

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-521102
(P2025-521102A)

(43)公表日 令和7年7月8日(2025.7.8)

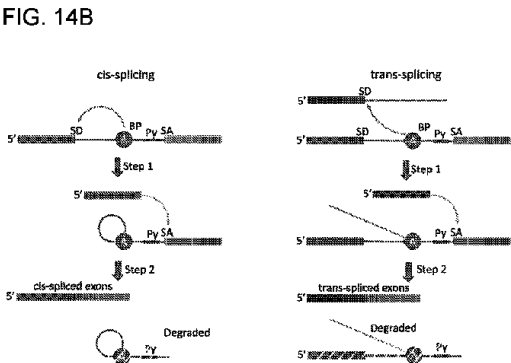
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全211頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-566858(P2024-566858)	(71)出願人	524414172	最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和5年5月12日(2023.5.12)		アシディアン セラピューティクス、インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和6年12月9日(2024.12.9)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ州		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066969		0 2 1 3 5 , 8 0 ゲスト ストリート		
(87)国際公開番号	WO2023/220742		ボストン		
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)				
(31)優先権主張番号	63/341,665	(74)代理人	100102978		
(32)優先日	令和4年5月13日(2022.5.13)		弁理士 清水 初志		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100205707		
(31)優先権主張番号	63/478,472		弁理士 小寺 秀紀		
(32)優先日	令和5年1月4日(2023.1.4)	(74)代理人	100160923		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100119507		
	最終頁に続く		弁理士 刑部 俊		
		(74)代理人	100142929		

(54)【発明の名称】 A B C A 4トランススプライシング分子

(57)【要約】

本明細書では、A B C A 4 遺伝子の変異を補正することができる核酸トランススプライシング分子（例えば、p r e -mRNAトランススプライシング分子（RTM）；RNAエクソン編集分子）が提供される。そのような分子は、A B C A 4 関連網膜ジストロフィー（例えば、スターガルト病または錐体桿体ジストロフィー）などの障害の治療に有用である。また本明細書では、本明細書に記載される核酸トランススプライシング分子を使用してA B C A 4 の変異を補正し、それによりA B C A 4 の変異に関連する障害を治療する方法、ならびにA B C A 4 の変異に関連する障害を治療するための本明細書に記載の核酸トランススプライシング分子の使用、及びA B C A 4 の変異に関連する障害の治療のための薬剤の調製における本明細書に記載の核酸トランススプライシング分子の使用が記載される。

【選択図】 図 1 4 B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸トランススプライシング分子であって、

(a) A B C A 4 エクソンを含むコードドメイン配列 (C D S)、

(b) 配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 85 % の同一性を有する配列を含むリンカードメイン、及び

(c) 内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 内の結合部位にアニーリングする結合ドメイン、を含み、

前記 C D S、前記リンカードメイン、及び前記結合ドメインは、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

10

【請求項 2】

核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 53 ~ 55 のいずれか 1 つのバリエーションを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる C D S であって、配列番号 53 ~ 55 のいずれか 1 つの前記バリエーションは、表 3 に列挙される少なくとも 1 つの潜在性スプライス部位において少なくとも 1 つの変異を含み、前記少なくとも 1 つのヌクレオチド変異は、少なくとも 1 つのヌクレオチド変異を含む前記少なくとも 1 つの潜在性スプライス部位の各々において潜在性スプライス部位の使用を低減させる、前記少 C D S、

(b) リンカードメイン、及び

(c) 内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 内の結合部位にアニーリングする結合ドメイン、を含み、

前記 C D S、前記リンカードメイン、及び前記結合ドメインは、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

20

【請求項 3】

配列番号 55 の前記バリエーションが、配列番号 56 ~ 59 のいずれか 1 つを含む、請求項 2 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 4】

配列番号 55 の前記バリエーションが、配列番号 56 を含む、請求項 3 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 5】

前記リンカードメインが、配列番号 27 に対して少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 86 % の同一性、少なくとも 87 % の同一性、少なくとも 88 % の同一性、少なくとも 89 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 91 % の同一性、少なくとも 92 % の同一性、少なくとも 93 % の同一性、少なくとも 94 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有する配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

30

【請求項 6】

前記リンカードメインが、配列番号 27 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

40

【請求項 7】

前記結合ドメインが、前記内因性 A B C A 4 p r e - m R N A のイントロンにアニーリングする、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 8】

前記内因性 A B C A 4 p r e - m R N A の前記イントロンが、イントロン 22 である、請求項 7 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 9】

前記結合ドメインが、配列番号 18 または配列番号 20 を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 10】

50

前記結合ドメインが、配列番号 18 または配列番号 20 から本質的になるか、またはそれからなる、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 11】

前記結合ドメインが、配列番号 20 から本質的になるか、またはそれからなる、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 12】

前記 CDS が、A B C A 4 エクソン 1～22 またはそのバリエーションを含む、請求項 1 または 5～11 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 13】

前記 CDS が、配列番号 53～59 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項 12 に記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【請求項 14】

核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(b) 配列番号 18 または配列番号 20 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び

20

(c) A B C A 4 エクソンを含む CDS を含み、

前記 CDS、前記リンカードメイン、及び前記結合ドメインは、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【請求項 15】

前記 CDS が、配列番号 53～59 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項 14 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 16】

核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 53～59 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる CDS、

30

(b) 配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、及び

(c) 配列番号 20 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメインを含み、

前記 CDS、前記リンカードメイン、及び前記結合ドメインは、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【請求項 17】

40

G G T A A G T または配列番号 61 を含む少なくとも 1 つの配列を含む増強剤をさらに含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 18】

前記増強剤が、前記リンカードメインの 3' 側で作動可能に連結される、請求項 17 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 19】

前記増強剤が、直列に配置され、作動可能に連結した 3 つの配列を含み、前記 3 つの配列の各々は、G G T A A G T または配列番号 61 を含む、請求項 17 または 18 のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 20】

50

前記増強剤が、直列に配置された3つの配列を含み、前記3つの配列は、配列番号62を含む、請求項17～19のいずれか1項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項21】

翻訳増強剤をさらに含み、前記翻訳増強剤は、配列番号63、または配列番号63に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、前記配列番号63、または配列番号63に対して少なくとも90%の同一性を有する前記配列は、前記増強剤の3'側で作動可能に連結される、先行請求項のいずれか1項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項22】

前記翻訳増強剤が、配列番号63に対して少なくとも91%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも92%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも93%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも94%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも95%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも96%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも97%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも98%の同一性を有する、または配列番号63に対して少なくとも99%の同一性を有する、請求項21に記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【請求項23】

前記翻訳増強剤が、配列番号63を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項21または22のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子。

20

【請求項24】

G T A A G T、G T A A G G、G T A A G C、またはG T A A C Tのいずれか1つを含むスプライシングドメインをさらに含み、先行請求項のいずれか1項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項25】

G T A A G Tを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるスプライシングドメインをさらに含み、先行請求項のいずれか1項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項26】

5'非翻訳領域をさらに含み、先行請求項のいずれか1項に記載の核酸トランススプライシング分子。

30

【請求項27】

前記5'非翻訳領域が、配列番号13または配列番号64を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項26に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項28】

3'転写ターミネータードメインをさらに含み、先行請求項のいずれか1項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項29】

前記3'転写ターミネータードメインが、前記トランススプライシング分子の前記3'末端を保護する三重らせん構造を形成するリボ核酸をコードする、請求項28に記載の核酸トランススプライシング分子。

40

【請求項30】

前記3'転写ターミネータードメインが、野生型M A L A T 1配列（配列番号33）、または配列番号33と少なくとも80%の同一性を有する核酸配列を含む、請求項28または請求項29に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項31】

前記3'転写ターミネータードメインが、配列番号33と少なくとも80%の同一性、配列番号33と少なくとも85%の同一性、配列番号33と少なくとも90%の同一性、配列番号33と少なくとも91%の同一性、配列番号33と少なくとも92%の同一性、配列番号33と少なくとも93%の同一性、配列番号33と少なくとも94%の同一性、

50

配列番号 33 と少なくとも 95 % の同一性、配列番号 33 と少なくとも 96 % の同一性、配列番号 33 と少なくとも 97 % の同一性、配列番号 33 と少なくとも 98 % の同一性、配列番号 33 と少なくとも 99 % の同一性を有する、または配列番号 33 と 100 % 同一である核酸配列を含む、請求項 30 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 32】

前記 3' 転写ターミネータードメインが、配列番号 33 または配列番号 66 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項 28 または請求項 29 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 33】

前記スプライシングドメインの 3' 側に作動可能に連結された少なくとも 1 つの終止コドンを含み、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【請求項 34】

5' から 3' の方向に作動可能に連結された：

- (a) 5' 非翻訳領域、
- (b) 配列番号 53 ～ 59 のいずれか 1 つから本質的になるか、またはそれからなる CDS、
- (c) スプライシングドメイン、
- (d) 少なくとも 1 つの終止コドン、
- (e) 配列番号 27 から本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、
- (f) 少なくとも 1 つの増強剤、
- (g) 翻訳増強剤、
- (h) 配列番号 18 または配列番号 20 から本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び
- (i) 3' 転写ターミネータードメインを含む、請求項 33 に記載の核酸トランススプライシング分子。

20

【請求項 35】

- (a) 前記 5' 非翻訳領域が、配列番号 13 または配列番号 64 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、
- (b) 前記スプライシングドメインが、G T A A G T を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、
- (c) 前記少なくとも 1 つの終止コドンが、2 つの終止コドンを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記 2 つの終止コドンのうちの第 1 の配列が、前記スプライシングドメイン配列と部分的に重複する、
- (d) 前記少なくとも 1 つの増強剤が、直列に配置された 3 つの配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記 3 つの配列の各々は、G G T A A G T または配列番号 61 を含む、
- (e) 前記翻訳増強剤が、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、及び
- (f) 前記 3' 転写ターミネータードメインが、配列番号 66 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項 34 に記載の核酸トランススプライシング分子。

30

40

【請求項 36】

核酸トランススプライシング分子であって、

- (a) 5' 非翻訳領域、
- (b) 配列番号 53 ～ 59 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる CDS、
- (c) スプライシングドメイン、
- (d) 任意選択で、少なくとも 1 つの終止コドン、
- (e) 配列番号 27 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

50

- (f) 少なくとも1つの増強剤、
- (g) 翻訳増強剤、
- (h) 配列番号18または配列番号20を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び
- (i) 3' 転写ターミネータードメインを含み、

前記5' 非翻訳領域、前記CDS、前記スプライシングドメイン、存在する場合前記少なくとも1つの終止コドン、前記リンカードメイン、前記少なくとも1つの増強剤、前記翻訳増強剤、前記結合ドメイン、及び前記3' 転写ターミネータードメインは、5' から3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【請求項37】

10

(a) 前記5' 非翻訳領域が、配列番号13または配列番号64を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、

(b) 前記スプライシングドメインが、GTAAGTを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、

(c) 前記少なくとも1つの終止コドンが存在し、かつ2つの終止コドンを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記2つの終止コドンのうちの第1の配列が、前記スプライシングドメイン配列と部分的に重複する、

(d) 前記少なくとも1つの増強剤が、直列に配置された3つの配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記3つの配列の各々は、GTAAGTまたは配列番号61を含む、

20

(e) 前記翻訳増強剤が、配列番号63を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、及び

(f) 前記3' 転写ターミネータードメインが、配列番号66を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項36に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項38】

5' から3' の方向に作動可能に連結された：

(a) 配列番号13または配列番号64を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる5' 非翻訳領域、

(b) 配列番号53～59のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるCDS、

30

(c) GTAAGTを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるスプライシングドメイン、

(d) 2つの終止コドンであって、前記2つの終止コドンのうちの第1の配列が、前記スプライシングドメイン配列と部分的に重複し、前記2つの終止コドンと組み合わせた前記スプライシングドメインの前記配列が、配列番号68を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、前記2つの終止コドン、

(e) 配列番号27を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

40

(f) 配列番号62を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、

(g) 配列番号63を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤、

(h) 配列番号18または配列番号20を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び

(i) 配列番号66を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる3' 転写ターミネータードメインを含む、前記核酸トランススプライシング分子

【請求項39】

前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号69、配列番号78、または配列番号90を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項37または請求項38に記載の核酸トランススプライシング分子。

50

【請求項 40】

前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号 70 または配列番号 71 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 41】

前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号 40～44、46、または 48～50 のいずれか 1 つと少なくとも 80 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 42】

請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子から転写されたリボ核酸トランススプライシング分子。 10

【請求項 43】

前記内因性 ABCA4 pre-mRNA が、ABCA4 関連網膜ジストロフィーに関連する少なくとも 1 つの変異を含む、請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 44】

前記 ABCA4 関連網膜ジストロフィーが、劣性遺伝する、請求項 43 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 45】

前記 ABCA4 関連網膜ジストロフィーが、前記 ABCA4 遺伝子のエクソン 1～22 に及ぶアレル病原性変異、及び錐体桿体ジストロフィー（例えば、錐体桿体ジストロフィー-3）、スターガルト黄斑ジストロフィー（例えば、スターガルト病-1）、黄色斑眼底、網膜色素変性症-19、または加齢性黄斑変性-2 と一致する表現型に関連する、請求項 43 または 44 に記載の核酸トランススプライシング分子。 20

【請求項 46】

前記少なくとも 1 つの変異を含む前記内因性 ABCA4 pre-mRNA が、光受容体細胞または網膜色素上皮細胞で発現される、請求項 1～45 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 47】

請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子を含む、ベクター。 30

【請求項 48】

前記ベクターが、前記 CDS の 5' 側で作動可能に連結された 5' 調節ドメインを含む、請求項 47 に記載のベクター。

【請求項 49】

前記 5' 調節ドメインが、5' 非翻訳領域に作動可能に連結される、請求項 48 に記載のベクター。

【請求項 50】

前記 5' 調節ドメインが、構成的プロモーターまたは組織特異的プロモーターを含む、請求項 48 または 49 のいずれかに記載のベクター。 40

【請求項 51】

前記構成的プロモーターが、CMV プロモーターである、請求項 50 に記載のベクター。

【請求項 52】

請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子を含む、プロウイルスプラスミド。

【請求項 53】

請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) であって、前記 AAV は、任意選択で、前記核酸トランススプライシング分子の 5' 側で作動可能に連結された 5' 調節ドメインを含む、前記 AAV。 50

【請求項 54】

前記 AAV が、前記 CDS の 5' 側で作動可能に連結された 5' 調節ドメインを含む、請求項 53 に記載の AAV。

【請求項 55】

前記 5' 調節ドメインが、5' 非翻訳領域に作動可能に連結される、請求項 53 または 54 のいずれかに記載の AAV。

【請求項 56】

前記 5' 調節ドメインが、構成的プロモーターを含む、請求項 53～55 のいずれか 1 項に記載の AAV。

【請求項 57】

前記構成的プロモーターが、CMV プロモーターである、請求項 56 に記載の AAV。

【請求項 58】

前記 AAV が、光受容細胞及び／または網膜色素上皮細胞を優先的に標的とする、請求項 53～57 のいずれか 1 項に記載の AAV。

【請求項 59】

前記 AAV が、AAV8、AAV5、または AAV2 である、請求項 53～58 のいずれか 1 項に記載の AAV。

【請求項 60】

請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 52 に記載のプロウイルスプラスミド、または請求項 53～59 のいずれか 1 項に記載の AAV を含む、組成物。

【請求項 61】

薬学的に許容される賦形剤を含む、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 62】

標的細胞において生物学的に活性な ABCA4 を発現させて、前記標的細胞における ABCA4 タンパク質の機能的レベルを回復させる方法であって、前記方法は、前記標的細胞を請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 52 に記載のプロウイルスプラスミド、請求項 53～59 のいずれか 1 項に記載の AAV、または請求項 60 もしくは 61 に記載の組成物で形質導入することを含む、前記方法。

【請求項 63】

前記標的細胞内の前記標的 ABCA4 mRNA の少なくとも 5%、少なくとも 10%、または少なくとも 15% が置換される、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記標的細胞内の前記標的 ABCA4 mRNA の少なくとも 20% が置換される、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

前記標的細胞内の前記標的 ABCA4 mRNA の少なくとも 35% が置換される、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

ABCA4 の機能レベルが、生物学的機能を有する完全長 ABCA4 タンパク質を発現させることによって、前記標的細胞において回復する、請求項 62～65 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 67】

対象における ABCA4 関連リポフスチン及び／または A2E 蓄積を低減する方法であって、前記対象における標的網膜細胞を、請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 52 に記載のプロウイルスプラスミド、請求項 53～59 のいずれか 1 項に記載の AAV、または請求項 60 もしくは 61 に記載の組成物でトランスフェクトまたは形質導入することを含む、前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 68】

対象の標的細胞における A B C A 4 エクソン配列中の少なくとも 1 つの変異を補正する方法であって、前記対象に、請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 52 に記載のプロウイルスプラスミド、請求項 53～59 のいずれか 1 項に記載の A A V、または請求項 60 もしくは 61 に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 69】

A B C A 4 関連網膜ジストロフィーの治療を必要とする対象におけるその治療方法であって、前記対象に、請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 52 に記載のプロウイルスプラスミド、請求項 53～59 のいずれか 1 項に記載の A A V、または請求項 60 もしくは 61 に記載の組成物を治療上有効な量で投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 70】

前記対象に、請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 52 に記載のプロウイルスプラスミド、請求項 53～59 のいずれか 1 項に記載の A A V、または請求項 60 もしくは 61 に記載の組成物を網膜下投与することを含む、請求項 67～69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 71】

前記対象が、非ヒト霊長類またはヒトである、請求項 67～70 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 72】

前記対象が、A B C A 4 関連網膜ジストロフィーと診断されている、請求項 67～71 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 73】

A B C A 4 関連網膜ジストロフィーの治療を必要とする対象におけるその治療に使用するための、請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 52 に記載のプロウイルスプラスミド、請求項 53～59 のいずれか 1 項に記載の A A V、または請求項 60 もしくは 61 に記載の組成物。

30

【請求項 74】

A B C A 4 関連網膜ジストロフィーの治療を必要とする対象におけるその治療のための薬剤の調製に使用するための、請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 52 に記載のプロウイルスプラスミド、請求項 53～59 のいずれか 1 項に記載の A A V、または請求項 60 もしくは 61 に記載の組成物。

【請求項 75】

前記 A B C A 4 関連網膜ジストロフィーが、前記 A B C A 4 遺伝子のエクソン 1～22 に及ぶアレル病原性変異、及び錐体桿体ジストロフィー、スターガルト黄斑ジストロフィー、または黄色斑眼底と一致する表現型に関連する、請求項 67～72 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 76】

核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(b) 任意選択で、配列番号 62 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

(c) 任意選択で、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプ

50

ライシング分子。

【請求項 77】

さらに、内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、
前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、請求項 76 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 78】

さらに、A B C A 4 エクソンを含む C D S を含み、
前記 C D S、前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、請求項 76 または請求項 77 に記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【請求項 79】

5'核酸トランススプライシング分子であって、
(a) G G T A A G T、または配列番号 61、または G G T A A G T もしくは配列番号 61 に対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する配列のうちの少なくとも 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

20

(b) 任意選択で、配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(c) 任意選択で、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、
存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記 5'核酸トランススプライシング分子。

【請求項 80】

5'核酸トランススプライシング分子であって、
(a) 配列番号 62、または配列番号 62 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

30

(b) 任意選択で、配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(c) 任意選択で、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、
存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記 5'核酸トランススプライシング分子。

【請求項 81】

さらに、内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、
存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、請求項 79 または請求項 80 に記載の核酸トランススプライシング分子。

40

【請求項 82】

さらに、A B C A 4 エクソンを含む C D S を含み、
前記 C D S、存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、請求項 79 ~ 81 のいずれか 1 項に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 83】

50

核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 63、または配列番号 63 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤、

(b) 任意選択で、配列番号 62 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

(c) 任意選択で、配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメインを含み、存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、及び前記翻訳増強剤は、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

10

【請求項 84】

さらに、内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、請求項 83 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 85】

さらに、ABCA4 エクソンを含む CDS を含み、前記 CDS、存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、請求項 83 または請求項 84 に記載の核酸トランススプライシング分子。

20

【請求項 86】

核酸トランススプライシング分子であって、リンカードメイン及び増強剤を含むカセットを含み、前記カセットは、配列番号 72 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、前記核酸トランススプライシング分子。

【請求項 87】

さらに、内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、前記カセット、及び前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、請求項 86 に記載の核酸トランススプライシング分子。

30

【請求項 88】

さらに、ABCA4 エクソンを含む CDS を含み、前記 CDS、前記カセット、及び存在する場合前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、請求項 86 または請求項 87 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 89】

核酸トランススプライシング分子であって、リンカードメイン、増強剤、及び翻訳増強剤を含むカセットを含み、前記カセットは、配列番号 73 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、前記核酸トランススプライシング分子。

40

【請求項 90】

さらに、内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、前記カセット、及び前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、請求項 89 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 91】

さらに、ABCA4 エクソンを含む CDS を含み、前記 CDS、前記カセット、及び存在する場合前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、請求項 89 または請求項 90 に記載の核酸トランススプライシ

50

グ分子。

【請求項 9 2】

核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 6 6、または配列番号 6 6 に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる 3' 転写ターミネータードメインを含む、前記核酸トランススプライシング分子。

【請求項 9 3】

前記 3' 転写ターミネータードメインが、配列番号 6 6 と少なくとも 9 6 % の同一性、配列番号 6 6 と少なくとも 9 7 % の同一性、配列番号 6 6 と少なくとも 9 8 % の同一性、配列番号 6 6 と少なくとも 9 9 % の同一性を有するか、または配列番号 6 6 に対して 1 0 0 % 同一である核酸配列を含む、請求項 9 2 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【請求項 9 4】

前記 3' 転写ターミネータードメインが、配列番号 6 6 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、請求項 9 2 または請求項 9 3 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 2 2 年 5 月 1 3 日出願の米国仮出願第 6 3 / 3 4 1 , 6 6 5 号及び 2 0 2 3 年 1 月 4 日出願の米国仮出願第 6 3 / 4 7 8 , 4 7 2 号の利益を主張するものであり、これらは各々、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願には、XML 形式にて電子的に提出され、その全体が参照することにより本明細書に組み込まれる配列表を含む。2 0 2 3 年 5 月 1 0 日に作成された上記 XML コピーは、6 1 3 1 3 - 7 0 3 _ 6 0 1 _ S L . x m l と命名され、サイズは 1 , 3 1 5 , 4 5 6 バイトである。

【発明の分野】

【0 0 0 3】

A B C A 4 (A T P 結合カセット、サブファミリー A、メンバー 4) の変異を補正するためのトランススプライシング分子が関与する、組成物、方法、及び使用が本明細書に記載される。

【背景技術】

【0 0 0 4】

A B C A 4 の劣性遺伝性変異は、スターガルト病及び錐体桿体ジストロフィーを含む進行性失明の発症の原因である。光受容体細胞外節ディスク膜の縁領域に沿って局在する A B C A 4 は、ディスク膜の内腔から細胞質小葉への N - レチニリデン - ホスファチジルエタノールアミン (N - R e t - P E) の輸送体 (または「フリッパーゼ」) として機能する。A B C A 4 タンパク質の欠陥は、有毒なレチノイド化合物の蓄積をもたらし、最終的には光受容体及び網膜色素上皮細胞の死滅をもたらす。A B C A 4 の 6 8 8 2 b p のコード配列は、単一の A A V ベクターでその全体を送達するには大きすぎる。さらに、遺伝子全体で何百もの疾患の原因となる変異が見出されるにつれて、単一の塩基編集アプローチでは多くの患者に対処できなくなるであろう。したがって、当該分野では、A B C A 4 遺伝子の変異を補正するための代替的な戦略が必要とされている。

【発明の概要】

【0 0 0 5】

スターガルト病などの A B C A 4 関連網膜症は、A B C A 4 遺伝子における両アレル病変性変異に起因し、成人及び小児の両方が罹患する重篤なまれな遺伝性網膜疾患である。スターガルト病の推定有病率は、世界中で 8 ~ 1 0 , 0 0 0 人に 1 人であり、網膜ジスト

10

20

30

40

50

ロフィーのおおよそ7%を占める。A B C A 4は、常染色体劣性スターガルト病の原因遺伝子として特徴付けられたが、いくつかの他の網膜表現型もA B C A 4の変異に関連している。実際、A B C A 4関連網膜症は、メンデル遺伝による網膜変性症の最も頻繁な原因であると集合的に考えられている。A B C A 4関連網膜症を有する個体は、典型的には、生涯の最初の20年間で診断され、特定の変異の重症度によっては、成人までに中心視野を完全に喪失する可能性がある。

【0006】

現在、A B C A 4関連網膜症を適応症とする承認された治療法は存在しない。したがって、機能喪失型A B C A 4変異の影響を受ける成人と小児の両方に対する疾患改変療法を開発するいまだ達成されていない大きな医療ニーズが存在する。

10

【0007】

広範な研究を通じて、本発明者らは、例えば、トランススプライシング効率及びそれによって産生されるトランススプライシングタンパク質のレベルを増加させることに関連する技術的課題に対処する特性が組み込まれた核酸トランススプライシング分子をもたらす核酸エレメントを同定した。したがって、核酸トランススプライシング分子（例えば、RNAトランススプライシング分子）への同定されたエレメントの包含は、例えば、不十分なトランススプライシング効率に関連する問題など、過去の核酸トランススプライシング分子の実施に関連する問題に対する様々な解決策を提示する。したがって、本発明者らは、遺伝子変異に関連する疾患における治療的介入の選択肢を提供するという念願の目的を達成する核酸トランススプライシング分子を設計し、それにより、RNAレベルでのそれらの遺伝子変異の補正により、患者に大きな利益をもたらすことができる。遺伝子変異に関連する疾患を有する多くの患者は、治療の選択肢が存在するとしてもわずかであり、そのため多くはアンメットニーズを有する。例えば、A B C A 4の変異に関連する進行性失明の患者は、アンメットニーズを有する代表的な患者集団である。

20

【0008】

これらのアンメットニーズに対処するために、エクソン編集とも称されるトランススプライシング解決策が本明細書に記載され、これは、少なくとも1つの変異を含む内因性A B C A 4 pre-mRNAにトランススプライシングするように設計されたRNAエクソンエディターをコードする治療用核酸トランススプライシング構築物を送達することを含み、それによってトランススプライシングが、内因性A B C A 4 pre-mRNA中のエクソン（そのうちの少なくとも1つのエクソンが少なくとも1つの変異を含む）を、機能的（例えば、野生型）アミノ酸配列をコードする治療用RNAエクソンエディター由来のエクソンと置き換え、したがって、内因性A B C A 4 pre-mRNAにおける少なくとも1つの変異を補正する。いくつかの実施形態では、RNAエクソンエディターは、細胞に直接送達され得る。「核酸トランススプライシング分子」、「RNAエクソン編集分子」、「RNAエクソンエディター」、「エクソンエディター」、及び「RNAトランススプライシング構築物」という用語は、本明細書で互換的に使用される。

30

【0009】

いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、（a）A B C A 4エクソンを含む配列（CDS）、（b）配列番号27、または配列番号27に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含むリンカードメイン、及び（c）内因性A B C A 4 pre-mRNA内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、ここでCDS、リンカードメイン、及び結合ドメインは、5'から3'の方向に作動可能に連結される。A B C A 4の変異に関連する網膜症を治療するため、及びA B C A 4の変異に関連する網膜症を治療するための薬剤の調製におけるその使用、ならびにA B C A 4の変異に関連する網膜症を治療するための方法も、本明細書に記載される。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸トランススプライシング分子は、（a）配列番号53～55のうちのいずれか1つのバリエーションを含む、それから本質的になる、またはそれからなるCDSであって、配列番号53～55のうちのいずれか1つのバリエーションを含む、

50

アントは、表 3 に列挙された少なくとも 1 つの潜在性スプライス部位に少なくとも 1 つのヌクレオチド変異を含み、少なくとも 1 つのヌクレオチド変異は、少なくとも 1 つのヌクレオチド変異を含む少なくとも 1 つの潜在的スプライス部位の各々で潜在的スプライス部位の使用を低減する、CDS、(b) 任意選択で、リンカードメイン、及び (c) 任意選択で、内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、ここで CDS、存在する場合リンカードメイン、及び存在する場合結合ドメインは、5' から 3' の方向に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、配列番号 55 のバリエーションは、配列番号 56 ~ 59 のうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態では、配列番号 55 のバリエーションは、配列番号 56 を含む。ABCA4 の変異に関連する網膜症を治療するため、及び ABCA4 の変異に関連する網膜症を治療するための薬剤の調製におけるその使用、ならびに ABCA4 の変異に関連する網膜症を治療するための方法も、本明細書に記載される。

10

【0011】

一態様では、本明細書で提供されるのは、核酸トランススプライシング分子（または核酸トランススプライシング分子を含むもしくはコードするベクター）であり、核酸トランススプライシング分子は、5' から 3' の方向に作動可能に：(a) 例えば、天然 5' ABCA4 非翻訳領域を含む 5' 調節ドメイン、(b) 5' ABCA4 エクソンの機能配列を含む CDS、(c) トランススプライシングを媒介するように構成されたスプライシングドメイン、及び (d) 内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位に結合するように構成された結合ドメインを含み、核酸トランススプライシング分子は、CDS を内因性 ABCA4 にトランススプライシングするように構成され、それによって内因性 5' ABCA4 エクソン配列を 5' ABCA4 エクソンの機能配列に置換する。いくつかの実施形態では、5' 調節ドメインは、さらに、構成的プロモーター、例えば、CMV / CMV プロモーター（CMV エンハンサー及びプロモーター）、またはそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、天然 5' ABCA4 非翻訳領域は、配列番号 12 または 13 に対して少なくとも 80 % の配列同一性（例えば、配列番号 12 または 13 に対して少なくとも 85 % の配列同一性、少なくとも 90 % の配列同一性、91 % の配列同一性、少なくとも 92 % の配列同一性、少なくとも 93 % の配列同一性、少なくとも 94 % の配列同一性、少なくとも 95 % の配列同一性、少なくとも 96 % の配列同一性、少なくとも 97 % の配列同一性、少なくとも 98 % の配列同一性、少なくとも 99 % の配列同一性、または 100 % の配列同一性）を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、5' 調節ドメインは、配列番号 14 または 15 に対して少なくとも 80 % の配列同一性（例えば、配列番号 14 または 15 に対して少なくとも 85 % の配列同一性、少なくとも 90 % の配列同一性、91 % の配列同一性、少なくとも 92 % の配列同一性、少なくとも 93 % の配列同一性、少なくとも 94 % の配列同一性、少なくとも 95 % の配列同一性、少なくとも 96 % の配列同一性、少なくとも 97 % の配列同一性、少なくとも 98 % の配列同一性、少なくとも 99 % の配列同一性、または 100 % の配列同一性）を有する核酸配列を含む。

20

30

【0012】

いくつかの実施形態では、結合部位は、ABCA4 イントロン 22 内にある。いくつかの実施形態では、結合部位は、配列番号 16 のヌクレオチド 1 ~ 510 または 880 ~ 1350 のいずれか 1 つ以上（例えば、配列番号 16 のヌクレオチド 1 ~ 510 または 880 ~ 1350 のいずれか 6 つ以上、いずれか 8 つ以上、いずれか 10 個以上、いずれか 12 個以上、いずれか 18 個以上、いずれか 20 個以上、いずれか 24 個以上、いずれか 50 個以上、いずれか 100 個以上、またはいずれか 150 個以上（例えば、150 個））を含む。いくつかの実施形態では、結合部位は、配列番号 16 のヌクレオチド 1160 ~ 1309 のいずれか 1 つ以上（例えば、配列番号 16 のヌクレオチド 1160 ~ 1309 のいずれか 6 つ以上、いずれか 8 つ以上、いずれか 10 個以上、いずれか 12 個以上、いずれか 18 個以上、いずれか 20 個以上、いずれか 24 個以上、いずれか 50 個以上、いずれか 100 個以上、またはいずれか 150 個以上（例えば、150））を含む。いくつかの実施形態では、結合部位に結合する結合ドメインは、配列番号 16 内の結合部位

40

50

に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、配列番号16内の結合部位に対して少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性）を有する。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、配列番号17または18を含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、スプライシングドメインは、G T A A G T、G U A A G T、G T A A G G、G U A A G G、G T A A G C、G U A A G C、G T A A C T、またはG U A A C Uを含む。

10

【0014】

いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、さらに、リンカードメインを含む。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、25ヌクレオチド長より長い（例えば、25～50ヌクレオチド長、35～45ヌクレオチド長、または約40ヌクレオチド長（例えば、40-mer リンカー））。いくつかの場合では、リンカードメインは、C T G G T G C C C G C G G G C C G C G G A A C C G G T T G G G G G C A T G T A C（配列番号27）と少なくとも80%の同一性（例えば、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性）を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。

20

【0015】

他の場合では、リンカードメインは、C C G A A T A C G A C A C G T A C A A G A T C T（配列番号29）と少なくとも80%の同一性（例えば、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性）を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。他の場合では、リンカードメインは、G C T G C T G C T C A G T C T C C T G G G C T G G（配列番号31）と少なくとも80%の同一性（例えば、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性）を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。

30

【0016】

別の態様では、提供されるのは、核酸トランススプライシング分子であり、5'から3'の方向に作動可能に連結された：（a）5' A B C A 4エクソンの機能配列を含むC D S、（b）トランススプライシングを媒介するように構成されたスプライシングドメインであって、G T A A G T、G U A A G T、G T A A G G、G U A A G G、G T A A G C、G U A A G C、G T A A C T、またはG U A A C Uを含む、スプライシングドメイン、及び（c）内因性A B C A 4イントロン22内の結合部位に結合するように構成された結合ドメインを含み、核酸トランススプライシング分子は、C D Sを内因性A B C A 4エクソン23にトランススプライシングするように構成され、それによって内因性5' A B C A 4エクソン配列を5' A B C A 4エクソンの機能配列に置換する。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、C D Sの5'側を作動可能に連結する5'調節ドメインを含む。いくつかの実施形態では、5'調節ドメインは、天然5' A B C A 4非翻訳領

40

50

域、例えば、配列番号 12 または 13 に対して少なくとも 80 % の配列同一性（例えば、配列番号 12 または 13 に対して少なくとも 85 % の配列同一性、少なくとも 90 % の配列同一性、91 % の配列同一性、少なくとも 92 % の配列同一性、少なくとも 93 % の配列同一性、少なくとも 94 % の配列同一性、少なくとも 95 % の配列同一性、少なくとも 96 % の配列同一性、少なくとも 97 % の配列同一性、少なくとも 98 % の配列同一性、少なくとも 99 % の配列同一性、または 100 % の配列同一性）を有する天然 5' ABCA4 非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、5' 調節ドメインは、構成的プロモーター、例えば、CMV プロモーターをさらに含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、さらに、リンカードメインを含む。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、25ヌクレオチド長より長い（例えば、25～50ヌクレオチド長、35～45ヌクレオチド長、または約40ヌクレオチド長（例えば、40-mer リンカー））。いくつかの場合では、リンカードメインは、CTGGTGCCCGCGGGCCGCGGAACCGGTGGGGGCATGTAC（配列番号27）と少なくとも80 % の同一性（例えば、少なくとも85 % の配列同一性、少なくとも90 % の配列同一性、少なくとも91 % の配列同一性、少なくとも92 % の配列同一性、少なくとも93 % の配列同一性、少なくとも94 % の配列同一性、少なくとも95 % の配列同一性、少なくとも96 % の配列同一性、少なくとも97 % の配列同一性、少なくとも98 % の配列同一性、少なくとも99 % の配列同一性、または100 % の配列同一性）を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。他の場合では、リンカードメインは、CCGAATACGACACGTACAAGATCT（配列番号29）と少なくとも80 % の同一性（例えば、少なくとも85 % の配列同一性、少なくとも90 % の配列同一性、少なくとも91 % の配列同一性、少なくとも92 % の配列同一性、少なくとも93 % の配列同一性、少なくとも94 % の配列同一性、少なくとも95 % の配列同一性、少なくとも96 % の配列同一性、少なくとも97 % の配列同一性、少なくとも98 % の配列同一性、少なくとも99 % の配列同一性、または100 % の配列同一性）を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。他の場合では、リンカードメインは、GCTGCTGCTCAGTCTCCTGGGCTGG（配列番号31）と少なくとも80 % の同一性（例えば、少なくとも85 % の配列同一性、少なくとも90 % の配列同一性、少なくとも91 % の配列同一性、少なくとも92 % の配列同一性、少なくとも93 % の配列同一性、少なくとも94 % の配列同一性、少なくとも95 % の配列同一性、少なくとも96 % の配列同一性、少なくとも97 % の配列同一性、少なくとも98 % の配列同一性、少なくとも99 % の配列同一性、または100 % の配列同一性）を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、結合部位は、配列番号16のヌクレオチド1～510または880～1,350のいずれか1つ以上（例えば、配列番号16のヌクレオチド1～510または880～1,350のいずれか6つ以上、いずれか8つ以上、いずれか10個以上、いずれか12個以上、いずれか18個以上、いずれか20個以上、いずれか24個以上、いずれか50個以上、いずれか100個以上、またはいずれか150個以上（例えば、150個））を含む。いくつかの実施形態では、結合部位は、配列番号16のヌクレオチド1160～1309のいずれか1つ以上（例えば、配列番号16のヌクレオチド1160～1309のいずれか6つ以上、いずれか8つ以上、いずれか10個以上、いずれか12個以上、いずれか18個以上、いずれか20個以上、いずれか24個以上、いずれか50個以上、いずれか100個以上、またはいずれか150個以上（例えば、150個））を含む。いくつかの実施形態では、結合部位に結合する結合ドメインは、配列番号17または18に対して少なくとも80 % の配列同一性（例えば、配列番号17または18に対して少なくとも85 % の配列同一性、少なくとも90 % の配列同一性、少なくとも91 % の配列同一性、少なくとも92 % の配列同一性、少なくとも93 % の配列同一性、少なくとも94 % の配列同一性、少なくとも95 % の配列同一性、少なくとも96 % の配列同

一性、少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、または 100% の配列同一性) を有する。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、配列番号 17 または 18 を含む。

【0019】

別の態様では、提供されるのは、核酸トランススプライシング分子であり、5' から 3' の方向に作動可能に連結された：(a) 5' ABCA4 エクソンの機能配列を含む CDS、(b) トランススプライシングを媒介するように構成されたスプライシングドメイン、(c) 25~50 ヌクレオチド長のリンカードメイン、及び (d) 内因性 ABCA4 インترون 22 内の結合部位に結合するように構成された結合ドメインを含み、核酸トランススプライシング分子は、CDS を内因性 ABCA4 エクソン 23 にトランススプライシングするように構成され、それによって内因性 5' ABCA4 エクソン配列を 5' ABCA4 エクソンの機能配列に置換する。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、35~45 ヌクレオチド長、または約 40 ヌクレオチド長 (例えば、40-mer リンカー) である。いくつかの場合では、リンカードメインは、CTGGTGCCCGCGGGCCGCGGAACCGGTTGGGGGCATGTAC (配列番号 27) と少なくとも 80% の同一性 (例えば、少なくとも 85% の配列同一性、少なくとも 90% の配列同一性、少なくとも 91% の配列同一性、少なくとも 92% の配列同一性、少なくとも 93% の配列同一性、少なくとも 94% の配列同一性、少なくとも 95% の配列同一性、少なくとも 96% の配列同一性、少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、または 100% の配列同一性) を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。他の場合では、リンカードメインは、CCGAATACGACACGTACAAGATCT (配列番号 29) と少なくとも 80% の同一性 (例えば、少なくとも 85% の配列同一性、少なくとも 90% の配列同一性、少なくとも 91% の配列同一性、少なくとも 92% の配列同一性、少なくとも 93% の配列同一性、少なくとも 94% の配列同一性、少なくとも 95% の配列同一性、少なくとも 96% の配列同一性、少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、または 100% の配列同一性) を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。他の場合では、リンカードメインは、GCTGCTGCTCAGTCTCCTGGGCTGG (配列番号 31) と少なくとも 80% の同一性 (例えば、少なくとも 85% の配列同一性、少なくとも 90% の配列同一性、少なくとも 91% の配列同一性、少なくとも 92% の配列同一性、少なくとも 93% の配列同一性、少なくとも 94% の配列同一性、少なくとも 95% の配列同一性、少なくとも 96% の配列同一性、少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、または 100% の配列同一性) を有する核酸配列であるか、またはそれを含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、CDS の 5' 側を作動可能に連結する 5' 調節ドメインを含む。いくつかの実施形態では、5' 調節ドメインは、天然 5' ABCA4 非翻訳領域、例えば、配列番号 12 または 13 に対して少なくとも 80% の配列同一性 (例えば、配列番号 12 または 13 に対して少なくとも 85% の配列同一性、少なくとも 90% の配列同一性、91% の配列同一性、少なくとも 92% の配列同一性、少なくとも 93% の配列同一性、少なくとも 94% の配列同一性、少なくとも 95% の配列同一性、少なくとも 96% の配列同一性、少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、または 100% の配列同一性) を有する天然 5' ABCA4 非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、5' 調節ドメインは、構成的プロモーター、例えば、CMV/CMV プロモーターをさらに含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、スプライシングドメインは、GTAAGT、GUAAGT、GTAAGG、GUAAGG、GTAAGC、GUAAGC、GTAAC T、または GUAACU を含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、結合部位は、配列番号 16 のヌクレオチド 1 ~ 510 または 880 ~ 1,350 のいずれか 1 つ以上（例えば、配列番号 16 のヌクレオチド 1 ~ 510 または 880 ~ 1,350 のいずれか 6 つ以上、いずれか 8 つ以上、いずれか 10 個以上、いずれか 12 個以上、いずれか 18 個以上、いずれか 20 個以上、いずれか 24 個以上、いずれか 50 個以上、いずれか 100 個以上、またはいずれか 150 個以上（例えば、150））を含む。いくつかの実施形態では、結合部位は、配列番号 16 のヌクレオチド 1160 ~ 1309 のいずれか 1 つ以上（例えば、配列番号 16 のヌクレオチド 1160 ~ 1309 のいずれか 6 つ以上、いずれか 8 つ以上、いずれか 10 個以上、いずれか 12 個以上、いずれか 18 個以上、いずれか 20 個以上、いずれか 24 個以上、いずれか 50 個以上、いずれか 100 個以上、またはいずれか 150 個以上（例えば、150 個））を含む。いくつかの実施形態では、結合部位に結合する結合ドメインは、配列番号 17 または 18 に対して少なくとも 80 % の配列同一性（例えば、配列番号 17 または 18 に対して少なくとも 85 % の配列同一性、少なくとも 90 % の配列同一性、少なくとも 91 % の配列同一性、少なくとも 92 % の配列同一性、少なくとも 93 % の配列同一性、少なくとも 94 % の配列同一性、少なくとも 95 % の配列同一性、少なくとも 96 % の配列同一性、少なくとも 97 % の配列同一性、少なくとも 98 % の配列同一性、少なくとも 99 % の配列同一性、または 100 % の配列同一性）を有する。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、配列番号 17 または 18 を含む。

10

【0023】

先行態様のいずれかのいくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、3' 転写ターミネータードメインを含む。いくつかの実施形態では、3' 転写ターミネータードメインは、トランススプライシング分子の 3' 末端を効果的にキャップする三重らせん構造を形成する。いくつかの実施形態では、3' 転写ターミネータードメインは、野生型 M A L A T 1 配列を含む。いくつかの実施形態では、3' 転写ターミネータードメインは、配列番号 32 または 33 に対して少なくとも 80 % の配列同一性（例えば、配列番号 32 または 33 に対して少なくとも 85 % の配列同一性、少なくとも 90 % の配列同一性、91 % の配列同一性、少なくとも 92 % の配列同一性、少なくとも 93 % の配列同一性、少なくとも 94 % の配列同一性、少なくとも 95 % の配列同一性、少なくとも 96 % の配列同一性、少なくとも 97 % の配列同一性、少なくとも 98 % の配列同一性、少なくとも 99 % の配列同一性、または 100 % の配列同一性）を有する核酸配列を含む。

20

30

【0024】

先行態様のいずれかのいくつかの実施形態では、CDS は、A B C A 4 エクソン 1 ~ 2 またはそのバリエーション（例えば、そのコドン最適化バリエーション）を含む。

【0025】

先行態様のいずれかのいくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、配列番号 40 ~ 50 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性（例えば、配列番号 40 ~ 50 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 85 % の配列同一性、少なくとも 90 % の配列同一性、91 % の配列同一性、少なくとも 92 % の配列同一性、少なくとも 93 % の配列同一性、少なくとも 94 % の配列同一性、少なくとも 95 % の配列同一性、少なくとも 96 % の配列同一性、少なくとも 97 % の配列同一性、少なくとも 98 % の配列同一性、少なくとも 99 % の配列同一性、または 100 % の配列同一性）を有する核酸配列を含む。

40

【0026】

先行態様のいずれかのいくつかの実施形態では、内因性 A B C A 4 pre-mRNA は、A B C A 4 関連網膜ジストロフィー（例えば、劣性遺伝性 A B C A 4 関連網膜ジストロフィー、例えば、スターガルト病または錐体桿体ジストロフィー）に関連する少なくとも 1 つの変異を有する。いくつかの実施形態では、変異は、光受容細胞及び／または網膜色素上皮細胞で発現される。

【0027】

別の態様では、核酸トランススプライシング分子が記載され、5' から 3' の方向に作動 50

可能に連結された：（a）5' A B C A 4 エクソンの機能配列を含む C D S、（b）トランスプライシングを媒介するように構成されたスプライシングドメイン、及び（c）配列番号 17～24 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性（例えば、少なくとも 85 % の配列同一性、少なくとも 90 % の配列同一性、少なくとも 91 % の配列同一性、少なくとも 92 % の配列同一性、少なくとも 93 % の配列同一性、少なくとも 94 % の配列同一性、少なくとも 95 % の配列同一性、少なくとも 96 % の配列同一性、少なくとも 97 % の配列同一性、少なくとも 98 % の配列同一性、少なくとも 99 % の配列同一性、または 100 % の配列同一性）を有する結合ドメインを含み、核酸トランスプライシング分子は、C D S を内因性 A B C A 4 エクソン 23 にトランスプライシングするように構成され、それによって内因性 5' A B C A 4 エクソン配列を 5' A B C A 4 エクソンの機能配列に置換する。 10

【0028】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、配列番号 18 を含む、単離された D N A 分子、またはそのベクターである。

【0029】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、配列番号 17 を含む、単離された R N A 分子、またはそのベクターである。

【0030】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、先行実施形態のいずれかまたは先行態様のいずれかに記載の核酸トランスプライシング分子をコードする単離された核酸（例えば、D N A または R N A）、例えば、先行実施形態のいずれかまたは先行態様のいずれかの核酸トランスプライシング分子をコードするベクターである。 20

【0031】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、先行実施形態のいずれかまたは先行態様のいずれかに記載の核酸トランスプライシング分子を含む、プロウイルスプラスミドである。

【0032】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、先行実施形態のいずれかまたは先行態様のいずれかに記載の核酸トランスプライシング分子をコードする配列を含む、アデノ随伴ウイルス（A A V）である。いくつかの実施形態では、A A V は、光受容細胞及び／または網膜色素上皮細胞を優先的に標的とする。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 8、A A V 5、または A A V 2 である。 30

【0033】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、先行実施形態のいずれかまたは先行態様のいずれかに記載の核酸トランスプライシング分子、ベクター、プロウイルスプラスミド、または A V V を含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含む。

【0034】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、機能的 A B C A 4 を標的細胞において（例えば、インビトロまたはインビボで）発現させる方法である。いくつかの実施形態では、方法は、標的細胞を、前述の態様のいずれか 1 つに記載の核酸トランスプライシング分子、ベクター、A A V、または組成物で形質導入することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、標的細胞中（例えば、トランスプライシング A B C A 4 R N A、またはトランスプライシング R N A の翻訳から生じる対応するタンパク質によって測定される、例えば、培養ヒト細胞中）の標的 A B C A 4 m R N A の 20 % 以上を置換する。いくつかの実施形態では、方法は、標的細胞中（例えば、トランスプライシング A B C A 4 R N A、またはトランスプライシング R N A の翻訳から生じる対応するタンパク質によって測定される、例えば、培養ヒト細胞中）の標的 A B C A 4 m R N A の 38 % 以上を置換する。いくつかの実施形態では、機能的 A B C A 4（トランスプライシング R N A の翻訳から生じる対応するタンパク質）は、完全長 A B C A 4 タンパク質である。 40 50

【0035】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、対象（例えば、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒト）におけるA B C A 4網膜症関連リポフスチン及び／またはA 2 E蓄積を低減させる方法である。いくつかの実施形態では、本方法は、対象における標的網膜細胞を、先行実施形態または先行態様のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子、ベクター、A A V、または組成物で形質導入することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト霊長類またはヒト（例えば、A B C A 4関連網膜ジストロフィーと診断されたヒト）である。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子、ベクター、またはA A Vは、対象に、眼投与によって（例えば、網膜下投与によって）投与される。

10

【0036】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、対象（例えば、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒト）の標的細胞における5' A B C A 4エクソン配列における少なくとも1つの変異を補正する方法である。いくつかの実施形態では、方法は、先行実施形態または先行態様のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子、ベクター、組成物、またはA A Vを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト霊長類またはヒト（例えば、A B C A 4関連網膜ジストロフィーと診断されたヒト）である。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子、ベクター、またはA A Vは、対象に、眼投与によって（例えば、網膜下投与によって）投与される。

【0037】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、対象（例えば、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒト）におけるA B C A 4関連網膜ジストロフィーの治療方法である。いくつかの実施形態では、方法は、先行実施形態または先行態様のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子、ベクター、A A V、または組成物を、治療上有効な量で対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、A B C A 4関連網膜ジストロフィーは、5' A B C A 4エクソン配列の変異（例えば、A B C A 4エクソン1～22のうちのいずれか1つ以上での変異）に関連する。いくつかの実施形態では、A B C A 4関連網膜ジストロフィーは、スターガルト病または錐体桿体ジストロフィーである。

20

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】スプライドメイン（S S）、リンカー、及び結合ドメイン（B D）の様々な順列を有するA B C A 4トランススプライシング分子にわたるトランススプライシング効率を示すグラフである。

30

【図2】様々なスプライドメイン配列を有するA B C A 4トランススプライシング分子にわたるトランススプライシング効率を示すグラフである。

【図3 A】培養ヒト細胞においてA A Vによって形質導入された様々なA B C A 4トランススプライシング分子のトランススプライシング効率を示す。

【図3 B】培養ヒト細胞においてA A Vによって形質導入された様々なA B C A 4トランススプライシング分子のトランススプライシング効率を示す。図3 Aは、R T-q P C Rによる結果を示す。図3 B及び3 Cは、ウエスタンブロットによる結果を示す。

40

【図3 D】図3 Cの結果を定量化するグラフである。

【図4】トランススプライシング分子のA A V 8調製物のウエスタンブロットを示しており、V P 1、V P 2、及びV P 3バンドを示している。

【図5 A】アフリカミドリザル（A G M）非ヒト霊長類（N H P）における、網膜下注射後のインビボでのG F Pトランススプライシング分子によるG F Pタンパク質発現を示す。

【図5 B】アフリカミドリザル（A G M）非ヒト霊長類（N H P）における、網膜下注射後のインビボでのG F Pトランススプライシング分子によるG F Pタンパク質発現を示す。

【図5 C】アフリカミドリザル（A G M）非ヒト霊長類（N H P）における、網膜下注射

50

後のインビボでのGFPトランススプライシング分子によるGFPタンパク質発現を示す。図5Aは、GFPタンパク質を示すライブ画像である。図5Bは、28日目における陰性対照における網膜切片（光受容体及び脈絡膜が標識されている）の抗GFP免疫組織化学（IHC）染色を示す顕微鏡写真である。図5Cは、28日目の、GFPトランススプライシング分子で治療した動物における網膜切片（光受容体及び脈絡膜が標識されている）の抗GFP IHC染色を示す顕微鏡写真である。

【図6】ベースライン、14日目及び28日目の網膜下注射後のcSLO OCT画像のセットである。プレブを「注射後」パネルにラベル付けする。

【図7】28日目の、ビヒクル、エクソンエディター443、及びエクソンエディター274で治療したNHP眼のカラー眼底画像（前方向、後方向、上方向、及び下方向の図）のセットである。

【図8A】トランススプライシング分子のRT-qPCR試験方法論を示す概略図である。5'タグを有するトランススプライシング分子（エクソンエディターRNA）がAGM pre-mRNAにトランススプライシングし、編集された（例えば、トランススプライシングされた）完全長mRNAが、その結果として生じる固有の配列によって定量化される。

【図8B】エクソンエディター443、274、497、及び505の定量的なRT-qPCRの結果を示す。示されるように、エクソンエディター443、274、497、及び505の各々は、インビボでAGM網膜において、編集コピー数/10 ng RNAを定量化することによって決定される統計学的に有意な頻度で、内因性AGM pre-mRNAとトランススプライスする。

【図9】エクソンエディター443、274、497、及び505がAGM網膜においてAGM pre-mRNAにトランススプライシングした結果として産生された完全長キメラ（ヒト/AGM）ABCA4タンパク質を示すウエスタンブロットである。タンパク質タグは、網膜の膜抽出物中で検出された。

【図10A】ヒト及びAGM ABCA4タンパク質の固有のペプチドの検出を示す質量解析結果である。

【図10B】ヒト及びAGM ABCA4タンパク質の固有のペプチドの検出を示す質量解析結果である。図10Aは、陰性対照（ビヒクル治療）網膜組織の結果を示す。上の列は、ヒトタンパク質スパイクが現れるべき場合にスパイクを欠いている対照試料を示し；2番目の列は、ヒトタンパク質スパイクがどこで現れるかを示すために標準物質をスパイクした対照試料を示し；3番目の列は、AGMタンパク質を表すスパイクを含有する対照試料を示し；下の列は、AGMタンパク質スパイクを含む、標準をスパイクした試料を示す。図10Bは、エクソンエディターで治療した網膜組織の結果を示しており、ヒト及びAGGペプチドの両方の検出を示している。上の列は対照試料を示し、これは、ヒト/AGMキメラタンパク質の存在を反映するヒトペプチドスパイクを示す（図10Aに示す陰性対照とは対照的に）；2番目の列は、標準をスパイクした対照試料を示し；3番目の列は、AGMタンパク質を表すスパイクを含有する対照試料を示し；下の列は、AGMタンパク質スパイクを含む、標準をスパイクした試料を示す。

【図11A】AAV8エクソンエディターまたはビヒクルで治療した後のAGMの眼の健康を示す棒グラフである。

【図11B】AAV8エクソンエディターまたはビヒクルで治療した後のAGMの眼の健康を示す棒グラフである。

【図11C】AAV8エクソンエディターまたはビヒクルで治療した後のAGMの眼の健康を示す棒グラフである。

【図11D】AAV8エクソンエディターまたはビヒクルで治療した後のAGMの眼の健康を示す棒グラフである。

【図11E】AAV8エクソンエディターまたはビヒクルで治療した後のAGMの眼の健康を示す棒グラフである。

【図11F】AAV8エクソンエディターまたはビヒクルで治療した後のAGMの眼の健

10

20

30

40

50

康を示す棒グラフである。データは、ビヒクルの平均値ならびにエクソンエディター 4 4 3、2 7 4、4 9 7、及び 5 0 5 の平均値 + / - 標準偏差として示されている。図 1 1 A は、ベースライン、1 4 日目、及び 2 8 日目における網膜厚を示す。図 1 1 B は、ベースライン、7 日目、1 4 日目、2 1 日目、及び 2 8 日目におけるトノメトリーによる眼圧を示す。図 1 1 C ~ 1 1 F は、眼炎症の測定基準の結果を示す。図 1 1 C は、ベースライン、7 日目、1 4 日目、2 1 日目、及び 2 8 日目における合計臨床スコアを示す；図 1 1 D は、ベースライン、7 日目、1 4 日目、2 1 日目、及び 2 8 日目の硝子体細胞スコアを示す；図 1 1 E は、ベースライン、7 日目、1 4 日目、2 1 日目、及び 2 8 日目の水溶液細胞スコアを示す；図 1 1 F は、ベースライン、7 日目、1 4 日目、2 1 日目、及び 2 8 日目の炎症性角質粒子を示す。

10

【図 1 2 A】A A V 8 エクソンエディターまたはビヒクルで網膜下投与によって治療した後の A G M の一般的健康測定基準の結果を示す。

【図 1 2 B】A A V 8 エクソンエディターまたはビヒクルで網膜下投与によって治療した後の A G M の一般的健康測定基準の結果を示す。図 1 2 A は、ベースライン、7 日目、1 4 日目、2 1 日目、及び 2 8 日目の体重測定値を示す。図 1 2 B は、ベースライン及び 2 8 日目の心拍数（1 分あたりの心拍数（b p m））を示す。

