方法は、XLRPに罹患しているか、またはそれを発症する危険性がある個体を同定し；遺伝子型分析を行い、そしてRPGR遺伝子に少なくとも一つの突然変異を同定し；非侵襲的網膜撮像および機能試験を行い、そして治療の標的になる保持されている光受容体の領域を同定し；そして有効濃度の組成物を個体に投与することを含んでなり、これによりXLRPが防がれ、阻止され、または改善される。組成物は、正常な光受容細胞 - 特異的遺伝子をコードする核酸配列を、光受容細胞に遺伝子産物を発現するプロモーター配列の制御下に持つ組換えウイルスおよび製薬学的に許容され得る担体を含む。遺伝子型分析は当該技術分野では日常的であり、そしてRPGR遺伝子の核酸配列中に1もしくは複数の突然変異を同定するためにPCRの使用を含む。例えばそれぞれ引用により本明細書に編入する非特許文献7、12および67を参照にされたい。

10

【0068】

別の態様では、任意の上記方法が、正常RPGR遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸配列を、個体の光受容細胞に遺伝子産物の発現を向けるIRBPまたはGRK1プロモーターの制御下に持つ組換えAAV2/5偽型アデノ随伴ウイルスを、担体および網膜下注入に適する他の追加成分と配合して含む組成物を使用して行われる。

【0069】

20

本発明の別の態様では、この方法は処置の効力を測定するために機能的および撮像実験を行うことを含む。これらの実験には、以下の実施例に記載するようにERGおよびインビボ網膜撮像を含む。さらに視野実験、視野測定法および微小視野測定法(microperimetry)、運動試験、視力、色覚試験を行うことができる。

【0070】

本発明のさらに別の態様では、上記の任意の方法は別の、または二次的な治療と組み合わせで行われる。この治療は、XLRPの防止、阻止または改善に役立つか、またはそれに付随する任意の上記効果に役立つ、現在知られている任意の、または未だ知られていない治療でよい。一つの態様では、二次的治療が毛様体神経栄養因子(CNTF)である。引用により本明細書に編入する非特許文献82。二次的治療は、上記rAAVの投与前、それと同時にまたは後に投与することができる。

30

【0071】

以下の実施例で示すように、例のhRPGROF15をインビボの実験で使用して本発明の方法および組成物の用途および効力の証拠を提供する。実施例は、ヒト網膜症の多数の動物モデルを対象として、本発明の方法による網膜機能の回復を示した。実験では、RPGR変異体のイヌの欠損を、例となるベクターの使用により遺伝子送達で矯正することができた。網膜機能は、この盲目の大規模動物モデルで改善した。このデータから当業者は、この方法がヒトを含む他の個体のXLRPまたは他の種類の網膜疾患を処置するために同様に使用できると容易に想定できる。

【実施例】

40

【0072】

F. 実施例

【実施例1】

【0073】

材料および方法

a. ヒト個体および網膜断層像

XLRPおよび分子的に確認されたRPGROF15の突然変異を有する患者がこの試験に含まれた。正しい情報を伝えた上で同意を得た。手順はヘルシンキ宣言のガイドラインに従い、そして治験審査委員会に承認を得た。網膜断層像はスペクトラル-ドメイン光干渉断層計(SD-OCT, RTVue-100; Optovue Inc.、フリー

50

モント、カリフォルニア州)で得た。記録および分析技術は以前に公開された。

【0074】

b. 動物

XLPRA1およびXLPRA2疾患の構造的および機能的結果を定め、そして処置および結果の評価に関する段階を設定するために、我々は野生型($n = 17$, 週齢7 - 416 weeks)、XLPRA1($n = 9$, 週齢7 - 156 weeks)、およびXLPRA2($n = 6$, 週齢8 - 144 weeks)のイヌを、非侵襲的撮像およびERG実験に使用した。遺伝子治療には、交配した罹患しているイヌを使用した(以下の表1および2)。動物が関与する全ての手順は、眼科および視覚研究における動物の使用に関するARVO宣言およびIACUC承認に従って行った。

10

【0075】

c. rAAVベクター産生および精製

完全長のヒトRPGROF15をAAV2/5ウイルスベクターにクローン化し、そしてヒトIRBPまたはGRK1プロモーターにより制御した。ベクターのcDNAは、引用により本明細書に編入するAlan Wright and colleagues (BK005711)による(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/BK005711>)に公開された配列に基づき、完全長のヒトRPGROF15クローンであった。しかしこの構築物に使用した配列(配列番号:1)は、Wright配列よりも高い安定性を現す。この構築物はエキソン1-ORF15を含み、そしてヒトリンパ球由来の15bのエキソン1-部分(ヌクレオチド169 - 1990)、およびヒトゲノムDNA由来の1991 - 3627を段階的に増幅することによる3-ウェイライゲーションを使用して作成した。内部制限酵素部位NdeI(CATATG)を、残基1993(A>T)で部位特異的突然変異誘発法により作成した。構築物に使用したRPGROF15配列は、配列番号:1に示す。Alan Wright and colleagues (BK005711)により公開された核酸配列と配列番号:1のアライメントを図3に与える(二つの核酸配列によりコードされる、並べた図4のアミノ酸配列、および図5に説明する部分的コンセンサス配列も参照にされたい)。次いでこれらのフラグメントをpBluescriptのBamHIおよびXhoI部位にクローン化し、大腸菌Stb14で増殖させ、そして配列をミシガン大学DNA配列シーケンシングコアファシリティで確認した。

20

30

【0076】

ヒトG-タンパク質共役受容体プロテインキナーゼ1(hGRK1)プロモーターを使用して、主にイヌの網膜中の桿体発現を 10^{11} vg/mlの治療濃度に制御した;より高濃度(10^{13})で幾つかの錐体に発現が生じたが、網膜への悪影響があった。桿体細胞および錐体細胞の両方の発現は、マウス近位プロモーター中に同定された重要なシス作用要素を含む235bpのヒトIRBPプロモーターにより調節された。双方とも引用により本明細書に編入する非特許文献83および84を参照にされたい。このプロモーターを含むベクターは、用量および時間依存的様式で桿体細胞および錐体細胞の両方の中にGFP発現を生じる(Beltran 2012の図S4、これは特許文献8の図8で再現される)。ベクターDNA配列は、ベクター産生前に正確さを確認した。

40

【0077】

二つのプラスミドのコ-トランスフェクション(co-transfection)法を使用してAAV2/5ベクターを産生した(引用により本明細書に編入する非特許文献85を参照にされたい)。ウイルス粒子を滴定し、そして0.014%Tween-20を含有する緩衝塩溶液(BSS, Alcon Laboratories, フォートワース、テキサス州)に、1mLあたり 1.5×10^{11} ウイルスベクターゲノム(vg/mL)の濃度で再懸濁した。無菌状態およびエンドトキシンが無いことは最終産物で確認した。

【0078】

d. 網膜下注入および処置後の管理

50

網膜下注入は以前公開されたように全身麻酔下で行った（例えば非特許文献62および非特許文献47を参照にされたい。双方とも引用により本明細書に編入する）。注入した容量は、週齢/目の寸法に依存した：週齢5および28 weeksのマウスにそれぞれ70 μ Lおよび150 μ L、右目に治療用ベクターを注入し、そして左目にBSSを注入した。注入時、網膜下ブレブの位置および広がりをもとの写真または図式による底の説明に記録した：すべての場合でブレブは平らになり、そして網膜は24時間以内に再付着した。硝子体に逆流した失敗した網膜下注入が、1匹のイヌで見出され、このイヌは実験を通して維持され、潜在的治療効力および/または硝子体内経路による目の合併症を測定した。

【0079】

e. 臨床的評価およびインビボ網膜像

眼科的調査は、注入終了の時間間隔を通して行った。正面および網膜断層撮像を全身麻酔下で行い、そしてSD-OCTで網膜断層を記載されているように分析した（非特許文献16, 24, 60, 61、これら全て、引用により本明細書に編入する）。正面および網膜断層像は、全身麻酔下のイヌを用いて行った。30°および55°の直径のレンズを用いて、近赤外線照明（820 nm）での重複する正面像反射を得（HRA2またはSpectralis HRAまたはSpectralis HRA+OCT, ハイデルベルグ、ドイツ）、視神経、網膜血管、注入ブレブの境界、網膜切開部位および他の位置の変化のような眼底所見を描写した。カスタムプログラム（MatLab 6.5; The MathWorks, ネイテック、マサチューセッツ州）を使用して、個々の写真を網膜全体像の幅にデジタル縫合した。一組の目は、短波長（488 nm）照明を使用してタペートおよび色素沈着RPEの境界を描写した。スペクトラル-ドメイン光干渉断層測定法（SD-OCT）は、線形およびラスタ走査を用いて行った（RTVue-100, Optovue, Inc. フレモント、カリフォルニア州、またはSpectralis HRA+OCT, ハイデルベルグ、ドイツ）。

【0080】

線形走査は、高度に解像された局所網膜構造を得るためにブレブ境界のような問題の領域または形体にわたって配置した。大部分の断層網膜情報は、網膜の広い領域を網羅する重複ラスタ走査から得た。6 x 6 mm（各513の縦方向反射プロファイル（LRP）の101線、平均化なし、Optovue）、または9 x 6（各1536 LRPの49線、8 - 10の平均、Spectralis）を使用した。

【0081】

OCTデータの獲得後処理は、カスタムプログラム（MatLab 6.5; The MathWorks, ネイテック、マサチューセッツ州）を用いて行った。網膜幅のトポグラフィー分析には、各ラスタ走査の統合後方散乱強度（integrated backscatter intensity）を使用して、NIR反射率像により形成された網膜幅のモザイク上に見える網膜の形体に関して、その正確な位置および方向を定めた。登録された全てのラスタ走査を形成する個々のLRPは、視神経が中心の直交座標系で規則的に間隔を空けたピン（1° x 1°）に割り当てられた：各ピン中にLRPを並べ、そして平均化した。組織学的に定められる層に対応する網膜内ピークおよび境界は、各LRPに沿った後方錯乱シグナルの強度および傾斜情報の両方を使用して、マニュアルオーバーライドで半自動的に分割した。具体的には網膜-硝子体界面、OPL、外境界膜（OLM）、内/外節（IS/OS）連結部付近のシグナルピークおよびRPEを定めた。イヌの上網膜では、タペートからの後方散乱が最高強度のピークを形成し、そしてRPEおよびIS/OSピークがタペートピークに対して硝子体に位置する。ONL厚はOPLのOLMへの強膜化移行から定め、そしてONL厚のトポグラフィー分析を算出した。さらにIS/OS後方散乱強度のトポグラフィー分析は、IS/OSピークの $\pm 8 \mu$ m内の平均後方散乱強度を最初に測定し、そして次にこの値を、網膜-硝子体界面に強膜化した網膜の最初の75 μ mの平均後方散乱強度により標準化した。全てのトポグラフィー分析の結果について、血管、視神経ヘッドおよびブレブ境界の位置を参考に重ねた。さらなる定量的比較は、視神経ヘッドと交差する垂直軸に沿って、10°幅のバンドのONL厚をサ

