

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-525721
(P2024-525721A)

(43)公表日 令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/60 (2006.01)	C 1 2 N	15/60	Z N A	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全69頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-501712(P2024-501712)	(71)出願人	517271175	メイラグティーエックス ユーケー アイ アイ リミテッド イギリス国, ロンドン エヌ1 7エヌキ ュー, ブリタニア ウォーク 9 2	
(86)(22)出願日	令和4年7月13日(2022.7.13)	(74)代理人	100099759		
(85)翻訳文提出日	令和6年3月11日(2024.3.11)	(74)代理人	弁理士 青木 篤		
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/056458	(74)代理人	100123582		
(87)国際公開番号	WO2023/285987	(74)代理人	弁理士 三橋 真二	100117019 弁理士 渡辺 陽一 100141977 弁理士 中島 勝 100138210 弁理士 池田 達則	
(87)国際公開日	令和5年1月19日(2023.1.19)	(74)代理人	100117019		
(31)優先権主張番号	63/221,883	(74)代理人	弁理士 渡辺 陽一		
(32)優先日	令和3年7月14日(2021.7.14)	(74)代理人	100141977		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 中島 勝		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100138210	弁理士 池田 達則 最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 R E T G C 遺伝子治療

(57)【要約】

本明細書では、網膜膜結合型グアニリルシクラーゼ 1 (R e t G C 1) の発現のための発現コンストラクト、ウイルスゲノム、及びベクター、ならびに本明細書で開示されるベクターを含む医薬組成物が提供される。また、本明細書に開示される発現コンストラクト及びベクターを使用する方法であって、網膜疾患の治療を必要とする対象における網膜疾患を治療する方法を含み、網膜疾患は、 G U C Y 2 D 遺伝子における 1 つ以上の変異に関連しており、本明細書に開示されるベクターを対象に投与することを含む、方法が提供される。

【選択図】 図 1

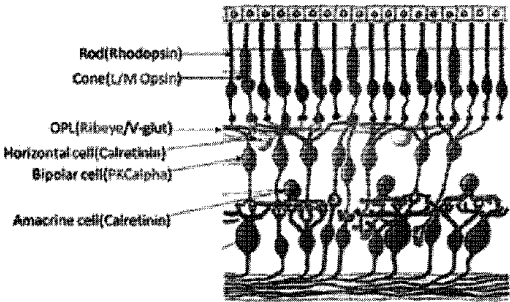


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 光受容体細胞に発現を与えるプロモーター配列、及び

(b) 網膜膜結合型グアニリルシクラーゼ 1 (RetGC1) をコードする核酸配列；を含む発現コンストラクトであって、前記核酸配列は前記プロモーターに作動可能に連結されている、前記発現コンストラクト。

【請求項 2】

前記プロモーター配列が、ロドプシンキナーゼ (RK) またはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配列である、請求項 1 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 3】

前記プロモーター配列が、配列番号 7 と少なくとも 90 % 同一である配列を含む、請求項 2 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 4】

前記プロモーター配列が、配列番号 7 を含む、請求項 3 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 5】

前記プロモーター配列が、配列番号 8 と少なくとも 90 % 同一である配列を含む、請求項 2 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 6】

前記プロモーター配列が、配列番号 8 を含む、請求項 5 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクトであって、転写後調節エレメントをさらに含む、前記発現コンストラクト。

【請求項 8】

前記転写後調節エレメントが、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) を含む、請求項 7 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 9】

前記転写後調節エレメントが、配列番号 10 と少なくとも 90 % 同一である配列を含む、請求項 7 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 10】

前記転写後調節エレメントが、配列番号 10 を含む、請求項 9 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 11】

前記 RetGC1 をコードする前記核酸配列が、野生型 RetGC1 遺伝子である、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクト。

【請求項 12】

前記 RetGC1 をコードする前記核酸配列が、コドン最適化配列である、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクト。

【請求項 13】

前記 RetGC1 をコードする前記核酸配列が、配列番号 9、配列番号 13 または配列番号 14 と少なくとも 90 % 同一である配列を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクト。

【請求項 14】

前記 RetGC1 をコードする前記核酸配列が、配列番号 9、配列番号 13 または配列番号 14 を含む、請求項 13 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 15】

前記 RetGC1 をコードする前記核酸配列が、配列番号 12 と少なくとも 90 % 同一である配列を含むタンパク質をコードする、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクト。

【請求項 16】

前記 RetGC1 をコードする前記核酸配列が、配列番号 12 を含むタンパク質をコー

10

20

30

40

50

ドする、請求項 15 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクトであって、ポリアデニル化シグナルをさらに含む、前記発現コンストラクト。

【請求項 18】

前記ポリアデニル化シグナルが、ウシ成長ホルモンポリアデニル化（BGH-ポリA）シグナルを含む、請求項 17 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 19】

前記ポリアデニル化シグナルが、配列番号 11 と少なくとも 90 % 同一である配列を含む、請求項 17 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 20】

前記ポリアデニル化シグナルが、配列番号 11 を含む、請求項 19 に記載の発現コンストラクト。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクトであって、配列番号 1 ～ 4 からなる群から選択される配列と少なくとも 90 % 同一である配列を含む、前記発現コンストラクト。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の発現コンストラクトであって、配列番号 1 ～ 4 からなる群から選択される配列を含む、前記発現コンストラクト。

【請求項 23】

請求項 1 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の発現コンストラクトを含む、ベクター。

【請求項 24】

請求項 23 に記載のベクターであって、ウイルスベクターである、前記ベクター。

【請求項 25】

請求項 24 に記載のベクターであって、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、前記ベクター。

【請求項 26】

請求項 25 に記載のベクターであって、AAV 血清型 AAV2 に由来するゲノムを含む、前記ベクター。

【請求項 27】

AAV7m8 由来のキャプシドを含む、請求項 25 または 26 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 28】

請求項 23 ～ 27 のいずれか 1 項に記載のベクター及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 29】

網膜疾患の治療を必要とする対象における網膜疾患を治療するための方法であって、前記網膜疾患は、GUCY2D 遺伝子における 1 つ以上の変異と関連しており、請求項 23 ～ 27 のいずれか 1 項に記載のベクターまたは請求項 28 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 30】

前記網膜疾患が、錐体桿体ジストロフィー（CRD）またはレーバー先天性黒内障 1 型（LCA1）である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記網膜疾患が、LCA1 である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

桿体 cGMP 特異的 3', 5'-環状ホスホジエステラーゼサブユニット β （PDE6 β ）の発現の増加を必要とする対象における桿体 cGMP 特異的 3', 5'-環状ホスホジエステラーゼサブユニット β （PDE6 β ）の発現を増加させる方法であって、請求項 23

10

20

30

40

50

～ 27 のいずれか 1 項に記載のベクターまたは請求項 28 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 33】

光受容体における環状グアノシンーリン酸（cGMP）レベルの増加を必要とする対象における、光受容体における環状グアノシンーリン酸（cGMP）レベルを増加させる方法であって、請求項 23～27 のいずれか 1 項に記載のベクターまたは請求項 28 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 34】

前記ベクターまたは前記医薬組成物を、眼内注射によって投与する、請求項 29～33 のいずれかに記載の方法。

【請求項 35】

前記ベクターまたは前記医薬組成物を、前記対象の網膜中心に注射する、請求項 34 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、一般に、分子生物学及び医学の分野に関する。より具体的には、本開示は、網膜疾患の治療のための遺伝子治療のための組成物及び方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

網膜膜結合型グアニリルシクラーゼ（RetGC）は、光受容体外節の円板膜に位置し、光受容体生理学における重要な酵素の 1 つであり、哺乳動物の桿体及び錐体において光伝達のセカンドメッセンジャーである環状グアノシンーリン酸（cGMP）を産生する。光受容体の興奮と回復の間、2 つの RetGC アイソザイム、すなわち RetGC1 及び RetGC2（それぞれ GC-E 及び GC-F、または ROSGC1 及び ROSGC2 としても知られる）は、グアニリルシクラーゼ活性化タンパク質（GCAP）によって媒介されるカルシウムフィードバックによって厳密に調節される。

【0003】

RetGC をコードする遺伝子である GUCY2D における 100 を超える変異は、2 つの主要な疾患、すなわち常染色体劣性レーバー先天性黒内障 1 型（arLCA もしくは LCA1）または常染色体優性錐体桿体ジストロフィー（adCRD）を引き起こすことが知られている。CRD では、錐体で変性が始まり、罹患していない網膜の黄斑に錐体が多く存在するため、中心視野の喪失につながる。錐体の変性に続いて桿体に変性すると、CRD は完全な失明につながる可能性がある。LCA1 表現型はさらにより重度であるとみられ、光受容体機能の喪失及び失明が幼児期に現れる。

【0004】

したがって、GUCY2D 変異（LCA1 及び CRD を含むが、これらに限定されない）に関連する網膜疾患の治療のための新規治療法が緊急に必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

一態様では、本開示は、以下：（a）光受容体細胞において発現を与えるプロモーター配列、及び（b）網膜膜結合型グアニリルシクラーゼ 1（RetGC1）をコードする核酸配列；を含む発現コンストラクトであって、核酸配列はプロモーターに作動可能に連結されている、発現コンストラクトを提供する。

【0006】

一実施形態では、プロモーター配列は、ロドプシンキナーゼ（RK）またはサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列である。

【0007】

一実施形態では、プロモーター配列は、配列番号 7 と少なくとも 90% 同一である配列を含む。一実施形態では、プロモーター配列は配列番号 7 を含む。

10

20

30

40

50

【0008】

一実施形態では、プロモーター配列は、配列番号8と少なくとも90%同一である配列を含む。一実施形態では、プロモーター配列は配列番号8を含む。

【0009】

一実施形態では、発現コンストラクトは転写後調節エレメントをさらに含む。一実施形態では、転写後調節因子は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む。一実施形態では、転写後調節エレメントは、配列番号10と少なくとも90%同一である配列を含む。一実施形態では、転写後調節エレメントは配列番号10を含む。

【0010】

一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、野生型RetGC1（GUCY2D）遺伝子由来のコード配列（cds）である。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、コドン最適化配列である。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号9と少なくとも90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号9を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号13と少なくとも90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号13を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号14と少なくとも90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号14を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号12と少なくとも90%同一である配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号12を含むタンパク質をコードする。

【0011】

一実施形態では、発現コンストラクトは、ポリアデニル化シグナルをさらに含む。実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化（BGH-ポリA）シグナルを含む。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号11と少なくとも90%同一である配列を含む。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号11を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、発現コンストラクトは、配列番号1～4からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、発現コンストラクトは、配列番号1～4からなる群から選択される配列を含む。

【0013】

一態様では、本明細書に開示される発現コンストラクトを含むベクターを提供する。実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。一実施形態では、ベクターは、AAV血清型AAV2に由来するゲノムを含む。一実施形態では、ベクターは、AAV 7m8由来のキャプシドを含む。

【0014】

一態様では、本明細書に開示されるベクター及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0015】

一態様では、網膜疾患の治療を必要とする対象における網膜疾患を治療するための方法であって、網膜疾患は、GUCY2D遺伝子における1つ以上の変異と関連しており、本明細書に開示されるベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、網膜疾患は錐体桿体ジストロフィー（CRD）またはレーバー先天性黒内障1型（LCA1）である。一実施形態では、網膜疾患はLCA1である。

【0016】

一態様では、桿体 c G M P 特異的 3', 5'-環状ホスホジエステラーゼサブユニット β (P D E 6 β) の発現の増加を必要とする対象における桿体 c G M P 特異的 3', 5'-環状ホスホジエステラーゼサブユニット β (P D E 6 β) の発現を増加させる方法であって、本明細書に開示されるベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0017】

一態様では、光受容体における環状グアノシンーリン酸 (c G M P) レベルの増加を必要とする対象における光受容体における環状グアノシンーリン酸 (c G M P) レベルを増加させる方法であって、本明細書に開示されるベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0018】

実施形態では、ベクターまたは医薬組成物は、眼内注射によって投与する。実施形態では、ベクターまたは医薬組成物は、対象の網膜中心に注射する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】細胞層を示すヒト網膜の概略図を示す。

【図2】20週目の野生型 (W T) 網膜オルガノイド及び R e t G C K O i P S C 網膜オルガノイドを示す。上列：W T と R e t G C K O の両方で、周辺縁に外節の「刷縁」を有するオルガノイド全体を示す明視野画像。中列。錐体及び桿体の外節及び内節は、錐体オブシン及びロドブシンで染色されている。外網状層 (O P L) 及び内網状層 (I P L) のシナプスは、R i b e y e 及び V G l u t で染色されている。双極細胞及びアマクリン／神経節細胞は、P K C α 及びカルレチニンで染色されている。R e t G C は、W T オルガノイドでは光受容体外節に局在し、R e t G C K O オルガノイドでは存在しない。

【図3】対照オルガノイド及び R e t G C K O オルガノイドにおいて40日目から220日目までのW T オルガノイド及び R e t G C K O オルガノイド全体における総タンパク質発現 (ウェスタンブロット) を示す (β チューブリンに対して正規化)。

【図4】A A V 7 m 8 キャプシドにパッケージ化された4つの導入遺伝子カセットの設計を示す。R K プロモーター及び C M V プロモーターは、W T G U C Y 2 D 遺伝子とともに、W P R E エlement及びウシ成長ホルモンポリアデニル化 (B G H -ポリA) シグナルを含むかまたは含まずに、組み込まれている。

【図5】W T オルガノイド及び形質導入 R e t G C K O オルガノイドにおける P D E 6 染色強度を示す。ロドブシン及び P D E 6 β で染色した網膜オルガノイド外節の代表的な画像。

【図6】ロドブシン陽性外節内の P D E 6 β 染色強度についての定量的免疫蛍光を示す。各点は、個々のオルガノイドのタイルスキャンを表す。染色強度は、同じブロック上で処理、染色、及び画像化されたW T オルガノイドのパーセンテージとして表す。

【図7】7 m 8 ベクターによる形質導入後の網膜オルガノイドにおける R e t G C 及び β チューブリン (ハウスキーピング) のタンパク質発現を決定するためのウェスタンブロットの結果を示す。 β チューブリンに対する R e t G C のウェスタンブロットシグナルのレシオメトリック、デンストメトリー定量化を示す。

【図8】F R E T アッセイによる c G M P 濃度 [n M] の定量化を示す。吸光度読み取り値を、総タンパク質量 [u g] に対して正規化した。W T オルガノイド対 R e t G C ノックアウト (非形質導入 N T) オルガノイドを、4つのベクターで形質導入されたオルガノイドと比較した (各実験群につき n = 7 胚様体 (E B))。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本明細書では、網膜膜結合型グアニリルシクラーゼ 1 (R e t G C 1) の発現のための発現コンストラクト、ウイルスゲノム、及びベクター、ならびに G U C Y 2 D 遺伝子の1つ以上の変異に関連する網膜疾患を治療するために発現コンストラクト、ウイルスゲノム

10

20

30

40

50

、及びベクターを使用する方法が提供される。

【0021】

RetGC

RetGCは、光受容体の桿体及び錐体におけるcGMPの合成を触媒する。このように、RetGCは視覚サイクル中のcGMP補充を媒介することにより、光伝達において必須の役割を果たす。

【0022】

光受容体の興奮と回復の間、2つのRetGCアイソザイム、すなわちRetGC1及びRetGC2（それぞれGC-E及びGC-F、またはROSGC1及びROSGC2としても知られる）は、グアニリルシクラーゼ活性化タンパク質（GCAP）によって媒介されるカルシウムフィードバックによって厳密に調節される。

【0023】

RetGC1の役割は、光曝露後にcGMPレベルを補充することである。暗所では、cGMPレベルは一定の比率で維持され、cGMPゲートチャネルを開口させたままに保ち、内向き電流の流入を可能にすることで細胞の部分的な脱分極を維持する。光に曝露されると、cGMPの加水分解及びチャネル閉鎖がもたらされ、細胞内 Ca^{2+} の急激な減少及び細胞の過分極が促進される。低 Ca^{2+} 濃度下では、グアニル酸シクラーゼ活性化タンパク質（GCAP）がGC1活性を刺激し、cGMP合成、チャネルの再開口、及び暗状態の回復をもたらす。

【0024】

光子が外節を通過すると、光子は外節の膜に埋め込まれたオプシンによって捕捉される。セカンドメッセンジャーcGMPは、視覚サイクルのシグナル伝達ステップにおける主要な構成要素である。外節の細胞質における合成及び分解のバランスによって、視覚サイクルのシグナル伝達ステップが制御される。cGMPは、RetGCによって触媒される反応によってGTPから生成される。cGMPは、 Ca^{2+} イオンの流入を可能にするチャネルに結合する。光伝達により、cGMPはPDE6によってGMPに加水分解され、これによってcGMPチャネルが閉鎖される。これにより、 Ca^{2+} の流入が阻害され、これに伴って、円板膜から Ca^{2+} が流出してその濃度が低下する。