【図 1 3】エクソンエディターのヒト A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 2 2 を内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 転写物のエクソン 2 3 ~ 5 0 にトランススプライシングするように設計された、例示的な R N A エクソンエディターのエレメントを図示する。例示的なエクソンエディターは、A B C A 4 のエクソン 1 ~ 2 2 に及ぶ変異を保有する対象を治療するように設計されている。数値タグ：1：A B C A 4 R N A エクソンエディターの A A V パッケージングのための A A V 2 ベースの逆方向末端反復配列（I T R）；2：光受容体細胞で A B C A 4 R N A エクソンエディターの発現を駆動する、サイトメガロウイルス（C M V）プロモーター（C M V 最初期エンハンサー及び C M V 最初期プロモーター）；3：天然 5' 制御を維持する、ヒト A B C A 4 m R N A 由来の天然 5' 非翻訳領域（U T R）；4：トランススプライシングを介して対応する内在性コード配列を置換する、同義コドン変化を含む A B C A 4 エクソン 1 ~ 2 1。同義コドン変化を使用して、例えば、潜在性スプライスアクセプター部位を除去して、潜在的な選択的スプライシング反応を軽減する；5：配列ベースの定量化を可能にする同義コドン変化を含む A B C A 4 エクソン 2 2；6：内因性 A B C A 4 イントロン 2 2 のスプライスアクセプター部位へとトランススプライシングし、内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 上流配列を、エクソン 2 2 を含む A B C A 4 R N A エクソンエディターコードドメイン配列（C D S）に置換する、スプライスドナー（本明細書ではスプライシングドメインとも称される）；7：エクソン 2 2 の下流の A B C A 4 エクソンエディター（例えば、リンカー、3 X U 1、A R E、B D ドメイン領域）からのアミノ酸の翻訳を低減／防止する、終止コドン（ダブル終止）；8：構造的な柔軟性及びスプライスドメイン部位へのアクセス可能性を提供するリンカー；9：U 1 s n R N P に会合することが予測され、A B C A 4 R N A エクソンエディター介在活性を増強することが本明細書で実証される、3 つの直列型 U 1 結合部位（3 X U 1）；1 0：細胞質に入る非スプライシング A B C A 4 R N A エクソンエディターの安定性を低減させることが本明細書で実証されている A U リッチエレメント（A R E）；1 1：配列相補性を介して、内因性 A B C A 4 p r e - m R N A イントロン 2 2 に対する A B C A 4 R N A エクソンエディターの標的化を媒介する結合ドメイン（B D）；1 2：効率的なトランススプライシングを促進する M A L A T 1 ターミネーター；1 3：エクソンエディターカセットの A A V パッケージングのための A A V 2 ベースの I T R。図示する例示的な R N A エクソンエディターに対応する例示的な配列は、配列番号 9 0（A B C A 4 - 0 1）に提示する。配列番号 9 0 は、配列番号 8 2 のヌクレオチド 4 2 8 4 ~ 9 0 7 3 に対応する。配列番号 9 0 は、配列番号 7 8（5' U T R から抗 - m u t 1 を含む M A L A T 1 - M a s c R N A の末端まで及ぶ）及び配列番号 6 9（5' U T R 内の A T G から抗 - m u t 1 を含む M A L A T 1 - M a s c R N A の末端まで及ぶ）を含む。配列番号 8 2 は、配列番号 9 0 をコードする。

20

30

40

50

【図14A】RNAトランススプライシング及びシススプライシング反応を図示する。

【図14B】RNAトランススプライシング及びシススプライシング反応を図示する。(A) トランススプライシングを介したエクソン編集の一般メカニズムがABCA4 RNAエクソンエディターに関して提示される、RNAトランススプライシング反応概略図を示す。例示的なABCA4エクソンエディターRNAは、標的ABCA4 pre-mRNAの上に図示される。イントロン22に相補的な結合ドメイン(BD)は、エクソンエディターをpre-mRNAと関連付け、スプライセオソーム媒介性トランススプライシング反応がエクソンエディターのスプライスドナー(SD)部位(またはスプライシングドメイン)と天然イントロン22スプライスアクセプター(SA)部位との間で起こることを可能にし、標的化pre-mRNAの上流領域の、エクソンエディターによって提供されるコード配列(CDS)への置換をもたらす。pre-mRNA分子は、あらゆる残りの下流のイントロンを除去する一般的なシススプライシングプロセスを徐々に経て進行し、成熟mRNAをもたらす、その後このmRNAが翻訳を受けて機能的(生物学的に活性な)ABCA4タンパク質を形成し得る。内因性pre-mRNAの図中の赤色の「x」の変異は、単一のpre-mRNA転写物のABCA4遺伝子に存在する代表的な個々の対立遺伝子の変異を示す。SD及びSA部位は、赤矢印で示される。トランススプライシングを介して形成されたエクソン-エクソン結合部を赤色で囲んでいる。(B) RNAシススプライシング及びトランススプライシングメカニズムを示す。RNAシススプライシング及びトランススプライシングは両方とも、スプライシングを媒介するためには内因性スプライセオソームに依存し、ポリピリミジントラック(Py)の上流である分岐点(BP)とSD部位の第1のヌクレオチドとの間の共有結合形成から始まる。シススプライシング中にラリアットが形成され、トランススプライシング中にY分岐が形成される。次に、スプライセオソームは、上流のエクソンから下流のエクソンへのライゲーションを媒介し、一方、ラリアット分子及びY分岐分子は急速に分解される。

10

20

30

40

50

【図15】個々のRNAエクソンエディター活性のRT-qPCR解析の概略図を提示する。RNAエクソンエディターで治療された細胞または組織からRNA抽出した後、RNAを逆転写し、qPCRまたはddPCRに供する。概略図では、紫色のフォワードプライマー(標識1)と緑色のリバースプライマー(標識2)を使用して、RNAエクソンエディターのRNAコピー数が測定されている。天然ABCA4 RNAは、青色のフォワード(標識3)及びリバース(標識4)プライマーのペアを使用して特異的に定量することができる。ABCA4 RNAエクソンエディターの末端エクソン22における同義コドン変化のため、青色のフォワードプライマー(標識3)は、この位置への相補性が低く、代わりにエクソン編集ONT RNA生成物を定量化するために、紫色のフォワードプライマー(標識1)に置き換えられる。紫色のフォワード(標識1)及びリバース(標識5)プライマーのペアを使用して、RNAエクソンエディター、ONT、及びOFT RNA分子を合わせて定量化する。

【図16】例示的なABCA4エクソンエディターのスクリーニング及び同定を示す。NGSライブラリベースのアプローチ(上)と単一のエクソンエディター生物発光ベースのアプローチ(下)の両方を適用して、エクソンエディターが向かうABCA4遺伝子イントロン22内の例示的な位置としてBD117を同定した。

【図17】40merリンカーがLinkDリンカーよりも劇的に優れていることを示す。(A) 示される各構築物または非トランスフェクト陰性対照についてのABCA4 RNAの置換パーセントを示すヒストグラムを提示する。40merリンカーを含むエクソンエディターは、前駆リンカー(LinkD)を含むエクソンエディターと比較して、ABCA4 RNAの劇的かつ統計学的に有意な置換率の増加を示す。(B) オンターゲット(ONT)トランススプライシングRNAから翻訳されるタンパク質のレベルが劇的に高いことによって反映されるように、40merリンカーがLinkDリンカーと比較してより高いトランススプライシング活性を促進することを示すウエスタンブロットを示す。変異ABCA4 mRNAを過剰発現するように操作されたHEK293T17+06細胞を使用したトランスフェクション実験では、40merリンカーを含むエクソンエ

ディターは、LinkDリンカーを含むエクソンエディターと比較して、トランススプライシングABC A 4タンパク質（ONT）レベルが劇的に高く、非スプライシングタンパク質（NSP）レベルが有意に低い。ウエスタンブロットを、ABC A 4のC末端に特異的な抗ABC A 4抗体（上パネル）、トランススプライシングタンパク質のN末端に組み込まれているV5エピトープタグに特異的な抗V5エピトープタグ抗体、及びNSP（中央のパネル）、ならびにタンパク質ローディング対照であるナトリウム／カリウムATPアーゼ（ $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ）に特異的な抗体でプローブした。

【図18】全長タンパク質及びNSPを例証する絵。C末端Abは、完全長ABC A 4タンパク質のみを免疫沈降させる。

【図19】例示的なABC A 45' RTMの文脈において、単独及び組み合わせた、示されるRTMエレメントの各々の活性を示す。A) 示される各構築物についてのABC A 4 RNAの置換パーセントを示すヒストグラムを提示する。置換パーセントは、各構築物について約20～30%の範囲にある。興味深いことに、U1結合部位（3XUBS）の40mer+3xリピートの組み合わせは、40mer単独と比較して、ABC A 4 RNAの置換パーセントが増加する傾向を示す。（B）ウエスタンブロットは、示された構築物40mer、40mer+3XUBS、40mer+AUリッチエレメント（ARE）、及び40mer+3XUBS+AREがトランススプライシングABC A 4タンパク質（ONT）を発現し、組み合わせでは、これらのRTMエレメントは、40mer単独と比較してONTレベルが増加する傾向を有することを示す。ウエスタンブロットはまた、40mer+3XUBS、40mer+ARE、及び40mer+3XUBS+AREの組み合わせの各々が、40mer単独と比較して、非スプライシングタンパク質（NSP）減少に対してコンビナトリアル効果を呈することも示す。NSP低減に対する組み合わせ効果は、40mer単独と比較して、40mer+3XUBS+AREで特に顕著である。最小のNSP状況（エクソンエディターにおけるスライズドナー配列の直後に終止コドンを含む）では、独立してNSPレベルを低減させる2つの戦略の組み合わせ（3xUBS及びAUリッチエレメントの包含）は、NSPレベル低減に対する協調効果を示した。この組み合わせは、40merのみと比較してNSPレベルを約70%減少させ、ノンストップエクソンエディターで見られるレベルまで低下させた。例示的な構築物は、配列番号84（40merレーン）、配列番号85（40mer+3XUBSレーン）、配列番号86（40mer+ARE）、配列番号87（40mer+3XUBS+ARE）を含む。

【図20A】MALAT1ターミネーター（三重ヘリックス+Mas c RNA）が、例示的なABC A 45' エクソンエディターにおいてONTトランススプライシングの有意な改善をもたらし、抗-mut1 MALAT1ターミネーターが、ONTタンパク質及びNSP発現に関してMALAT1ターミネーターと同様の活性を呈することを示す。

【図20B】MALAT1ターミネーター（三重ヘリックス+Mas c RNA）が、例示的なABC A 45' エクソンエディターにおいてONTトランススプライシングの有意な改善をもたらし、抗-mut1 MALAT1ターミネーターが、ONTタンパク質及びNSP発現に関してMALAT1ターミネーターと同様の活性を呈することを示す。（A）例示的なABC A 45' エクソンエディターの文脈において、前駆ターミネーターと比較して、MALAT1ターミネーターによってもたらされる相対的なトランススプライシングを示すヒストグラムを提示する。MALAT1ターミネーターは、前駆ターミネーターと比較して、トランススプライシングの23倍の増加をもたらす。（B）3つの異なるABC A 45' エクソンエディター、MALAT1、及び抗-mut1 MALAT1が、トランススプライシングABC A 4タンパク質（ONT）及び非スプライシングタンパク質（NSP）の発現レベルに関して同様の活性を呈することを示すウエスタンブロットを示す。ウエスタンブロットを、ABC A 4のN末端に特異的な抗ABC A 4抗体（上パネル）、ABC A 4のC末端に特異的な抗ABC A 4抗体（中央パネル）、及びタンパク質ローディング対照であるナトリウム／カリウムATPアーゼに特異的な抗体（ $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ）でプローブした。

10

20

30

40

50

【図21A】変異ABCA4 mRNAを過剰発現するように操作されたHEK293T 17+06細胞に形質導入された、例示的なAAV2-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物の用量反応を示し、ABCA4 RNAエクソンエディターは、図13に示され(5'UTRから抗-mut1 MALAT1ターミネーターの末端まで及ぶ; 配列番号78)、40merリンカー+3XUBS+ARE (配列番号73)のカセットを含む。

【図21B】変異ABCA4 mRNAを過剰発現するように操作されたHEK293T 17+06細胞に形質導入された、例示的なAAV2-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物の用量反応を示し、ABCA4 RNAエクソンエディターは、図13に示され(5'UTRから抗-mut1 MALAT1ターミネーターの末端まで及ぶ; 配列番号78)、40merリンカー+3XUBS+ARE (配列番号73)のカセットを含む。AAV2-ABCA4エクソンエディターを、一連の感染多重度(MOI)(0、1k、10k(1e4)、100k(1e5)、1M(1e6))で生物学的二連でHEK293T17+06細胞に形質導入し、続いて、(A)ddRT-PCR%RNA置換のためのRNA抽出、または(B)膜タンパク質抽出及びABCA4特異的抗体でプローブしたウエスタンブロッティングを行った。ABCA4のN末端に対して特異的な抗ABCA4抗体でプローブしたウエスタンブロット(上パネル)は、ONTタンパク質及びNSPがMOI 1e4で検出可能であり、MOI 1e6まで増加することを示す。ウエスタンブロットを、ABCA4のN末端に特異的な抗ABCA4抗体(上パネル、20回の曝露)及びタンパク質ローディング対照であるナトリウム/カリウムATPアーゼ(Na⁺/K⁺ATPase、5回の曝露)に特異的な抗体を用いてプローブした。これらの結果は、ABCA4 RNA%及びタンパク質代替レベルに関してMOIを増加させることによる予想される用量反応効果を実証する。

【図22】インビボでのABCA4 RNAエクソン編集を示す。RT-qPCRによって測定したAGM網膜におけるエクソン編集。治療領域の神経網膜穿孔を、RT-qPCRで解析した。(A)RNA置換%を、全ABCA4(天然及び編集)に対する%として示す。(B)10ng RNAあたりのエクソンエディターのコピー数を、RNaseH20に対して正規化した。このインビボ試験で使用される例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物(AAV8-REC)は、配列番号77を含むRNAエクソンエディターを含む。1か月(4週間)及び3か月(12週間)タイムポイントの結果を示す。

【図23】ABCA4-01(配列番号90)をコードするAAVベクタープラスミド(配列番号82)の概略図を提示する。

【図24】エクソン編集ABCA4 RNAから翻訳されたタンパク質の機能的活性を示す。これらの結果は、ABCA4 RNAエクソン編集を介して救済されたABCA4タンパク質の機能的活性を確認する証拠を提供する。未治療(陰性対照)または配列番号78(V5タグ付きREC)を含むエクソンエディターのV5エピトープタグ付きバージョンでのトランスフェクション後に、ABCA4 KO細胞からの免疫沈降によって濃縮したABCA4タンパク質のATPアーゼ活性であって、V5エピトープタグ付きバージョン(配列番号81)の活性を示す。ATRなし(ベースライン)または40μMのATR(+ATR)を添加したABCA4ATPase活性測定値を示す。データは、技術的な二連または三連の測定値での単一の生物学的複製である。

【図25】OFT配列により補足されたRNA種を図示する。GSPは、エクソンエディターのエクソン22(Ex22)のコドン最適化(CO)配列を標的とする。赤色の点線の領域を、Illuminaシーケンシングプラットフォームによって配列決定する。紫色の領域は、エクソンエディターによって提供されるABCA4 CDSを示す。3つの推定上のOFTジャンクション(A、B、C)及び2つの推定上の自己スプライシングされたエクソンエディター配列が、例示目的で提供される。

【図26】示されたエレメントを含む例示的なABCA4構築物について、HEK17+06細胞において同定された潜在性スプライス部位及びその使用頻度を示す結果を提示する。潜在性スプライス部位の同様のパネルを、NHP網膜においてインビボで同定し、特

10

20

30

40

50

徴付けた。同定された潜在性スプライス部位（配列番号46）における同義変異の導入前（上パネル）、及びその中の同定された潜在性スプライス部位における同義変異の導入後（下パネル）の前駆体配列を含むABC A4構築物の実験的に決定された潜在性スプライス部位頻度これらの導入により、スプライシング頻度の有意な低減によって証明されるように、スプライス部位耐性配列（配列番号79）が生成された。

【図27】インビトロで調べた標的pre-mRNAの例示的なイントロン（イントロンA）の5'RTMの文脈において、単独及び組み合わせた、示されるRTMエレメントの各々についての活性を示す。（A）示される各構築物についてのABC A4 RNAの置換パーセントを示すヒストグラムを提示する。興味深いことに、40mer+3XUBSの組み合わせ、40mer+AREの組み合わせ、または40mer+3XUBS+AREの組み合わせは、40mer単独と比較して、標的RNAの置換パーセントが減少する傾向を示す。（B）ウエスタンブロットが、示された構築物40mer、40mer+3XUBS、40mer+ARE、及び40mer+3XUBS+AREが、トランススプライシングオンターゲットタンパク質（ONT）を発現すること、ならびに組み合わせの各々が、40mer単独と比較してNSP低減へのコンビナトリアル効果を表していることを図示する。より具体的には、40mer単独と比較して、40mer+3XUBSの組み合わせはNSPレベルを約75%低減させ、40mer+AREの組み合わせはNSPレベルを約40%低減させ、40mer+3XUBS+AREの組み合わせはNSPレベルを約88%低減させた。

【図28】インビトロで調べた標的pre-mRNAの例示的なイントロン（イントロンB）の5'RTMの文脈において、単独及び組み合わせた、示されるRTMエレメントの各々についての活性を示す。（A）示される各構築物についてのABC A4 RNAの置換パーセントを示すヒストグラムを提示する。興味深いことに、40mer+3XUBSの組み合わせ、または40mer+AREの組み合わせは、40mer単独と比較して、標的RNAの置換パーセントが増加する傾向を示す。（B）ウエスタンブロットが、示された構築物40mer、40mer+3XUBS、40mer+ARE、及び40mer+3XUBS+AREが、トランススプライシング標的タンパク質（ONT）を発現すること、ならびに40mer+3XUBS、40mer+ARE、及び40mer+3XUBS+AREの組み合わせの各々が、40mer単独と比較してNSP低減へのコンビナトリアル効果を表していることを図示する。NSP低減に対する組み合わせ効果は、40mer単独と比較して、40mer+3XUBS+AREで特に顕著である。より具体的には、40mer単独と比較して、40mer+3XUBSの組み合わせはNSPレベルを約38%低減させ、40mer+AREの組み合わせはNSPレベルを約33%低減させ、40mer+3XUBS+AREの組み合わせはNSPレベルを約66%低減させた。

【図29】インビトロで調べた標的pre-mRNAの例示的なイントロン（イントロンC）の5'RTMの文脈において、単独及び組み合わせた、示されるRTMエレメントの各々についての活性を図示する。簡潔に述べると、HEK293T細胞を、非結合ドメイン（NBD）+40mer；BD34（イントロンCに特異的に結合する）+40mer；BD34+40mer+3XUBS；またはRTMなし（トランスフェクション対照）を含有するRTMでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に細胞を採取し、RT-qPCRによってトランススプライシング効率に関してアッセイした。BD34+40merの置換パーセントは約1%の置換であり、これは、BD34+40mer+3XUBSを含むRTMでは約3%の置換に増加した。したがって、3xUBSエレメントは、示されるイントロンCを標的とする例示的なRTMにおいて置換パーセントを約3倍増加させた。

【図30A】例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物による治療から6か月後のNHPにおけるインビボでの堅牢なABC A4 RNA及びタンパク質置換を実証する結果を示す。

【図30B】例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物による治療から6か月

後のNHPにおけるインビボでの堅牢なABCA4 RNA及びタンパク質置換を実証する結果を示す。

【図30C】例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物による治療から6か月後のNHPにおけるインビボでの堅牢なABCA4 RNA及びタンパク質置換を実証する結果を示す。(A) ウイルスゲノムコピー (VGC) (x軸) 及びエクソンエディターRNAコピー数 (y軸)、(B) ABCA4 RNAの置換%、(C) ABCA4-01 (3.5E11 vg/眼) による治療から6か月後のn=3のカニクイザル動物におけるタンパク質置換。A及びBにおいて、DNA及びRNAのレベルを、液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応 (ddPCR) ベースのアッセイを使用して評価した。Cでは、総タンパク質パーセント (編集天然タンパク質とNHP天然タンパク質の合計に対する編集されたABCA4) を、認定IAMSアッセイを使用して定量化した。このインビボ試験で使用する例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物は、配列番号90を含むRNAエクソンエディターを含む。4つのNHPの結果を示し、(B) 及び (C) では1~4:1 (ビヒクル治療)、2~4 (3.5E11 vg/眼で治療) として示される。

【図31】例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物が、エキスピボでヒト網膜においてABCA4 RNAを編集することを実証する結果を提示する。このエキスピボ試験で使用する例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物は、配列番号90を含むRNAエクソンエディターを含む。グラフは、ビヒクルまたは配列番号90を含む例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物で治療後21日の3人の独立したドナー由来のヒト網膜外植体におけるABCA4 RNAの置換パーセントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本明細書に記載の組成物及び方法は、ABCA4遺伝子の変異によって引き起こされる疾患または障害を治療するためのトランススプライシング分子 (例えば、pre-mRNAトランススプライシング分子) が関与する。本明細書に記載の組成物及び方法は、遺伝子治療 (例えば、インビボ遺伝子治療、例えば、アデノ随伴ウイルスによって送達される) を用いて、スターガルト病または錐体桿体ジストロフィーなど、ABCA4における少なくとも1つの変異によって引き起こされる疾患を治療する。

【0040】

ABCA4は、サイズが約6.8 kbであり、50個のエクソンを含み、光受容体細胞及びRPE細胞で発現される250 kDaのATP結合カセットトランスポータータンパク質をコードする。ABCA4は、桿体光受容体及び錐体光受容体の外節円板の縁及び切開部に特異的に局在する膜貫通タンパク質である。網膜では、ABCA4は、N-レチニリデン-ホスファチジルエタノールアミンを内腔から光受容体ディスク膜の細胞質小葉に輸送し、このプロセスは、化学異性化と組み合わせられて、潜在的に有毒なレチノイド化合物の除去を促進する。逆に、ABCA4の機能障害は、網膜色素上皮 (RPE) 中のジ網膜コンジュゲートA2Eなどのビスレチノイドの蓄積をもたらす。この残屑は、リポフスチンとしても知られ、RPE代謝を妨害すると考えられ、最終的に細胞死に寄与する。現在の遺伝子型-表現型モデルは、残存ABCA4活性の程度を網膜疾患表現型の重症度と相関させる。ABCA4関連網膜症は通常、常染色体劣性で遺伝するため、光受容体のABCA4レベルが50%である個体は、正常な網膜機能を有すると予想される。Abca4ノックアウトマウスからのデータは、網膜における有毒脂質蓄積の低減を含めた関連する治療効果を達成するのに、ABCA4レベルの10~25%補正の範囲が十分であることを示している。

【0041】

重要なことに、本発明者らは、未熟終止コドン変異を模倣する疾患を保有するインビトロで操作されたヒトABCA4タンパク質ノックアウト (KO) 細胞株において、ABCA4タンパク質レベルの完全な救済を実証し、インビボでのNHP網膜及びヒト網膜外植体におけるRNAエクソン編集の治療的に適切なレベルを達成した。より具体的には、本発明者らは、20%超のABCA4 RNAエクソン編集効率 (RNA置換%) をもたら

す A A V - A B C A 4 エクソンエディター治療は、A B C A 4 タンパク質 K O 細胞株においてインビトロで A B C A 4 タンパク質レベルの 100% 救済を達成するのに十分であることを確認した。例えば、図 3 C を参照されたい。内因性 A B C A 4 遺伝子座の上流でノックインされた強力な C A G プロモーターを含む、親 A B C A 4 ノックイン (K I) 細胞株を、A B C A 4 タンパク質の救済効率を比較するための基準として使用した。本明細書に記載されるように、インビトロで操作されたヒト A B C A 4 タンパク質 K O 細胞株は、疾患を模倣する未熟終止コドン変異を A B C A 4 遺伝子に導入することによって、親 A B C A 4 K I 細胞株から誘導した。したがって、インビトロで操作されたヒト A B C A 4 タンパク質ノックアウト細胞株は、本明細書に記載の A B C A 4 R N A エクソンエディター (核酸トランススプライシング分子) の治療有効性を予測するためのインビトロモデル系として機能する。

10

【0042】

さらに、本発明者らは、例示的な A A V 8 ベースの A B C A 4 エクソン編集分子の単回網膜下投与により、N H P 眼において 3 か月 (12 週間) 時点でインビボで最大 37% の R N A 置換がもたらされることを示した。例えば、図 22 を参照されたい。本明細書で 사용되는場合、37% の置換とは、治療された細胞または組織から定量化された全 A B C A 4 m R N A の 37% がエクソン編集形態で存在することを意味する。本試験で 사용되는例示的な A A V 8 ベースの A B C A 4 エクソン編集分子は、配列番号 77 を含み、これは、配列番号 90 に存在する同じ調節エレメント及び二重終止コドンとを共有する。R N A トランススプライシングに起因する完全長ヒト / N H P A B C A 4 タンパク質発現の翻訳も本試験で実証されており、発現レベルは R N A 置換 % による傾向を示している。治療後の異なるタイムポイントで調べた様々な他の A A V 8 ベースの A B C A 4 エクソン編集分子を用いた追加の N H P 試験により、耐久性のある R N A エクソン編集及び R N A トランススプライシングから生じるヒト / N H P A B C A 4 タンパク質発現が実証された。例えば、図 9 及び 10 B を参照されたい。従って、本発明者らは、スプライセオソーム媒介性トランススプライシングを介する治療上関連する R N A エクソン編集、及び結果として得られる N H P において単一の A A V ベクターによって媒介される完全長 A B C A 4 タンパク質発現を達成した。これらの試験で、A B C A 4 - 01 (配列番号 90) と共通する選択された調節エレメント及び 40mer リンカー及び B D が、N H P において 3 か月タイムポイントまで持続的な発現及びエクソン編集活性をもたらすことが実証された。例えば、図 22 A 及び 22 B を参照されたい。

20

30

【0043】

本明細書に提示されるさらなる証拠は、配列番号 82 を含む A A V ベクタープラスミドによってコードされる例示的な A A V 8 パッケージ R N A エクソンエディターである A B C A 4 - 01 (配列番号 90) が、インビトロ及びインビボでの細胞における A B C A 4 生物活性を少なくとも部分的に回復するのに十分な程度まで、内因性プレ R N A のトランススプライシングを媒介し得ることを実証する。A B C A 4 - 01 (配列番号 90) は、図 13 に図示され、R N A エクソンエディターの長さが 5' I T R から 3' I T R に及ぶ。いくつかの実施形態では、配列番号 78 [5' U T R から M A L A T 1 - M a s c R N A (抗変異 1) の末端まで及ぶ配列番号 90 の一部分、図 13 を参照] は、R N A エクソンエディターに使用され得る。いくつかの実施形態では、エクソン 1 ~ 22 の C D S から、図 13 に図示される抗 - m u t 1 (例えば、配列番号 69) を含む M A L A T 1 - M a s c R N A の末端まで及ぶ配列番号 78 の一部分は、A B C A 4 生物活性の同等の回復を達成する際の成功の合理的な予想を伴って、A B C A 4 R N A エクソンエディターにおいて異なる 5' U T R と組み合わせることができる。

40

【0044】

上記に加え、図 30 A ~ 30 C は、例示的な A A V 8 R N A エクソンエディター構築物 (A B C A 4 - 01 ; 配列番号 90) による治療から 6 か月後の N H P におけるインビボでの堅牢な A B C A 4 R N A 及びタンパク質置換を実証する結果を示す。簡潔に述べると、本発明者らは、野生型カニクイザルを、単回網膜下用量の A B C A 4 - 01 (3 .

50

5 E 1 1 v g / 眼) で治療した。次に、6 か月タイムポイントにおける A A V ベクターゲノム DNA コピー (V G C) の生体内分布、エクソンエディター RNA 発現、ならびに編集された A B C A 4 RNA 及びタンパク質の割合を評価した。エクソンエディター RNA 発現は、V G C と良好に相関し (図 3 0 A)、神経網膜サンプルに存在する全体 (編集 + 天然) A B C A 4 RNA 集団 (図 3 0 B) に対する編集 A B C A 4 RNA の割合として計算される、堅牢な RNA 置換 % (天然 A B C A 4 RNA コピーの編集コピーへの変換) をもたらした。図 3 0 B に示すように、RNA 置換パーセントは、A B C A 4 - 0 1 のこの用量では、約 4 0 % ~ 6 0 % の範囲であった。これにより、認定 I A - M S アッセイによって測定される、結果として得られたヒト N H P キメラ A B C A 4 タンパク質の治療レベルが得られた (図 3 0 C)。より具体的には、これらの動物における A B C A 4 RNA 編集から得られるヒト N H P キメラ A B C A 4 タンパク質は、試験サンプル中に全 A B C A 4 タンパク質 (ヒト N H P + N H P) の 2 0 ~ 4 0 % で存在することが見出された。さらに、本発明者らは、単回網膜下注射により送達される高用量の A B C A 4 - 0 1 で治療した野生型カニクイザルにおいて、最大 6 6 % の RNA 置換及び最大 4 5 % のヒト / N H P キメラ A B C A 4 タンパク質を実証した。これらの結果は、A B C A 4 - 0 1 が、N H P において治療的に適切なレベルの編集 A B C A 4 タンパク質発現を達成し、このレベルが、A B C A 4 K O マウスモデルにおいて治療効果をもたらすことが以前に示された救済された A B C A 4 タンパク質のレベルを超えることを実証する。

10

【 0 0 4 5 】

本発明者らはまた、ヒトドナーの網膜外植片を、例示的な配列番号 9 0 を含む A A V 8 RNA エクソンエディター構築物である A B C A 4 - 0 1 で治療することにより、ヒト光受容体における A B C A 4 エクソン編集を評価した。本明細書で詳細に記載するように、本発明者らは、複数のドナーからの外植片を A B C A 4 - 0 1 (3 . 9 E 1 1 v g / 網膜パンチ) で治療し、細胞を 2 1 日間インキュベートし、次いで、RNA を抽出した。抽出した RNA の解析は、おおよそ 2 0 ~ 3 0 % の、内因性エクソン 1 ~ 2 2 の A B C A 4 - 0 1 によってコードされる対応するエクソンとの RNA 置換を示した (図 3 1)。

20

【 0 0 4 6 】

本発明者らはまた、A B C A 4 - 0 1 (配列番号 8 1) の RNA エクソンエディターの N 末端 V 5 エピトープタグ付きバージョンをコードする過剰発現プラスミドでトランスフェクトした A B C A 4 タンパク質 K O 細胞において救済された A B C A 4 タンパク質が、A T P アーゼ活性を示したことを実証した。本明細書に記載されるように、A B C A 4 - 0 1 (配列番号 8 1) の RNA エクソンエディターの V 5 エピトープタグ付きバージョンによって媒介されるトランススプライシング後に救済された A B C A 4 タンパク質の活性を、A B C A 4 タンパク質免疫沈降後に 4 0 μ M の全トランス網膜 (A T R) 有りまたは無しで評価した。これらの結果は、A B C A 4 タンパク質 K O 細胞において救済された A B C A 4 タンパク質が、4 0 μ M の全トランス網膜の添加に応答した A T P a s e 活性の基底レベルの増加によって反映されるように、A T P a s e 活性を呈したことを示す。図 2 4 を参照されたい。これらの結果は、A B C A 4 - 0 1 (配列番号 9 0) 治療から生成されたエクソン編集 A B C A 4 タンパク質が、光受容体からの A T R 及び 1 1 - シス網膜の排除に必要な機能的 A T P a s e 活性を示したという証拠を提供する。これらの結果は、例示的な A B C A 4 RNA エクソンエディターの発現後の A B C A 4 生物活性の回復を示す。

30

40

【 0 0 4 7 】

したがって、本明細書に提示される結果は、本明細書に記載の A B C A 4 RNA エクソンエディター (例えば、配列番号 9 0、配列番号 7 8、または配列番号 6 9 のいずれか 1 つを含む RNA エクソンエディター) 及びそれを含む組成物の、A B C A 4 関連網膜症の治療における、及び A B C A 4 関連網膜疾患を治療するための薬剤の調製における、ならびに A B C A 4 関連網膜症を有する対象を治療するための方法における使用においての治療可能性を実証する。本明細書に記載の A B C A 4 RNA エクソンエディター (例えば、配列番号 9 0、配列番号 7 8、または配列番号 6 9 のいずれか 1 つを含む RNA エク

50

ソンエディター) 及びそれを含む組成物を使用して治療され得る A B C A 4 関連網膜症には、スターガルト病-1 (S T G D 1) ; 黄色斑眼底 ; 網膜色素変性症-19 (R P 19) ; 錐体桿体ジストロフィー-3 (C O R D 3) ; 及び加齢性黄斑変性-2 (A R M D 2) が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の A B C A 4 R N A エクソンエディター (例えば、配列番号 90、配列番号 78、または配列番号 69 のいずれか 1 つを含む R N A エクソンエディター) 及びそれを含む組成物を使用して治療され得る A B C A 4 関連網膜症は、錐体桿体ジストロフィー、スターガルト黄斑ジストロフィー、または黄色斑眼底と一致する表現型と一緒に存在する、A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 22 に及ぶ 2 つのアレル病原性変異を伴う遺伝性網膜疾患を含む。利用可能なデータに基づき、A B C A 4 の既知の変異の約 60 % が、本明細書に記載の A B C A 4 R N A エクソンエディター (例えば、配列番号 90、配列番号 78、または配列番号 69 のいずれか 1 つを含む核酸トランススプライシング分子によってコードされる R N A エクソンエディター) を使用して修正可能であり、A B C A 4 関連網膜症と診断された患者の 70 ~ 85 % は、本明細書に記載の A B C A 4 R N A エクソンエディター (例えば、配列番号 90、配列番号 78、または配列番号 69 のいずれか 1 つを含む R N A エクソンエディター) による治療から恩恵を受ける。

10

【0048】

上記に加えて、当業者は、A B C A 4 遺伝子内で新規変異が定期的に同定され、必ずしも特定の表現型 (複数可) に属するものではないことを理解する。当業者はまた、C O R D 3 → S T G D 1 → R P 19 が、変異の重症度に基づいて多様な表現型を表すと考えられることを理解する。したがって、R N A エクソンエディター及びそれをコードする構築物、ならびにそれを含む組成物は、A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 22 で同定されたいずれかの及び全ての変異に関連する状態 / 疾患の治療において有利に使用され得、後に属する表現型は、A B C A 4 網膜症に関する知識が進化するにつれて特徴づけされ得る。

20

【0049】

いくつかの実施形態では、対象 / 患者は、A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 22 に少なくとも 1 つの変異を有すると同定される。いくつかの実施形態では、対象 / 患者は、遺伝子型を同定し、A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 22 に少なくとも 1 つの変異を有すると同定される。いくつかの実施形態では、A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 22 に少なくとも 1 つの変異を有すると同定するために遺伝子型がすでに同定された対象 / 患者を得る。いずれのモデルにおいて、対象 / 患者は、本明細書に記載の R N A エクソンエディターを有するそのような対象 / 患者の提案される治療に対して、それを基に選択プロセスが行われる遺伝子型同定のタイミングに関係なく、A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 22 に少なくとも 1 つの変異を有することに基づいて選択される。このような対象 / 患者は、A B C A 4 関連網膜症を治療するための本明細書に記載の A B C A 4 R N A エクソンエディター、A B C A 4 関連網膜症を治療するための本明細書に記載の A B C A 4 R N A エクソンエディターを含む薬剤、及び本明細書に記載の A B C A 4 R N A エクソンエディターまたはそれを含む組成物を投与することを必要とする A B C A 4 関連網膜症を治療するための方法の使用から恩恵を受けるであろう。

30

【0050】

スターガルト病-1 (S T G D 1) は、染色体 1 p 22 上の A B C A 4 遺伝子 (O M I M 番号 601691) におけるホモ接合性または複合ヘテロ接合性の変異によって引き起こされる。ミスセンス、スプライシング、ランケート、及びフレームシフトの変化を含む 900 を超える異なる変異が、A B C A 4 遺伝子で報告されており、網膜変性症と関連していることが示されている。これらの変異の多くは、A B C A 4 タンパク質の単一アミノ酸を変化させ、光受容体細胞における A B C A 4 活性の欠如または減少をもたらす。A B C A 4 活性が低減することは、網膜細胞内でのビタミン A 誘導体の蓄積及びリポフスチンの蓄積を招き、これは網膜色素上皮及び光受容体に対して毒性を有する。スターガルト黄斑変性症は、網膜に影響を及ぼす遺伝性眼障害であり、より具体的には、読書、運転、及び顔認識を含む様々な視覚作業に重要な鋭い中心視覚を担う黄斑と呼ばれる領域に影響

40

50

を及ぼす。中心視力喪失に加えて、スターガルト黄斑変性症に罹患した対象は、暗視障害を有し、一部の罹患者は色覚障害も有する。疾患経過の後期には、周辺視覚視野も中等度から広範な制限を示すことがある。スターガルト黄斑変性症の徴候及び症状は、典型的には、小児期から成人早期までに存在し、患者は、経時的に進行性の両側視力喪失を示し、多くの場合、20／200またはそれより悪化する。

【0051】

黄色斑眼底（FFM）は、ABCA4遺伝子及びペリフェリン-2（PRPH2）遺伝子の変異に関連しているスターガルト病の対立遺伝子のサブタイプである。斑点基底部病の一種である黄色斑眼底は、リポフスチンの沈着に起因する多くの白黄色の斑点が眼底上に広く分布していることに由来する。FFMは、網膜色素上皮のネットワーク萎縮及び脈絡膜血管萎縮を特徴とする。中心視力喪失、色覚喪失、羞明、傍中心暗点、及び暗順応が遅いことは、FFMの特徴的な特色である。FFMは、他のスターガルトサブタイプよりも時期が遅くなり、進行速度が遅い傾向がある。視力の喪失が生涯の最初の20年で始まる場合、患者は通常、スターガルトと診断されるが、疾患が生涯の後半で発現し、より緩徐に進行する場合、患者は通常、FFMを有すると診断される。

【0052】

網膜色素変性症-19（RP19）は、染色体1p22上のABCA4遺伝子におけるホモ接合性または複合ヘテロ接合性の変異によって引き起こされ得る。網膜色素変性症は、周辺視覚の進行性喪失及び暗視障害を特徴とする遺伝性の眼の疾患である。多くの遺伝子が網膜色素変性症に関連付けられている。網膜色素変性症-19は、夜盲症、末梢視力喪失、進行性網膜変性症、トンネル視覚、進行性視力喪失、夜間または弱い光での視力低下、進行期の中心視覚喪失、及び網膜色素上皮（RPE）を特徴とする。臨床的には、眼底は、広範な外網膜変性、骨スピキュール色素沈着、血管減弱、ワックス状の円盤腫、及び重度の萎縮変化、ならびに黄斑の脈絡膜瘢痕化を示す。

【0053】

錐体桿体ジストロフィー-3（CORD3）は、染色体1p22上のABCA4遺伝子のホモ接合性または複合ヘテロ接合性の変異によって引き起こされる。ABCA4は、錐体桿体ジストロフィーの病因に関与する4つの主要な原因遺伝子のうちの1つであり、ABCA4の変異は、常染色体劣性錐体桿体ジストロフィーの30～60%に関連している。CORD3は、常染色体劣性の臨床的に不均一な網膜障害であり、典型的には、最初に認められる羞明及び色識別の喪失を伴う症候的な急速に進行する視力喪失、その後続く夜盲症及び進行性の視野喪失を特徴とする。錐体変性は若い時期に現れ、網膜が中心的に関与し、続いて数年後に桿体に変性する。錐体桿体ジストロフィーの診断は、病歴、眼底検査、及び網膜電図に基づく。錐体桿体ジストロフィーは、典型的には、他のABCA4網膜症よりも早期に発症し、はるかに急速に進行し、広範囲の黄斑萎縮は発症から数年後に発生する。現在、疾患の進行を阻止し、または視覚を回復させる療法はなく、視覚的な予後は不良である。管理は、変性プロセスを遅らせ、合併症を治療し、失明の社会的及び心理的影響に関連する課題に患者を備えることを目的とする。

【0054】

加齢性黄斑変性-2（ARMD2）に対する感受性は、染色体1p22上のABCA4遺伝子の変異によってもたらされる。ARMD2は、RPE内側及びその下側でのドルーゼンの蓄積（黄色がかった沈着の蓄積）と、黄斑RPEの進行性萎縮とを特徴とする複合障害である。これらの変化は、光受容体機能の喪失及び視覚障害をもたらす。加齢性黄斑変性は、先進国における高齢者の視力低下の主な原因である。視力低下は通常、60代または70代で顕著になり、経時的に悪化する傾向がある。加齢性黄斑変性は、読書、運転、及び顔認識などの詳細な作業に重要な中心視覚に主に影響を与える。加齢性黄斑変性の2つの主要なタイプである、ドライ型及びウェット型が説明されている。ドライ型ははるかに一般的であり、加齢性黄斑変性の全症例の85～90%を占める。これは、網膜の下側のドルーゼンの蓄積、黄斑の萎縮、及びゆっくりと進行する視力低下を特徴とする。この病態は通常、両眼に影響を及ぼす。加齢性黄斑変性のウェット型は、急速に悪化するこ

10

20

30

40

50

とがある突然発症する重度の視力低下に関連している。この型の病態は、V E G Fの過剰発現による黄斑の下側での異常で脆弱な血管の成長を特徴とする。これらの血管が血液及び体液を漏出し、これが黄斑に損傷を与え、それによって中心視覚がかすんだり歪んだりする。ウェット型黄斑変性症は、様々な治療法を使用して治療することができる。ドライ型A M Dには、地理的萎縮症の患者のみが利用できるC 3阻害剤という、単一の利用可能な治療法がある。萎縮または体液漏出がなく、ドルーゼン堆積のみが生じた早期形態のA R M Dに対する治療法は現在存在しない。

【0055】

I. 定義

本明細書で使用される場合、「トランススプライシング」とは、1つ以上のエクソン（例えば、外因性エクソンまたはトランススプライシング分子のC D Sの一部であるエクソン）を含む第1のR N A分子を、第2のR N A分子（例えば、p r e - m R N A分子、例えば、内因性p r e - m R N A分子）と結合し、スプライセオソーム介在性メカニズムを介して第2のR N A分子の一部を第1のR N A分子の一部で置換すること意味する。R N Aトランススプライシング反応の一般的メカニズムは、図14Bに例示される。

【0056】

「核酸トランススプライシング分子」または「トランススプライシング分子」は、3つの主要なエレメントを有する：（a）トランススプライシング分子をその標的遺伝子（例えば、p r e - m R N A）にテザリングすることによって特異性をもたらす結合ドメイン、（b）スプライシングドメイン（例えば、3'または5'スプライス部位を有するスプライシングドメイン）、及び（c）標的核酸上にトランススプライシングされるように構成されるC D Sであって、標的核酸における1つ以上のエクソン（例えば、1つ以上の変異エクソン）を置換することができる、C D S。「p r e - m R N Aトランススプライシング分子」または「R T M」は、p r e - m R N Aを標的とする核酸トランススプライシング分子を指す。「核酸トランススプライシング分子」及び「トランススプライシング分子」という用語は、（1）R N AをコードするD N A（R N A転写物は、標的p r e - m R N Aに物理的に結合するエフェクター分子である）、及び（2）R N A転写物自体の両方を指す。明確にするために、「コード配列」（例えば、トランススプライシング分子コード配列）という用語は、対象がエフェクターをコードする（例えば、コード配列はD N Aであり、エフェクターはR N Aである）ことを特定するために本明細書で使用される。いくつかの実施形態では、トランススプライシング分子コード配列は、例えば、変異A B C A 4エクソンの置換のための機能的エクソン（例えば、機能的A B C A 4エクソン）の一部としてのc D N Aを含み得る。

【0057】

本明細書で使用される場合、「エクソンエディター」という用語は、トランススプライシング分子またはそれを含むベクター（例えば、トランススプライシング分子であるR N A転写物をコードするD N Aを含むA A Vベクター）を指すために使用され得る。

【0058】

本明細書で使用される場合、「トランススプライシング効率」とは、所望のトランススプライシングR N A生成物（すなわち、R N Aトランススプライシング反応によって生成された内因性標的p r e - m R N Aに作動可能に連結されたトランススプライシング分子の機能的エクソンを含むキメラR N A分子）の検出された発現レベルの、トランススプライシング分子（または基準分子）について導入されるD N AまたはR N Aの量に対する比を指す。いくつかの場合では、トランススプライシングR N A産物の発現レベルは、R N A - s e qを使用して細胞または組織から単離されたR N Aから検出される。

【0059】

本明細書で使用される場合、「R N A置換%」は、トランススプライシング（T S）に成功した全標的m R N A集団の部分を指し、次の式によって計算される：オンターゲット（O N T）T S % = 100 * （O N Tコピー数 / （O N Tコピー数 + 天然コピー数））。

【0060】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「相対的トランススプライシング効率」とは、試験トランススプライシング効率の、基準トランススプライシング効率に対する比を指し、ここで、試験トランススプライシング効率は、トランススプライシング分子のトランススプライシング効率であり（例えば、本明細書に記載の核酸トランススプライシング分子）、基準トランススプライシング効率は、基準分子（例えば、結合ドメインは、スクランブルされた結合ドメイン（例えば、配列番号 1 を含むかまたはそれからなる結合ドメイン、例えば、配列番号 2 を含むまたはそれからなる結合ドメイン）で置き換えられることを除き核酸トランススプライシング分子と同じエレメントを有する基準分子）のトランススプライシング効率である。トランススプライシング分子の相対的トランススプライシング効率は、同様の条件下で試験された基準トランススプライシング効率に対する試験トランススプライシング RNA 効率の比（別名、増加倍率）として与えられ得る。

10

【0061】

本明細書で使用する場合、「作動可能に連結された (operably linked)」または「作動可能に連結された (operatively linked)」という用語は、エレメントの配置を指し、そのように説明される構成要素は、それらの通常の機能を発揮するように構成される。核酸は、それが別の核酸配列と機能的な関係性に置かれるとき、「作動可能に連結」されている。エレメントは、作動可能に連結されるために隣接している必要はない。従って、例えば、介在配列は、作動可能に連結された配列の間に存在し得る（例えば、結合ドメインとコード配列は、介在配列によって分離され得、結合ドメインは、コード配列に「作動可能に連結」しているとみなされる）。

20

【0062】

本明細書で使用される場合、「CDS」という用語は、タンパク質（例えば、変異が修正されている標的タンパク質）をコードする核酸配列（例えば、RNA 配列、DNA 配列、または RNA と DNA の組み合わせ）を指す。したがって、CDS は、1 つ以上の機能的エクソン（例えば、機能的エクソンの配列）を含み得る。いくつかの場合では、CDS の 1 つ以上の機能的エクソンは、イントロンによって分離されておらず（例えば、内因性 pre-mRNA のように）、互いに隣接している（例えば、cDNA として）。いくつかの場合では、CDS は、エクソンの間、またはそうでなければエクソンに隣接する（例えば、エクソンの上流または下流）1 つ以上のイントロン（例えば、天然イントロン）または非翻訳領域（UTR、例えば、天然 UTR）を含み得る。

30

【0063】

本明細書で使用される場合、「天然 5' ABCA4 非翻訳領域」または「天然 5' ABCA4 UTR」は、ATG 開始コドンの 5' 側にある天然 ABCA4 遺伝子（例えば、ヒト ABCA4 遺伝子）の領域に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する 20 ヌクレオチド長超の配列を指す。天然 5' ABCA4 非翻訳領域の一例は、配列番号 13 の DNA 配列または配列番号 12 の RNA 配列によって示される。同様に本明細書に包含されるのは、例えば、配列番号 64 の DNA 配列または配列番号 65 の RNA 配列などの天然 5' ABCA4 非翻訳領域のバリエーションである。

【0064】

本明細書で使用する場合、「5' ABCA4 エクソンの機能的配列」は、ABCA4 タンパク質の機能的（生物学的に活性な）部分をコードする ABCA4 エクソン 1 ~ 22 のうちの 1 つ以上を含む核酸配列を指す。結合部位に対して 3' 側の内因性 ABCA4 エクソンにトランススプライシングされた場合、5' ABCA4 エクソンの機能的配列は、機能的 ABCA4 タンパク質（例えば、非変異 ABCA4 タンパク質）の発現を提供する。いくつかの場合では、5' ABCA4 エクソンの機能的配列は、トランススプライシング分子がトランススプライシングされているエクソンに隣接するエクソンの配列を含む（例えば、ABCA4 イントロン 22 に結合し、内因性 ABCA4 エクソン 23 にトランススプライスするトランススプライシング分子は、エクソン 22、21、20、19 などを含む 5' ABCA4 エクソンの機能的配列を含み得る）。

40

【0065】

50

本明細書で使用される場合、「機能的」という用語は、タンパク質の文脈において使用される場合、生物学的に活性なタンパク質を指す。「機能的」という用語は、正常な細胞機能を支持するのに必要なタンパク質の活性の量を指すために使用されることもある。A B C A 4 に関して、「機能的」という用語は、例えば、光受容体及び／または網膜上皮細胞の文脈において、正常な細胞機能を支持するために A B C A 4 の活性レベルを回復するのに必要な A B C A 4 タンパク質の活性の量を指すために使用され得る。このようなレベルは、光受容体及び／または網膜上皮細胞における毒性レベルのビスレチノイド化合物の蓄積を低減または防止するのに十分である。より具体的には、欠陥（非機能）A B C A 4 タンパク質は、光受容体における 11-シス及び全トランス網膜、ならびに網膜色素上皮におけるリポフスチンの蓄積をもたらす。A B C A 4 活性の低減もしくは無視できる程度 10 の A B C A 4 活性、または本明細書に記載の核酸トランススプライシング分子を含む治療剤の使用に関連する病態の治療の文脈において、機能的とは、例えば、A B C A 4 関連網膜ジストロフィーなどの A B C A 4 活性の低減したレベルと関連している病態の 1 つ以上の症状を排除するのに十分な A B C A 4 タンパク質の量を回復させることを指す。A B C A 4 関連網膜ジストロフィーとしては、例えば、スターガルト黄斑ジストロフィー（スターガルト病）、黄色斑眼底、及び A B C A 4 関連錐体桿体ジストロフィーが挙げられる。いくつかの実施形態では、かかる方法または使用は、A B C A 4 タンパク質活性（機能的に生物学的に活性な A B C A 4 タンパク質活性）の増加につながる。いくつかの実施形態では、A B C A 4 タンパク質活性のそのような増加は、非変異 A B C A 4 が発現した細胞 20 内（例えば、光受容体及び／または網膜上皮細胞）に存在するものなど通常の野生型レベルで A B C A 4 が存在する細胞のものと比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 %（例えば、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 %）の A B C A 4 活性まで A B C A 4 活性レベルを回復させる。

【0066】

本明細書で使用される場合、「潜在性スプライス部位が修正された」、「潜在性スプライス部位が軽減された」、または「潜在性スプライス部位抵抗性」とは、核酸トランスス 30 プライシング分子の文脈において潜在性スプライス部位で起こるスプライシングの頻度を低下させるために、その中の個々のヌクレオチドを変化させるように改変された核酸トランススプライシング分子またはその一部（例えば、その中のコードドメイン配列）を指す。いくつかの実施形態では、改変は、それによってコードされるアミノ酸配列にいかなる変化ももたらさない。いくつかの実施形態では、改変は、それによってコードされるアミノ酸配列に変化をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子内の潜在性スプライス部位耐性核酸配列は、コードドメイン配列（CDS）である。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位耐性 A B C A 4 CDS は、A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 22 を含む、それから本質的になる、またはそれからなり、潜在性ス 40 プライス部位は、核酸トランススプライシング分子の文脈において同定されており、潜在性スプライス部位のうちの少なくとも 1 つは、少なくとも 1 つの部位におけるスプライシングの頻度を低減するように改変されているが、それによってコードされるアミノ酸を変化させない。A B C A 4 エクソン 1 ~ 22 で同定された例示的な潜在性スプライス部位、及びこれらの部位でのスプライシングの頻度を表 3 に提示する。表の r t m _ p o s のヘッダを有する列に示されるヌクレオチド位置は、A T G コドン（翻訳開始部位）に対する列 3 または列 4 に示される最後のヌクレオチドの位置を指し、このコドンの A は、位置 1 として指定される。例示的な潜在性スプライス耐性 A B C A 4 エクソン 1 ~ 22 配列は、配列番号 56 ~ 59 のうちのいずれか 1 つを含む、それから本質的になる、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、例示的な潜在性スプライス耐性 A B C A 4 エクソン 1 ~ 22 配列は、配列番号 56 を含む、それから本質的になる、またはそれからなる。 50

【0067】

本明細書で使用される「スプライシングドメイン」とは、スプライセオソームによって認識され、トランススプライシングを媒介するモチーフを有する核酸配列を指す。スプライシングドメインは、スプライス部位（例えば、単一のスプライス部位、すなわち、1つのみのスプライス部位）を含み、これは、3'スプライス部位でも5'スプライス部位でもよい。スプライシングドメインは、他の調節エレメントを含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、スプライシングドメインは、スプライシングエンハンサー（例えば、エクソンスプライシングエンハンサー（ESE）、及びイントロンスプライシングエンハンサー（ISE））を含む。いくつかの実施形態では、スプライシングドメインは、GUAA GTまたはGTAA GTを含む。いくつかの実施形態では、スプライス部位は、GUAA GTまたはGTAA GTから本質的になる。いくつかの実施形態では、スプライシングドメインは、GUAA GTまたはGTAA GTからなる。

10

【0068】

本明細書で使用される場合、トランススプライシング分子の「結合ドメイン」は、ハイブリダイゼーション（すなわち、結合部位に対する完全または部分的な相補性）を介して結合部位で標的遺伝子に結合するポリヌクレオチド配列である。

【0069】

本明細書で使用される場合、「結合部位」という用語は、核酸トランススプライシング分子の結合ドメインによって結合される標的mRNA（例えば、内因性遺伝子のmRNA、例えば、ABC A4）中の内因性ポリヌクレオチド配列を指す。結合部位は、結合ドメインによって結合された最も5'側のヌクレオチドから結合ドメインによって結合された最も3'側のヌクレオチドまで延びる。いくつかの実施形態では、結合部位は、結合ドメインと同じ長さである。他の実施形態では、結合部位は、結合ドメインよりも1~10残基以内で長いまたは短い（すなわち、結合部位または結合ドメインのいずれかの残基の一部はハイブリダイズしない）。結合部位に対して少なくとも80%の相補性を有する少なくとも2つの非重複配列を有する結合ドメインが関与する実施形態では、結合部位は、結合ドメインよりも実質的に短い場合がある。

20

【0070】

本明細書で使用される場合、「相補性」及びその文法的変形は、参照配列との水素結合によって対合する所与の配列のヌクレオチド塩基のパーセンテージを指す。所与のパーセンテージの相補性がない場合、「相補」及び「相補的」という用語は、100%の相補性を指す。

30

【0071】

本明細書で使用される場合、所与の配列のヌクレオチド塩基の各々が、参照配列と水素結合することによって対合する場合、所与の配列（例えば、結合ドメイン配列）は、参照配列（例えば、内因性pre-mRNA結合部位）と「100%相補的」であるか、または「100%の相補性」を有し、それによってハイブリダイズして二本鎖配列を形成する（例えば、ワトソンクリック塩基ペアリングを介して、例えば、各AはTまたはUと対合し、各CはGと対合する）。例えば、結合部位に対してアンチセンス方向にある結合ドメインは、結合部位に相補的である。RNAペアリングは、UとのGペアリング（ゆらぎ塩基ペアリング）を含み、したがって、その結合部位とG-Uペアリングを有するRNA結合ドメインは、結合部位と100%相補的であり得る。したがって、正確にその結合部位の逆相補体である結合ドメイン（すなわち、結合ドメインのAが結合部位のUと対合する）を改変して、実質的に結合に影響を与えることなくAのいずれか1つ以上をGで置換することができる。

40

【0072】

本明細書で使用される場合、所与の配列のヌクレオチド塩基のX%が、参照配列と水素結合することによって対合する例えば、ハイブリダイズして二本鎖配列を形成する（例えば、ワトソンクリック塩基ペアリングを介して、例えば、AはTまたはUと対合し、CはGと対合する）場合、所与の配列（例えば、結合ドメイン配列）は、参照配列（例えば、

50

内因性 *pre-mRNA* 結合部位)と「少なくともX%相補的」であるか、または「X%の相補性」を有する。例えば、150塩基の長さを有する結合ドメイン配列は、その150個の残基のうちの少なくとも135個が、15個以下のミスマッチヌクレオチドを残してワトソクリック塩基ペアリングを介して結合部位と水素結合によって対合する場合、150塩基の長さを有する結合部位に少なくとも90%相補的である。

【0073】

本明細書で使用される、結合ドメインとイントロンとの間の「結合」とは、トランススプライシング分子を標的（例えば、*pre-mRNA*）と会合させることによる、結合ドメインと標的イントロンとの間のトランススプライシングを媒介するのに十分な程度の水素結合（例えば、二重ヘリックス形成、またはワトソクリックペアリング）を指す。いくつかの実施形態では、結合ドメインと標的イントロンとの間の水素結合は、互いに相補的であり、かつ、互いにアンチセンス方向にある（例えば、互いにハイブリダイズする）ヌクレオチド塩基間にある。

10

【0074】

結合ドメインの配列は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%標的配列（例えば、*pre-mRNA*）の標的配列に相補的であり得る。いくつかの実施形態では、結合ドメインの配列は、*pre-mRNA* 転写物の標的配列に100%相補的であり得る。

【0075】

20

いくつかの実施形態では、結合ドメインの配列は、*pre-mRNA* 転写物の標的配列に対して4個以下のミスマッチを有し得る。いくつかの実施形態では、結合ドメインの配列は、*pre-mRNA* 転写物の標的配列に対して3個以下のミスマッチを有し得る。いくつかの実施形態では、結合ドメインの配列は、*pre-mRNA* 転写物の標的配列に対して2個以下のミスマッチを有し得る。いくつかの実施形態では、結合ドメインの配列は、*pre-mRNA* 転写物の標的配列に対して1個以下のミスマッチを有し得る。いくつかの実施形態では、結合ドメインの配列は、*pre-mRNA* 転写物の標的配列に対してミスマッチを有し得ない。

【0076】

結合ドメインは、*pre-mRNA* 転写物の標的配列に特異的にハイブリダイズし得る。例えば、結合ドメインは、*pre-mRNA* 転写物の標的配列に対して、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%の配列相補性を有し得る。いくつかの実施形態では、ハイブリダイゼーションは、生理学的ハイブリダイゼーション条件下で（インビトロまたはインビボの細胞において）あり得る。いくつかの実施形態では、ハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下であり得る。