10

20

30

40

50

ンプリングすることにより行った。

【0082】

f. 網膜電図法

イヌは一晚、暗 - 順応させ、前投薬し、そして記載のように麻酔かけた（非特許文献3；非特許文献86、双方とも引用により本明細書に編入する）。瞳孔を、アトロピン（1%）、トロピカミド（1%）およびフェニレフリン（10%）で広げた。脈拍数、酸素飽和および体温をモニターした。全界磁（full-field）ERGをBurian-Allen（Hansen Ophthalmics, アイオワシティ、アイオワ州）コンタクトレンズ電極およびコンピューターに基づくシステムで記録した。低エネルギー（10 μ sの期間；0.4 Log scot-cd.s.m-2）および高エネルギー（1 msの期間；3.7 Log scot-cd.s.m-2）のホワイトフラッシュを暗 - 順応および明 - 順応（1 Hzの刺激で1.5 log cd.m-2、29 Hzの刺激で0.8 log cd.m-2）状態下で使用した。高エネルギーフラッシュ応答の先端を、4 msの固定時点で測定し（引用により本明細書に編入する非特許文献32）、桿体光受容体により支配される網膜機能を定量し、そして29 Hzでの低エネルギーフラッシュのピーク対ピーク増幅を測定して錐体光受容体により支配される網膜機能を定量した。定性的および定量的測定を使用した視覚行動の評価は、処置した動物では行わなかった。それというのも実験した疾患状態では、両突然変異種（未処置）が正常から識別できないほど十分に桿体および錐体視覚機能を保持するからである。

【0083】

g. 組織処理および形態学的評価

イヌは安楽死溶液（Euthasol, Virbac, フォートワース, テキサス州）の静脈内注射により安楽死させ、そして眼球を摘出し、固定し、そして以前に記載されたように処理した（引用により本明細書に編入する非特許文献22）。処置および未処置領域を包含する連続した10 μ m厚の網膜低温切片を切り取り（ \sim 700/網膜）、そしてサブセットをH&Eで染色し、血管ランドマークを使用して切片を正面cSLO像および続いて正面ONLマップ上に配置した。隣接区分での免疫組織化学は、桿体オプシン、ヒト錐体アレスチン（Cheryl Craftにより提供されたLUMIF; 1/10000）、R/G - オプシン, RIBEYE/CtBP2, PKC γ , Go α , カルビンディン、ニューロフィラメント（NF200 kDa）、およびGFAPに対する抗体を用いて行って、処置および未処置領域の分子マーカーの発現を調べた（それぞれ引用により本明細書に編入する上記非特許文献22、および35）。ヒトRPGRのC - 末端ドメインに対する抗体（引用により本明細書に編入する非特許文献33）も使用して処置した目の中の治療用導入遺伝子を同定した。抗原 - 抗体複合体は、蛍光標識二次抗体（Alexa Fluor, 1:200; Molecular Probes, ユージーン、オレゴン州、米国）で視覚化し、DAPIを用いて細胞核を標識し、そしてデジタル画像を撮り（スポット4.0カメラ、Diagnostic Instrumentsスターリングハイツ、ミシガン州）、そして表示のためにグラフィックプログラムに取り込んだ（Photoshop; Adobe, マウンテンビュー、カリフォルニア州、米国）。

【実施例2】

【0084】

RPGR ORF15の突然変異は、ヒトおよびイヌの光受容体変性を導く

光受容体のトポグラフィーは、断層OCT網膜撮像を使用して外（光受容体）顆粒層（ONL）の厚さを測定することによりRPGR - XLRPの患者の網膜をわたりマッピングすることができる。特許文献8の図1Aのように再現される非特許文献87の図1Aに示すように、正常な目（インセット：inset）ではONL厚は中心にピークがあり、そして中心窩から離れるにつれて減少する。ORF15の突然変異があるXLRP患者は、異なる疾患パターンを有する。普通のパターンは、検出できるが顕著に薄くなったONLのゾーンに囲まれた錐体がリッチな中心窩領域、およびその付近に比較的高いONL厚を保持しながら劇的な光受容体の喪失を示す（特許文献8の図1Aのように再現される非

10

20

30

40

50

特許文献 87 の図 1 A)。また R P G R 疾患の発現は、中心の光受容体の喪失、および罹患しているものの、それでも良く保存されている周辺の光受容体により特徴付けられる一般には少ない表現型も含む (特許文献 8 の図 1 A のように再現される非特許文献 87 の図 1 A)。本実施例は以前の考察を考慮して、ヒト R P G R - X L R P 表現型のスペクトラムが存在し得ることを示す。E R G により、ほとんどの表現型が錐体より多くの桿体の機能不全を有する。

【 0 0 8 5 】

我々はヒト患者で使用したように、2 匹のイヌのモデルもまた断層網膜撮像で実験し、そしてトポグラフィーによる光受容体マップを作成し、そして正常なデータと比較できる (特許文献 8 の図 1 B のように再現される非特許文献 87 の図 1 B)。橋渡し (t r a n s l a t i o n a l) の重要性の中で、疾患パターンのスペクトラムがイヌのモデルでも生じる。例えば X L P R A 1 のイヌは、視覚線条 (v i s u a l s t r e a k) の高い光受容体密度に対応する視神経の直ぐ上の領域が比較的保存された O N L の薄化を示すことができる。対照的に X L P R A 2 光受容体マップの例は、網膜幅の O N L 薄化パターンを示すが、視覚線条に対応する中心網膜での喪失が周辺網膜より顕著である。

【 0 0 8 6 】

光受容体の変性の自然な病歴は、X L P R A 1 および X L P R A 2 の処置のための年齢および網膜部位を選択するために測定された (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)。光受容体変性および疾患経過の時空分布は、垂直軸に沿った O N L 厚を定量することにより測定した (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)。野生型のイヌ (W T) (n = 5 、週齢 7 - 4 3 w k s) は、視神経上に 3 5 ° まで傾いてわずかに高い値 (平均 5 7 μ m) の、そして視神経下に 2 5 ° まで傾いてわずかに低い値 (平均 5 4 μ m) の比較的均一な O N L 厚を表す。より若い週齢の X L P R A 1 (n = 7 、週齢 7 - 2 8 w k s) は、正常限界内または付近の O N L 厚を表す (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)。老化した X L P R A 1 (n = 6 、週齢 5 6 - 7 6 w k s) は、下網膜内に O N L の薄化、および視神経の直ぐ上の視覚線条領域に相対的保存を表す (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C の括弧内)。より老齢の X L P R A 1 間の目ではより大きい差が存在し、幾つかの結果は正常の下限であり、そしてその他は W T の 5 0 % 未満の実質的な O N L 喪失を示し (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)、以前に報告されたような疾患の変動性重篤度と一致する。

【 0 0 8 7 】

調査した最も若い週齢の X L P R A 2 で (n = 2 , 週齢 8 、 2 2 w k s)、我々は視覚線条に対応する中心網膜 (W T の 4 4 %) で、周辺 (W T の 6 0 %) より大きくなる傾向がある網膜幅の O N L 薄化を観察した (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)。より老化した X L P R A 2 のイヌ (n = 3 、週齢 3 6 - 5 9 w k s) は、上の周辺網膜 (W T の 4 5 %) よりも高い中心および下網膜疾患 (i n f e r i o r r e t i n a l d i s e a s e) (W T の 3 0 %) の傾向がある、より多くの O N L 薄化を示す (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)。最も老化した X L P R A 1 および X L P R A 2 の目の O N L 厚は実質的に低下した (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)。X L P R A 1 および X L P R A 2 の若いおよび老化したイヌの桿体および錐体の網膜機能は、E R G により測定した。X L P R A 1 および X L P R A 2 疾患の両方が、錐体機能不全よりも桿体機能不全を有すると特徴付けることができた。より若い X L P R A 1 の目 (n = 6) は、異常な (4 / 6) 桿体機能を示したが、錐体機能は正常であり (特許文献 8 の図 1 D のように再現される非特許文献 87 の図 1 D)、一方、より老化した X L P R A 1 の目 (n = 7) は、異常な桿体 (6 / 7) および錐体 (5 / 7) を示した (特許文献 8 の図 1 D のように再現される非特許文献 87 の図 1 D)。より若い X L P R A 2 の目 (n = 3) は桿体機能が異常だが、ほとんどが (2 / 3) 正常な錐体機能を有し、しかしより老化した X L P R A 2 の目 (n = 6) は異常な桿体および錐体機能を有した (特許文献 8 の図 1 D のように再現される非特

許文献 87 の 1 D)。X L P R A 1 および X L P R A 2 疾患の構造的および機能的な自然の病歴における差異を定めることは、R P G R - X L P R 患者に関連し得る処置の概念実証実験で、イヌのモデルの使用を確認するために、イヌおよびヒトでの非侵襲的実験で十分な重複を示した。

【実施例 3】

【0088】

遺伝子ノックダウンおよび置換法での X L P R A の処置 - インビボの知見

突然変異した R P G R 遺伝子の影響を克服するためには、遺伝子ノックダウンおよび置換法が必要になると予想された。すなわち短いヘアピン RNA はイヌの短縮化 R P G R O R F 15 c D N A を含む構築物にコードされ、これは O R F 15 の反復領域からインフレイムの 708 b p が除去されていた (c R P G R_{short})。追加のサイレント突然変異が c R P G R 配列に含まれて、s i R N A に対してこの配列を強くした (h a r d e n)。

10

【0089】

h I R B P プロモーターの制御下の c R P G R_{short} c D N A (A A V 2 / 5 - h I R B P - c R P G R_{short} - s h R N A 5) の網膜下注入は、X L P R A 2 のイヌで行った。処置は疾患の発症後、5 週間で開始した。網膜異形成の重篤な網膜病変が、網膜下注入後、17 週で観察された。救済は見られなかった (表 2)。