【0025】

光伝達サイクルでは、光子は桿体中のロドプシンと錐体中の錐体オプシンによって吸収され、そこで11-シスレチナールがオールトランスレチナールに変換される。オールトランスレチナールはGタンパク質トランスデュースンのアルファサブユニットを活性化し、そのプロセスでGDPがGTPに変換される。次に、生成されたGTPは、ホスホジエステラーゼ6（PDE6）のガンマサブユニットを活性化し、cGMP産生を阻害することが可能になる。これによって、cGMPゲートチャネルが閉鎖され、したがってカルシウムイオンの流入が停止される。暗状態におけるGCAPは、カルシウムイオンに結合しているため、RetGCと会合することができない。明状態におけるGCAPからの Ca^{2+} の放出によって、GCAPがRetGCに結合し、cGMPを産生することが可能になる。これと並行して、オールトランスはロドプシンキナーゼによるリン酸化及びアレシチンへの結合によって不活性化される。Gタンパク質トランスデュースン結合GTPは、再びGDPに変換される。その後、サイクル全体が繰り返される。

【0026】

RetGC1は、ヒトでは遺伝子GUCY2Dによってコードされ、マウスでは遺伝子Gucy2eによってコードされる。RetGC2は、ヒトの遺伝子GUCY2Fによってコードされる。

【0027】

RetGC1をコードするGUCY2D遺伝子の変異は、ヒトにおける重度の網膜疾患、主に常染色体優性錐体桿体ジストロフィー（adCRD）または常染色体劣性レーバー先天性黒内障1型（arLCA）をもたらす。CRDでは、錐体で変性が始まり、罹患していない網膜の黄斑に錐体が多く存在するため、中心視野の喪失につながる。錐体の変性

10

20

30

40

50

に続いて桿体に変性すると、CRDは完全な失明につながる可能性がある。LCA1表現型はさらにより重度であるとみられ、光受容体機能の喪失及び失明が幼児期に現れる。LCA（12型）の発症に関与する別の遺伝子は、網膜変性3（RD3）タンパク質をコードするrd3であり、これは、RetGC1のGCAP媒介活性化の効果的な阻害剤であり、光受容体の内節から外節へのRetGC1の輸送に関与する。

【0028】

合計144の異なるGUCY2D変異が報告されている。大多数（127の変異）は、罹患患者においてLCA表現型をもたらす。LCA関連変異は通常、劣性及びヌル（主にフレームシフト、ナンセンス、及びスプライシング変異）であり、RetGC酵素のすべてのドメインに影響を与える可能性があるが、CRD変異は主に優性ミスセンスであり、これらは、二量体化ドメインに対応する「ホットスポット領域」のE837とT849の間の位置にクラスター化されている。

【0029】

LCA1患者は、生後1年以内に症状を示し、日常的に、視力の低下、網膜電図（ERG）応答の低下または記録不能、眼振、指眼現象、及び見かけ上正常な眼底を有すると報告される。この疾患に関連する光受容体変性の程度に関する報告は矛盾している。2つの死後網膜（26週齢の早産流産胎児及び12歳のドナー）の組織病理学的分析により、桿体と錐体の両方で光受容体変性の兆候が明らかになった。最新の生前イメージング（すなわち、光干渉断層撮影法）を使用したその後の研究では、53歳という年齢の患者に明白な変性がないことが明らかになった。より最近の研究では、高度の視覚障害にもかかわらず、LCA1患者は、中心窩錐体外節の異常、及び一部の患者における中心窩錐体喪失を除いて、正常な光受容体層構造を保持していることが示されている。

【0030】

CRDでは、桿体機能の異常は錐体機能の異常よりも重度ではなく、疾患の経過において錐体機能不全よりも遅く検出される場合がある。診断は電気生理学的評価によって確立される；機能的結果は、疾患の病期及び個体の年齢によって異なる。錐体桿体ジストロフィーの診断は、末梢視野喪失及び中心視野喪失の実証によって裏付けることができる。

【0031】

発現コンストラクト

一態様では、以下：（a）光受容体細胞において発現を与えるプロモーター配列、及び（b）網膜膜結合型グアニリルシクラーゼ（RetGC1）をコードする核酸配列；を含む発現コンストラクトであって、核酸配列はプロモーターに作動可能に連結されている、発現コンストラクトを提供する。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」とは、RetGC1のコード配列（cds）と連続する発現制御配列（例えば、プロモーター）と、RetGC1の発現を制御するためにトランスでまたは離れて作用する発現制御配列の両方を指す。発現制御配列には、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーター配列及びエンハンサー配列；スプライシングシグナル及びポリアデニル化シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳効率を高める配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を高める配列；及び、所望される場合、タンパク質のプロセッシング及び／または分泌を強化する配列が含まれる。

【0032】

多数の発現制御配列、例えば天然、構成的、誘導性及び／または組織特異的配列が当技術分野で公知であり、所望の発現のタイプに応じて、RetGC1（GUCY2D）導入遺伝子の発現を駆動するために利用することができる。真核細胞の場合、発現制御配列には典型的には、プロモーター配列、エンハンサー配列、及びスプライスドナー部位及びスプライスアクセプター部位を含み得るポリアデニル化配列が含まれる。ポリアデニル化配列は、一般に、RetGC1をコードする配列の後に、3' ITR配列の前に挿入される。本明細書に開示される方法において有用なrAAVの別の調節成分は、内部リボソーム進入部位（IRES）である。IRES配列を使用して、単一の遺伝子転写物から複数の

10

20

30

40

50

ポリペプチドを産生することができる。IRES（または他の好適な配列）を使用して、複数のポリペプチド鎖を含有するタンパク質を産生するか、または同じ細胞からまたは同じ細胞内で2つの異なるタンパク質を発現する。例示的なIRESは、光受容体、RPE及び神経節細胞における導入遺伝子の発現を支持するポリオウイルス内部リボソーム進入配列である。好ましくは、IRESは、rAAVベクター中のRetGC1をコードする配列の3'側に位置する。

【0033】

一実施形態では、プロモーター配列はロドプシンキナーゼ（RK）プロモーター配列を含む。実施形態では、プロモーター配列は、配列番号7と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、プロモーター配列は配列番号7を含む。

10

【0034】

一実施形態では、プロモーター配列は、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列を含む。実施形態では、プロモーター配列は、配列番号8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、プロモーター配列は配列番号8を含む。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、プロモーターは光受容体細胞に特異的である、すなわち、プロモーターは光受容体細胞では活性を有するが、他の細胞型では活性が低下しているか、または活性を有していない。

【0036】

一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、野生型RetGC1（GUCY2D）遺伝子由来のコード配列である。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、コドン最適化配列である。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号9と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号9を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号13と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号13を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号14と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号14を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号12と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号12を含むタンパク質をコードする。

30

40

【0037】

一実施形態では、発現コンストラクトは転写後調節エレメントを含む。一実施形態では

50

、発現コンストラクトは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む。いくつかの実施形態では、転写後調節エレメントは、配列番号10と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、転写後調節エレメントは、配列番号10を含む。

【0038】

一実施形態では、発現コンストラクトはポリアデニル化シグナルを含む。一実施形態では、発現コンストラクトはウシ成長ホルモンポリアデニル化（BGH-ポリA）シグナルを含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号11と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号11を含む。

【0039】

一実施形態では、発現コンストラクトは、1つ以上の逆方向末端反復（ITR）を含む核酸を含む。一実施形態では、ITR配列はAAV血清型2に由来する。一実施形態では、5' ITR配列は、配列番号5と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、5' ITR配列は配列番号5を含む。一実施形態では、3' ITR配列は、配列番号6と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%と同一である配列を含む。一実施形態では、3' ITR配列は配列番号6を含む。

【0040】

ベクター

一態様では、組換えベクター及び細胞への導入遺伝子または発現コンストラクトの導入のためのその使用が提供される。いくつかの実施形態では、組換えベクターは、宿主細胞におけるDNAの複製及び適切なレベルでの標的細胞における標的遺伝子の発現をもたらすDNAセグメントを含む追加のDNAエレメントを含む組換えDNAコンストラクトを含む。当業者は、発現制御配列（プロモーター、エンハンサーなど）が、標的細胞における標的遺伝子の発現を促進する能力に基づいて選択されることを理解する。本明細書で使用する「ベクター」とは、インビトロまたはインビボで宿主細胞に送達されるべきポリヌクレオチドを含むビヒクルを意味する。ベクターの非限定的な例としては、組換えプラスミド、酵母人工染色体（YAC）、ミニ染色体、DNAミニサークル、またはウイルス（ウイルス由来の配列を含む）が挙げられる。ベクターはまた、インビトロまたはインビボのいずれかで宿主細胞に送達される核酸を含むビリオンを指してもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えウイルスゲノムを含むビリオンを指し、ここで、ウイルスゲノムは、1つ以上のITR及び導入遺伝子を含む。

【0041】

一実施形態では、組換えベクターは、ウイルスベクターまたは複数のウイルスベクターの組み合わせである。

【0042】

一態様では、本明細書に開示される発現コンストラクトのいずれかを含むベクターが提供される。

【0043】

一態様では、（a）光受容体細胞において発現を与えるプロモーター配列、及び（b）RetGC1をコードする核酸配列、を含む核酸を含むベクターであって、RetGC1

をコードする核酸配列は、プロモーターに作動可能に連結されている、ベクターが提供される。

【0044】

一実施形態では、プロモーター配列は、R Kプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、配列番号7と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、プロモーター配列は配列番号7を含む。

【0045】

一実施形態では、プロモーター配列は、CMVプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、配列番号8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、プロモーター配列は配列番号8を含む。

【0046】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、光受容体細胞に特異的である。

【0047】

一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、野生型RetGC1 (GUCY2D) 遺伝子由来のコード配列である。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、コドン最適化配列である。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号9と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号9を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号13と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号13を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号14と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号14を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号12と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号12を含むタンパク質をコードする。

【0048】

一実施形態では、ベクターは、転写後調節エレメントを含む核酸を含む。一実施形態では、ベクターは、WPREを含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、転写後調節エレメントは、配列番号10と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、転写後調節エレメントは、配列番号10を含む。

10

20

30

40

50

【0049】

一実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化シグナルを含む核酸を含む。一実施形態では、ベクターは、BGH-ポリAシグナルを含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号11と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号11を含む。

【0050】

一実施形態では、ベクターは、1つ以上の逆方向末端反復（ITR）を含む核酸を含む。一実施形態では、ITR配列はAAV血清型2に由来する。一実施形態では、5' ITR配列は、配列番号5と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、5' ITR配列は配列番号5を含む。一実施形態では、3' ITR配列は、配列番号6と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、3' ITR配列は配列番号6を含む。

【0051】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号1～4の配列のいずれかと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号1～4からなる群から選択される配列を含む配列を含む核酸を含む。

【0052】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

- (a) RKプロモーター配列を含むプロモーター配列；
- (b) RetGC1をコードする核酸配列であって、RetGC1をコードする核酸配列がプロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；
- (c) WPRE；
- (d) BGH-ポリAシグナル；及び
- (e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、ベクターは、2つのITR配列を含む。

【0053】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

- (a) CMVプロモーター配列を含むプロモーター配列；
- (b) RetGC1をコードする核酸配列であって、RetGC1をコードする核酸配列がプロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；
- (c) WPRE；
- (d) BGH-ポリAシグナル；及び
- (e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2つのITR配列を含む。

【0054】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

- (a) 配列番号7と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、プロモーター配列；

(b) RetGC1をコードする核酸配列であって、RetGC1をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、RetGC1をコードする核酸配列が、配列番号9、配列番号13または配列番号14と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、核酸配列；

(c) 配列番号10と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、転写後調節エレメント；

(d) 配列番号11と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、ポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2つのITR配列を含む。
【0055】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

(a) 配列番号8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、プロモーター配列；

(b) RetGC1をコードする核酸配列であって、RetGC1をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、RetGC1をコードする核酸配列が、配列番号9、配列番号13または配列番号14と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、核酸配列；

(c) 配列番号10と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、転写後調節エレメント；

(d) 配列番号11と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、ポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2つのITR配列を含む。
【0056】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

(a) 配列番号7と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、プロモーター配列；

(b) RetGC1タンパク質をコードする核酸配列であって、RetGC1タンパク質が、配列番号12と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含み、RetGC1タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；

(c) 配列番号10と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95

10

20

30

40

50

%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、転写後調節エレメント；

(d) 配列番号11と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、ポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2つのITR配列を含む。

【0057】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

(a) 配列番号8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、プロモーター配列；

(b) RetGC1タンパク質をコードする核酸配列であって、RetGC1タンパク質が、配列番号12と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含み、RetGC1タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；

(c) 配列番号10と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、転写後調節エレメント；

(d) 配列番号11と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、ポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2つのITR配列を含む。

【0058】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

(a) 配列番号7を含むプロモーター配列；

(b) RetGC1をコードする核酸配列であって、RetGC1をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、RetGC1をコードする核酸配列が、配列番号9、配列番号13または配列番号14を含む、核酸配列；

(c) 配列番号10を含む転写後調節エレメント；

(d) 配列番号11の配列を含むポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2つのITR配列を含む。

【0059】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

(a) 配列番号8を含むプロモーター配列；

(b) RetGC1をコードする核酸配列であって、RetGC1をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、RetGC1をコードする核酸配列が、配列番号9、配列番号13または配列番号14を含む、核酸配列；

(c) 配列番号10を含む転写後調節エレメント；

(d) 配列番号11の配列を含むポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2つのITR配列を含む。

【0060】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

(a) 配列番号7を含むプロモーター配列；

(b) RetGC1タンパク質をコードする核酸配列であって、RetGC1タンパク質

10

20

30

40

50

が、配列番号 12 を含み、RetGC1 タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；

(c) 配列番号 10 を含む転写後調節エレメント；

(d) 配列番号 11 の配列を含むポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1 つ以上の ITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2 つの ITR 配列を含む。

【0061】

一実施形態では、以下の 1 つ以上を含む核酸を含むベクターが提供される：

(a) 配列番号 8 を含むプロモーター配列；

(b) RetGC1 タンパク質をコードする核酸配列であって、RetGC1 タンパク質が、配列番号 12 を含み、RetGC1 タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；

(c) 配列番号 10 を含む転写後調節エレメント；

(d) 配列番号 11 の配列を含むポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1 つ以上の ITR。いくつかの実施形態では、核酸は、2 つの ITR 配列を含む。

【0062】

ウイルスベクター

標的細胞、組織、または生物において標的遺伝子を発現させるためのウイルスベクターは、当技術分野で公知であり、例えば、AAV ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、または合成ウイルスベクター（例えば、キメラウイルス、モザイクウイルス、もしくはシュードタイプウイルス、及び／または外来タンパク質、合成ポリマー、ナノ粒子、もしくは小分子を含有するウイルス）、が挙げられる。

【0063】

AAV ベクター

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、効率的な複製を促進するためにヘルパーウイルスを必要とする小さな一本鎖 DNA ウイルスである。AAV の 4.7 kb ゲノムは、2 つの逆方向末端反復 (ITR) と、それぞれ Rep タンパク質及び Cap タンパク質をコードする 2 つのオープンリーディングフレームを特徴とする。Rep リーディングフレームは、分子量 78 kD、68 kD、52 kD、及び 40 kD の 4 つのタンパク質をコードする。これらのタンパク質は主に、AAV の複製及びレスキュー及び宿主細胞の染色体への AAV の組み込みの制御において機能する。Cap リーディングフレームは、ビリオンキャプシドを形成する、分子量 85 kD (VP1)、72 kD (VP2)、及び 61 kD (VP3) の 3 つの構造タンパク質をコードする。AAV ビリオン中の総タンパク質の 80% 超が VP3 からなる。rep 及び cap のオープンリーディングフレームの 5' 及び 3' 末端に隣接するのは、約 145 bp 長の逆方向末端反復 (ITR) である。2 つの ITR は、AAV の複製、レスキュー、パッケージング、及び AAV ゲノムの組み込みに必須の唯一のシス要素である。rep ドメイン及び cap ドメイン全体を切り出し、治療用またはレポーター導入遺伝子で置き換えることができる。

【0064】

組換えアデノ随伴ウイルス「rAAV」ベクターには、任意のアデノ随伴ウイルス血清型に由来する任意のベクターが含まれる。rAAV ベクターは、全体または一部が欠失した AAV 野生型遺伝子、好ましくは Rep 及び／または Cap 遺伝子のうちの 1 つ以上を有することができるが、機能的な隣接 ITR 配列を保持している。

【0065】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、rAAV ゲノム及び 1 つ以上のキャプシドタンパク質を含む rAAV ビリオンである。いくつかの実施形態では、rAAV ゲノムは、本明細書に開示される発現カセットを含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるウイルスベクターは、RetGC1 を

10

20

30

40

50

コードする配列に対してそれぞれ 5' 及び 3' に位置する AAV 5' ITR 及び 3' ITR を含む核酸を含む。しかし、ある特定の実施形態では、核酸が、タンデムに、例えば、5' - 3' で、もしくは頭 - 尾で、または別の代替配置で配置された 5' ITR 配列及び 3' ITR 配列を含有することが望ましい場合がある。さらに他の実施形態では、核酸が ITR の複数のコピーを含有するか、または RetGC1 をコードする配列の 5' 及び 3' の両方に位置する 5' ITR (または逆に 3' ITR) を有することが望ましい場合がある。ITR 配列は、異種分子のすぐ上流及び／または下流に位置していてもよく、あるいは介在配列が存在していてもよい。ITR は、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的なレスキュー、複製、及びパッケージングを提供する限り、(例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失、または置換によって) 変更することができる。ITR は、本明細書に記載されるように、AAV2 から、または他の AAV 血清型の中から選択することができる。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、AAV ベクター、例として、AAV1 (すなわち、AAV1 ITR 及び AAV1 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAV2 (すなわち、AAV2 ITR 及び AAV2 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAV3 (すなわち、AAV3 ITR 及び AAV3 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAV4 (すなわち、AAV4 ITR 及び AAV4 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAV5 (すなわち、AAV5 ITR 及び AAV5 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAV6 (すなわち、AAV6 ITR 及び AAV6 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAV7 (すなわち、AAV7 ITR 及び AAV7 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAV8 (すなわち、AAV8 ITR 及び AAV8 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAV9 (すなわち、AAV9 ITR 及び AAV9 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAVrh74 (すなわち、AAVrh74 ITR 及び AAVrh74 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、AAVrh.8 (すなわち、AAVrh.8 ITR 及び AAVrh.8 キャプシドタンパク質を含有する AAV)、または AAVrh.10 (すなわち、AAVrh.10 ITR 及び AAVrh.10 キャプシドタンパク質を含有する AAV) である。