30

【0077】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、*pre-mRNA*の標的配列に「特異的にハイブリダイズする」か、またはそのために「特異的」である。このようなハイブリダイゼーションは、典型的には、37℃よりも実質的に高いT_m、より具体的には、少なくとも50℃、より具体的には、60℃～約90℃で生じる。このようなハイブリダイゼーションは、より具体的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に対応する。所与のイオン強度及びpHにて、T_mは、完全に一致するプローブに対して、標的配列の50%が相補的オリゴヌクレオチドハイブリダイズする温度である。

40

【0078】

本明細書で使用される場合、「人工イントロン」は、結合ドメインをCDSに対して（直接的または間接的に）連結する非コード核酸配列を指す。人工イントロンは、スプライシングドメインを含み、1つ以上のスペーサー配列及び／または他の調節エレメントをさらに含み得る。

【0079】

50

本明細書で使用される場合、「変異」という用語は、欠陥タンパク質産物（例えば、非機能タンパク質産物、非生物学的に活性なタンパク質、機能が低下したタンパク質産物、異常な機能を有するタンパク質産物、及び／または正常未満もしくは正常より多い量で産生されるタンパク質産物）の原因となるいずれかの異常な核酸配列を指すために使用される。変異には、塩基対変異（例えば、単一ヌクレオチド多形）、ミスセンス変異、フレームシフト変異、欠失、挿入、及びスプライス変異が含まれる。いくつかの実施形態では、変異は、その配列の1つ以上の部分において、対応する野生型核酸配列またはその機能的バリエーションと異なる核酸配列を指す。いくつかの実施形態では、変異は、対応する野生型タンパク質またはその機能的バリエーションとは異なるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列を指す。「変異エクソン」（例えば、変異ABC A 4エクソン）とは、変異を含有するエクソン、または異なる領域における変異を反映するエクソン配列、例えば、イントロンの変異に起因する潜在性エクソンを指す。

10

【0080】

「ABC A 4」（ATP結合カセットサブファミリーAメンバー4）という用語は、別途記載のない限り、霊長類（例えば、ヒト、アフリカミドリザル、及びカニクイザル）、及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む任意の脊椎動物源、ならびに機能的に等価なまたは改善されたバリエーション（例えば、天然または合成バリエーション）、突然変異体、突然変異タンパク質、類似体、サブユニット、受容体複合体、アイソタイプ、スプライスバリエーション、及びそれらの断片を含む、任意の脊椎動物源に由来する任意の天然ABC A 4（別名、ARMD2、CORD3、ABCR、FFM、網膜特異的リン脂質輸送ATPアーゼABC A 4、スターガルト病タンパク質、RIMABCトランスポーター、RIMABCトランスポーター、RIMタンパク質、STGD1、RP19、またはSTGD）を指す。機能的に等価であり改善されたバリエーションは、既知のABC A 4シグナル伝達に基づいて決定することができる。ABC A 4は、完全長、未処理のABC A 4、ならびに細胞内の天然処理から生じるABC A 4の任意の形態を包含する。例示的なヒトABC A 4配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) 参照配列：NG_009073.1として提供される。いくつかの場合では、ABC A 4は、配列番号11に対して少なくとも95%の配列同一性（例えば、配列番号11に対して少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性）を有する治療的遺伝子、その機能的部分、及び／またはそのコドン最適化バリエーションによってコードされる。

20

30

【0081】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」は、天然に存在するポリペプチド配列、または例えば、本明細書に記載のrAAV配列のいずれかなどの参照ポリペプチド配列とは少なくとも1つのアミノ酸残基が異なる、参照ポリヌクレオチド配列とは少なくとも1つの核酸残基が異なるポリヌクレオチド、例えば、天然に存在するポリヌクレオチド配列、またはポリペプチド（例えば、AAVカプシド配列）を指す。この文脈において、少なくとも1つの残基における差異は、例えば、核酸残基の別の核酸への置換、欠失、もしくは挿入、またはアミノ酸残基の別のアミノ酸への置換を含み得る。バリエーションは、本明細書で定義されるポリヌクレオチドのホモログ、アイソフォーム、または転写物バリエーションであり得、ホモログ、アイソフォーム、または転写物バリエーションは、それぞれ、本明細書で定義される同一性または相同性の程度によって特徴付けられる。

40

【0082】

いくつかの場合では、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドのバリエーションは、少なくとも1つの核酸置換（例えば、1～100個の核酸もしくはアミノ酸の置換、1～50個の核酸もしくはアミノ酸の置換、1～20個の核酸もしくはアミノ酸の置換、1～10個の核酸もしくはアミノ酸置換、例えば、1個の核酸もしくはアミノ酸の置換、2個の核酸もしくはアミノ酸の置換、3個の核酸もしくはアミノ酸の置換、4個の核酸もしくはアミノ酸の置換、5個の核酸もしくはアミノ酸置換、6個の核酸もしくはアミノ酸置換、7個の核酸もしくはアミノ酸置換、8個の核酸もしくはアミノ酸置換、9個の核酸もしくはアミ

50

ノ酸置換、または10個の核酸もしくはアミノ酸置換)を含む。同じクラス由来の交換されたアミノ酸を有する発現ポリペプチドをもたらす核酸置換は、本明細書では保存的置換と称される。特に、これらは、脂肪族側鎖、正または負に帯電した側鎖、側鎖またはアミノ酸に芳香族基を有するアミノ酸であり、その側鎖は、水素架橋を形成することがでる、例えば、ヒドロキシル官能を有する側鎖である。保存的構成により、例えば、極性側鎖を有するアミノ酸は、対応する極性側鎖を有する別のアミノ酸で置換することができる、または、例えば、疎水性側鎖を特徴とするアミノ酸は、対応する疎水性側鎖を有する別のアミノ酸で置換することができる(例えば、セリン(スレオニン)はスレオニン(セリン)により、またはロイシン(イソロイシン)はイソロイシン(ロイシン)による)。

【0083】

場合によっては、挿入、欠失、及び／または非保存的置換も、例えば、タンパク質の三次元構造の実質的な改変を引き起こさない位置における、バリエーションという用語によって包含される。挿入(複数可)または欠失(複数可)による三次元構造の改変は、当業者によって、例えば、CDスペクトル(円二色性スペクトル)を使用して、容易に特定され得る。

【0084】

「相同」という用語は、2つの核酸配列の配列間の同一性の程度を指す。配列の相同性は、比較する配列長さにわたって標準条件下でアラインした2つの配列を比較することによって決定される。本明細書で比較される配列は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて付加または欠失(例えば、ギャップなど)を有し得る。いくつかの実施形態では、配列相同性は、例えば、ClustalWアルゴリズム(Nucleic Acid Res., 1994, 22(22): 4673-4680)を使用してアラインメントを作成することによって計算される。VectorNTI、GENETYX、BLASTなどの一般的に利用可能な配列解析ソフトウェア、または公開データベースによって提供される解析ツールも使用され得る。

【0085】

本明細書で使用される「AAV」または「AAV血清型」という用語は、数十の天然に存在する及び利用可能なアデノ随伴ウイルス、ならびに人工AAVを指す。ヒトまたは非ヒト霊長類(NHP)から単離または操作され、特徴がよく解明されているAAVの中で、ヒトAAV2は、遺伝子導入ベクターとして開発された最初のAAVであり、それは、異なる標的組織及び動物モデルにおける効率的な遺伝子導入実験に広く使用されている。

【0086】

本明細書で使用される場合、AAVに関連して、バリエーションという用語は、アミノ酸配列または核酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%またはそれ以上の配列同一性を共有するものを含む、既知のAAV配列に由来する任意のAAV配列を意味する。別の実施形態では、AAVカプシドは、任意の記載されたまたは既知のAAVカプシド配列からの最大約10%の変動を含み得るバリエーションを含む。すなわち、AAVカプシドは、本明細書で提供される及び／または当技術分野で周知のAAVカプシドに対して、約90%～約99.9%の同一性、約95%～約99%の同一性、または約97%～約98%の同一性を共有する。一実施形態では、AAVカプシドは、AAVカプシドと少なくとも95%の同一性を共有する。AAVカプシドの同一性パーセントを決定する場合、比較は、可変タンパク質(例えば、vp1、vp2、またはvp3)のいずれにおいて行われ得る。

【0087】

ITRまたは他のAAV構成要素は、当業者が利用可能な技術を使用して、AAVから容易に単離または操作することができる。このようなAAVは、学術的、商業的、または公共的供給源(例えば、American Type Culture Collection, Manassas, Va.)から単離、操作、または取得され得る。代替的に、AAV配列は、文献で、または例えば、GenBank、PubMed等などのデータベ

10

20

30

40

50

ースで入手可能な公開配列を参照することにより、合成または他の適切な手段を介して操作され得る。A A V ウイルスは、従来の分子生物学技術によって操作され得、これらの粒子を、核酸配列の細胞特異的送達、免疫原性の最小化、安定性及び粒子寿命の調整、効率的な分解、核への正確な送達等のために最適化することを可能にし得る。

【0088】

本明細書で使用される場合、「対象」、「個体」、または「患者」という用語は、ヒトなどの霊長類を含む、これらの治療または予防方法を必要とする任意の哺乳動物を含む。そのような治療または予防を必要とする他の哺乳動物としては、非ヒト霊長類（NHP；例えばカニクイザル及びアフリカミドリザル）、イヌ、ネコ、もしくは他の飼育動物、ウマ、家畜、実験動物（例えば、マウス、ラットまたはウサギ）等が挙げられる。個体は男性または女性であり得る。一実施形態では、個体は、A B C A 4 遺伝子の変異に起因する疾患または障害（例えば、A B C A 4 関連網膜ジストロフィー）を有する。別の実施形態では、個体は、A B C A 4 遺伝子の変異に起因する疾患または障害を発症するリスクを有する。別の実施形態では、個体は、A B C A 4 関連網膜ジストロフィーなどの、A B C A 4 遺伝子の変異によって引き起こされる疾患または障害の臨床徴候を示している。個体は、治療または予防的療法が有益であり得る任意の年齢であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、個体は、0～5歳、5～10歳、10～20歳、20～30歳、30～50歳、50～70歳、または70歳以上である。別の実施形態では、個体は、12か月齢以上、18か月齢以上、2歳以上、3歳以上、4歳以上、5歳以上、6歳以上、7歳以上、8歳以上、9歳以上、または10歳以上である。別の実施形態では、個体は、生存可能な網膜細胞（例えば、部分的な視覚機能または完全な視覚機能を維持するのに十分な生存可能な網膜細胞）を有する。

10

20

【0089】

本明細書で使用される場合、「変異に関連する障害」または「障害に関連する変異」という用語は、障害と変異との相関関係を指す。いくつかの実施形態では、変異に関連する障害は、変異によって全体的もしくは部分的に、または直接的もしくは間接的に引き起こされることが知られている、または疑われる。例えば、変異を有する個体は、障害を発症するリスクがあり得、そのリスクは、他の要因、例えば、他の（例えば、独立した）変異（例えば、同じ遺伝子または異なる遺伝子における）、または環境要因にさらに依存し得る。

30

【0090】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語、またはその文法的派生は、疾患の進行を軽減すること、疾患症状の重症度を低下させること、疾患症状の進行を遅延させること、疾患症状を除去すること、または疾患発症を遅延させることとして定義される。いくつかの実施形態では、「治療」という用語は、本明細書に記載のRNAエクソンエディターなどの治療薬の持続的または耐久性のある効果を指すために使用される。本明細書に記載のRNAエクソンエディターの耐久性のある治療効果を示している証拠を、例えば、図22及び31に示す。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される治療の効果は、少なくとも1、2、3、4、5、6、またはそれ以上持続する。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、生涯に1回のみ投与される。

40

【0091】

本明細書で使用される場合、障害の「予防」という用語、またはその文法的派生は、疾患の発症のリスクを低減させることとして定義され、例えば、変異に関連する障害を発症するリスクのある個体のための予防的療法として定義される。個体は、当該技術分野で周知の、または本明細書に記載されている任意の好適な方法に従って、障害に関連する変異を同定することにより、障害を発症する「リスクがある」と特徴づけることができる。いくつかの実施形態では、障害を発症するリスクのある個体は、障害に関連する1つ以上のA B C A 4 変異を有する。追加的に、または代替的に、個体が障害の家族歴を有する場合、個体は、障害を発症する「リスクがある」として特徴付けられ得る。

【0092】

50

本明細書で使用される場合、「A B C A 4 関連網膜症」という用語は、A B C A 4 の変異に関連する疾患／状態を含み、これには、例えば、スターガルト病－1（S T G D 1）、黄色斑眼底、網膜色素変性症－19（R P 19）、錐体桿体ジストロフィー－3（C O R D 3）、及び加齢性黄斑変性－2（A R M D 2）を含む。

【0093】

個体における障害の治療または予防は、トランススプライシング分子またはRNAエクソンエディター（例えば、ベクター、例えば、AAVベクターまたはAAV粒子内）を、個体に直接投与することによって行うことができる。代替的に、トランススプライシング分子を含む宿主細胞を個体に投与し得る。

【0094】

本明細書に記載の方法で使用される場合、「投与する」という用語またはその文法的派生は、トランススプライシング分子もしくはRNAエクソンエディター（例えば、ベクター、例えばAAVベクターもしくはAAV粒子内）または組成物、またはエキスピボで治療した細胞を、それを必要とする個体、例えば、A B C A 4 の変異または欠損を有する個体に投与することを意味する。例えば、眼細胞（例えば、光受容体）が標的化される一実施形態では、方法は、トランススプライシング分子もしくはRNAエクソンエディター（例えば、ベクター、例えば、AAVベクターもしくはAAV粒子内）、またはその組成物を網膜下注射によって個体に投与することを伴う。別の実施形態では、硝子体内注射または眼瞼静脈を介した注射が投与として実行され得る。別の実施形態では、組成物は、全身的に（例えば、静脈内に）投与される。さらに他の投与方法が、本開示に照らして当業者によって選択され得る。

【0095】

本明細書で使用される場合、「A B C A 4 の発現を調節する」とは、内因性変異（非機能的）A B C A 4 の発現を減少させること、及び／またはトランススプライシングA B C A 4 の発現を増加させることを指す。A B C A 4 の発現を調節することは、例えば、内因性（例えば、変異）A B C A 4 の発現を減少させること、及び／またはトランススプライシングA B C A 4（例えば、その内在性変異転写物またはタンパク質産物に対してトランススプライシング分子媒介補正変異部位を有するA B C A 4 転写物またはタンパク質産物）の発現を増加させることを指すように使用され得る。変異部位を含む内因性A B C A 4 エクソンをトランススプライシングを介して置換すると、機能的A B C A 4 タンパク質が発現する。

【0096】

本明細書で使用される場合、「コドン最適化」は、コードされるアミノ酸にいかなる変化ももたらずに個々の核酸を変更するように核酸配列を改変することを指す。このように改変された配列は、本明細書では「コドン最適化」と称される。このプロセスは、発現または安定性を増強するために、本明細書に記載された配列のいずれに対しても行われ得る。コドン最適化は、例えば、米国特許第7,561,972号、同第7,561,973号、及び同第7,888,112号に記載されているような方法で行うことができ、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。翻訳開始部位を取り巻く配列は、既知の方法に従ってコンセンサスコザック配列に変換され得る。例えば、K o z a k e t a l, 1987. N u c l e i c A c i d s R e s. 15 (20) : 8125-8148を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0097】

「薬学的に許容される」という用語は、ヒトなどの哺乳動物への投与にとって安全であることを意味する。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される組成物は、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されているか、または米国薬局方もしくは動物、より具体的にはヒトにおいて使用するための他の一般的に認識されている薬局方に記載されている。

【0098】

「担体」という用語は、治療用分子（例えば、トランススプライシング分子、または本

10

20

30

40

50

発明のベクターもしくは細胞を含むトランススプライシング分子)と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。好適な医薬担体の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences,」Mack Publishing Co., Easton, P.A., 18th edition.に記載されている。

【0099】

用語「a」及び「an」は、「1つ以上」を意味する。例えば、「遺伝子」は、1つ以上のかかる遺伝子を表すと理解される。したがって、「a」及び「an」、「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。

【0100】

別段指定されない限り、一本鎖核酸（例えば、pre-mRNA転写物、オリゴヌクレオチド等）配列の左手端は5'端であり、一本鎖または二本鎖核酸配列の左手方向は、5'方向と称される。同様に、核酸配列（一本鎖または二本鎖）の右手端または方向は、3'端または方向である。一般に、核酸中の参照点に対して5'の領域または配列は「上流」と称され、核酸中の参照点に対して3'の領域または配列は「下流」と称される。一般に、5'方向またはmRNAの末端は、開始（initiation）または開始（start）コドンが位置する場所であり、3'末端または方向は、終止コドンが位置する場所である。

【0101】

本明細書で使用する場合、「約」という用語は、特に明記しない限り、基準値から±10%以内の変動内の値を指す。

【0102】

II. トランススプライシング分子

エクソンエディターの設計及び発見では、RNA置換効率を評価するためのNext Generation Sequencing (NGS) ベースのエクソンエディターライブラリのスクリーニングに続いてコンピュータ解析、ならびに個々のエクソンエディターのトランスフェクションに続くRT-qPCR解析の評価と、タンパク質救済を評価するためのプロット解析との組み合わせのアプローチを用いる。前者のアプローチは、多重並列化スループットの能力と共に、過去のスクリーニングから得られた合理的な設計及び蓄積された知識を利用し、後者のアプローチは、新たな仮説を試験することと、NGSベースの方法から得られた結論を検証することとの両方に使用される。

【0103】

本明細書で提供されるのは、少なくとも1つの変異ABCA4エクソンを機能的ABCA4エクソン（例えば、結合部位の5'側のABCA4エクソン、例えば、ABCA4のエクソン1～22）で置換することにより、ABCA4の変異を補正するのに有用な核酸トランススプライシング分子である。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、pre-RNAトランススプライシング分子（RTM）である。トランススプライシング分子の設計は、pre-mRNAエクソン（複数可）の欠損または変異部分を核酸配列、例えば、変異のない機能的（例えば、正常な）配列を有するエクソン（複数可）で置換することを可能にする。機能的配列は、野生型の天然に存在する配列でも、いくつかの他の改変、例えば、コドン最適化を伴う補正された配列でもよい。

【0104】

トランススプライシング分子は、結合ドメイン、スプライシングドメイン、及びCDSを含む。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、天然5'ABCA4非翻訳領域（例えば、配列番号12～15のいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有する配列）を有する5'調節ドメインを有する。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、GUAAGTまたはGTAAGTのスプライス部位を有する。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、25ヌクレオチド長よりも長いリンカードメインを有する。いくつかの実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、配列番号27、または配列番号27に対して少なくとも91%の同一

10

20

30

40

50

性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメインを有する。

【0105】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のトランススプライシング分子は、5' から 3' の方向に作動可能に連結された：5' 非翻訳領域、コードドメイン配列（例えば、CDS、例えば、ABCA4 エクソンの機能的配列をコードする配列、例えば、結合部位の 5' 側の ABCA4 エクソンの機能的配列）、スプライシングドメイン（例えば、スプライス部位）、リンカードメイン、結合ドメイン、3' 下流領域、及びターミネータードメインを含む。

10

【0106】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸トランススプライシング分子は、ABCA4 遺伝子の 5' 領域（例えば、イントロン 22 の 5' 側の領域）に位置する少なくとも 1 つの変異（例えば、2 つの異なる変異、各変異は対象における ABCA4 遺伝子の異なるアレル上に存在する）を、標的イントロン 22 に結合し、5' ABCA4 エクソンの機能的配列を有する CDS の、標的イントロン 3' 側の内因性 ABCA4 エクソンへのトランススプライシングを媒介することにより補正するように構成される。それにより、そのようなトランススプライシングは、欠陥エクソン（複数可）を置換し、標的 pre-mRNA の欠陥部分を除去することによって、個体の標的細胞内の欠陥 ABCA4 遺伝子を修復し、細胞内に機能的 ABCA4 タンパク質を転写することができる機能的 ABCA4 mRNA をもたらす。

20

【0107】

いくつかの実施形態では、トランススプライシング分子は、最大 5,000 ヌクレオチド塩基長、例えば、最大 4,900 ヌクレオチド塩基長、最大 4,800 ヌクレオチド塩基長、または最大 4,700 ヌクレオチド塩基長（例えば、3,000 ~ 4,000 ヌクレオチド塩基長、3,100 ~ 3,800 ヌクレオチド塩基長、3,200 ~ 3,700 ヌクレオチド塩基長、または 3,300 ~ 3,500 ヌクレオチド塩基長、例えば、3,000 ~ 3,100 ヌクレオチド塩基長、3,100 ~ 3,200 ヌクレオチド塩基長、3,200 ~ 3,300 ヌクレオチド塩基長、3,300 ~ 3,400 ヌクレオチド塩基長、3,400 ~ 3,500 ヌクレオチド塩基長、3,500 ~ 3,600 ヌクレオチド塩基長、3,600 ~ 3,700 ヌクレオチド塩基長、3,700 ~ 3,800 ヌクレオチド塩基長、3,800 ~ 3,900 ヌクレオチド塩基長、3,900 ~ 4,000 ヌクレオチド塩基長、4,000 ~ 4,100 ヌクレオチド塩基長、4,100 ~ 4,200 ヌクレオチド塩基長、4,200 ~ 4,300 ヌクレオチド塩基長、4,300 ~ 4,400 ヌクレオチド塩基長、4,400 ~ 4,500 ヌクレオチド塩基長、4,500 ~ 4,600 ヌクレオチド塩基長、4,600 ~ 4,700 ヌクレオチド塩基長、4,700 ~ 4,800 ヌクレオチド塩基長、4,800 ~ 4,900 ヌクレオチド塩基長、または 4,900 ~ 5,000 ヌクレオチド塩基長）である。

30

【0108】

ABCA4 遺伝子の大きなサイズ及び AAV 送達 of のサイズ制約のため、AAV ベクター内にパッケージングするように構成された単一のトランススプライシング分子（例えば、トランススプライシング分子コード配列として）は、障害と関連し得る ABCA4 遺伝子内でのすべての変異に及ぶことはなく、したがって、ABCA4 遺伝子全体の長さに沿った変異が補正されない可能性がある。したがって、本明細書に記載のトランススプライシング分子は、ABCA4 遺伝子の全長に及ぶ複数の変異を補正するために、以下に記載の方法の一部として適合させることができる。

40

【0109】

ABCA4

本明細書に記載のトランススプライシング分子によって標的化される ABCA4 遺伝子

50

は、A B C A 4 関連網膜ジストロフィーに関連する、スターガルト病または錐体桿体ジストロフィーなどの疾患（例えば、の原因となる、またはそれと関連する）1つ以上の変異を含み得る。例示的なヒトA B C A 4 配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の参照配列：NG_009073として提供される。公開された配列に加えて、後に得られたすべての補正、またはヒトもしくは他の哺乳動物集団で生じる自然発生的な保存的及び非疾患原因バリエーション配列も含まれる。追加の保存的ヌクレオチド置換またはコドン最適化を引き起こすものも含まれる。データベースアクセス番号によって提供される配列は、同じまたは別の哺乳類生物における相同配列を検索するために使用され得る。

【0110】

A B C A 4 核酸配列及び結果として発現されるタンパク質は、例えば、サイレントであるヌクレオチド塩基に対する改変、例えば、優先コドンを含む、核酸レベルにおける特定のわずかな改変を許容し得ることが予想される。他の実施形態では、例えば、結果として得られるペプチド／タンパク質の発現を改善するためにアミノ酸を変更する核酸塩基改変（例えば、コドン最適化）が想定される。いくつかの実施形態では、遺伝コードの自然の縮重によって引き起こされる対立遺伝子変異の改変が想定される。

【0111】

また、A B C A 4 遺伝子の改変として、コードされたアミノ酸配列の類似体、または改変型も含まれる。通常、かかる類似体は、1～4つのコドンの変化だけが、具体的に同定されたタンパク質とは異なる。保存的置換は、それらの側鎖及び化学的性質において関連するアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。

【0112】

機能的A B C A 4 遺伝子の核酸配列は、機能的A B C A 4 またはそのホモログを天然で発現する任意の哺乳動物に由来し得る。他の実施形態では、標的細胞における発現を増強するために、A B C A 4 遺伝子配列に特定の改変を行う。このような改変には、コドン最適化が含まれる。

【0113】

特定のA B C A 4 エクソンにおける変異は、例えば、国際特許公開第WO 2017 / 087900号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

【0114】

本明細書で上記したように、A B C A 4 網膜症は、常染色体劣性様態で遺伝するA B C A 4 遺伝子の病原性バリエーションによって引き起こされる。かかる病原性バリエーション（変異）には、ミスセンス、ナンセンス、スプライシング、構造、及び深層イントロン性バリエーションが含まれる。ミスセンスバリエーションは、A B C A 4 網膜症に関連するバリエーションのほとんどを占める。A B C A 4 網膜症を有する個体では、個体は、各アレルでA B C A 4 に変異を有する。トランススプライシング分子を含む組成物は、A B C A 4 遺伝子内の変異の位置に関係なく、両方のアレルでの変異を補正することができる。例えば、第1のアレル上に変異A B C A 4 エクソン2、及び第2のアレル上に変異A B C A 4 エクソン9を有する個体については、エクソン1～22をコードする単一の5'トランススプライシング分子（5'RNA編集分子）を使用して、変異A B C A 4 エクソン2及び変異A B C A 4 エクソン9が置き換えられ得る。例えば、図14Aを参照されたい。したがって、いくつかの実施形態では、2つ以上の変異が、2つ以上の変異にまたがる同じトランススプライシング分子によって置換することができるA B C A 4 遺伝子の部分に位置している場合、機能的A B C A 4 エクソン（複数可）を含むコード領域を有する単一のトランススプライシング分子は、変異を含む1つ以上のエクソンを置換することができる。

【0115】

代替的に、いくつかの実施形態では、個体は、A B C A 4 遺伝子内の離れたエクソンでの変異を伴うA B C A 4 変異を有する。例えば、個体が、第1のアレル上で変異A B C A 4 エクソン2、及び第2のアレル上で変異A B C A 4 エクソン49を有する場合、2つのRNA編集分子を組み合わせて（例えば、組成物において）使用して、変異エクソンの各

10

20

30

40

50

々を置換し得る。このようなアプローチは、変異 A B C A 4 エクソン 2 を置換するための 5' トランススプライシング分子、及び変異 A B C A 4 エクソン 4 9 を置換するための 3' トランススプライシング分子の使用を伴うであろう。かかる実施形態では、2つのトランススプライシング分子は、同じ A A V ベクターの一部として同時送達されるか、または別々の A A V ベクターで送達され得る（例えば、両方のトランススプライシング分子が A A V のパッケージング限界を超える場合）。

【0116】

コーディングドメイン配列

いくつかの実施形態では、5' トランススプライシング分子の C D S は、標的 A B C A 4 イントロン（例えば、A B C A 4 イントロン 2 2）の 5' 側にある全ての A B C A 4 エクソン（例えば、機能的 A B C A 4 エクソン）を含む。例えば、5' トランススプライシング分子が A B C A 4 イントロン 2 2 を標的とする実施形態では、C D S は、機能的 A B C A 4 エクソン 1 ~ 2 2 を含み得る。そのような実施形態では、C D S は、長さが 2, 0 0 0 ~ 4, 5 0 0 b p であり得る。場合によっては、両方の対立遺伝子変異が標的遺伝子の 5' 部分で生じ、両方の変異を補正するために 5' トランススプライシング分子が選択される。一実施形態では、結合ドメインは、イントロン 2 2 に結合し、C D S は、機能的 A B C A 4 エクソン 1 ~ 2 2 を含む。

【0117】

いくつかの実施形態では、（例えば、R T M をコードする導入遺伝子の）C D S は、変異 A B C A 4 エクソン（複数可）の置換のための A B C A 4 エクソン（例えば、機能的 A B C A 4 エクソン）の c D N A を含む。例えば、C D S 内の 1 つ以上の機能的 A B C A 4 エクソンは、c D N A 配列であり得る。いくつかの実施形態では、C D S 全体が c D N A 配列である。さらに、または代替的に、C D S の全てもしくは一部、またはその 1 つ以上の機能的 A B C A 4 エクソンは、天然に存在する配列であり得る（例えば、内因性 A B C A 4 エクソンと 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する）。

【0118】

いくつかの実施形態では、C D S の全てまたは一部、またはその 1 つ以上の機能的 A B C A 4 エクソンは、コードされたアミノ酸に変化をもたらすことなく、例えば、発現または安定性を増強するために核酸配列が改変された、コドン最適化配列である。コドン最適化は、例えば、米国特許第 7, 5 6 1, 9 7 2 号、同第 7, 5 6 1, 9 7 3 号、及び同第 7, 8 8 8, 1 1 2 号に記載されているような方法で行うことができ、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されるように、組み合わせ A A V を介した送達のために、一実施形態では、C D S は、最大 4, 0 0 0 ヌクレオチド塩基長（例えば、3, 0 0 0 ~ 4, 0 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 1 0 0 ~ 3, 8 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 2 0 0 ~ 3, 7 0 0 ヌクレオチド塩基長、または 3, 3 0 0 ~ 3, 5 0 0 ヌクレオチド塩基長、例えば、3, 0 0 0 ~ 3, 1 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 1 0 0 ~ 3, 2 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 2 0 0 ~ 3, 3 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 3 0 0 ~ 3, 4 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 4 0 0 ~ 3, 5 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 5 0 0 ~ 3, 6 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 6 0 0 ~ 3, 7 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 7 0 0 ~ 3, 8 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 8 0 0 ~ 3, 9 0 0 ヌクレオチド塩基長、3, 9 0 0 ~ 4, 0 0 0 ヌクレオチド塩基長、例えば、約 3, 1 0 8 ヌクレオチド塩基長、約 3, 2 8 5 ヌクレオチド塩基長、約 3, 3 7 5 ヌクレオチド塩基長、約 3, 5 0 3 ヌクレオチド塩基長、約 3, 6 3 0 ヌクレオチド塩基長、約 3, 5 4 0 ヌクレオチド塩基長、約 3, 3 6 3 ヌクレオチド塩基長、約 3, 2 7 3 ヌクレオチド塩基長、約 3, 1 4 5 ヌクレオチド塩基長、または約 3, 0 1 8 ヌクレオチド塩基長）の核酸配列であり得る。

【0119】

いくつかの実施形態では、C D S の全てまたは一部、またはその 1 つ以上の機能的 A B C A 4 エクソンは、そこで同定される潜在性スプライス部位を変異するように改変される

。本発明者らは、結果の大規模な実験的及び計算的解析を通じて、潜在性スプライス部位が、本明細書に記載のA B C A 4エクソンエディターのいくつかの実施形態の文脈において利用されることを発見した。要約すると、本発明者らは、オフターゲット（O F T）ライブラリの生成及びそのバイオフィォマティクス解析を含む、大規模な実験及び解析を実施し、驚くべきことに、エクソン1～22を含むA B C A 4コード配列（C D S）内に、本明細書に記載のトランススプライシング分子の文脈において潜在性スプライシングが発生する多数の位置を発見した。この発見により、R N Aエクソンエディター（本明細書ではR N Aトランススプライシング分子または核酸トランススプライシング分子とも称される）が、潜在性スプライス部位でスプライシングを受け、これにより潜在的な下流効果を有する望まれていない種のスプライシングバリエーションをもたらされ得るという、これまで理解されていなかった問題が明らかになった。本明細書に記載のトランススプライシング分子のトランススプライシング効率及び忠実度を改善し、それによって潜在性スプライス部位の利用の問題に対する解決策を提供するために、複数の潜在性スプライス部位の配列を改変して、同義変異の導入により潜在性スプライス部位が障害され及び／または無効になるようにした。いくつかの実施形態では、改変された潜在性スプライス部位は、O F Tライブラリのバイオフィォマティクス解析によって検出された潜在性スプライス部位が利用された回数に基づいて同定された。いくつかの実施形態では、複数の潜在性スプライス部位事象のために潜在性スプライス部位を改変した。そのようなアプローチは、遺伝コードの縮重を利用し、これにより、コードされるアミノ酸に変化をもたらすことなく、潜在性スプライス部位の使用を軽減するために所望の改変を導入することが可能になる。例えば、表6及び図26を参照されたい。

10

20

【0120】

次世代シーケンシング（N G S）アプローチを使用して、本発明者らは、潜在性スプライス部位を同定し、かつエクソン1～22を含むA B C A 4 C D S内の異なる位置の各々における潜在性スプライスの使用頻度を定量化することができ、それによってデータ駆動型の、そこでの使用される潜在性スプライスを軽減することを優先したプロトコルを確立した。表3及び図26を参照されたい。表3に示すように、同定された潜在性スプライス部位は、潜在性スプライス部位を破壊する同義変異を含まない配列にマッピング／組み込まれた百万あたりの平均カウント（C P M）リードによって決定される使用頻度の順に配置されている。したがって、結果及びそのバイオフィォマティクス解析により、トランススプライシング分子の文脈における改善された特性及び機能性を有するA B C A 4 C D Sを生成するために改変され得るA B C A 4エクソン1～22における潜在性スプライス部位の優先リストが確立される。

30

【0121】

本明細書に提示された結果に従って、本発明者らは、潜在性スプライス部位の軽減のための解析及び設計が、同義変異の導入を介して可能であれば有利に実施され得る使用頻度の閾値を確立した。表6を参照されたい。いくつかの実施形態では、表3に示された結果に基づく閾値は、10 C P M以上である。

【0122】

同義変異の導入後の潜在性スプライスの使用頻度を評価するために、N G Sアプローチも実施した。表3及び図26を参照されたい。かかるアプローチによる潜在性スプライス部位の軽減の確認は、配列修飾（同義変異）の構造変化を、それによってもたらされる機能、すなわち、潜在性スプライス部位耐性A B C A 4 C D Sの生成と関連付けた。

40

【0123】

いくつかの実施形態では、R N Aエクソンエディター分子、例えば、A B C A 4エクソンエディターは、エクソンエディター分子内のオフターゲットスプライシングに関連する1つ以上の部位において潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有する。変化したヌクレオチド位置のいずれかまたは全てが、表3に同定された位置にあり得る。いくつかの実施形態では、A B C A 4エクソンエディターは、以下の位置（例えば、配列番号56に従った番号付け）のうちの1つ以上においてヌクレオチド変化を有し、以下に示

50

されるヌクレオチド位置は、ATGコドン（翻訳開始部位）のGに対して軽減された潜在性スプライス部位ヌクレオチド配列の5'末端及び3'末端、またはそれらの任意の組み合わせを指す。以下に列挙された配列において行われたヌクレオチド変化には下線が引かれている。表3も参照されたい：

【化1-1】

ヌクレオチド3066～3086位に及ぶ配列：

ACATGCTGTTCTATGCCCAG（配列番号91）

ACATGCTGTTCTATGCACAA（配列番号92）

ヌクレオチド2911～2931位に及ぶ配列：

CACCTTGTTCCATCCTCACAG（配列番号93）

CACCTTGTTCCATCCTCACTIG（配列番号94）

ヌクレオチド2556～2576位に及ぶ配列：

TCGCTTGGTACCTTGATCAG（配列番号95）

TCGCTTGGTACCTTGATCAA（配列番号96）

ヌクレオチド3009～3029位に及ぶ配列（スプライス部位補正）：

GCCTTGGCATGTGTCCACAG（配列番号97）

CCCTTGGCATGTGTCCACAA（配列番号98）

ヌクレオチド107～127位に及ぶ配列：

CTGGTCTTGATCTGGTTAAG（配列番号99）

CTGGTCTTGATCTGGTTACG（配列番号100）

ヌクレオチド2328～2348位に及ぶ配列：

TCCTGTGCTTCGCCTGGCAG（配列番号101）

TCCTGTGCTTCGCCTGGCAA（配列番号102）

ヌクレオチド1815～1835位に及ぶ配列：

GCGGGTTTGCCTATCTGCAG（配列番号103）

GCGGGTTTGCATATCTGCAA（配列番号104）

ヌクレオチド1198～1218位に及ぶ配列：

CACTCCTGATTACCTGCAG（配列番号105）

CACTCCTGATTACCTGCIG（配列番号106）

10

20

30

40

50

【化 1 - 2】

ヌクレオチド 3063～3083 位に及ぶ配列 [以下に示されているヌクレオチドの変化は、3086 位 (3083 位の近位) の文脈において行われた変化の結果であり、3083 位についてのスプライス部位、ポリピリミジントラクト、及び/または分岐点を補正しなかった配列] :

AGCACATGCTGTTCTATGCC (配列番号 107)

AGCACATGCTGTTCTATGCA (配列番号 108)

ヌクレオチド 2090～2110 位に及ぶ配列 :

TGTACCTGGTTCCTGGACAG (配列番号 109)

TGTACCTGGTTCCTGGACTC (配列番号 110)

以下に列挙されている最後のヌクレオチドは、2608～2628 位 (分岐点補正) に相当する :

TTGGTACTTTCTTCTACAAG (配列番号 111)

TTGGTACTTTCTTCTGCAAG (配列番号 112)

ヌクレオチド 3083～3103 位に及ぶ配列 [以下に示されているヌクレオチドの変化は、3086 位 (3103 位の近位) の文脈において行われた変化の結果であり、3103 位についてのスプライス部位、ポリピリミジントラクト、及び/または分岐点を補正しなかった配列] :

CAGCTGAAAGGAAAGTCCCA (配列番号 113)

CAACTGAAAGGAAAGTCCCA (配列番号 114)

ヌクレオチド 3073～0 位に及ぶ配列 [以下に示されているヌクレオチドの変化は、3086 位 (3093 位の近位) の文脈において行われた変化の結果であり、3093 位についてのスプライス部位、ポリピリミジントラクト、及び/または分岐点を補正しなかった配列] :

GTTCTATGCCCAGCTGAAAG (配列番号 115)

GTTCTATGCACAACTGAAAG (配列番号 116)

ヌクレオチド 681～701 位に及ぶ配列 (スプライス部位補正) :

CCCTGTGCTCCCTCTCCCAG (配列番号 117)

CCCTGTGCTCCCTCTCCCAA (配列番号 118)

ヌクレオチド 508～528 位に及ぶ配列 :

CATCGGCCTGTCTGACTCAG (配列番号 119)

CATCGGCCTGTCTGACTCTG (配列番号 120)

10

20

30

40

50

【化 1 - 3】

ヌクレオチド位置 1431～1451 に及ぶ配列（分岐点補正）：

TCCTAAACTTCCTCTACAAG（配列番号 121）

TCCTGAACTTCCTCTACAAG（配列番号 122）

ヌクレオチド 1995～2015 位に及ぶ配列（スプライス部位補正）：

CTGTCTCCATGACTGTGAAG（配列番号 123）

CTGTCTCCATGACTGTAAAA（配列番号 124）

ヌクレオチド位置 3159～3179 に及ぶ配列（非同義変異で補正され得る）：

AGCGGAATGAAGAGGCTCAG（配列番号 125）

AGCGGAATGAAGAGGCTCAG（配列番号 125）

ヌクレオチド 2234～2254 位に及ぶ配列（スプライス部位補正）：

ATGCTGTGCTTTCTGCTCAG（配列番号 126）

ATGCTGTGCTTTCTGCTCTC（配列番号 127）

ヌクレオチド位置 1104～1124 に及ぶ配列（スプライス部位、分岐点補正）：

TTTGTAATGCATTGATCCCAG（配列番号 128）

TTTGTAATGCCTTGATACAA（配列番号 129）

ヌクレオチド 1887～1907 位に及ぶ配列（スプライス部位補正）：

TTGGAATCTACCTCCAGCCAG（配列番号 130）

TTGGAATCTACCTCCAACAA（配列番号 131）

10

20

【0124】

しかしながら、当業者であれば、同定された潜在性スプライス部位を破壊するために他のヌクレオチド変化を行ってもよいことを理解するであろう、また、本明細書に示される結果に基づいて、そのような変化を想定し、設計することができるであろう。いくつかの実施形態では、ABCA4 エクソンエディターは、上記の位置にヌクレオチド変化のうちの 1 つ以上を有する。表 3 も参照されたい。いくつかの実施形態では、ABCA4 エクソンエディターは、配列番号 56～59 に示される配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは 99.9 % の配列同一性を有するか、または 100 % の配列同一性を有する CDS 配列を有する。いくつかの実施形態では、ABCA4 エクソンエディターは、上記の位置（例えば、配列番号 56 による番号付け）のうちの 1 つ以上に潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有し、配列番号 56～58 に示される配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは 99.9 % の配列同一性を有するか、または 100 % の配列同一性を有する CDS を有する。いくつかの実施形態では、ABCA4 エクソンエディターは、上記の位置（例えば、配列番号 56 による番号付け）のうちの 1 つ以上に潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有し、配列番号 56 に示される配列に対して少なくとも 80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは 99.9 % の配列同一性を有するか、または 100 % の配列同一性を有する CDS を有する。いくつかの実施形態では、ABCA4 エクソンエディターは、表 3 に示される 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、または 45 個の位置のうちの少なくとも 1 つに潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有する。

30

40

【0125】

いくつかの実施形態では、ABCA4 エクソンエディターは、少なくとも百万あたり 10 カウント（本明細書では CPM と称される）のスプライス部位の使用頻度を有する表 3 に示される 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、1

50

5、16、17、18、19、または20個の位置のうちの少なくとも1つに潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有するが、ただし、スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く。いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディター分子は、以下の実施例7に記載されるアッセイにより測定される、少なくとも百万あたり10 cpm [スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く]の使用頻度を有する、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個、または全ての潜在性スプライス部位に潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有する。

【0126】

10

いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディターは、少なくとも百万あたり5カウント（本明細書ではCPMとも称される）のスプライス部位の使用頻度を有する表3に示される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の位置のうちの少なくとも1つに潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有するが、ただし、スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く。いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディター分子は、以下の実施例7に記載されるアッセイにより測定される、少なくとも百万あたり5 cpm [スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く]の使用頻度を有する、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個、または全ての潜在性スプライス部位に潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有する。

20

【0127】

いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディターは、少なくとも百万あたり3カウント（本明細書ではCPMとも称される）のスプライス部位の使用頻度を有する表3に示される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の位置のうちの少なくとも1つに潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有するが、ただし、スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く。いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディター分子は、以下の実施例7に記載されるアッセイにより測定される、少なくとも百万あたり3 cpm [スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く]の使用頻度を有する、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個、または全ての潜在性スプライス部位に潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有する。

30

【0128】

いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディターは、少なくとも百万あたり2カウント（本明細書ではCPMとも称される）のスプライス部位の使用頻度を有する表3に示される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の位置のうちの少なくとも1つに潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有するが、ただし、スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く。いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディター分子は、以下の実施例7に記載されるアッセイにより測定される、少なくとも百万あたり2 cpm [スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く]の使用頻度を有する、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個、または全ての潜在性スプライス部位に潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有する。

40

【0129】

いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディターは、少なくとも百万あたり1

50

カウント（本明細書ではCPMとも称される）のスプライス部位の使用頻度を有する表3に示される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の位置のうちの少なくとも1つに潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有するが、ただし、スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く。いくつかの実施形態では、ABCA4エクソンエディター分子は、以下の実施例7に記載されるアッセイにより測定される、少なくとも百万あたり1cpm [スプライス部位を含まない表3に列挙される位置（例えば、3083、3103、または3093位）は除く]の使用頻度を有する、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個、または全ての潜在性スプライス部位に潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有する。

10

【0130】

ABCA4エクソンエディターに加えて、本明細書に記載の実施形態は、潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化を有する他の遺伝子標的に特異的なエクソンエディターを含む。潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化には、スプライシング反応に使用される潜在性スプライス部位の能力を排除または低減する変化が含まれ得る。例えば、RNAエクソンエディターの文脈にて同定される潜在性スプライス部位は、通常、スプライス部位、ポリピリミジントラクト、及び分岐点を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のヌクレオチド変化は、RNAエクソンエディターの文脈において同定される潜在性スプライス部位の、スプライス部位、ポリピリミジントラクト、もしくは分岐点のうちの少なくとも1つ、またはそれらの任意の組み合わせに導入され得る。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド変化は、それによってコードされるタンパク質への潜在的な影響を最小にするように決定される。当業者は、潜在性スプライス部位の使用頻度を低減させるために行われたヌクレオチド変化が、トランススプライシングRNAによってコードされるアミノ酸も変化させる場合、保存的アミノ酸変化が非保存的アミノ酸変化よりも好ましいことを理解するであろう。さらに、そのような当業者は、機能的ドメイン及びその中の重要な配列に目を向けてタンパク質の配列及び構造を容易に解析して、かかる変化がトランススプライシングタンパク質によってコードされるタンパク質の機能を変化させることが合理的に予想され得るかどうかを評価することができる。当業者はまた、当該技術分野で知られているアッセイを使用して、そのようなアミノ酸変化を含むタンパク質を試験して、生物活性が変化するか否かを決定することができる。いくつかの実施形態では、同定された潜在性スプライス部位内で複数のヌクレオチドが変化する。いくつかの状況下では、変更されるべきヌクレオチドの数の決定は、インシリコ予測及び／または実験結果に基づいて経験的に行われる。いくつかの実施形態では、1つ以上（本明細書では少なくとも1つとも称される）の同義変異は、RNAエクソンエディターの文脈において同定される潜在性スプライス部位の、スプライス部位、ポリピリミジントラクト、もしくは分岐点のうちの少なくとも1つ、またはそれらの任意の組み合わせに導入され得る。同義変異は、トランススプライシングRNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させない。いくつかの実施形態では、1つ以上の同義変異は、RNAエクソンエディターの文脈において同定される潜在性スプライス部位の、スプライス部位、ポリピリミジントラクト、もしくは分岐点のうちの少なくとも1つ、またはそれらの任意の組み合わせに導入され得る。

20

30

40

【0131】

上記に加えて、本発明者らは、一般に以下のように、実験結果及び配列情報を解析した。実験的に同定された潜在性スプライス部位を除去するための変化は、スプライスドナー部位の特定のエレメントを探索し置換することによって行った。スプライスドナー部位の末端のAG部位（及びより強力にはCAG部位）が、ヌクレオチド変化の導入のために優先された。AG部位が存在しないか、または非同義変異を導入することなく変更することができない場合、スプライス部位の42～4塩基対上流の配列を分岐点（YNAHにマッチする配列）についてスキャンした。次いで、同定したかかる分岐点配列のいずれかを解

50

析し、実験的に同定した潜在性スプライス部位における潜在性スプライス部位の使用を低減させるために、ヌクレオチド変異（複数可）の導入について検討した。さらに、配列を、ポリピリミジントラクト（末端 A G のすぐ上流にある複数の Y）の存在についてもスキャンした。典型的には、かかるポリピリミジントラクトは、スプライス部位の上流の 10 塩基対以内に少なくとも 5 つのピリミジンを含む。同定されると、次いで、かかるポリピリミジントラクトを解析し、実験的に同定した潜在性スプライス部位における潜在性スプライス部位の使用を低減させるために、ヌクレオチド変異（複数可）の導入について検討した。

【0132】

いくつかの実施形態では、オフターゲットスプライシングを軽減するために変更される潜在性スプライス部位、またはオフターゲットスプライス部位は、オフターゲットスプライシングの部位として経験的に同定されている部位である。このような部位は、例えば、以下の実施例 6 及び 7 に記載の技法を使用して同定され得る。いくつかの実施形態では、所定の閾値を超える使用頻度を有する全ての潜在性スプライス部位は、潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化によって変化される。

【0133】

いくつかの実施形態では、オフターゲットスプライシングを軽減するために変更される潜在性スプライス部位、またはオフターゲットスプライス部位は、オフターゲットスプライシングの部位として予測されている部位である。このような予測は、正準スプライス部位、ポリピリミジントラクト、及び／またはそれらの中の推定上の潜在性スプライス部位の分岐点を同定するための配列解析に基づいて行うことができる。潜在性スプライス部位は、ヒトゲノム内の真正スプライス部位よりも 1 桁多く、真正スプライス部位と同じスプライシング認識配列を有し得るが、通常は、これまで十分に理解されていない分子メカニズムによって抑制される。潜在性 5' スプライス部位は、コンセンサス NNN / GUNNNN または NNN / GCNNNN を有することが多く、式中、N は、任意のヌクレオチドであり、「/」は、エクソン-イントロンの境界である。潜在性 3' スプライス部位は、コンセンサス NAG / N を有することが多い。潜在性スプライス部位の活性化は、潜在性スプライス部位を真正スプライス部位の典型的なコンセンサスのもの、すなわち、それぞれ MAG / GURAGU 及び YAG / G（式中、M は C または A であり、R は G または A であり、Y は C または U である）により類似させるように機能し得る周囲のヌクレオチドによって正の影響を受ける。

【0134】

いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化は、正準スプライス部位コンセンサス配列に一致するヌクレオチド配列を、正準配列にもはや一致しなくさせる。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化により、潜在的なスプライス部位ヌクレオチドが排除される。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化により、潜在的なポリピリミジントラクトヌクレオチドが排除される。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化により、潜在的な分岐点ヌクレオチドが排除される。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位を軽減するヌクレオチド変化は、同義ヌクレオチド変化である。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位を緩和するヌクレオチドの変化は、エクソンエディターによってコードされるアミノ酸の変化を引き起こす。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化は、保存的アミノ酸置換である。

【0135】

例えば、表 3 ならびに実施例 6 及び 7 に記載するように、本発明者らは、本明細書に記載の RNA エクソンエディターにおける潜在性スプライス部位の使用を実験的に観察した。局在化／同定された潜在性スプライス部位のさらなる解析により、実験的に同定された潜在性スプライス部位内の推定スプライス部位、ポリピリミジントラクト、及び分岐点が特定され、ひいては、潜在性スプライス部位の結合を軽減するためにどの配列を改変すべきかに関するガイダンスが提供された。これらの結果は、一般に RNA エクソンエディタ

ーに広く適用可能である。

【0136】

いくつかの実施形態では、RNA分子が本明細書に記載され、当該分子は、5'から3'の方向に、(a) cDNAコードドメイン配列、(b) スプライスドナー配列、及び(c) 内因性RNA分子のイントロンに結合するように構成された結合ドメイン配列であって、コードドメイン配列は、内因性RNA分子配列に対してヌクレオチド変異を含み、ヌクレオチド変異は、コードドメイン配列内の潜在性スプライス部位を破壊する、結合ドメイン配列を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド変異は、同義ヌクレオチド変異である。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位は、実験的に同定される。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位は、インシリコ解析に基づいて予測される。

10

【0137】

細胞内のRNA分子を改変する方法もまた本明細書に包含され、当該方法は、細胞に外因性RNA分子を提供することを含み、当該分子は、5'から3'の方向に、(a) 細胞内の内在性標的RNA分子のものとは異なるヌクレオチド変異を含むcDNAコードドメイン配列、(b) 内在性標的RNA分子のスプライスアクセプター配列にスプライスするように構成されたスプライスドナー配列、及び(c) 内在性標的RNA分子のイントロンに結合するように構成された結合ドメイン配列、を含み、ヌクレオチド変異が、外因性RNA分子のコードドメイン配列内の潜在性スプライス部位を破壊する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド変異は、同義ヌクレオチド変異である。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位は、実験的に同定される。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位は、インシリコ解析に基づいて予測される。

20

【0138】

また、本明細書で包含されるのは、RNAエクソンエディターのトランススプライシング効率を増加させる方法であって、RNAエクソンエディターのコードドメイン配列に変異を導入することを含み、変異は、RNAエクソンエディターのコードドメイン配列における潜在性スプライス部位を破壊する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド変異は、同義ヌクレオチド変異である。例えば、表6を参照されたい。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位は、実験的に同定される。いくつかの実施形態では、潜在性スプライス部位は、インシリコ解析に基づいて予測される。

【0139】

30

結合ドメイン

本明細書に記載のABCA4トランススプライシング分子は、標的ABCA4イントロン及び／またはエクソンに結合／アニーリングするように構成された結合ドメイン(BD)を特徴とする。いくつかの場合では、標的ABCA4イントロンは、ABCA4イントロン22である。一実施形態では、結合ドメインは、標的ABCA4イントロンpre-mRNA(例えば、標的ABCA4イントロン)の配列に対して少なくとも80%相補的(例えば、それに対して少なくとも85%相補的、それに対して少なくとも90%相補的、それに対して少なくとも91%相補的、それに対して少なくとも92%相補的、それに対して少なくとも93%相補的、それに対して少なくとも94%相補的、それに対して少なくとも95%相補的、それに対して少なくとも96%相補的、それに対して少なくとも97%相補的、それに対して少なくとも98%相補的、それに対して少なくとも99%相補的、またはそれに対して100%相補的)である核酸配列であり、これは、トランススプライシング分子と標的ABCA4 pre-mRNAとの間のトランススプライシングを増強しながら、内因性標的シススプライシングを抑制し得る(例えば、内因性ABCA4 mRNAの一部及び野生型ABCA4アミノ酸配列をコードする1つ以上の機能的ABCA4エクソンを有するコードドメイン配列を有するキメラ分子を創出することによる)。トランススプライシング分子コード配列(例えば、トランススプライシング分子をコードするベクター)を伴う実施形態では、結合ドメインコード配列は、標的ABCA4イントロンpre-mRNAの配列に対して少なくとも80%相補的(例えば、それに対して少なくとも85%相補的、それに対して少なくとも86%相補的、それに対して少な

40

50

くとも 87% 相補的、それに対して少なくとも 88% 相補的、それに対して少なくとも 89% 相補的、それに対して少なくとも 90% 相補的、それに対して少なくとも 91% 相補的、それに対して少なくとも 92% 相補的、それに対して少なくとも 93% 相補的、それに対して少なくとも 94% 相補的、それに対して少なくとも 95% 相補的、それに対して少なくとも 96% 相補的、それに対して少なくとも 97% 相補的、それに対して少なくとも 98% 相補的、それに対して少なくとも 99% 相補的、またはそれに対して 100% 相補的) である核酸配列をコードする。

【0140】

いくつかの場合では、本発明は、イントロン 22 で ABCA4 に結合するトランススプライシング分子 (またはそのベクター) を提供し、例えば、核酸トランススプライシング分子は、CDS を内因性 ABCA4 エクソン 23 にトランススプライシングするように構成される。特に、本明細書に記載のトランススプライシング分子は、結合ドメインが、配列番号 16 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 のうちのいずれか 1 つ以上 (例えば、6 つ以上、8 つ以上、10 個以上、または 12 個以上) を有する結合部位と結合するものを含む。

【0141】

いくつかの場合では、結合ドメインは、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 6 つ以上の連続するヌクレオチド (例えば、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 8 つ以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 10 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 12 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 20 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 30 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 40 つ以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 50 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 100 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 150 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 200 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 1~510 または 880~1, 350 内の任意の 250 個以上の連続する核酸) を含む。

【0142】

いくつかの場合では、結合部位は、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 6 つ以上の連続するヌクレオチド (例えば、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 8 つ以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 10 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 12 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 20 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 30 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 40 つ以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 50 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 100 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 150 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 200 個以上の連続する核酸、ABCA4 イントロン 22 のヌクレオチド 880~1, 350 内の任意の 250 個以上の連続する核酸) を含む。

【0143】

いくつかの場合では、結合ドメインは、結合部位に対して少なくとも80%の相補性を有する少なくとも2つの非重複配列を有する。

【0144】

いくつかの場合では、結合ドメインは、UUGUUGGUAAGGGUGUACAGCAAUUUCCUGGCUAUAUAGUUGCAA AAAAUCAGGAGUUAAACUAAAAA A A A A A A A A A A C C C A A G G G A A C U A A U U C A G C A G C A A A U U C C A G C A U A U U G G G A C A A U A A U A A C C A A C A U U U C A U A G C U U C C U A C A U A C（配列番号17）に対して少なくとも80%の同一性（例えば、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、または100%の同一性、例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性）を有する核酸配列を含む。

10

【0145】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、配列番号18TTGTGTGGTAAAGGGTGTACAGCAATTTCTCTGGCTATATAGTTTGCAAAAATCAGGAGTTTAACCTAAAAA A A A A A A A A A C C C A A G G G A A C T A A T T C A G C A G C A A A T T C C A G C A T A T T G G G A C A A T A A T A A C C A A C A T T T C A T A G C T T C C T A C A T A C（配列番号18）に対して少なくとも80%の同一性（例えば、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、または100%の同一性、例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性）を有するDNA配列である。

20

【0146】

いくつかの場合では、結合ドメインは、配列番号19に対して少なくとも80%の同一性（少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、または100%の同一性、例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性）を有する核酸配列を含む。

30

【0147】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、配列番号20に対して少なくとも80%の同一性（例えば、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、または100%の同一性、例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性）を有するDNA配列である。

40

【0148】

いくつかの場合では、結合ドメインは、配列番号21に対して少なくとも80%の同一性（少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少な

50

くとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、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 %、少なくとも 99 %、または 100 % の同一性、例えば、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性) を有する核酸配列を含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、配列番号 22 に対して少なくとも 80 % の同一性 (例えば、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、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 %、少なくとも 99 %、または 100 % の同一性、例えば、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性) を有する DNA 配列である。

【0150】

いくつかの場合では、結合ドメインは、配列番号 23 に対して少なくとも 80 % の同一性 (例えば、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、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 %、少なくとも 99 %、または 100 % の同一性、例えば、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性) を有する核酸配列を含む。

【0151】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、配列番号 24 に対して少なくとも 80 % の同一性 (例えば、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、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 %、少なくとも 99 %、または 100 % の同一性、例えば、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性) を有する DNA 配列である。

【0152】

結合ドメインは、スプライシングドメインの 3' 側で作動可能に連結され得る (例えば、スプライシングドメインに直接連結され得るか、またはスプライシングドメインの 3' 末端と結合ドメインの 5' 末端とを接続する介在配列を有し得る)。