【実施例 4】

【0090】

20

遺伝子オーギュメンテーション治療 (g e n e a u g m e n t a t i o n t h e r a p y) での X L P R A の処置 - インビボの知見

h I R B P (A A V 2 / 5 - h I R B P - h R P G R) (図 1) プロモーターの制御下の完全長ヒト R P G R O R F 15 c D N A の網膜下注入は、X L P R A 1 および X L P R A 2 の両方に行い、そして X L P R A 2 では h G R K 1 (A A V 2 / 5 - h G R K 1 - h R P G R) (図 2) プロモーターの制御下で行った (表 1)。X L P R A 1 では、処置は光受容体喪失の 28 週間前に開始し、そして 77 w k s まで、変性の開始後も十分にモニターした (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)。X L P R A 2 では、注入は 5 週齢で行い、そして実験を 38 w k s で終了した。上記で検討した処置の失敗とは対照的に、完全長のヒト R P G R O R F 15 (h I R B P または h G R K 1 プロモーターにより駆動される) は治療に有効であった。

30

【0091】

特許文献 8 の図 9 のように再現される非特許文献 87 の図 S 5 に示すように、h I R B P プロモーターを持つ A A V 2 / 5 ベクターは、桿体細胞および錐体細胞への発現を標的とすることを表す。この図は、A A V 2 / 5 - h I R B P - h G F P の網膜下注入から 2 および 8 週間後の正常なイヌの網膜に、自然な G F P 蛍光 (緑) を示す。2 ベクター力価の 150 μ l 注入を使用した。光受容体中の G F P 蛍光は 2 w k s までに現れ (A 1 , A 2)、そして 8 w k s まで増加する (B 1 , B 2)。形質導入されたより少ない錐体細胞を生じるより低用量のベクターで処置した網膜中の錐体アレスチンとの共局在化 (c o l l o c a l i z a t i o n) により確認されるように、発現は桿体細胞および錐体細胞の両方に見出される (C)。より多くの光受容体がより高用量で標識され、そして発現は 8 週間の処置期間中、持続する。

40

【0092】

正の処置応答がインビボで検出できた。X L P R A 1 のイヌの処置した目は、上周辺網膜、特に未処置側と比べて網膜下注入領域 (プレブ) 境界の処置側に、より厚い O N L を有した (特許文献 8 の図 2 A のように再現される非特許文献 87 の図 2 A)。さらに光受容体の内および外節 (I S / O S) 領域に対応するシグナルピークは、処置した側でより強く、そして良く組織化された (特許文献 8 の図 2 A のように再現される非特許文献 87 の図 2 A)。X L P R A 2 のイヌの処置した目は、処置した側により厚い O N L を、または I S / O S のレベルでより高い強度のシグナルを示した (特許文献 8 の図 2 A のように

50

再現される非特許文献 87 の図 2 A)。処置したブレブと局所網膜構造との間の関係をより良く理解するために、ONL 厚を処置した目および対照の目の広い範囲 (e x p a n s e) にわたってマップした (特許文献 8 の図 2 B のように再現される非特許文献 87 の図 2 B)。X L P R A 1 のイヌ H 4 8 4 は 7 6 週齢で、上周辺網膜の処置ブレブ内に ONL 保持の境界画定ゾーンを明らかに有した (特許文献 8 の図 2 B のように再現される非特許文献 87 の図 2 B)。上側頭網膜中のブレブの外側に ONL 変性が存在した。この週齢の X L P R A 1 のイヌの中心網膜領域は、ほぼ正常な ONL 厚を保持し (特許文献 8 の図 1 C のように再現される非特許文献 87 の図 1 C)、ブレブ境界をわたる移行はほとんど検出できなかった (特許文献 8 の図 2 B のように再現される非特許文献 87 の図 2 B)。

【 0 0 9 3 】

10

より小さい網膜下ブレブを持つ X L P R A 1 のイヌ H 4 8 3 は、ブレブ境界の内側に ONL 厚保持の局所的証拠を有する上周辺領域で類似の知見を有した。さらに中心では、処置および未処置領域の両方が、ほぼ正常な ONL 厚を保持し、そしてブレブ境界に対応する ONL 厚に変化はなかった (特許文献 8 の図 2 B のように再現される非特許文献 87 の図 2 B)。X L P R A 2 のイヌ Z 4 1 2 は、ブレブ境界に対応する保存された ONL を含む領域を示した：ONL はこの境界の外側で異常に薄化した (特許文献 8 の図 2 B のように再現される非特許文献 87 の図 2 B)。21 から 36 w k s まで長期の追跡で、処置した目のブレブの外側、および B S S を注入した対照の目で ONL 変性の時間経過を示した (特許文献 8 の図 5 のように再現される非特許文献 87 の図 S 1)。X L P R A 2 のイヌ Z 4 1 4 は、ブレブ境界にほぼ対応するわずかな ONL 厚の保存領域を示した (特許文献 8 の図 2 B のように再現される非特許文献 87 の図 2 B)。

20

【 0 0 9 4 】

光受容体 I S / O S のレベルで変化を定量した。この層での後方散乱強度を分画し、そしてマップした (特許文献 8 の図 2 C のように再現される非特許文献 87 の図 2 C)。処置した 3 匹のイヌ (H 4 8 4 , H 4 8 3 および Z 4 1 2) の I S / O S 強度マップは、ONL マップに類似したので、保持された ONL 領域はより高い強度に対応した。Z 4 1 4 の場合、処置した領域が実質的により高い後方散乱強度を I S / O S 層で示し、これは個々の走査で明白なより良い層の定義と一致した (特許文献 8 の図 2 A のように再現される非特許文献 87 の図 2 A)。処置および B S S - 注入対照の目の比較では、処置に関連する効果を有することが明らかに描写される網膜領域を示した (特許文献 8 の図 2 C のように再現される非特許文献 87 の図 2 C、ハッシュした)。眼内の非対称性と言う意味で E R G を評価した (特許文献 8 の図 2 D のように再現される非特許文献 87 の図 2 D)。桿体細胞により支配される光受容体の応答、および桿体細胞および錐体細胞の両方により媒介されるレセプター後の (p o s t - r e c e p t o r a l) 双極細胞応答に関する 3 匹のイヌ (H 4 8 4 , Z 4 1 2 および Z 4 1 4) の処置した目におけるシグナルは、より大きかった。H 4 8 3 は最も変性しない網膜および標準的な増幅の応答を両側に有し (特許文献 8 の図 2 D および 6 のように再現される非特許文献 87 の図 2 D および S 2)、これらは錐体細胞には対称的で、そして桿体細胞には非対称的であり、未処置の目には好ましかった。

30

【 0 0 9 5 】

40

これらの結果を以下の表 1 および表 2 にまとめる：

【 0 0 9 6 】

【表 1】

表1											
遺伝子型	週齢(wks) ¹		注入剤	OCT		ERG ⁵		形態/IHC		内網膜 ⁸	hRPGR Exp ⁹
動物/目	開始	終了		ONL ³	IS/OS ⁴	桿体	錐体	PR ⁶	OPL ⁷		
XLPR A1 H484-RE	28	77	hIRBP- hRPGR	+	+	+	+	N	N	N	+3
XLPR A1 H484-LE	28	77	BSS	-	-	+	+	D	D	D	-
XLPR A1 H483-RE	28	77	hIRBP- hRPGR	+	+	-	-	N	N	N	+2
XLPR A1 H483-LE	28	77	BSS	-	-	-	-	D	D	D	-
XLPR A2 Z412-RE	5	38	hIRBP- hRPG	+	+	+	+	N	N	N	+2
XLPR A2 Z412-LE	5	38	BSS	-	-	+	+	D	D	D	-
XLPR A2 Z414-RE	5	38	hGRK1- hRPGR	-	+	+	+	P	P	P	+1
XLPR A2 Z414-LE	5	38	BSS	-	-	+	+	D	D	D	-
XLPR A2 Z413-RE	5	38	hGRK1- hRPGR ¹⁰	ND	ND	ND	ND	D	D	D	-

【 0 0 9 7 】

脚注：

B S S - 緩衝塩溶液；R E - 右目；L E - 左目；N D - 行わず

¹ 処置から終了までの週齢期間（週で）。² 5 週齢で 70 μl、28 週齢で 150 μl の容量の網膜下注入。A A V 2 / 5 ベクター注入は、1.5 × 10¹¹ v g / m l の力価を有した。D o g Z 4 1 3 は 70 μl を硝子体に注入し、そして対照とした。³ 光干渉断層計（O C T）により測定した、プレブの外側と比べて注入プレブ内で保持された外顆粒層（O N L）の領域の存在；+ = 正の処置結果、- = 処置に対する応答なし。⁴ O C T により測定した、プレのブ外側と比べて注入プレブ内でより高い内節 / 外節（I S / O S）反射性の領域の存在。；+ = 正の処置結果，- = 処置に対する応答なし。

。

⁵ 桿体 - または錐体 支配型網膜電図（E R G）の増幅の眼内非対称⁶ 光受容体（P R）。処置対未処置領域中の桿体細胞、錐体細胞および外顆粒層の構造、および桿体および錐体オプシンの誤局在化の逆転。N = 正常、救済；D = 疾患、救済なし；P = 部分救済。⁷ 外網状層（O P L）。光受容体のシナプス末端および双極細胞を標識する抗体を使用した免疫組織化学（H I C）により測定した正常な延長双極デンドライトの存在を含む前 - および後 - シナプス末端構造。N = 正常、救済；D = 疾患、救済なし；P = 部分救済。⁸ 内網膜リモデリングの逆転 / 保護。N = 正常、救済；D = 疾患、救済なし；P = 部分救済。⁹ C - 末端抗体で測定された処置領域中の h R P G R 発現。桿体細胞および錐体細胞に限定された標識、そして - （標識なし），+ 1 （弱い），+ 2 （中程度），および +

10

20

30

40

50

3 (強い) と階級付けした。
¹⁰ 硝子体内対照を表す。

【 0 0 9 8 】

【 表 2 】

表2					
動物/処置	週齢(wks) 開始/ 終了	プロモーター - 導入遺伝子 (目の#)	ベクター 力価 (vg/ml)	結果	
				救済	合併症
XLPRAI/ オーギュメンテ ーション	26-28/ 31-37	mOP-cRPGR (1)	1.5x10 ¹¹	なし	多焦点ロゼット multifocal rosettes (1)
		hIRBP-HiscRPGR (4)	1.5x10 ¹¹	なし	多焦点ロゼット (4)
		hGRK1-hRPGR (1)	1.5x10 ¹¹	**	小さい網膜剥離 (1)
XLPRA2/ ノックダウン	5-22/ 20-39	CBA-GFP-H1-siRNA3 (1)	2.8 - 2.9x10 ¹¹	なし	なし
		CBA-GFP-H1-siRNA5 (1)		なし	なし
		CBA-GFP-H1-siRNA5 (1)		なし	なし
		CBA-GFP-H1-siRNA5 (2)		なし	なし
XLPRA2/ ノックダウン + オーギュメンテ ーション	5/22	hIRBP-cRPGR_HT-H1- siRNA5 (3)	1.5x10 ¹⁰ - 1.5x10 ¹¹	なし	多焦点ロゼット(2) なし(1)
		hIRB-cRPGR_HT-H1- siRNA5 (2)-IV	1.5x10 ¹⁰ - 1.5x10 ¹¹	なし	なし(2)