20

【0068】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、1つの AAV 血清型に由来する ITR、及び異なる AAV 血清型に由来するキャプシドタンパク質を含む、偽型 AAV ベクターである。いくつかの実施形態では、偽型 AAV は、AAV2/9 (すなわち、AAV2 ITR 及び AAV9 キャプシドタンパク質を含有する AAV) である。いくつかの実施形態では、偽型 AAV は、AAV2/10 (すなわち、AAV2 ITR 及び AAV10 キャプシドタンパク質を含有する AAV) である。

30

【0069】

いくつかの実施形態では、偽型 AAV は AAV2/7m8 (すなわち、AAV2 ITR 及び AAV7m8 キャプシドタンパク質を含有する AAV) である。

【0070】

いくつかの実施形態では、AAV ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh74、AAVrh.8、または AAVrh.10 由来の 1つ以上のキャプシドタンパク質のキメラを含有するキャプシドタンパク質など、組換えキャプシドタンパク質を含有する。実施形態では、キャプシドは、AAV2 バリエント rAAV2-レトロ (WO2017/218842 からの配列番号 44、参照により本明細書に組み込まれる) などのバリエント AAV キャプシドである。

40

【0071】

一態様では、(a) 光受容体細胞において発現を与えるプロモーター配列、及び (b) RetGC1 をコードする核酸配列を含む核酸を含むウイルスゲノムであって、RetGC1 をコードする核酸配列は、プロモーターに作動可能に連結されている、ウイルスゲノ

50

ムが提供される。

【0072】

一実施形態では、プロモーター配列は、R Kプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、配列番号7と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、プロモーター配列は配列番号7を含む。

【0073】

一実施形態では、プロモーター配列は、CMVプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、配列番号8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、プロモーター配列は配列番号8を含む。

【0074】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、光受容体細胞に特異的である。

【0075】

一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、野生型RetGC1 (GUC Y2D) 遺伝子由来のコード配列である。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、コドン最適化配列である。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号9と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号9を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号13と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号13を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号14と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号14を含む。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号12と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、RetGC1をコードする核酸配列は、配列番号12を含むタンパク質をコードする。

【0076】

一実施形態では、ウイルスゲノムは、転写後調節エレメントを含む核酸を含む。一実施形態では、ウイルスゲノムは、WPREを含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、転写後調節エレメントは、配列番号10と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、転写後調節エレメントは配列番号10を含む。

【0077】

10

20

30

40

50

一実施形態では、ウイルスゲノムは、ポリアデニル化シグナルを含む核酸を含む。一実施形態では、ウイルスゲノムは、BGH-ポリAシグナルを含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号11と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号11を含む。

【0078】

一態様では、ウイルスゲノムは、1つ以上の逆方向末端反復（ITR）を含む核酸を含む。一実施形態では、ITR配列はAAV血清型2に由来する。一実施形態では、5' ITR配列は、配列番号5と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、5' ITR配列は配列番号5を含む。一実施形態では、3' ITR配列は、配列番号6と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。一実施形態では、3' ITR配列は配列番号6を含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、配列番号1～4の配列のいずれかと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、配列番号1～4からなる群から選択される配列を含む配列を含む核酸を含む。

【0080】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

- (a) RKプロモーター配列を含むプロモーター配列；
- (b) RetGC1をコードする核酸配列であって、RetGC1をコードする核酸配列がプロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；
- (c) WPRE；
- (d) BGH-ポリAシグナル；及び
- (e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2つのITR配列を含む。

【0081】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

- (a) CMVプロモーター配列を含むプロモーター配列；
- (b) RetGC1をコードする核酸配列であって、RetGC1をコードする核酸配列がプロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；
- (c) WPRE；
- (d) BGH-ポリAシグナル；及び
- (e) 1つ以上のITR。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2つのITR配列を含む。

【0082】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

- (a) 配列番号7と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む、プロモーター配列；

(b) R e t G C 1 をコードする核酸配列であって、R e t G C 1 をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、R e t G C 1 をコードする核酸配列が、配列番号 9、配列番号 13 または配列番号 14 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、核酸配列；

(c) 配列番号 10 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、転写後調節エレメント；

(d) 配列番号 11 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、ポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1 つ以上の I T R。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2 つの I T R 配列を含む。

【0083】

一実施形態では、以下の 1 つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

(a) 配列番号 8 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、プロモーター配列；

(b) R e t G C 1 をコードする核酸配列であって、R e t G C 1 をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、R e t G C 1 をコードする核酸配列が、配列番号 9、配列番号 13 または配列番号 14 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、核酸配列；

(c) 配列番号 10 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、転写後調節エレメント；

(d) 配列番号 11 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、ポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1 つ以上の I T R。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2 つの I T R 配列を含む。

【0084】

一実施形態では、以下の 1 つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

(a) 配列番号 7 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、プロモーター配列；

(b) R e t G C 1 タンパク質をコードする核酸配列であって、R e t G C 1 タンパク質が、配列番号 12 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含み、R e t G C 1 タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；

10

20

30

40

50

(c) 配列番号 10 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、転写後調節エレメント；

(d) 配列番号 11 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、ポリアデニル化シグナル；及び

(e) 1 つ以上の I T R。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2 つの I T R 配列を含む。

10

【0085】

一実施形態では、以下の 1 つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

(a) 配列番号 8 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、プロモーター配列；

(b) R e t G C 1 タンパク質をコードする核酸配列であって、R e t G C 1 タンパク質が、配列番号 12 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含み、R e t G C 1 タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；

20

(c) 配列番号 10 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、転写後調節エレメント；

(d) 配列番号 11 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む、ポリアデニル化シグナル；及び

30

(e) 1 つ以上の I T R。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2 つの I T R 配列を含む。

【0086】

一実施形態では、以下の 1 つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

(a) 配列番号 7 を含むプロモーター配列；

(b) R e t G C 1 をコードする核酸配列であって、R e t G C 1 をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、R e t G C 1 をコードする核酸配列が、配列番号 9、配列番号 13 または配列番号 14 を含む、核酸配列；

(c) 配列番号 10 を含む転写後調節エレメント；

(d) 配列番号 11 の配列を含むポリアデニル化シグナル；及び

40

(e) 1 つ以上の I T R。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2 つの I T R 配列を含む。

【0087】

一実施形態では、以下の 1 つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

(a) 配列番号 8 を含むプロモーター配列；

(b) R e t G C 1 をコードする核酸配列であって、R e t G C 1 をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、R e t G C 1 をコードする核酸配列が、配列番号 9、配列番号 13 または配列番号 14 を含む、核酸配列；

(c) 配列番号 10 を含む転写後調節エレメント；

(d) 配列番号 11 の配列を含むポリアデニル化シグナル；及び

50

(e) 1つ以上の I T R。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2つの I T R 配列を含む。

【0088】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

- (a) 配列番号7を含むプロモーター配列；
- (b) R e t G C 1タンパク質をコードする核酸配列であって、R e t G C 1タンパク質が、配列番号12を含み、R e t G C 1タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；
- (c) 配列番号10を含む転写後調節エレメント；
- (d) 配列番号11の配列を含むポリアデニル化シグナル；及び
- (e) 1つ以上の I T R。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2つの I T R 配列を含む。

10

【0089】

一実施形態では、以下の1つ以上を含む核酸を含むウイルスゲノムが提供される：

- (a) 配列番号8を含むプロモーター配列；
- (b) R e t G C 1タンパク質をコードする核酸配列であって、R e t G C 1タンパク質が、配列番号12を含み、R e t G C 1タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、核酸配列；
- (c) 配列番号10を含む転写後調節エレメント；
- (d) 配列番号11の配列を含むポリアデニル化シグナル；及び
- (e) 1つ以上の I T R。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、2つの I T R 配列を含む。

20

【0090】

他のウイルスベクターとしては、アデノウイルス (A V) ベクター、例えば、E 1 及び E 3 領域の欠失により複製欠損性とされたヒトアデノウイルス 2 型及びヒトアデノウイルス 5 型に基づくものが挙げられる。転写カセットを E 1 領域に挿入して、E 1 / E 3 欠失組換え A V ベクターを得ることができる。アデノウイルスベクターには、ウイルスコード配列を含有しないヘルパー依存性大容量アデノウイルスベクター (大容量、「ガットレス (g u t l e s s)」) または「ガッティド (g u t t e d)」ベクターとしても知られる) が含まれる。これらのベクターは、ウイルス D N A 複製及びパッケージングに必要なシス作用性エレメントを含有し、主に逆方向末端反復配列 (I T R) 及びパッケージングシグナル (C Y) を含有する。これらのヘルパー依存性 A V ベクターゲノムは、数百塩基対から最大およそ 3 6 k b の外来 D N A を担持する可能性がある。

30

【0091】

あるいは、レンチウイルスベクターなどの他の系を使用することもできる。レンチウイルスベクターの系は、非分裂細胞ならびに分裂細胞を形質導入することができるため、例えば、C N S の非分裂細胞を標的とする用途に有用になる。レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルスに由来し、そのウイルスと同様に、宿主ゲノムに組み込まれ、非常に長期の遺伝子発現の可能性を提供する。

【0092】

発現カセットを含有する標的遺伝子を担持する、プラスミド、Y A C、ミニ染色体及びミニサークルを含むポリヌクレオチドはまた、例えば、カチオン性脂質、ポリマー、またはその両方を担体として使用する非ウイルスベクター系によって細胞または生物に導入することができる。コンジュゲートポリーレーリシン (P L L) ポリマー及びポリエチレンイミン (P E I) ポリマー系を使用して、ベクターを細胞に送達することもできる。ベクターを細胞に送達する他の方法には、細胞培養と生物の両方に対する、流体力学的注入、及びエレクトロポレーション、及び超音波の使用が含まれる。遺伝子送達のためのウイルス及び非ウイルス送達系の総説については、参照により本明細書に組み込まれる N a y e r o s s a d a t , N . e t a l . (A d v B i o m e d R e s . 2 0 1 2 ; 1 : 2 7) を参照のこと。

40

50

【0093】

rAAVビリオン産生

本明細書に開示されるrAAVビリオンは、本明細書に記載される材料及び方法、ならびに当業者に公知の材料及び方法を使用して構築及び産生することができる。本開示の任意の実施形態を構築するために使用されるそのような工学的方法は、核酸操作の当業者に公知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技術を含む。例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)、及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989) ; 及び国際特許公開第WO95/13598号を参照のこと。さらに、アデノウイルスキャプシド内でrAAVカセットを産生するのに好適な方法は、米国特許第5,856,152号及び同第5,871,982号に記載されている。

10

【0094】

簡単に述べると、rAAVゲノムをrAAVビリオンにパッケージングするために、AAV rep及びAAV capまたはその機能的断片を発現するのに必要な配列、ならびにAAV産生に必須のヘルパー遺伝子を含む宿主細胞が使用される。AAV rep及びcap配列は、本明細書で見出されるAAV供給源から得られる。AAV rep配列及びAAV cap配列は、当業者に公知の任意の様式で宿主細胞に導入することができ、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングベレット、ウイルス感染及びプロトプラスト融合、を含むがこれらに限定されない。一実施形態では、rep配列及びcap配列は、1つ以上の核酸分子によって宿主細胞にトランスフェクトして、エピソームとして細胞内に安定に存在することができる。別の実施形態では、rep配列及びcap配列は、細胞のゲノムに安定して組み込まれる。別の実施形態では、宿主細胞内で一過的に発現するrep配列及びcap配列を有する。例えば、そのようなトランスフェクションに有用な核酸分子は、5'から3'に、プロモーター、プロモーターとrep遺伝子配列の開始部位との間に挿入される任意のスペーサー、AAV rep遺伝子配列、及びAAV cap遺伝子配列を含む。

20

【0095】

rep配列及びcap配列は、それらの発現制御配列とともに、単一のベクター上に供給してもよく、または各配列をそれ自体のベクター上に供給してもよい。好ましくは、rep配列及びcap配列は、同じベクター上に供給される。あるいは、rep配列及びcap配列は、宿主細胞に導入され得る他のDNA配列を含むベクター上に供給してもよい。好ましくは、このコンストラクトで使用されるプロモーターは、当業者に公知の任意の好適な構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または天然プロモーターであり得る。repタンパク質及びcapタンパク質を提供する分子は、これらの成分を宿主細胞に輸送する任意の形態であってもよい。望ましくは、この分子はプラスミドの形態であり、マーカー遺伝子の配列などの他の非ウイルス配列を含む。この分子はAAV ITRを含むせず、一般にAAVパッケージング配列を含むしない。相同組換えの発生を回避するために、このプラスミドでは他のウイルス配列、特にアデノウイルスの配列は避けられる。このプラスミドは、細胞に安定にトランスフェクトすることができるように構築されることが望ましい。

30

40

【0096】

rep及びcapを提供する分子は、宿主細胞に一過的にトランスフェクトすることができるが、宿主細胞は、例えばエピソームとして、または宿主細胞の染色体への組み込みによって、宿主細胞内で機能的rep/capタンパク質を発現するのに必要な配列で安定に形質転換されることが好ましい。そのような安定にトランスフェクトされた宿主細胞の発現を制御するプロモーターに応じて、rep/capタンパク質は一過的に発現することができる（例えば、誘導性プロモーターの使用を通じて）。

50

【0097】

本開示の実施形態を構築するために使用される方法は、上記の参考文献に記載されているような、従来の遺伝子工学または組換え工学技術である。例えば、rAAVは、製造業者の指示に従って、リン酸カルシウム法（Clontech）またはEffectene試薬（Qiagen、Valencia、Calif.）のいずれかを使用するトリプルトランスフェクション法を利用して生成することができる。導入遺伝子を有するプラスミド、AAV rep及びcapを含有するヘルパープラスミド、ならびにE2A、E4Orf6及びVAのアデノウイルスヘルパー機能を供給するプラスミドを用いる、以下の実施例で使用方法について、Herzog et al, 1999, Nature Med. 5 (1): 56-63を参照のこと。本明細書は、本明細書に提供される情報を使用して、特定のコンストラクトの実例を提供するが、当業者は、スパーサー、プロモーター、及び少なくとも1つの翻訳開始及び翻訳停止シグナルを含むその他のエレメントの選択、ならびにポリアデニル化部位の任意選択の付加を使用して、他の好適なコンストラクトを選択し、設計することができる。

10

【0098】

次に、rAAVビリオンは、rAAVビリオンにパッケージングされるrAAVゲノム、AAV rep配列及びAAV cap配列を含有する、本明細書に記載のrAAVウイルスを含有する宿主細胞を、その発現を誘導する調節配列の制御下で培養することによって産生される。他の考えられるヘルパー遺伝子の中でも、好適なウイルスヘルパー遺伝子、例えばアデノウイルスE2A、E4Orf6及びVAは、当技術分野で公知の様々な方法で、好ましくは別個のプラスミド上で培養物に提供することができる。その後、RetGC1導入遺伝子の発現を誘導する組換えAAVビリオンを、混入ヘルパーウイルスまたは野生型AAVの非存在下で、細胞または細胞培養物から単離する。

20

【0099】

RetGC1導入遺伝子の発現は、当技術分野で公知の方法で測定することができる。例えば、標的細胞をインビトロで感染させ、細胞内の導入遺伝子のコピー数をサザンブロットティングまたは定量的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって監視することができる。RNA発現レベルは、ノーザンブロットティングまたは定量的逆転写酵素（RT）-PCRによって監視することができる；またタンパク質発現レベルは、ウェスタンブロットティング、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）によって、または以下の実施例で詳述する特定の方法によって監視することができる。

30

【0100】

医薬組成物

本明細書では、本明細書に開示されるベクターのいずれか及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が提供される。

【0101】

RetGC1をコードする遺伝子を含むrAAVは、好ましくは従来の方法によって汚染について評価し、次に保存及び／または患者への投与に好適な医薬組成物に製剤化する。

40

【0102】

本明細書に開示されるベクターの製剤は、pHを適切な生理学的レベルに維持するために、薬学的及び／または生理学的に許容されるビヒクルまたは担体、特に緩衝生理食塩水または他の緩衝液例えば、HEPES、などの網膜下注射に好適なビヒクルまたは担体の使用を伴う。

【0103】

本開示のベクターは、医薬組成物に製剤化することができる。これらの組成物は、ベクターに加えて、薬学的及び／または生理学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤、抗酸化剤、防腐剤、または当業者に周知の他の添加剤を含んでもよい。このような材料は非毒性であるべきであり、活性成分の有効性を妨げるものであってはならない。担体ま