【0153】

本明細書で詳述されるように、ABCA4 エクソンエディター設計の第 1 段階は、標的 pre-mRNA イントロンに相補的である高効率の BD 配列のスクリーニング及び選択から始めた。高い CDS 置換可能性を実現し、AAV パッケージング能力の制限 (約 4.7 Kb) 内の ABCA4 関連網膜症患者集団の高い割合で変異を補正するのに有用なエクソンエディターを提供するために、BD スクリーンのための ABCA4 遺伝子のイントロン 22 が選択された。本発明者らは、NGS ベースの BD ライブラリアプローチと生物発光ベースのアプローチの両方を適用して、BD 配列が異なるエクソンエディターバリエーションを用いてイントロン 22 配列に沿ってスキャンした。両方の方法の結果がアラインされ、RNA エクソン編集に適したイントロン内の領域が特定され、いくつかの実施形態での BD 117 の選択に至った。図 16 を参照されたい。

【0154】

スプライシングドメイン

スプライシングドメインは、トランススプライシングを媒介するためのスプライス部位、分岐点、及び／またはポリピリミジントラクト（PPT）トラクトを含み得る。いくつかの実施形態では、スプライシングドメインは、単一のスプライス部位を有し、これは、対応するスプライス部位がないため、スプライス部位が、シススプライシングではなくトランススプライシングが優先的に設計されていることを示す。

【0155】

代替的なスプライシングドメインは、周知の方法及び原理に従って当業者によって選択され得る。一実施形態では、5' スプライス部位コンセンサス配列は、核酸配列 AG/GURAGU（ここで、/はスプライス部位を示す）である。別の実施形態では、スプライス部位に近位のエクソン及びイントロンに対応する内因性スプライス部位を用いて、任意のスプライシング調節シグナルが維持され得る。

10

【0156】

一実施形態では、スペーサーを伴う好適な5' スプライス部位は、5' -GTAAAGAGAGCTCGTTGCGATATTAT-3'（配列番号25）である。一実施形態では、好適な5' スプライス部位はAGGTである。いくつかの実施形態では、スプライス部位（例えば、5' スプライス部位）は、GTAAAGTもしくはGUAAAGTであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、スプライス部位（例えば、5' スプライス部位）は、GTAAAGG、GUAAAGG、GTAAAGC、GUAAAGC、GTAAACT、GUAAACU、CAAAGT、もしくはCAAAGUであるか、またはそれらを含む。

【0157】

20

スプライシングドメインは、5' 側でターミネータードメインの（例えば、ターミネータードメインに直接連結するか、またはスプライシングドメインの3' 末端とターミネータードメインの5' 末端とを接続する介在配列、例えば、リンカードメイン及び／または3' 下流配列を有し得る）で作動可能に連結され得る。

【0158】

5' 非翻訳領域

いくつかの場合では、核酸トランススプライシング分子は、5' 非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、5' 非翻訳領域は、天然5' ABCA4非翻訳領域を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、5' 非翻訳領域は、配列番号12～13のいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも86%の配列同一性、少なくとも87%の配列同一性、少なくとも88%の配列同一性、少なくとも89%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性）を有する配列を含む。

30

【0159】

いくつかの実施形態では、5' 非翻訳領域は、CDSの5' 側に作動可能に連結され得る（例えば、CDSに直接連結されるか、または5' 非翻訳領域の3' 末端とCDSの5' 末端とを接続する介在配列を有する）。

40

【0160】

5' 調節ドメイン

いくつかの場合では、核酸トランススプライシング分子は、CDSの5' 側に作動可能に連結された5' 調節ドメインに作動可能に連結される（例えば、CDSに直接連結されるか、または中間ドメイン、例えば、非翻訳領域を介して連結される）。5' 調節ドメインは、プロモーター（例えば、構成的プロモーター、例えば、CMVプロモーターまたはEF1-アルファプロモーター）を含み得る。いくつかの場合では、5' 調節ドメインは、天然5' ABCA4非翻訳領域に作動可能に連結されたプロモーター（例えば、構成的プロモーター、例えば、CMVプロモーター）を含む。いくつかの実施形態では、天然5

50

’ A B C A 4 非翻訳領域に作動可能に連結された 5 ’ 調節ドメインは、配列番号 1 4 ~ 1 5 のいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性（例えば、少なくとも 8 5 % の配列同一性、少なくとも 8 6 % の配列同一性、少なくとも 8 7 % の配列同一性、少なくとも 8 8 % の配列同一性、少なくとも 8 9 % の配列同一性、少なくとも 9 0 % の配列同一性、少なくとも 9 1 % の配列同一性、少なくとも 9 2 % の配列同一性、少なくとも 9 3 % の配列同一性、少なくとも 9 4 % の配列同一性、少なくとも 9 5 % の配列同一性、少なくとも 9 6 % の配列同一性、少なくとも 9 7 % の配列同一性、少なくとも 9 8 % の配列同一性、少なくとも 9 9 % の配列同一性、または 1 0 0 % の配列同一性）を有する配列を含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、5 ’ 調節ドメインは、C D S の 5 ’ 側に作動可能に連結され得る（例えば、C D S に直接連結されるか、または 5 ’ 調節ドメインの 3 ’ 末端と C D S の 5 ’ 末端とを接続する介在配列を有する）。

【0162】

リンカードメイン

本明細書で論じられるように、トランススプライシング効率を増加させることは、依然として治療薬としての核酸トランススプライシング分子の実施における重要な目標である。治療介入における使用要件を満たすことができるトランススプライシング効率を有する核酸トランススプライシング分子を設計する試みの中で、本発明者らは、スプライスドメイン（S D）と結合ドメイン（B D）との間の数千のリンカー配列を試験し、前駆リンカー（L i n k D）と比較して統計学的に有意な程度に性能を改善した 4 0 m e r と呼ばれる例示的なリンカーを同定した。例えば、図 1 7 A 及び図 1 7 B を参照されたい。

【0163】

上記に加えて、核酸トランススプライシング分子は、分子とともに 1 つ以上の位置でリンカードメインを含み得る。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、スプライシングドメインまたはスプライス部位に 3 ’ 側で作動可能に連結される（例えば、スプライシングドメインまたはスプライス部位に直接接続される）。リンカードメインは、任意の好適なサイズであり得る。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、2 5 ヌクレオチド長より長い（例えば、2 5 ~ 5 0 ヌクレオチド長、3 5 ~ 4 5 ヌクレオチド長、または約 4 0 ヌクレオチド長（例えば、4 0 - m e r リンカー））。いくつかの実施形態ではリンカードメインは、C U G G U G C C C G C G G G C C G C G G A A C C G G U U G G G G G C A U G U A C （配列番号 2 6）または C T G G T G C C C G C G G G C C G C G G A A C C G G T T G G G G G C A T G T A C （配列番号 2 7）と少なくとも 8 0 % の配列同一性（例えば、少なくとも 8 5 % の配列同一性、少なくとも 8 6 % の配列同一性、少なくとも 8 7 % の配列同一性、少なくとも 8 8 % の配列同一性、少なくとも 8 9 % の配列同一性、少なくとも 9 0 % の配列同一性、少なくとも 9 1 % の配列同一性、少なくとも 9 2 % の配列同一性、少なくとも 9 3 % の配列同一性、少なくとも 9 4 % の配列同一性、少なくとも 9 5 % の配列同一性、少なくとも 9 6 % の配列同一性、少なくとも 9 7 % の配列同一性、少なくとも 9 8 % の配列同一性、少なくとも 9 9 % の配列同一性、または 1 0 0 % の配列同一性）を有する核酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0164】

上記のように、配列番号 2 6 （R N A）または配列番号 2 7 （D N A）を含む 4 0 m e r リンカーを、トランススプライシング分子の文脈において数千の異なるエレメントが機能について評価されるライブラリスクリーニングから選択した。4 0 m e r リンカーの優位性は、例えば、図 1 で明らかであり、これは、エレメントの異なる組み合わせの文脈において、3 つの異なるリンカーを比較するものである。それぞれの文脈において、4 0 m e r リンカー（最も軽いグレースケールトーンに対応するリンカーとして示される。各 s s の文脈において左から右に示される 3 番目のリンカー）の存在は、最高の相対的トランススプライシング効率と関連していた。リンカー配列は、トランススプライシング分子に含まれることが多く、リンカー配列は、スプライスドナーと結合ドメインとの間に位置す

ることで、柔軟性及び各エレメントへのアクセス可能性を提供する。本明細書に記載されるように、異なるエレメントの機能的寄与を、トランススプライシング分子の文脈においてもたらされる活性について、異なる組み合わせで評価した。40mer リンカーは、A B C A 4 RNA のオンターゲット (ONT) 置換%の統計学的に有意な増加 (図 17 A)、ならびに LinkD と比較して、トランススプライシング A B C A 4 タンパク質 (ONT) レベルの有意な増加及び非スプライシングタンパク質 (NSP) レベルの有意な減少 (図 17 B) によって例示されるように、トランススプライシング分子の文脈においてトランススプライシング活性の改善をもたらすリード候補エレメントとして、このスクリーニングから現れた。

【0165】

いくつかの実施形態ではリンカードメインは、C C G A A U A C G A C A C G U A C A A G A U C U (配列番号 28) または C C G A A T A C G A C A C G T A C A A G A T C T (配列番号 29) と少なくとも 80% の配列同一性 (例えば、少なくとも 85% の配列同一性、少なくとも 86% の配列同一性、少なくとも 87% の配列同一性、少なくとも 88% の配列同一性、少なくとも 89% の配列同一性、少なくとも 90% の配列同一性、少なくとも 91% の配列同一性、少なくとも 92% の配列同一性、少なくとも 93% の配列同一性、少なくとも 94% の配列同一性、少なくとも 95% の配列同一性、少なくとも 96% の配列同一性、少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、または 100% の配列同一性) を有する核酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態ではリンカードメインは、G C U G C U G C U C A G U C U C C U G G G C U G G (配列番号 30) または G C T G C T G C T C A G T C T C C T G G G C T G G (配列番号 31) と少なくとも 80% の配列同一性 (例えば、少なくとも 85% の配列同一性、少なくとも 86% の配列同一性、少なくとも 87% の配列同一性、少なくとも 88% の配列同一性、少なくとも 89% の配列同一性、少なくとも 90% の配列同一性、少なくとも 91% の配列同一性、少なくとも 92% の配列同一性、少なくとも 93% の配列同一性、少なくとも 94% の配列同一性、少なくとも 95% の配列同一性、少なくとも 96% の配列同一性、少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、または 100% の配列同一性) を有する核酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0166】

RNA エクソンエディター活性の増強剤

本発明者らは、治療介入におけるそれらの使用に有利な特性を有する核酸トランススプライシング分子を操作するために、多面的実験的アプローチを使用した。したがって、本発明者らは、例えば、オンターゲット (ONT) トランススプライシングを増加させること、ONT A B C A 4 トランススプライシングタンパク質レベルを増加させること、もしくは非スプライシングタンパク質 (NSP) レベルを減少させること、またはまたはそれらの任意の組み合わせによって、RNA エクソンエディター活性を増強し得る追加のエレメントを同定しようとした。したがって、様々なエレメントを試験して、試験されたエレメントの存在が、試験されたエレメントのない RNA エクソンエディターで観察されたものと比較して、RNA エクソンエディターの活性を増強するか否かを判定した。異なるエレメント及びそれらの異なる組み合わせのスコアを個々のトランススプライシング分子の文脈において評価する大規模な試行錯誤の手順を通じて、本発明者らは、UBS を欠く RNA エクソンエディターと比較して、追加のエレメントとして UBS を含む RNA エクソンエディターへの ONT トランススプライシング及び NSP レベルの減少の増加及び増加をもたらす配列エレメントである U1 結合部位 (UBS) を同定した。例えば、図 13 (3X U1) ならびに図 19 A 及び 19 B (3x UBS) を参照されたい。いくつかの実施形態では、3x UBS (3X U1 と称される) は、配列番号 62 を含む。いくつかの実施形態では、3x UBS (3X U1 と称される) は、G G T A A G T もしくは G G T A A G T A G A G T G (配列番号 61) または G G T G A G T A G A G T G (配列番

号 83) を含む少なくとも 1 つの配列を含む。その特定の実施形態では、3 x UBS は、リンカードメインの 3' に位置付けられる。その特定の実施形態では、3 x UBS は、リンカードメインの 3' 及び結合ドメインの 5' 側に位置付けられる。その特定の実施形態では、3 x UBS は、GGTAAAGT を含む少なくとも 1 つの配列を含み、GGTAAAGT を含む少なくとも 1 つの配列の各々は、隣接配列をさらに含む。その実施形態では、3 x UBS は、GGTAAAGTAGAGTG (配列番号 61) または GGTGAGTAGAGTG (配列番号 83) のうちの少なくとも 1 つを含む。いくつかの実施形態では、3 x UBS は、CGTGGTAAAGTAGAGTG (配列番号 74; UBS1)、ATGGGTAAAGTAGAGTG (配列番号 75; UBS2)、もしくは TGGGGTAAAGTAGAGTG (配列番号 76; UBS3) のうちの少なくとも 1 つ、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0167】

従って、いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの UBS を含む RNA エクソンエディターは、GGTAAAGT または GGTAAAGTAGAGTG (配列番号 61) を含む少なくとも 1 つの配列を含む。その特定の実施形態では、3 x UBS は、RNA エクソンエディターにおけるリンカードメインの 3' に位置付けられる。その特定の実施形態では、3 x UBS は、RNA エクソンエディターにおけるリンカードメインの 3' 及び結合ドメインの 5' 側に位置付けられる。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの UBS を含む RNA エクソンエディターは、CGTGGTAAAGTAGAGTG (UBS1; 配列番号 74)、ATGGGTAAAGTAGAGTG (UBS2; 配列番号 75)、もしくは TGGGGTAAAGTAGAGTG (UBS3; 配列番号 76) のうちの少なくとも 1 つ、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの UBS を含む RNA エクソンエディターは、少なくとも 1 つの CGTGGTAAAGTAGAGTG (UBS1; 配列番号 74) を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの UBS を含む RNA エクソンエディターは、CGTGGTAAAGTAGAGTG (配列番号 74、UBS1)、ATGGGTAAAGTAGAGTG (配列番号 75、UBS2)、及び TGGGGTAAAGTAGAGTG (配列番号 76; UBS3) を含む。

20

【0168】

本明細書に提示された結果によれば、トランスプライシング分子の文脈において存在する少なくとも 1 つの UBS は、本明細書において増強剤と称される。本明細書に記載の例示的な増強剤は、CGTGGTAAAGTAGAGTG (UBS1、配列番号 74)、ATGGGTAAAGTAGAGTG (UBS2、配列番号 75)、もしくは TGGGGTAAAGTAGAGTG (UBS3、配列番号 76) のうちの少なくとも 1 つ、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の例示的な増強剤は、少なくとも 1 つの CGTGGTAAAGTAGAGTG (UBS1; 配列番号 74) を含む少なくとも 1 つの UBS を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される例示的な増強剤は、CGTGGTAAAGTAGAGTG (UBS1、配列番号 74)、ATGGGTAAAGTAGAGTG (UBS2、配列番号 75)、及び TGGGGTAAAGTAGAGTG (UBS3、配列番号 76) を含む UBS を含む。

30

【0169】

RNA エクソンエディター活性を増強する UBS (RNA エクソンエディターに追加の要素として含まれ、リンカーに対して 3' 側及び BD に対して 5' 側に配置される; 図 13 を参照のこと) の能力は、少なくとも驚くべきものであり、それは、代替的な 5' スプライス部位として潜在的に作用し得る少なくとも 1 つの追加の要素の存在が、潜在的に RNA エクソンエディターのスプライスドメイン (例えば、図 13 を参照; SD; 既存の真正 5' スプライス部位) と競合及び/またはそれと干渉することによって ONT トランスプライシングを低減させ、その競合/干渉により ONT トランスプライシングが低減され得ると予測することが妥当であったからである。したがって、RNA エクソンエディターにおける増強剤 (UBS、例えば、UBS1、UBS2、もしくは UBS3 のうちの少なくとも 1 つ、またはそれらの任意の組み合わせ) の存在によってもたらさ

40

50

れると認められるONTトランススプライシングの増加は、予想外かつ驚くべきことであった。増強剤はまた、NSPに統計的に有意な低減をもたらし、この観察は、RNAエクソンエディターの文脈にいて、このエレメントの驚くべき機能特性をさらに強く示した。

【0170】

本明細書に記載の増強剤の機能的特性は、ABCA4 pre-mRNA以外の異なる標的pre-mRNA中の異なるイントロンに結合する／それを標的とする異なる結合ドメインを含むRNAエクソンエディターの文脈においても実証されている。例示的なRNAエクソンエディターからの結果は、3xUBSを含む増強剤が、非ABCA4 pre-mRNAにおいてイントロンA及びイントロンBを標的とするRNAエクソンエディターの文脈において驚くほど有益な特性をもたらすことを例証している。より具体的には、40mer+3xUBS（配列番号62）の組み合わせを含む非ABCA4 pre-mRNAを標的とするRNAエクソンエディターは、40mer（配列番号27）のみを含むRNAエクソンエディターと比較して、NSPのレベルの有意な低減を示した。例えば、図27B及び28Bを参照されたい。NSPを低減させながら、40mer+3xUBS（配列番号62）の組み合わせは、40mer単独の場合と同様のレベルのONTトランススプライシングタンパク質を維持した。比較として、3xUBSがNSPを低減させることが示されたRNAエクソンエディターの各々[ABCA4 pre-mRNAを標的とするイントロン22（図19B）；イントロンA（図27B）；及びイントロンB（図28B）]は、40mer+3xUBS配列の同じカセットを含み、これは、3xUBS配列（配列番号62）の存在によってもたらされる機能が、RNAエクソンエディターの標的イントロン及び／または標的pre-mRNAに関係なく一貫しているという結論を支持する。

【0171】

核酸トランススプライシング分子における3xUBS配列（配列番号62）の存在によってもたらされる機能性は、RNAトランススプライシング%のレベルでも明らかであった。図19A（ABCA4 pre-mRNAを標的とするイントロン22）、図28A（イントロンB）、及び図29（イントロンC）は、3xUBS配列（配列番号62）の存在が、RNAの置換%の増加傾向によって反映されるように、RNAトランススプライシング%の増加をもたらし得ることを例証している。実際、イントロンCを標的とする例示的なトランススプライシング分子では、3xUBS配列（配列番号62）の存在は、置換%のレベルに3倍の増加をもたらした。これらの結果は、置換%の増加傾向を促進する3xUBS配列（配列番号62）のこの追加の機能的特性が、RNAエクソンエディターの標的イントロン及び／または標的pre-mRNAに関係なく一貫していることを示唆している。イントロンCを標的とする結合ドメイン（BD34）を含むRNAエクソンエディターが、ABCA4 pre-mRNAのイントロン22、イントロンA、及びイントロンBを標的とする結合ドメインを含むRNAエクソンエディターの各々で使用される5'スプライス部位とは異なる代替的5'スプライス部位を含むことは注目すべきことである。これらの結果は、3xUBS増強剤が、結合ドメイン及びpre-mRNA標的特異性に加えて、RNAエクソンエディターの文脈においてエレメントに関して異なる機能性をもたらし得ることを実証する。

【0172】

したがって、本発明者らは、本明細書に記載されるものなどの増強剤（例えば、配列番号62）が結合ドメイン非依存的、及び標的非依的に機能することを示す証拠を提示し、したがって、RNAエクソンエディターの文脈において一般に使用され得、増強剤の存在により、RNA置換率に反映されるNSPレベルの低減及び潜在的なトランススプライシング活性の増加を含む有利な特性をもたらすであろうことが予想される。

【0173】

RNAエクソンエディター活性の翻訳増強剤

オンターゲット（ONT）トランススプライシングを増加させること、ONT ABCA4トランススプライシングタンパク質レベルを上昇させること、もしくは非スプライシ

ングタンパク質（NSP）レベルを減少させること、またはそれらの任意の組み合わせによってRNAエクソンエディター活性を増強し得る追加の要素の探索もまた、本発明者らは、本明細書に記載のRNAエクソンエディターの文脈において、AUリッチ要素（ARE）が驚くべき機能特性を示すという発見をもたらした。AREの驚くべき特性は、異なる要素及びそれらの異なる組み合わせのスコアを個々のトランススプライシング分子の文脈において評価する大規模な試行錯誤手順を介して発見された。本発明者らは、AREの存在が、追加の要素としてARE（40mer+ARE）を含むRNAエクソンエディターが、AREを欠くもの（例えば、40merのみを含む）と比較して、NSPレベルの低減をもたらすことを示した。いくつかの実験では、AREの存在はまた、AREを欠くもの（例えば、40mer単独を含む）と比較して、追加の要素としてAREを含むRNAエクソンエディター（40mer+ARE）に対するONTトランススプライシングABCA4タンパク質の増加をもたらした。例えば、図13（ARE）及び19B（40mer+ARE）を参照されたい。AREは、NSPレベルの低減、及びONTトランススプライシングABCA4タンパク質レベルの増加をもたらしたため、それらは本明細書では「翻訳増強剤」と称される。

10

20

30

40

50

【0174】

いくつかの実施形態では、例示的なAREは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）AREであり、ATTTATATATTTATATTTTTAAAAATATTTATTTATTTATTTATTTATTTA（配列番号63）を含む配列、または配列番号63に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、翻訳増強剤は、配列番号63に対して少なくとも91%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも92%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも93%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも94%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも95%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも96%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも97%の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも98%の同一性を有する、または配列番号63に対して少なくとも99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、配列番号63、または配列番号63に対して少なくとも90%の同一性を有する配列は、3'側で増強剤（例えば、配列番号62）に対して作動可能に連結される。コア配列は通常、AUUUA（RNA；それをコードするDNAベクター内のATTTA）であり、このコアAUUUA要素の繰り返し、多くの場合、機能するために必要とされる。ARE要素は、典型的には、約50塩基以上である。したがって、いくつかの実施形態では、AREは、約50塩基以上のコアAUUUA要素の繰り返しを含む。

【0175】

RNAエクソンエディターの活性を増強するARE（RNAエクソンエディターの追加の要素として含まれる、図13を参照）の能力は、少なくとも、NSPレベルを低減させながらONTトランススプライシングABCA4タンパク質レベルを増加させるため、驚くべきものであった。したがって、コードされるタンパク質レベルに対するARE媒介性効果は、治療用タンパク質レベル（ONTトランススプライシングABCA4タンパク質レベル）を優先的に増加させ、NSPレベルを減少させることによって、RNAエクソンエディターの治療可能性を促進する。

【0176】

例示的な翻訳増強剤（40mer+3XUBS+ARE、配列番号73）と組み合わせた例示的な増強剤のカセットは、40merのみ、40mer+3XUBS、または40mer+AREを含むRNAエクソンエディターのものと比較して、NSPレベルのさらに有意な低減をもたらすことも注目すべきである。したがって、要素のこの組み合わせ（40mer+3XUBS+ARE；配列番号73）は、本明細書に記載されるものなどのトランススプライシング分子の文脈において、特に有利な特性を示す。

【0177】

本明細書に記載の翻訳増強剤の機能的特性は、ABCA4 pre-mRNA以外の異

なる標的 *pre-mRNA* 中の異なるイントロンに結合する／それを標的とする異なる結合ドメインを含む *RNA* エクソンエディターの文脈においても実証されている。例示的な *RNA* エクソンエディターからの結果は、*ARE*（配列番号 63）を含む翻訳増強剤が、非 *ABCA4 pre-mRNA* においてイントロン A 及び B を標的とする *RNA* エクソンエディターの文脈において驚くほど有益な特性をもたらすことを例証している。より具体的には、*40mer + ARE*（配列番号 63）の組み合わせを含む非 *ABCA4 pre-mRNA* を標的とする *RNA* エクソンエディターは、*40mer*（配列番号 27）のみを含む *RNA* エクソンエディターと比較して、*NSP* のレベルの有意な低減を示した。例えば、図 27B 及び 28B を参照されたい。*NSP* を低減させながら、*40mer + ARE*（配列番号 63）の組み合わせは、*40mer* 単独の場合と同様のレベルの *ONT* トランススプライシングタンパク質を維持した。比較として、*RNA* が *NSP* を低減させることが示された *RNA* エクソンエディターの各々 [*ABCA4 pre-mRNA* を標的とするイントロン 22（図 19B）；イントロン A（図 27B）；及びイントロン B（図 28B）] は、*40mer + RNA* 配列（配列 86 の配列 3444～3529）の同じカセットを含み、これは、*RNA* 配列（配列番号 63）の存在によってもたらされる機能が、*RNA* エクソンエディターの標的イントロン及び／または標的 *pre-mRNA* に関係なく一貫しているという結論を支持する。*NSP* レベルの低下は、*40mer + 3xUBS + ARE*（配列番号 73）のカセットでさらに顕著であり、これらのエレメントのコンビナトリアル効果が示された。これらの結果は、*ARE* 翻訳増強剤が、結合ドメイン及び *pre-mRNA* 標的特異性に関して、*RNA* エクソンエディターの文脈において異なる機能性をもたらし得、*RNA* エクソンエディターの有効性を促進するために他のエレメントとコンビナトリアル方式で作用し得ることを実証する。

10

20

【0178】

したがって、本発明者らは、本明細書に記載されるものなどの翻訳増強剤（例えば、配列番号 63）が結合ドメイン非依存的、及び標的非依的に機能することを示す証拠を提示し、したがって、*RNA* エクソンエディターの文脈において一般に使用され得、翻訳増強剤の存在により、*RNA* 置換率に反映される *NSP* レベルの低減を含む有利な特性がもたらされるであろうことが予想される。

【0179】

追加の構成要素または改変

30

いくつかの場合では、トランススプライシング分子は、3' 転写ターミネータードメインを含む。いくつかの実施形態では、かかる 3' 転写ターミネータードメインは、トランススプライシング分子の 3' 末端を効果的にキャップする三重らせん構造を形成する。いくつかの場合では、3' 転写ターミネータードメインは、ヒト長非コード *RNA MALAT1*（例えば、野生型 *MALAT1*）に由来する。いくつかの実施形態では、3' 転写ターミネータードメインは、*tRNA* 様ドメインを含む。本 *ABCA4* トランススプライシング分子の一部として有用な 3' 転写ターミネータードメインは、国際特許公開第 WO 2020/214973 号に記載されており、参照により全体として本明細書に組み込まれる。例えば、いくつかの実施形態では、結合ドメインの 3' 末端に作動可能に連結された *RTM* の領域は、配列番号 32 または配列番号 33 などの野生型 *MALAT1 + Masc RNA* ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるターミネータードメインを含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインの 3' 末端に作動可能に連結された *RNA* エクソンエディターの領域は、配列番号 66（*DNA*）または配列番号 67（*RNA*）などの変異 *MALAT1 + Masc RNA*（抗 *Mut1 Masc RNA*）ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるターミネータードメインを含む。

40

【0180】

いくつかの場合では、トランススプライシング分子は、結合ドメインの下流（すなわち、結合ドメインに対して 3' で作動可能に連結された）及び／またはターミネータードメインの上流（すなわち、ターミネータードメインに 5' で作動可能に連結された）の 3' だ

50

ウンストリーム（DS）領域を含む。いくつかの場合によっては、3' DS領域は、ターミネータードメインの一部である。3' DS領域は、結合ドメインをターミネーター領域に直接つなげ得る。いくつかの実施形態では、3' DS領域は、6～10ヌクレオチド長（例えば、8ヌクレオチド長）である。いくつかの実施形態では、3' DS領域は、8-mer RNAに隣接する3' DS-MALAT1、AGGGUCAU；8-mer DNAに隣接する3' DS-MALAT1、AGGGTCAT；3' DS-ランダム8-mer RNA、CGAGCCUC；3' DS-ランダム8-mer DNA、CGAGCCTCC；8-mer RNAの最初の6つに隣接する3' DS-MALAT1、AGGGU；及びフランキン8-mer DNAの最初の6つに隣接する3' DS-MALAT1、AGGGTのうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、3' DS領域は、8-mer RNAに隣接する3' DS-MALAT1、AGGGUCAU；8-mer DNAに隣接する3' DS-MALAT1、AGGGTCAT；3' DS-ランダム8-mer RNA、CGAGCCUC；3' DS-ランダム8-mer DNA、CGAGCCTCC；8-mer RNAの最初の6つに隣接する3' DS-MALAT1、AGGGU；及びフランキン8-mer DNAの最初の6つに隣接する3' DS-MALAT1、AGGGTのうちのいずれか1つからなる。

10

20

30

40

50

【0181】

いくつかの実施形態では、トランススプライシング分子の標的pre-mRNAへの結合は、相補性パーセント（すなわち、核酸の塩基対合特性に基づく）、三重ヘリックス形成、またはタンパク質-核酸相互作用（本明細書で引用される文書に記載）によって媒介される。一実施形態では、核酸トランススプライシング分子は、DNA、RNA、またはDNA/RNAハイブリッド分子を含み、DNAまたはRNAは、一本鎖または二本鎖のいずれかである。本明細書にはまた、好ましくは、2.5xSSC緩衝液中60℃、及び低緩衝液濃度、例えば、0.5xSSC緩衝液で37℃で数回の洗浄というストリンジェントな条件下で、前述のRNAまたはDNAのうちの1つにハイブリダイズすることができるRNAまたはDNAも含まれる。これらの核酸は、脂質リン酸ホスファターゼ活性及び／または原形質膜との会合を示すタンパク質をコードし得る。トランススプライシング分子がインビトロで合成される場合、かかるトランススプライシング分子は、例えば、分子の安定性、標的mRNAへのハイブリダイゼーション、細胞への輸送を改善するために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において改変され得る。例えば、総電荷を低減するためのトランススプライシング分子の改変は、分子の細胞取り込みを増強することができる。さらに、ヌクレアーゼまたは化学的分解に対する感受性を低下させるように改変を行うことができる。核酸分子は、別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションを誘発する架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーションを誘発する切断剤等にコンジュゲートされるような方法で合成され得る。

【0182】

細胞内安定性及び半減期を増加させる手段として、核酸分子に対する様々な他の周知の改変を導入することができる（オリゴヌクレオチドについては上記も参照されたい）。可能な改変は、当該技術分野において周知である。合成トランススプライシング分子の構造に施してもよい改変には、骨格修飾が含まれる。

【0183】

例示的なABCA4 RNAエクソンエディターカセットマップ及び概要

一般的に言えば、ABCA4 RNAエクソンエディターカセット（ABCA4 REC）は、RNAエクソンエディターの発現を導く制御構成要素、対応する天然配列及び標的天然配列内に存在し得る任意の変異を置換する5' UTR及びCDS、天然スプライスアクセプター（SA）と相互作用するスプライスドナー（SD）、この相互作用が起こるための柔軟性及びアクセス可能性を可能にし得るリンカー、トランススプライシング（TS）を増強する調節エレメント、pre-mRNAの正しい位置を標的とするBD、ならびにTS及び安定性を促進するターミネーター配列を含む。これらの特徴は、図13及び以下の表1に示され、簡単に説明され、例示的なABCA4 RECを提示する。

【表 1】

表 1 :

1	AAV 2 ベースの逆方向末端反復配列 (ITR) は、ABCA 4 エクソンエディターカセットの AAV パッケージングに不可欠である。
2	サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターは、ABCA 4 エクソンエディターの発現を駆動する。
3	ヒト ABCA 4 mRNA 由来の天然 5' 非翻訳領域 (UTR) は、天然 5' 制御を維持する。
4	同義コドン変化を含む ABCA 4 エクソン 1~21 は、RNA エクソン編集を介して対応する内在性コード配列を置換するように設計される。同義コドン変化は、潜在性スプライスアクセプター部位を除去して、潜在的な選択的スプライシング反応を軽減する。
5	配列ベースの定量化を可能にする同義コドン変化を含む ABCA 4 エクソン 22。
6	スプライスドナー (SD) は、内因性 ABCA 4 イントロン 22 のスプライスアクセプター部位へとトランススプライシングされ、内因性 ABCA 4 pre-mRNA 上流配列を、エクソン 22 を含む ABCA 4 エクソンエディターコードドメイン配列 (CDS) で置換する。
7	二重終止コドンは、エクソン 22 の下流 (例えば、リンカー、3' UTR、AU リッチエレメント [ARE]、BD ドメイン領域) の ABCA 4 エクソンエディターからのアミノ酸の翻訳を防止する。
8	リンカーは、構造的な柔軟性及びスプライスドナー部位へのアクセス可能性を提供する。
9	U1 snRNP と会合すると仮定された 3 つの直列型 U1 結合部位 (3' UTR) ; RNA エクソンの編集効率を増加させることが実証された。
10	ARE は、細胞質に進入する任意の非スプライシング ABCA 4 エクソンエディターの安定性を低下させると仮定されている。
11	結合ドメイン (BD) は、配列相補性を介して、内因性 ABCA 4 pre-mRNA イントロン 22 に対する ABCA 4 エクソンエディターの標的化を媒介する。
12	MALAT1 ターミネーター (例えば、MALAT1-Masc RNA 抗-mut 1) は、効率的な RNA エクソン編集を促進する。
13	エクソンエディターカセットの AAV パッケージングに不可欠な AAV 2 ベースの ITR。

10

20

30

【0184】

ABCA 4 REEC 機能

図 13 に提示される例示的な ABCA 4 REEC の実施形態の特徴に関する詳細及び背景を以下に概説する。

40

【0185】

逆方向末端反復 (ITR) 配列 : 5' 及び 3' ITR 配列は、例示的な RNA エクソンエディター配列に隣接し、導入遺伝子のアデノ随伴ウイルス (AAV) パッケージングに不可欠である。例示的な ABCA 4 REEC は、遺伝子治療で一般的に使用される、AAV 2 に由来する「フロップ配向」130ヌクレオチド ITR 配列を含有する。

【0186】

CMV / CMV プロモーター : この調節配列は、例示的なエクソンエディター転写物の発現を駆動する。これは、サイトメガロウイルス (CMV) 最初期エンハンサー及び CMV 最初期エンハンサーを含み、非ヒト霊長類 (NHP) 光受容体において高発現を駆動す

50

ることが示されており、本明細書において、NHP網膜及びヒト網膜において高発現を駆動することが示されている。例えば、図8、9、31、及び32を参照されたい。

【0187】

5' UTR：例示的なエクソンエディターRNA分子の5'末端は、天然ABCA4 5' UTR配列で始まり、TSから生じる最終的なONT mRNA分子において天然RNA配列を維持する。UTR配列は、疑わしいまたはデータ駆動型潜在性スプライスアクセプター部位を除去して、エクソンエディター転写物間のシススプライシングまたはTSの潜在的な発生を軽減する5つの点変異で改変されている。

【0188】

コード配列(CDS)：例示的なABCA4 REECは、TSに続く対応する天然配列を置換するようにABCA4 mRNA配列のエクソン1～22をコードする(エクソン22に関する追加の詳細は以下に提示する)。エクソン1～21は、疑わしいまたはデータ駆動型潜在性スプライスアクセプター部位を除去して、エクソンエディター転写物間のシススプライシングまたはTSの潜在的な発生を軽減する40個の同義点変異で改変されている。

【0189】

末端エクソン22：例示的なABCA4 REECにおけるコードされたCDSはエクソン22を含み、エクソンエディター配列におけるスプライスドナー(SD)部位の直前にあるため末端エクソンと称され、後にTSを介して天然エクソン23にライゲーションし正しいエクソン22-23接合部を形成する。TSによって形成されたONT分子の同定及び定量化を容易にするために、エクソン22は29個の同義点変異で改変されている。これらの変異は、RT-qPCR解析(定量)、ならびにアミノ酸がタンパク質配列に変化することを誘発することなく次世代シーケンシング(NGS)ベースの解析(同定及び定量)のための選択的プライマー/プローブ設計を容易にすることにより、トランススプライシング転写物を内在性転写物と区別する機会を提供する。

【0190】

スプライスドナー部位(スプライシングドメイン、SD)：例示的なABCA4 REECは、末端エクソン22のすぐ下流に位置するコンセンサスU1スプライスドナー部位(SD)を含む。このSDは、さもなければ内因性イントロン22スプライスドナー部位とSA部位との間で起こるであろう天然シススプライシング反応の代わりに、スプライセオソームによって媒介されるTS反応中に、内因性イントロン22のスプライスアクセプター(SA)部位と相互作用する。このTS事象の結果が、正確に形成されたエクソン22-23接合部であり、上流領域はエクソンエディターに由来し、下流領域は天然ABCA4 pre-mRNAの残部を含み、その天然シススプライシング事象を介して、成熟mRNA分子の形成に向けて進む。

【0191】

終止コドン：例示的なABCA4 REECは、SD部位の直後に二重の終止コドンを含む。実際、GTAAGTSD部位の最後のヌクレオチドは、TAGTGA二重終止コドン内の最初のヌクレオチドとして機能する。この意図的な終止コドンの1つの目的は、プレスプライシングされたエクソンエディター転写物が核を出て、細胞質に入り、トランケートされた、スプライシングタンパク質(NSP)をもたらす翻訳を受ける状況下で、C末端での外来アミノ酸の付加を排除することである。NSPのC末端におけるそのような任意の外来アミノ酸は、終止コドンの包含によって回避される潜在的な免疫原性のリスクを引き起こす可能性がある。終止コドンはまた、AUリッチエレメント(ARE)媒介性の崩壊にも寄与し得、本発明者らは、これは、以下で論じられるように、細胞質中に流出するプレスプライシングされたエクソンエディターRNAを分解するのに役立つと仮定した。

【0192】

40merリンカー：SD部位と下流エレメントとの間に位置決めされるリンカー配列は、RNA構造に柔軟性及びSDへのアクセス可能性を提供し得、これは効果的なTSに

10

20

30

40

50

有利であり得る。40mer リンカーは、数千のリンカー候補の包括的なスクリーニングから非常に有効な配列として出現した。例えば、図1を参照されたい。40mer リンカーを含むエクソンエディターの関連領域の予測された二次構造は、40mer リンカーの存在により、オープンでアクセス可能なSDがもたらされることを示唆している。

【0193】

3X U1 部位：例示的な ABCA4 REEC は、40mer リンカーの下流に3つの直列型U1 部位を含む増強剤を含む。U1 部位は、スプライセオソーム媒介性スプライシングのプロセス中にU1 snRNPによって結合される。このエクソンエディターの一次SD 部位の下流に3つの直列型U1 部位を含めると、RNA TSが増加し、観察されたNSPレベルが減少した。本発明者らは、これらの結果は潜在的に、TSが発生する核内でのスプライセオソームとの会合及び保持の増加に起因した可能性があるかと仮定した。

10

【0194】

AUリッチエレメント (ARE)：例示的な ABCA4 REEC は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 遺伝子のmRNAに由来するAUリッチエレメント (ARE) を含む。このAREの存在は、上流の終止コドンとともに、3' UTR様配列を模倣するように設計される。本発明者らは、事前にスプライシングされたエクソンエディターRNAが細胞質に進入する場合に、ARE RNA結合タンパク質がARE配列を認識し、分子の急速な分解につながり、それによってNSPのレベルを低減させる可能性があるという仮説を立てた。

20

【0195】

結合ドメイン (BD)：例示的な ABCA4 REEC のコードされたBDは、エクソンエディターRNAを天然 ABCA4 pre-mRNAと直接会合させる。その150ヌクレオチド (nt) 配列は、pre-mRNAのイントロン22内の同じ長さの領域 (chr1: 94041452~94041601) に相補的である。BDのイントロン位置は、別個のイントロン位置でBD配列に関して分岐するエクソンエディターのアレイを用いてイントロン22をスキャンする反復プロセスを通じて選択した。このスキャンプロセスは、イントロン22を標的とする数千のBDを評価する超並列ライブラリNGSベースのアプローチと、リードアウトとして生物発光またはqPCRを使用した個々のエクソンエディターレベルでの評価との両方を伴った。例えば、図16を参照されたい。

30

【0196】

MALAT1 三重らせんターミネーター：例示的な ABCA4 REEC はまた、MALAT1 長非コードRNA (lncRNA) に由来するターミネーター配列も含む。MALAT1 lncRNAのこの部分は、エクソンエディターRNAに安定性及び核内保持をもたらし得る三重らせん構造を含有する。MALAT1ターミネーターは、自己切断型リボザイムなどの代替的ターミネーターを適用する場合に達成されるものをはるかに超えるTS効率をもたらす。例えば、図20Aを参照されたい。この三重らせんの後に、Rnase P切断部位と、後述するMALAT1 関連小細胞質RNA (Masc RNA) を含む短い配列とが続く。三重らせんの下流でのRnase P切断が、エクソンエディター転写物の3' 末端を規定する。

40

【0197】

Masc RNA：例示的な ABCA4 REEC におけるMasc RNA配列は、上流のRnase P切断部位及び下流のRnase Z切断部位が隣接し、プロセシングされると、エクソンエディター転写物が残存してTSに結合する間に核を出ると考えられている。Masc RNAは、Rnase P切断後のエクソンエディター転写物内にもはや存在しないが、天然に存在する場合にMALAT1 三重らせんの下流でその配列を含めることは、高効率のTS結果の達成に寄与し得る。細胞質では、Masc RNAは、マルチtRNAシンテターゼ複合体成分グルタミニル-tRNAシンテターゼ (QARS) との相互作用及び上方制御を介して、グローバルなタンパク質翻訳及び細胞増殖を促進することが疑われる。この潜在的なリスクを軽減するために、例示的な ABCA4 R

50

EEC内でコードされるMas c RNA配列は、そのアンチコドンステムループ（抗Mut 1と呼ばれる）内に点変異を含むように変異されており、これは、QARSとの相互作用を無効にし、世界的タンパク質合成速度を確実に増加させる可能性がある。第2の点変異は、抗Mut 1変異との塩基対合によってMas c RNAの天然クローバーリーフ構造を維持するのに役立つ。重要なことに、Mas c RNA配列への抗Mut 1の導入は、TS効率を損なわない。例えば、図20Bを参照されたい。

【0198】

本明細書に記載されるように、例示的なABCA4 REECは、内因性スプライセオソームによって媒介される5'トランススプライシング反応において機能する例示的なABCA45'エクソンエディターRNA分子をコードする。図14Aに示すように、エクソンエディターRNAの転写後、天然ABCA4 pre-mRNAのイントロン22に相補的であるエクソンエディター内のRNA配列（結合ドメイン；BD）が、エクソンエディターRNAをpre-mRNAに局在化させる。次に、エクソンエディターのスプライスドナー部位（SD）とpre-mRNAのイントロン22スプライスアクセプター部位（SA）との間で、トランススプライシング（TS）反応が起こる。この反応は、エクソン1～エクソン22までの天然内在性pre-mRNA配列が、エクソンエディターRNAによって提供される対応するコード配列（CDS）で置換され、それにより、天然内在性pre-mRNAのその領域内に存在し得る任意の変異が補正される。得られたオンターゲット（ONT）分子は、翻訳を受けて生物学的に活性なABCA4タンパク質を形成する。例えば、図14Aを参照されたい。

【0199】

さらに上記に加えて、理論に束縛されることを望むものではないが、本明細書に記載のRNAエクソンエディターは、シススプライシングと同様のメカニズムを介して進行するスプライセオソーム媒介性トランススプライシングを介して機能すると考えられる。転写後、エクソンエディターRNAは、その対になっていないSDに沈着したU1 snRNPと共に核内で拡散する。また、核内では、内在性（天然）pre-mRNA標的が、そのゲノム遺伝子座から転写され、隣接するSDとスプライスアクセプター（SA）部位との間のシススプライシングを介したそのイントロンの除去は、各々のイントロンのSAの出現の数秒以内に起こる。トランススプライシングプロセスは、エクソンエディターの結合ドメイン（BD）と、内因性ABCA4 pre-mRNAのイントロン22内に位置するその相補配列との塩基対合によって開始され、これは、シススプライシングを介したイントロンの除去の前に行わなければならない。この時点で、スプライセオソームは、（1）内因性SD及びSA部位を使用したシススプライシングに向けたラリアット形成、または（2）内因性SAと対合したエクソンエディターのSDを使用したトランススプライシングに向けた「Y分岐」形成のいずれかで進行し得る。後者の場合、エクソンエディターのSDの第1のヌクレオチド（グアニン）は、典型的には、SAの15～50bp上流にあるイントロンの分岐点と共有結合を形成する。この結合の形成により、エクソンエディターの下流部分の、スプライセオソームと相互作用したままになるエクソン22で終わるCDS部分からの分離がもたらされる。次に、スプライセオソームが、エクソンエディターのエクソン22から内因性pre-mRNAのエクソン23へのライゲーションを媒介し、一方でイントロンが分離されることで、正しいエクソン22-23接合がもたらされる。最後に、エクソンエディターRNAの下流部分及び分離したイントロン配列からなるY分岐RNAは、シススプライシング中に形成されたラリアットRNAの運命と同様に、急速な分解を受ける。例えば、図14Bを参照されたい。

【0200】

ABCA4エクソンエディターは、上記表1に示される成分のうちの1つ以上を含む場合もあれば、除外する場合もある。個々の機能的構成要素は、表1に示される構成要素の全てを含まずに、ABCA4エクソンエディターに有利に含まれ得る。例えば、エレメント3、7、8、9、10、及び12は、ABCA4エクソンエディターに利点をもたらすが、効果的なABCA4エクソンエディターは、これらのエレメントの1つ以上がなくて

も作製され得る。

【0201】

細胞株アッセイ

いくつかの場合では、本明細書に記載のトランススプライシング分子は、培養細胞株において試験される。RNAエクソンエディターの機能性をスクリーニング、選択、及び改善するために、培養細胞株を取得するか、または標的ABCA4 pre-mRNAを十分なレベルで発現するように操作してもよい。ABCA4発現は、一般的な、堅牢で容易にトランスフェクト可能／形質導入可能な形質転換された細胞株では極めて低いため、B6と呼ばれるHEK293Tベースの細胞株を、高いABCA4 RNAレベル及びタンパク質レベルの両方を発現するように操作した。これは、CRISPR媒介性の相同性指向修復(HDR)を介した、内因性ABCA4プロモーターとエクソン1との間での構成的CAGGSプロモーターのノックイン(KI)を介して達成された。ゲノムDNAでのPCRは、B6細胞の少なくとも1つのアレルにおけるCAGプロモーターの挿入を明らかにした。次に、4つの異なるqPCRアッセイを使用して、B6細胞におけるABCA4 RNA発現を確認した。これは、ABCA4を発現しない親HEK293T細胞とは対照的である。B6細胞におけるタンパク質翻訳を、ウェスタンブロットで確認した。図3Cを参照されたい。

10

【0202】

標的化された天然pre-mRNAを効果的に補正するABCA4 RNAエクソンエディターの能力を特徴付けるために、結果として得られたトランススプライシングオンターゲット(ONT)RNAの翻訳を受けて完全長ABCA4タンパク質を産生する能力を評価した。この目的のために、ノックアウト(KO)細胞株(17+06と呼ばれる)を、B6細胞株に基づいて操作した。17+06細胞は高レベルのABCA4 RNAを産生し続けたが、B6細胞株とは対照的に、17+06細胞はABCA4タンパク質を産生しない。CRISPRならびにエクソン3及び4を標的とするガイドRNA(gRNA)を使用して変異をABCA4遺伝子コード配列に導入することによって、17+06細胞の操作を達成した。B6細胞を2回の連続したトランスフェクションに供し、高い変異効率を達成し、ABCA4遺伝子配列を破壊した。最初に、エクソン3を標的とするgRNAを適用することにより、続いてエクソン3を標的とするgRNAとエクソン4を標的とするgRNAの混合物を適用することにより行った。変異は、17+06ゲノムDNA及びcDNAから作製されたPCRアンプリコンに適用されるサンガーシーケンシングによって確認し、後者は、親細胞株であるB6を生成するプロセス中に、CAG挿入が成功したアレル内で変異が生じたことを確認するものとして機能する。RT-qPCRにより、17+06細胞株におけるABCA4 RNA発現の持続が確認され、ウェスタンブロット解析により、ABCA4タンパク質の翻訳が無効になったことが示された。図3Cを参照されたい。

20

30

【0203】

RNAエクソンエディタースクリーニングプラットフォーム

図13に記載されるように、5' RNAエクソンエディターは、pre-mRNA標的化のための結合ドメイン(BD)及びスプライスドナー(SD)部位へのアクセスを可能にするリンカーなどのいくつかの機能的配列エレメントを含む。所与の遺伝子標的に対してRNAエクソンエディターを操作する場合、これらのエレメントの各々についての様々な配列オプションが、その高いトランススプライシング(TS)効率に寄与する能力について試験される。このような試験は、(A)個々のRNAエクソンエディターバリエーションをクローニング及びトランスフェクトし、RT-qPCR/ddPCR及びウェスタンブロットを介して効率を解析すること、または(B)効率を評価するための次世代シーケンシング(NGS)及びコンピュータ解析に依存するハイスループット(HT)ライブラリベースのアプローチにおいてRNAエクソンエディターをクローニング及びプールすることを介して達成され得る。例示的なABCA4 RNAエクソンエディター構築物であるABCA4 REECを、これらのアプローチを組み合わせることで開発した。両方のアプロ

40

50

ーチを以下で説明する。

【0204】

個々の形式でのRNAエクソンエディターのスクリーニング：

このアプローチは、ライブラリベースのマルチプレックススクリーニングを開始する前にRNAエクソンエディター配列内の小規模可変エレメント数を試験するために適用することができ、マルチプレックススクリーニングで同定されたRNAエクソンエディターの性能を検証する、及び／またはリード候補のパフォーマンスを改善するために適用することができる。TS効率の評価は、RNAレベル及びタンパク質レベルで行われる。

【0205】

RNAレベルでは、TS活性は、細胞から全RNAを単離し、続いて逆転写、及びリアルタイム定量的PCR (RT-qPCR) により、例えば、以下の標的のRNAコピー数を測定することによって評価される： RNF20 (正規化のためのハウスキーピング遺伝子)；天然 (ABCA4) mRNA；エクソンエディターRNA；陽性TSの生成物であるオンターゲットエクソン編集RNA (ONT)；ONT+エクソンエディター+OFT (オフターゲット) - これらの標的のうちの3つ全てを捕捉する単一のアッセイ。OFTは、RNAエクソンエディターがトランススプライシングしうる誤ったRNA分子を表す。

【0206】

置換パーセントとも呼ばれるONTTS効率は、TSに成功した全ABCA4 mRNA集団の部分を表し、次の式で計算される： $ONTTS\% = 100 * (ONT \text{コピー数} / (ONT \text{コピー数} + \text{天然コピー数}))$ 。

【0207】

RNAエクソンエディターTS効率は、ABCA4 RNAに正しくトランススプライシングRNAエクソンエディター転写物集団の部分であり、次の式によって計算される： $エクソンエディターTS\% = 100 * (ONT \text{コピー数} / (ONT \text{コピー数} + \text{エクソンエディターコピー数} + \text{OFTコピー数}))$ 。

【0208】

タンパク質レベルでは、TS活性は、ABCA4の場合に膜タンパク質を濃縮するプロトコルを介して細胞または組織サンプルから抽出したタンパク質に適用されるウエスタンブロット解析を介して測定される。膜タンパク質であるNa⁺/K⁺ATPaseをローディング対照として使用する。ONTタンパク質のレベルは、ABCA4特異的抗体 (Ab) を介して測定される。タグ、例えば、V5タグをそのN末端に含む構築物については、そのタグに特異的なAb (例えば、V5特異的Ab) を使用してウエスタンブロットをプローブしてONTタンパク質レベルを評価することができる。

【0209】

ライブラリ形式でのRNAエクソンエディタースクリーニング：

上記に加えて、RNAエクソンエディターは、BDまたはリンカーなどのエクソンエディターの特定の特性に焦点をあて得るDNAオリゴライブラリーの合成に依存するハイスループットライブラリー形式でスクリーニングすることができる。

【0210】

完全長エクソン編集ABCA4 mRNA配列の確認：

エクソン編集から生成されたABCA4成熟mRNAが、正しいエクソン22-エクソン23接合部を含め、正確なトランススプライシング反応から生じると予測された配列を有することを確認するために、本発明者らは、ABCA4-01エクソンエディターをコードするプラスミドで一過性にトランスフェクトしたABCA4 KO細胞から編集ABCA4 RT-PCR生成物を単離し、配列決定した。サンガーシーケンシングにより、複数のランダムに選択されたクローンにおいて正しい成熟mRNA配列が確認された。正しいエクソン22-エクソン23接合部を確認したに加えて、これらのシーケンシングの結果により、完全長エクソン編集ABCA4成熟mRNA分子が、エクソン1~22にわたるエクソンエディター由来CDSならびにエクソン23~50に及ぶ内因性配列を含

10

20

30

40

50

め、その全長にわたって予想配列を有することが確認された。これらの結果は、A B C A 4-01での治療によって媒介されたA B C A 4エクソン編集が、意図した正しいA B C A 4成熟mRNA配列をもたらすというさらなる信頼性を提供する。

【0211】

エクソン編集A B C A 4タンパク質のA T P a s e機能活性評価：

A B C A 4タンパク質は、A T P結合カセット（A B C）トランスポーターのスーパーファミリーのメンバーであり、光受容体外節ディスク膜の縁領域に沿って優先的に局在する。A B Cトランスポーターは、A T P加水分解のエネルギーを利用して、イオンから脂質及びペプチドに至るまで、多様な基質のセットを細胞膜を越えて一方向に移動させる。A B C A 4タンパク質は、眼に入る光が電気信号に変換（光伝達）されると、活性化する。潜在的に毒性のビタミンA誘導体が光伝達の間に形成され、A B C A 4タンパク質は、これらの物質のうち少なくとも2つ（全て経網膜及び11シス網膜）を光受容体の外節から除去するのに役立つ。この光受容体クリアランスメカニズムは、光受容体と網膜色素上皮細胞の両方を、これらの分子によって誘発され得る蓄積及び二次的な損傷から保護するのに役立つ。上記の通り、劣性遺伝性機能喪失型A B C A 4変異は、これらのビタミンA誘導体の蓄積をもたらし、A 2 E（リポフスチンに見られるビスレチノイドピリジニウム塩N-レチニリデン-N-レチニルエタノールアミンフルオロフォア）を含むリポフスチンの蓄積を引き起こし、網膜の細胞毒性をもたらし、最終的には進行性の視力喪失に至る。

10

【0212】

基質結合による活性の増加を含めたA T P a s e活性は、A B C A 4タンパク質の機能にとって重要である。したがって、エクソン編集を介して生成されたA B C A 4 mRNAから翻訳されたA B C A 4タンパク質のA T P a s e活性を評価することは、A B C A 4の生物活性の全体的な指標として機能する。以前の報告では、40 μMの全トランス網膜（A T R）と精製された野生型（W T）A B C A 4タンパク質とのインキュベーションにより、A T P a s e活性が1.8～2.5倍増加することが示されている。この情報を念頭に置いて、エクソン編集A B C A 4タンパク質の生物活性を評価するための実験を設計した。

20

【0213】

A B C A 4-01（配列番号81）のRNAエクソンエディターのN末端V5エピトープタグ付きバージョンをコードする過剰発現プラスミドをトランスフェクトしたA B C A 4 KO細胞において救済されたA B C A 4タンパク質のA T P a s e活性を、確立された方法を利用して、A B C A 4タンパク質免疫沈降後に40 μMの全トランス網膜（A T R）有りまたは無しで評価した。初期データは、40 μMの全トランス網膜の添加にตอบสนองして増加するA T P a s e活性の基底レベルを示す。図24を参照されたい。最小限のバックグラウンドA T P a s e活性が、A B C A 4を欠くトランスフェクトされていないサンプルで検出された。これらの結果は、A B C A 4-01（配列番号90）治療から生成されたエクソン編集A B C A 4タンパク質が、光受容体外節からのオールトランス網膜及び過剰な11シス網膜の輸送に必要な機能的A T P a s e活性を示すという証拠を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号90の断片（例えば、配列番号69）を異なる5' U T Rと組み合わせることで、同等の結果が得られる。これらの結果は、例示的なA B C A 4 RNAエクソンエディターの発現後のA B C A 4生物活性の回復を示す。

30

40

【0214】

A B C A 4関連網膜症患者に対するA B C A 4エクソンエディター治療薬の使用を支持するインビボNHP試験の概要：

実施例4は、A A V 8ベースのV5エピトープタグ付きA B C A 4エクソンエディターが、1 E 1 1 v g /注射の単回網膜下投与の1か月後のアフリカミドリザル（A G M）において治療上関連性のエクソン編集活性をもたらすことを示す証拠を提示する。特記すべきこととして、本研究で試験した（配列番号42）を含む初期リードベクターは、配列番号78を含むRNAエクソンエディターを含むA B C A 4-01（配列番号90）に存在

50

するエレメントのさらなる最適化及び最終的な選択の基礎として使用された。例えば、図 4～12；表 1 及び 2 を参照されたい。

【0215】

実施例 8 は、A B C A 4-01（配列番号 90）における選択された調節エレメントが、A G Mにおいて3か月タイムポイントまで持続的発現及びエクソン編集活性をもたらすことを示す証拠を提示する。本試験で試験された A A V 8 構築物は、配列番号 77 を含む R N A エクソンエディター（最初の 104 個のヌクレオチドは、天然 A B C A 45' U T R と、それに続く翻訳開始のための A T G 開始コドンを含む）を含み、これは（配列番号 42）を含む早期リードベクターに類似しているが、V5 エピトープタグを欠く点が異なり、スプライスドメインに続く二重終止コドンを含み、A B C A 4-01（配列番号 90）と比較した場合、インビトロでより高レベルのトランケート A B C A 4 非スプライシングタンパク質（N S P）を産生する。とりわけ、本試験で試験された A A V 8 構築物は、早期リードベクター（配列番号 42）を含む早期リードベクター（配列番号 42）に類似するエクソンエディター（配列番号 77）を含み、これは、すべての動物において 4.3 E 10 v g / 眼の単回網膜下用量後 1 か月及び 3 か月時点で耐容性は良好であり、関連する構築物 A B C A 4-01（配列番号 90）を使用した臨床的アプローチをさらに裏付ける。図 22 を参照されたい。配列番号 90 を含む A B C A 4-01 R N A エクソンエディター（今度は配列番号 78 を含む）は、配列番号 77 が増強因子（例えば、配列番号 62）または翻訳増強因子（例えば、配列番号 63）を含まないという点で、本試験で使