【 0 0 9 9 】

脚注：

C = イヌ；h = ヒト；I V - 硝子体内対照；m O P = 最小オプシンプロモーター；C B A = ニワトリベータアクチンプロモーター⁶⁵。

** 処置領域内での弱い、および非均一 h R P G R 発現、オプシン誤局在化の部分的回復。光受容体の救済は、網膜剥離、およびこれらの合併症に次ぐ早期終了により解釈されなかった。

【 0 1 0 0 】

X L P R A 2 について、毒性機能獲得型⁶³であるという事前の仮説は、疾患を改善するために変異体 R P G R 発現をダウンレギュレートするという試みに導いた。インビトロでイヌ R P G R 発現のダウンレギュレーションに効果的な二つの K D 試薬、s h R N A 3 および s h R N A 5 を使用したが、救済されなかった。R P G R の同時置換では、s h R N A 5 および 5 ' 6 x H i s タグを有する耐性が省略型⁶⁴のイヌ R P G R c D N A を合わせた一つのウイルス構築物を使用した。高いベクター力価での網膜下処置は効力および網膜毒性を生じなかった。同様に網膜毒性は、H i s タグを持たない省略型のイヌ R P G R c D N A を用いたオーギュメンテーションのみにより観察された。

【 実施例 5 】

【 0 1 0 1 】

遺伝子オーギュメンテーションは、両 X L P R A 遺伝子型で光受容体を救済し、そして桿体および錐体オプシンの誤局在化を逆転する

ブレブ境界を含む組織切片中の網膜形態の評価は、網膜下処置領域中の O N L 厚の保持および光受容体保存のインビホ撮像結果を確認した（特許文献 8 の図 3 および 7 のように再現される非特許文献 8 7 の図 3 および S 3 のパネル 1 - 5 ）。硝子体内ベクター投与は、処置に匹敵しなかった（表 1 ）。A A V 2 / 5 - h I R B P - h R P G R で処置した 3

匹のイヌH484, H483, Z412)では、桿体および錐体のISおよびOS構造がプレブ境界内で正常であった。未処置領域ではISが短く、そしてOSがまばらで、しかも不規則であった(特許文献8の図3および7のように再現される非特許文献87の図3およびS3のパネル3, 4)。AAV2/5-hGRK1-hRPGRで処置したZ414では、弱いがそれでも正の光受容体救済がプレブ領域で観察された(特許文献8の図7のように再現される非特許文献87の図S3C)。ヒトRPGROF15に対する抗体を用いた免疫標識では、処置領域の光受容体に限定された強固なhRPGRタンパク質発現が検出された(表1)。標識は4匹のイヌのISおよびシナプス末端全体に、ならびにH484の桿体および錐体の核周囲領域に見出された(特許文献8の図3および7のように再現される非特許文献87の図3およびS3のパネル6-8)。最後に、ヒト、マウスおよびイヌの疾患の特徴である桿体および錐体オプシンの誤局在化は、AAV2/5-hIRBP-hRPGRで処置した3匹のイヌで逆転した(特許文献8の図3および7のように再現される非特許文献87の図3およびS3のパネル9, 10, 11, 12, 13)。少ないがそれでも顕著な桿体およびR/G錐体オプシンの誤局在化が、AAV2/5-hGRK1-hRPGRで処置したZ414で明らかであった(特許文献8の図7Cのように再現される非特許文献87の図S3C)。

【実施例6】

【0102】

二次的OPL、双極細胞および内網膜疾患の防止

XLPR Aでは、他の一次光受容体疾患のような、OPLおよび内網膜異常が一般的な二次的影響である。未処置領域ではOPLの狭窄が、圧縮された光受容体シナプス末端(特許文献8の図3および7のように再現される非特許文献87の図3およびS3のパネル2, 5)、そして桿体および錐体末端のCtBP2-標識シナプスリボン数の減少(特許文献8の図4および8のように再現される非特許文献87の図4およびS4のパネル1, 2)に関係した。同時に桿体および錐体の双極細胞デンドライトが収縮した(特許文献8の図4および8のように再現される非特許文献87の図4およびS4のパネル3, 4)。これらの二次的変化は処置した領域には無く、保護されたOPLを生じた。対照的に、水平およびアマクリン細胞のカルピンディン標識(特許文献8の図4および8のように再現される非特許文献87の図4およびS4のパネル5, 6)、およびそれらの外側突起(lateral processes)は正常であり、そして処置と未処置領域との間で変化しなかった。XLPR Aにおける後期網膜リモデリングのこのような顕著な特徴が、イヌを安楽死させた週齢で存在するとは予想されなかった。

【0103】

処置および未処置領域の水平細胞のデンドライト末端、ならびにガングリオン細胞のデンドライト末端、および神経線維層は、ニューロフィラメント重鎖(NF200kDa)に対する抗体で標識した時に正常に現れた。しかし小さい斑点のあるNF200染色がONLに存在した。ニューロフィラメントの過剰発現は、幾つかの神経変性疾患で軸索損傷の特徴であり、そしてこの、および他の網膜疾患で起こる。この知見は全てのイヌの未処置領域に限られ、そして処置領域では存在しないか、または少なかった(特許文献8の図4および8のように再現される非特許文献87の図4およびS4のパネル5, 6)。GFAP免疫標識は、増大したミューグリア反応性を表す未処置領域を明らかに描き出す一方、これは処置と未処置領域の間の移行ゾーンで減り、そしてプレブ領域では存在しなかった(特許文献8の図4および8のように再現される非特許文献87の図4およびS4のパネル7, 8)。まとめると、内網膜の救済は4匹の処置した目の3匹で完結した(complete); 救済はAAV2/5-hGRK1-hRPGRで処置した1匹については部分的で、この場合、桿体の神経突起発芽が内網膜まで広がり(表1)、そしてNF200標識パターンは正常と疾患との間の中間であった(特許文献8の図8Dのように再現される非特許文献87の図S4D)。この結果は、両XLPR A1およびXLPR A2でRPGRオーギュメンテーションを光受容体に標的化することが、一次光受容体欠損を正し、そしてOPLおよび内網膜異常を防ぎ、または逆転するような有利な下流の効果を有

10

20

30

40

50

することを明らかに示している。

【実施例 7】

【0104】

考察

RPE65 の突然変異による常染色体劣性 RPE 疾患である LCA2 を処置するために、遺伝子置換療法を使用した最近の成功は、他の治療不可能なヒトの網膜症を処置するために遺伝子治療を考える道を築いた。XLRP は家系分析、キャリアーの同定を通して医院で確認できること、あるいは RP の男性の間だけに高頻度で XLRP が存在し；そして RPGROF15 の突然変異が XLRP 患者の約 75% を占めているという事実により、処置するための候補疾患である。ヒト RPGROF15 - XLRP の二つの大きな動物モデルで治療効果を示す本結果は、遺伝子オーギュメンテーション法が、この光受容体の繊毛病の実行可能な選択肢となり、そしてバルデー - ビードル症候群の繊毛病のマウスモデルにおいて成功裡の桿体救済を完全にすることを強く示唆している。

10

【0105】

しかしヒトおよび動物モデルにおけるこの疾患は複雑さが無いわけではなく、そしてヒトの疾患の将来の治療には注意して取り組む必要がある。例えば患者およびイヌのモデルの両方で疾患の発現に影響し得るモディファイヤーが存在し、そして RPGRXLRP 家系間およびその中、およびイヌの XLPRA1 モデルで表現型のスペクトラムが存在する。この表現型の多様性は、患者選択の潜在的障害となり得、そして治療の候補を定めるための基準として分子診断および患者の年齢以上のものが必要になることを指摘している。遺伝子型データの支援では、詳細な非侵襲型網膜撮像および機能実験を補足しなければならない。初期のヒトの処置法では、全ての表現型および全て疾患段階に合うように処置の計画を立てる衝動は抑えられるべきである。イヌの疾患は主に桿体 > 錐体変性であり、中心の網膜変性がある重篤な XLPRA2 および中心の網膜が保護されたより軽度な XLPRA1 の両方を、桿体細胞および錐体細胞の両方を標的とするベクターを使用して処置することに効力があった。イヌの疾患スペクトラムには含まれないが、軽度の錐体 > 桿体または錐体形成異常のような特定のヒト RPGR - XLRP 表現型が存在する。患者の中には大変限られた、または正常でさえある桿体機能を表すことができる者もあり、そして錐体標的化法はこのようなサブタイプにも開発されなければならない。錐体の疾患を標的とした原理証明実験は、錐体の光伝達またはサイクリック GMP チャンネル遺伝子に突然変異を持つマウスおよびイヌのモデルの両方で既に成功しており、臨床への橋渡しが促進されることになる。

20

30

【0106】

報告された表現型の家族内変動は、参加者の全家系を排除も含みもしないが、個々の患者の表現型の完全な分類の場合に強みを増す。さらに本実験では極めて中心の網膜を標的とするための試みは無かった：イヌで使用する場合に、中心外の網膜下での取り組みは、現在の考察に基づいて早期のヒト臨床試験に助言を与えることができる方法となろう。しかし多くの RPGR 患者が持続した中心窩錐体細胞の残存、および損傷されているが有用な視力を疾患後期に示す。ベクター - 遺伝子の中心窩下注入は、罹患した中心窩錐体細胞の喪失を引き起こすことが示され、治療用遺伝子送達の代替手段が考察されるべきである。外網膜を処置するために、例えば変異体 AAV キャプシドベクターを使用した硝子体内送達系の進歩により、残存する中心窩錐体細胞の処置における安全性の憂慮も最終的に軽くすることができるだろう。

40

【0107】

RPGR - 関連疾患が一般的で、しかも概して重篤であることは明らかだが、遺伝子の機能、および突然変異と疾患との間の関係は十分に解明されていない。RPGR は多数の組織 - / 細胞 - 特異的アイソフォームを持つ複雑なスプライシングパターンを有し、多数の毛様体タンパク質と相互作用することが知られ、小 GTPase RAB8A のグアニンヌクレオチド交換因子として作用し、そして脊椎動物の発生に役割を果たすことができる。そのような複雑さが、疾患の表現型における変動性の原因の一部かもしれない。一般に