50

たは他の材料の正確な性質は、投与経路に従って当業者が決定することができる。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、一般に、水、石油、動物油または植物油、鉱油または合成油などの液体担体を含む。追加の担体は、参照により本明細書に組み込まれる国際特許公開第W O O O / 1 5 8 2 2 号に提供されている。生理食塩水、塩化マグネシウム、デキストロース、もしくは他の糖溶液、またはエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールなどのグリコールを含めてもよい。場合によっては、界面活性剤、例としてプルロン酸（P F 6 8）0 . 0 0 1 %を使用してもよい。場合によっては、リンゲル液、加乳酸リンゲル液、またはハルトマン液を使用する。必要に応じて、防腐剤、安定剤、緩衝剤、抗酸化剤及び／または他の添加剤を含むことができる。

10

【0104】

遅延放出の場合、ベクターを、生体適合性ポリマーから形成されたマイクロカプセルまたは当技術分野で公知の方法によるリポソーム担体系など、徐放用に製剤化された医薬組成物に含めてもよい。

【0105】

ベクターを長期保存する場合、グリセロールの存在下で凍結してもよい。

【0106】

治療方法

網膜疾患の治療を必要とする対象における網膜疾患を治療する方法であって、網膜疾患は、G U C Y 2 D 遺伝子における1つ以上の変異と関連しており、本明細書に開示されるベクターを対象に投与することを含む、方法が、本明細書において提供される。網膜疾患の治療を必要とする対象における網膜疾患を治療する方法であって、網膜疾患は、G U C Y 2 D 遺伝子における1つ以上の変異と関連しており、本明細書に開示されるベクターを含む医薬組成物を対象に投与することを含む、方法もまた、本明細書において提供される。網膜疾患の治療を必要とする対象における網膜疾患を治療する方法において使用するためのベクターであって、網膜疾患は、G U C Y 2 D 遺伝子における1つ以上の変異と関連している、ベクターが、本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、対象は、G U C Y 2 D 遺伝子に変異を有する。

20

【0107】

いくつかの実施形態では、対象は哺乳動物である。本明細書で使用される「哺乳動物」という用語は、ヒト、実験動物、家庭用ペット、及び家畜を含むことを意図しているが、これらに限定されない。哺乳動物には、ヒト、または非ヒト哺乳動物、例としてウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、もしくはネコなどが含まれるが、これらに限定されない。個体及び患者も、本明細書では対象となる。

30

【0108】

本明細書で使用される「治療する（treat）」、「治療される（treated）」、「治療すること（treating）」、または「治療（treatment）」という用語は、治療的処置を指し、その目的は、望ましくない生理学的状態、障害または疾患を減速させる（軽減させる）こと、または有益なもしくは所望の臨床結果を得ることである。本開示の目的において、有益なまたは所望の臨床結果としては、症状の軽減；状態、障害、もしくは疾患の程度の低下；病態、障害、もしくは疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しない）；状態、障害、もしくは疾患の発症の遅延、または状態、障害、もしくは疾患の進行の遅延；状態、障害、もしくは病状の1つ以上の兆候の改善；及び寛解（部分的もしくは完全）、または状態、障害、もしくは疾患の向上または改善が挙げられるが、これらに限定されない。治療には、過剰なレベルの副作用を伴わずに、臨床的に有意な応答を誘発することが含まれる。治療はまた、治療を受けていなかった場合に予測される生存期間と比較して、生存期間を延長することを含む。「予防する」、「予防」などの用語は、明らかな疾患もしくは障害の発症前に作用すること、疾患もしくは障害が発症するのを防ぐこと、または疾患もしくは障害の程度を最小限に抑えるか、あるいはその進行過程を遅らせることを指す。

40

50

【0109】

いくつかの実施形態では、治療の成功は、以下、すなわち、視力、網膜電図（ERG）応答、眼振の減少、指眼現象の変化、及び組織病理学的分析または光干渉断層撮影、のうちの1つ以上によって測定される。

【0110】

いくつかの実施形態では、網膜疾患は錐体桿体ジストロフィー（CRD）またはレーバー先天性黒内障1型（LCA1）である。一実施形態では、網膜疾患はLCA1である。一実施形態では、網膜疾患はCRDである。

【0111】

一態様では、以下を含む方法が提供される：

- (a) 対象がGUCY2D遺伝子に変異を保有しているかどうかを決定すること；及び
- (b) 対象がGUCY2D遺伝子に変異を保有する場合、本明細書に開示されるベクターを含む医薬組成物を対象に投与すること。

【0112】

投与の経路及び方法

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるベクターまたは医薬組成物は、眼内注射によって投与する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるベクターまたは医薬組成物は、直接網膜注射、網膜下注射、または硝子体内注射によって投与する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるベクターまたは医薬組成物は、対象の網膜中心に投与する。

【0113】

本開示のベクターの用量は、種々のパラメータに従って、特に治療される患者の年齢、体重及び状態、特定の眼障害及び進行性である場合は障害が進行している程度、投与経路、及び必要なレジメンに従って決定することができる。また、医師は特定の患者に必要な投与経路及び投与量を決定することができる。プロモーター配列の制御下でRetGC1をコードする核酸配列を担持するrAAVの有効量は、望ましくは、約 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{12}$ の間のrAAVゲノム粒子、または $1 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{11}$ の間のゲノム粒子の範囲である。ゲノム粒子は、本明細書では、配列特異的方法（リアルタイムPCRなど）を用いて定量することができる一本鎖DNA分子を含有するAAVキャプシドとして定義される。いくつかの実施形態では、約 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{12}$ のrAAVゲノム粒子は、約150～約800 μl の間の体積で提供される。いくつかの実施形態では、約 $1 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{11}$ のrAAVゲノム粒子は、約250～約500 μl の間の体積で提供される。これらの範囲のさらに他の用量は、主治医が選択することができる。

【0114】

用量は単回用量として提供してもよいが、僚眼に対して、または何らかの理由（手術合併症など）でベクターが網膜の正しい領域を標的にしなかった場合には、繰り返してもよい。治療は、好ましくは各眼に対する単一の永久治療であるが、例えば将来的に及び／または異なるAAV血清型による反復注射を考慮してもよい。したがって、本明細書に開示される医薬組成物の「ブースター」投与量を複数回投与することが望ましい場合がある。例えば、眼の標的細胞内の導入遺伝子の持続期間に応じて、ブースター投与量を6か月間隔で、または最初の投与の後から1年ごとに送達することができる。このようなブースター投与量及びその必要性は、例えば、当技術分野で公知の網膜及び視覚機能検査及び視覚行動検査を使用して、主治医が監視することができる。他の同様の検査を使用して、治療対象の状態を経時的に判定してもよい。適切な検査の選択は主治医が行うことができる。さらに代替的に、本明細書に開示される方法はまた、野生型網膜で見られるレベルに近い視覚機能のレベルが可能になるために、単一または複数回の感染においてより大量のベクター含有溶液の注射を伴ってもよい。

【0115】

追加の方法

一態様では、桿体cGMP特異的3', 5'-環状ホスホジエステラーゼサブユニットβ 50

10

20

30

40

(PDE6 β)の発現の増加を必要とする対象における桿体cGMP特異的3',5'-環状ホスホジエステラーゼサブユニット β (PDE6 β)の発現を増加させる方法であって、本明細書に開示されるベクターを対象に投与することを含む、方法を提供する。一態様では、細胞において桿体cGMP特異的3',5'-環状ホスホジエステラーゼサブユニット β (PDE6 β)の発現を増加させる方法であって、細胞を、本明細書に開示されるベクターと接触させることを含む、方法を提供する。

【0116】

一態様では、光受容体におけるcGMPレベルの増加を必要とする対象における光受容体におけるcGMPレベルを増加させる方法であって、本明細書に開示されるベクターを対象に投与することを含む、方法を提供する。一態様では、細胞において光受容体におけるcGMPレベルを増加させる方法であって、細胞を、本明細書に開示されるベクターと接触させることを含む、方法を提供する。

10

【0117】

製造品及びキット

本明細書に記載の方法で使用するためのキットまたは製造品も提供される。態様では、キットは、本明細書に記載される組成物(例えば、RetGC1コード導入遺伝子の送達のための組成物)を好適なパッケージングで含む。本明細書に記載される組成物(注射用の眼用組成物など)の適切なパッケージングは当技術分野で公知であり、これには、例えば、バイアル(密封バイアルなど)、容器、アンプル、ボトル、ジャー、柔軟なパッケージング(例えば、密封マイラーまたはビニール袋)などが含まれる。これらの製造品は、さらに、滅菌及び／または密封されてもよい。

20

【0118】

本明細書に記載の組成物を含むキットも提供される。これらのキットは、本明細書に記載される使用など、組成物の使用方法に関する説明書(複数可)をさらに含んでもよい。本明細書に記載されるキットは、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び組成物の投与を実行するためのまたは本明細書に記載される任意の方法を実行するための説明書を含む添付文書を含む、商業的及びユーザーの観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、キットは、標的細胞におけるRetGC1コード導入遺伝子の発現のためのrAAV、注射に好適な薬学的に許容される担体、ならびに緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び注射を行うための説明書を含む添付文書のうちの1つ以上を含む。

30

【0119】

本発明は、記載された特定の分子、組成物、方法論、またはプロトコルに限定されず、これらは変化し得ることを理解すべきである。本明細書に記載の方法及び材料に類似したまたは同等の、任意の方法及び材料を、本発明の実施形態の実践または試験に使用することができる。さらに、本明細書における本発明の開示は、そのような特定の特徴の全ての考えられる組み合わせを含むことを理解すべきである。例えば、特定の特徴が本発明の特定の態様もしくは実施形態、または特定の請求項に関連して開示されている場合、その特徴も、本発明の他の特定の態様及び実施形態と組み合わせて、及び／または本発明の他の特定の態様及び実施形態との関連で、及び本発明において、一般に、可能な限り使用することができる。

40

【0120】

本明細書において、2つ以上の定義されたステップを含む方法について言及する場合、それらの定義されたステップは、任意の順序でまたは同時に実行することができ(文脈がその可能性を除外する場合を除く)、この方法には、定義されたステップのいずれかの前、定義されたステップのうちの2つの間、または定義されたステップすべての後に行われる1つ以上の他のステップを含めることができる(文脈によりこれらの可能性が除外される場合を除く)。

【0121】

他のすべての参照特許及び出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。さ

50

らに、参照により本明細書に組み込まれる参考文献における用語の定義または使用が、本明細書に提供されるその用語の定義と一致しない、または矛盾する場合、本明細書に提供されるその用語の定義が適用され、参考文献におけるその用語の定義は適用されない。

【0122】

本発明のより良い理解を容易にするために、特定の実施形態の以下の実施例が与えられる。以下の実施例は、本発明の範囲全体を限定または定義するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0123】

実施例1：GUCY2Dの変異に関連する網膜疾患のインビトロ疾患モデルとしてのRetGCノックアウト（KO）オルガノイドの生成

RetGC KOオルガノイドを生成するために、野生型（WT）網膜オルガノイドを発生中のいくつかの時点で採取した。GUCY2D mRNA及びRetGCタンパク質レベルをそれぞれ、網膜オルガノイド発生中の種々の時点で、網膜特異的マーカーを用いて、qPCR及びウェスタンブロット／免疫蛍光によって測定した。エピソードリプログラミング因子及びCRISPR/CAS9を使用して、WTヒト線維芽細胞をリプログラミングし、遺伝子編集して、GUCY2D-RetGCを欠失させた。KO誘導多能性幹細胞（iPSC）クローンを、それらの未編集（WT）同質遺伝子対照株と共に、網膜オルガノイドに分化させた。発生の予想される時点で光受容体マーカーの存在及びRetGCタンパク質の不存在が確認された。

【0124】

RetGCタンパク質を、哺乳動物の網膜の光受容体外節に移行させた。免疫蛍光により、RetGCタンパク質はWTオルガノイドの外節構造で検出することができ、そこではロドプシンと共局在していた。成熟RetGC KOオルガノイドにおけるRetGCタンパク質の喪失を、免疫蛍光及びウェスタンブロットによって確認した。また、GUCY2D（RetGC）mRNAの有意な減少があった。

【0125】

外節におけるRetGCの喪失に加えて、光伝達タンパク質ホスホジエステラーゼ-6-ベータ（PDE6 β ）が、RetGC KOオルガノイドの外節において減少することが見出された。PDE6 β は、光伝達サイクルにおいて中心的な役割を有する。光刺激を受けると、cGMPはPDE6 β によってGMPに加水分解され、外節円板のcGMPチャネルが閉鎖され、光受容体細胞の過分極がもたらされる。

【0126】

RetGC KOオルガノイドの上記特性は、これらのオルガノイドを、タンパク質レベルを回復するRetGCウイルスベクターの有効性を試験するためのインビトロ疾患モデルとして利用することができることを示した。

【0127】

実施例2：RetGC KOオルガノイドの特徴付け

確立された分化プロトコルを使用して、ヒト人工多能性細胞（hiPSC）からRetGC KO及びWT網膜オルガノイドを生成した。分化プロトコルにより、140日目（20週）に「成熟」した網膜オルガノイドが産生され、これらをAAV形質導入実験に使用することができた。成熟した網膜オルガノイドは、形態学的に識別可能な変性の兆候を伴わずに、最長300日間（43週間）培養で維持することができた。

【0128】

ヒト神経網膜は、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、ミュラーグリア及び神経節細胞、光受容体、網膜色素上皮細胞を含む神経細胞のいくつかの層で構造化されている（図1）。インビトロ生成されたオルガノイドは、上記の網膜細胞型が適切な層に配置され、2つのシナプス層に接続された神経網膜の積層形態を反映している。

【0129】

WTオルガノイド及びRetGC KOオルガノイドを、免疫蛍光、ウェスタンブロッ

ト及び qPCR 技術を使用して特徴付けた。網膜におけるさまざまな細胞型に関連するマーカーを使用して、WT 細胞株と RetGC KO 細胞株の両方におけるインビボヒト網膜と網膜オルガノイドの間の網膜形態の類似性を同定し、説明した。図 2 は、錐体及び桿体光受容体の LM オプシン及びロドプシン、外網状層のシナプスの Ribeye 及び VGluT、双極細胞、水平細胞及びアマクリン細胞の PKC α 及びカルレチニンの凍結切片及び免疫染色画像を示す。明視野画像は、光受容体の外節である可視「刷子縁」を有する成熟オルガノイドを示す。図 3 のグラフは、網膜オルガノイド発生の時間経過（40 日目～220 日目）にわたる RetGC タンパク質発現の分析を示す。RetGC タンパク質レベルは、WT と比較して RetGC KO オルガノイドにおいて有意に低下している。

【0130】

10

実施例 3：KO オルガノイドにおける RetGC 発現を回復するためのベクターの設計

4 つの異なる発現コンストラクトのうちの 1 つを含むウイルスベクターを、図 4 に示すように、設計した。発現コンストラクトは、2 つの異なるプロモーター：RK（光受容体に特異的な光受容体特異的ロドプシンキナーゼプロモーターに由来する）及び CMV（サイトメガロウイルスに由来する）を有していた。発現コンストラクトの一部は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）も含有していた。すべてのウイルスゲノムを、7m8 キャプシドにパッケージングした。

【0131】

WT 網膜オルガノイド及び RetGC KO 網膜オルガノイドに、140 日～204 日の範囲の日齢で 4 つの異なるウイルスベクターを形質導入し、採取及び分析前に 21 日間インキュベートした。形質導入オルガノイドを、免疫蛍光、ウェスタンブロッティング、qPCR、及び cGMP FRET アッセイを使用して評価した。

20

【0132】

4 つの AAV 7m8 ベクターはすべて、総 RetGC タンパク質定量（ウェスタンブロット）及び mRNA（qPCR）によって決定されるように、RetGC KO 網膜オルガノイドにおけるヒト光受容体の形質導入に成功し、RetGC タンパク質発現を駆動した。7m8 CMV-RetGC 及び 7m8 RK-RetGC によって送達されたトランスジェニック RetGC は、光受容体外節の正しい細胞内コンパートメントにおいて免疫蛍光によって検出可能であった。

【0133】

30

実施例 4：AAV ベクター駆動 RetGC 発現は、光受容体外節における PDE6 β 発現を回復させる

図 5 は、WT オルガノイド、非形質導入網膜オルガノイド及びウイルスベクター形質導入網膜オルガノイドにおける PDE6 β の免疫染色を示す。PDE6 β をロドプシントンパク質と共染色して、すべてのオルガノイドにおける外節の存在を確立し、WT 対照と比較して非形質導入対照で PDE6 β タンパク質がどのように減少したかを示した。ウイルスベクターによる形質導入後、PDE6 β タンパク質の回復を確認した。

【0134】

非形質導入 RetGC KO では、WT 対照網膜オルガノイドと比較して、PDE6 β 染色強度が有意に減少した； $p < 0.005$ （複数の比較を行うため、一元配置 ANOVA 試験を Kruskal-Wallis 検定と共に行った）。ロドプシン陽性外節の染色強度を、複数の WT オルガノイド、RetGC KO オルガノイド、及び形質導入オルガノイドにおいて定量した。7m8-CMV-RetGC 及び 7m8-RK-RetGC で処理したオルガノイドでは、PDE6 β 発現が WT レベル近くに回復した。7m8-CMV-RetGC-WPRE 及び 7m8-RK-RetGC-WPRE は、KO と比較して改善を示したが、他の 2 つのベクターと同じレベルには達しなかった（図 6 及び表 1）。