【0216】

実施例 10 は、A B C A 4-01（配列番号 90）が、N H P において 6 か月タイムポイントまで持続的な発現及びエクソン編集活性をもたらすことを示す証拠を提示する。より具体的には、図 30A～30C は、例示的な A A V 8 R N A エクソンエディター構築物（A B C A 4-01；配列番号 90）による治療から 6 か月後の N H P におけるインビボでの堅牢な A B C A 4 R N A 及びタンパク質置換を実証する結果を示す。簡潔に述べると、野生型カニクイザルを、単回網膜下用量の A B C A 4-01 で治療した（例示的な用量 3.5 E 11 v g / 眼の結果を提示する）。R N A 置換パーセントは、この用量の A B C A 4-01 では、約 40%～60% の範囲であった。これにより、認定 I A-M S アッセイによって測定される、結果として得られたヒト-N H P キメラ A B C A 4 タンパク質の治療レベルが得られた（図 30C）。より具体的には、これらの動物における A B C A 4 R N A 編集から得られるヒト N H P キメラ A B C A 4 タンパク質は、試験サンプル中に全 A B C A 4 タンパク質（ヒト-N H P + N H P）の 20～40% で存在することが見出された。最大 66% の R N A 置換及び最大 45% のヒト / N H P キメラ A B C A 4 タンパク質が、単回網膜下注射で送達される高用量の A B C A 4-01（1 E 12 v g / 眼）で治療した野生型カニクイザルで検出された。これらの結果は、A B C A 4-01 が、N H P において治療的に適切なレベルの編集 A B C A 4 タンパク質発現を達成し、このレベルが、A B C A 4 K O マウスモデルにおいて治療効果をもたらすことが以前に示された、救済された A B C A 4 タンパク質のレベルを超えることを実証する。

【0217】

実施例 12 は、配列番号 90 を含む例示的な A A V 8 R N A エクソンエディター構築物である A B C A 4-01 が、ヒト光受容体の文脈において機能するという証拠を提示する。簡潔に述べると、複数のヒトドナーに由来するドナー由来の網膜外植片を A B C A 4-01（3.9 E 11 v g）で治療して、ヒト光受容体における A B C A 4-01 の活性を評価した。A B C A 4-01 治療により、およそ 20～30% の、内因性エクソン 1～22 の A B C A 4-01 によってコードされる対応するエクソンとの R N A 置換をもたらした（図 31）。特記すべきこととして、A B C A 4-01 の同じロットが、実施例 10 で言及した調査 N H P 試験でも使用され、N H P のヒト対象への結果により A B C A 4-01 の翻訳可能性がさらに実証された。

【0218】

I I I . ベクター

トランススプライシング分子は、様々な技術を使用して、例えば、組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターまたは他のベクターモダリティ、例えば、非ウイルスベクターを使用して、個体の標的細胞に送達することができる。したがって、本明細書で提供されるのは、トランススプライシング分子を含む／コードするベクター（例えば、トランススプライシング分子を含む／コードするウイルスまたは非ウイルスベクター、例えば、トランススプライシング分子を含む／コードするDNAベクター）である。任意の好適な核酸ベクターを本発明の組成物及び方法と併せて使用して、トランススプライシング分子及び組換えAAVの構成要素を設計及び組み立てられ得る。一実施形態では、ベクターは、個体の選択された細胞においてトランススプライシング分子を発現するプロモーターによって駆動されるトランススプライシング分子を担持する組み換えAAVである。組み換えベクターを構築する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989; Kay, M. A. et al., Nat. Med., 2001, 7 (1): 33-40; 及びWalter W. and Stein U., Drugs 2000, 60 (2): 249-71を参照されたい。

10

【0219】

本明細書に記載される特定の実施形態では、トランススプライシング分子は、AAVベクターによる治療を必要とする選択された細胞、例えば、光受容体細胞に送達される。AAVの様々な天然血清型が利用可能である。AAVカプシドには多くの天然バリエーションが存在し、眼細胞または蝸牛細胞に特に適した特性を備えたAAVの同定及び使用を可能にしている。人工AAVベクターは、従来の分子生物学技術によって操作することができ、これにより、トランススプライシング分子核酸配列の細胞特異的送達のために、免疫原性を最小化するために、安定性及び粒子寿命を調整するために、効率的に分解するために、核内へ正確に送達するために等、これらの粒子を最適化することが可能になり、例えば、そのような人工カプシドは、選択されたAAV配列（例えば、vp1カプシドタンパク質の断片）を、異なる選択されたAAVから、同じAAVの非連続部分、非AAVウイルス源から、または非ウイルス源から得ることができる異種配列と組み合わせて使用する、任意の適切な技術によって生成することができる。人工AAVは、限定されないが、シュードタイプAAV、キメラAAVカプシド、組換えAAVカプシド、または「ヒト化」AAVカプシドであり得る。1つのAAVのカプシドが異種カプシドタンパク質と置換されているシュードタイプベクターは、本明細書に記載のトランススプライシング分子を送達するのに有用である。

20

30

【0220】

本明細書に記載のトランススプライシング分子の発現は、所望のトランススプライシング分子を含む／コードする配列を含有する、組み換え操作されたAAVまたは人工AAVによる送達により、選択された細胞において達成され得る。AAVの使用は、比較的非毒性であり、効率的な遺伝子導入を提供し、特定の目的のために容易に最適化することができるため、DNAの外因性送達の一般的な様式である。ヒトまたは非ヒト霊長類から単離されたAAVの十分に特徴付けられた血清型の中で、ヒト血清型2が、異なる標的組織及び動物モデルでの効率的な遺伝子導入実験に広く使用されている。

40

【0221】

いくつかの実施形態では、AAVは、AAV1もしくはそのバリエーション（例えば、US20030138772の配列番号6もしくは64、もしくはUS20150159173の配列番号11もしくは27）、AAV2もしくはそのバリエーション（例えば、US20030138772の配列番号7もしくは70、US20150159173の配列番号7もしくは23、もしくはUS20150159173の配列番号7）、AAV2G9もしくはそのバリエーション、AAV3もしくはそのバリエーション（例えば、US2003013

50

8 7 7 2 の配列番号 8 もしくは 7 1)、A A V 3 a もしくはそのバリエーション、A A V 3 b もしくはそのバリエーション (例えば、米国特許第 6, 156, 303 号の配列番号 1 及び 10)、A A V 3-3 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321 の配列番号 200 及び 217)、A A V 4 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 63)、A A V 4-4 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321 の配列番号 201 もしくは 218)、A A V 5 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 114)、A A V 6 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 65)、A A V 6.1 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173 の配列番号 29)、A A V 6.2 もしくはそのバリエーション、A A V 6.1.2 もしくはそのバリエーション、A A V 7 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 1~3)、A A V 7.2 もしくはそのバリエーション、A A V 8 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 4 及び 95) もしくは A A V 8 (b) (野生型 A A V 8 と比較して、アミノ酸 587 位~595 位に Pro-Glu-Arg-Thr-Ala-Met-Ser-Leu-Pro (配列番号 132) のアミノ酸配列を有する (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 9, 567, 376 号に記載されているもの))、A A V 9 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 5 及び 100)、A A V 9.9 もしくはそのバリエーション、A A V 9.11 もしくはそのバリエーション、A A V 9.13 もしくはそのバリエーション、A A V 9.16 もしくはそのバリエーション、A A V 9.24 もしくはそのバリエーション、A A V 9.45 もしくはそのバリエーション、A A V 9.47 もしくはそのバリエーション、A A V 9.61 もしくはそのバリエーション、A A V 9.68 もしくはそのバリエーション、A A V 9.84 もしくはそのバリエーション (例えば、N. Pulicherla et al. Molecular Therapy 19 (6): 1070-1078 (2011) を参照 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる))、A A V 10 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 117)、A A V 11 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 118)、A A V 12 もしくはそのバリエーション (例えば、US 20030138772 の配列番号 119)、A A V 16.3 もしくはそのバリエーション、A A V 24.1 もしくはそのバリエーション、A A V 27.3 もしくはそのバリエーション、A A V 42.12 もしくはそのバリエーション、A A V 42-1b もしくはそのバリエーション、A A V 42-2 もしくはそのバリエーション、A A V 42-3a もしくはそのバリエーション、A A V 42-3b もしくはそのバリエーション、A A V 42-4 もしくはそのバリエーション、A A V 42-5a、もしくはそのバリエーション、A A V 42-5b もしくはそのバリエーション、A A V 42-6b もしくはそのバリエーション、A A V 42-8 もしくはそのバリエーション、A A V 42-10 もしくはそのバリエーション、A A V 42-11 もしくはそのバリエーション、A A V 42-12 もしくはそのバリエーション、A A V 42-13 もしくはそのバリエーション、A A V 42-15 もしくはそのバリエーション、A A V 42-a a もしくはそのバリエーション、A A V 43-1 もしくはそのバリエーション、A A V 43-12 もしくはそのバリエーション、A A V 43-20 もしくはそのバリエーション、A A V 43-21 もしくはそのバリエーション、A A V 43-23 もしくはそのバリエーション、A A V 43-25 もしくはそのバリエーション、A A V 43-5 もしくはそのバリエーション、A A V 44.1 もしくはそのバリエーション、A A V 44.2 もしくはそのバリエーション、A A V 44.5 もしくはそのバリエーション、A A V 223.1 もしくはそのバリエーション、A A V 223.2 もしくはそのバリエーション、A A V 223.4 もしくはそのバリエーション、A A V 223.5 もしくはそのバリエーション、A A V 223.6 もしくはそのバリエーション、A A V 223.7 もしくはそのバリエーション、A A V 1-7/rh.48 もしくはそのバリエーション、A A V 1-8/rh.49 もしくはそのバリエーション、A A V 2-15/rh.62 もしくはそのバリエーション、A A V 2-3/rh.61 もしくはそのバリエーション、A A V 2-4/rh.50 もしくはそのバリエーション、A A V 2-5/rh.51 もしくはそのバリエーション、A A V 3.1/hu.6 もしくはそのバリエーション、A A V 3.1/hu.9 もしくはそのバリエーション、A A V 3-9/rh.52 もしくはそのバリエーション、A

10

20

30

40

50

AV3-11/rh. 53もしくはそのバリエーション、AAV4-8/rh. 64もしくはそのバリエーション、AAV4-9/rh. 54もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号116）、AAV4-19/rh. 55もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号117）、AAV5-3/rh. 57もしくはそのバリエーション、AAV5-22/rh. 58もしくはそのバリエーション、AAV7.3/hu. 7もしくはそのバリエーション、AAV16.8/hu. 10もしくはそのバリエーション、AAV16.12/hu. 11もしくはそのバリエーション、AAV29.3/bb. 1もしくはそのバリエーション、AAV29.5/bb. 2もしくはそのバリエーション、AAV106.1/hu. 37もしくはそのバリエーション、AAV114.3/hu. 40もしくはそのバリエーション、AAV127.2/hu. 41もしくはそのバリエーション、AAV127.5/hu. 42もしくはそのバリエーション、AAV128.3/hu. 44もしくはそのバリエーション、AAV130.4/hu. 48もしくはそのバリエーション、AAV145.1/hu. 53もしくはそのバリエーション、AAV145.5/hu. 54もしくはそのバリエーション、AAV145.6/hu. 55もしくはそのバリエーション、AAV161.10/hu. 60もしくはそのバリエーション、AAV161.6/hu. 61もしくはそのバリエーション、AAV33.12/hu. 17もしくはそのバリエーション、AAV33.4/hu. 15もしくはそのバリエーション、AAV33.8/hu. 16もしくはそのバリエーション、AAV52/hu. 19もしくはそのバリエーション、AAV52.1/hu. 20もまたそのバリエーション、AAV58.2/hu. 25もしくはそのバリエーション、AAVA3.3もしくはそのバリエーション、AAV3.4もしくはそのバリエーション、AAV3.5もしくはそのバリエーション、AA3.7もしくはそのバリエーション、AAVC1もしくはそのバリエーション、AAVC2もしくはそのバリエーション、AAVC5もしくはそのバリエーション、AAV-DJもしくはそのバリエーション（e.g.、US20140359799の配列番号2もしくは3）、AAV-DJ8もしくはそのバリエーション、AAVF3もしくはそのバリエーション、AAVF5もしくはそのバリエーション、AAVH2もしくはそのバリエーション、AAVH6もしくはそのバリエーション、AAVLK03もしくはそのバリエーション、AAVH-1/hu. 1もしくはそのバリエーション、AAVH-5/hu. 3もしくはそのバリエーション、AAVLG-10/rh. 40もしくはそのバリエーション、AAVLG-4/rh. 38もしくはそのバリエーション、AAVLG-9/hu. 39もしくはそのバリエーション、AAVN721-8/rh. 43もしくはそのバリエーション、AAVCh. 5もしくはそのバリエーション（例えば、US20150159173の配列番号46）、AAVCh. 5R1もしくはそのバリエーション、AAVcy. 2もしくはそのバリエーション、AAVcy. 3もしくはそのバリエーション、AAVcy. 4もしくはそのバリエーション、AAVcy. 5もしくはそのバリエーション（例えば、US20150159173の配列番号8及び24）、AAVCy. 5R1もしくはそのバリエーション、AAVCy. 5R2もしくはそのバリエーション、AAVCy. 5R3もしくはそのバリエーション、AAVCy. 5R4もしくはそのバリエーション、AAVcy. 6もしくはそのバリエーション、AAVhu. 1もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号143）、AAVhu. 2もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号145）、AAVhu. 3もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号141）、AAVhu. 4もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号147）、AAVhu. 5もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号84）、AAVhu. 7もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号150）、AAVhu. 9もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号155）、AAVhu. 10もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号156）、AAVhu. 11もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号153）、AAVhu. 13もしくはそのバリエーション（配列番号16及び32US20150159173の配列番号147）、AAVhu. 15もしくはそのバリエーション（例えば、WO2005033321の配列番号147）、AAVhu. 16もしくはそのバリエーション（例えば、WO200503

10

20

30

40

50

3 3 2 1 の配列番号 1 4 8)、AAVhu. 17 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 8 3)、AAVhu. 18 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 4 9)、AAVhu. 19 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 3 3)、AAVhu 20 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 3 4)、AAVhu. 21 もしくはそのバリエーション (例えば、配列番号 WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 3 5)、AAVhu. 22 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 3 8)、AAVhu. 23. 2 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 3 7)、AAVhu. 24 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 3 6)、AAVhu. 25 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 4 6)、AAVhu. 26 もしくはそのバリエーション (例えば、US 2 0 1 5 0 1 5 9 1 7 3 の配列番号 1 7 及び 3 3)、AAVhu. 27 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 4 0)、AAVhu. 28 もしくはそのバリエーション (例えば、US 2 0 1 5 0 1 5 9 1 7 3 の配列番号 4 2)、AAVhu. 29 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 3 2)、AAVhu. 29R もしくはそのバリエーション、AAVhu. 31 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 2 1)、AAVhu. 32 もしくはそのバリエーション (配列番号 WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の 1 2 2)、AAVhu. 34 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 2 5)、AAVhu. 35 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 6 4)、AAVhu. 37 もしくはそのバリエーション (例えば、US 2 0 1 5 0 1 5 9 1 7 3 の配列番号 1 8 及び 3 4)、AAVhu. 39 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 0 2)、AAVhu. 40 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 8 7)、AAVhu. 41 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 9 1)、AAVhu. 42 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 8 5)、AAVhu. 43 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 6 0)、AAVhu. 44 もしくはそのバリエーション (例えば、US 2 0 1 5 0 1 5 9 1 7 3 の配列番号 4 5)、AAVhu. 44R1 もしくはそのバリエーション、AAVhu. 44R2 もしくはそのバリエーション、AAVhu. 44R3 もしくはそのバリエーション、AAVhu. 45 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 2 7)、AAVhu. 46 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 5 9)、AAVhu. 47 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 2 8)、AAVhu. 48 もしくはそのバリエーション (例えば、US 2 0 1 5 0 1 5 9 1 7 3 の配列番号 3 8)、AAVhu. 48R1 もしくはそのバリエーション、AAVhu. 48R2 もしくはそのバリエーション、AAVhu. 48R3 もしくはそのバリエーション、AAVhu. 49 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 8 9)、AAVhu. 51 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 9 0)、AAVhu. 52 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 9 1)、AAVhu. 53 もしくはそのバリエーション (例えば、US 2 0 1 5 0 1 5 9 1 7 3 の配列番号 1 9 及び 3 5)、AAVhu. 54 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 8 8)、AAVhu. 55 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 8 7)、AAVhu. 56 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 9 2)、AAVhu. 57 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 9 3)、AAVhu. 58 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 9 4)、AAVhu. 60 もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号 1 8 4)、AAVhu. 61 もしくはバリエーション (例えば、WO 2 0 0 5 0 3 3 3 2 1 の配列番号

10

20

30

40

50

号 185)、AAVhu. 63もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号195)、AAVhu. 64もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号196)、AAVhu. 66もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号197)、AAVhu. 67もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号198)、AAVhu. 14/9もしくはそのバリエーション、AAVhu. t19もしくはそのバリエーション、AAVrh. 2もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号39)、AAVrh. 2Rもしくはそのバリエーション、AAVrh. 8もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号41)、AAVrh. 8Rもしくはそのバリエーション、AAVrh. 10もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号9及び25)、AAVrh. 12もしくはそのバリエーション、AAVrh. 13もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号10及び26)、AAVrh. 13Rもしくはそのバリエーション、AAVrh. 14もしくはそのバリエーション、AAVrh. 17もしくはそのバリエーション、AAVrh. 18もしくはそのバリエーション、AAVrh. 19もしくはそのバリエーション、AAVrh. 20もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号1)、AAVrh. 21もしくはそのバリエーション、AAVrh. 22もしくはそのバリエーション、AAVrh. 23もしくはそのバリエーション、AAVrh. 24もしくはそのバリエーション、AAVrh. 25もしくはそのバリエーション、AAVrh. 31もしくはそのバリエーション、AAVrh. 32もしくはそのバリエーション、AAVrh. 33もしくはそのバリエーション、AAVrh. 34もしくはそのバリエーション、AAVrh. 35もしくはそのバリエーション、AAVrh. 36もしくはそのバリエーション、AAVrh. 37もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号40)、AAVrh. 37R2もしくはそのバリエーション、AAVrh. 38もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号86)、AAVrh. 39もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号3、20、もしくは36)、AAVrh. 40もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号92)、AAVrh. 43もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号21及び37)、AAVrh. 46もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号4及び22)、AAVrh. 48もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号44)、AAVrh. 48. 1もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号44)、AAVrh. 48. 1. 2もしくはそのバリエーション、AAVrh. 48. 2もしくはそのバリエーション、AAVrh. 49もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号103)、AAVrh. 50もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号108)、AAVrh. 51もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号104)、AAVrh. 52もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号96)、AAVrh. 53もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号97)、AAVrh. 54もしくはAAVrh. 56もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号49)、AAVrh. 56もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号152) 1)、AAVrh. 57もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号105)、AAVrh. 58もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号48)、AAVrh. 61もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号107)、AAVrh. 62もしくはそのバリエーション (例えば、WO 2005033321の配列番号114)、AAVrh. 64もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号43)、AAVrh. 64R1もしくはそのバリエーション、AAVrh. 64R2もしくはそのバリエーション、AAVrh. 67もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173の配列番号47)、AAVrh. 73もしくはそのバリエーション (例えば、US 20150159173)、またはAAV

10

20

30

40

50

rh. 74もしくはそのバリエーション（例えば、US 2015015917の配列番号6）である。バリエーションの非限定的な例としては、US 20030138772の配列番号9、27～45、47～62、66～69、73～81、84～94、96、97、99、及び101～113（これらの内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、及びWO 2005033321の配列番号1、2、4～82、89、90、93～95、98、100、101、109～113、118～120、124、126、131、139、142、151、154、158、161、162、165～183、202、204～212、215、219、及び224～236（これらの内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）が挙げられる。一実施形態では、AAV血清型は、内容の全体が参照により本明細書に組み込まれるUS 2021/0189430に記載されているもののいずれかである。AAVのアミノ酸配列は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用する1つ以上の位置、またはアミノ酸484、487、527、532、585、または588（AAV2のVP1番号付けに基づく番号付けに）対応する1つ以上の位置において、AAVカプシドタンパク質における1つ以上のアミノ酸置換を含み得る。

10

【0222】

別段の指定のない限り、AAV ITR、及び本明細書に記載の他の選択されたAAV構成要素は、限定するものではないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、または既知及び未知のAAV血清型を含むAAV血清型のうちのいずれかから容易に選択され得る。一実施形態では、ITRは、AAV2に由来する。ITRまたは他のAAV構成要素は、当業者が利用可能な技術を使用して、AAVから容易に単離することができる。このようなAAVは、学術的、商業的、または公共的供給源（例えば、American Type Culture Collection, Manassas, Va.）から単離または取得され得る。代替的に、AAV配列は、文献で、または例えば、GenBank、PubMed等などのデータベースで入手可能な公開配列を参照することにより、合成または他の適切な手段を介して取得され得る。

20

【0223】

ベクターへのアセンブリに望ましいAAV断片には、vp1、vp2、vp3、及び超可変領域を含むcapタンパク質、rep78、rep68、rep52、及びrep40を含むrepタンパク質、ならびにこれらのタンパク質をコードする配列が含まれる。これらの断片は、様々なベクター系及び宿主細胞において容易に利用され得る。このような断片は、単独で、他のAAV血清型配列もしくは断片と組み合わせ、または他のAAVもしくは非AAVウイルス配列由来の要素と組み合わせ使用され得る。本明細書で使用される場合、人工AAV血清型は、天然に存在しないカプシドタンパク質を含むAAVを含むが、これに限定されない。そのような人工カプシドは、選択されたAAV配列（例えば、vp1カプシドタンパク質の断片）を、異なる選択されたAAVから、同じAAVの非連続部分、非AAVウイルス源から、または非ウイルス源から得ることができる異種配列と組み合わせ使用、任意の適切な技術によって生成することができる。人工AAVは、限定されないが、シュードタイプAAV、キメラAAVカプシド、組換えAAVカプシド、または「ヒト化」AAVカプシドであり得る。1つのAAVのカプシドが、異なるカプシドタンパク質を有するAAV由来のITRとともに利用されるシュードタイプベクターは、本明細書に記載するように有用である。一実施形態では、AAVは、AAV2/5（すなわち、AAV2 ITR及びAAV5カプシドを有するAAV）である。別の実施形態では、AAVは、AAV2/8（すなわち、AAV2 ITR及びAAV8カプシドを有するAAV）である。一実施形態では、AAVは、AAV8カプシドを含む。このようなAAV8カプシドは、NCBI参照配列：YP_077180.1で見出されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、AAV8カプシドは、GenBankアクセッション：AF513852.1のnt2121～4337によってコードされるカプシドを含む。

30

40

【0224】

50

一実施形態では、本明細書に記載される組成物及び方法で有用なベクターは、最低限、選択されたAAV血清型カプシド、例えば、AAV2カプシド、またはその断片をコードする配列を含む。別の実施形態では、有用なベクターは、最低限、選択されたAAV血清型repタンパク質、例えば、AAV2 repタンパク質、またはその断片をコードする配列を含む。任意選択で、そのようなベクターは、AAV cap及びAAV repタンパク質の両方を含み得る。AAV rep及びAAV capの両方が提供されるベクターでは、AAV rep配列及びAAV cap配列は両方とも、1つの血清型起源、例えば、AAV2起源のものであり得る。

【0225】

代替的に、rep配列が、cap配列を提供しているものとは異なるAAV血清型に由来するベクターを使用することができる。1つの実施形態では、rep配列及びcap配列は、別個の供給源（例えば、別個のベクター、または宿主細胞及びベクター）から発現される。別の実施形態では、これらのrep配列がインフレームで異なるAAV血清型のcap配列に融合されて、キメラAAVベクター、例えば、米国特許第7,282,199号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたものを形成する。

【0226】

適切な組換えAAV (rAAV) は、本明細書で定義されるAAV血清型カプシドタンパク質、またはその断片をコードする核酸配列を含む宿主細胞を培養することによって；機能的rep遺伝子；例えば、AAV ITR及びトランススプライシング分子核酸配列から構成されるミニジーン、及びAAVカプシドタンパク質へのミニジーンのパッケージングを可能にする十分なヘルパー機能により生成される。AAVミニジーンをAAVカプシドにパッケージングするために宿主細胞で培養する必要がある構成要素は、宿主細胞にトランスで提供され得る。代替的に、必要な構成要素（例えば、ミニジーン、rep配列、cap配列、及び／またはヘルパー機能）のうちのいずれか1つ以上は、当業者に周知の方法を使用して必要な構成要素のうちの1つ以上を含むように操作された安定宿主細胞によって提供され得る。

【0227】

一実施形態では、AAVは、プロモーター（またはプロモーターの機能的断片）を含む。rAAVで使用されるプロモーターの選択は、選択された導入遺伝子を所望の標的細胞で発現し得る多数の構成的または誘導性プロモーターの中から行うことができる。例えば、国際特許公開第WO2014/012482号（参照により本明細書に組み込まれる）で同定されているプロモーターのリストを参照されたい。一実施形態では、プロモーターは細胞特異的である。「細胞特異的」という用語は、組み換えベクター用に選択された特定のプロモーターが、特定の細胞型において選択された導入遺伝子の発現を誘導し得ることを意味する。一実施形態では、プロモーターは、光受容細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、桿体及び／または錐体における発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、網膜色素上皮（RPE）細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、神経節細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、ミューラー細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、双極細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、水平細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、アマクリン細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、導入遺伝子は、上述の細胞のいずれかで発現される。

【0228】

別の実施形態では、プロモーターは、発現される標的遺伝子の天然プロモーターである。有用なプロモーターとしては、ロッドオペシンプロモーター、赤-緑オペシンプロモーター、青オペシンプロモーター、cGMP-ホスホジエステラーゼプロモーター、マウスオペシンプロモーター、ロッドオペシンプロモーター、錐体形質導入のアルファサブユニット、ベータホスホジエステラーゼ（PDE）プロモーター、網膜色素変性症プロモーター、

10

20

30

40

50

N X N L 2 / N X N L 1 プロモーター、R P E 6 5 プロモーター、網膜変性緩徐な / ペリフェリン 2 (R d s / p e r p h 2) プロモーター、及び V M D 2 プロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 2 2 9 】

ミニジーンまたは r A A V に含まれる他の従来の調節配列もまた、W O 2 0 1 4 / 1 2 4 2 8 2 などの文書、及び他の文献で引用され、参照により本明細書に組み込まれる。当業者には、本明細書に記載の範囲から逸脱することなく、これら及び他の発現制御配列の中から選択を行うことができる。

【 0 2 3 0 】

選択された遺伝要素は、本明細書に記載のものを含む任意の好適な方法によって送達され得る。本明細書に記載される任意の実施形態を構築するために使用される方法は、核酸操作の当業者に周知であり、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, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY を参照されたい。同様に、r A A V ビリオンを生成する方法は周知であり、好適な方法の選択は、本明細書に記載の方法及び構築物に限定されない。例えば、K. Fisher et al., J. Virol., 1993 70: 520-532 及び米国特許第 5, 478, 745 号（各々が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【 0 2 3 1 】

別の実施形態では、トランススプライシング分子は、国際特許公開第 W O 2 0 1 2 / 1 5 8 7 5 7 号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているようなプロウイルスプラスミドに含まれる。かかるプロウイルスプラスミドは、モジュール式の組み換え A A V ゲノムを含み、該ゲノムは、作動的に会合している：当該 I T R の容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位に隣接する野生型 5 ' A A V 2 I T R 配列；サイトメガロウイルス（C M V）- ニワトリベータアクチン配列の上流に 4 9 核酸サイトメガロウイルス配列、または光受容体特異的プロモーター / エンハンサーを含むプロモーターを含み、当該プロモーターは、プロモーター配列全体の容易な除去または置換を可能にする独自の制限部位が隣接し、当該上流の配列は、プロモーター配列から上流の C M V またはエンハンサー配列のみの容易な除去または置換を可能にする独自の制限部位に隣接している。本明細書に記載のトランススプライシング分子は、マルチクローニングポリリンカーの部位に挿入することができ、トランススプライシング分子は、プロモーターに作動可能に連結され、プロモーターの制御下にある。当該ポリ A 配列の容易な除去または置換を可能にする独自の制限部位が隣接する、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、及び 3 ' I T R の容易な除去または置換を可能にする独自の制限部位が隣接する野生型 3 ' A A V 2 I T R 配列、もまた、かかるプラスミドの一部である。プラスミド骨格は、細菌細胞における複製に必要な要素、例えば、カナマイシン耐性遺伝子を含み、それ自体は転写ターミネーター / インシュレーター配列に隣接している。

【 0 2 3 2 】

一実施形態では、プロウイルスプラスミドは、(a) 連動して：(i) 野生型 5 ' A A V 2 I T R 配列であって、当該 I T R の容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位が隣接する、配列と、(i i) (A) C M V - ニワトリベータアクチン配列の上流に 4 9 - 核酸 C M V 配列、(B) 光受容体特異的プロモーター / エンハンサー、または (C) 神経細胞特異的プロモーター / エンハンサーを含むプロモーターと、を含む、モジュール式の組み換え A A V ゲノムを含む。プロモーターは、プロモーター配列全体の容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位が隣接し、及び上流配列は、プロモーター配列から上流の C M V またはエンハンサー配列のみの容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位が隣接する。また、このプロウイルスプラスミドの一部は、本明細書に記載されるもののうちのいずれかを含むトランススプライシング分子配列の挿入を可能にするマルチクローニングポリリンカー配列であって、トランススプライシング分子は、プロモ-

ターに作動可能に連結され、プロモーターの制御下にある、配列と、ウシ成長ホルモンポリリブリン化配列であって、当該ポリA配列の容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位が隣接する、配列と、3' ITRの容易な除去または置換を可能にする固有の制限部位が隣接する野生型3' AAV2 ITR配列である。プロウイルスプラスミドはまた、細菌細胞における複製に必要なエレメントを含み、カナマイシン耐性遺伝子をさらに含むプラスミド骨格を含み、当該プラスミド骨格は、転写ターミネーター／インシュレーター配列と隣接している。本明細書に記載されるプロウイルスプラスミドはまた、プラスミド骨格に非コードラムダファージ5.1 kbスタッパー配列を含んで、骨格長さを増加させ、非機能的AAVゲノムの逆パッケージングを防止し得る。

【0233】

なおもさらなる態様では、プロウイルスプラスミドのプロモーターは、プロモーターのサイズを縮小して、より大きなトランススプライシング分子配列がrAAVに挿入されることを可能にするように改変される。一実施形態では、通常、合計約1,000塩基対の非コードエクソン及びイントロンを含むCMV/CBAハイブリッドプロモーターは、国際特許公開第WO2017/087900号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、130塩基対のキメライントロンで置換される。

【0234】

次いで、これらのプロウイルスプラスミドが、現在行われているパッケージング方法で用いられ、プロウイルスプラスミドによって保有されるトランススプライシング分子導入遺伝子を発現している組み換えウイルスを生成する。適切な産生細胞株は、当業者によって容易に選択される。例えば、好適な宿主細胞は、原核（例えば、細菌）細胞、ならびに昆虫細胞、酵母細胞、及び哺乳動物細胞を含めた真核細胞を含む任意の生物学的生体から選択され得る。簡潔に述べると、プロウイルスプラスミドは、選択されたパッケージング細胞にトランスフェクトされ、そこでプロウイルスプラスミドは一過性に存在し得る。代替的に、隣接するITRを含むミニジーンまたは遺伝子発現カセットは、染色体的に、またはエピソームとしてのいずれかで、宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる。好適なトランスフェクション技法は既知であり、組換えAAVゲノムを宿主細胞に送達するために容易に利用され得る。典型的には、プロウイルスプラスミドは、cap及び／またはrepタンパク質を発現する宿主細胞内で培養される。宿主細胞では、隣接するAAVのITRを有するトランススプライシング分子からなるミニジーンが救済され、カプシドタンパク質またはエンベロープタンパク質中にパッケージングされて、感染性ウイルス粒子を形成する。したがって、組換えAAV感染性粒子は、プロウイルスプラスミドを有するパッケージング細胞を、感染性AAVエンベロープまたはカプシドへの遺伝子発現カセットウイルスゲノムのパッケージングを可能にするのに十分なウイルス配列の存在下で培養することによって産生される。

【0235】

代替的に、トランススプライシング分子は、非AAVベクター、例えば、非ウイルスベクターを使用して送達され得る。当技術分野で周知の、または本明細書に記載されている任意の好適な非ウイルスベクター技術が使用され得る。トランススプライシング分子の送達に適したかかる非ウイルスベクターとしては、リポソーム（例えば、カチオン性リポソーム、単層リポソーム、または多層リポソーム）、ナノ粒子（例えば、ポリマーナノ粒子、脂質ナノ粒子（LNP）、PEG化ナノ粒子（例えば、PEG化LNP）、ペプチドナノ粒子、金属ナノ粒子など）、デンドリマー（例えば、カチオン性デンドリマー、例えば、ポリプロピレンイミンデンドリマー）、エキソソーム（例えば、免疫学的に不活性及び／または標的化されたエキソソーム、例えば、Alvarez-Erviti, et al., 2011, Nat. Biotechnol. 29:341に記載の技術を使用して作製したもの）、及び微小が挙げられる。いくつかの場合では、本明細書に記載されるトランススプライシング分子は、細胞透過性ペプチド（CPP）を使用して送達され得、CPPは、標的細胞の原形質膜を移動させ、標的細胞の内部へのトランススプライシング分子の送達を容易にすることができる。

10

20

30

40

50

【0236】

I V . 医薬組成物及び

本明細書で提供されるのは、核酸トランススプライシング分子、プロウイルスプラスミド、または本明細書に記載のA B C A 4核酸トランススプライシング分子のうちのいずれかを含むr A A Vを含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の5'トランススプライシング分子のうちのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、5'トランススプライシング分子及び3'トランススプライシング分子を含み、例えば、5'トランススプライシング分子及び3'トランススプライシング分子は、合わせてA B C A 4エクソンの機能的配列を含有し、同じ標的A B C A 4イントロン（例えば、イントロン22）に結合する。

10

【0237】

このような医薬組成物は、汚染がなく、インビボ投与に適しているように調製され得る。本明細書に記載される医薬組成物は、従来の方法によって汚染について評価され、その後、好適な投与経路を意図した医薬組成物に製剤化され得る。トランススプライシング分子、例えば、ネイキッドDNAを含有するさらに他の組成物は、好適な担体を用いて同様に製剤化され得る。かかる製剤化は、特に標的細胞（例えば、眼細胞）への投与を目的とした、薬学的に許容される及び／または生理学的に許容されるビヒクルまたは担体の使用を伴う。一実施形態では、標的細胞への投与に好適な担体には、緩衝生理食塩水、等張性塩化ナトリウム溶液、または他の緩衝液、例えば、pHを適切な生理学的レベルに維持するためのH E P E S、及び任意選択で、他の薬剤、医薬薬剤、安定化剤、緩衝剤、担体、アジュバント、希釈剤が含まれる。

20

【0238】

いくつかの実施形態では、担体は、投与のために液体である。例示的な生理学的に許容される担体には、滅菌のピロジェンフリー水、及び滅菌のピロジェンフリーリン酸緩衝生理食塩水が含まれる。様々なそのような周知の担体が、米国特許第7,629,322号（参照により本明細書に組み込まれる）に提供されている。一実施形態では、担体は、等張性塩化ナトリウム溶液である。別の実施形態では、担体は、平衡塩溶液である。一実施形態では、担体は、t w e e nを含む。ウイルスが長期保存される場合、グリセロールまたはT W E E N 2 0の存在下で凍結され得る。

【0239】

他の実施形態では、本明細書に記載のトランススプライシング分子を含有する組成物は、界面活性剤を含む。P l u r o n i c F 6 8（ポロキサマー188、別名L U T R O L（登録商標）F 6 8）などの有用な界面活性剤を含み得る。これは、A A Vが不活性表面に付着するのを防ぎ、したがって所望の用量を確実に送達するためである。例として、本明細書に記載の眼疾患の治療用に設計される1つの例示的な組成物は、哺乳動物個体の眼細胞においてトランススプライシング分子を発現する調節配列の制御下において、本明細書に記載の5'トランススプライシング分子または3'トランススプライシング分子をコードする核酸配列を担持する組み換えアデノ随伴ベクター、及び薬学的に許容される担体を含む。担体は、等張性塩化ナトリウム溶液であり、界面活性剤P l u r o n i c F 6 8を含む。一実施形態では、トランススプライシング分子は、本明細書に記載されるいずれかのものである。

30

40

【0240】

さらに別の例示的な実施形態では、組成物は、A B C A 4遺伝子補正について本明細書に記載のA B C A 4トランススプライシング分子のいずれかを含むr A A Vウイルスを含み、核酸配列は、光受容体細胞におけるトランススプライシング分子の発現を指示するプロモーターの制御下にあり、組成物は、網膜下注射に好適な担体及び追加の成分で製剤化される。さらに別の実施形態では、担体、r A A V粒子、界面活性剤、及び／またはr A A Vを生成するための構成要素を含む、組成物またはこの組成物の生成もしくは組み立てのための構成要素、ならびに組成物を調製するための好適な実験用ハードウェアは、キットに組み込まれ得る。このようなキットはさらに、組成物を、例えば、スターガルト病ま

50

たはウサー症候群などの眼疾患の治療薬として個体に投与するための説明書を含み得る。

【0241】

5' トランススプライシング分子（例えば、トランススプライシング分子は、本明細書に記載の任意のAAVベクターにパッケージングされている）を含む医薬組成物を含むキットが本明細書でさらに提供される。いくつかの施形態では、キットは、投与前に医薬組成物を混合するための説明書を含む。

【0242】

V. 方法及び使用

ABCA4関連網膜症の患者は、類似しているが同一ではない臨床的特徴を呈する。大多数は、リポフスチンの蓄積及び両側視力喪失を有する。ABCA4関連のスターガルト病は典型的に、特徴的な黄斑萎縮を示し、多くの場合、眼底検査で金属様反射が見られる。黄色斑眼底は類似しているが、黄斑萎縮がより少なく、黄斑における黄色－白色斑の存在がより多く、それは中央周辺領域にまで及ぶ。ABCA4関連錐体桿体ジストロフィーを有する対象は、視力喪失、色覚障害、及び中心暗点などの視覚症状を示す。

【0243】

ABCA4関連スターガルト病の臨床症状は、小児期発症、成人早期発症、及び成人後期発症に分類され得る。これらの群の各々は、特定のABCA4バリエーションと相関する表現型の独自のバリエーションを有し得る。

【0244】

小児期発症：両アレル性の重度のABCA4バリエーションを有する小児は、黄斑機能不全のみに起因するか、または錐体桿体ジストロフィーとの組み合わせに起因する、典型的には5～11歳の間により侵襲的な中心視覚喪失を示す。

【0245】

成人早期発症：これらの患者は通常、20歳代または30歳代に中心窩萎縮による中央視覚喪失を呈する。受診時には、通常、眼底検査では、多数の傍黄斑及び末梢斑を伴う顕著な黄斑萎縮が示される。これらの患者は、両方のアレル、またはヌル／重度のABCA4バリエーションとの化合物ヘテロ接合性の組み合わせとしてのいずれかで、ABCA4機能に中等度の影響を及ぼすABCA4バリエーション（例えば、c. 6079C>T及びc. [2588G>C; 5603A>T]）を保有することが多い。

【0246】

成人後期発症：「後期」発症疾患の定義は、35歳以上のものから50歳以上のものまで様々である。したがって、患者は40歳代から発症し得る。患者は、中心窩を温存する萎縮によって説明され得ると考えられる最良矯正視力（BCVA）が比較的良好に維持されているため、網膜スクリーニングによって偶発的に特定されることが多い。

【0247】

ABCA4関連網膜症の対象の大部分は、20歳代までに診断される／症候的であり、これは、発達、自立、教育、及び全体的な生活の質に顕著な影響を有し得る。さらに、錐体桿体ジストロフィーなどのより重症型のいくつかは、5歳ほどの若さの小児期に発症する。スターガルト病の患者95名を対象としたある研究では、視力（VA）が20/40を下回ると、視力喪失が20/200まで急速に進行することが見出された。さらに、少なくとも1つの眼で20/40以上のVAを維持する確率は、19歳時点で52%であったが、39歳時点では22%に低下した。より早期に発症し、より重症度の高い錐体桿体ジストロフィー、ならびに小児期に発症するスターガルト病は、一般に、ABCA4の両アレル性ヌルバリエーションと関連している。これらの小児期／早期発症型は、症候的な中心暗点及び急速に進行する萎縮を示し、小児患者の大部分は、診断時に桿体光受容体の関与を示し、これは予後不良の指標となる。別の考慮事項は、ABCA4網膜症を有するより若い患者における弱視の発症である。弱視は、視覚発達における初期の欠陥の結果として生じ、視力障害、立体視の低減、及び7歳～9歳の臨界期間に矯正されなかった場合は永続的であると理解されている融像障害につながる。青年期もまた神経可塑性に対するいくつかの可能性を示すいくつかの研究がある。これにより、本発明者らは、臨界

10

20

30

40

50

期を迎える前に、網膜症に対して本明細書に記載の A B C A 4 エクソンエディターで治療される小児対象におけるより高い有効性が予想される。

【0248】

上記の核酸トランススプライシング分子（例えば、核酸トランススプライシング分子及び核酸トランススプライシング分子コードベクター）及び組成物は、例えば、本明細書に記載の疾患に関連する症状の遅延または改善を含む、A B C A 4 遺伝子の変異に関連する疾患または障害、例えば、A B C A 4 関連網膜ジストロフィー、例えば、スターガルト病及び錐体桿体ジストロフィーを治療するための方法における個体の標的細胞（例えば、眼細胞、網膜細胞、光受容体及び／または R P E 細胞）において、機能的 A B C A 4 を発現させる、及び／または A B C A 4 の発現を調節するのに有用である。上記の核酸トランススプライシング分子（例えば、核酸トランススプライシング分子及び核酸トランススプライシング分子コードベクター）及び組成物はさらに、個体の標的細胞（例えば、眼細胞、網膜細胞、光受容体及び／または R P E 細胞）において、機能的 A B C A 4 を発現させる、及び／または A B C A 4 の発現を調節するのに有用であり、それは本明細書に記載の疾患に関連する症状の遅延または改善を含む、A B C A 4 遺伝子の変異に関連する疾患または障害、例えば、A B C A 4 関連網膜ジストロフィー、例えば、スターガルト病及び錐体桿体ジストロフィーを治療するための使用に適用されるか、またはそれは本明細書に記載の疾患に関連する症状の遅延または改善を含む、A B C A 4 遺伝子の変異に関連する疾患または障害、例えば、A B C A 4 関連網膜ジストロフィー、例えば、スターガルト病及び錐体桿体ジストロフィーを治療するための薬剤を調製するために適用される。かかる方法及び使用は、標的 A B C A 4 遺伝子（例えば、A B C A 4 p r e - m R N A）を、本明細書に記載のトランススプライシング分子〔例えば、物本明細書に記載の 5' トランススプライシング分子、または 3' と 5' の両方のスプライシング分子の混合、それを含む組成物（例えば、医薬組成物）、またはそれを含む薬剤〕に、トランススプライシング分子の C D S が標的 A B C A 4 p r e - m R N A にスプライシングされ、1 つ以上の欠損または変異を有する標的 p r e - m R N A の一部を、標的細胞における A B C A 4 の発現を補正するために、標的遺伝子の機能的（すなわち、健康な）または正常または野生型または補正された m R N A で置換する条件下で接触させることを伴う。したがって、方法及び組成物は、特定の変異及び／または遺伝子発現に関連する眼の疾患／病変を治療するために使用される。

10

20

30

【0249】

いくつかの事例では、本明細書に提供されるのは、標的細胞を、本明細書に記載の核酸トランススプライシング分子、ベクター（例えば、A A V ベクター）、または組成物のいずれかと接触させる（例えば、形質導入する）ことにより、標的細胞において機能的 A B C A 4 を発現させる方法である。一実施形態では、接触させることは、組成物（例えば、医薬組成物）を罹患した個体に直接投与することを含む。別の実施形態では、接触させることは、個体に再移植された培養細胞及び治療された眼細胞を用いてエキスピボで行われ得る。別の実施形態では、方法は、本明細書に記載の 5' A B C A 4 トランススプライシング分子のいずれかを有する r A A V を投与することを伴う。さらに別の実施形態では、方法は、3' トランススプライシング分子を保有する r A A V と 5' トランススプライシング分子を保有する r A A V との混合物を投与することを伴う。これらの方法は、本明細書に記載されるもののいずれかの組成物を有効濃度でそれを必要とする個体に投与することを含む。

40

【0250】

いくつかの実施形態では、方法は、A B C A 4 の変異（複数可）に関連する障害を有する個体を治療するための 1 つ以上のトランススプライシング分子を選択することを含む。いくつかの実施形態では、A B C A 4 の変異（複数可）に関連する障害を有する個体を治療するための 1 つ以上のトランススプライシング分子の使用、または A B C A 4 の変異（複数可）に関連する障害を有する個体を治療するための薬剤の調製におけるその使用が、本明細書に包含される。かかる方法及び使用には、A B C A 4 の変異に関連する障害を有

50

する個体を治療するための1つ以上のトランススプライシング分子を選択すること、またはA B C A 4の変異に関連する障害を有する個体を治療するためのかかる選択された1つ以上のトランススプライシング分子の使用、またはA B C A 4の変異（複数可）に関連する障害を有する個体を治療するための薬剤の調製におけるかかる選択された1つ以上のトランススプライシング分子の使用を伴う。かかる選択は、個体の遺伝子型に基づくことができる。いくつかの実施形態では、A B C A 4に関連する障害は、常染色体劣性障害であり得る。いくつかの場合では、個体は、A B C A 4の変異（複数可）についてホモ接合性であるか、または複合ヘテロ接合性である。A B C A 4における特定の変異をスクリーニングし、同定する方法は、当該技術分野において周知である。

【0251】

10

本発明の方法は、A B C A 4における単一の変異（例えば、個体の1つのアレルの変異）の位置に基づいて、単一のトランススプライシング分子を選択することを含む。いくつかの場合では、常染色体劣性変異の文脈において、2つの変異のうち的一方のみを補正することで、機能的タンパク質の活性が回復するのに十分な場合があり、例えば、第2のアレルが、A B C A 4遺伝子の反対部分に変異を有する場合、第1の変異を補正するように構成された単一のA A V送達トランススプライシング分子の範囲外となる。したがって、いくつかの実施形態では、本発明の方法は、例えば、他のアレルにおける変異の位置に関係なく、標的遺伝子の5'部分上の単一の変異を補正するために、単一のトランススプライシング分子を投与することを含む。

【0252】

20

さらに、本発明は、A B C A 4遺伝子の5'部分上の2つ以上の変異を補正するための単一のトランススプライシング分子を選択することを伴い、それにより、A A Vベクターにパッケージされることが可能な単一のトランススプライシング分子が、両方または全ての変異にわたることが可能であり、それによって両方または全ての変異を補正する。

【0253】

他の実施形態では、本明細書で提供されるのは、2つのトランススプライシング分子、すなわち5'トランススプライシング分子及び3'トランススプライシング分子を使用して、A B C A 4遺伝子内の複数の変異を補正するための方法である。いくつかの実施形態では、A B C A 4遺伝子全体が、両方のトランススプライシング分子の結合及びトランススプライシング時に置換され、5'トランススプライシング分子及び3'トランススプライシ

30

ング分子が、同じ標的A B C A 4イントロンに結合し、標的イントロン（複数可）の上流及び下流それぞれのエクソンを置換する。

【0254】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される組成物は、疾患または障害を治療する方法として個体に投与される。いくつかの実施形態では、個体は、本明細書に記載のA B C A 4関連網膜症などの遺伝性疾患を有する。いくつかの実施形態では、個体は、本明細書に記載のA B C A 4関連網膜症などの遺伝性疾患を有するリスクがある。いくつかの実施形態では、個体は、タンパク質（例えば、A B C A タンパク質）の量が不十分であるか、またはタンパク質（例えば、A B C A タンパク質）の活性が不十分であることに起因する疾患または障害を有するリスクが高い。個体が、タンパク質の量が不十分であること、またはタンパク質の活性が不十分であることに起因する疾患または障害を有する「リスクが高い」場合、方法は、予防的（preventative）または予防的（prophylactic）治療を含む。例えば、個体は、疾患の家族歴により、そのような疾患または障害を有するリスクが高くなり得る。典型的には、そのような疾患または障害を有するリスクが高い個体は、予防的治療から恩恵を受ける（例えば、疾患または障害の発症または進行を予防するまたは遅延させることによる）。

40

【0255】

本明細書に記載のトランススプライシング分子を有する組換えアデノ随伴ウイルスの有効濃度は、1ミリリットル当たり約 $10^8 \sim 10^{13}$ ベクターゲノム（vg/mL）の範囲である。r A A V感染単位は、McLaughlin et al., J. Virol

50

・ 1988, 62:1963に記載されるように計測される。別の実施形態では、濃度は、 $10^9 \sim 10^{13}$ v g / mL の範囲である。別の実施形態では、有効濃度は、約 1.5×10^{11} v g / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 5×10^{11} v g / mL である。一実施形態では、有効濃度は、約 1.5×10^{10} v g / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 2.8×10^{11} v g / mL である。さらに別の実施形態では、有効濃度は、約 1.5×10^{12} v g / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 1.5×10^{13} v g / mL である。

【0256】

いくつかの実施形態では、濃度は、 $4.0 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ v g / 眼の範囲である。いくつかの実施形態では、有効濃度は、約 1.0×10^{11} v g / 眼である。いくつかの実施形態では、有効濃度は、約 4.3×10^{10} v g / 眼である。

10

【0257】

毒性などの望ましくない影響、ならびに眼への投与に関連する他の問題、例えば、網膜異形成及び剥離のリスクを低減させるために、ウイルスの最低有効用量（送達される総ゲノムコピー）が利用されることが望ましい。本明細書に記載のトランススプライシング分子を有する組換えアデノ随伴ウイルスの有効用量は、1用量当たり（すなわち、1回の注射当たり）約 $10^8 \sim 10^{13}$ ベクターゲノム（v g）の範囲である。一実施形態では、用量は、 $10^9 \sim 10^{13}$ v g の範囲である。別の実施形態では、有効用量は、約 1.5×10^{11} v g である。別の実施形態では、有効用量は、約 5×10^{11} v g である。一実施形態では、有効用量は、約 1.5×10^{10} v g である。別の実施形態では、有効用量は、約 2.8×10^{11} v g である。さらに別の実施形態では、有効用量は、約 1.5×10^{12} v g である。別の実施形態では、有効濃度は、約 1.5×10^{13} v g である。これらの範囲または他の単位でのさらに他の用量は、個体の年齢、投与されている組成物、及び特定の障害；標的細胞、及び進行性の場合、障害が発症した程度を含む、治療される個体の身体的状態を考慮して担当医によって選択され得る。

20

【0258】

組成物は、治療される領域のサイズ、使用されるウイルス力価、投与経路、及び所望の方法の効果に応じて、約 $50 \mu\text{L} \sim 1 \text{ mL}$ （範囲内の全ての数字を含む）の体積で送達される。一実施形態では、体積は、約 $50 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $70 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、 $100 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $125 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $150 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $175 \mu\text{L}$ である。さらに別の実施形態では、体積は、 $200 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $250 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $300 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $350 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $400 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $450 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $500 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $600 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $750 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $850 \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、体積は、約 $1,000 \mu\text{L}$ である。

30

【0259】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のRNAエクソンエディター（例えば、配列番号90、配列番号78、または配列番号69を含むRNAエクソンエディター）を含む組成物は、注射に好適な懸濁液として供給され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のRNAエクソンエディター（例えば、配列番号90、配列番号78、または配列番号69を含むRNAエクソンエディター）は、小ゲージカニューレを介して $300 \mu\text{L}$ の定量で経扁平部硝子体切除に続いて網膜下注射によって投与され得る。

40

【0260】

一実施形態では、rAAV組成物の体積及び濃度は、標的細胞を有する特定の解剖領域のみが影響を受けるように選択される。別の実施形態では、rAAV組成物の体積及び／または濃度は、眼のより大きな部分に到達するためには、より多い量である。同様に、他の臓器への投与のために用量を調整する。

50

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

、標的細胞（複数可）中の標的 A B C A 4 タンパク質の 6 9 % 以上、標的細胞（複数可）中の標的 A B C A 4 タンパク質の 7 0 % 以上、標的細胞（複数可）中の標的 A B C A 4 タンパク質の 7 5 % 以上、標的細胞（複数可）中の標的 A B C A 4 タンパク質の 8 0 % 以上、標的細胞（複数可）中の標的 A B C A 4 タンパク質の 8 5 % 以上、標的細胞（複数可）中の標的 A B C A 4 タンパク質の 9 0 % 以上、標的細胞（複数可）中の標的 A B C A 4 タンパク質の 9 5 % 以上」。

【 0 2 6 3 】

機能的 A B C A 4 タンパク質レベルの増加が言及される場合、この増加は臨床的に有意であり得る。この増加は、治療を受けていない対象における機能的 A B C A 4 タンパク質のレベルに対する場合もあれば、同様の対象の集団における機能的 A B C A 4 タンパク質の量に対する場合もある。この増加は、治療前の対象または同様の対象の集団と比較して、機能的な A B C A 4 タンパク質の少なくとも 1 0 % の増加であり得る。この増加は、治療前の対象または同様の対象の集団と比較して、機能的な A B C A 4 タンパク質の少なくとも 2 0 % の増加であり得る。この増加は、治療前の対象または同様の対象の集団と比較して、機能的な A B C A 4 タンパク質の少なくとも 4 0 % の増加であり得る。この増加は、治療前の対象または同様の対象の集団と比較して、機能的な A B C A 4 タンパク質の少なくとも 5 0 % の増加であり得る。この増加は、治療前の対象または同様の対象の集団と比較して、機能的な A B C A 4 タンパク質の少なくとも 8 0 % の増加であり得る。この増加は、治療前の対象または同様の対象の集団と比較して、機能的な A B C A 4 タンパク質の少なくとも 1 0 0 % の増加であり得る。この増加は、治療前の対象または同様の対象の集団と比較して、機能的な A B C A 4 タンパク質の少なくとも 2 0 0 % の増加であり得る。この増加は、治療前の対象または同様の対象の集団と比較して、機能的な A B C A 4 タンパク質の少なくとも 5 0 0 % の増加であり得る。

【 0 2 6 4 】

いくつかの場合では、本明細書に記載の方法及び使用は、対象（例えば、A B C A 4 関連網膜ジストロフィーを有する対象）の B C A 4 関連リポフスチンを減少させる。他の場合では、本明細書に記載の方法及び使用は、対象（例えば、A B C A 4 関連網膜ジストロフィーを有する対象）の A 2 E 蓄積を減少させる。

【 0 2 6 5 】

記載された方法及び使用の各々について、治療または使用は、さらなる損傷の発生を防ぐために、または軽度、中等度、または進行した疾患を有する組織を救済するために使用され得る。本明細書で使用される、「救済」という用語は、疾患の進行を予防すること、未損傷の細胞への損傷の拡大を防止すること、及び／または損傷細胞における損傷を改善することを意味する。

【 0 2 6 6 】

したがって、一実施形態では、組成物は、疾患の発症前に投与される。別の実施形態では、組成物は、症状の発症前に投与される。別の実施形態では、組成物は、症状の発症後に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、9 0 % 未満の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、1 0 % 超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、2 0 % 超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、3 0 % 超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、4 0 % 超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、5 0 % 超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、6 0 % 超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、7 0 % 超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。

さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、80%超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、90%超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。さらに別の実施形態では、組成物は、例えば参照組織と比較して、95%超の標的細胞が機能しているかまたは残っている場合に投与される。

【0267】

さらに別の実施形態では、上記の方法または使用のいずれかは、別の療法または二次療法と組み合わせて行われる。療法は、これらの変異もしくは欠損、またはそれに関連する影響のいずれかを予防する、阻止する、または改善するのに役立つ任意の現在知られている、またはまだ知られていない療法であり得る。二次療法は、上記の医薬組成物の投与前、投与と同時、または投与後に投与することができる。一実施形態では、二次療法は、神経栄養因子、抗酸化剤、及び／または抗アポトーシス剤の投与など、網膜細胞の健康を維持するための非特異的アプローチを含む。非特異的アプローチは、タンパク質、組み換えDNA、組み換えウイルスベクター、幹細胞、胎児組織、または遺伝子改変細胞の注射を通じて達成される。後者は、カプセル化された遺伝子改変細胞を含み得る。

【0268】

別の実施形態では、本方法は、治療の有効性を判定するために、機能検査及び撮像検査を行うことを含む。これらの検査には、米国特許第8,147,823号；国際特許公開第WO2014/011210号または同第WO2014/124282号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ERG及びインビボ網膜撮像が含まれる。さらに、視覚視野検査、視野測定（例えば、運動的視野測定または完全視野静的視野測定）及び微小周囲測定、細隙灯検査、眼圧測定、拡張眼底眼科、可動性検査、視力、及び／または色覚検査が行われ得る。有効性を、本明細書に記載される核酸トランススプライシング分子及びそれによってコードされるRNAエクソンエディター、またはそれを含む組成物（例えば、医薬組成物）の投与後の時点で測定して、ABCA4関連網膜症の症状が、例えば、治療された対象において未治療の対象と比較して減少したかを判定する。いくつかの実施形態では、有効性は、例えば、視力及び／または色覚の改善、またはA2E蓄積を含めたりポフスチンの減少によって測定され得る。