50

、機能喪失または機能獲得のメカニズムが提案され、それぞれ異なる治療的取組を必要とすることが示唆された。我々の本実験は、疾患の原因としていずれのメカニズムも排除することはできないが、結果は、イヌのORF15突然変異モデルにおいて、明らかに遺伝子オーギュメンテーションが単独で疾患の防止、または進行の阻止、および変性プロセスの逆転に効果的であることを示している。このような基本的知見が、我々を橋渡し実験に向けて治療的に前進させ、同時に特異的な疾患メカニズムがさらに解明されることを待つようにする。

【0108】

我々の結果は、治療を桿体および錐体の光受容体に標的化することが、RPGR関連網膜疾患の機能のおよび構造的救済に必須であると強調している。治療遺伝子の発現を調節するhIRBPプロモーターは、両細胞型でレポーターおよび治療遺伝子の強固な発現をもたらす（特許文献8の図9、2および7のように再現される非特許文献87のそれぞれ図S5および図3およびS3のパネル6-8）、そして発現は持続する。IRBPもヒトの錐体で発現するので、我々は将来の橋渡し実験ではこのプロモーターを用いて桿体細胞および錐体細胞の効率的標的化を期待する。hGRK1プロモーターにより調節される場合、治療用の導入遺伝子発現は桿体細胞で低く、そして錐体細胞ではより程度が低い。残る光受容体構造は異常でも、未処置領域よりはかなり改善された。しかしGRK1はヒトの錐体細胞で発現するので、我々はGRKの標的化効率ヒトで上がると期待する。例えば引用により本明細書に編入する非特許文献88を参照にされたい。

【0109】

XLPA1では、疾患発症前の処置が疾患の発症を防いだ。さらに疾患発症後、そして同時に光受容細胞の死後にXLPA2の処置を進めると（TUNEL標識により測定した5wksで、細胞死が~50%の最大率）、疾患の進行を阻止し、そして残る光受容体の形態は正常に回復した。少なくとも実験した疾患の段階で、この治療ベクターは高度に効果的であり、そして橋渡しの応用のさらなる実験を保障する。両モデルで、hIRPB-hRPGR治療ベクターを用いた処置は、ヒト、マウスおよびイヌの疾患の特徴である桿体およびR/G錐体オプシンの誤局在化、および光受容細胞死の推定初期マーカーを防ぎ（XLPA1）または逆転した（XLPA2）。

【0110】

光受容体変性の特徴的形態は、OPL、双極細胞および内網膜層で進行的に変化する。これらは未処置領域で広がるが、特にAAV2/5-hIRPB-hRPGRベクターが使用された場合に処置領域では正常に逆転した。リモデリングの防止は、疾患の発症前にXLPA1網膜を処置すると起こり、一方、XLPA2では、初期OPLシナプス変化、双極細胞異常、および内網膜異常が処置で抑制され、そして正常な構造が続いて生じた。このように一次光受容体欠損の処置は、OPLおよび内網膜異常が防止または逆転されたように有益な下流の効果を有する。これは4匹の処置したイヌのうち3匹で記録された、改善されたレセプター後応答の理由となり得る。将来的に実験は、未処置領域の変性が、瞳孔測定および視覚誘発電位の使用、および最終的に視覚行動を用いるような視覚脳（visual brain）で処置の結果を試験できるようになる高齢まで処置後の追跡期間を延ばすべきである。XLPAのイヌモデルを対象とした、AAV2/5ベクターを含むRPGRORF15-XLRPおよび完全長のヒトRPGRORF15 cDNAの網膜下処置は、光受容体構造および機能の保護に効果的であった。

【実施例8】

【0111】

RPGR-XLRPの矯正遺伝子治療は中期疾患のイヌモデルを救済する

本発明者は次に、より進んだ疾患段階で送達される遺伝子治療でも正の結果を与えることができるかどうかを調査した。完全長のヒトRPGRORF15 cDNAをhIRBPプロモーターの制御下に持つAAV2/5ベクター構築物（力価：1.51 x 10¹¹ vg/ml）を、3匹の12-wk齢XLPA2のイヌに網膜下注入した。その週齢で、進行性の細胞死があり、そしてONL厚が~40%まで低下する。さらに1匹のXLP

A 2 のイヌには早期疾患段階の対照として疾患の発症直後（週齢 5 . 1 w k s ）に注入した。反対側の目には B S S が注入されるか、または同様の用量のウイルス構築物を硝子体内に受けるかのいずれかであった。光受容体構造および機能は、39 および 42 週齢でそれぞれ非侵襲的な網膜撮像（c S L O / S D - O C T ）および E R G により評価した。

【 0 1 1 2 】

インビボ網膜撮像では、処置した網膜領域に保存された O N L 厚を示した。桿体および錐体 E R G 機能は、対照よりも処置した目で高かった。両 O N L 厚および E R G 応答は、12 週齢で注入した 3 匹のイヌよりも 5 . 1 週で処置した動物で良く保存された。

【 0 1 1 3 】

これらの結果は、光受容体構造および網膜機能に及ぼす持続的かつ有益な効果が、X L R P 疾患の中期段階に R P G R 遺伝子オーギュメンテーションを送達した場合にも達成できることを示している。このことは患者が処置の時点でより進行した疾患を有するであろうと仮定すると、重要な橋渡しの応用を有する。

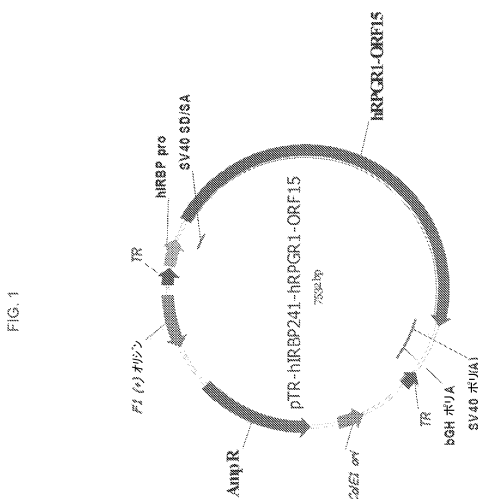
【 0 1 1 4 】

さらに説明しなくても、当業者は前述の説明および説明の実施例を使用して本発明の組成物を作成し、そして利用することができ、そして特許請求する方法を実施することができる。本発明を様々な具体的材料、手順および例を参照して本明細書に記載し、そして説明してきたが、本発明をその目的に選択された材料および手法の特定の組み合わせに限定することを意図しない。そのような詳細の多くの変形を当業者に想定されるように含むことができる。

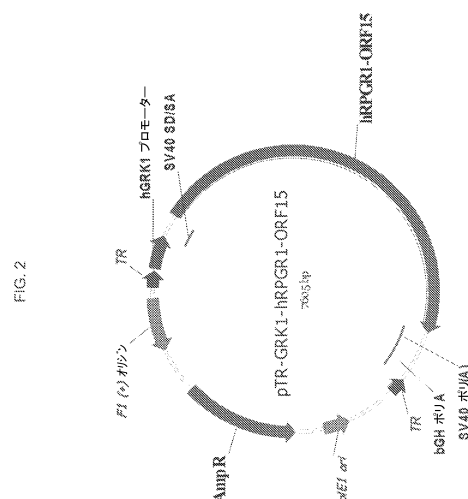
【 0 1 1 5 】

非特許文献 87 および特許文献 8、ならびにすべての特許、特許出願および他の参考文献は、本明細書で引用する配列表を含め、それら全部、引用により本明細書に編入する。

【 図 1 】



【 図 2 】



【図 3 - 1】

FIG. 3 (1/5)

```

1          50
hRPGR_BK005711_(Wright)  ATGAGGGAGC CGGAAGAGCT GATGCCCGAT TCGGTGCTG TGTTTACATT
hRPGR_Hauswirth/Boye     ATGAGGGAGC CGGAAGAGCT GATGCCCGAT TCGGTGCTG TGTTTACATT

51          100
hRPGR_BK005711_(Wright)  TGGGAAAAGT AAATTTGCTG AAAATAATCC CGGTAAATTC TGGTTTAAAA
hRPGR_Hauswirth/Boye     TGGGAAAAGT AAATTTGCTG AAAATAATCC CGGTAAATTC TGGTTTAAAA

101         150
hRPGR_BK005711_(Wright)  ATGATGTGCC TGTACATCTT TCATGTGGAG ATGAACATTC TCGTGTGTGT
hRPGR_Hauswirth/Boye     ATGATGTGCC TGTACATCTT TCATGTGGAG ATGAACATTC TCGTGTGTGT

151         200
hRPGR_BK005711_(Wright)  ACCGGAATAA ATAAACTTTA CATCTTTGCG AGTAACAAC TGGGTCAGTT
hRPGR_Hauswirth/Boye     ACCGGAATAA ATAAACTTTA CATCTTTGCG AGTAACAAC TGGGTCAGTT

201         250
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGGATTAGGA TCAAAGTCAG CCATCACCAA GCCAACATGT GTCAAAGCTC
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGGATTAGGA TCAAAGTCAG CCATCACCAA GCCAACATGT GTCAAAGCTC

251         300
hRPGR_BK005711_(Wright)  TAAAACCTGA AAAAGTGAAA TTAGCTGCCT GTGGAAGGAA CCACACCTCG
hRPGR_Hauswirth/Boye     TAAAACCTGA AAAAGTGAAA TTAGCTGCCT GTGGAAGGAA CCACACCTCG

301         350
hRPGR_BK005711_(Wright)  GTGTCAACAG AAGGAGGCAA TGTATATGCA ACTGGTGGAA ATAATGAAGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GTGTCAACAG AAGGAGGCAA TGTATATGCA ACTGGTGGAA ATAATGAAGG

351         400
hRPGR_BK005711_(Wright)  ACAGTTGGGG CTGTGGTACA CCGAAGAAAG AAACACITTT CATGTAAATTA
hRPGR_Hauswirth/Boye     ACAGTTGGGG CTGTGGTACA CCGAAGAAAG AAACACITTT CATGTAAATTA

401         450
hRPGR_BK005711_(Wright)  GCITTTTITAC ATCCGAGCAT AAGATTAAAG AGCTGTCTCG TGGATCTAAT
hRPGR_Hauswirth/Boye     GCITTTTITAC ATCCGAGCAT AAGATTAAAG AGCTGTCTCG TGGATCTAAT

451         500
hRPGR_BK005711_(Wright)  ACTTCACGCTG CCTCACTGGA GGATGGAAGA CTFTTTATGT GGGGTGACAA
hRPGR_Hauswirth/Boye     ACTTCACGCTG CCTCACTGGA GGATGGAAGA CTFTTTATGT GGGGTGACAA

501         550
hRPGR_BK005711_(Wright)  TTCCGAAGGG CAAATGGTGT TAAAAATGT  AAGTAATGTC TGTGTCCCTC
hRPGR_Hauswirth/Boye     TTCCGAAGGG CAAATGGTGT TAAAAATGT  AAGTAATGTC TGTGTCCCTC

551         600
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGCAAGTGAC CATTGGGAAA CCGTGTCTCT GGATCTCTTG TGGATATATAC
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGCAAGTGAC CATTGGGAAA CCGTGTCTCT GGATCTCTTG TGGATATATAC

601         650
hRPGR_BK005711_(Wright)  CATTCAGCCTT TTGTACAACAC AGATGGTGAG CTATATGTGT TTGGAGAACC
hRPGR_Hauswirth/Boye     CATTCAGCCTT TTGTACAACAC AGATGGTGAG CTATATGTGT TTGGAGAACC

651         700
hRPGR_BK005711_(Wright)  TGAGATGGGG AAGTATAGTC TTCCCAATCA GCTCCTGGGC AATCACAGAA
hRPGR_Hauswirth/Boye     TGAGATGGGG AAGTATAGTC TTCCCAATCA GCTCCTGGGC AATCACAGAA