40

【0135】

50

【表 1】

表 1. 外節における PDE 6 β 発現の回復。SD=標準偏差。各ベクターについて n = 4。

ベクター	WT と比較した PDE6 β [%]	WT と比較した PDE6 β [SD, %]
7m8-CMV-RetGC	73	22.0
7m8-RK-RetGC	75	25.7
7m8-CMV-RetGC-WPRE	44	19.5
7m8-RK-RetGC-WPRE	43	13.0

10

【0136】

実施例 5：AAVベクター駆動 RetGC 発現は、RetGC タンパク質レベルを回復する

RetGC タンパク質レベルを、ウェスタンブロットによってアッセイした。図 7 に示すように、RetGC 発現は、ベクター 7m8-CMV-RetGC (WT の 30%)、7m8-CMV-WPRE-RetGC (WT の 47%)、及び 7m8-RK-RetGC (WT の 27%) を形質導入した EB において、非形質導入 EB に比べて高かった。各実験群について、2つの試料を採取し、タンパク質発現分析のために処理した。

20

【0137】

実施例 6：AAVベクター駆動 RetGC 発現は、光刺激後のオルガノイドにおける総 cGMP レベルを回復する

RetGC 活性を測定するために、ユーロピウムクリプテートで標識された特異的抗体 (ドナー) 及び d2 試薬で標識された cGMP (アクセプター) を使用する競合アッセイ形式で、cGMP の定量測定を行った。検出原理は、HTRF (登録商標) 技術に基づく。色素が非常に近接している場合、光源 (レーザーまたはフラッシュランプ) によるドナーの励起により、アクセプターに向けた蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が引き起こされ、次いでアクセプターは特定の波長 (665 nm) で蛍光を発する。試料中に存在する cGMP は、2つのコンジュゲート間の結合と競合し、それによって FRET の発生を防止する。特定のシグナルは、cGMP 濃度に反比例する。

30

【0138】

WT オルガノイド及び 7m8 ベクターを形質導入した KO オルガノイド及び非形質導入 KO オルガノイドを、明/暗のサイクルに曝露して、cGMP の産生を誘導した。使用した光刺激プロトコルは、光受容体を単離するためにオルガノイドを解剖する前の、5分間の白色光刺激及び5分間の暗期で構成されていた。研究プロトコルに記載のように、試料を解剖し、IBMX (PDE 阻害剤) の存在下にて赤色光下で溶解した。このアッセイは、標準曲線に対する cGMP [nM] 濃度を決定し、得られた値を、試料あたりの総タンパク質量 [ug] に対して正規化した。統計分析を実行して、非形質導入 KO 対照 (NT) と比較した試料間の統計的差異を評価した。

40

【0139】

図 8 のグラフに示すように、RetGC KO オルガノイド (NT) は、光刺激後に cGMP レベルが有意に低下した (WT の 20%)。形質導入後、ベクター 7m8-CMV-GUCY2D (WT の +76%、 $p=0.0043$) 及び 7m8-RK-GUCY2D (WT の +37%、 $p=0.0494$) で形質導入された KO RetGC-GUCY2D オルガノイドにおいて、統計的に有意な cGMP の増加が見出された。WPRE エレメントを保有する CMV ベクターと RK ベクターの両方による形質導入によって、cGMP の増加がもたらされ、これは統計的に有意でなかったが、WT 試料に見られるものと同等

50

の平均値であった。グラフでは、1群あたり3つまたは4つの形質導入オルガノイドを用いた2つの別々の実験から得られた結果を示す（図8）。総cGMPレベルがWTレベルを達成または上回るという観察結果は、光感受性ヒト光受容体のとの関係において、これらの上記ベクターの機能的効力を実証している。

【0140】

配列の概要

【0141】

【表2-1】

配列番号	名称	説明	配列
1	AAVss-RK-hGUCY2D-WPRE(mut6)	AAV2 5' ITR: 1-141 bp RK: 169-620 bp コザック: 813-818 bp hGUCY2D [NM_000180.4 由来の cds]: 819-4130 bp WPREmut6: 4131-4719 bp BGH pA: 4774-4981 bp AAV2 3' ITR: 4989-5129 bp	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGA CCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCCTTCTAGACAACCTTTGTATAGAAAAGTT GTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTAT CTACGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATT ACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGAATT CGCTAGCAAGATCCAAGCTCAGATCTCGATCGA GTTGGGCCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCT TCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGG AAGGGGCCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCC AAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTCTAGCACCT TCTTGCCACTCCTAAGCGTCTCCGTGACCCCGG CTGGGATTTAGCCTGGTGTGTGTCAGCCCCGGT CTCCCAGGGGCTTCCCAGTGGTCCCCAGGAACCC TCGACAGGGCCCCGGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGG CAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGCCCTCGATC GAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAA GTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTAGGTCCCGGA TCCGGTGGTGGTGAAATCAAAGAACTGCTCCTC AGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGG AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTG TACCCGCGGCCGCCAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTGCCACCATGACCGCTGCGCCCCGCCGAGC GGGTGGGCTTCCGGACCCCGGGCTCTGCGGTCCC GCGTGGTGGGCTCCGTCCCTGCCCCGCCTCCCC GGGCCCTGCCCCGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCCT GCTTCTGCTGCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGTG TTCACGGTGGGGGTCTGGGCCCCCTGGGCTTGCG ACCCCATCTTCTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGGC CGCCCGCTGGCCGCCGCCCGCCTGAACCGCGA CCCCGGCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGTA GCGCTGCTGCCCCAGCCTTGCCGGACGCCGGGCT

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

配列 番号	名称	説明	配列
			CGCTGGGGGGCCGTGTCCTCCGCGCTGGCCCCGCGT GTCGGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGGCC TGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAGCC GGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCCCTGG ACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCCCCCTGCCGTG ACCCCCGCCCGGATGCCCTCTACGCCCTGCTTC GCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTGGTCAC CGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGCGGGACG CTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCCCGGGGCCTG CCTGTCGCCTCCGTGACTTCCATGGAGCCCCTGG ACCTGTCTGGAGCCCCGGGAGGCCCTGAGGAAGG TTCGGGACGGGCCCAGGGTCACAGCAGTGATCA TGGTGATGCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGAGG AGCAGCGCTACCTCCTGGAGGCCGCAGAGGAGC TGGGCCTGACCGATGGCTCCCTGGTCTTCCTGCC CTTCGACACGATCCACTACGCCTTGTCCCCAGGC CCGGAGGCCTTGGCCGCACTCGCCAACAGCTCCC AGCTTCGCAGGGCCCACGATGCCGTGCTCACCCCT CACGCGCCACTGTCCCTCTGAAGGCAGCGTGCTG GACAGCCTGCGCAGGGCTCAAGAGCGCCGCGAG CTGCCCTCTGACCTCAATCTGCAGCAGGTCTCCC CACTCTTTGGCACCATCTATGACGCGGTCTTCTT GCTGGCAAGGGGCGTGGCAGAAGCGCGGGCTGC CGCAGGTGGCAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTGT GGCCCCGCCACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGG CTTCTGCGGGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGCC CCCATTCGTGCTGCTAGACACGGACGCGGCGGG AGACCGGCTTTTTGCCACATACATGCTGGATCCT GCCCCGGGGCTCCTTCCTCTCCGCCGGTACCCGGA TGCACTTCCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGAC CTGACCCCTCGTGCTGGTTCGATCCAAACAACAT CTGCGGTGGAGGACTGGAGCCGGGCCTCGTCTTT CTTGGCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

配列 番号	名称	説明	配列
			CTGGGGCCTTCCTGGCCCATTATGTGAGGCACCG GCTACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCCAAC AAGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACCTTTC TCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTGG CCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCCGA GCATGTGACACATTCGCAGCGGCCCCAGCCAAC ACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATGAGGG AGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCCAGGGGA TCAGCACATAGCTATCCGCCAGCAACCAAGAC GGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCCGGCATGAG AACGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTTTCTGGCTC GGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCCCTCTGGGAGG GCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAGCACTGCACGC GGGGCTCTCTTCAGGACCTCCTCGCTCAGAGAGA AATAAAGCTGGACTGGATGTTCAAGTCCTCCCTC CTGCTGGACCTTATCAAGGGAATAAGGTATCTGC ACCATCGAGGCGTGGCTCATGGGCGGCTGAAGT CACGGAAGTGCATAGTGGATGGCAGATTCTGTAC TCAAGATCACTGACCACGGCCACGGGAGACTGC TGGAAGCACAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCCCA GAGCGGAGGACCAGCTGTGGACAGCCCCGGAGC TGCTTAGGGACCCAGCCCTGGAGCGCCGGGGAA CGCTGGCCGGCGACGTCTTTAGCTTGGCCATCAT CATGCAAGAAGTAGTGTGCCGCAGTGCCCTTAT GCCATGCTGGAGCTCACTCCCGAGGAAGTGGTG CAGAGGGTGCGGAGCCCCCTCCACTGTGTCGG CCCTTGGTGTCCATGGACCAGGCACCTGTGAGT GTATCCTCCTGATGAAGCAGTGTGGGCAGAGC AGCCGGAACCTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTT CGACCTGTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAA GACGAACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTG GAGCAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCC GGGAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAG CAGAAGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTG CCTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACGGGG ACACCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGTG

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

配列 番号	名称	説明	配列
			ACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCACCA CCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATGAGGTTGT GGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTTTGAT GCCATCATTGGTTCCACGATGTCTACAAGGTGG AGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGGCCTCGG GGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGACACGCGG CAGAGATCGCCAACATGTCACTGGACATCCTCA GTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCGCCATATGCC TGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGGCCTGCAC TCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGGTGGGCCTC ACCATGCCGCGGTACTGCCTGTTTGGGGACACGG TCAACACCGCCTCGCGCATGGAGTCCACCGGGCT GCCTTACCGCATCCACGTGAACTTGAGCACTGTG GGGATTCTCCGTGCTCTGGACTCGGGCTACCAGG TGGAGCTGCGAGGCCGCACGGAGCTGAAGGGCA AGGGCGCCGAGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCA GACGCGGCTTCAACAAGCCCATCCCCAAACCGC CTGACCTGCAACCGGGGTCCAGCAACCACGGCA TCAGCCTGCAGGAGATCCCACCCGAGCGGCGAC GGAAGCTGGAGAAGGCGCGGCCGGGCCAGTTCT CTTGAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGA AAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCT TTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTT GTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT TCTCCTCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTTT TATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTG GCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCC CACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC CTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGC CACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGAC AATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCT TTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATT CTGCGCGGGACGTCCCTTCTGCTACGTCCCTTCGG CCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCT

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

配列 番号	名称	説明	配列
			GCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGC CTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGG CCGCCTCCCCGCACCCAGCTTTCTTGTACAAAGT GGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACT GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCC ACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG GGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGG GGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCCGG GCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCCTGCAGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

配列 番号	名称	説明	配列
2	AAVss- RK- GUCY2D	AAV2 5' ITR: 1- 141 bp RK: 169-620 bp コザック: 813- 818 bp hGUCY2D [NM_000180.4 由来の cds]: 819-4130 bp BGH pA: 4185- 4392 bp AAV2 3' ITR: 4400-4540 bp	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCTTCTAGACAACCTTTGTATAGAAAAGTT GTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTAT CTACGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATT ACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGAAATT CGCTAGCAAGATCCAAGCTCAGATCTCGATCGA GTTGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCT TCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCCCTTGGAGG AAGGGGCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCC AAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTCTAGCACCT TCTTGCCACTCCTAAGCGTCCTCCGTGACCCCGG CTGGGATTTAGCCTGGTGTCTGTGTACGCCCCGGT CTCCCAGGGGCTTCCCAGTGGTCCCCAGGAACCC TCGACAGGGCCCCGGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGG CAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGCCCTCGATC GAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAA GTTTAGTCTTTTGTCTTTTATTTAGGTCCCGGA TCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTC AGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGG AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTG TACCCGCGGCCGCCAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTGCCACCATGACCGCCTGCGCCCGCCGAGC GGGTGGGCTTCCGGACCCCGGGCTCTGCGGTCCC GCGTGGTGGGCTCCGTCCCTGCCCCGCCTCCCCC GGGCCCTGCCCCGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCCT GCTTCTGCTGCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGTG TTCACGGTGGGGGTCCTGGGCCCCCTGGGCTTGCG ACCCCATCTTCTCTCGGGCTCGCCCGACCTGGC CGCCCGCCTGGCCGCCGCCCGCCTGAACCGCGA CCCCGGCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGT

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

配列 番号	名称	説明	配列
			AGCGCTGCTGCCCCAGCCTTGCCGGACGCCGGG CTCGCTGGGGGCGCGTGTCTCCGCGCTGGCCCCG GTGTCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGG CCTGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAG CCGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCCTG GACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCCCCCTGCCGT GACCCCCGCGCGGATGCCCTCTACGCCCTGCTT CGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTGGTCA CCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGCGGGAC GCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCCGGGCCCT GCCTGTGCCTCCGTGACTTCCATGGAGCCCTTG GACCTGTCTGGAGCCCGGGAGGCCCTGAGGAAG GTTCGGGACGGGCCCAGGGTCACAGCAGTGATC ATGGTGATGCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGAG GAGCAGCGCTACCTCCTGGAGGCCGAGAGGAG CTGGGCCTGACCGATGGCTCCCTGGTCTTCCTGC CCTTCGACACGATCCACTACGCCTTGTCGCCAGG CCCGGAGGCCTTGCGCCGCACTCGCCAACAGCTCC CAGCTTCGACAGGGCCCACGATGCCGTGCTCACCC TCACGCGCCACTGTCCCTCTGAAGGCAGCGTGCT GGACAGCCTGCGCAGGGCTCAAGAGCGCCGCGA GCTGCCCTCTGACCTCAATCTGCAGCAGGTCTCC CCACTCTTTGGCACCATCTATGACGCGGTCTTCT TGCTGGCAAGGGGCGTGGCAGAAGCGCGGGCTG CCGCAGGTGGCAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTG TGGCCCGCCACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTG GCTTCTGCGGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGC CCCCATTCTGTGCTGCTAGACACGGACGCGGCGG GAGACCGGCTTTTGGCCACATACATGCTGGATCC TGCCCGGGGCTCCTTCCTCTCCGCCGGTACCCGG ATGCACTTCCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGA CCTGACCCCTCGTGCTGGTTCGATCCAAACAACA TCTGCGGTGGAGGACTGGAGCCGGGCCTCGTCTT TCTTGGCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTG GCTGGGGCCTTCCTGGCCATTATGTGAGGCACC GGCTACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCCAA CAAGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACCTTT

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

配列 番号	名称	説明	配列
			CTCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTG GCCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCCG AGCATGTCAGACATTTCGACGGCCCCAGCCAA CACTTGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATGAGG GAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCCAGGGG ATCAGCACATAGCTATCCGCCCAGCAACCAAGA CGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCCGGCATGA GAACGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTTTCCTGGCT CGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCCCTCTGGGAG GGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAGCACTGCACG CGGGGCTCTCTTCAGGACCTCCTCGCTCAGAGAG AAATAAAGCTGGACTGGATGTTCAAGTCCTCCCT CCTGCTGGACCTTATCAAGGGAATAAGGTATCTG CACCATCGAGGCGTGGCTCATGGGCGGCTGAAG TCACGGAAGTGCATAGTGGATGGCAGATTCGTA CTCAAGATCACTGACCACGGCCACGGGAGACTG CTGGAAGCACAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCCC AGAGCGGAGGACCAGCTGTGGACAGCCCCGGAG CTGCTTAGGGACCCAGCCCTGGAGCGCCGGGGA ACGCTGGCCGCGACGTCTTTAGCTTGGCCATCA TCATGCAAGAAGTAGTGTCCGCAGTGCCCTTA TGCCATGCTGGAGCTCACTCCCGAGGAAGTGGT GCAGAGGGTGCGGAGCCCCCTCCACTGTGTCG GCCCTTGGTGTCCATGGACCAGGCACCTGTCGAG TGTATCCTCCTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGC AGCCGGAAC TTCGGCCCTCCATGGACCACACCTT CGACCTGTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAA GACGAACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTG GAGCAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCC GGGAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAG CAGAAGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTG CCTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTGAAGACGGGG ACACCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGTG ACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCACCA CCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTGAGGTTGT GGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTTTGAT GCCATCATTGGTTCCACGATGTCTACAAGGTGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 9】

配列 番号	名称	説明	配列
			AGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGGCCTCGG GGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGACACGCGG CAGAGATCGCCAACATGTCACTGGACATCCTCA GTGCCGTGGGCAC'TTTCCGCATGCGCCATATGCC TGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGGCCTGCAC TCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGGTGGGCCTC ACCATGCCGCGGTACTGCCTGTTTGGGGACACGG TCAACACCGCCTCGCGCATGGAGTCCACCGGGCT GCCTTACCGCATCCACGTGAACTTGAGCACTGTG GGGATTCTCCGTGCTCTGGACTCGGGCTACCAGG TGGAGCTGCGAGGCCGCACGGAGCTGAAGGGCA AGGGCGCCGAGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCA GACGCGGCTTCAACAAGCCCATCCCCAAACCGC CTGACCTGCAACCGGGGTCCAGCAACCACGGCA TCAGCCTGCAGGAGATCCCACCCGAGCGGCGAC GGAAGCTGGAGAAGGCGCGGCCGGGCCAGTTCT CTTGAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAATT CCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCC GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA CTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATC GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA TTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGG CCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACT CCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG GGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCAGGGCTTTG CCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