【0269】

特定の実施形態では、非侵襲的な網膜撮像及び機能検査を実施して、治療の標的となる保持された光受容体の領域を同定することが望ましい。これらの実施形態では、1つ以上の網膜下注射（複数可）の正確な位置（複数可）を決定するために、臨床診断検査が使用される。これらの検査では、ERG、周囲測定、網膜の層のトポグラフィマッピング、ならびに共焦点走査レーザー検眼鏡（cSLO）及び光コヒーレンストモグラフィ（OCT）を用いたその層の厚さの測定、適応光学（AO）による錐体密度のトポグラフィマッピング、眼機能検査などが含まれ得る。撮像及び機能検査を考慮して、いくつかの実施形態では、保持された光受容体の異なる領域を標的とするために、同じ眼で1回以上の注射が実行される。

【0270】

これらの方法で使用する場合、各注射の体積及びウイルス力価は個別に決定され、同じまたは反対側の眼に行われる他の注射と同じであってもよく、または異なってもよい。別の実施形態では、眼全体を治療するために、単回のより大量の注射が行われる。用量、投与、及びレジメンは、本開示の教示を考慮して、主治医によって決定され得る。

【0271】

以下の実施例は、本明細書に記載される実施形態の範囲を限定するものではない。当業者であれば、本発明の趣旨及び範囲によって包含されることが意図される変更を、以下の実施例において行うことができることを理解するであろう。

【実施例】

【0272】

以下の実施例は、上記の組成物を生成するための、及び上記の組成物を使用するための

非限定的な方法を提供する。

【0273】

実施例1．培養ヒト細胞におけるトランススプライシング効率

各トランススプライシング分子において様々な順列を試験するハイスループットのNGSベースのアッセイを使用して、ABCA4トランススプライシング分子を培養ヒト細胞において試験した。結果を図1に示す。この実施例における各ABCA4トランススプライシング分子は、CMVプロモーター及び天然5'UTR、ならびに機能的ABCA4CDSを含めた5'調節ドメインを含んだ。トランススプライシング分子間で異なったドメインは、リンカードメイン、結合ドメイン(BD)、3'DS、及びターミネーターであった。この実施例では、トランススプライシング分子をプラスミドとして細胞にトランスフェクトし、既知のRNA-seq法に従って固有分子識別子(UMI)によって検出した。トランススプライシング効率のリードアウトは、特定のドメインが、多くまたは全ての順列にわたってトランススプライシングの改善を示したことを示す。例えば、ここでは、配列番号27の40-merリンカーは、配列番号29及び31のより短いリンカーと比較して、予想外に、最も高いトランススプライシング効率を示した。また、配列番号18を有する結合ドメインは、試験したすべての結合ドメインの中で最も高いトランススプライシング効率を呈した。また、リンカードメイン、BD、及びスプライス部位(SS)の特定の組み合わせが、驚くべきレベルの相対的なトランススプライシング効率をもたらしたことも注目すべきである。

10

20

【0274】

実施例2．スプライス部位の評価

スプライス部位を、総計550個のリンカー配列を有するABCA4核酸トランススプライシング分子のライブラリにわたって次世代シーケンシングを使用して試験した。試験した5つのスプライス部位は、CAAGGT、GTAAGT、GTAAGC、GTAAGG、及びGTAAGTであった。それによってコードされるRNA配列は、本明細書ではそれぞれ、GUAAGU、GUAAGG、GUAAGC、及びGUAACUと称される。図2は、任意のユニットにおけるトランススプライシング活性(エクソン編集活性)を示す。これらの結果は、GTAAGTを含むスプライス部位が、試験した5つのスプライス部位のうちで最も高いトランススプライシング活性をもたらしたことを示す。したがって、本明細書に記載の例示的なスプライシングドメインは、GTAAGTによってコードされるGUAAGTを含む。

30

【0275】

実施例3．培養ヒト細胞におけるABCA4トランススプライシング

培養したヒト細胞(HEK-293T)細胞に様々なABCA4トランススプライシング分子(RNAエクソンエディター)をコードするAAVをMOI=100,000で形質導入し、3日間インキュベートした後、細胞を採取した。AAV-56は、配列番号40を有するABCA4トランススプライシング分子をコードするAAVベクターである。AAV-274は、配列番号41を有するABCA4トランススプライシング分子をコードするAAVベクターである。AAV-443は、配列番号42を有するABCA4トランススプライシング分子をコードするAAVベクターである。AAV-497は、配列番号43を有するABCA4トランススプライシング分子をコードするAAVベクターである。AAV-505は、配列番号44を有するABCA4トランススプライシング分子をコードするAAVベクターである。

40

【0276】

膜タンパク質抽出を、従来の方法を使用して行った。簡潔に述べると、透過処理緩衝液及びプロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤を細胞に添加し、ボルテックスし、4℃で10分間インキュベートした。透過処理した細胞を遠心分離し、ペレットをプロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤を含む可溶化緩衝液中に再懸濁させた。サンプルを4℃で30分間インキュベートした後、遠心分離した。膜タンパク質を含む上清を移し、-80℃で保存した。

50

【0277】

従来の方法によってRNAを抽出し、RT-qPCRによって定量した。オンターゲットABCA4トランススプライシングのパーセントを、トランススプライシング分子のコピー数に対して正規化した。各トランススプライシング分子（エクソン編集）によって置換されたABCA4 mRNAのパーセンテージを示すRNAの結果を図3Aに示す。ウエスタンブロットを図3Bに示しており、抗ABCA4C末端抗体、及び負荷対照のために抗NaK/ATPase抗体を使用した。

【0278】

AAV-274、AAV-443、AAV-497、及びAAV-505は各々、AAV-56と比較して改善されたトランススプライシング効率を示した（それぞれ、23.8%に対して37.3%、38.7%、28.5%、及び28.5%）。AAV-274及びAAV-443は各々、AAV-56と比較して、有意に高いオンターゲットコピー数を示した。

【0279】

類似のアッセイを、AAV-443-2（配列番号45）とAAV-652（配列番号46）との間のトランススプライシング効率を比較するために、ABCA4ノックイン細胞を陽性対照として及び未治療HEK293T細胞を陰性対照として使用して行った。図3Cは、AAV-443-2及びAAV-652の各々の複製におけるタンパク質発現を示すウエスタンブロットを示す。結果を、図3Dにおいて倍率変化として示す。注目すべきことに、ABCA4タンパク質レベルの完全な回復がABCA4ノックアウト細胞において観察された（図3D）。

【0280】

実施例4．非ヒト霊長類におけるABCA4トランススプライシング分子の評価

ABCA4の劣性遺伝変異は、スターガルト病1及び錐体桿体ジストロフィー3を含む進行形の失明の発症の原因である。ABCA4の6882bpのコード配列は、単一のAAVベクターでその全体を送達するには大きすぎる。さらに、遺伝子全体で何百もの疾患の原因となる変異が見出されるにつれて、単一の塩基編集アプローチでは多くの患者に対処できなくなるであろう。ラージスケールエクソン編集溶液を、内因性ABCA4 pre-mRNAにトランススプライシングすることが可能な治療用RNA構築物を送達するように設計し、それによって、トランススプライシングによって送達される機能的エクソンに局在化する無数の変異を補正する機能的エクソンを導入した。実際、単一のAAVベースの構築物を使用したRNAトランススプライシングは、すべての患者の変異の約60%に対処することができる。本実施例は、健常アフリカミドリザル（AGM）非ヒト霊長類（NHP）において、網膜下注射後にインビボでAAV-ABCA4エクソンエディターの編集効率及び忍容性を報告する。

【0281】

エクソンエディター443（配列番号47）、274（配列番号48）、497（配列番号49）、及び505（配列番号50）をAAV8ベクターにパッケージングした。AAV8ベクター調製物を、共通の調節エレメントのqPCRを使用して力価決定し、スタンナーで全及び空のカプシドの測定、及びエンドトキシンレベルの測定を行い特性評価した。結果が以下の表2に示される。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. AAV特性評価

エクソンエディター	力価 (vg/mL)	フル%	エンドトキシン (EU/mL)
443	1×10^{12}	41.5	< 0.5
274	1×10^{12}	46.0	< 0.5
497	1×10^{12}	43.0	< 0.5
505	1×10^{12}	23.9	< 0.5

10

【0282】

各調製物についてのVP1、VP2、及びVP3タンパク質を、 $5 \times 10 \text{ vg}$ / ウェルで実行するSDSゲルで検出し、可視化した（図4）。

【0283】

配列番号15の5'調節ドメインを含有するGFPコードAAVベクター（すなわち、CMVプロモーター及び天然5' ABCA4非翻訳領域を含有する）を、アフリカミドリザル（AGM）非ヒト霊長類（NHP）に網膜下投与した。GFPタンパク質の発現を図5A～5Cに示す。図5Aは、GFPタンパク質を示すライブ画像である。図5Bは、28日目における陰性対照における網膜切片（光受容体及び脈絡膜が標識されている）の抗GFP免疫組織化学（IHC）染色を示す顕微鏡写真である。図5Cは、28日目の、GFPエクソンエディターで治療した動物における網膜切片（光受容体及び脈絡膜が標識されている）の抗GFP IHC染色を示す顕微鏡写真である。これらの結果は、5'調節ドメインが、インビボの光受容体において堅牢なタンパク質発現をもたらすことを示している。

20

【0284】

ABCA4エクソンエディターをAAV8として製剤化し、1眼当たり2ブレイブとしてAGM NHPに網膜下投与した。各注射は、 $1 \times 10^{11} \text{ vg}$ を含む $100 \mu\text{l}$ であった。ベースライン、網膜下注射後、14日目及び28日目のcSLO及びOCT画像を図6に示す。注射後に上方及び下方のブレイブが観察された。ブレイブ領域のわずかな「影」が28日目まで観察された。28日目に、ビヒクル、エクソンエディター443、及びトランススプライシング分子274のカラー眼底撮像を使用して、臨床スコアリングを実施した（図7）。ビヒクル、エクソンエディター443、及びトランススプライシング分子274の合計臨床スコアは、それぞれ、17、0、及び1であった。

30

【0285】

ABCA4エクソンエディターによるエクソン編集を、RNAを定量するための定量RT-PCRと、ABCA4タンパク質を定量するためのウエスタンブロットとを使用して、AGM NHP網膜で評価した。トランススプライシングABCA4 mRNAを測定するために、定量RT-PCRを使用して、図8Aに示すように、ヒト配列とAGM配列との間のキメラmRNAにおける接合部を検出した。各ABCA4エクソンエディターについて、トランススプライシングmRNAを、 10 ng RNA当たりの編集コピーとして定量化した（図8B及び表4）。

40

50

【表 3】

表 4. 編集コピー／10 ng RNA

エクソンエディター	平均	標準偏差
(ビヒクル)	0	0
443	464880.29	464880.29
274	45380.29	45380.29
497	328749.88	328749.88
505	30594.16	30594.16

10

【0286】

各 ABCA4 エクソンエディターについて、タグ付きの完全長トランススプライシング ABCA4 タンパク質を、網膜からの膜抽出物中でタグのウエスタンブロットによって定量化した。エクソンエディター 443、274、497、及び 505 の完全長 ABCA4 発現を示す例示的なウエスタンブロットを、図 9 に示す。

【0287】

発現したタンパク質がキメラヒト／AGM（したがってトランススプライシング産物）であることを確認するために、質量解析実験を行った。完全 AGM NHP ABCA4 とキメラの編集 ABCA4 とを区別する固有のペプチドを、免疫親和性濃縮を MRMS とカップリングすることにより同定した。ペプチドの同一性は、標準物質にスパイキングすることによって確認した。ビヒクル治療網膜（図 10A）では、NHP ペプチドのみが観察された。エクソンエディター治療網膜（図 10B）では、ヒト及び NHP ペプチドの両方が検出された。この結果は、完全長エクソン編集 mRNA が翻訳されたことを確認する。

20

【0288】

試験全体を通じて、眼の健康をモニタリングした。一般に、眼の健康は、網膜厚（図 11A）、眼圧（図 11B）、合計臨床スコア（図 11C）、硝子体細胞スコア（図 11D）、水性細胞スコア（図 11E）、及び炎症性角質粒子（図 11F）で測定されるように、AAV8 網膜下送達エクソンエディターによる治療後維持された。網膜厚は、試験全体を通じて正常のままであった（図 11A）。眼圧測定では、ビヒクル治療眼では 7 日目に眼圧が低下し、その後の時点で安定したことが示された（図 11B）。エクソンエディター治療眼では、眼圧は健康範囲内を維持した。眼の炎症を、細隙灯顕微鏡検査及び眼底検査により評価した（図 11C～図 11F）。エクソンエディターで治療した個々の眼は、いくらかの軽度～中等度の炎症の徴候を示したが、特定のエディターまたは AAV 調製物に対して一貫したものではなく、これらの観察結果が個々の眼での処置に起因したことが示唆された。

30

【0289】

試験に参加した全ての動物は、良好な健康状態を維持した。体重（図 12A）及び心拍数（図 12B）の測定では、エクソンエディターの投与によって引き起こされる有害な全身的影響を示す臨床徴候は明らかにされなかった。ケージサイドでの観察を毎日実施し、食物摂取量をモニタリングしたが、変化は見られなかった。

40

【0290】

本明細書に記載される試験は、NHP 網膜における臨床的に関連する効率における最初のトランススプライシング報告を構成する。エクソンの編集及び置換は、網膜下注射後のアフリカミドリザル非ヒト霊長類においてインビボで効率性と忍容性を例証した。網膜下に送達された全ての AAV 媒介性エクソン編集分子は、耐容性が良好であった。これらの試験では、ABCA4 関連網膜症を治療する RNA エクソン編集の可能性が強調されている。

【0291】

50

実施例 5 . 例示的な A B C A 4 トランススプライシング分子のインビトロでの評価

A B C A 4 タンパク質 K O 細胞株にトランスフェクションした後の例示的な A B C A 4 R N A エクソンエディターの活性

本明細書上記のように、B 6 と呼ばれる H E K 2 9 3 T ベースの細胞株を、高い A B C A 4 R N A 及びタンパク質レベルの両方を発現するように操作した。これは、C R I S P R 媒介性の相同性指向修復 (H D R) を介した、内因性 A B C A 4 プロモーターとエクソン 1 との間での構成的 C A G G S プロモーターのノックイン (K I) を介して達成された。

【0292】

標的化された天然 p r e - m R N A を補正する A B C A 4 R N A エクソンエディターの能力を特徴付け、トランススプライシングオンターゲット (O N T) R N A を生成し、完全長 A B C A 4 タンパク質をコードするモデル系を作成するために、タンパク質ノックアウト (K O) 細胞株 (1 7 + 0 6 と呼ばれる) を、B 6 細胞株に基づいて操作した。1 7 + 0 6 細胞は高レベルの A B C A 4 R N A を産生し続けたが、B 6 細胞株とは対照的に、1 7 + 0 6 細胞は A B C A 4 タンパク質を産生しない。1 7 + 0 6 細胞の操作は、C R I S P R ならびにエクソン 3 及び 4 を標的とするガイド R N A (g R N A) を使用して A B C A 4 遺伝子コード配列に変異を導入することによって達成した。R T - q P C R により、1 7 + 0 6 細胞株における A B C A 4 R N A 発現の持続性が確認され、ウエスタンブロット解析により、A B C A 4 タンパク質翻訳が無効になっていることが示された。図 3 C を参照されたい。

【0293】

A B C A 4 K O (1 7 + 0 6) 細胞にいくつかの A B C A 4 R N A エクソンエディター構築物をトランスフェクトして、トランススプライシング効率及びその結果として生じる O N T トランススプライシング A B C A 4 タンパク質の発現を評価した。構築物は同一であったが、図 1 9 A 及び 1 9 B 中の 4 つのレーンのラベルに反映されるように、レメントについてはそれぞれを区別するものとして示された。図 1 3 に図示される例示的な A B C A 4 R N A エクソンエディターを含む例示的な A B C A 4 R N A エクソンエディター構築物 (5' U T R ~ M A L A T 1 - M a s c R N A (抗 - m u t 1 ; 配列番号 7 8) は、高レベルのトランススプライシング (約 2 0 % の A B C A 4 R N A の置換) 及び高レベルの O N T トランススプライシング A B C A 4 タンパク質を駆動する一方で他の構築物と比較して N S P のレベルを低減させることから、この解析からリード候補として浮上した。例示的な A B C A 4 R N A エクソンエディターの活性を図 1 9 A 及び 1 9 B のレーン 4 に示す。図 1 9 A 及び 1 9 B に示されるように、例示的な A B C A 4 R N A エクソンエディターは、本明細書に詳細に記載される 4 0 m e r リンカー + 3 X U B S + A R E エレメントを含む。

【0294】

上記に加えて、図 1 9 A 及び 1 9 B は、例示的な A B C A 4 5' 構築物の文脈において、単独及び組み合わせた、示される A B C A 4 R N A エクソンエディター (R T M) エレメントの各々の活性を示す。図 1 9 A は、示される各構築物についての A B C A 4 R N A の置換パーセントを示すヒストグラムを提示する。置換パーセントは、各構築物について約 2 0 ~ 3 0 % の範囲にある。興味深いことに、U 1 結合部位 (3 X U B S) (配列番号 7 2) の 4 0 m e r + 3 x リピートの組み合わせは、4 0 m e r 単独 (配列番号 2 7) と比較して、A B C A 4 R N A の置換パーセントが増加する傾向を示す。図 1 9 B は、4 0 m e r (配列番号 2 7)、4 0 m e r + 3 X U B S (配列番号 7 2)、4 0 m e r + A U リッチエレメント (配列番号 8 6 の配列 3 4 4 4 ~ 3 5 2 9)、及び 4 0 m e r + 3 X U B S + A R E (配列番号 7 3) を含む示された構築物が、トランススプライシング A B C A 4 タンパク質 (O N T) を発現し、組み合わせて、これらの R T M エレメントが、4 0 m e r 単独と比較して、O N T レベルの増加傾向を呈することを示すウエスタンブロットを提示する。ウエスタンブロットはまた、4 0 m e r + 3 X U B S、4 0 m e r + A R E、及び 4 0 m e r + 3 X U B S + A R E の組み合わせの各々が、4 0 m e r 単

10

20

30

40

50

独と比較して、非スプライシングタンパク質（NSP）減少に対してコンビナトリアル効果を呈することも示す。NSP低減に対する組み合わせ効果は、40mer（配列番号27）単独と比較して、40mer+3XUBS+ARE（配列番号73）で特に顕著である。最小のNSP状況（エクソンエディターにおけるスライズドナー配列の直後に終止コドンを含む）では、独立してNSPレベルを低減させる2つの戦略の組み合わせ（3xUBS及びAUリッチエレメントの包含）は、NSPレベル低減に対する協調効果を示した。この組み合わせは、40merのみと比較してNSPレベルを約70%減少させ、ノンストップエクソンエディターで見られるレベルまで低減させた。

【0295】

40mer+3XUBS+ARE（配列番号73）のカセットは、40merのみ、40mer+3XUBS、または40mer+AREを含むRNAエクソンエディターのものと比較して、NSPレベルのさらなる有意な低減をもたらすことは注目すべきである。したがって、エレメントのこの組み合わせ（40mer+3XUBS+ARE；配列番号73）は、本明細書に記載されるものなどのトランススプライシング分子の文脈において、特に有利な特性を示す。

【0296】

ABCA4 RNAエクソンエディターの文脈において提示された結果を、ABCA4以外の遺伝子の標的pre-mRNAにおいて異なるイントロンを標的とする他のRNAエクソンエディターの文脈において再現した。例えば、図27及び28（これらは以下でより詳細に記載される）を参照されたく、40mer単独（配列番号27）と比較した、40mer+3XUBS（配列番号72）、40mer+ARE（配列番号86の配列3444~3529）、及び40mer+3XUBS+ARE（配列番号73）の各々のNSPレベルを低減させる能力が図示される。異なるRNAエクソンエディターの文脈において、40mer+3XUBS（配列番号72）、40mer+ARE（配列番号86の配列3444~3529）、及び40mer+3XUBS+ARE（配列番号73）の配置及び位置決めは、本明細書に記載され、図13に示されるABCA4エクソンエディターのそれと一致する。

【0297】

図27Bに示すように、イントロンA標的化RNAエクソンエディターに3XUBS及びAREを含めることによってコンビナトリアル的にNSPを低減させ、その結果が図示される。イントロンA標的化RNAエクソンエディターは、ABCA4とは異なるpre-mRNA中のイントロンを標的とする。簡潔に述べると、HEK293細胞を、示されたRNAエクソンエディターエレメント（40mer、40mer+3XUBS、40mer+ARE、及び40mer+3XUBS+ARE）を含むリンカー領域が異なるイントロンA標的化RNAエクソンエディターでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に細胞を採取し、RT-qPCRによってトランススプライシング効率に関してアッセイした（図27A）か、またはウエスタンブロット解析に供した（図28B）。イントロンA標的化エクソンエディターにおいて、本発明者らは、40mer単独と比較して40mer+3XUBSがNSPレベルを約75%低減させ、40mer単独と比較して40mer+AREがNSPレベルを約40%低減させ、40mer単独と比較して40mer+3XUBS+AREがNSPレベルを88%低減させた（図27B）ことを示した。

【0298】

図28Bに示すように、イントロンB標的化RNAエクソンエディターに3XUBS及びAREを含めることによってコンビナトリアル的にNSPを低減させ、その結果が図示される。イントロンB標的化RNAエクソンエディターは、ABCA4とは異なり、イントロンA標的化RNAエクソンエディターによって標的化されるpre-mRNAとは異なるpre-mRNA中のイントロンを標的とする。簡潔に述べると、HEK293細胞を、示されたRNAエクソンエディターエレメント（40mer、40mer+3XUBS、40mer+ARE、及び40mer+3XUBS+ARE）を含むリンカー領域が異なる

イントロンB 標的化RNAエクソンエディターでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に細胞を採取し、RT-qPCRによってトランススプライシング効率に関してアッセイした(図28A)か、またはウエスタンブロット解析に供した(図28B)。イントロンB 標的化エクソンエディターにおいて、本発明者らは、40mer単独と比較して40mer+3XUBSがNSPレベルを約38%低減させ、40mer単独と比較して40mer+AREがNSPレベルを約33%低減させ、40mer単独と比較して40mer+3XUBS+AREがNSPレベルを66%低減させた(図28B)ことを示した。

【0299】

ABCA4 KO細胞株の形質導入後の例示的なABCA4 RNAエクソンエディターの用量反応評価

ABCA4 RNAエクソンエディター構築物の薬理及び作用機序の信頼性を実証するために、本発明者らは、図13に図示される例示的なABCA4 RNAエクソンエディター(配列番号78を含む配列番号90)を含む例示的なABCA4 RNAエクソンエディター構築物(ABCA4-01)をサロゲートAAV2カプシドにパッケージングし、ABCA4 KO細胞株における用量反応を評価した。ABCA4 KO細胞を、図13に図示される例示的なABCA4 RNAエクソンエディター(配列番号78を含む配列番号90)を含むAAV2-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物の増加させたMOI $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ ($1e3 \sim 1e6$) で形質導入し、続いて膜タンパク質単離及びABCA4 特異的Abを用いたウエスタンブロッティングした。図13(配列番号90)に図示される例示的なABCA4 RNAエクソンエディターを含むAAV2-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物のMOIを増加させることは、オンターゲット(ONT) ABCA4タンパク質発現及びRNA置換%に反映されるエクソン編集のレベルの増加をもたらした。図21A及び21Bを参照されたい。

【0300】

実施例6. オフターゲット(OFT) 発見次世代シーケンス(NGS)法(OFT-seq)

OFT RNAシーケンシング(OFT-seq)は、本発明者らによって開発されたグローバルなオフターゲット発見方法である。この方法は、プラスミドをトランスフェクトしたか、またはABCA4エクソンエディターをコードするAAVもしくは関連する対照を形質導入した細胞、NHP神経網膜サンプル、またはヒト網膜外植体のいずれから抽出したRNAを利用する。エクソン22の3'の上流にあるエクソンエディター特異的コドン最適化CDSを、標的化プライマー(遺伝子特異的プライマー:GSP)領域として使用する。この方法はエクソンエディターの上流配列のみを標的とするため、偏りのないグローバルオフターゲット非ABCA4 RNA配列をキャプチャするために使用することができる。したがって、この方法では、非スプライシングエクソンエディター、自己スプライシングエクソンエディター、ならびに目的のONT編集ABCA4 RNA及びOFTの捕捉が可能になる(図25)。次に、これらの配列を、Illumina短リードNGSプラットフォームで配列決定する。出力NGSリードは、内部で開発された独自の計算的バイオインフォマティクス解析ツールで処理される。この解析によって、全体的なシーケンシングクオリティ及び標的ジャンクション配列、ならびに各バリエーション配列についての定量的情報が提供される。

【0301】

簡潔に述べると、最初にRNAサンプルをDNaseで処理して、残留するゲノムDNA、プラスミドDNA/AAVDNA、及び可能性のある汚染物質DNAを排除した。次いで、リボソームRNA(rRNA)枯渇またはポリA濃縮のいずれかを用いてRNAの濃縮を実施した。次いで、濃縮したRNAサンプルを断片化した。Illuminaアダプターライゲーション及びcDNA調製後、GSP標的化ABCA4コドン最適化配列及びアダプター標的化プライマーをPCRに使用した。このステップは、エクソンエディター、ONT、OFT、及び自己スプライシングエクソンエディターを含むABCA4コード

ン最適化配列を有する標的配列を増幅する。

【0302】

実施例7．潜在性スプライス部位耐性A B C A 4 C D Sの生成

本発明者らは、インビトロ及びインビボ（NHP）結果の大規模な実験的及び計算的解析を通じて、潜在性スプライス部位が、本明細書に記載のA B C A 4エクソンエディターの文脈において利用されることを発見した。本発明者らは、オフターゲット（OFT）ライブラリの生成及びそのバイオインフォマティクス解析を含む、大規模な実験及び解析を実施し、驚くべきことに、エクソン1～22を含むA B C A 4コード配列（C D S）内に、本明細書に記載のトランススプライシング分子の文脈において潜在性スプライシングが発生する多数の位置を発見した。本明細書に記載のトランススプライシング分子のトランススプライシング効率及び忠実度を改善するために、複数の潜在性スプライス部位の配列を改変して、同義変異の導入により潜在性スプライス部位が障害され及び／または無効になるようにした。そのようなアプローチは、遺伝コードの縮重を利用し、これにより、コードされるアミノ酸に変化をもたらすことなく、潜在性スプライス部位の使用を軽減するために所望の改変を導入することが可能になる。

10

【0303】

上記に加えて、次世代シーケンシング（NGS）アプローチを使用して、本発明者らは、潜在性スプライス部位を同定し、かつエクソン1～22を含むA B C A 4 C D S内の異なる位置の各々における潜在性スプライスの使用頻度を定量化し、それによってデータ駆動型の、そこでの使用される潜在性スプライスを軽減することを優先したプロトコルを確立した。表3及び図26を参照されたい。表3に示すように、同定した潜在性スプライス部位は、同義変異の導入前に組み込まれた百万リードマッピング当たりの平均カウント（CPM）によって決定される使用頻度の高い順に配置されている。したがって、結果及びそのバイオインフォマティクス解析により、トランススプライシング分子の文脈における改善された特性（例えば、潜在性スプライス部位耐性A B C A 4 C D S）及び機能性を有するA B C A 4 C D Sを生成するために改変され得るA B C A 4エクソン1～22における潜在性スプライス部位の優先リストが確立される。

20

【0304】

同義変異の導入後の潜在性スプライスの使用頻度を評価するために、NGSアプローチも実施した。表3及び図26を参照されたい。かかるアプローチによる潜在性スプライス部位の軽減の確認は、配列修飾（同義変異）の構造変化を、それによってもたらされる機能、すなわち、潜在性スプライス部位耐性A B C A 4 C D Sの生成と関連付けた。図26例示的なA B C A 4エクソンエディターにおける、同定された潜在性スプライス部位における同義変異の導入によりもたらされる機能を、同定された潜在性スプライス部位（上パネル）における同義変異の導入前、及び同定された潜在性スプライス部位（下パネル、スプライス部位耐性配列）における同義変異の導入後の潜在性スプライス部位切断の頻度を示すことにより示す。図26は、潜在性スプライス部位の軽減後にスプライシング頻度の有意な低減が観察されることを示す。

30

【0305】

40

50

【表 4－1】

表 3：ABCA4コードドメイン配列（CDS）で同定された潜在性スプライス部位、及びスプライス部位の軽減前後に同定された各スプライス部位におけるスプライシングの頻度を列挙する。配列番号 46 は、同義変異の導入前の例示的な配列を表す；配列番号 79 は、同義変異の導入後の例示的な配列を表す。r t m__p o s 列に示されているヌクレオチド位置は、ATGコドン（翻訳開始部位）の G に対する列 2 または列 3 に示される最後のヌクレオチドの位置を指す。略語「n o t」は、示される配列（配列番号 79）においてヌクレオチドの変化が行われなかったことを示すために使用される；分岐点の略語は「b p」である。

r t m__p o s	スプライス部位軽減前の ABCA4 CDS	スプライス部位軽減後の ABCA4 CDS	補正	スプライス部位軽減前の ABCA4 CDS__a v g__c p m	スプライス部位軽減後の ABCA4 CDS__a v g__c p m	アノテーション
3 0 8 6	ACATGCTGTTCTATGCCAG (配列番号 133)	ACATGCTGTTCTATGCACAA (配列番号 92)	スプライス部位	1 4 8 0. 8 1 4 7 4 5	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	ABCA4 e x 2 1

【表 4 - 2】

2 9 3 1	CACCTTG TCCATCC TCACAG (配列番号134)	CACCTTG TCCATCC TCACTG (配列番号94)	スプライ ス部位	2 5 6 . 3 1 6 5 6 9 6	0	ABCA 4 e x 2 0
2 5 7 6	TCGCTTG GTACCTT GATCAG (配列番号135)	TCGCTTG GTACCTT GATCAA (配列番号96)	スプライ ス部位	1 4 2 . 1 9 0 8 7 6 3	0 . 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	ABCA 4 e x 1 6
3 0 2 9	GCCTTGG CATGTGT CCACAG (配列番号136)	GCCTTGG CATGTGT CCACAG (配列番号97)	n o t	8 7 . 6 3 2 3 6 1 7 1	1 8 3 . 2 3 2 7 2 0 6	ABCA 4 e x 2 0
1 2 7	CTGGTCT TGATCTG GTTAAG (配列番号137)	CTGGTCT TGATCTG GTTACG (配列番号100)	スプライ ス部位	4 8 . 2 7 6 8 8 5 8 1	0	ABCA 4 e x 1
2 3 4 8	TCCTGTG CTTCGCC TGGCAG (配列番号138)	TCCTGTG CTTCGCC TGGCAA (配列番号102)	スプライ ス部位	4 6 . 3 6 8 2 7 3 1	0	ABCA 4 e x 1 5
1 8 3 5	GCGGGTT TGCCTAT CTGCAG (配列番号139)	GCGGGTT TGCATAT CTGCAA (配列番号104)	スプライ ス部位、 分岐点	4 0 . 5 4 4 8 6 0 2 7	0	ABCA 4 e x 1 3
1 2 1 8	CACTCCT GATTCAC CTGCAG (配列番号140)	CACTCCT GATTCAC CTGCTG (配列番号106)	スプライ ス部位	3 4 . 9 0 6 7 1 1	0 . 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	ABCA 4 e x 9
3 0 8 3	AGCACAT GCTGTTC TATGCC (配列番号141)	AGCACAT GCTGTTC TATGCA (配列番号108)	n o t	2 9 . 0 4 5 4 2 3 7 8	0	ABCA 4 e x 2 1

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

2 1 1 0	TGTACCT GGTTCCT GGACAG (配列番号142)	TGTACCT GGTTCCT GGA CTC (配列番号110)	スプライ ス部位	27. 632 90145	0. 871 34275 66	ABCA 4ex1 4
2 6 2 8	TTGGTAC TTTCTTC TACAAG (配列番号143)	TTGGTAC TTTCTTC TACAAG (配列番号111)	n o t	23. 568 65795	25. 48 41631 6	ABCA 4ex1 7
3 1 0 3	CAGCTGA AAGGAAA GTCCCA (配列番号144)	CAACTGA AAGGAAA GTCCCA (配列番号114)	n o t	20. 916 93678	26. 29 90876 4	ABCA 4ex2 1
3 0 9 3	GTTCTAT GCCCAGC TGAAAG (配列番号145)	GTTCTAT GCACAAC TGAAAG (配列番号116)	n o t	20. 024 38495	64. 52 53323 9	ABCA 4ex2 1
7 0 1	CCCTGTG CTCCCTC TCCCAG (配列番号146)	CCCTGTG CTCCCTC TCCCAG (配列番号117)	n o t	18. 785 18611	15. 44 66570 2	ABCA 4ex6
5 2 8	CATCGGC CTGTCTG ACTCAG (配列番号147)	CATCGGC CTGTCTG ACTCTG (配列番号120)	スプライ ス部位	15. 563 67999	0	ABCA 4ex5
1 4 5 1	TCCTAAA CTTCCTC TACAAG (配列番号148)	TCCTAAA CTTCCTC TACAAG (配列番号121)	n o t	14. 497 80466	0	
2 0 1 5	CTGTCTC CATGACT GTGAAG (配列番号149)	CTGTCTC CATGACT GTGAAG (配列番号123)	n o t	12. 292 35941	12. 23 29274 8	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

3 1 7 9	AGCGGAA TGAAGAG GCTCAG (配列番号15 0)	AGCGGAA TGAAGAG GCTCAG (配列番号12 5)	n o t	1 1 . 3 3 8 0 5 3 0 6	9 . 1 6 6 1 6 3 3 9	
2 2 5 4	ATGCTGT GCTTTCT GCTCAG (配列番号15 1)	ATGCTGT GCTTTCT GCTCAG (配列番号12 6)	n o t	9 . 1 9 4 3 6 2 3 2 8	4 4 . 5 9 7 2 8 5 5 3	
1 1 2 4	TTTGTA TGCAATTG ATCCAG (配列番号15 2)	TTTGTA TGCAATTG ATCCAG (配列番号12 8)	n o t	8 . 5 7 4 7 6 2 9 1 2	1 4 . 8 4 6 9 5 5 7 5	
1 9 0 7	TTGGAAT CTACCTC CAGCAG (配列番号15 3)	TTGGAAT CTACCTC CAGCAG (配列番号13 0)	n o t	8 . 1 7 8 3 0 1 4 5 4	2 4 . 7 0 3 3 6 7 5 7	
1 0 9 0	CCTATCT ATTCTTA TGACAG (配列番号15 4)	CCTATCT ATTCTTA TGACAG (配列番号67 1)	n o t	6 . 9 3 9 1 0 2 6 2 1	2 2 . 9 6 0 6 8 2 0 6	
5 5 5	CCTTCTG ATCAACT CTCAAG (配列番号15 5)	CCTTCTG ATCAACT CTCAAG (配列番号67 2)	n o t	6 . 5 4 2 6 4 1 1 6 3	2 7 . 3 1 7 3 9 5 8 4	
2 8 0 1	GGGTATG CGTGAAG AATCTG (配列番号15 6)	GGGTATG CGTGAAG AATCTG (配列番号67 3)	n o t	6 . 1 4 6 1 7 9 7 0 6	0	
3 1 0 4	AGCTGAA AGGAAAG TCCCAG (配列番号15 7)	AACTGAA AGGAAAG TCCCAG (配列番号67 4)	n o t	6 . 0 3 4 6 1 0 7 2 6	0 . 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

3 1 4 7	AGCCATG TTGGAGG ACACAG (配列番号158)	AGCCATG TTGGAGG ACACAG (配列番号675)	n o t	5. 8 6 1 2 8 7 2 2 7	7. 3 3 2 9 3 0 7 1 2	
1 3 3 3	TGGTACT TCTTTGA CAACAG (配列番号159)	TGGTACT TCTTTGA CAACAG (配列番号676)	n o t	5. 7 4 9 7 1 8 2 4 8	1 1. 9 6 1 2 8 5 9 9	
3 1 1 6	AGTCCCA GGAGGAG GCCCAG (配列番号160)	AGTCCCA GGAGGAG GCCCAG (配列番号677)	n o t	5. 1 3 0 1 1 8 8 3 1	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 0 8 2	TCAGGGT GTCTCCA ATGCAG (配列番号161)	TCAGGGT GTCTCCA ATGCAG (配列番号678)	n o t	5. 1 3 0 1 1 8 8 3 1	9. 0 7 5 6 1 6 2 2 5	
3 0 8 4	GCACATG CTGTTCT ATGCC (配列番号162)	GCACATG CTGTTCT ATGCAC (配列番号679)	n o t	5. 1 3 0 1 1 8 8 3 1	0	
1 9 0 4	CAGTTGG AATCTAC CTCCAG (配列番号163)	CAGTTGG AATCTAC CTCCAG (配列番号680)	n o t	4. 9 0 6 9 8 0 8 7 2	7. 9 3 2 6 3 1 9 7 4	
2 8 7 4	CTTCTAC GAGAACC AGATCA (配列番号164)	CTTCTAC GAGAACC AGATCA (配列番号681)	n o t	4. 5 1 0 5 1 9 4 1 5	5. 4 0 9 1 5 0 8 6 9	
3 0 8 8	ATGCTGT TCTATGC CCAGCT (配列番号165)	ATGCTGT TCTATGC ACAAC (配列番号682)	n o t	4. 2 8 7 3 8 1 4 5 6	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

3040	TGTCCAC AGCACAA CATCCT (配列番号166)	TGTCCAC AGCACAA CATCCT (配列番号683)	not	3.8909 19998	0.871 34275 66	
250	AACAATC CCTGTTT TCAAAG (配列番号167)	AACAATC CCTGTTT TCAAAG (配列番号684)	not	3.8909 19998	2.614 02827	
2820	GGTAAAG ATTTTGT AGCCCT (配列番号168)	GGTAAAG ATTTTGT AGCCCT (配列番号685)	分岐点	3.7793 51019	2.795 12259 9	
3160	GACACAG GCCTCCA CCACAA (配列番号169)	GACACAG GCCTCCA CCACAA (配列番号686)	not	3.6060 2752	2.704 57543 5	
1936	CCCTGCT TCGTGGA CGATTC (配列番号170)	CCCTGCT TCGTGGA CGATTC (配列番号687)	not	3.3828 89561	2.795 12259 9	
1396	GTAAAAG ACTTTTT GAATAG (配列番号171)	GTAAAAG ACTTTTT GAATAG (配列番号688)	not	3.3828 89561	4.628 35527 7	
2703	AAAGACC GAGCCCC TAACAG (配列番号172)	AAAGACC GAGCCCC TAACAG (配列番号689)	not	3.3828 89561	2.885 66976 4	
2959	CCTCCAA CCTCTGG GACTGT (配列番号173)	CCTCCAA CCTCTGG GACTGT (配列番号690)	not	3.3828 89561	0.871 34275 66	

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

7 8 3	TGTGCTT CCCACAC TCCTAG (配列番号17 4)	TGTGCTT CCCACAC TCCTAG (配列番号69 1)	n o t	3. 2 7 1 3 2 0 5 8 2	2. 7 9 5 1 2 2 5 9 9	
2 5 2 2	GCTTCCT GCTGTCC ATGCAG (配列番号17 5)	GCTTCCT GCTGTCC ATGCAG (配列番号69 2)	n o t	3. 0 4 8 1 8 2 6 2 3	2 1. 0 3 6 9 0 2 2 1	
3 0 9 7	TATGCCC AGCTGAA AGGAAA (配列番号17 6)	TATGCAC AACTGAA AGGAAA (配列番号69 3)	n o t	3. 0 4 8 1 8 2 6 2 3	2. 7 9 5 1 2 2 5 9 9	
1 7 6	AATGCCA TTTCCCC AACAAG (配列番号17 7)	AATGCCA TTTCCCC AACAAG (配列番号69 4)	n o t	3. 0 4 8 1 8 2 6 2 3	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 0 8 5	CACATGC TGTTCTA TGCCCA (配列番号17 8)	CACATGC TGTTCTA TGCACA (配列番号69 5)	n o t	2. 9 8 6 4 2 8 1 0 3	0	
6 4 9	GAGCGCT TCATCAT CTTCAG (配列番号17 9)	GAGCGCT TCATCAT CTTCAG (配列番号69 6)	n o t	2. 9 8 6 4 2 8 1 0 3	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 1 1 8	TCCCAGG AGGAGGC CCAGCT (配列番号18 0)	TCCCAGG AGGAGGC CCAGCT (配列番号69 7)	n o t	2. 7 6 3 2 9 0 1 4 5	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 0 9 8	ATGCCCA GCTGAAA GGAAAG (配列番号18 1)	ATGCACA ACTGAAA GGAAAG (配列番号69 8)	n o t	2. 7 6 3 2 9 0 1 4 5	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

3 1 2 8	AGGCCCA GCTGGAG ATGGAA (配列番号 18 2)	AGGCCCA GCTGGAG ATGGAA (配列番号 69 9)	n o t	2. 7 6 3 2 9 0 1 4 5	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
1 9 8 2	TCCCTAT CTTCATG GTGCTG (配列番号 18 3)	TCCCTAT CTTCATG GTGCTG (配列番号 70 0)	n o t	2. 6 5 1 7 2 1 1 6 5	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 5 8 6	CCTTGAT CAGGTGT TTCCAG (配列番号 18 4)	CCTTGAT CAAGTGT TTCCAG (配列番号 70 1)	n o t	2. 5 4 0 1 5 2 1 8 6	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 4 5	CGGCCAG CTGTGGA CCGTCT (配列番号 18 5)	CGGCCAG CTGTGGA CCGTCT (配列番号 70 2)	n o t	2. 5 4 0 1 5 2 1 8 6	0	
1 7 8 2	TTGGGAT TCTGGTC CCAGAG (配列番号 18 6)	TTGGGAT TCTGGTC CCAGAG (配列番号 70 3)	n o t	2. 3 6 6 8 2 8 6 8 7	0	
2 9 0 1	CCTGGGC CACAATG GAGCTG (配列番号 18 7)	CCTGGGC CACAATG GAGCTG (配列番号 70 4)	n o t	2. 2 5 5 2 5 9 7 0 7	3. 7 5 7 0 1 2 5 2 1	
3 1 0	AACAACCT CCATCTT GGCAAG (配列番号 18 8)	AACAACCT CCATCTT GGCAAG (配列番号 70 5)	n o t	2. 2 5 5 2 5 9 7 0 7	8. 2 0 4 2 7 3 4 6 8	
2 1 3 7	ATCATGT CGATGAG CATCTT (配列番号 18 9)	ATCATGT CGATGAG CATCTT (配列番号 70 6)	n o t	2. 2 5 5 2 5 9 7 0 7	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 9】

3 0 6 7	CACCTCA CGGTGGC TGAGCA (配列番号19 0)	CACCTCA CGGTGGC TGAGCA (配列番号70 7)	n o t	2. 2 5 5 2 5 9 7 0 7	0	
3 0 9 0	GCTGTTC TATGCCC AGCTGA (配列番号19 1)	GCTGTTC TATGCAC AACTGA (配列番号70 8)	n o t	2. 1 4 3 6 9 0 7 2 8	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 1 3 3	CAGCTGG AGATGGA AGCCAT (配列番号19 2)	CAGCTGG AGATGGA AGCCAT (配列番号70 9)	n o t	2. 1 4 3 6 9 0 7 2 8	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 0 6 6	CCACCTC ACGGTGG CTGAGC (配列番号19 3)	CCACCTC ACGGTGG CTGAGC (配列番号71 0)	n o t	2. 1 4 3 6 9 0 7 2 8	0	
3 1 5 2	TGTTGGA GGACACA GGCCTC (配列番号19 4)	TGTTGGA GGACACA GGCCTC (配列番号71 1)	n o t	2. 0 3 2 1 2 1 7 4 8	0	
5 5 4	ACCTTCT GATCAAC TCTCAA (配列番号19 5)	ACCTTCT GATCAAC TCTCAA (配列番号71 2)	n o t	2. 0 3 2 1 2 1 7 4 8	0	
2 8 7 0	TCACCTT CTACGAG AACCAG (配列番号19 6)	TCACCTT CTACGAG AACCAG (配列番号71 3)	n o t	1. 8 5 8 7 9 8 2 5	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
3 5 2	CTCCTCA TGAATGC ACCAGA (配列番号19 7)	CTCCTCA TGAATGC ACCAGA (配列番号71 4)	n o t	1. 8 5 8 7 9 8 2 5	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 0】

1 2 0 3	GGGAAAA ATCCTGT ACACTC (配列番号198)	GGGAAAA ATCCTGT ACACTC (配列番号715)	n o t	1. 8 5 8 7 9 8 2 5	0	
1 9 6 6	ATCCTGA ACCGCTG TTTCCC (配列番号199)	ATCCTGA ACCGCTG TTTCCC (配列番号716)	n o t	1. 8 5 8 7 9 8 2 5	0	
3 0 5 7	CCTGTTC CACCAAC TCACGG (配列番号200)	CCTGTTC CACCAAC TCACGG (配列番号717)	n o t	1. 8 5 8 7 9 8 2 5	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 9 9 6	ACATTGA AACCAGC CTGGAT (配列番号201)	ACATTGA AACCAGC CTGGAT (配列番号718)	n o t	1. 8 5 8 7 9 8 2 5	0	
2 3 7 2	GCATGAC CGCTGAG CTGAAG (配列番号202)	GCATGAC CGCTGAG CTGAAG (配列番号719)	n o t	1. 8 5 8 7 9 8 2 5	0	
2 9 6 6	CCTCTGG GACTGTG CTCGTT (配列番号203)	CCTCTGG GACTGTG CTCGTT (配列番号720)	n o t	1. 8 5 8 7 9 8 2 5	0	
2 8 1 8	CTGGTAA AGATTTT TGAGCC (配列番号204)	CTGGTGA AGATTTT TGAGCC (配列番号721)	分岐点	1. 7 4 7 2 2 9 2 7	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 8 1 1	GAAGAAT CTGGTAA AGATTT (配列番号205)	GAAGAAT CTGGTGA AGATTT (配列番号722)	分岐点	1. 7 4 7 2 2 9 2 7	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 1】

3 0 8 0	CTGAGCA CATGCTG TTCTAT (配列番号206)	CTGAGCA CATGCTG TTCTAT (配列番号723)	n o t	1. 7 4 7 2 2 9 2 7	0	
3 0 8 1	TGAGCAC ATGCTGT TCTATG (配列番号207)	TGAGCAC ATGCTGT TCTATG (配列番号724)	n o t	1. 7 4 7 2 2 9 2 7	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 8 3 2	TGAGCCC TGTGGCC GGCCAG (配列番号208)	TGAGCCC TGTGGCC GGCCAG (配列番号725)	n o t	1. 7 4 7 2 2 9 2 7	0	
3 1 2 5	AGGAGGC CCAGCTG GAGATG (配列番号209)	AGGAGGC CCAGCTG GAGATG (配列番号726)	n o t	1. 7 4 7 2 2 9 2 7	0	
1 8 6 0	GGTTGAA CAGGGGA TCACAA (配列番号210)	GGTTGAA CAGGGGA TCACAA (配列番号727)	n o t	1. 7 4 7 2 2 9 2 7	0	
3 1 2 3	GGAGGAG GCCCAGC TGGAGA (配列番号211)	GGAGGAG GCCCAGC TGGAGA (配列番号728)	n o t	1. 7 4 7 2 2 9 2 7	0	
2 7 7 4	AGAGAGA ACACCCC GGGTGG (配列番号212)	AGAGAGA ACACCCC GGGTGG (配列番号729)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	7. 9 3 2 6 3 1 9 7 4	
3 0 7 1	TCACGGT GGCTGAG CACATG (配列番号213)	TCACGGT GGCTGAG CACATG (配列番号730)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 2】

2 6 0 0	TTCCAGG AGACTAT GGAACC (配列番号 2 1 4)	TTCCAGG AGACTAT GGAACC (配列番号 7 3 1)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0	
3 1 1 9	CCCAGGA GGAGGCC CAGCTG (配列番号 2 1 5)	CCCAGGA GGAGGCC CAGCTG (配列番号 7 3 2)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0	
2 7 1 3	CCCCTAA CAGAGGA AACGGA (配列番号 2 1 6)	CCCCTAA CAGAGGA AACGGA (配列番号 7 3 3)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0	
2 7 2 1	AGAGGAA ACGGAGG ATCCAG (配列番号 2 1 7)	AGAGGAA ACGGAGG ATCCAG (配列番号 7 3 4)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0	
2 8 5 7	GACCGTC TGAACAT CACCTT (配列番号 2 1 8)	GACCGTC TGAACAT CACCTT (配列番号 7 3 5)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0	
3 0 4 6	CAGCACA ACATCCT GTTCCA (配列番号 2 1 9)	CAGCACA ACATCCT GTTCCA (配列番号 7 3 6)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0	
3 0 8 7	CATGCTG TTCTATG CCCAGC (配列番号 2 2 0)	CATGCTG TTCTATG CACAAAC (配列番号 7 3 7)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0	
2 6 7 6	TTCAACC AGAGAAG AAAGAG (配列番号 2 2 1)	TTCAACC AGAGAAG AAAGAG (配列番号 7 3 8)	n o t	1. 6 3 5 6 6 0 2 9 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 3】

2 8 3 1	TTGAGCC CTGTGGC CGGCCA (配列番号 2 2 2)	TTGAGCC CTGTGGC CGGCCA (配列番号 7 3 9)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	3. 8 4 7 5 5 9 6 8 5	
1 4 8	AATGCCA ACCCGCT CTACAG (配列番号 2 2 3)	AATGCCA ACCCGCT CTACAG (配列番号 7 4 0)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	2. 6 1 4 0 2 8 2 7	
5 8 0	CCAGAGC AGTTCGC TCATGG (配列番号 2 2 4)	CCAGAGC AGTTCGC TCATGG (配列番号 7 4 1)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	0	
6 4 3	CTCCTGG AGCGCTT CATCAT (配列番号 2 2 5)	CTCCTGG AGCGCTT CATCAT (配列番号 7 4 2)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	0	
7 0 3	CTGTGCT CCCTCTC CCAGGG (配列番号 2 2 6)	CTGTGCT CCCTCTC CCAGGG (配列番号 7 4 3)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	0	
3 0 7 0	CTCACGG TGGCTGA GCACAT (配列番号 2 2 7)	CTCACGG TGGCTGA GCACAT (配列番号 7 4 4)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 7 8 3	ACCCCGG GTGGGTT CCTGGG (配列番号 2 2 8)	ACCCCGG GTGGGTT CCTGGG (配列番号 7 4 5)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	0	
3 0 7 5	GGTGGCT GAGCACA TGCTGT (配列番号 2 2 9)	GGTGGCT GAGCACA TGCTGT (配列番号 7 4 6)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 4】

2 8 5 2	CTGTGGA CCGTCTG AACATC (配列番号 2 3 0)	CTGTGGA CCGTCTG AACATC (配列番号 7 4 7)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	0	
3 1 0 7	TGAAAGG AAAGTCC CAGGAG (配列番号 2 3 1)	TGAAAGG AAAGTCC CAGGAG (配列番号 7 4 8)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	2. 7 9 5 1 2 2 5 9 9	
2 2 7 0	TCAGCAC CTTCTTC TCCAAG (配列番号 2 3 2)	TCAGCAC CTTCTTC TCCAAG (配列番号 7 4 9)	n o t	1. 5 2 4 0 9 1 3 1 1	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
2 9 8 8	GGGAAGG GACATTG AAACCA (配列番号 2 3 3)	GGGAAGG GACATTG AAACCA (配列番号 7 5 0)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
3 1 4 9	CCATGTT GGAGGAC ACAGGC (配列番号 2 3 4)	CCATGTT GGAGGAC ACAGGC (配列番号 7 5 1)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
6 9 8	ATGCCCT GTGCTCC CTCTCC (配列番号 2 3 5)	ATGCCCT GTGCTCC CTCTCC (配列番号 7 5 2)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
3 1 0 6	CTGAAAG GAAAGTC CCAGGA (配列番号 2 3 6)	CTGAAAG GAAAGTC CCAGGA (配列番号 7 5 3)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
2 6 9 1	AAGAGCC CTGGAAA AGACCG (配列番号 2 3 7)	AAGAGCC CTGGAAA AGACCG (配列番号 7 5 4)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 5】

3 1 3 5	GCTGGAG ATGGAAG CCATGT (配列番号 2 3 8)	GCTGGAG ATGGAAG CCATGT (配列番号 7 5 5)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 1 1 5	AAGTCCC AGGAGGA GGCCCA (配列番号 2 3 9)	AAGTCCC AGGAGGA GGCCCA (配列番号 7 5 6)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 9 7 4	ACTGTGC TCGTTGG GGGAAG (配列番号 2 4 0)	ACTGTGC TCGTTGG GGGAAG (配列番号 7 5 7)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
2 7 8 9	GGTGGGT TCCTGGG GTATGC (配列番号 2 4 1)	GGTGGGT TCCTGGG GTGTGC (配列番号 7 5 8)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
2 1 3 4	TCCATCA TGTCGAT GAGCAT (配列番号 2 4 2)	TCCATCA TGTCGAT GAGCAT (配列番号 7 5 9)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
2 7 0 0	GGAAAAG ACCGAGC CCCTAA (配列番号 2 4 3)	GGAAAAG ACCGAGC CCCTAA (配列番号 7 6 0)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
5 6 6	ACTCTCA AGTCCGT CCAGAG (配列番号 2 4 4)	ACTCTCA AGTCCGT CCAGAG (配列番号 7 6 1)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
3 1 3 7	TGGAGAT GGAAGCC ATGTTG (配列番号 2 4 5)	TGGAGAT GGAAGCC ATGTTG (配列番号 7 6 2)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 6】

3 0 9 6	CTATGCC CAGCTGA AAGGAA (配列番号 2 4 6)	CTATGCA CAACTGA AAGGAA (配列番号 7 6 3)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 9	AGCGGCT TCGTGAG ACAGAT (配列番号 2 4 7)	TCCGGCT TCGTGAG ACAGAT (配列番号 7 6 4)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
3 0 9 2	TGTTCTA TGCCCAG CTGAAA (配列番号 2 4 8)	TGTTCTA TGCACAA CTGAAA (配列番号 7 6 5)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
1 8 7 7	CAAGGAG CCAGGTG CAGGCG (配列番号 2 4 9)	CAAGGAG CCAGGTG CAGGCG (配列番号 7 6 6)	n o t	1. 2 3 9 1 9 8 8 3 3	0	
8 5 7	TGTCACC AAGAATT CAAGAG (配列番号 2 5 0)	TGTCACC AAGAATT CAAGAG (配列番号 7 6 7)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 8 4 6	GGCCAGC TGTGGAC CGTCTG (配列番号 2 5 1)	GGCCAGC TGTGGAC CGTCTG (配列番号 7 6 8)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
2 9 7 7	GTGCTCG TTGGGGG AAGGGA (配列番号 2 5 2)	GTGCTCG TTGGGGG AAGGGA (配列番号 7 6 9)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
6 1 6	CTGAAGG ACATCGC CTGCAG (配列番号 2 5 3)	CTGAAGG ACATCGC CTGCAG (配列番号 7 7 0)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 7】

2 7 2 9	CGGAGGA TCCAGAG CACCCA (配列番号 2 5 4)	CGGAGGA TCCAGAG CACCCA (配列番号 7 7 1)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
2 8 3 4	AGCCCTG TGGCCGG CCAGCT (配列番号 2 5 5)	AGCCCTG TGGCCGG CCAGCT (配列番号 7 7 2)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
3 1 4 0	AGATGGA AGCCATG TTGGAG (配列番号 2 5 6)	AGATGGA AGCCATG TTGGAG (配列番号 7 7 3)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
2 9 8 9	GGAAGGG ACATTGA AACCAG (配列番号 2 5 7)	GGAAGGG ACATTGA AACCAG (配列番号 7 7 4)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
2 9 3 8	TCCATCC TCACAGG CCTGCT (配列番号 2 5 8)	TCCATCC TCACTGG CCTGCT (配列番号 7 7 5)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
2 9 7 2	GGA CTGT GCTCGTT GGGGGA (配列番号 2 5 9)	GGA CTGT GCTCGTT GGGGGA (配列番号 7 7 6)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 1 2 7	GAGGCCC AGCTGGA GATGGA (配列番号 2 6 0)	GAGGCCC AGCTGGA GATGGA (配列番号 7 7 7)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
1 9 2	CAAGGCG ATGCCCT CAGCAG (配列番号 2 6 1)	CAAGGCG ATGCCCT CAGCAG (配列番号 7 7 8)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 8】

2 6 5 2	GTATTGG CTTGGCG GTGAAG (配列番号 2 6 2)	GTATTGG CTTGGCG GTGAAG (配列番号 7 7 9)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	3. 7 5 7 0 1 2 5 2 1	
1 4 6 9	AGGGCCC TCGGGAA AGCCAG (配列番号 2 6 3)	AGGGCCC TCGGGAA AGCCAG (配列番号 7 8 0)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
3 1 6 2	CACAGGC CTCCACC ACAAGC (配列番号 2 6 4)	CACAGGC CTCCACC ACAAGC (配列番号 7 8 1)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	2. 8 8 5 6 6 9 7 6 4	
2 7 0 5	AGACCGA GCCCCTA ACAGAG (配列番号 2 6 5)	AGACCGA GCCCCTA ACAGAG (配列番号 7 8 2)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
2 6 6 5	GGTGAAG GGTGTTT AACCAG (配列番号 2 6 6)	GGTGAAG GGTGTTT AACCAG (配列番号 7 8 3)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 9 2 7	CCACCAC CTTGTTCC ATCCTC (配列番号 2 6 7)	CCACCAC CTTGTTCC ATCCTC (配列番号 7 8 4)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
2 8 2 2	TAAAGAT TTTTGAG CCCTGT (配列番号 2 6 8)	TGAAGAT TTTTGAG CCCTGT (配列番号 7 8 5)	分岐点	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
3 1 2 4	GAGGAGG CCCAGCT GGAGAT (配列番号 2 6 9)	GAGGAGG CCCAGCT GGAGAT (配列番号 7 8 6)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 9】