```

【図 3 - 3】

FIG. 3 (3/5)

```

1501        1550
hRPGR_BK005711_(Wright)  AACATGACAC ACATCATGAG CCTGAATPCC AATGAAAAGT CATTAAAAAT
hRPGR_Hauswirth/Boye     AACATGACAC ACATCATGAG CCTGAATPCC AATGAAAAGT CATTAAAAAT

1551        1600
hRPGR_BK005711_(Wright)  ATACCAAGTT CAGAAACAAA AGAAACAACA AACAAITGGG GAATCGAACG
hRPGR_Hauswirth/Boye     ATACCAAGTT CAGAAACAAA AGAAACAACA AACAAITGGG GAATCGAACG

1601        1650
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGGATACAGC TCTTACTGAA AACGATGATA GTGATGAATA TGAAGAAATG
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGGATACAGC TCTTACTGAA AACGATGATA GTGATGAATA TGAAGAAATG

1651        1700
hRPGR_BK005711_(Wright)  TCAGAAATGA AAGAAAGCAA AGCATGTAAA CAACATGTGT CACAAGGAGT
hRPGR_Hauswirth/Boye     TCAGAAATGA AAGAAAGCAA AGCATGTAAA CAACATGTGT CACAAGGAGT

1701        1750
hRPGR_BK005711_(Wright)  TTTCATGACG CAGCCGACTA CGACTATCGA AGCATTTTCA GATGAGGAAG
hRPGR_Hauswirth/Boye     TTTCATGACG CAGCCGACTA CGACTATCGA AGCATTTTCA GATGAGGAAG

1751        1800
hRPGR_BK005711_(Wright)  TAGAGATCCC AGAGGAGAAAG CAAGGAGCAG AGGATTCAAA AGGAAATGGA
hRPGR_Hauswirth/Boye     TAGAGATCCC AGAGGAGAAAG CAAGGAGCAG AGGATTCAAA AGGAAATGGA

1801        1850
hRPGR_BK005711_(Wright)  ATAGAGGAGC AAGAGGTAGA AGCAAAATGAG GAAATGTGTA AGGTGCATGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     ATAGAGGAGC AAGAGGTAGA AGCAAAATGAG GAAATGTGTA AGGTGCATGG

1851        1900
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGGAAGAAAG GAGAAACACAG AGATCCTATC AGATGACCTT ACAGACAAAG
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGGAAGAAAG GAGAAACACAG AGATCCTATC AGATGACCTT ACAGACAAAG

1901        1950
hRPGR_BK005711_(Wright)  CAGAGGTGAG TGAAGGCCAAG GCAAAATCAG TGGGAGAAGC AGAGGATGGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     CAGAGGTGAG TGAAGGCCAAG GCAAAATCAG TGGGAGAAGC AGAGGATGGG

1951        2000
hRPGR_BK005711_(Wright)  CCTGAAGGTA GAGGGGATGG AACCTGTGAG GAAGGTAGTT CAGGACGAGA
hRPGR_Hauswirth/Boye     CCTGAAGGTA GAGGGGATGG AACCTGTGAG GAAGGTAGTT CAGGACGAGA

2001        2050
hRPGR_BK005711_(Wright)  ACACATGCCAA CATGAGGAGA GCGAGAAGCG CGAGAAAGAC AAGGGATGAG
hRPGR_Hauswirth/Boye     ACACATGCCAA CATGAGGAGA GCGAGAAGCG CGAGAAAGAC AAGGGATGAG

2051        2100
hRPGR_BK005711_(Wright)  GAGAAATGGA GAGGCCAGGA GAGGAGAGAG AGGAATAGC AGAGAAGGAA
hRPGR_Hauswirth/Boye     GAGAAATGGA GAGGCCAGGA GAGGAGAGAG AGGAATAGC AGAGAAGGAA

2101        2150
hRPGR_BK005711_(Wright)  GAATGTGAAG AGAGGGATGG GGAAGAGCAG GAGCAAAAGG AGAGGAGGCA
hRPGR_Hauswirth/Boye     GAATGTGAAG AGAGGGATGG GGAAGAGCAG GAGCAAAAGG AGAGGAGGCA

2151        2200
hRPGR_BK005711_(Wright)  GGCCCATCAG AAGGAAGAAA ACCAAGAGAT GGAGGAGGGA GGGGAGGAGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GGCCCATCAG AAGGAAGAAA ACCAAGAGAT GGAGGAGGGA GGGGAGGAGG

2201        2250
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGCATGTGGA AGGAGAAGAA GAGGAGGAG AGAGAGAAGA GGAAGAAGAG
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGCATGTGGA AGGAGAAGAA GAGGAGGAG AGAGAGAAGA GGAAGAAGAG

```

【図 3 - 2】

FIG. 3 (2/5)

```

701          750
hRPGR_BK005711_(Wright)  CACCCAGAGT GGTGTCTGAA ATTCGGGAGA AGGTGAATCA AGTACGCTGT
hRPGR_Hauswirth/Boye     CACCCAGAGT GGTGTCTGAA ATTCGGGAGA AGGTGAATCA AGTACGCTGT

751          800
hRPGR_BK005711_(Wright)  GGTGGAGAGC ATACTGTGGT TCTCACGGAG AATGCTGTGT ATACTTTGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GGTGGAGAGC ATACTGTGGT TCTCACGGAG AATGCTGTGT ATACTTTGG

801          850
hRPGR_BK005711_(Wright)  GCTGGGACAA TTTGGTCAGC TGGGCTTGG CACTTTTCTT TTGAAACTTT
hRPGR_Hauswirth/Boye     GCTGGGACAA TTTGGTCAGC TGGGCTTGG CACTTTTCTT TTGAAACTTT

851          900
hRPGR_BK005711_(Wright)  CAGAACCCAA AGTCATTGAG AATATTAGGG ATCAACAAT AAGTATATTT
hRPGR_Hauswirth/Boye     CAGAACCCAA AGTCATTGAG AATATTAGGG ATCAACAAT AAGTATATTT

901          950
hRPGR_BK005711_(Wright)  TCTTTGGGAG AAAATCACAC AGCTTTGATA ACAGATATCG GCCTTATGTA
hRPGR_Hauswirth/Boye     TCTTTGGGAG AAAATCACAC AGCTTTGATA ACAGATATCG GCCTTATGTA

951          1000
hRPGR_BK005711_(Wright)  TACTTTTGGG GAGGTCTGCC ACGGAAAAT AGGACTTGGG CTGAGAAATT
hRPGR_Hauswirth/Boye     TACTTTTGGG GAGGTCTGCC ACGGAAAAT AGGACTTGGG CTGAGAAATT

1001         1050
hRPGR_BK005711_(Wright)  TTACCAATCA CTTCATTCTT ACTTTGTGCT CTAATTTTTT GAGGTTTATA
hRPGR_Hauswirth/Boye     TTACCAATCA CTTCATTCTT ACTTTGTGCT CTAATTTTTT GAGGTTTATA

1051         1100
hRPGR_BK005711_(Wright)  GTTAAAITGG TTGCTTGTGG TGGATGTCAC ATGGTAGTTT TTGCTGCTCC
hRPGR_Hauswirth/Boye     GTTAAAITGG TTGCTTGTGG TGGATGTCAC ATGGTAGTTT TTGCTGCTCC

1101         1150
hRPGR_BK005711_(Wright)  TCATCGTGTG GTGGCAAAGG AAATTGAATT CGATGAAATA AATGATACCT
hRPGR_Hauswirth/Boye     TCATCGTGTG GTGGCAAAGG AAATTGAATT CGATGAAATA AATGATACCT

1151         1200
hRPGR_BK005711_(Wright)  GCITATCTGT GCGGACTTTT CTGCGGTATA GCGATTAAAC CTCAGAAATT
hRPGR_Hauswirth/Boye     GCITATCTGT GCGGACTTTT CTGCGGTATA GCGATTAAAC CTCAGAAATT

1201         1250
hRPGR_BK005711_(Wright)  GTACTGCGAG GACTCTATC AGCACGTATG CCGGGAAGAG AGAGGAGAGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GTACTGCGAG GACTCTATC AGCACGTATG CCGGGAAGAG AGAGGAGAGG

1251         1300
hRPGR_BK005711_(Wright)  GTCTCCAGAT TCTTTTCAA TGAGGAGAAC ACTACTTCCA ATAGAAAGGA
hRPGR_Hauswirth/Boye     GTCTCCAGAT TCTTTTCAA TGAGGAGAAC ACTACTTCCA ATAGAAAGGA

1301         1350
hRPGR_BK005711_(Wright)  CTCTTGCCCT TTCTGCTTGT TTCTTCCCCA ATTGACTTCT TCCAGATGCT
hRPGR_Hauswirth/Boye     CTCTTGCCCT TTCTGCTTGT TTCTTCCCCA ATTGACTTCT TCCAGATGCT

1351         1400
hRPGR_BK005711_(Wright)  TCTGAGAGAA ACCTCCAAGA GAGTGCTCTA TCTGACAGG ACCTCATGCA
hRPGR_Hauswirth/Boye     TCTGAGAGAA ACCTCCAAGA GAGTGCTCTA TCTGACAGG ACCTCATGCA

1401         1450
hRPGR_BK005711_(Wright)  GCCAGAGGAA CCAGATTATT TCGTAGATGA AATGACCAA GAAGCAGAGA
hRPGR_Hauswirth/Boye     GCCAGAGGAA CCAGATTATT TCGTAGATGA AATGACCAA GAAGCAGAGA

1451         1500
hRPGR_BK005711_(Wright)  TACATAATTC TTCAACTGTA GAAAGCCTTG GAGAAACTAC TGATATCTTA
hRPGR_Hauswirth/Boye     TACATAATTC TTCAACTGTA GAAAGCCTTG GAGAAACTAC TGATATCTTA