配列 番号	名称	説明	配列
3	AAVss- CMV- hGUCY2 D- WPRE(m ut6)	AAV2 5' ITR: 1- 141 bp CMV: 169-757 bp コザック: 782- 787 bp hGUCY2D [NM_000180.4 由来の cds]: 788-4099 bp WPRE(mut6): 4100-4688 bp BGH pA: 4743- 4950 bp AAV2 3' ITR: 4958-5098 bp	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGAC CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAG GGGTTCCTTCTAGACAACCTTTGTATAGAAAAGTT GTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTTCATT AGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACA TAACCTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC CCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGAC GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGA CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT TTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT TGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCG CCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAG TGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTGCCACCATGACCGCCTGCGCCCGCCGAG CGGGTGGGCTTCCGGACCCCGGGCTCTGCGGTCC CGCGTGGTGGGCTCCGTCCCTGCCCCGCCTCCCC CGGGCCCTGCCCCGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCC TGCTTCTGCTGCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGT GTTACGGTGGGGGTCTTGGGCCCCCTGGGCTTGC GACCCCATCTTCTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGG CCGCCCCGCTGGCCGCCGCCCGCCTGAACCGCG ACCCCGGCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

配列 番号	名称	説明	配列
			TAGCGCTGCTGCCCCGAGCCTTGCCGGACGCCGG GCTCGCTGGGGGCGGTGTCTCCGCGCTGGCCCCG CGTGTCGGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCG GCCTGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAA GCCGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCTT GGACGCAGGCGGAGGGCACACGGCCCCCTGCCG TGACCCCCGCGCGGATGCCCTCTACGCCCTGCT TCGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTGGTC ACCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGCGGGA CGCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCCGGGC CTGCCTGTGCGCTCCGTGACTTCCATGGAGCCCT TGGACCTGTCTGGAGCCCCGGAGGCCCTGAGGA AGGTTCGGGACGGGCCCAGGGTCACAGCAGTGA TCATGGTGATGCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGA GGAGCAGCGCTACCTCCTGGAGGCCGCAGAGGA GCTGGGCCGTGACCGATGGCTCCCTGGTCTTCCTG CCCTTCGACACGATCCACTACGCCTTGTCCCCAG GCCCCGAGGCCCTTGCCGCACTCGCCAACAGCT CCCAGCTTCGCAGGGCCCCACGATGCCGTGCTCAC CCTCACGCGCCACTGTCCCTCTGAAGGCAGCGTG CTGGACAGCCTGCGCAGGGCTCAAGAGCGCCGC GAGCTGCCCTCTGACCTCAATCTGCAGCAGGTCT CCCCACTCTTTGGCACCATCTATGACGCGGTCTT CTTGCTGGCAAGGGGCGTGCGCAGAAGCGCGGGC TGCCCGAGGTGGCAGATGGGTGTCCGGAGCAGC TGTGGCCCGCCACATCCGGGATGCGCAGGTCCCT GGCTTCTGCGGGGACCTAGGAGGAGACGAGGAG CCCCCATTCGTGCTGCTAGACACGGACGCGGCG GGAGACCGGCTTTTGGCCACATACATGCTGGATC CTGCCCCGGGGCTCCTCCTCTCCGCCGGTACCCG GATGCACTTCCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGG ACCTGACCCCTCGTGCTGGTTCGATCCAAACAAC ATCTGCGGTGGAGGACTGGAGCCGGGCCCTCGTC TTTCTTGGCTTCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGC TGGCTGGGGCCTTCCTGGCCATTATGTGAGGCA CCGGCTACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCC AACAAGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACC

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

配列 番号	名称	説明	配列
			TTTCTCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGG TGGCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCC GCAGCATGTCAGACATTTCGAGCGGCCCCAGCC AACACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATGA GGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATCCCAGG GGATCAGCACATAGCTATCCGCCCAGCAACCAA GACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCCGGCAT GAGAACGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTTTCCTGG CTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCCCTCTGGG AGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAGCACTGCA CGCGGGGCTCTCTTCAGGACCTCCTCGCTCAGAG AGAAATAAAGCTGGACTGGATGTTCAAGTCCTC CCTCCTGCTGGACCTTATCAAGGGAATAAGGTAT CTGCACCATCGAGGCGTGGCTCATGGGCGGCTG AAGTCACGGAAGTGCATAGTGGATGGCAGATTC GTACTCAAGATCACTGACCACGGCCACGGGAGA CTGCTGGAAGCACAGAAGGTGCTACCGGAGCCT CCCAGAGCGGAGGACCAGCTGTGGACAGCCCCG GAGCTGCTTAGGGACCCAGCCCTGGAGCGCCGG GGAACGCTGGCCGCGACGTCTTTAGCTTGGCCA TCATCATGCAAGAAGTAGTGTGCCGCAGTGCCCC TTATGCCATGCTGGAGCTCACTCCCGAGGAAGTG GTGCAGAGGGTGCGGAGCCCCCTCCACTGTGTCT GGCCCTTGGTGTCCATGGACCAGGCACCTGTCTGA GTGTATCCTCCTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGA GCAGCCGGAACCTCGGCCCTCCATGGACCACAC CTTCGACCTGTTCAAGAACATCAACAAGGGCCG GAAGACGAACATCATTGACTCGATGCTTCGGAT GCTGGAGCAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCT GATCCGGGAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGA AAAGCAGAAGACAGACCGGCTGCTTACACAGAT GCTGCCTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACG GGGACACCAGTGGAGCCCAGTACTTTGAGCAA GTGACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCA CCACCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTGAGGT TGTGGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTTT GATGCCATCATTGGTTCCCACGATGTCTACAAGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

配列 番号	名称	説明	配列
			TGGAGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGGCCT CGGGGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGACACG CGGCAGAGATCGCCAACATGTCACTGGACATCC TCAGTGCCGTGGGCACCTTCCGCATGCGCCATAT GCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGGCCTG CACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGGTGGGC CTCACCATGCCGCGGTACTGCCTGTTTGGGGACA CGGTCAACACCGCCTCGCGCATGGAGTCCACCG GGCTGCCTTACCGCATCCACGTGAACCTGAGCAC TGTGGGGATTCTCCGTGCTCTGGACTCGGGCTAC CAGGTGGAGCTGCGAGGCCGCACGGAGCTGAAG GGCAAGGGCGCCGAGGACACTTTCTGGCTAGTG GGCAGACGCGGCTTCAACAAGCCCATCCCCAAA CCGCCTGACCTGCAACCGGGGTCCAGCAACCAC GGCATCAGCCTGCAGGAGATCCCACCCGAGCGG CGACGGAAGCTGGAGAAGGCGCGGCCGGGCCAG TTCTCTTGAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTT GTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATG CCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTT CATTTTCTCCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGT CTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCA ACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGCA ACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTC AGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCTCCCT ATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTG CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCA CTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATC GTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCC TTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGC GGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTTCCGCGTC TTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCT TTGGGCCCGCCTCCCCGCACCCAGCTTCTTGTAC AAAGTGGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCT CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT TTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 4】

配列 番号	名称	説明	配列
			GGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATG AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG CAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGC ATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGAT GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGA CGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 5】

配列 番号	名称	説明	配列
4	AAVss- CMV- hGUCY2 D	AAV2 5' ITR: 1- 141 bp CMV: 169-757 bp コザック: 782- 787 bp hGUCY2D [NM_000180.4 由来の cds]: 788-4099 bp BGH pA: 4154- 4361 bp AAV2 3' ITR: 4369-4509 bp	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCTTCTAGACAACTTTGTATAGAAAAGTT GTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATT AGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACA TAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGC CCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGAC GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA CTGCCCACCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGA CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT TTGACTCACGGGGATTTCCTAAGTCTCCACCCCAT TGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCTAAGTCTCGTAACAACCTCCG CCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTAC GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAG TGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTGCCACCATGACCGCTGCGCCCCGCCGAG CGGGTGGGCTTCCGGACCCCGGGCTCTGCGGTCC CGCGTGGTGGGCTCCGTCCCTGCCCCGCCTCCCC CGGGCCCTGCCCCGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCC TGCTTCTGCTGCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGT GTTACGGTGGGGGTCTTGGGCCCCCTGGGCTTGC GACCCCATCTTCTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGG CCGCCCCGCTGGCCGCCGCCCGCTGAACCGCG ACCCCGGCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGT AGCGCTGCTGCCCCGAGCCTTGCCGGACGCCGGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 6】

配列 番号	名称	説明	配列
			CTCGCTGGGGGGCCGTGTCTCCGCGCTGGCCCCG GTGTCCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGG CCTGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAG CCGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCCTG GACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCCCCTGCCGT GACCCCCGCCGCGGATGCCCTCTACGCCCTGCTT CGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTGGTCA CCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGCGGGAC GCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCCCGGGCCT GCCTGTGCGCTCCGTGACTTCCATGGAGCCCTTG GACCTGTCTGGAGCCCGGGAGGCCCTGAGGAAG GTTCCGGGACGGGCCCAGGGTCACAGCAGTGATC ATGGTGATGCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGAG GAGCAGCGCTACCTCCTGGAGGCCGCGAGAGGAG CTGGGCCTGACCGATGGCTCCCTGGTCTTCCTGC CCTTCGACACGATCCACTACGCCTTGTCGCCAGG CCCGGAGGCCTTGCCCGCACTCGCCAACAGCTCC CAGCTTCGCAGGGCCCACGATGCCGTGCTCACCC TCACGCGCCACTGTCCCTCTGAAGGCAGCGTGCT GGACAGCCTGCGCAGGGCTCAAGAGCGCCGCGA GCTGCCCTCTGACCTCAATCTGCAGCAGGTCTCC CCACTCTTTGGCACCATCTATGACGCGGTCTTCT TGCTGGCAAGGGGCGTGGCAGAAGCGCGGGCTG CCGCAGGTGGCAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTG TGGCCCGCCACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTG GCTTCTGCGGGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGC CCCCATTCGTGCTGCTAGACACGGACGCGGCGG GAGACCGGCTTTTTGCCACATACATGCTGGATCC TGCCCGGGGCTCCTTCCTCTCCGCCGGTACCCGG ATGCACTTCCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGA CCTGACCCCTCGTGCTGGTTTCGATCCAAACAACA TCTGCGGTGGAGGACTGGAGCCGGGCCCTCGTCTT TCTTGGCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTG GCTGGGGCCTTCCTGGCCCCATTATGTGAGGCACC GGCTACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCCAA

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 7】

配列 番号	名称	説明	配列
			CAAGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACCTTT CTCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTG GCCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCCG AGCATGTCAGACATTTCGCAGCGCCCCAGCCAA CACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATGAGG GAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATCCCAGGGG ATCAGCACATAGCTATCCGCCCAGCAACCAAGA CGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCCGGCATGA GAACGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTTTCCTGGCT CGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCCCTCTGGGAG GGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAGCACTGCACG CGGGGCTCTCTTCAGGACCTCCTCGCTCAGAGAG AAATAAAGCTGGACTGGATGTTCAAGTCCTCCCT CCTGCTGGACCTTATCAAGGGAATAAGGTATCTG CACCATCGAGGCGTGGCTCATGGGCGGCTGAAG TCACGGAAGTGCATAGTGGATGGCAGATTCGTA CTCAAGATCACTGACCACGGCCACGGGAGACTG CTGGAAGCACAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCCC AGAGCGGAGGACCAGCTGTGGACAGCCCCGGAG CTGCTTAGGGACCCAGCCCTGGAGCGCCGGGGA ACGCTGGCCGGCGACGTCTTTAGCTTGGCCATCA TCATGCAAGAAGTAGTGTGCCGAGTGCCCTTA TGCCATGCTGGAGCTCACTCCCGAGGAAGTGGT GCAGAGGGTGCGGAGCCCCCTCCACTGTGTCG GCCCTTGGTGTCCATGGACCAGGCACCTGTCGAG TGTATCCTCCTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGC AGCCGGAAC TTCGGCCCTCCATGGACCACACCTT CGACCTGTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAA GACGAACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTG GAGCAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCC GGGAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAG CAGAAGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTG CCTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTGAAGACGGGG ACACCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGTG ACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCACCA CCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTGAGGTTGT GGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTTTGAT

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 8】

配列 番号	名称	説明	配列
			GCCATCATTTGGTTCCACGATGTCTACAAGGTGG AGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGGCCTCGG GGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGACACGCGG CAGAGATCGCCAACATGTCACTGGACATCCTCA GTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCGCCATATGCC TGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGGCCTGCAC TCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGGTGGGCCTC ACCATGCCGCGGTACTGCCTGTTTGGGGACACGG TCAACACCGCCTCGCGCATGGAGTCCACCGGGCT GCCTTACCGCATCCACGTGAACTTGAGCACTGTG GGGATTCTCCGTGCTCTGGACTCGGGCTACCAGG TGGAGCTGCGAGGCCGCACGGAGCTGAAGGGCA AGGGCGCCGAGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCA GACGCGGCTTCAACAAGCCCATCCCCAAACCGC CTGACCTGCAACCGGGGTCCAGCAACCACGGCA TCAGCCTGCAGGAGATCCCACCCGAGCGGCGAC GGAAGCTGGAGAAGGCGCGGCCGGGCCAGTTCT CTTGAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAATT CCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCC GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA CTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATC GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA TTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGG CCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGCCACT CCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG GGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCGGGCTTTG CCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG
5	AAV2 5' ITR	141 bp	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCT

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 9】

配列 番号	名称	説明	配列
6	AAV2 3' ITR	141 bp	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTC TCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA CCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG
7	RK プロ モーター		TGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATC TACGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTA CCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGAATTC GCTAGCAAGATCCAAGCTCAGATCTCGATCGAG TTGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTT CTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGA AGGGGCCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCCA AGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTCTAGCACCTT CTTGCCACTCCTAAGCGTCCTCCGTGACCCCGGC TGGGATTTAGCCTGGTGTGTGTGTCAGCCCCGGTC TCCCAGGGGCTTCCCAGTGGTCCCCAGGAACCCT CGACAGGGCCCCGGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGG CAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGCCCTCGATC GAGGAACTGAAAAAC
8	CMV プ ロモータ ー		TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA GTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACAT AACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGAC GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA CTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGA CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT TTGACTCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCCAT TGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCTCAAAATGTCGTAACAACCTCCG CCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAG TGAACCGTCAGATC

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 0】

配列 番号	名称	説明	配列
9	hGUCY2 D [NM_000 180.4 由 来の cds]		ATGACCGCCTGCGCCCGCCGAGCGGGTGGGCTT CCGGACCCCGGGCTCTGCGGTCCCGCGTGGTGG GCTCCGTCCCTGCCCCGCCTCCCCGGGGCCCTGC CCGGGTCCCGCTCCTGCTGCTCCTGCTTCTGCTG CAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGTGTTACGGTGG GGGTCTTGGGCCCCTGGGCTTGCGACCCCATCTT CTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGGCCGCCCGCCTG GCCGCCGCCCGCCTGAACCGCGACCCCGGCCCTG GCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAGCGCTGCTGC CCGAGCCTTGCCGGACGCCGGGCTCGCTGGGGG CCGTGTCTCCCGCTGGCCCGCGTGTCTGGGCCCT CGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGGCCTGCCGGCC AGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAGCCGGGATCGC GCTGGTGGCCTGGGGCTGCCCCGGACGCAGGC GGAGGGACACACGGCCCCTGCCGTGACCCCCGC CGCGGATGCCCTCTACGCCCTGCTTCGCGCATTC GGCTGGGCGCGCGTGGCCCTGGTCACCGCCCCC AGGACCTGTGGGTGGAGGCGGGACGCTCACTGT CCACGGCACTCAGGGCCCCGGGGCCTGCCTGTCG CCTCCGTGACTTCCATGGAGCCCTTGGACCTGTC TGGAGCCCGGGAGGCCCTGAGGAAGGTTTCGGGA CGGGCCCAGGGTCACAGCAGTGATCATGGTGAT GCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGAGGAGCAGCG CTACCTCCTGGAGGCCGCAGAGGAGCTGGGCCT GACCGATGGCTCCCTGGTCTTCCTGCCCTTCGAC ACGATCCACTACGCCTTGTCCCCAGGCCCGGAGG CCTTGGCCGCACTCGCCAACAGCTCCCAGCTTCG CAGGGCCACGATGCCGTGCTCACCCTCACGCGC CACTGTCCCTCTGAAGGCAGCGTGCTGGACAGCC TGCGCAGGGCTCAAGAGCGCCGCGAGCTGCCCT CTGACCTCAATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTT TGGCACCATCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCA AGGGGCGTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGT

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 1】

配列 番号	名称	説明	配列
			GGCAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCCG CACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTCTGCG GGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCCCATTGCG TGCTGCTAGACACGGACGCGGCGGGAGACCGGC TTTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCCCGGG CTCCTTCCTCTCCGCCGGTACCCGGATGCACTTC CCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGACCTGACCCC TCGTGCTGGTTCGATCCAAACAACATCTGCGGTG GAGGACTGGAGCCGGGCCCTCGTCTTTCTTGGCTT CCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGGCTGGGGCC TTCCTGGCCCATTATGTGAGGCACCGGCTACTTC ACATGCAAAATGGTCTCCGGCCCCAACAAAGATCA TCCTGACCGTGGACGACATCACCTTTCTCCACCC ACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTGGCCCAGGG GAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCCGAGCATGTC AGACATTTCGAGCGGCCCCAGCCAACACTTGGA CAGCCCCAACATTGGTGTCTATGAGGGAGACAG GGTTTGGCTGAAGAAATTCCCAGGGGATCAGCA CATAGCTATCCGCCCAGCAACCAAGACGGCCTTC TCCAAGCTCCAGGAGCTCCGGCATGAGAACGTG GCCCTCTACCTGGGGCTTTTCCTGGCTCGGGGAG CAGAAGGCCCTGCGGCCCTCTGGGAGGGCAACC TGGCTGTGGTCTCAGAGCACTGCACGCGGGGCTC TCTTCAGGACCTCCTCGCTCAGAGAGAAATAAA GCTGGACTGGATGTTCAAGTCCTCCCTCCTGCTG GACCTTATCAAGGGAATAAGGTATCTGCACCATC GAGGCGTGGCTCATGGGCGGCTGAAGTCACGGA ACTGCATAGTGGATGGCAGATTCGTA CTCAAGAT CACTGACCACGGCCACGGGAGACTGCTGGAAGC ACAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCCCAGAGCGGA GGACCAGCTGTGGACAGCCCCGGAGCTGCTTAG GGACCCAGCCCTGGAGCGCCGGGGAACGCTGGC CGGCGACGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAA GAAGTAGTGTGCCGAGTGCCCCCTTATGCCATGC TGGAGCTCACTCCCGAGGAAGTGGTGCAGAGGG TGCGGAGCCCCCTCCACTGTGTGCGGCCCTTGGT GTCCATGGACCAGGCACCTGTGAGTGTATCCTC

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 2】

配列 番号	名称	説明	配列
			CTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGGAA CTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACCTGT TCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGACGAACA TCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTGGAGCAGTA CTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCCGGGAGCG CACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAGAAGA CAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTGCCTCCGTC TGTGGCTGAGGCCTTGAAGACGGGGACACCACT GGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGTGACACTGTA CTTTAGTGACATTGTGGGCTTCACCACCATCTCT GCCATGAGTGAGCCCATTTGAGGTTGTGGACCTGC TCAACGATCTCTACACACTCTTTGATGCCATCAT TGTTTCCACGATGTCTACAAGGTGGAGACAAT AGGGGACGCCTATATGGTGGCCTCGGGGCTGCC CCAGCGGAATGGGCAGCGACACGCGGCAGAGAT CGCCAACATGTCACTGGACATCCTCAGTGCCGTG GGCACTTTCCGCATGCGCCATATGCCTGAGGTTT CCGTGCGCATCCGCATAGGCCTGCACTCGGGTCC ATGCGTGGCAGGCGTGGTGGGCCTCACCATGCC GCGGTACTGCCTGTTTGGGGACACGGTCAACACC GCCTCGCGCATGGAGTCCACCGGGCTGCCTTACC GCATCCACGTGAACCTGAGCACTGTGGGGATTCT CCGTGCTCTGGACTCGGGCTACCAGGTGGAGCTG CGAGGCCGCACGGAGCTGAAGGGCAAGGGCGCC GAGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCAGACGCGGC TTCAACAAGCCCATCCCCAAACCGCCTGACCTGC AACCGGGGTCCAGCAACCACGGCATCAGCCTGC AGGAGATCCCACCCGAGCGGCGACGGAAGCTGG AGAAGGCGCGGCCCGGGCCAGTTCTCTTGA

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 3】

配列 番号	名称	説明	配列
10	WPRE (mut6)		AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGAT TGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACG CTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATC ATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCC TCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGA GGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGT GGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACT GGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTT CCGGGACTTTCGCTTTCCCCCCTCCCTATTGCCAC GGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGC TGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAT TCCGTGGTGTTGTCTCGGGGAAATCATCGTCCTTTC CTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT GCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCC CTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGC TGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTT CGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCG CCTCCCCGC
11	BGH pA		CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC CCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTG CCACTCCCAGTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGA AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG GGGGAGGATTGGAAGAGAATAGCAGGCATGCT GGGGA

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 4】

配列 番号	名称	説明	配列
12	hRetGC1 [NM_000 180.4]		MTACARRAGGLPDPGLCGPAWWAPSLPRLPRALP RLPLLLLLLLLLQPPALSAVFTVGVLPWACDPIFSR ARPDLAARLAAARLNDRDPGLAGGPRFEVALLPEPC RTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLA EEAGIALVPWGPCPWTQAEGTTAPAVTPAADALYA LLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAGRSLSTALRAR GLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPVRTAVI MVMHSVLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPF DTIHYALSPGPEALAALANSSQLRRAHDAVLTLTR HCPSEGSVLDSLRRAQERRELPSDLNLQQVSPLFGT IYDAVFLARGVAEAAAAGGRWVSGAAVARHIR DAQVPGFCGDLGGDEEPPFVLLDTDAAGDRLFAT YMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPSCHF DPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVGMGLAGAFLAH YVRHRLMHMQMVSGPNKIILTVDDITFLPHGGTS RKVAQGSRSSLGARMSDIRSGPSQHLDSPNIGVYE GDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHEN VALYLGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRG SLQDLLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKIRYLHHR GVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLAEQK VLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLAGDVF SLAIIHQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVSPPL CRPLVSMQAPVEICLLMKQCWAEQPELRPSMDH TFDLFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIR ERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPV EPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDL YTLFDAIIGSHDVYKVETIGDAYMVASGLPQRNGQ RHAAEIANMSLDILSAVGTFMRMRHMPEVPVRIRIGL HSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTG LPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELK GK GAEDTFWLVGRRGFNKPIKPPDLQPGSSNHGISLQ EIPPERRRKLEKARPGQFS

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 5】

配列 番号	名称	説明	配列
13	hGUCY2 D (コード ン最適化 配列の実 施例 1)		ATGACAGCCTGTGCCAGGAGAGCTGGTGGGCTT CCTGACCCTGGGCTCTGTGGTCCAGCTTGGTGGG CTCCCTCCCTGCCCAGACTCCCCAGGGCCCTGCC CAGGCTCCCTCTCCTGCTGCTCCTGCTTCTGCTGC AGCCCCCTGCCCTCAGTGCAGTGTTCACTGTGGG GGTCTGGGGCCCCCTGGGCTTGTGACCCCATCTTC TCTAGGGCTAGACCTGACCTGGCTGCCAGGCTGG CTGCAGCCAGGCTGAACAGGGACCCTGGCCTGG CAGGGGGTCCCAGGTTTGAGGTAGCCCTGCTGCC AGAGCCTTGCAGGACACCAGGCTCCCTGGGGGC AGTGTCTCTGCCCTGGCCAGAGTGTGAGGCCTA GTGGGTCCTGTGAACCCTGCAGCCTGCAGACCA GCAGAGCTGCTGGCTGAAGAAGCTGGGATAGCA CTGGTGCCCTGGGGCTGCCCCTGGACTCAGGCTG AGGGCACACAGCCCCTGCAGTGACCCAGCTG CAGATGCCCTCTATGCCCTGCTTAGAGCATTTGG CTGGGCCAGAGTGGCCCTGGTCACTGCCCTCAG GACCTGTGGGTGGAGGCAGGAAGGTCAGTGTCC ACAGCACTCAGGGCCAGAGGCCTGCCTGTGGCC TCTGTGACTTCCATGGAGCCCTTGGACCTGTCTG GAGCCAGAGAGGCCCTGAGGAAGGTTAGAGATG GGCCCAGGGTCACAGCAGTGATCATGGTGATGC ACAGTGTGCTGCTGGGTGGAGAGGAGCAGAGGT ACCTCCTGGAGGCTGCAGAGGAGCTGGGCCTGA CAGATGGCTCCCTGGTCTTCCTGCCCTTTGACAC CATCCACTATGCCTTGTCCCCAGGCCAGAGGCC TTGGCTGCACTAGCCAACAGCTCCCAGCTTAGAA GGGCCCATGATGCAGTGCTCACCCTCACCAGAC ACTGTCCCTCTGAAGGCTCAGTGCTGGACAGCCT GAGAAGGGCTCAAGAGAGGAGAGAGCTGCCCTC TGACCTCAATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTT

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 6】

配列 番号	名称	説明	配列
			GGCACCATCTATGATGCTGTCTTCTTGCTGGCAA GGGGAGTGGCAGAAGCCAGAGCTGCTGCAGGTG GCAGATGGGTGTCAGGAGCAGCTGTGGCCAGGC ACATCAGGGATGCCCAGGTCCCCTGGCTTCTGTGG GGACCTAGGAGGAGATGAGGAGCCCCCATTTGT GCTGCTAGACACAGATGCTGCAGGAGACAGGCT TTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCAGGGGC TCCTTCCTCAGTGCAGGTACCAGGATGCACTTCC CAAGAGGGGGATCAGCACCTGGACCTGACCCCA GCTGCTGGTTTGATCCAAACAACATCTGTGGTGG AGGACTGGAGCCTGGCCTTGTCTTTCTTGGCTTC CTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGGCTGGGGCCT TCCTGGCCCATTATGTGAGGCACAGGCTACTTCA CATGCAAATGGTCTCAGGCCCCAACAAGATCAT CCTGACTGTGGATGACATCACCTTTCTCCACCCA CATGGGGGCACCTCTAGAAAGGTGGCCCAGGGG AGTAGATCAAGTCTGGGTGCCAGGAGCATGTCA GACATTAGGTCTGGCCCCAGCCAACACTTGGAC AGCCCCAACATTGGTGTCTATGAGGGAGACAGG GTTTGGCTGAAGAAATTCCCAGGGGATCAGCAC ATAGCTATCAGGCCAGCAACCAAGACAGCCTTC TCCAAGCTCCAGGAGCTCAGGCATGAGAATGTG GCCCTCTACCTGGGGCTTTTCCTGGCTAGGGGAG CAGAAGGCCCTGCAGCCCTCTGGGAGGGCAACC TGGCTGTGGTCTCAGAGCACTGCACCAGGGGCTC TCTTCAGGACCTCCTTGCTCAGAGAGAAATAAAG CTGGACTGGATGTTCAAGTCCTCCCTCCTGCTGG ACCTTATCAAGGGAATAAGGTATCTGCACCATA GGGGAGTGGCTCATGGGAGACTGAAGTCAAGAA ACTGCATAGTGGATGGCAGATTTGTACTCAAGAT CACTGACCATGGCCATGGGAGACTGCTGGAAGC ACAGAAGGTGCTACCTGAGCCTCCCAGAGCTGA GGACCAGCTGTGGACAGCCCCCTGAGCTGCTTAG

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 7】

配列 番号	名称	説明	配列
			GGACCCAGCCCTGGAGAGGAGAGGAACCCTGGC AGGAGATGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAA GAAGTAGTGTGCAGAAGTGCCCCCTTATGCCATGC TGGAGCTCACTCCTGAGGAAGTGGTGCAGAGGG TGAGAAGTCCCCCTCCACTGTGTAGGCCCTTGGT GTCCATGGACCAGGCACCTGTTGAGTGTATCCTC CTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCTGAA CTTAGACCCTCCATGGACCACACCTTTGACCTGT TCAAGAACATCAACAAGGGCAGGAAGACCAACA TCATTGACTCAATGCTTAGAATGCTGGAGCAGTA CTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCAGGGAGAG GACAGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAGAAGA CAGACAGACTGCTTACACAGATGCTGCCTCCTTC TGTGGCTGAGGCCTTGAAGACAGGGACACCAGT GGAGCCTGAGTACTTTGAGCAAGTGACACTGTA CTTTAGTGACATTGTGGGCTTCACCACCATCTCT GCCATGAGTGAGCCCATTGAGGTTGTGGACCTGC TCAATGATCTCTACACACTCTTTGATGCCATCAT TGGTTCCCATGATGTCTACAAGGTGGAGACAATA GGGGATGCCTATATGGTGGCCTCTGGGCTGCCCC AGAGGAATGGGCAGAGGCATGCTGCAGAGATTG CCAACATGTCACTGGACATCCTCAGTGCTGTGGG CACTTTCAGGATGAGGCATATGCCTGAGGTTCCA GTGAGGATCAGAATAGGCCTGCACAGTGGTCCA TGTGTGGCAGGGGTGGTGGGCCTCACCATGCCC AGGTACTGCCTGTTTGGGGACACAGTCAACACTG CCAGTAGAATGGAGTCCACTGGGCTGCCTTACA GAATCCATGTGAACTTGAGCACTGTGGGGATTCT CAGGGCTCTGGACAGTGGCTACCAGGTGGAGCT GAGGGGCAGGACTGAGCTGAAGGGCAAGGGGG CAGAGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCAGAAAGAG GCTTCAACAAGCCCATCCCCAAACCCCTGACCT GCAACCAGGGTCCAGCAACCATGGCATCAGCCT GCAGGAGATCCCACCTGAGAGAAGGAGAAAGCT GGAGAAGGCCAGGCCAGGCCAGTTCTCTTGA

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 8】

配列 番号	名称	説明	配列
14	hGUCY2 D (コード ン最適化 配列の実 施例 2)		ATGACAGCCTGTGCCAGAAGGGCAGGTGGGCTT CCAGACCCAGGGCTCTGTGGTCCTGCTTGGTGGG CTCCCTCCCTGCCCAGACTCCCCAGAGCCCTGCC CAGGCTCCCCCTCCTGCTGCTCCTGCTTCTGCTGC AGCCCCCAGCCCTCAGTGCTGTGTTACAGTGGG GGTCTTGGGGCCCCCTGGGCTTGTGACCCCATCTTC TCTAGGGCTAGGCCTGACCTGGCAGCCAGGCTG GCAGCTGCCAGACTGAACAGGGACCCTGGCCTG GCAGGAGGTCCCAGGTTTGAGGTAGCTCTGCTGC CAGAGCCTTGCAGAACACCTGGCAGTCTGGGGG CTGTGTCCAGTGCCTGGCCAGAGTGTGAGGCTT GGTGGGTCTGTGAACCCTGCAGCCTGCAGACC AGCTGAGCTGCTGGCTGAAGAAGCTGGGATTGC TCTGGTGGCCTGGGGCTGCCCCTGGACCCAGGCT GAGGGCACACAGCCCCTGCTGTGACCCAGCT GCAGATGCCCTCTATGCCCTGCTTAGGGCATTG GCTGGGCCAGGGTGGCCCTGGTCACAGCACCCC AGGACCTGTGGGTGGAGGCTGGAAGGTCACTGT CCACTGCACTCAGGGCCAGGGGCCTGCCTGTGG CCTCAGTGACTTCCATGGAGCCCTTGGACCTGTC TGGAGCCAGGGAGGCCCTGAGGAAGGTTAGAGA TGGGCCCAGGGTCACAGCAGTGATCATGGTGAT GCACAGTGTGCTGCTGGGTGGTGAGGAGCAGAG GTACCTCCTGGAGGCTGCAGAGGAGCTGGGCCT GACAGATGGCTCCCTGGTCTTCTGCCCTTTGAC ACCATCCACTATGCCTTGTCCCCAGGCCCTGAGG CCTTGGCTGCACTGGCCAACAGCTCCCAGCTTAG AAGGGCCCATGATGCTGTGCTCACCTCACTAGA CACTGTCCCTCTGAAGGCAGTGTGCTGGACAGCC TGAGAAGGGCTCAAGAGAGAAGGGAGCTGCCCT CTGACCTCAATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTT

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 9】

配列 番号	名称	説明	配列
			TGGCACCATCTATGATGCTGTCTTCTTGCTGGCA AGGGGTGTGGCAGAAGCCAGAGCTGCTGCAGGT GGCAGATGGGTGTCTGGAGCAGCTGTGGCCAGG CACATCAGGGATGCACAGGTCCCTGGCTTCTGTG GGGACTTGGGAGGAGATGAGGAGCCCCCATTTG TGCTGCTGGACACAGATGCTGCAGGAGACAGAC TTTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCAGGGG CTCCTTCCTCTCTGCTGGTACCAGAATGCACTTC CCTAGAGGGGGATCAGCACCTGGACCTGACCCC TCATGCTGGTTTGATCCAAACAACATCTGTGGTG GAGGACTGGAGCCAGGCCTTGTCCTTCTTGCTT CCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGGCTGGGGCC TTCCTGGCCCATTAATGTGAGGCACAGGTTGCTTC ACATGCAAATGGTCTCAGGCCCCAACAAGATCA TCCTGACTGTGGATGACATCACCTTTCTCCACCC ACATGGGGGCACCTCTAGAAAGGTGGCCAGGG GAGTAGATCAAGTCTGGGTGCCAGAAGCATGTC AGACATTAGGAGTGGCCCCAGCCAACACTTGGA CAGCCCCAACATTGGTGTCTATGAGGGAGACAG GGTTTGGCTGAAGAAATTCCCAGGGGATCAGCA CATAGCTATCAGACCAGCAACCAAGACTGCCTTC TCCAAGCTCCAGGAGCTCAGACATGAGAATGTG GCCCTCTACCTGGGGCTTTTCTGGCTAGGGGAG CAGAAGGCCCTGCTGCCCTCTGGGAGGGCAACC TGGCTGTGGTCTCAGAGCACTGCACTAGAGGCTC TCTTCAGGACCTCCTTGCTCAGAGAGAAATAAAG CTGGACTGGATGTTCAAGTCCTCCCTCCTGCTGG ACCTTATCAAGGAATAAGGTATCTGCACCATA GGGGTGTGGCTCATGGGAGGCTGAAGTCAAGAA ACTGCATAGTGGATGGCAGATTTGTA CTCAAGAT CACTGACCATGGCCATGGGAGACTGCTGGAAGC ACAGAAGGTGCTGCCAGAGCCTCCCAGAGCAGA GGACCAGCTGTGGACAGCCCCTGAGCTGCTTAG GGACCCAGCCCTGGAGAGAAGGGGAACACTGGC TGGAGATGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAA GAAGTAGTGTGCAGGAGTGCCCCCTATGCCATGC TGGAGCTCACTCCAGAGGAAGTGGTGCAGAGGG