3 1 2 9	GGCCCAG CTGGAGA TGGAAG (配列番号 2 7 0)	GGCCCAG CTGGAGA TGGAAG (配列番号 7 8 7)	n o t	1. 1 2 7 6 2 9 8 5 4	0	
2 9 9 3	GGGACAT TGAAACC AGCCTG (配列番号 2 7 1)	GGGACAT TGAAACC AGCCTG (配列番号 7 8 8)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
3 1 0 1	CCCAGCT GAAAGGA AAGTCC (配列番号 2 7 2)	CACAACT GAAAGGA AAGTCC (配列番号 7 8 9)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
2 6 5 0	TCGTATT GGCTTGG CGGTGA (配列番号 2 7 3)	TCGTATT GGCTTGG CGGTGA (配列番号 7 9 0)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
2 8 1 6	ATCTGGT AAAGATT TTTGAG (配列番号 2 7 4)	ATCTGGT GAAGATT TTTGAG (配列番号 7 9 1)	分岐点	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	3. 7 5 7 0 1 2 5 2 1	
2 3 6 1	CTGGCAG GACCGCA TGACCG (配列番号 2 7 5)	CTGGCAA GACCGCA TGACCG (配列番号 7 9 2)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
5 9 2	GCTCATG GAGTCCC GGACCT (配列番号 2 7 6)	GCTCATG GAGTCCC GGACCT (配列番号 7 9 3)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
4 9 0	AAAGATG AAGAAAC ACTGAC (配列番号 2 7 7)	AAAGATG AAGAAAC ACTGAC (配列番号 7 9 4)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 0】

2 2 6 0	TGCTTTTC TGCTCAG CACCTT (配列番号 2 7 8)	TGCTTTTC TGCTCAG CACCTT (配列番号 7 9 5)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
2 1 0 4	ATTTGGT GTACCTG GTTCCCT (配列番号 2 7 9)	ATTTGGT GTACCTG GTTCCCT (配列番号 7 9 6)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
2 2 8 5	CCAAGGC CAGTCTG GCAGCA (配列番号 2 8 0)	CCAAGGC CAGTCTG GCAGCA (配列番号 7 9 7)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
2 8 0 6	TGCGTGA AGAATCT GGTAAA (配列番号 2 8 1)	TGCGTGA AGAATCT GGTGAA (配列番号 7 9 8)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
2 8 0 8	CGTGAAG AATCTGG TAAAGA (配列番号 2 8 2)	CGTGAAG AATCTGG TGAAGA (配列番号 7 9 9)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 2 5 7	CTGTGCT TTCTGCT CAGCAC (配列番号 2 8 3)	CTGTGCT TTCTGCT CAGCAC (配列番号 8 0 0)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 7 7 8	AGAACAC CCCGGGT GGGTTC (配列番号 2 8 4)	AGAACAC CCCGGGT GGGTTC (配列番号 8 0 1)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 0 4 9	CACAACA TCCTGTT CCACCA (配列番号 2 8 5)	CACAACA TCCTGTT CCACCA (配列番号 8 0 2)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 0 5 2	GGAGTTG CGACTGA AGGAGA (配列番号 2 8 6)	GGAGTTG CGACTGA AGGAGA (配列番号 8 0 3)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 1】

3 1 2 1	CAGGAGG AGGCCCA GCTGGA (配列番号287)	CAGGAGG AGGCCCA GCTGGA (配列番号804)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
7 6 7	TCTTCAA GCTCTTC CGTGTG (配列番号288)	TCTTCAA GCTCTTC CGTGTG (配列番号805)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 8 6 1	GTTGAAC AGGGGAT CACAAG (配列番号289)	GTTGAAC AGGGGAT CACAAG (配列番号806)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
7 0 2	CCTGTGC TCCCTCT CCCAGG (配列番号290)	CCTGTGC TCCCTCT CCCAGG (配列番号807)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
3 0 0 0	TGAAACC AGCCTGG ATGCAG (配列番号291)	TGAAACC AGCCTGG ATGCAG (配列番号808)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 0 9 8	GCAGTGA TTTGGTG TACCTG (配列番号292)	GCAGTGA TTTGGTG TACCTG (配列番号809)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	
2 7 8 2	CACCCCG GGTGGGT TCCTGG (配列番号293)	CACCCCG GGTGGGT TCCTGG (配列番号810)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 6 2	TCTGAAC ATCACCT TCTACG (配列番号294)	TCTGAAC ATCACCT TCTACG (配列番号811)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 2】

2 2 7 3	GCACCTT CTTCTCC AAGGCC (配列番号 2 9 5)	GCACCTT CTTCTCC AAGGCC (配列番号 8 1 2)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
5 6 9	CTCAAGT CCGTCCA GAGCAG (配列番号 2 9 6)	CTCAAGT CCGTCCA GAGCAG (配列番号 8 1 3)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
6 7 6	CGCGGGG CAAAGAC GGTGCG (配列番号 2 9 7)	CGCGGGG CAAAGAC GGTGCG (配列番号 8 1 4)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
3 1 4 1	GATGGAA GCCATGT TGGAGG (配列番号 2 9 8)	GATGGAA GCCATGT TGGAGG (配列番号 8 1 5)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
2 6 2 7	CTTG GTA CTTTCTT CTACAA (配列番号 2 9 9)	CTTG GTA CTTTCTT CTACAA (配列番号 8 1 6)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 0 0 9	TCTACTC TGTCTCC ATGACT (配列番号 3 0 0)	TCTACTC TGTCTCC ATGACT (配列番号 8 1 7)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
1 8 5 0	TGCAGGA CATGGTT GAACAG (配列番号 3 0 1)	TGCAAGA CATGGTT GAACAG (配列番号 8 1 8)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
1 8 8 7	GGTGCAG GCGGAGG CTCCAG (配列番号 3 0 2)	GGTGCAG GCGGAGG CTCCAG (配列番号 8 1 9)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 3】

2 3 1 5	GTGTCAT CTATTTTC ACCCTC (配列番号303)	GTGTCAT CTATTTTC ACCCTG (配列番号820)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
1 3 5 9	GATGAAC ATGATCA GAGATA (配列番号304)	GATGAAC ATGATCA GAGATA (配列番号821)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
2 7 8 7	CGGGTGG GTTCTTG GGGTAT (配列番号305)	CGGGTGG GTTCTTG GGGTGT (配列番号822)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 9 5 3	CTGCTGC CTCCAAC CTCTGG (配列番号306)	CTGCTGC CTCCAAC CTCTGG (配列番号823)	n o t	1. 0 1 6 0 6 0 8 7 4	0	
2 9 2 4	AAACCAC CACCTTG TCCATC (配列番号307)	AAACCAC CACCTTG TCCATC (配列番号824)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 1 0 0	GCCCAGC TGAAAGG AAAGTC (配列番号308)	GCACAAC TGAAAGG AAAGTC (配列番号825)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 6 8 7	AAGAAAG AGCCCTG GAAAAG (配列番号309)	AAGAAAG AGCCCTG GAAAAG (配列番号826)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 4 4 6	GTTTCGCT TTGAAGA GCAAGG (配列番号310)	GTTTCGCT TTGAAGA GCAAGG (配列番号827)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 4】

3 1 1 3	GAAAGTC CCAGGAG GAGGCC (配列番号3 1 1)	GAAAGTC CCAGGAG GAGGCC (配列番号8 2 8)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 6 6 1	TGGCGGT GAAGGGT GTTCAA (配列番号3 1 2)	TGGCGGT GAAGGGT GTTCAA (配列番号8 2 9)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 6 8 1	CCAGAGA AGAAAGA GCCCTG (配列番号3 1 3)	CCAGAGA AGAAAGA GCCCTG (配列番号8 3 0)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 7 8 6	CCGGGTG GGTTCCT GGGGTA (配列番号3 1 4)	CCGGGTG GGTTCCT GGGGTG (配列番号8 3 1)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 8 8 0	GGAGCCA GGTGCAG GCGGAG (配列番号3 1 5)	GGAGCCA GGTGCAG GCGGAG (配列番号8 3 2)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 6 3 2	TACTTTC TTCTACA AGAGTC (配列番号3 1 6)	TACTTTC TTCTACA AGAGTC (配列番号8 3 3)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 9 9 9	CTGGCAT GGATCTA CTCTGT (配列番号3 1 7)	CTGGCAT GGATCTA CTCTGT (配列番号8 3 4)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 2 8 4	CAAGCGG CGTGGAC CCTTAC (配列番号3 1 8)	CAAGCGG CGTGGAC CCTTAC (配列番号8 3 5)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 5】

2 5 4 3	TGATGCT CCTTGAT GCTGCT (配列番号 3 1 9)	TGATGCT CCTTGAT GCTGCT (配列番号 8 3 6)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 7 9 2	GGGTTCC TGGGGTA TGCGTG (配列番号 3 2 0)	GGGTTCC TGGGGTG TGCGTG (配列番号 8 3 7)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 8 5 3	TGTGGAC CGTCTGA ACATCA (配列番号 3 2 1)	TGTGGAC CGTCTGA ACATCA (配列番号 8 3 8)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
7 1 4	CTCCCAG GGCACCC TACAGT (配列番号 3 2 2)	CTCCCAG GGCACCC TACAGT (配列番号 8 3 9)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 1 5 8	CTCCTGA CGATATT CATCAT (配列番号 3 2 3)	CTCCTGA CGATATT CATCAT (配列番号 8 4 0)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 1 5 8	TCCTTTA ACCAAAA TCGCTT (配列番号 3 2 4)	TCCTTTA ACCAAAA TCGCTT (配列番号 8 4 1)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 8 6 9	ATCACCT TCTACGA GAACCA (配列番号 3 2 5)	ATCACCT TCTACGA GAACCA (配列番号 8 4 2)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 7 7 2	CGAGAGA GAACACC CCGGGT (配列番号 3 2 6)	CGAGAGA GAACACC CCGGGT (配列番号 8 4 3)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	2. 6 1 4 0 2 8 2 7	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 6】

3 1 5 8	AGGACAC AGGCCTC CACCAC (配列番号3 2 7)	AGGACAC AGGCCTC CACCAC (配列番号8 4 4)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 2 3 0	GCGTGGC CATTGCC TTCGTG (配列番号3 2 8)	GCGTGGC CATTGCC TTCGTG (配列番号8 4 5)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 8 2 5	AGATTTT TGAGCCC TGTGGC (配列番号3 2 9)	AGATTTT TGAGCCC TGTGGC (配列番号8 4 6)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 1 5 6	GGAGGAC ACAGGCC TCCACC (配列番号3 3 0)	GGAGGAC ACAGGCC TCCACC (配列番号8 4 7)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
9 7 8	TGACCTC CTGTGTG GCTACC (配列番号3 3 1)	TGACCTC CTGTGTG GCTACC (配列番号8 4 8)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 6 6 3	GCGGTGA AGGGTGT TCAACC (配列番号3 3 2)	GCGGTGA AGGGTGT TCAACC (配列番号8 4 9)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 8 9	CAACAAG GCGATGC CCTCAG (配列番号3 3 3)	CAACAAG GCGATGC CCTCAG (配列番号8 5 0)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 2 0 1	GCGACCC ATTCATC CTCTTC (配列番号3 3 4)	GCGACCC ATTCATC CTCTTC (配列番号8 5 1)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 7】

3 3 2	TATATCG AGATTTT CAAGAA (配列番号3 3 5)	TATATCG AGATTTT CAAGAA (配列番号8 5 2)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 8 7 3	ATCACAA GGAGCCA GGTGCA (配列番号3 3 6)	ATCACAA GGAGCCA GGTGCA (配列番号8 5 3)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 2 9 1	AGGAAGT TGGTCAA AGCCTG (配列番号3 3 7)	CGGAAGT TGGTCAA AGCCTG (配列番号8 5 4)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 4 1 3	TAGGCAG CTTGGTG AAGAAG (配列番号3 3 8)	TAGGCAG CTTGGTG AAGAAG (配列番号8 5 5)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 8 2 6	GATTTT GAGCCCT GTGGCC (配列番号3 3 9)	GATTTT GAGCCCT GTGGCC (配列番号8 5 6)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
6 6 1	ATCTTCA GCCAGAG GCGCGG (配列番号3 4 0)	ATCTTCA GCCAGAG GCGCGG (配列番号8 5 7)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
6 7 0	CAGAGGC GCGGGGC AAAGAC (配列番号3 4 1)	CAGAGGC GCGGGGC AAAGAC (配列番号8 5 8)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 5 5 0	CCTTGAT GCTGCTG TCTATG (配列番号3 4 2)	CCTTGAT GCTGCTG TGTATG (配列番号8 5 9)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 8】

2 3 0 4	AGCCTGT AGTGGTG TCATCT (配列番号 3 4 3)	AGCCTGT AGTGGTG TCATCT (配列番号 8 6 0)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 6 3 3	CTCTCTC TACTGGA GGAAAA (配列番号 3 4 4)	CTCTCTC TACTGGA GGAAAA (配列番号 8 6 1)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 5 4 6	CTCCGCC TGGTCAA TCAATA (配列番号 3 4 5)	CTCCGCC TGGTCAA TCAATA (配列番号 8 6 2)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 1 2	GAATGCT GCCGTGG CTCCAG (配列番号 3 4 6)	GAATGCT GCCGTGG CTCCAG (配列番号 8 6 3)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 5 7 5	CTCGCTT GGTACCT TGATCA (配列番号 3 4 7)	CTCGCTT GGTACCT TGATCA (配列番号 8 6 4)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 4 9 8	ATGGCCA ACTTCGA CTGGAG (配列番号 3 4 8)	ATGGCCA ACTTCGA CTGGAG (配列番号 8 6 5)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 7 5 9	ACCAATA AGATTAA AGACAG (配列番号 3 4 9)	ACCAATA AGATTAA AGACAG (配列番号 8 6 6)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 9 7 5	CTGTGCT CGTTGGG GGAAGG (配列番号 3 5 0)	CTGTGCT CGTTGGG GGAAGG (配列番号 8 6 7)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 9】

3 0 1 2	GGATGCA GTCCGGC AGAGCC (配列番号 3 5 1)	GGATGCA GTCCGGC AGAGCC (配列番号 8 6 8)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 1 4 2	ATGGAAG CCATGTT GGAGGA (配列番号 3 5 2)	ATGGAAG CCATGTT GGAGGA (配列番号 8 6 9)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 6 9 0	AAAGAGC CCTGGAA AAGACC (配列番号 3 5 3)	AAAGAGC CCTGGAA AAGACC (配列番号 8 7 0)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
6 4 2	CCTCCTG GAGCGCT TCATCA (配列番号 3 5 4)	CCTCCTG GAGCGCT TCATCA (配列番号 8 7 1)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 0 2 8	TGTGAAG AGCATCG TCTTGG (配列番号 3 5 5)	TGTGAAG AGCATCG TCTTGG (配列番号 8 7 2)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 3 6 4	GCAGGAC CGCATGA CCGCTG (配列番号 3 5 6)	GCAAGAC CGCATGA CCGCTG (配列番号 8 7 3)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 7 1 6	CTAACAG AGGAAAC GGAGGA (配列番号 3 5 7)	CTAACAG AGGAAAC GGAGGA (配列番号 8 7 4)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 0 2 4	GCAGAGC CTTGGCA TGTGTC (配列番号 3 5 8)	GCAGAGC CTTGGCA TGTGTC (配列番号 8 7 5)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 0】

1 8 2 0	TCCGGTA CATCTGG GGCGGG (配列番号 3 5 9)	TCCGGTA CATCTGG GGCGGG (配列番号 8 7 6)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 0 3 9	GTGTCCA CAGCACA ACATCC (配列番号 3 6 0)	GTGTCCA CAGCACA ACATCC (配列番号 8 7 7)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 6 4 5	AAGAGTC GTATTGG CTTGGC (配列番号 3 6 1)	AAGAGTC GTATTGG CTTGGC (配列番号 8 7 8)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 6 9 6	CCCTGGA AAAGACC GAGCCC (配列番号 3 6 2)	CCCTGGA AAAGACC GAGCCC (配列番号 8 7 9)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 7 5 9	ACGACTC CTTCTTC GAGAGA (配列番号 3 6 3)	ACGACTC CTTCTTC GAGAGA (配列番号 8 8 0)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 3 6 2	TGGCAGG ACCGCAT GACCGC (配列番号 3 6 4)	TGGCAAG ACCGCAT GACCGC (配列番号 8 8 1)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
9 8 3	TCCTGTG TGGCTAC CCCGAG (配列番号 3 6 5)	TCCTGTG TGGCTAC CCCGAG (配列番号 8 8 2)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
7 4 0	AAGACAC TCTGTAT GCCAAC (配列番号 3 6 6)	AAGACAC TCTGTAT GCCAAC (配列番号 8 8 3)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 1】

9 0 7	CTGTGGG TGACCAG GCCCCCT (配列番号36 7)	CTGTGGG TGACCAG GCCCCCT (配列番号88 4)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
7 5 0	GTATGCC AACGTGG ACTTCT (配列番号36 8)	GTATGCC AACGTGG ACTTCT (配列番号88 5)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 7 8 8	GGGTGGG TTCCTGG GGTATG (配列番号36 9)	GGGTGGG TTCCTGG GGTGTG (配列番号88 6)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 2 4 8	TGGGCGA CGCCAAG GTTGTG (配列番号37 0)	TGGGCGA CGCCAAG GTTGTG (配列番号88 7)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 7 9 8	CTGGGGT ATGCGTG AAGAAT (配列番号37 1)	CTGGGGT GTGCGTG AAGAAT (配列番号88 8)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 1 4 3	TGGAAGC CATGTTG GAGGAC (配列番号37 2)	TGGAAGC CATGTTG GAGGAC (配列番号88 9)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 1 3 8	TCATGTC GATGAGC ATCTTC (配列番号37 3)	TCATGTC GATGAGC ATCTTC (配列番号89 0)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 9 4 0	CATCCTC ACAGGCC TGCTGC (配列番号37 4)	CATCCTC ACTGGCC TGCTGC (配列番号89 1)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 2】

3 3 0 0	TTACAGC AGAAGAT CCATCT (配列番号 3 7 5)	TTACAGC AGAAGAT CCATCT (配列番号 8 9 2)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 0 9 1	CTCCAAT GCAGTGA TTTGGT (配列番号 3 7 6)	CTCCAAT GCAGTGA TTTGGT (配列番号 8 9 3)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
5 9 1	CGCTCAT GGAGTCC CGGACC (配列番号 3 7 7)	CGCTCAT GGAGTCC CGGACC (配列番号 8 9 4)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 5 3 2	GTCCATG CAGATGA TGCTCC (配列番号 3 7 8)	GTCCATG CAGATGA TGCTCC (配列番号 8 9 5)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 1 1 0	AAGGAAA GTCCCAG GAGGAG (配列番号 3 7 9)	AAGGAAA GTCCCAG GAGGAG (配列番号 8 9 6)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	3. 5 7 5 9 1 8 1 9 1	
2 8 8	TCCTGGA ATTGTGT CAAACCT (配列番号 3 8 0)	TCCTGGA ATTGTGT CAAACCT (配列番号 8 9 7)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 7 5 8	AACCAAT AAGATTA AAGACA (配列番号 3 8 1)	AACCAAT AAGATTA AAGACA (配列番号 8 9 8)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 3 1 4	GGTGTCA TCTATTT CACCCCT (配列番号 3 8 2)	GGTGTCA TCTATTT CACCCCT (配列番号 8 9 9)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 3】

2 7 1 0	GAGCCCC TAACAGA GGAAAC (配列番号383)	GAGCCCC TAACAGA GGAAAC (配列番号900)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 1 9 2	TACATTA CAGCGAC CCATTC (配列番号384)	TACATTA CAGCGAC CCATTC (配列番号901)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 8 6 8	AGGGGAT CACAAGG AGCCAG (配列番号385)	AGGGGAT CACAAGG AGCCAG (配列番号902)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 8 0 9	GTGAAGA ATCTGGT AAAGAT (配列番号386)	GTGAAGA ATCTGGT GAAGAT (配列番号903)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 0 9 1	CTGTTCT ATGCCCA GCTGAA (配列番号387)	CTGTTCT ATGCACA ACTGAA (配列番号904)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
7 5 3	TGCCAAC GTGGACT TCTTCA (配列番号388)	TGCCAAC GTGGACT TCTTCA (配列番号905)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
9 8 0	ACCTCCT GTGTGGC TACCCC (配列番号389)	ACCTCCT GTGTGGC TACCCC (配列番号906)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
1 4 6 1	CCTCTAC AAGGGCC CTCGGG (配列番号390)	CCTCTAC AAGGGCC CTCGGG (配列番号907)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 4】

2 4 1 3	CCGGTGG CATTTGG ATTTGG (配列番号391)	CCGGTGG CATTTGG ATTTGG (配列番号908)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 2 1 3	CATGCAG AGAAAAC TGAGCG (配列番号392)	CATGCAG AGAAAAC TGAGCG (配列番号909)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 0 8 9	TGCTGTT CTATGCC CAGCTG (配列番号393)	TGCTGTT CTATGCA CAACTG (配列番号910)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 8 6 0	CGTCTGA ACATCAC CTTCTA (配列番号394)	CGTCTGA ACATCAC CTTCTA (配列番号911)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
3 0 6 8	ACCTCAC GGTGGCT GAGCAC (配列番号395)	ACCTCAC GGTGGCT GAGCAC (配列番号912)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0	
2 8 4 1	TGGCCGG CCAGCTG TGGACC (配列番号396)	TGGCCGG CCAGCTG TGGACC (配列番号913)	n o t	0. 6 1 9 5 9 9 4 1 6 6	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 9 6 5	ACCTCTG GGACTGT GCTCGT (配列番号397)	ACCTCTG GGACTGT GCTCGT (配列番号914)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 8 5 9	CCGTCTG AACATCA CCTTCT (配列番号398)	CCGTCTG AACATCA CCTTCT (配列番号915)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 5】

2 2 8 3	CTCCAAG GCCAGTC TGGCAG (配列番号 3 9)	CTCCAAG GCCAGTC TGGCAG (配列番号 9 1 6)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 1 3 1	CCCAGCT GGAGATG GAAGCC (配列番号 4 0 0)	CCCAGCT GGAGATG GAAGCC (配列番号 9 1 7)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 9 4 6	CACAGGC CTGCTGC CTCCAA (配列番号 4 0 1)	CACTGGC CTGCTGC CTCCAA (配列番号 9 1 8)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 7 3 0	GGAGGAT CCAGAGC ACCCAG (配列番号 4 0 2)	GGAGGAT CCAGAGC ACCCAG (配列番号 9 1 9)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 9 7 1	GGGACTG TGCTCGT TGGGGG (配列番号 4 0 3)	GGGACTG TGCTCGT TGGGGG (配列番号 9 2 0)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 7 9 7	CAGAGCT GATCCCG TGGAAG (配列番号 4 0 4)	CAGAGCT GATCCCG TGGAAG (配列番号 9 2 1)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 6 2 4	TTCCTTG GTACTTT CTTCTA (配列番号 4 0 5)	TTCCTTG GTACTTT CTTCTA (配列番号 9 2 2)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 4 7 2	GCCCTCG GGAAAGC CAGGCT (配列番号 4 0 6)	GCCCTCG GGAAAGC CAGGCT (配列番号 9 2 3)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 6】

1 7 6 5	AAGATTA AAGACAG GTATTG (配列番号407)	AAGATTA AAGACAG ATATTG (配列番号924)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 3 8 5	GGAACCC AACAGTA AAAGAC (配列番号408)	GGAACCC AACAGTA AAAGAC (配列番号925)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 5 5 3	TGGTCAA TCAATAC CTGGAG (配列番号409)	TGGTCAA TCAATAC CTGGAG (配列番号926)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 8 2 4	AAGATTT TTGAGCC CTGTGG (配列番号410)	AAGATTT TTGAGCC CTGTGG (配列番号927)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 7 3	CACCCCA GGAGAAT CTCCTG (配列番号411)	CACCCCA GGAGAAT CTCCTG (配列番号928)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 6 0	GTTCCAC CACCTCA CGGTGG (配列番号412)	GTTCCAC CACCTCA CGGTGG (配列番号929)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 1 4 9	AGCATCT TCCTCCT GACGAT (配列番号413)	AGCATCT TCCTCCT GACGAT (配列番号930)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 8 8 1	GAGAACC AGATCAC CGCATT (配列番号414)	GAGAACC AGATCAC CGCATT (配列番号931)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 7】

2 7 9 7	CCTGGGG TATGCGT GAAGAA (配列番号415)	CCTGGGG TGTGCGT GAAGAA (配列番号932)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 7 3 3	GGATCCA GAGCACCC CAGAAG (配列番号416)	GGATCCA GAGCACCC CAGAAG (配列番号933)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
7 9 8	CCTAGAC AGCCGTT CTCAAG (配列番号417)	CCTAGAC AGCCGTT CTCAAG (配列番号934)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 8 4 9	CAGCTGT GGACCGT CTGAAC (配列番号418)	CAGCTGT GGACCGT CTGAAC (配列番号935)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 1 1 7	GTCCCAG GAGGAGG CCCAGC (配列番号419)	GTCCCAG GAGGAGG CCCAGC (配列番号936)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	2. 7 9 5 1 2 2 5 9 9	
1 7 8 0	TATTGGG ATTCTGG TCCCAG (配列番号420)	TATTGGG ATTCTGG TCCCAG (配列番号937)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 8 1 7	TCTGGTA AAGATTT TTGAGC (配列番号421)	TCTGGTG AAGATTT TTGAGC (配列番号938)	分岐点	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 9 4	CCGCATT CCTGGGC CACAAT (配列番号422)	CCGCATT CCTGGGC CACAAT (配列番号939)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 8】

2 8 0 7	GCGTGAA GAATCTG GTAAAG (配列番号423)	GCGTGAA GAATCTG GTGAAG (配列番号940)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 0 8	GCCTGGA TGCAGTC CGGCAG (配列番号424)	GCCTGGA TGCAGTC CGGCAG (配列番号941)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 7 8 5	CCCGGGT GGGTTCC TGGGGT (配列番号425)	CCCGGGT GGGTTCC TGGGGT (配列番号942)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
6 0 8	ACCTGGC GCTGAAG GACATC (配列番号426)	ACCTGGC GCTGAAG GACATC (配列番号943)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 7 1 3	CCACGTG AAGTATA AGATCC (配列番号427)	CCACGTG AAGTATA AGATCC (配列番号944)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 9 4 4	CTCACAG GCCTGCT GCCTCC (配列番号428)	CTCACTG GCCTGCT GCCTCC (配列番号945)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 0 6 6	AGGAGAC TTTGAAA AATCAG (配列番号429)	AGGAGAC ATTGAAA AATCAG (配列番号946)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 6 3 9	TTCTACA AGAGTCG TATTGG (配列番号430)	TTCTACA AGAGTCG TATTGG (配列番号947)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 9】

2 3 7	CTTCTGC AATGTGA ACAATC (配列番号431)	CTTCTGC AATGTGA ACAATC (配列番号948)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 8 7 0	GGGATCA CAAGGAG CCAGGT (配列番号432)	GGGATCA CAAGGAG CCAGGT (配列番号949)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 9 9	TGCCCAG CTGAAAG GAAAGT (配列番号433)	TGCACAA CTGAAAG GAAAGT (配列番号950)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 8 4 1	TTGCCTA TCTGCAG GACATG (配列番号434)	TTGCATA TCTGCAA GACATG (配列番号951)	分岐点	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 7	GCAGCGG CTTCGTG AGACAG (配列番号435)	GATCCGG CTTCGTG AGACAG (配列番号952)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	8 2. 5 8 6 0 1 7 6 7	
3 1 5 1	ATGTTGG AGGACAC AGGCCT (配列番号436)	ATGTTGG AGGACAC AGGCCT (配列番号953)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 4 0 0	AAGACTT TTTGAAT AGGCAG (配列番号437)	AAGACTT TTTGAAT AGGCAG (配列番号954)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	3. 5 7 5 9 1 8 1 9 1	
3 0 6 2	TCCACCA CCTCACG GTGGCT (配列番号438)	TCCACCA CCTCACG GTGGCT (配列番号955)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 0】

2 7 6 9	CTTCGAG AGAGAAC ACCCCG (配列番号439)	CTTCGAG AGAGAAC ACCCCG (配列番号956)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 0 3 2	AAGAGCA TCGTCTT GGAGAA (配列番号440)	AAGAGCA TCGTCTT GGAGAA (配列番号957)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 8 1	CATTTCC CCAACAA GGCGAT (配列番号441)	CATTTCC CCAACAA GGCGAT (配列番号958)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
8 5 4	ATATGTC ACCAAGA ATTCAA (配列番号442)	ATATGTC ACCAAGA ATTCAA (配列番号959)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 8 9 9	GGCTCCA GTTGGAA TCTACC (配列番号443)	GGCTCCA GTTGGAA TCTACC (配列番号960)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 4 2 6	GATTTGG CACTGAG TACCTG (配列番号444)	GATTTGG CACTGAG TACCTG (配列番号961)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 7 7	TGGCTGA GCACATG CTGTTC (配列番号445)	TGGCTGA GCACATG CTGTTC (配列番号962)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 2 8 6	CAAGGCC AGTCTGG CAGCAG (配列番号446)	CAAGGCC AGTCTGG CAGCAG (配列番号963)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 1】

3 3 0 8	GAAGATC CATCTGG GATCTG (配列番号447)	GAAGATC CATCTGG GATCTG (配列番号964)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
9 2 7	CATGCAG AATGGTG GTCCAG (配列番号448)	CATGCAG AATGGTG GTCCAG (配列番号965)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 1 1 4	AAAGTCC CAGGAGG AGGCC (配列番号449)	AAAGTCC CAGGAGG AGGCC (配列番号966)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
9 0 8	TGTGGGT GACCAGG CCCCTC (配列番号450)	TGTGGGT GACCAGG CCCCTC (配列番号967)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 1 2 7	CAGCTTC TCCATCA TGTCGA (配列番号451)	CTCCTTC TCCATCA TGTCGA (配列番号968)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 8 8 6	AGGTGCA GGCGGAG GCTCCA (配列番号452)	AGGTGCA GGCGGAG GCTCCA (配列番号969)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 6 0 3	CAGGAGA CTATGGA ACCCCA (配列番号453)	CAGGAGA CTATGGA ACCCCA (配列番号970)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 1 0 9	AAAGGAA AGTCCCA GGAGGA (配列番号454)	AAAGGAA AGTCCCA GGAGGA (配列番号971)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 2】

2 8 5 1	GCTGTGG ACCGTCT GAACAT (配列番号455)	GCTGTGG ACCGTCT GAACAT (配列番号972)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 1 0 8	GAAAGGA AAGTCCC AGGAGG (配列番号456)	GAAAGGA AAGTCCC AGGAGG (配列番号973)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
7 3 8	AGAAGAC ACTCTGT ATGCCA (配列番号457)	AGAAGAC ACTCTGT ATGCCA (配列番号974)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 6 1 4	GGAACCC CACTTCC TTGGTA (配列番号458)	GGAACCC CACTTCC TTGGTA (配列番号975)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 9 5	TCTATGC CCAGCTG AAAGGA (配列番号459)	TCTATGC ACAACCTG AAAGGA (配列番号976)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 1 6	GCAGTCC GGCAGAG CCTTGG (配列番号460)	GCAGTCC GGCAGAG CCTTGG (配列番号977)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
4 4 8	GAGAGAA TTGCAGG AAGAGG (配列番号461)	GAGAGAA TTGCAGG AAGAGG (配列番号978)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 5 1 0	GA CTGGA GGGACAT ATTTAA (配列番号462)	GA CTGGA GGGACAT ATTTAA (配列番号979)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 3】

2 5 0 3	ACGGAAG GGGACGA ATTCAG (配列番号46 3)	ACGGAAG GGGACGA ATTCAG (配列番号98 0)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 7 8 1	ACACCCC GGGTGGG TTCCTG (配列番号46 4)	ACACCCC GGGTGGG TTCCTG (配列番号98 1)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
6 0 7	GACCTGG CGCTGAA GGACAT (配列番号46 5)	GACCTGG CGCTGAA GGACAT (配列番号98 2)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 2 0 1	CCTATCA GGCGGCA TGCAGA (配列番号46 6)	CCTATCA GGCGGCA TGCAGA (配列番号98 3)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 2 9 8	TGGTCAA AGCCTGG GAAGAA (配列番号46 7)	TGGTCAA AGCCTGG GAAGAA (配列番号98 4)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 2 4 3	AGGATAC TGAAGAA TGCCAA (配列番号46 8)	AGGATAC TGAAGAA TGCCAA (配列番号98 5)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 5 7 0	GAGTGCT TGGTCCT GGATAA (配列番号46 9)	GAGTGCT TGGTCCT GGATAA (配列番号98 6)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 9 2 0	GGGAAAA CCACCAC CTTGTC (配列番号47 0)	GGGAAAA CCACCAC CTTGTC (配列番号98 7)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 4】

2 9 1 4	GGAGCTG GGAAAAC CACCAC (配列番号 4 7 1)	GGAGCTG GGAAAAC CACCAC (配列番号 9 8 8)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 8 1 9	TTCCGGT ACATCTG GGGCGG (配列番号 4 7 2)	TTCCGGT ACATCTG GGGCGG (配列番号 9 8 9)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 6 0 1	TCCAGGA GACTATG GAACCC (配列番号 4 7 3)	TCCAGGA GACTATG GAACCC (配列番号 9 9 0)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 4 7	AGCACAA CATCCTG TTCCAC (配列番号 4 7 4)	AGCACAA CATCCTG TTCCAC (配列番号 9 9 1)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 8 0 0	GGGGTAT GCGTGAA GAATCT (配列番号 4 7 5)	GGGGTGT GCGTGAA GAATCT (配列番号 9 9 2)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 8 3 4	GGCGGGT TTGCCTA TCTGCA (配列番号 4 7 6)	GGCGGGT TTGCATA TCTGCA (配列番号 9 9 3)	分岐点	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 9	TAACAAC TCCATCT TGGCAA (配列番号 4 7 7)	TAACAAC TCCATCT TGGCAA (配列番号 9 9 4)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 8 2 3	AAAGATT TTTGAGC CCTGTG (配列番号 4 7 8)	GAAGATT TTTGAGC CCTGTG (配列番号 9 9 5)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 5】

3 2 2 9	AGCGTGG CCATTGC CTTCGT (配列番号479)	AGCGTGG CCATTGC CTTCGT (配列番号996)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 5 6 4	TCTATGG CTTACTC GCTTGG (配列番号480)	TGTATGG CTTGCTC GCTTGG (配列番号997)	分岐点	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
7 1 3	TCTCCCA GGGCACC CTACAG (配列番号481)	TCTCCCA GGGCACC CTACAG (配列番号998)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 4 3 3	GTATTAC TGCTGAA GCCATC (配列番号482)	GCATTAC TGCGGAG GCCATC (配列番号999)	分岐点	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 7 1 4	CCCTAAC AGAGGAA ACGGAG (配列番号483)	CCCTAAC AGAGGAA ACGGAG (配列番号1000)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 3	GCTTCGT GAGACAG ATACAG (配列番号484)	GCTTCGT GAGACAG ATACAG (配列番号1001)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 5 9 7	AGCTACA ATGATGA AACTCA (配列番号485)	AGCTACA ATGATGA AACTCA (配列番号1002)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 3 4 3	ACACATC CTGTGCT TCGCCT (配列番号486)	CCACATC CTGTGCT TCGCCT (配列番号1003)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 6】

2 3 5 1	TGTGCTT CGCCTGG CAGGAC (配列番号 4 8 7)	TGTGCTT CGCCTGG CAAGAC (配列番号 1 0 0 4)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 6 4 2	TACAAGA GTCGTAT TGGCTT (配列番号 4 8 8)	TACAAGA GTCGTAT TGGCTT (配列番号 1 0 0 5)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 2 3 9	TCCACTG CCACCAT CATGCT (配列番号 4 8 9)	TCCACTG CCACCAT CATGCT (配列番号 1 0 0 6)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 2 2 3	GTTCTTG TTGGCTT TCTCCA (配列番号 4 9 0)	GTTCTTG TTGGCTT TCTCCA (配列番号 1 0 0 7)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
4 4 1	TCACCCG GAGAGAA TTGCAG (配列番号 4 9 1)	TCACCCG GAGAGAA TTGCAG (配列番号 1 0 0 8)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 1 8 9	AAGCCTT TGCTGAT GGGAAA (配列番号 4 9 2)	AAGCCTT TGCTGAT GGGAAA (配列番号 1 0 0 9)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 5 5 5	ATGCTGC TGTCTAT GGCTTA (配列番号 4 9 3)	ATGCTGC TGTGTAT GGCTTG (配列番号 1 0 1 0)	分岐点	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 6 3 6	TCTCTAC TGGAGGA AAACAT (配列番号 4 9 4)	TCTCTAC TGGAGGA AAACAT (配列番号 1 0 1 1)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 7】

2 2 9	CAGGGGA TCTTCTG CAATGT (配列番号49 5)	CAGGGGA TCTTCTG CAATGT (配列番号10 12)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
7 0 5	GTGCTCC CTCTCCC AGGGCA (配列番号49 6)	GTGCTCC CTCTCCC AGGGCA (配列番号10 13)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 7 4 7	GTGGTGG AGAAAAC CAATAA (配列番号49 7)	GTGGTGG AGAAAAC CAATAA (配列番号10 14)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 3 1 8	GTAGGGC CCCAGAT CTGGTA (配列番号49 8)	GTAGGGC CCCAGAT CTGGTA (配列番号10 15)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 0 1 5	TGCAGTC CGGCAGA GCCTTG (配列番号49 9)	TGCAGTC CGGCAGA GCCTTG (配列番号10 16)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 1 0 3	GATTTGG TGTACCT GGTTCC (配列番号50 0)	GATTTGG TGTACCT GGTTCC (配列番号10 17)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 1 2 2	AGGAGGA GGCCCAG CTGGAG (配列番号50 1)	AGGAGGA GGCCCAG CTGGAG (配列番号10 18)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
1 5 5 5	GTCAATC AATACCT GGAGTG (配列番号50 2)	GTCAATC AATACCT GGAGTG (配列番号10 19)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 8】

1 7 2 5	TAAGATC CGAATGG ACATAG (配列番号 5 0 3)	TAAGATC CGAATGG ACATAG (配列番号 1 0 2 0)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 7 8	GGCTGAG CACATGC TGTTCT (配列番号 5 0 4)	GGCTGAG CACATGC TGTTCT (配列番号 1 0 2 1)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 6 8 1	GACATGT ATCCCTG GACCAG (配列番号 5 0 5)	GACATGT ATCCCTG GACCAG (配列番号 1 0 2 2)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
2 0 2 3	ATGACTG TGAAGAG CATCGT (配列番号 5 0 6)	ATGACTG TGAAGAG CATCGT (配列番号 1 0 2 3)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
3 0 8 2	GAGCACA TGCTGTT CTATGC (配列番号 5 0 7)	GAGCACA TGCTGTT CTATGC (配列番号 1 0 2 4)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
1 0 3	CTCGTGT GGCCTTT ATCTTT (配列番号 5 0 8)	CTCGTGT GGCCTTT ATCTTT (配列番号 1 0 2 5)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 9 3 5	TTGTCCA TCCTCAC AGGCCT (配列番号 5 0 9)	TTGTCCA TCCTCAC TGGCCT (配列番号 1 0 2 6)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
5 1	CTGGAAG AACTGGA CCCTGC (配列番号 5 1 0)	CTGGAAG AACTGGA CCCTGC (配列番号 1 0 2 7)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 9】

1 7 5	GAATGCC ATTTCCC CAACAA (配列番号511)	GAATGCC ATTTCCC CAACAA (配列番号1028)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 6 3 0	GGTACTT TCTTCTA CAAGAG (配列番号512)	GGTACTT TCTTCTA CAAGAG (配列番号1029)	n o t	0. 5 0 8 0 3 0 4 3 7 1	0	
2 3 0 8	TGTAGTG GTGTCAT CTATTT (配列番号513)	TGTAGTG GTGTCAT CTATTT (配列番号1030)	n o t	0	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	
1 2 7 2	TGAAGAA CTGGAAC ACGTTA (配列番号514)	TGAAGAA CTGGAAC ACGTTA (配列番号1031)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
6 4 4	TCCTGGA GCGCTTC ATCATC (配列番号515)	TCCTGGA GCGCTTC ATCATC (配列番号1032)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 1 6 2	TTAACCA AAATCGC TTGGAG (配列番号516)	TTAACCA AAATCGC TTGGAG (配列番号1033)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 9 1 7	GCTGGGA AAACCAC CACCTT (配列番号517)	GCTGGGA AAACCAC CACCTT (配列番号1034)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 8 9	GATCACCC GCATTCC TGGGCC (配列番号518)	GATCACCC GCATTCC TGGGCC (配列番号1035)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 0】

3 0 0 4	ACCAGCC TGGATGC AGTCCG (配列番号 5 1 9)	ACCAGCC TGGATGC AGTCCG (配列番号 1 0 3 6)	n o t	0	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	
2 3 4 9	CCTGTGC TTCGCCT GGCAGG (配列番号 5 2 0)	CCTGTGC TTCGCCT GGCAAG (配列番号 1 0 3 7)	n o t	0	7. 2 4 2 3 8 3 5 4 7	
3 0 0 2	AAACCAG CCTGGAT GCAGTC (配列番号 5 2 1)	AAACCAG CCTGGAT GCAGTC (配列番号 1 0 3 8)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 0 7 6	GTGGCTG AGCACAT GCTGTT (配列番号 5 2 2)	GTGGCTG AGCACAT GCTGTT (配列番号 1 0 3 9)	n o t	0	2. 7 0 4 5 7 5 4 3 5	
2 8 1 3	AGAATCT GGTAAAG ATTTTT (配列番号 5 2 3)	AGAATCT GGTGAAG ATTTTT (配列番号 1 0 4 0)	分岐点	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 7 7 3	GAGAGAG AACACCC CGGGTG (配列番号 5 2 4)	GAGAGAG AACACCC CGGGTG (配列番号 1 0 4 1)	n o t	0	3. 5 7 5 9 1 8 1 9 1	
6 1 9	AAGGACA TCGCCTG CAGCGA (配列番号 5 2 5)	AAGGACA TCGCCTG CAGCGA (配列番号 1 0 4 2)	n o t	0	2. 6 1 4 0 2 8 2 7	
2 9 5 7	TGCCTCC AACCTCT GGGACT (配列番号 5 2 6)	TGCCTCC AACCTCT GGGACT (配列番号 1 0 4 3)	n o t	0	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 1】

2 9 4 9	AGGCCTG CTGCCTC CAACCT (配列番号 5 2 7)	TGGCCTG CTGCCTC CAACCT (配列番号 1 0 4 4)	n o t	0	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
2 9 2 9	ACCACCT TGTCCAT CCTCAC (配列番号 5 2 8)	ACCACCT TGTCCAT CCTCAC (配列番号 1 0 4 5)	n o t	0	4. 5 3 7 8 0 8 1 1 2	
2 3 2 0	ATCTATT TCACCTT CTACCT (配列番号 5 2 9)	ATCTATT TCACCTT GTACCT (配列番号 1 0 4 6)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 1 4	GAATCTG GTAAAGA TTTTTG (配列番号 5 3 0)	GAATCTG GTGAAGA TTTTTG (配列番号 1 0 4 7)	分岐点	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 2 9 7	TGGCAGC AGCCTGT AGTGGT (配列番号 5 3 1)	TGGCAGC AGCCTGT AGTGGT (配列番号 1 0 4 8)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 0 7 3	ACGGTGG CTGAGCA CATGCT (配列番号 5 3 2)	ACGGTGG CTGAGCA CATGCT (配列番号 1 0 4 9)	n o t	0	2. 7 9 5 1 2 2 5 9 9	
1 7 8 5	GGATTCT GGTCCCA GAGCTG (配列番号 5 3 3)	GGATTCT GGTCCCA GAGCTG (配列番号 1 0 5 0)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 0 9 4	TTCTATG CCCAGCT GAAAGG (配列番号 5 3 4)	TTCTATG CACAACCT GAAAGG (配列番号 1 0 5 1)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 2】

1 7 3	ATGAATG CCATTTTC CCCAAC (配列番号 5 3 5)	ATGAATG CCATTTTC CCCAAC (配列番号 1 0 5 2)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 1 9 4	CATTACA GCGACCC ATTTCAT (配列番号 5 3 6)	CATTACA GCGACCC ATTTCAT (配列番号 1 0 5 3)	n o t	0	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	
2 7 9 5	TTCCTGG GGTATGC GTGAAG (配列番号 5 3 7)	TTCCTGG GGTGTGC GTGAAG (配列番号 1 0 5 4)	n o t	0	2. 6 1 4 0 2 8 2 7	
1 3	GGTGGCA GCGGCTT CGTGAG (配列番号 5 3 8)	GGTGGAT CCGGCTT CGTGAG (配列番号 1 0 5 5)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 2 4 2	ACTGCCA CCATCAT GCTGTG (配列番号 5 3 9)	ACTGCCA CCATCAT GCTGTG (配列番号 1 0 5 6)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 6 3	CTGAACA TCACCTT CTACGA (配列番号 5 4 0)	CTGAACA TCACCTT CTACGA (配列番号 1 0 5 7)	n o t	0	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
2 4 3 5	CTGAGTA CCTGGTT CGCTTT (配列番号 5 4 1)	CTGAGTA CCTGGTT CGCTTT (配列番号 1 0 5 8)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 2 2 5	GATTCAC CTGCAGC ACGAAG (配列番号 5 4 2)	GATTCAC CTGCTGC ACGAAG (配列番号 1 0 5 9)	n o t	0	2. 6 1 4 0 2 8 2 7	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 3】

9 0 1	GACTTGC TGTGGGT GACCAG (配列番号5 4 3)	GACTTGC TGTGGGT GACCAG (配列番号1 0 6 0)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 1 2 3	TTTTGTA ATGCATT GATCCA (配列番号5 4 4)	TTTTGTA ATGCATT GATCCA (配列番号1 0 6 1)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 1 3 0	CTTCTCC ATCATGT CGATGA (配列番号5 4 5)	CTTCTCC ATCATGT CGATGA (配列番号1 0 6 2)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 0 1 1	TGGATGC AGTCCGG CAGAGC (配列番号5 4 6)	TGGATGC AGTCCGG CAGAGC (配列番号1 0 6 3)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 0 8 1	ATCAGGG TGTCTCC AATGCA (配列番号5 4 7)	ATCAGGG TGTCTCC AATGCA (配列番号1 0 6 4)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 0 9 2	TATCTAT TCTTATG ACAGAA (配列番号5 4 8)	TATCTAT TCTTATG ACAGAA (配列番号1 0 6 5)	n o t	0	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	
3 1 2 0	CCAGGAG GAGGCC AGCTGG (配列番号5 4 9)	CCAGGAG GAGGCC AGCTGG (配列番号1 0 6 6)	n o t	0	1. 8 3 3 2 3 2 6 7 8	
3 1 1 1	AGGAAAG TCCCAGG AGGAGG (配列番号5 5 0)	AGGAAAG TCCCAGG AGGAGG (配列番号1 0 6 7)	n o t	0	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 4】

2 8 3 9	TGTGGCC GGCCAGC TGTGGA (配列番号 5 5 1)	TGTGGCC GGCCAGC TGTGGA (配列番号 1 0 6 8)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 6 7 7	TCAACCA GAGAAGA AAGAGC (配列番号 5 5 2)	TCAACCA GAGAAGA AAGAGC (配列番号 1 0 6 9)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 2 1	GTAAAGA TTTTTGA GCCCTG (配列番号 5 5 3)	GTGAAGA TTTTTGA GCCCTG (配列番号 1 0 7 0)	分岐点	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 7 8 4	CCCCGGG TGGGTTC CTGGGG (配列番号 5 5 4)	CCCCGGG TGGGTTC CTGGGG (配列番号 1 0 7 1)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 1 2 9	AATGCAT TGATCCA GAGCCT (配列番号 5 5 5)	AATGCAT TGATCCA GAGCCT (配列番号 1 0 7 2)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
9 1 8	CAGGCCC CTCATGC AGAATG (配列番号 5 5 6)	CAGGCCC CTCATGC AGAATG (配列番号 1 0 7 3)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 5 1	ACTCCTC ATGAATG CACCAG (配列番号 5 5 7)	ACTCCTC ATGAATG CACCAG (配列番号 1 0 7 4)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 5 4 0	AGATGAT GCTCCTT GATGCT (配列番号 5 5 8)	AGATGAT GCTCCTT GATGCT (配列番号 1 0 7 5)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 5】

3 0 5 6	TCCTGTT CCACCAC CTCACG (配列番号 5 5 9)	TCCTGTT CCACCAC CTCACG (配列番号 1 0 7 6)	n o t	0	1. 7 4 2 6 8 5 5 1 3	
1 4 6 5	TACAAGG GCCCTCG GGAAAG (配列番号 5 6 0)	TACAAGG GCCCTCG GGAAAG (配列番号 1 0 7 7)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 3 8	CTGTGGC CGGCCAG CTGTGG (配列番号 5 6 1)	CTGTGGC CGGCCAG CTGTGG (配列番号 1 0 7 8)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 0 6 5	ACCACCT CACGGTG GCTGAG (配列番号 5 6 2)	ACCACCT CACGGTG GCTGAG (配列番号 1 0 7 9)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 1 5 0	GAGTCAA ATCCTTT AACC AA (配列番号 5 6 3)	GAGTCAA ATCCTTT AACC AA (配列番号 1 0 8 0)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 9 5 9	CATGATC ATCCTGA ACCGCT (配列番号 5 6 4)	CATGATC ATCCTGA ACCGCT (配列番号 1 0 8 1)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 6 5 6	TGGCTTG GCGGTGA AGGGTG (配列番号 5 6 5)	TGGCTTG GCGGTGA AGGGTG (配列番号 1 0 8 2)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 0 1	AACTCGT GTGGCCT TTATCT (配列番号 5 6 6)	AACTCGT GTGGCCT TTATCT (配列番号 1 0 8 3)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 6】

1 8 0 7	CCCGTGG AAGATTT CCGGTA (配列番号 5 6 7)	CCCGTGG AAGATTT CCGGTA (配列番号 1 0 8 4)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 2 7 0	TTTGAAG AACTGGA ACACGT (配列番号 5 6 8)	TTTGAAG AACTGGA ACACGT (配列番号 1 0 8 5)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 7 3 8	CAGAGCA CCCAGAA GGAATA (配列番号 5 6 9)	CAGAGCA CCCAGAA GGAATA (配列番号 1 0 8 6)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 2 7	ATTTTTTG AGCCCTG TGGCCG (配列番号 5 7 0)	ATTTTTTG AGCCCTG TGGCCG (配列番号 1 0 8 7)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 0 7 4	TTGAAAA ATCAGGG TGTCTC (配列番号 5 7 1)	TTGAAAA ATCAGGG TGTCTC (配列番号 1 0 8 8)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 4 1 4	AGGCAGC TTGGTGA AGAAGG (配列番号 5 7 2)	AGGCAGC TTGGTGA AGAAGG (配列番号 1 0 8 9)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 3 8 3	GAGCTGA AGAAGGC TGTGAG (配列番号 5 7 3)	GAGCTGA AGAAGGC TGTGAG (配列番号 1 0 9 0)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 9 6 1	TCCAACC TCTGGGA CTGTGC (配列番号 5 7 4)	TCCAACC TCTGGGA CTGTGC (配列番号 1 0 9 1)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 7】

1 3 5 5	CACAGAT GAACATG ATCAGA (配列番号 5 7 5)	CACAGAT GAACATG ATCAGA (配列番号 1 0 9 2)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
9 8 7	GTGTGGC TACCCCG AGGGAG (配列番号 5 7 6)	GTGTGGC TACCCCG AGGGAG (配列番号 1 0 9 3)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 1 9 5	ATTACAG CGACCCA TTCATC (配列番号 5 7 7)	ATTACAG CGACCCA TTCATC (配列番号 1 0 9 4)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 0 7 2	CTTTGAA AAATCAG GGTGTC (配列番号 5 7 8)	CATTGAA AAATCAG GGTGTC (配列番号 1 0 9 5)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 8 9 9	TTCCTGG GCCACAA TGGAGC (配列番号 5 7 9)	TTCCTGG GCCACAA TGGAGC (配列番号 1 0 9 6)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 6 7 4	TGTTCAA CCAGAGA AGAAAG (配列番号 5 8 0)	TGTTCAA CCAGAGA AGAAAG (配列番号 1 0 9 7)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 9 8 7	ATCTTCA TGGTGCT GGCATG (配列番号 5 8 1)	ATCTTCA TGGTGCT GGCATG (配列番号 1 0 9 8)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
4 9 8	AGAAACA CTGACAC TATTTTC (配列番号 5 8 2)	AGAAACA CTGACAC TATTTTC (配列番号 1 0 9 9)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 8】

1 9 5 5	CTTTCAT GATCATC CTGAAC (配列番号 5 8 3)	CTTTCAT GATCATC CTGAAC (配列番号 1 1 0 0)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 7 7 7	GAGAACA CCCCGGG TGGGTT (配列番号 5 8 4)	GAGAACA CCCCGGG TGGGTT (配列番号 1 1 0 1)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
9 6	GGTGGAA CTCGTGT GGCCTT (配列番号 5 8 5)	GGTGGAA CTCGTGT GGCCTT (配列番号 1 1 0 2)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 1 4 6	CCTGGAG TCAAATC CTTTAA (配列番号 5 8 6)	CCTGGAG TCAAATC CTTTAA (配列番号 1 1 0 3)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
1 2 1	TTATTTTC TGGTCTT GATCTG (配列番号 5 8 7)	TTATTTTC TGGTCTT GATCTG (配列番号 1 1 0 4)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 4 9 5	ACAGTCC CACGGAA GGGGAC (配列番号 5 8 8)	ACAGTCC CACGGAA GGGGAC (配列番号 1 1 0 5)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
2 2 0 3	GACCCAT TCATCCT CTTCCT (配列番号 5 8 9)	GACCCAT TCATCCT CTTCCT (配列番号 1 1 0 6)	n o t	0	0. 8 7 1 3 4 2 7 5 6 6	
3 1 7 0	TCCACCA CAAGCGG AATGAA (配列番号 5 9 0)	TCCACCA CAAGCGG AATGAA (配列番号 1 1 0 7)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 5 9】

3 1 6 9	CTCCACC ACAAGCG GAATGA (配列番号 5 9 1)	CTCCACC ACAAGCG GAATGA (配列番号 1 1 0 8)	n o t	0	2. 8 8 5 6 6 9 7 6 4	
2 0 8 6	GGTGTCT CCAATGC AGTGAT (配列番号 5 9 2)	GGTGTCT CCAATGC AGTGAT (配列番号 1 1 0 9)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 4 0	CTGCAAT GTGAACA ATCCCT (配列番号 5 9 3)	CTGCAAT GTGAACA ATCCCT (配列番号 1 1 1 0)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 6 5 3	TATTGGC TTGGCGG TGAAGG (配列番号 5 9 4)	TATTGGC TTGGCGG TGAAGG (配列番号 1 1 1 1)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 2 6 8	GCTCAGC ACCTTCT TCTCCA (配列番号 5 9 5)	GCTCAGC ACCTTCT TCTCCA (配列番号 1 1 1 2)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 5 3	TCCTCAT GAATGCA CCAGAG (配列番号 5 9 6)	TCCTCAT GAATGCA CCAGAG (配列番号 1 1 1 3)	ではない	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 0 7 3	TTTGAAA AATCAGG GTGTCT (配列番号 5 9 7)	ATTGAAA AATCAGG GTGTCT (配列番号 1 1 1 4)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 2 7 1	CAGCACC TTCTTCT CCAAGG (配列番号 5 9 8)	CAGCACC TTCTTCT CCAAGG (配列番号 1 1 1 5)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 0】

2 9 7 0	TGGGACT GTGCTCG TTGGGG (配列番号59)	TGGGACT GTGCTCG TTGGGG (配列番号116)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 8 1 5	AATCTGG TAAAGAT TTTTGA (配列番号60)	AATCTGG TGAAGAT TTTTGA (配列番号117)	分岐点	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 1 3 2	CCAGCTG GAGATGG AAGCCA (配列番号601)	CCAGCTG GAGATGG AAGCCA (配列番号118)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 0 9 7	TGCAGTG ATTTGGT GTACCT (配列番号602)	TGCAGTG ATTTGGT GTACCT (配列番号119)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 8 9 4	GCGGAGG CTCCAGT TGGAAT (配列番号603)	GCGGAGG CTCCAGT TGGAAT (配列番号120)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
6 1 7	TGAAGGA CATCGCC TGCAGC (配列番号604)	TGAAGGA CATCGCC TGCAGC (配列番号121)	n o t	0	2. 8 8 5 6 6 9 7 6 4	
3 0 2 7	GAGCCTT GGCATGT GTCCAC (配列番号605)	GAGCCTT GGCATGT GTCCAC (配列番号122)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
1 9 7 7	CTGTTTC CCTATCT TCATGG (配列番号606)	CTGTTTC CCTATCT TCATGG (配列番号123)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 1】

2 8 3 5	GCCCTGT GGCCGGC CAGCTG (配列番号 6 0 7)	GCCCTGT GGCCGGC CAGCTG (配列番号 1 1 2 4)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 0 5	TCAGCAG GAATGCT GCCGTG (配列番号 6 0 8)	TCAGCAG GAATGCT GCCGTG (配列番号 1 1 2 5)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 1 6 1	ACACAGG CCTCCAC CACAAG (配列番号 6 0 9)	ACACAGG CCTCCAC CACAAG (配列番号 1 1 2 6)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 8 6 4	TGAACAT CACCTTC TACGAG (配列番号 6 1 0)	TGAACAT CACCTTC TACGAG (配列番号 1 1 2 7)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
3 0 5 5	ATCCTGT TCCACCA CCTCAC (配列番号 6 1 1)	ATCCTGT TCCACCA CCTCAC (配列番号 1 1 2 8)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 9 3 1	CCTACCC CTGCTTC GTGGAC (配列番号 6 1 2)	CCTACCC CTGCTTC GTGGAC (配列番号 1 1 2 9)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 8 7 2	ACCTTCT ACGAGAA CCAGAT (配列番号 6 1 3)	ACCTTCT ACGAGAA CCAGAT (配列番号 1 1 3 0)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 9 5 0	GGCCTGC TGCCTCC AACCTC (配列番号 6 1 4)	GGCCTGC TGCCTCC AACCTC (配列番号 1 1 3 1)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 2】