```

【図 3 - 4】

FIG. 3 (4/5)

```

2251         2300
hRPGR_BK005711_(Wright)  AAGGAGGAGG AAGGGAAAGA GGAGGAGAA GGGGAAAGG TGGAGGAGA
hRPGR_Hauswirth/Boye     AAGGAGGAGG AAGGGAAAGA GGAGGAGAA GGGGAAAGG TGGAGGAGA

2301         2350
hRPGR_BK005711_(Wright)  ACCTGAAAGG GAGGAGGAGG AGAGGAAAA GGAAGAAAG GCGGGAGAGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     ACCTGAAAGG GAGGAGGAGG AGAGGAAAA GGAAGAAAG GCGGGAGAGG

2351         2400
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGGAGAAAGG AGAGGAAAGA GGAGACCAAG GAGAGGGGGA AGAGGAGGAA
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGGAGAAAGG AGAGGAAAGA GGAGACCAAG GAGAGGGGGA AGAGGAGGAA

2401         2450
hRPGR_BK005711_(Wright)  ACAGAGGGGA GAGGGGAGGA AAAAGAGGAG GGAGGGGAGG TAGAGGGAGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     ACAGAGGGGA GAGGGGAGGA AAAAGAGGAG GGAGGGGAGG TAGAGGGAGG

2451         2500
hRPGR_BK005711_(Wright)  GGAAGTAGAG GAGGGGAAAG GAGAGAGGGA AGAGGAAGAG GAGGAGGGTG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GGAAGTAGAG GAGGGGAAAG GAGAGAGGGA AGAGGAAGAG GAGGAGGGTG

2501         2550
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGCGGGAAGA GAGGGAAGGG GAGGGGGAAG AGAGGGAAG GAGGGGAGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGCGGGAAGA GAGGGAAGGG GAGGGGGAAG AGAGGGAAG GAGGGGAGG

2551         2600
hRPGR_BK005711_(Wright)  GAGGAGGAGG GAGGAAGGGA AGGGGAGGAA GAAGGGGAGG AAGGAGAGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GAGGAGGAGG GAGGAAGGGA AGGGGAGGAA GAAGGGGAGG AAGGAGAGG

2601         2650
hRPGR_BK005711_(Wright)  GGAGGAGGAA GGGGAGGAGG GAGAGGGGGA GGGGAGAGG GAGGAGGAGG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GGAGGAGGAA GGGGAGGAGG GAGAGGGGGA GGGGAGAGG GAGGAGGAGG

2651         2700
hRPGR_BK005711_(Wright)  AAGGGGAGGG AGAAGAGGAA GGAGAGGGGG AGGGAAGAAG AGAGGAGGAA
hRPGR_Hauswirth/Boye     AAGGGGAGGG AGAAGAGGAA GGAGAGGGGG AGGGAAGAAG AGAGGAGGAA

2701         2750
hRPGR_BK005711_(Wright)  GAAGGGGAGG GAGAAAGGGA AGGAGAGGGG GAGGGGAGAG AGGAGAGGAG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GAAGGGGAGG GAGAAAGGGA AGGAGAGGGG GAGGGGAGAG AGGAGAGGAG

2751         2800
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGAAGGGAAA GGGGAGGAGG AAGGAGGAGA AGGAGAGGG GAGGGGAGAG
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGAAGGGAAA GGGGAGGAGG AAGGAGGAGA AGGAGAGGG GAGGGGAGAG

2801         2850
hRPGR_BK005711_(Wright)  AGAGGAGGAG AGAAGGGGGA GGGGAGGAGT GGAAGGGGGA GGGGAGGAG
hRPGR_Hauswirth/Boye     AGAGGAGGAG AGAAGGGGGA GGGGAGGAGT GGAAGGGGGA GGGGAGGAG

2851         2900
hRPGR_BK005711_(Wright)  GAGGAAGGAG AATGGAGGGG GAGGAGGAGA GGAGAGGGGG AGGGGAGGAA
hRPGR_Hauswirth/Boye     GAGGAAGGAG AATGGAGGGG GAGGAGGAGA GGAGAGGGGG AGGGGAGGAA

2901         2950
hRPGR_BK005711_(Wright)  GGAAGGAGAA GGGGAGGGGG AGGAAGGAGA AGGGGAGGG GAAGGAGGAG
hRPGR_Hauswirth/Boye     GGAAGGAGAA GGGGAGGGGG AGGAAGGAGA AGGGGAGGG GAAGGAGGAG

2951         3000
hRPGR_BK005711_(Wright)  AAGGAGAGG GGGGAGGGGA GAGGAGGAAG GGAAGAAGA AGGGGAGGAA
hRPGR_Hauswirth/Boye     AAGGAGAGG GGGGAGGGGA GAGGAGGAAG GGAAGAAGA AGGGGAGGAA

3001         3050
hRPGR_BK005711_(Wright)  GAAGGAGAGG GAGGAGGAAG AGGGGAGGGA GAGGGGAGG AAGGAGAGGA
hRPGR_Hauswirth/Boye     GAAGGAGAGG GAGGAGGAAG AGGGGAGGGA GAGGGGAGG AAGGAGAGGA

```

【図 3 - 5】

FIG. 3 (5/5)

```

3051                AGGGGAAGTG GAAGGGGAGG TGGGAAGGGA GGAAGGAGAG GGGGAAGGAG      3100
hrPGR_BK005711_(Wright) AGGGGAAGTG GAAGGGGAGG TGGGAAGGGA GGAAGGAGAG GGGGAAGGAG
hrPGR_Hauswirth/Boye

3101                3150
hrPGR_BK005711_(Wright) AGGAAGAGCA AGGAGAGGAG GAAGGAGAAG AAAGCGAAAA GGAGGGGGAA
hrPGR_Hauswirth/Boye AGGAAGAGCA AGGAGAGGAG GAAGGAGAAG AAAGCGAAAA GGAGGGGGAA

3151                3200
hrPGR_BK005711_(Wright) GGAGAAGAAA ACAGGAGGAA CAGAGAAGAG GAGGAGGAAG AAGAGGGGAA
hrPGR_Hauswirth/Boye GGAGAAGAAA ACAGGAGGAA CAGAGAAGAG GAGGAGGAAG AAGAGGGGAA

3201                3250
hrPGR_BK005711_(Wright) GTATCAGGAG ACAGGCGAAG AAGAGAATGA AAGGCAAGGAT GGAGAGGAGT
hrPGR_Hauswirth/Boye GTATCAGGAG ACAGGCGAAG AAGAGAATGA AAGGCAAGGAT GGAGAGGAGT

3251                3300
hrPGR_BK005711_(Wright) ACAAAAAAGT GAGCAAAATA AAAGGATCTG TGAATATGCG CAACATAAAA
hrPGR_Hauswirth/Boye ACAAAAAAGT GAGCAAAATA AAAGGATCTG TGAATATGCG CAACATAAAA

3301                3350
hrPGR_BK005711_(Wright) ACATATCAAA AAAAGTCAGT TACTAACACA CAGGGAATG GGAAGAGCA
hrPGR_Hauswirth/Boye ACATATCAAA AAAAGTCAGT TACTAACACA CAGGGAATG GGAAGAGCA

3351                3400
hrPGR_BK005711_(Wright) GAGGTCCAAA ATGCCAGTCC AGTCAAAACG ACTTTAAAAA AACGGGCCAT
hrPGR_Hauswirth/Boye GAGGTCCAAA ATGCCAGTCC AGTCAAAACG ACTTTAAAAA AACGGGCCAT

3401                3450
hrPGR_BK005711_(Wright) CAGGTTCCAA AAGATCTCGT AATAATGTAT TACCACATTA CTTCGAATTG
hrPGR_Hauswirth/Boye CAGGTTCCAA AAGATCTCGT AATAATGTAT TACCACATTA CTTCGAATTG

3451
hrPGR_BK005711_(Wright) AAGTAA
hrPGR_Hauswirth/Boye AAGTAA

```

【図 4 - 1】

FIG. 4 (1/2)