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 0】

配列 番号	名称	説明	配列
			TGAGAAGCCCACCTCCACTGTGTAGACCCTTGGT GTCCATGGACCAGGCACCTGTGGAGTGTATCCTC CTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCTGAA CTTAGGCCCTCCATGGACCACACCTTTGACCTGT TCAAGAACATCAACAAGGGCAGAAAGACCAACA TCATTGACTCAATGCTTAGAATGCTGGAGCAGTA CTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCAGGGAGAG GACTGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAGAAGAC AGACAGACTGCTTACACAGATGCTGCCTCCCTCT GTGGCTGAGGCCTTGAAGACAGGGACACCAGTG GAGCCTGAGTACTTTGAGCAAGTGACACTGTACT TTAGTGACATTGTGGGCTTCACCACCATCTCTGC CATGAGTGAGCCCATTGAGGTTGTGGACCTGCTC AATGATCTCTACACACTCTTTGATGCCATCATTG GTTCCCATGATGTCTACAAGGTGGAGACAATAG GGGATGCCTATATGGTGGCCTCTGGGCTGCCCCA GAGGAATGGGCAGAGGCATGCTGCAGAGATTGC CAACATGTCACTGGACATCCTCAGTGCTGTGGGC ACTTTCAGGATGAGACATATGCCTGAGGTTCTTG TGAGGATCAGGATAGGCCTGCACTCTGGTCCATG TGTGGCAGGAGTGGTGGGCCTCACCATGCCTAG ATACTGCCTGTTTGGGGACACAGTCAACACAGCC TCCAGGATGGAGTCCACAGGGCTGCCTTACAGG ATCCATGTGAACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCA GGGCTCTGGACTCAGGCTACCAGGTGGAGCTGA GGGGCAGGACTGAGCTGAAGGGCAAGGGAGCTG AGGACACTTTCTGGCTTGTGGGCAGAAGGGGCTT CAACAAGCCCATCCCCAAACCACCTGACCTGCA ACCAGGGTCCAGCAACCATGGCATCAGCCTGCA GGAGATCCCACCTGAGAGGAGAAGGAAGCTGGA GAAGGCAAGGCCAGGCCAGTTCTCTTGA

10

20

30

40

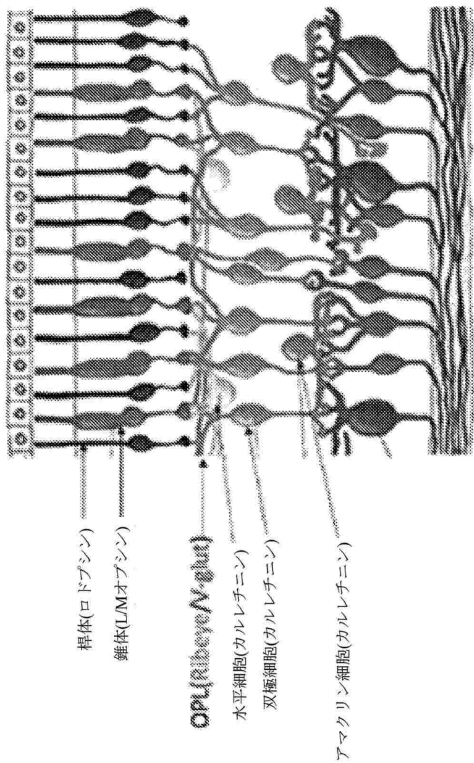
【0142】

本発明の前述の書面による記載は、当業者が、その最良の形態であると現在考えられるものを製造して使用することを可能にするが、当業者は、本明細書における特定の実施形態、方法、及び実施例の変形、組み合わせ、ならびに均等物の存在を理解して認識するであろう。

50

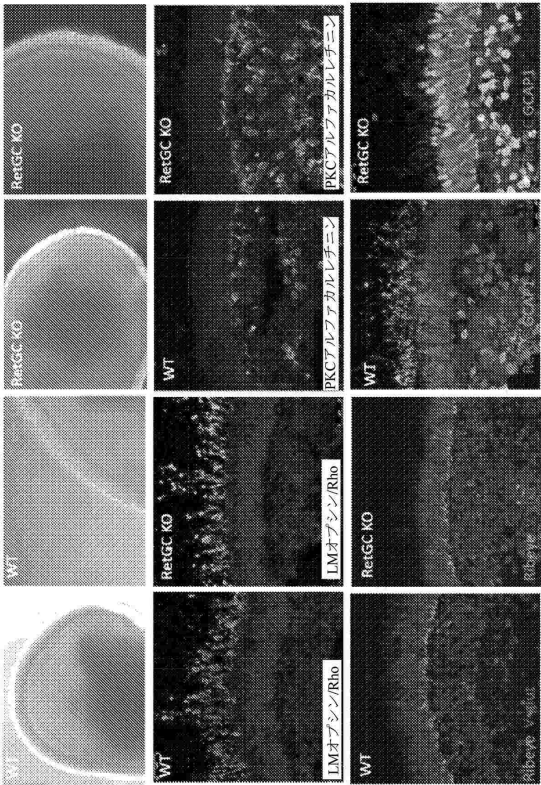
【図面】
【図 1】

図 1



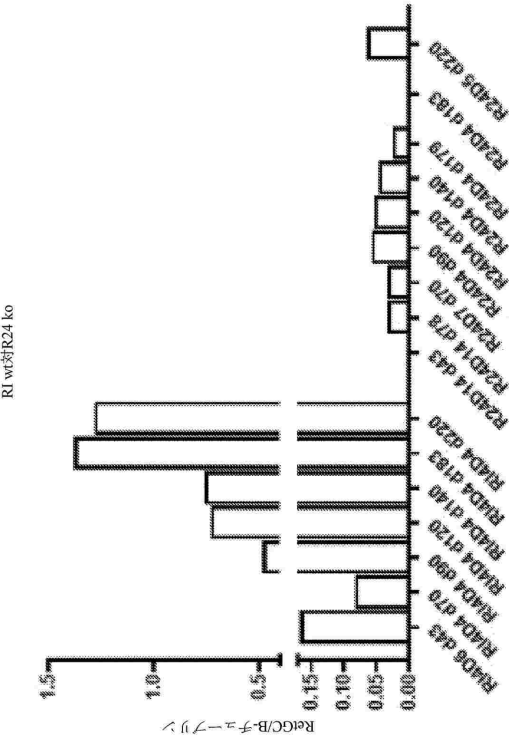
【図 2】

図 2



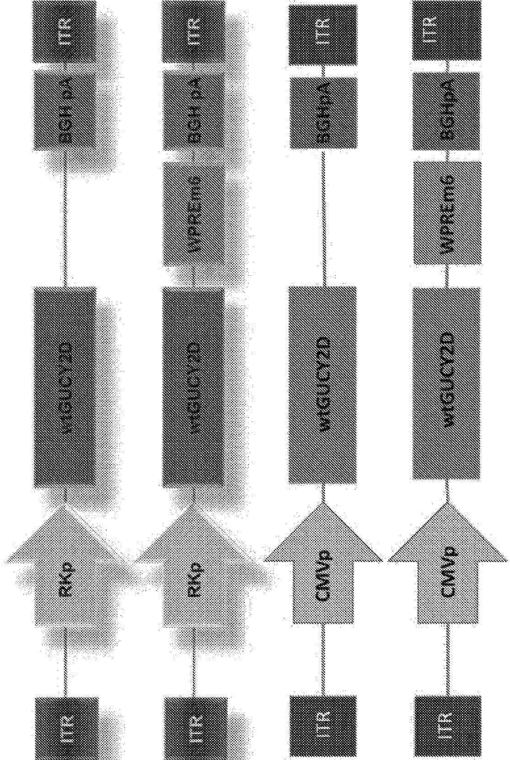
【図 3】

図 3



【図 4】

図 4



10

20

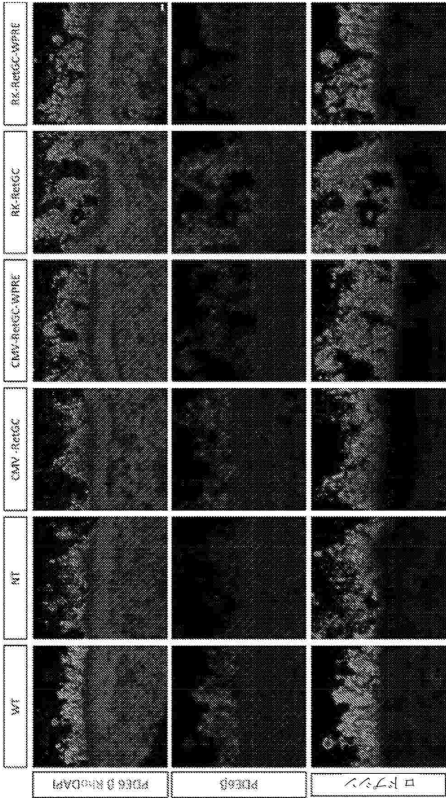
30

40

50

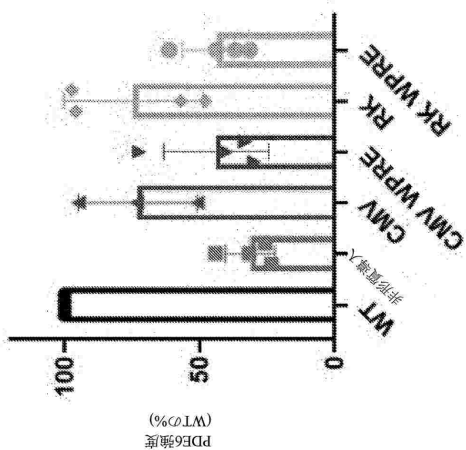
【図 5】

図 5



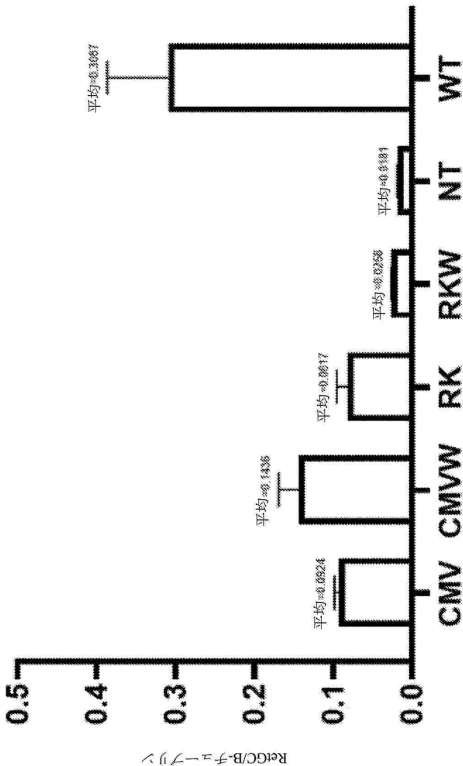
【図 6】

図 6



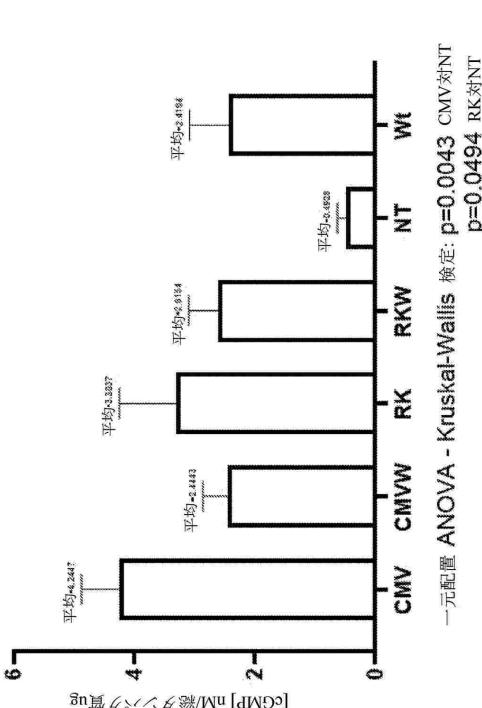
【図 7】

図 7



【図 8】

図 8



10

20

30

40

50

【配列表】

2024525721000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/IB2022/056458
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/86 C12N15/87 A61K38/51 C12N15/63 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 A61K C40B 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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOYE SANFORD L. ET AL: "AAV-Mediated Gene Therapy in the Guanylate Cyclase (RetGC1/RetGC2) Double Knockout Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis", HUMAN GENE THERAPY, vol. 24, no. 2, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 189-202, XP055968582, GB ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2012.193 abstract page 190, right-hand column, paragraph 2-4 ----- -/-	1-4, 7-35
☒ 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 7 October 2022		Date of mailing of the international search report 12/12/2022
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 Herrmann, Klaus

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/056458

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIHELEC MARIJA ET AL: "Long-Term Preservation of Cones and Improvement in Visual Function Following Gene Therapy in a Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis Caused by Guanylate Cyclase-1 Deficiency", HUMAN GENE THERAPY, vol. 22, no. 10, 10 August 2011 (2011-08-10), pages 1179-1190, XP055968587, GB ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2011.069 abstract page 1180, left-hand column, last paragraph -----	1-4, 7-35
X	WO 2011/133933 A2 (UNIV FLORIDA [US]; BOYE SHANNON ELIZABETH [US] ET AL.) 27 October 2011 (2011-10-27) claims 1-15 paragraphs [0008], [0013] -----	1-4, 7-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2022/056458
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/IB2022/056458
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: see additional sheet 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.: 3, 4 (completely); 1, 2, 7-35 (partially) Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/IB2022/056458

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3, 4(completely); 1, 2, 7-35(partially)

An expression construct comprising: (a) a rhodopsin kinase (RK) promotor sequence that confers expression in photoreceptor cells, and (b) a nucleic acid sequence encoding retinal membrane guanylyl cyclase 1 (RetGC1); wherein the nucleic acid sequence is operably linked to the promoter, and subject-matter relating thereto.

2. claims: 5, 6(completely); 1, 2, 7-35(partially)

An expression construct comprising: (a) a cytomegalovirus (CMV) promotor sequence that confers expression in photoreceptor cells, and (b) a nucleic acid sequence encoding retinal membrane guanylyl cyclase 1 (RetGC1); wherein the nucleic acid sequence is operably linked to the promoter, and subject-matter relating thereto.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/056458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011133933 A2	27-10-2011	AU 2011242527 B2	19-05-2016
		BR 112012026730 A2	22-09-2015
		CA 2796399 A1	27-10-2011
		CL 2012002969 A1	31-05-2013
		CN 102918152 A	06-02-2013
		CN 105821079 A	03-08-2016
		CO 6640236 A2	22-03-2013
		DK 2561067 T3	11-03-2019
		DK 3486320 T3	11-04-2022
		EA 201291103 A1	30-10-2013
		EA 202091105 A1	30-12-2020
		EP 2561067 A2	27-02-2013
		EP 3486320 A1	22-05-2019
		EP 4056700 A1	14-09-2022
		ES 2711256 T3	30-04-2019
		ES 2911185 T3	18-05-2022
		HR P20190144 T1	22-03-2019
		HU E041571 T2	28-05-2019
		JP 5897549 B2	30-03-2016
		JP 6533246 B2	19-06-2019
		JP 2013526854 A	27-06-2013
		JP 2015091273 A	14-05-2015
		JP 2017114914 A	29-06-2017
		JP 2019107037 A	04-07-2019
		KR 20130095643 A	28-08-2013
		KR 20190060881 A	03-06-2019
		KR 20200047642 A	07-05-2020
		LT 2561067 T	12-03-2019
		MX 351865 B	30-10-2017
		NZ 602897 A	26-09-2014
		PL 2561067 T3	31-05-2019
		PL 3486320 T3	09-05-2022
		PT 2561067 T	04-02-2019
		PT 3486320 T	30-03-2022
		SG 184876 A1	29-11-2012
		SG 10201502759T A	29-06-2015
		SG 10201800541S A	28-03-2018
		SG 10201913135Y A	27-02-2020
		SI 2561067 T1	30-04-2019
		TR 201901377 T4	21-02-2019
		US 2013210895 A1	15-08-2013
		US 2018100165 A1	12-04-2018
		US 2022186260 A1	16-06-2022
		WO 2011133933 A2	27-10-2011

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/54 (2006.01)	A 6 1 K 38/54	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,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,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100203828
弁理士 喜多村 久美

(72)発明者 アナスタシオス ジョージアディス
イギリス国, ロンドン アバディーンシャー エヌ1 7エヌキュー, ブリタニア ウォーク 92,
シー／オー メイラグティーエックス ユーケー アイアイ リミティド

F ターム (参考) 4C084 AA13 BA02 DC22 MA58 MA66 NA13 NA14 ZA33
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA58 MA66 NA13 NA14 ZA33