Alignment of amino acid sequence for human RPGR variant Hauswirth/Boye no top and variant BK005711(Wright) on bottom.

```

1                50
hrPGR_Hauswirth/Boye MREPEELMPD SGAVFTFGKS KFAENNPCKF WFKNDVPVHL SCGDHSAGVV
hrPGR_(BK005711_Wright) MREPEELMPD SGAVFTFGKS KFAENNPCKF WFKNDVPVHL SCGDHSAGVV

51                100
hrPGR_Hauswirth/Boye TGNKLYMPG SNWAGQLGLG SKSAISKPTC VKALKPEKVK LAACGRNHTL
hrPGR_(BK005711_Wright) TGNKLYMPG SNWAGQLGLG SKSAISKPTC VKALKPEKVK LAACGRNHTL

101                150
hrPGR_Hauswirth/Boye VSTEGGNVYA TGGNNEGQLG LGDTERTNTP HVISFTTSEH KIKQLSAGSN
hrPGR_(BK005711_Wright) VSTEGGNVYA TGGNNEGQLG LGDTERTNTP HVISFTTSEH KIKQLSAGSN

151                200
hrPGR_Hauswirth/Boye TSAALTEDGR LPMWGDMSDG QIGLKNVSNV CVPQQVTIGK FVSWISCGYV
hrPGR_(BK005711_Wright) TSAALTEDGR LPMWGDMSDG QIGLKNVSNV CVPQQVTIGK FVSWISCGYV

201                250
hrPGR_Hauswirth/Boye HSAFVTTDGE LYVPGEPENG KLGLPNQLLG NHPTQLVSE IPEKVIQVAC
hrPGR_(BK005711_Wright) HSAFVTTDGE LYVPGEPENG KLGLPNQLLG NHPTQLVSE IPEKVIQVAC

251                300
hrPGR_Hauswirth/Boye GGEHTVVLTE NAVITFGLGQ FGQLGLGTFI FETSEPKVIE NIRDQTISIY
hrPGR_(BK005711_Wright) GGEHTVVLTE NAVITFGLGQ FGQLGLGTFI FETSEPKVIE NIRDQTISIY

301                350
hrPGR_Hauswirth/Boye SCGENHTALI TDIGLMTYFG DGRHGKLG LGNFTNHFIP TICSNFLRFI
hrPGR_(BK005711_Wright) SCGENHTALI TDIGLMTYFG DGRHGKLG LGNFTNHFIP TICSNFLRFI

351                400
hrPGR_Hauswirth/Boye VKLVACGGCH MVVFAAPHRG VAREIEFDEI NDTCLSVATF LPYSLSLTGN
hrPGR_(BK005711_Wright) VKLVACGGCH MVVFAAPHRG VAREIEFDEI NDTCLSVATF LPYSLSLTGN

401                450
hrPGR_Hauswirth/Boye VLQRTLSARM RRRERERSPD SFSMRRTLFP IEGTLGLSAC PLPNSVFPFC
hrPGR_(BK005711_Wright) VLQRTLSARM RRRERERSPD SFSMRRTLFP IEGTLGLSAC PLPNSVFPFC

451                500
hrPGR_Hauswirth/Boye SSRNLQESVL SEQDLMQPEE PVIYLDENTK EADINNSTV ESIGETTDIL
hrPGR_(BK005711_Wright) SSRNLQESVL SEQDLMQPEE PVIYLDENTK EADINNSTV ESIGETTDIL

501                550
hrPGR_Hauswirth/Boye NMTHIMSLNS NEKSLKLSFV QKQKQQTIG ELTQDTALTE NDDSDVEYEM
hrPGR_(BK005711_Wright) NMTHIMSLNS NEKSLKLSFV QKQKQQTIG ELTQDTALTE NDDSDVEYEM

551                600
hrPGR_Hauswirth/Boye SEMKSGKACK QHVSQGLFMT QPATTIEAFS DEEVEIPEEK SGAEBSKNG
hrPGR_(BK005711_Wright) SEMKSGKACK QHVSQGLFMT QPATTIEAFS DEEVEIPEEK SGAEBSKNG

601                650
hrPGR_Hauswirth/Boye IEQEVEANE ENVKVHGGRK EKTETLSDDL TKAEVSEGK AKSVGEAEDG
hrPGR_(BK005711_Wright) IEQEVEANE ENVKVHGGRK EKTETLSDDL TKAEVSEGK AKSVGEAEDG

651                700
hrPGR_Hauswirth/Boye PEGRGDGTCE EGSSGASHWQ DEEREKGEKD KGRGEMERFG EGEEKLAERE
hrPGR_(BK005711_Wright) PEGRGDGTCE EGSSGASHWQ DEEREKGEKD KGRGEMERFG EGEEKLAERE

701                750
hrPGR_Hauswirth/Boye EWKKRDCEEQ EQKEREQCHQ KERNQEMEEG GEEHGESEGE EGDREZEEER
hrPGR_(BK005711_Wright) EWKKRDCEEQ EQKEREQCHQ KERNQEMEEG GEEHGESEGE EGDREZEEER

```

【図 4 - 2】

FIG. 4 (2/2)

```

751                800
hrPGR_Hauswirth/Boye KEGSGKEEGE GEEVEGEREK EGERKKKEER AKGKEGKEE GDQGESEEEE
hrPGR_(BK005711_Wright) KEGSGKEEGE GEEVEGEREK EGERKKKEER AKGKEGKEE GDQGESEEEE

801                850
hrPGR_Hauswirth/Boye TEGRGEKEKE GGEVGGGEVE EOKGEREEBE EEGSGDEEKG EGEESEGEKG
hrPGR_(BK005711_Wright) TEGRGEKEKE GGEVGGGEVE EOKGEREEBE EEGSGDEEKG EGEESEGEKG

851                900
hrPGR_Hauswirth/Boye .....KGE EGEEGGSEB GEEGEGEGEB EEGSGDEEKG EGEE...EBG
hrPGR_(BK005711_Wright) .....KGE EGEEGGSEB GEEGEGEGEB EEGSGDEEKG EGEE...EBG

901                950
hrPGR_Hauswirth/Boye EGGEREGEGK E.EEGGEVE GEVGEEGKG EGEEEGEGEE EGEESEGEKG
hrPGR_(BK005711_Wright) EGGEREGEGK E.EEGGEVE GEVGEEGKG EGEEEGEGEE EGEESEGEKG

951                1000
hrPGR_Hauswirth/Boye EEE...EGEE EGEEEGEGEG GEEGEGEGEG EGEEEGEGEG EGEESEGEKG
hrPGR_(BK005711_Wright) EEE...EGEE EGEEEGEGEG GEEGEGEGEG EGEEEGEGEG EGEESEGEKG

1001                1050
hrPGR_Hauswirth/Boye EER...EKEG EGEEEGEGEE GEVEGEVEGE EGEEEGEGEE EGEESEGERK
hrPGR_(BK005711_Wright) EER...EKEG EGEEEGEGEE GEVEGEVEGE EGEEEGEGEE EGEESEGERK

1051                1100
hrPGR_Hauswirth/Boye EGEGENNRNN REEEEEEKKG YQETGEEENR RQDGEYKVK SKIKGSVKYG
hrPGR_(BK005711_Wright) EGEGENNRNN REEEEEEKKG YQETGEEENR RQDGEYKVK SKIKGSVKYG

1101                1150
hrPGR_Hauswirth/Boye KHKTQKKSV TINTQNGKEQ RSMPVQSKR LLKNGPSGSK KFWNNVLPFY
hrPGR_(BK005711_Wright) KHKTQKKSV TINTQNGKEQ RSMPVQSKR LLKNGPSGSK KFWNNVLPFY

1151
hrPGR_Hauswirth/Boye LELK
hrPGR_(BK005711_Wright) LELK

```

【図 5】

FIG. 5

```

(845)                (845)                (845)                (845)                (845)                (845)
hrPGR_Hauswirth/Boye KEGSGKEEGE GEEVEGEREK EGERKKKEER AKGKEGKEE GDQGESEEEE
hrPGR_BK005711_Wright KEGSGKEEGE GEEVEGEREK EGERKKKEER AKGKEGKEE GDQGESEEEE
コンセンサス KEGSGKEEGE GEEVEGEREK EGERKKKEER AKGKEGKEE GDQGESEEEE

(912)                (912)                (912)                (912)                (912)                (912)
hrPGR_Hauswirth/Boye TEGRGEKEKE GGEVGGGEVE EOKGEREEBE EEGSGDEEKG EGEESEGEKG
hrPGR_BK005711_Wright TEGRGEKEKE GGEVGGGEVE EOKGEREEBE EEGSGDEEKG EGEESEGEKG
コンセンサス TEGRGEKEKE GGEVGGGEVE EOKGEREEBE EEGSGDEEKG EGEESEGEKG

(979)                (979)                (979)                (979)                (979)                (979)
hrPGR_Hauswirth/Boye .....KGE EGEEGGSEB GEEGEGEGEB EEGSGDEEKG EGEE...EBG
hrPGR_BK005711_Wright .....KGE EGEEGGSEB GEEGEGEGEB EEGSGDEEKG EGEE...EBG
コンセンサス .....KGE EGEEGGSEB GEEGEGEGEB EEGSGDEEKG EGEE...EBG

(1030)                (1030)                (1030)                (1030)                (1030)                (1030)
hrPGR_Hauswirth/Boye EGGEREGEGK E.EEGGEVE GEVGEEGKG EGEEEGEGEE EGEESEGEKG
hrPGR_BK005711_Wright EGGEREGEGK E.EEGGEVE GEVGEEGKG EGEEEGEGEE EGEESEGEKG
コンセンサス EGGEREGEGK E.EEGGEVE GEVGEEGKG EGEEEGEGEE EGEESEGEKG

(1046)                (1046)                (1046)                (1046)                (1046)                (1046)
hrPGR_Hauswirth/Boye EEE...EGEE EGEEEGEGEG GEEGEGEGEG EGEEEGEGEG EGEESEGEKG
hrPGR_BK005711_Wright EEE...EGEE EGEEEGEGEG GEEGEGEGEG EGEEEGEGEG EGEESEGEKG
コンセンサス EEE...EGEE EGEEEGEGEG GEEGEGEGEG EGEEEGEGEG EGEESEGEKG

```

【配列表】

0006199965000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 2 1

- (72)発明者 ベルトラン, ウィリアム・エイ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 4 7 フィラデルフィア・アパートメントナンバー 8 1 1・
 サウスセカンドストリート 5 3 0
- (72)発明者 アギーレ, グスタボ・デー
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 5 1 フィラデルフィア・オーバーブルックアベニュー 6 4
 1 9
- (72)発明者 ジャコブソン, サミュエル・ジー
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 7 2 ペンバリー・センテニアルロード 1 2 2 9
- (72)発明者 シデシヤン, アーサー・ブイ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 フィラデルフィア・ノースサティナインズストリート
 5 1
- (72)発明者 リューイン, アルフレッド・エス
 アメリカ合衆国フロリダ州 3 2 6 0 5 ゲインズビル・ノースウエストイレブンスロード 1 8 5 0
- (72)発明者 ボーイ, サンフオード・エル
 アメリカ合衆国フロリダ州 3 2 6 0 8 ゲインズビル・サウスウエストフォーティファーストアベニ
 ュー 1 0 2 0 6
- (72)発明者 ハウスワース, ウィリアム・ダブリュー
 アメリカ合衆国フロリダ州 3 2 6 0 8 ゲインズビル・サウスウエストエイティナインズストリート
 1 2 0 0 1
- (72)発明者 デン, ウエン - タオ
 アメリカ合衆国フロリダ州 3 2 6 0 8 ゲインズビル・サウスウエストエイティファイフズストリート
 6 2 3 1

審査官 伊藤 基章

- (56)参考文献 特開平 0 8 - 1 5 7 4 9 3 (J P , A)
 特表 2 0 0 9 - 5 3 7 6 1 2 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 0 / 0 9 7 2 0 1 (W O , A 1)
 PNAS, 2012, vol.109, No.6, p.2132-2137, Supporting Information[online], p.1-7, <URL:ht
 tp://www.pnas.org/cgi/content/short/1118847109>
 GenBank, BK005711.1, 2006,[online], [2016.10.20検索], U R L , http://www.ncbi.nlm.nih.
 gov/nuccore/BK005711

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 7 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 A 6 1 K 3 5 / 0 0
 A 6 1 K 3 8 / 0 0
 A 6 1 K 4 8 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 G I A S