9 2	TTGTGGT GGA ACTC GTGTGG (配列番号 6 1 5)	TTGTGGT GGA ACTC GTGTGG (配列番号 1 1 3 2)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
3 0 5 0	ACAACAT CCTGTTC CACCAC (配列番号 6 1 6)	ACAACAT CCTGTTC CACCAC (配列番号 1 1 3 3)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 8 7 4	TCACAAG GAGCCAG GTGCAG (配列番号 6 1 7)	TCACAAG GAGCCAG GTGCAG (配列番号 1 1 3 4)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 9 8 4	TTGGGGG AAGGGAC ATTGAA (配列番号 6 1 8)	TTGGGGG AAGGGAC ATTGAA (配列番号 1 1 3 5)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 1 0 7	TGGTGTA CCTGGTT CCTGGA (配列番号 6 1 9)	TGGTGTA CCTGGTT CCTGGA (配列番号 1 1 3 6)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 3	ACAGATA CAGCTTT TGCTCT (配列番号 6 2 0)	ACAGATA CAGCTTT TGCTCT (配列番号 1 1 3 7)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 9 9 9	TTGAAAC CAGCCTG GATGCA (配列番号 6 2 1)	TTGAAAC CAGCCTG GATGCA (配列番号 1 1 3 8)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 8 3 6	CCCTGTG GCCGGCC AGCTGT (配列番号 6 2 2)	CCCTGTG GCCGGCC AGCTGT (配列番号 1 1 3 9)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 3】

2 2 6 2	CTTTCTG CTCAGCA CCTTCT (配列番号 6 2 3)	CTTTCTG CTCAGCA CCTTCT (配列番号 1 1 4 0)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 6 4 0	TCTACAA GAGTCGT ATTGGC (配列番号 6 2 4)	TCTACAA GAGTCGT ATTGGC (配列番号 1 1 4 1)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 7 1 7	TAACAGA GGAAACG GAGGAT (配列番号 6 2 5)	TAACAGA GGAAACG GAGGAT (配列番号 1 1 4 2)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 0 3 8	TGTGTCC ACAGCAC AACATC (配列番号 6 2 6)	TGTGTCC ACAGCAC AACATC (配列番号 1 1 4 3)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 5 7 9	GTCCTGG ATAAGTT TGAAAG (配列番号 6 2 7)	GTCCTGG ATAAGTT TGAAAG (配列番号 1 1 4 4)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 3 0 7	CTGTAGT GGTGTCA TCTATT (配列番号 6 2 8)	CTGTAGT GGTGTCA TCTATT (配列番号 1 1 4 5)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 1 3 8	GGAGATG GAAGCCA TGTTGG (配列番号 6 2 9)	GGAGATG GAAGCCA TGTTGG (配列番号 1 1 4 6)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 8 9 2	CACCGCA TTCCTGG GCCACA (配列番号 6 3 0)	CACCGCA TTCCTGG GCCACA (配列番号 1 1 4 7)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 4】

1 5 5 8	AATCAAT ACCTGGA GTGCTT (配列番号 6 3 1)	AATCAAT ACCTGGA GTGCTT (配列番号 1 1 4 8)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 9 5 5	GCTGCCT CCAACCT CTGGGA (配列番号 6 3 2)	GCTGCCT CCAACCT CTGGGA (配列番号 1 1 4 9)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 1 4 6	AAGCCAT GTTGGAG GACACA (配列番号 6 3 3)	AAGCCAT GTTGGAG GACACA (配列番号 1 1 5 0)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
2 7 9 9	TGGGGTA TGCGTGA AGAATC (配列番号 6 3 4)	TGGGGTG TGCGTGA AGAATC (配列番号 1 1 5 1)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
9 1	TTTGTGG TGGAACCT CGTGTG (配列番号 6 3 5)	TTTGTGG TGGAACCT CGTGTG (配列番号 1 1 5 2)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 4 9 5	GACATGG CCAACCT CGACTG (配列番号 6 3 6)	GACATGG CCAACCT CGACTG (配列番号 1 1 5 3)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 9 6 9	CTGAACC GCTGTTT CCCTAT (配列番号 6 3 7)	CTGAACC GCTGTTT CCCTAT (配列番号 1 1 5 4)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 3 4 0	GCCACAC ATCCTGT GCTTCG (配列番号 6 3 8)	GCCCCAC ATCCTGT GCTTCG (配列番号 1 1 5 5)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 5】

5 7 8	GTCCAGA GCAGTTC GCTCAT (配列番号 6 3 9)	GTCCAGA GCAGTTC GCTCAT (配列番号 1 1 5 6)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 4 9 1	GGGAACA GTCCCAC GGAAGG (配列番号 6 4 0)	GGGAACA GTCCCAC GGAAGG (配列番号 1 1 5 7)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 8 2 6	ACATCTG GGGCGGG TTTGCC (配列番号 6 4 1)	ACATCTG GGGCGGG TTTGCA (配列番号 1 1 5 8)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
5 6 3	TCAACTC TCAAGTC CGTCCA (配列番号 6 4 2)	TCAACTC TCAAGTC CGTCCA (配列番号 1 1 5 9)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 5 3 5	CTGATCG CACCCCTC CGCCTG (配列番号 6 4 3)	CTGATCG CACCCCTC CGCCTG (配列番号 1 1 6 0)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 4 4 4	GAAGCCA TCCTAAA CTTCCT (配列番号 6 4 4)	GAGGCCA TCCTAAA CTTCCT (配列番号 1 1 6 1)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 2 2 3	AAACTGA GCGTGGC CATTGC (配列番号 6 4 5)	AAACTGA GCGTGGC CATTGC (配列番号 1 1 6 2)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 5 0 0	GGCCAAC TTCGACT GGAGGG (配列番号 6 4 6)	GGCCAAC TTCGACT GGAGGG (配列番号 1 1 6 3)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 6】

3 2 0 0	ACCTATC AGGCGGC ATGCAG (配列番号 6 4 7)	ACCTATC AGGCGGC ATGCAG (配列番号 1 1 6 4)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
7 8 7	CTTCCCA CACTCCT AGACAG (配列番号 6 4 8)	CTTCCCA CACTCCT AGACAG (配列番号 1 1 6 5)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 2 1 3	TCCTCTT CCTGTTC TTGTTG (配列番号 6 4 9)	TCCTCTT CCTGTTC TTGTTG (配列番号 1 1 6 6)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 4 1 1	CTCCGGT GGCATTT GGATTT (配列番号 6 5 0)	CTCCGGT GGCATTT GGATTT (配列番号 1 1 6 7)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 0 3 5	GCATGTG TCCACAG CACAAC (配列番号 6 5 1)	GCATGTG TCCACAG CACAAC (配列番号 1 1 6 8)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 8 1 2	AAGAATC TGGTAAA GATTTT (配列番号 6 5 2)	AAGAATC TGGTGAA GATTTT (配列番号 1 1 6 9)	分岐点	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
6 2 6	TCGCCTG CAGCGAG GCCCTC (配列番号 6 5 3)	TCGCCTG CAGCGAG GCCCTC (配列番号 1 1 7 0)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 0 0 5	TGGATCT ACTCTGT CTCCAT (配列番号 6 5 4)	TGGATCT ACTCTGT CTCCAT (配列番号 1 1 7 1)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 7】

6 5	CCCTGCG GAAAAGG CAAAAG (配列番号 6 5 5)	CCCTGCG GAAAAGG CAAAAG (配列番号 1 1 7 2)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 9 2 8	CACCACC TTGTCCA TCCTCA (配列番号 6 5 6)	CACCACC TTGTCCA TCCTCA (配列番号 1 1 7 3)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 7 5 8	CACGACT CCTTCTT CGAGAG (配列番号 6 5 7)	CACGACT CCTTCTT CGAGAG (配列番号 1 1 7 4)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 2 9 5	TCTGGCA GCAGCCT GTAGTG (配列番号 6 5 8)	TCTGGCA GCAGCCT GTAGTG (配列番号 1 1 7 5)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 1 3 9	GAGATGG AAGCCAT GTTGGA (配列番号 6 5 9)	GAGATGG AAGCCAT GTTGGA (配列番号 1 1 7 6)	n o t	0	1. 9 2 3 7 7 9 8 4 3	
1 6 9	CATCATG AATGCCA TTTCCC (配列番号 6 6 0)	CATCATG AATGCCA TTTCCC (配列番号 1 1 7 7)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 9 6 4	AACCTCT GGGACTG TGCTCG (配列番号 6 6 1)	AACCTCT GGGACTG TGCTCG (配列番号 1 1 7 8)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
1 3 5 4	ACACAGA TGAACAT GATCAG (配列番号 6 6 2)	ACACAGA TGAACAT GATCAG (配列番号 1 1 7 9)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

40

50

【表 4 - 6 8】

1 4 1 6	GCAGCTT GGTGAAG AAGGTA (配列番号 6 6 3)	GCAGCTT GGTGAAG AAGGCA (配列番号 1 1 8 0)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 9 0 2	CTGGGCC ACAATGG AGCTGG (配列番号 6 6 4)	CTGGGCC ACAATGG AGCTGG (配列番号 1 1 8 1)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
9 5 4	TACAAAG CTGATGG GCATCC (配列番号 6 6 5)	TACAAAG CTGATGG GCATCC (配列番号 1 1 8 2)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 9 4 2	TCCTCAC AGGCCTG CTGCCT (配列番号 6 6 6)	TCCTCAC TGGCCTG CTGCCT (配列番号 1 1 8 3)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
9 4	GTGGTGG AACTCGT GTGGCC (配列番号 6 6 7)	GTGGTGG AACTCGT GTGGCC (配列番号 1 1 8 4)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
3 0 6 4	CACCACC TCACGGT GGCTGA (配列番号 6 6 8)	CACCACC TCACGGT GGCTGA (配列番号 1 1 8 5)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 2 3 2	GGCTTTC TCCACTG CCACCA (配列番号 6 6 9)	GGCTTTC TCCACTG CCACCA (配列番号 1 1 8 6)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	
2 6 6 0	TTGGCGG TGAAGGG TGTTCA (配列番号 6 7 0)	TTGGCGG TGAAGGG TGTTCA (配列番号 1 1 8 7)	n o t	0	0. 9 6 1 8 8 9 9 2 1 3	

10

20

30

「標準アミノ酸」とは、以下の表 6 に示される、人体に自然に見出される 2 0 個のアミノ酸を指す。

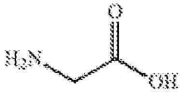
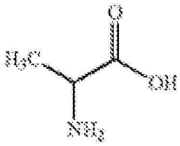
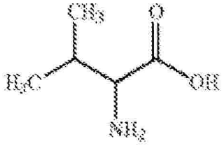
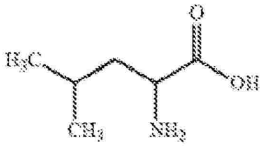
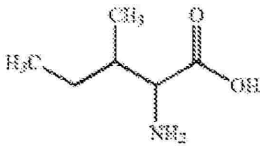
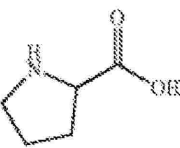
40

【0 3 0 6】

50

【表 5 - 1】

表 6：標準的なアミノ酸を、それぞれの 3 文字による略称、1 文字による略称、構造、及び対応するコドンを用いて図示する。

非極性、脂肪族残基				
グリシン	Gly	G		GGU GGC GGA GGG
アラニン	Ala	A		GCU GCC GCA GCG
バリン	Val	V		GUU GUC GUA GUG
ロイシン	Leu	L		UUA UUG CUU CUC CUA CUG
イソロイシン	Ile	I		AUU AUC AUA
プロリン	Pro	P		CCU CCC CCA CCG

10

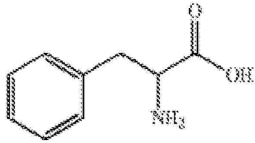
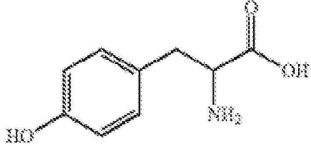
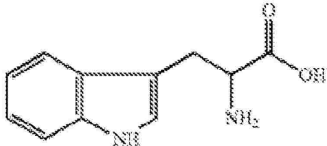
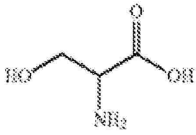
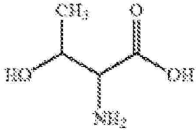
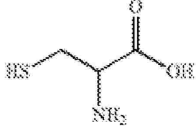
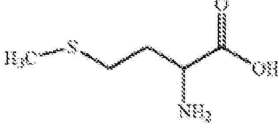
20

30

40

50

【表 5 - 2】

芳香族残基			
フェニルアラニン <i>Phe</i>	F		UUU UUC
チロシン <i>Tyr</i>	Y		UAU UAC
トリプトファン <i>Trp</i>	W		UGG
極性、非荷電残基			
セリン <i>Ser</i>	S		UCU UCC UCA UCG AGU AGC
トレオニン <i>Thr</i>	T		ACU ACC ACA ACG
システイン <i>Cys</i>	C		UGU UGC
メチオニン <i>Met</i>	M		AUG
アスパラギン <i>Asn</i>	N		AAU AAC

10

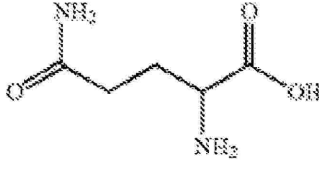
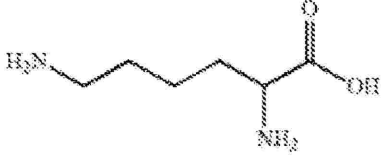
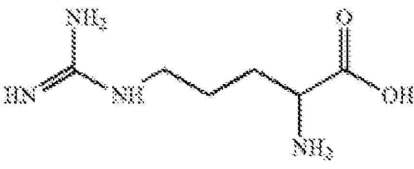
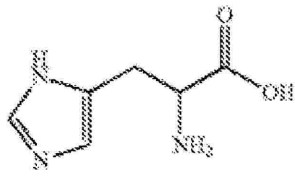
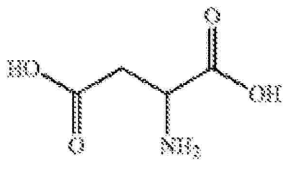
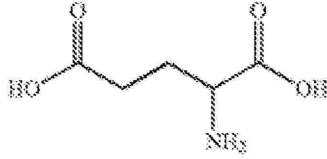
20

30

40

50

【表 5 - 3】

グルタミン	Gln	Q		CAA CAG
正電荷残基				
リジン	Lys	K		AAA AAG
アルギニン	Arg	R		CGU CGC CGA CGG AGA AGG
ヒスチジン	His	H		CAU CAC
負電荷残基				
アスパラギン酸	Asp	D		GAU GAC
グルタミン酸	Glu	E		GAA GAG

10

20

30

40

50

【0307】

実施例 8．例示的な ABCA4 トランススプライシング分子のインビトロでの評価

本試験の主要目的は、アフリカミドリザル (AGM) における例示的な AAV8-ABCA4 RNA エクソンエディター構築物の 4.3×10^{10} ($4.3 \text{ E } 10$) v g / 眼 oculusterque (OU; 両眼) の用量での網膜下投与後の 1 か月及び 3 か月タイムポイントでの持続的なエクソンエディターの発現及び有効性を確認することである。例示的な AAV8-ABCA4 RNA エクソンエディター構築物は、配列番号 77 を含む。例示的な AAV8-ABCA4 RNA エクソンエディター構築物によってコードされるエクソンエディターは、図 13 に記載するものと同じ調節エレメント (エンハンサー、プロモーター及び 5' UTR) を含み、SD を越えた NSP 翻訳を防止する二重終止コドンを含むが、3X U1 及び ARE の特徴を含まず、したがって、増強剤 (3X U1) 及び翻訳増強剤 (ARE) を含む構築物と比較して、有意に高いレベルの NSP が生成される。AAV8-ABCA4 RNA エクソンエディター構築物の力価は、エクソンエディターの ABCA4 CDS 内の末端エクソン 22 を標的とするフォワードプライマ

ー及びプローブ、ならびにエクソンエディター構築物中の40merリンカー及び二重終止コドン配列に及びバースプライマーを用いたddPCRアッセイを使用して測定した。この同じddPCRアッセイを使用して、他の例示的なABCA4 RNAエクソンエディター構築物の力価を計算している。

【0308】

RT-qPCRを使用して、編集ABCA4 RNA、天然NHP ABCA4 RNA、及び例示的なAAV8-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物の発現を測定し、すべてハウスキーピング遺伝子RNF20に対して正規化した。ABCA4 RNAの置換パーセンテージは、4週時点（1か月）で14.4%～31.5%の範囲であり、12週時点（3か月）で26.3%～37.8%の範囲であった。10ng RNAあたりのエクソンエディターのコピー数の範囲は、4週時点で1.3E6～0.6E6、12週時点で2.1E6～3.0E6であった。これらの結果は、本明細書に記載のAAVパッケージABCA4 RNAエクソンエディター構築物の形質導入が、観察された置換%によって反映されるように、コードされたRNAエクソンエディターの耐久性のある発現、及び耐久性のある活性をもたらすということを実証している。実際、代替%は経時的に増加している。図22A及び22Bを参照されたい。

【0309】

細隙灯顕微鏡法による生前の眼評価では、網膜下注射に関連した数匹の動物に軽度から中等度の炎症が示され、これは7日目にピークに達し、28日目までにほとんど回復した。眼底画像は、網膜下注射と一致する眼の変化を示した。眼圧（IOP）、網膜厚、及び網膜体積は、試験期間中、すべての動物で安定した。例示的なAAV8-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物またはビヒクルで治療された眼の共焦点走査レーザー検眼器（cSLO）及びカラー眼底写真は、注射領域において同等の程度の変化を示した。

【0310】

1日2回の全身観察では、例示的なAAV8-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物の有害な全身への影響を示す臨床徴候は明らかにならなかった。体重、呼吸数、心拍数、及び体温は試験中安定しており、生じた変動の中でAAV8-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物に関連するパターンは明らかでなかった。臨床病理〔臨床化学、全血球計算（CBC）、凝固プロファイル〕の異常は、AAV8-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物の投与に起因しなかった。

【0311】

組織病理学的解析により、すべての動物に由来する外側膝状核、視索、視交叉、脾臓、及び肝臓のサンプルが正常範囲内にあることが確認された。いずれのビヒクルまたはAAV8-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物で治療した動物の眼組織病理学的解析でも、免疫浸潤または網膜解剖学的異常の徴候は観察されなかった。網膜色素上皮（RPE）の最小限から軽度の肥大及び移動が、鋸状縁（硝子体切除の部位）のレベルで、AAV8-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物で治療した2匹の動物及びビヒクルで治療した1匹の動物で認められた。これらの知見は、注射手順と一致しており、試験品（構築物）に関連していないと考えられる。

【0312】

本試験で、ABCA4-01（例えば、実施例8～10を参照）と共通する選択された調節エレメント及び40merリンカー及びBDが、AGMにおいて3か月タイムポイントまで持続的な発現及びエクソン編集活性をもたらすことが実証された。図22A及び22Bを参照されたい。

【0313】

実施例9．調査毒性試験：インビボでの例示的なABCA4トランススプライシング分子ABCA4-01の評価

調査毒性試験：3.5E11または1E12vg／眼の単回網膜下投与から1か月後及び6か月後のカニクイザルにおける、エクソン編集効率及び調査安全性評価に関する例示的なAAV8-ABCA4 RNAエクソンエディター構築物ABCA4-01（配列番

10

20

30

40

50

号 90) (配列番号 78 を含む RNA エクソンエディターを含む) の評価を完了させた。

【0314】

本試験の主要目的は、例示的な AAV8-ABCA4 RNA エクソンエディター (ABCA4-01、配列番号 90) (配列番号 78 を含む) の 1 か月及び 6 か月タイムポイントでのインビボでの安全性及び有効性を確認することであった。本試験では、2 つの用量レベルを評価した。雄カニクイザルに、3.5E11 及び 1E12 vg/眼を 1 眼当たり (OU) の単回網膜下注射として投与した。各用量レベルについて、1 か月群は n=2 であり、ビヒクル群は n=2 であった。各用量レベルについて、6 か月群は n=3 であり、ビヒクル群は n=2 であった。本試験では全ての投与が完了した。

【0315】

本明細書に記載されるように、ABCA4-01 ベクターゲノム DNA コピー (VGC) の生体内分布、RNA 発現、エクソン編集活性 (RNA 置換%)、及び編集ヒト-NHP キメラ ABCA4 タンパク質を、神経網膜サンプルにて測定した。

【0316】

さらに、VGC を視交叉、視索、視神経で評価した。以下の非眼組織を収集した：脳、後根神経節 (腰部)、心臓、腎臓、肝臓、胆嚢、外側膝状核、肺、リンパ節 (下顎及び腸間膜)、脾臓、及び精巣。初期の計画は、1 か月タイムポイントで 1E12 vg/眼の用量群のみからの全ての非眼組織を解析して、下流の必要性及び将来の解析要件を評価することであった。

【0317】

本明細書に記載されるように、RT-qPCR (または ddPCR) を使用して、編集 ABCA4 RNA、天然 NHP ABCA4 RNA、及び ABCA4-01 エクソンエディター RNA 発現を測定し、すべてハウスキーパー RNFB20 に対して正規化した。神経網膜サンプル以外にも、ABCA4-01 VGC 陽性組織のみを ABCA4-01 エクソンエディター RNA 発現について評価した。

【0318】

各動物の片眼を認定病理医が評価し、署名された病理学的報告書を作成した。非臨床的毒物学評価を裏付けるすべての標準的な全身組織 (副腎、任意の肉眼的病変、大動脈 (昇行)、骨髄、脳、食道、胆嚢、心臓 (左室壁)、腎臓、大腸、外側膝状核、肝臓、肺、腸間膜リンパ節、視交叉、視索、脾臓、坐骨神経、骨格筋、皮膚、小腸 (空腸)、脊髄、脾臓、胃、下顎リンパ節、精巣、胸腺、及び膀胱) を収集し、固定し、パラフィンブロックに包埋した。すべての動物からの肉眼的病変、骨髄スメア (肋骨)、後根神経節、心臓、腎臓、外側膝状核、肝臓、肺、視交叉、視神経、視索、及び脾臓をスライドし、H&E で染色し、認定病理医によって評価することを意図した。他のすべての組織学的サンプルは、必要に応じて可能性のある将来調査のために保存した。

【0319】

調査毒性試験の予備的観察：

3.5E11 用量の ABCA4-01 における注射後 1 か月時点の結果では、インビボで 54% の置換が明らかとなった。これらの結果は、ABCA4-01 の治療有効性の可能性を強く示しており、なぜなら、少なくとも、観察されたレベルの置換% は、治療上有効な量のトランススプライシング ABCA4 タンパク質が、光受容体及び RPE 細胞の文脈において生成され、内因性 ABCA4 活性が低減するか不在である細胞内の野生型 ABCA4 の機能を回復させることを示唆するからである。

【0320】

現在まで、両方の用量での ABCA4-01 の耐容性は良好である。試験 35 日目までの眼の検査の予備的所見をここにまとめる。投薬後 2~3 日、1 週間、2 週間及び 4 週間または 5 週間後に、各眼を炎症の徴候についてモニタリングした。水細胞、硝子体細胞、結膜状態、虹彩高血症、化学症、眼脂、眼瞼、PLR、角膜混濁、角質沈殿物、角膜血管新生、房水フレア、水性細胞の色、硝子体細胞の色、硝子体濁り、水晶体、及び眼底を検査した。また、眼圧も測定した。

10

20

30

40

50

【0321】

網膜下処置に起因するいくつかの眼及びいくつかのタイムポイントで、軽度から中等度の眼の炎症が見られた。眼の検査の結果に応じて抗炎症剤で治療する治療計画を立てた。より低い閾値（水性細胞スコア >3 または3、房水フレアを伴う、前部硝子体細胞または硝子体濁りの徴候なし）は、デキサメタゾン（ 10 mg/ml を 0.1 ml ）による結膜下注射を実行し、より高い閾値（水性細胞スコア3超、房水フレアを伴う、前部硝子体細胞または硝子体濁りの徴候あり）トリアムシノロンによる硝子体内注射を実行する。3.5 E 1 1 v g / 眼の用量のA B C A 4 - 0 1を投与した動物では、これまでに治療は必要とされない。1つのビヒクルで治療した動物では、トリアムシノロンを72時間で投与した（O Dのみ）。1 E 1 2 用量 / 眼群では、第1の動物は2日目にデキサメタゾン、7日目にトリアムシノロン（O Sのみ）、29日目にデキサメタゾン投与を必要とし（O Dのみ）、第2の動物は8日目にO U トリアムシノロン治療を必要とし、第3の動物は29日目にトリアムシノロンを投与した（O Dのみ）。いずれの場合も、フォローアップの眼検査で炎症の軽減が示された。特記すべきこととして、設計として、本試験の動物は、特にA B C A 4 - 0 1コードエクソンエディターに対して、好ましくない免疫応答のマスクを防ぐために、予防的コルチコステロイドまたは他の免疫抑制レジメンを受けていない。上記の炎症は、網膜下注射と一致し、より高いA A V 8用量に対する応答であった。したがって、この調査試験は、後続の研究における高用量レベルを定義するのに適切であった。

10

【0322】

試験全体を通して、眼圧はすべての群で安定していた。c S L O / O C Tを用いた眼の撮像では、網膜下注射と一致する眼底の変化が示され、A B C A 4 - 0 1投与に起因する変化は示されなかった（試験進行中、8日目のデータを評価）。

20

【0323】

抗A A V 8 N A bを、すべての動物においてA B C A 4 - 0 1投与の前に評価した。これらの力価は、 $1:10$ 未満 $\sim \geq 1:100$ 以上の範囲であった。既存のN A b力価データを使用して、3つの群にわたって動物を分布させた。4週間または5週間時点で、ビヒクルを投与した動物のN A b力価は $\geq 1:10 \sim \geq 1:100$ の範囲内であったが、いずれかの用量でA B C A 4 - 0 1を投与された動物は、 $\geq 1:100 \sim 1 \leq 1:1000$ の範囲であり、網膜下プレブから体循環に漏出する可能性のある少量のA A V 8カプシドに対して予想される適応免疫応答と一致していた。

30

【0324】

ケージサイドでの動物の健康状態のモニタリング及び体重測定では、有害事象の徴候は示されなかった。

【0325】

実施例10. 確定G L P 毒性試験：インビボでの例示的なA B C A 4トランススプライシング分子の評価

3.5 E 1 1 または1 E 1 2 v g / 眼の単回網膜下投与から1か月後及び6か月後のカニクイザルにおける、エクソン編集効率及び調査安全性評価に関する例示的なA A V 8 - A B C A 4 R N A エクソンエディター構築物A B C A 4 - 0 1（配列番号90）（配列番号78を含む）の評価を完了させた。

40

【0326】

確定G L P 毒性試験：本研究の目的は、4 E 1 0 $\sim$ 1 E 1 2 v g / 眼の範囲の異なる用量のA B C A 4 - 0 1の単回網膜下投与後、3か月及び6か月の、カニクイザルにおける、配列番号78を含む例示的なA A V 8 - A B C A 4 R N A エクソンエディターA B C A 4 - 0 1（配列番号90）の網膜下忍容性を評価することであった。本試験のために選択した用量は、3.5 E 1 1 または1 E 1 2 v g / 眼であった。男性と女性の両方のN H Pを登録し、網膜下プレブ（O U）ごとに $100\text{ }\mu\text{ l}$ を投与した。本試験は、各A A V 8 - A B C A 4 R N A エクソンエディターA B C A 4 - 0 1（配列番号90）及び用量レベル群について $n=3$ 動物 / タイムポイント、ならびに $n=2$ ビヒクル動物 / タイムポイントを評価するように設計された。

50

【0327】

評価項目には、生前及び剖検時に収集したサンプルの両方における眼及び全身の安全性評価が含まれた。全身及び眼の健康状態の生前評価を以下の通り実施した：詳細な観察（毎週）、体重（検査前、－1日目及びその後毎週）、食物摂取量（毎週）、眼科（検査前、1週目及び5週目、末端剖検前；倒像眼底検査及び細隙灯顕微鏡検査）、眼圧測定（検査前、1週目及び5週目、末端剖検前）、共焦点レーザー眼底検査（検査前、5週目、末端剖検前）、光コヒーレンストモグラフィ（検査前、5週目、末端剖検前）、臨床病理学（血液学、凝固、臨床化学：検査前2回、1日目の投与前、2日目、8日目、15日目、22日目、29日目、35日目、43日目、50日目、57日目及びその後剖検まで毎月）。

10

【0328】

各動物について、片眼を組織病理学について検査した。反対側の眼を解剖し、神経網膜サンプル及びRPE／脈絡膜サンプルを急速凍結した。網膜の治療領域にマッピングされた神経網膜サンプルを、ABCA4-01 VGCの生体内分布、RNA発現、及びエクソン編集活性（RNA置換%）について解析した。神経網膜サンプルの入手を保留し（必要な解析のための十分なDNA及びRNA抽出を確認した後）、編集ヒト-NHPキメラABCA4タンパク質を、認定IA-LC-MS／MSアッセイにより評価した。

【0329】

さらに、VGCを、上記の調査毒性試験から1か月時点で、1E12vg／眼用量群においてABCA4-01 VGCに陽性である組織のみで評価した。同様に、ABCA4-01 RNA発現を、ABCA4-01 VGC陽性組織で測定した。

20

【0330】

非臨床的毒物学評価を裏付けるすべての標準的な全身組織（副腎、任意の肉眼的病変、大動脈、骨髄、脳、食道、胆嚢、心臓（左室壁）、腎臓、大腸、外側膝状核、肝臓、肺、腸間膜リンパ節、視交叉、視索、脾臓、坐骨神経、骨格筋、皮膚、小腸（空腸）、脊髄、脾臓、胃、下顎リンパ節、精巣または卵巣、胸腺、及び膀胱）を収集し、固定し、パラフィンブロックに包埋した。

【0331】

全ての動物から得た眼を、認定病理医が評価した。調査毒性試験においてABCA4-01 VGCに陽性であることが判明したのと同じ非眼組織タイプをスライドにマウントし、H&Eで染色し、評価した。他のすべてのサンプルは、必要に応じて可能性のある将来評価のために保存した。

30

【0332】

上記の調査及び確定GLP試験では、以下の評価が実施された：ABCA4-01 DNAの生体内分布及びRNA発現、エクソン編集ABCA4 RNA及びタンパク質、臨床病理学（化学、血液学、凝固）、生前眼測定（細隙灯、光コヒーレンストモグラフィ（OCT）／cSLO、眼圧）、及び組織病理学。任意の免疫学的反応のリスクに特異的に、調査試験及びGLP毒性試験の両方において、抗AAV8中和抗体をベースライン時及び投与後に血清から測定した。さらに、GLP試験では、ベースライン、生前、及び末端循環サイトカイン及び補体が評価され、ABCA4-01 DNAの生体内分布が確認された任意の組織での組織病理学評価を実施した。この試験の結果から、ABCA4-01による治療は安全であり、いかなる有害事象も関連していないことが示される。

40

【0333】

上記に加え、図30A～30Cは、例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物（ABCA4-01；配列番号90）による治療から6か月後のNHPにおけるインビボでの堅牢なABCA4 RNA及びタンパク質置換を実証する結果を示す。ABCA4-01によ治療後6か月のカニクイザル動物（n=3）について、ウイルスゲノムコピー（VGC）（x軸）及びエクソンエディターRNAのコピー数（y軸）が図30Aに示され、ABCA4 RNAの置換%が図30Bに示され、ABCA4タンパク質の置換が図30Cに示される（3.5E11vg／眼の例示的な用量の結果が提示される）。DNA

50

及びRNAのレベルを、液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応（ddPCR）ベースのアッセイを使用して評価した。総タンパク質パーセント（編集天然タンパク質とNHP天然タンパク質の合計に対する編集されたABCA4）を、認定免疫親和性質量分析（IAMS）アッセイを使用して定量化した。このインビボ試験で使用する例示的なAAV8 RNAエクソンエディター構築物は、配列番号90を含むRNAエクソンエディターを含む。4つのNHPの結果を示し、（B）及び（C）では1～4：1（ビヒクル治療）、2～4（3.5E11vg／眼で治療）として示される。

【0334】

簡潔に述べると、本発明者らは、野生型カニクイザルを、単回網膜下用量のABCA4-01（3.5E11vg／眼）で治療した。次に、6か月タイムポイントにおけるAAVベクターゲノムDNAコピー（VGC）の生体内分布、エクソンエディターRNA発現、ならびに編集されたABCA4 RNA及びタンパク質の割合を評価した。エクソンエディターRNA発現は、VGCと良好に相関し（図30A）、神経網膜サンプルに存在する全体（編集＋天然）ABCA4 RNA集団（図30B）に対する編集ABCA4 RNAの割合として計算される、堅牢なRNA置換％（天然ABCA4 RNAコピーの編集コピーへの変換）をもたらした。図30Bに示すように、RNA置換パーセントは、ABCA4-01のこの用量では、約40％～60％の範囲であった。これにより、認定IAMSアッセイによって測定される、結果として得られたヒトNHPキメラABCA4タンパク質の治療レベルが得られた（図30C）。より具体的には、これらの動物におけるABCA4 RNA編集から得られるヒトNHPキメラABCA4タンパク質は、試験サンプル中に全ABCA4タンパク質（ヒトNHP＋NHP）の20～40％で存在することが見出された。さらに、本発明者らは、単回網膜下注射により送達される高用量のABCA4-01で治療した野生型カニクイザルにおいて、最大66％のRNA置換及び最大45％のヒトNHPキメラABCA4タンパク質を実証した。これらの結果は、ABCA4-01が、NHPにおいて治療的に適切なレベルの編集ABCA4タンパク質発現を達成し、このレベルが、ABCA4 KOマウスモデルにおいて治療効果をもたらすことが以前に示された、救済されたABCA4タンパク質のレベルを超えることを実証する。

【0335】

実施例11：RNAエクソンエディター配列番号78を含むAAVベクタープラスミド ABCA4-01をコードするプラスミド（配列番号82）は、AAV2 ITR（配列番号90）が隣接するRNAエクソンエディター（配列番号78）を含む13,232塩基対（bp）のAAVベクタープラスミドである。プラスミド骨格は、カナマイシン耐性（KanR）遺伝子、細菌の複製起点、及びオプシン1イントロン1に由来する2つの非コード領域を含む。これらの後者の配列は、「スタッパー」配列として説明され、プラスミドのサイズをAAVのパッケージング限界を超えて増加するように設計され、よってカプシド形成される可能性のあるプラスミドDNA骨格成分のレベルを低減させる。AAVベクタープラスミドの概略図を図23に提示し、それに関する追加の詳細を表5に提示する。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5 : 配列番号 8 2 を含む AAV ベクタープラスミド内の遺伝子エレメント

特徴	プラスミド内での位置	長さ (bp)
KanR	810-1	810
スタッファー: ヒトオプシン1イントロン1 (後半)	1185-4127	2943
5' AAV2 ITR	4284-4413	130
CMV 最初期エンハンサー	4486-4789	304
CMV 最初期プロモーター	4790-4993	204
ABCA4 5' UTR	4994-5099	106
ABCA4 コード配列 (CDS) エクソン1~22	5100-8427	3328
スプライスドナー (SD)	8428-8433	6
二重終止コドン	8433-8438	6
40mer リンカー	8439-8478	40
3X U1 部位	8479-8549	71
GM-CSF ARE	8550-8595	46
結合ドメイン (BD)	8596-8745	150
MALAT1 三重ヘリックスターミネーター	8746-8847	102
抗Mut1_Masc RNA	8848-8905	58
3' AAV2 ITR	8944-9073	130
スタッファー: ヒトオプシン1イントロン1 (前半)	9091-12040	2950
Ori	12467-13055	589

【0336】

実施例 12. 例示的な ABCA4 トランススプライシング分子のエキスピボでの評価

ヒト光受容体における ABCA4 エクソン編集を評価するために、本発明者らは、ヒトドナーの網膜外植片を、例示的な配列番号 90 を含む AAV8 RNA エクソンエディター構築物である ABCA4-01 で治療した。本発明者らは、複数のドナーからの外植体を ABCA4-01 (3.9E11 v g) と 21 日間インキュベートすると、対応する同じ ABCA4-01 によりコードされるエクソンで、内因性エクソン 1~22 のおおよそ 20~30% の RNA 置換をもたらすことを見出した (図 31)。本実験におけるドナー外植体は、以前に網膜疾患と診断されたことのない個体に由来する。特記すべきこととして、ABCA4-01 の同じロットが、上記の調査 NHP 試験にも使用され (図 30)、NHP のヒト対象への結果により ABCA4-01 の翻訳可能性に対する本発明者らの信頼をさらに強化した。

【0337】

実施例 13. エクソン編集 ABCA4 mRNA の配列確認

エクソン編集から生成された ABCA4 成熟 mRNA が、正しいエクソン 22-エクソン 23 接合部を含め、正確なトランススプライシング反応から生じると予測された配列を有することを確認するために、本発明者らは、ABCA4-01 エクソンエディターをコードする配列番号 78 を含むプラスミドで一過性にトランスフェクトした ABCA4 KO 細胞から編集 ABCA4 RT-PCR 生成物を単離し、配列決定した。簡潔に述べると、完全長エクソン編集 mRNA の確認は、トランスフェクトした ABCA4 KO 細胞から単離した RNA に対する RT-PCR の後、TOPO クローニング及びシーケンシングを行うことにより達成した。サンガーシーケンシングにより、複数のランダムに選択され

たクローンにおいて正しい成熟mRNA配列が確認された。正しいエクソン22-エクソン23接合部を確認したことに加えて、これらのシーケンシングの結果により、完全長エクソン編集ABCA4成熟mRNA分子が、エクソン1～22にわたるエクソンエディター由来CDSならびにエクソン23～50に及ぶ内因性配列を含め、その全長にわたって予想配列を有することが確認された。これらの結果は、ACDN-01での治療によって媒介されたABCA4エクソン編集が、意図した正しいABCA4成熟mRNA配列をもたらすというさらなる信頼性を提供する。

【0338】

実施形態の列挙I

1. 核酸トランススプライシング分子であって、

10

(a) 配列番号27、または配列番号27に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(b) 内因性ABCA4 pre-mRNA内の結合部位にアニーリングする結合ドメイン、

(c) 任意選択で、ABCA4エクソンを含むコードドメイン配列(CDS)、

(d) 任意選択で、スプライシングドメイン、

20

(e) 任意選択で、GGTAAGT、または配列番号61、またはGGTAAGTもしくは配列番号61に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する配列のうちの少なくとも1つを含む増強剤、

及び

(f) 任意選択で、配列番号63からなる配列、または配列番号63に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、もしくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含む翻訳増強剤、を含み、

30

前記CDS、存在する場合前記スプライシングドメイン、存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインは、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0339】

2. 前記結合ドメインが、前記内因性ABCA4 pre-mRNAのイントロンにアニーリングする、実施形態1に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0340】

3. 前記内因性ABCA4 pre-mRNAの前記イントロンが、イントロン22である、実施形態2に記載の核酸トランススプライシング分子。

40

【0341】

4. 前記結合ドメインが、配列番号18または配列番号20を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態1～3のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0342】

5. 前記結合ドメインが、配列番号18または配列番号20から本質的になるか、またはそれからなる、実施形態1～4のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0343】

6. 前記結合ドメインが、配列番号20から本質的になるか、またはそれからなる、実施

50

形態 1～5 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0344】

7. 前記 CDS が、存在する場合、A B C A 4 エクソン 1～22 またはそのバリエーションを含む、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0345】

8. 前記 CDS が、配列番号 53～59 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 1～7 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0346】

9.

(a) 配列番号 53～59 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる CDS、

(b) 配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(c) 配列番号 18 または配列番号 20 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、

(d) 任意選択で、配列番号 4、6、8、もしくは 10 のうちのいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるスプライシングドメイン、

(e) 任意選択で、5' 非翻訳領域、

(f) 任意選択で、3' 転写ターミネータードメイン、及び

(g) 任意選択で、前記スプライシングドメインの 3' 側に作動可能に連結された少なくとも 1 つの終止コドンを含み、

存在する場合前記 5' 非翻訳領域、前記 CDS、存在する場合前記スプライシングドメイン、存在する場合前記少なくとも 1 つの終止コドン、前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、前記結合ドメイン、及び存在する場合前記 3' 転写ターミネータードメインは、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 1～8 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0347】

10. 前記増強剤が、直列に配置された 3 つの配列を含み、前記 3 つの配列の各々は、G G T A A G T、または配列番号 61、または G G T A A G T もしくは配列番号 61 に対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 9 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0348】

11. 前記増強剤が、配列番号 62、または配列番号 62 に対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む、実施形態 9 または 10 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0349】

12. 前記スプライシングドメインが、配列番号 4 (G G T A A G T) を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 9～11 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0350】

13. 前記5'非翻訳領域が、配列番号13または配列番号64を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態9～12のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0351】

14. 前記3'転写ターミネータードメインが、前記トランススプライシング分子の3'末端をキャップする三重らせん構造を形成するリボ核酸をコードする、実施形態9～13のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0352】

15. 前記3'転写ターミネータードメインが、配列番号33または配列番号66を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態9～14のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【0353】

16. 前記3'転写ターミネータードメインが、配列番号66と少なくとも80%の同一性、配列番号66と少なくとも85%の同一性、配列番号66と少なくとも90%の同一性、配列番号66と少なくとも91%の同一性、配列番号66と少なくとも92%の同一性、配列番号66と少なくとも93%の同一性、配列番号66と少なくとも94%の同一性、配列番号66と少なくとも95%の同一性、配列番号66と少なくとも96%の同一性、配列番号66と少なくとも97%の同一性、配列番号66と少なくとも98%の同一性、配列番号66と少なくとも99%の同一性を有する、または配列番号66と100%同一である核酸配列を含む、実施形態15に記載の核酸トランススプライシング分子。

20

【0354】

17. 5'から3'の方向に作動可能に連結された：

- (a) 5'非翻訳領域、
- (b) 配列番号53～59のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるCDS、
- (c) スプライシングドメイン、
- (d) 少なくとも1つの終止コドン、
- (e) 配列番号27を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、
- (f) 少なくとも1つの増強剤、
- (g) 翻訳増強剤、
- (h) 配列番号20を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び
- (i) 3'転写ターミネータードメインを含む、実施形態1～16のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

30

【0355】

18. (a) 前記5'非翻訳領域が、配列番号13または配列番号64を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、

(b) 前記スプライシングドメインが、配列番号4 (G T A A G T) を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、

40

(c) 前記少なくとも1つの終止コドンが、2つの終止コドンを含み、前記2つの終止コドンのうちの第1の配列が、前記スプライシングドメイン配列と部分的に重複し、前記2つの終止コドンと組み合わせた前記スプライシングドメインの前記配列が、配列番号68を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、

(d) 前記少なくとも1つの増強剤が、直列に配置された3つの配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記3つの配列の各々は、G G T A A G T、または配列番号61、またはそれらの任意の組み合わせを含む、

(e) 前記翻訳増強剤が、配列番号63を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、及び

50

(f) 前記 3' 転写ターミネータードメインが、配列番号 66 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 17 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0356】

19. 前記 CDS が、配列番号 56 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 1～18 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0357】

20. 前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号 69、配列番号 78、または配列番号 90 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 18 または実施形態 19 に記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【0358】

21. 前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号 70 または配列番号 71 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 1～16 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0359】

22. 前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号 40～44、46、または 48～50 のいずれか 1 つと少なくとも 80% の同一性を有する核酸配列を含む、実施形態 1～16 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0360】

23. 実施形態 1～22 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子から転写されたリボ核酸トランススプライシング分子。

20

【0361】

24. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(b) 任意選択で、GGTAAGT、または 61、またはそれらの任意の組み合わせのうちの少なくとも 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

(c) 任意選択で、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

30

【0362】

25. 前記増強剤が、存在する場合、配列番号 62 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 24 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0363】

26. さらに、内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、

前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 24 または 25

40

のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0364】

27. さらに、ABCA4 エクソンを含む CDS を含み、前記 CDS、前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 26 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0365】

28. 5' 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) GGTAAGT、または配列番号 61、または GGTAAGT もしくは配列番号 61 に対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の

50

同一性、少なくとも 93 % の同一性、少なくとも 94 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有する配列のうちの少なくとも 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

(b) 任意選択で、配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(c) 任意選択で、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、

存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記 5' 核酸トランススプライシング分子。

10

【0366】

29. 5' 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 62、または配列番号 62 に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

(b) 任意選択で、配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(c) 任意選択で、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、

20

存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記 5' 核酸トランススプライシング分子。

【0367】

30. さらに、内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、

存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 28 または実施形態 29 のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0368】

31. さらに、ABCA4 エクソンを含む CDS を含み、

30

前記 CDS、存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 28 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0369】

32. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 63、または配列番号 63 に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤、

(b) 任意選択で、GGTAAGT、または 61、またはそれらの任意の組み合わせのうちの少なくとも 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

40

(c) 任意選択で、配列番号 27 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメインを含み、存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、及び前記翻訳増強剤は、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0370】

33. 前記増強剤が、存在する場合、配列番号 62 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 32 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0371】

34. さらに、内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、

50

存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、実施形態32または実施形態33のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0372】

35. さらに、ABCA4エクソンを含むCDSを含み、前記CDS、存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、実施形態32～34のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0373】

36. 核酸トランススプライシング分子であって、リンカードメイン及び増強剤を含むカセットを含み、前記カセットは、配列番号72を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、前記核酸トランススプライシング分子。

10

【0374】

37. 核酸トランススプライシング分子であって、リンカードメイン、増強剤、及び翻訳増強剤を含むカセットを含み、前記カセットは、配列番号73を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、前記核酸トランススプライシング分子。

【0375】

38. 核酸トランススプライシング分子であって、
(a) 配列番号66、または配列番号66に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる3'転写ターミネータードメインを含む、前記核酸トランススプライシング分子。

20

【0376】

39. 前記3'転写ターミネータードメインが、配列番号66と少なくとも96%の同一性、配列番号66と少なくとも97%の同一性、配列番号66と少なくとも98%の同一性、配列番号66と少なくとも99%の同一性を有する、または配列番号66に対して100%同一である核酸配列を含む、実施形態38に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0377】

40. 前記3'転写ターミネータードメインが、配列番号66を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態38または実施形態39に記載の核酸トランススプライシング分子。

30

【0378】

実施形態の列挙II

1. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) ABCA4エクソンを含むコードドメイン配列(CDS)、

(b) 配列番号27、または配列番号27に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含むリンカードメイン、及び

(c) 内因性ABCA4 pre-mRNA内の結合部位にアニーリングする結合ドメイン、を含み、

40

前記CDS、前記リンカードメイン、及び前記結合ドメインは、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0379】

2. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号53～55のいずれか1つのバリエーションを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるCDSであって、配列番号53～55のいずれか1つの前記バリエーションは、表3に列挙される少なくとも1つの潜在性スプライス部位において少なくとも1つの変異を含み、前記少なくとも1つのヌクレオチド変異は、少なくとも1つのヌクレオチド変異を含む前記少なくとも1つの潜在性スプライス部位の各々において潜在性スプ

50

ライス部位の使用を低減させる、前記少 C D S、

(b) 任意選択で、リンカードメイン、及び

(c) 任意選択で、内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 内の結合部位にアニーリングする結合ドメイン、を含み、

前記 C D S、存在する場合前記リンカードメイン、及び存在する場合前記結合ドメインは、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0380】

3. 配列番号55の前記バリエントが、配列番号56～59のいずれか1つを含む、実施形態2に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0381】

4. 配列番号55の前記バリエントが、配列番号56を含む、実施形態3に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0382】

5. 前記リンカードメインが、存在する場合、配列番号27に対して少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0383】

6. 前記リンカードメインが、存在する場合、配列番号27を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、先行実施形態のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0384】

7. 前記結合ドメインが、存在する場合、前記内因性 A B C A 4 p r e - m R N A のイントロンにアニーリングする、先行実施形態のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0385】

8. 前記内因性 A B C A 4 p r e - m R N A の前記イントロンが、イントロン22である、実施形態7に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0386】

9. 前記結合ドメインが、存在する場合、配列番号18または配列番号20を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0387】

10. 前記結合ドメインが、配列番号18または配列番号20から本質的になるか、またはそれからなる、先行実施形態のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0388】

11. 前記結合ドメインが、存在する場合、配列番号20から本質的になるか、またはそれからなる、先行実施形態のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0389】

12. 前記 C D S が、A B C A 4 エクソン1～22またはそのバリエントを含む、実施形態1または5～11のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0390】

13. 前記 C D S が、配列番号53～59のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態12に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0391】

14. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号27、または配列番号27に対して少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも9

10

20

30

40

50

8 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(b) 配列番号18または配列番号20を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び

(c) 任意選択で、A B C A 4エクソンを含むC D Sを含み、

存在する場合前記C D S、前記リンカードメイン、及び前記結合ドメインは、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0392】

15. 前記C D Sが、存在する場合、配列番号53～59のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態14に記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【0393】

16. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号53～59のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるC D S、

(b) 配列番号27、または配列番号27に対して少なくとも91 %の同一性、少なくとも92 %の同一性、少なくとも93 %の同一性、少なくとも94 %の同一性、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくとも97 %の同一性、少なくとも98 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、及び

20

(c) 任意選択で、配列番号18または配列番号20を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメインを含み、

前記C D S、前記リンカードメイン、及び存在する場合前記結合ドメインは、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0394】

17. G G T A A G Tまたは配列番号61を含む少なくとも1つの配列を含む増強剤をさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0395】

18. 前記増強剤が、前記リンカードメインの3'側で作動可能に連結される、実施形態17に記載の核酸トランススプライシング分子。

30

【0396】

19. 前記増強剤が、直列に配置された3つの配列を含み、前記3つの配列の各々は、G G T A A G Tまたは配列番号61を含む、実施形態17または18のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0397】

20. 前記増強剤が、直列に配置された3つの配列を含み、前記3つの配列は、配列番号62を含む、実施形態17～19のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0398】

21. 翻訳増強剤をさらに含み、前記翻訳増強剤は、配列番号63、または配列番号63に対して少なくとも90 %の同一性を有する配列を含み、前記配列番号63、または配列番号63に対して少なくとも90 %の同一性を有する前記配列は、前記増強剤の3'側で作動可能に連結される、先行実施形態のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

40

【0399】

22. 前記翻訳増強剤が、配列番号63に対して少なくとも91 %の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも92 %の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも93 %の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも94 %の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも95 %の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも96 %の同一性を有する、配列番号63に対して少なくとも97 %の同一性を有する

50

、配列番号 63 に対して少なくとも 98% の同一性を有する、または配列番号 63 に対して少なくとも 99% の同一性を有する、実施形態 21 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0400】

23. 前記翻訳増強剤が、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 21 または 22 のいずれかに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0401】

24. G T A A G T、G T A A G G、G T A A G C、または G T A A C T のいずれか 1 つを含むスプライシングドメインをさらに含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0402】

25. G T A A G T を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるスプライシングドメインをさらに含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0403】

26. 5' 非翻訳領域をさらに含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0404】

27. 前記 5' 非翻訳領域が、配列番号 13 または配列番号 64 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 26 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0405】

28. 3' 転写ターミネータードメインをさらに含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0406】

29. 前記 3' 転写ターミネータードメインが、前記トランススプライシング分子の前記 3' 末端を保護する三重らせん構造を形成するリボ核酸をコードする、実施形態 28 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0407】

30. 前記 3' 転写ターミネータードメインが、野生型 M A L A T 1 配列（配列番号 33）、または配列番号 33 と少なくとも 80% の同一性を有する核酸配列を含む、実施形態 28 または実施形態 29 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0408】

31. 前記 3' 転写ターミネータードメインが、配列番号 33 と少なくとも 80% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 85% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 90% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 91% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 92% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 93% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 94% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 95% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 96% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 97% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 98% の同一性、配列番号 33 と少なくとも 99% の同一性を有する、または配列番号 33 と 100% 同一である核酸配列を含む、実施形態 30 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0409】

32. 前記 3' 転写ターミネータードメインが、配列番号 66 または配列番号 33 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 28 または実施形態 29 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0410】

33. 前記スプライシングドメインの 3' 側に作動可能に連結された少なくとも 1 つの終止コドンを含み、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

10

20

30

40

50

【0411】

34. 5' から 3' の方向に作動可能に連結された：

- (a) 5' 非翻訳領域、
- (b) 配列番号 53～59 のいずれか 1 つから本質的になるか、またはそれからなる CDS、
- (c) スプライシングドメイン、
- (d) 少なくとも 1 つの終止コドン、
- (e) 配列番号 27 から本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、
- (f) 少なくとも 1 つの増強剤、
- (g) 翻訳増強剤、
- (h) 配列番号 18 または配列番号 20 から本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び
- (i) 3' 転写ターミネータードメインを含む、実施形態 33 に記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【0412】

35.

- (a) 前記 5' 非翻訳領域が、配列番号 13 または配列番号 64 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、
- (b) 前記スプライシングドメインが、G T A A G T を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、
- (c) 前記少なくとも 1 つの終止コドンが存在し、かつ 2 つの終止コドンを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記 2 つの終止コドンのうちの第 1 の配列が、前記スプライシングドメイン配列と部分的に重複する、
- (d) 前記少なくとも 1 つの増強剤が、直列に配置された 3 つの配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記 3 つの配列の各々は、G G T A A G T または配列番号 61 を含む、
- (e) 前記翻訳増強剤が、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、及び
- (f) 前記 3' 転写ターミネータードメインが、配列番号 66 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 34 に記載の核酸トランススプライシング分子。

20

30

【0413】

36. 核酸トランススプライシング分子であって、

- (a) 5' 非翻訳領域、
- (b) 配列番号 53～59 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる CDS、
- (c) スプライシングドメイン、
- (d) 任意選択で、少なくとも 1 つの終止コドン、
- (e) 配列番号 27 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、
- (f) 少なくとも 1 つの増強剤、
- (g) 翻訳増強剤、
- (h) 配列番号 18 または配列番号 20 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び
- (i) 3' 転写ターミネータードメインを含み、

40

前記 5' 非翻訳領域、前記 CDS、前記スプライシングドメイン、存在する場合前記少なくとも 1 つの終止コドン、前記リンカードメイン、前記少なくとも 1 つの増強剤、前記翻訳増強剤、前記結合ドメイン、及び前記 3' 転写ターミネータードメインは、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0414】

50

37.

(a) 前記5'非翻訳領域が、配列番号13または配列番号64を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、

(b) 前記スプライシングドメインが、G T A A G Tを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、

(c) 前記少なくとも1つの終止コドンが存在し、かつ2つの終止コドンを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記2つの終止コドンのうちの第1の配列が、前記スプライシングドメイン配列と部分的に重複する、

(d) 前記少なくとも1つの増強剤が、直列に配置された3つの配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、前記3つの配列の各々は、G G T A A G Tまたは配列番号61を含む、

(e) 前記翻訳増強剤が、配列番号63を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、及び

(f) 前記3'転写ターミネータードメインが、配列番号66を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態36に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0415】

38. 5'から3'の方向に作動可能に連結された：

(a) 配列番号13または配列番号64を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる5'非翻訳領域、

(b) 配列番号53～59のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるCDS、

(c) G T A A G Tを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるスプライシングドメイン、

(d) 2つの終止コドンであって、前記2つの終止コドンのうちの第1の配列が、前記スプライシングドメイン配列と部分的に重複し、前記2つの終止コドンと組み合わせた前記スプライシングドメインの前記配列が、配列番号68を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、前記2つの終止コドン、

(e) 配列番号27を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(f) 配列番号62を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、

(g) 配列番号63を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤、

(h) 配列番号18または配列番号20を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる結合ドメイン、及び

(i) 配列番号66を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる3'転写ターミネータードメインを含む、前記核酸トランススプライシング分子。

【0416】

39. 前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号69、配列番号78、または配列番号90を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態37または実施形態38に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0417】

40. 前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号70または配列番号71を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態1～20のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0418】

41. 前記核酸トランススプライシング分子が、配列番号40～44、46、または48～50のいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する核酸配列を含む、実施形態1～12のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0419】

10

20

30

40

50

42. 実施形態1～41のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子から転写されたりボ核酸トランススプライシング分子。

【0420】

43. 前記内因性ABCA4 pre-mRNAが、ABCA4関連網膜ジストロフィーに関連する少なくとも1つの変異を含む、実施形態1～41のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0421】

44. 前記ABCA4関連網膜ジストロフィーが、劣性遺伝する、実施形態43に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0422】

45. 前記ABCA4関連網膜ジストロフィーが、前記ABCA4遺伝子のエクソン1～22に及ぶアレル病原性変異、及び錐体桿体ジストロフィー（例えば、錐体桿体ジストロフィー-3）、スターガルト黄斑ジストロフィー（例えば、スターガルト病-1）、黄色斑眼底、網膜色素変性症-19、または加齢性黄斑変性-2と一致する表現型に関連する、実施形態43または44に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0423】

46. 前記少なくとも1つの変異を含む前記内因性ABCA4 pre-mRNAが、光受容体細胞または網膜色素上皮細胞で発現される、実施形態1～45のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0424】

47. 実施形態1～46のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子を含む、ベクター。

【0425】

48. 前記ベクターが、前記CDSの5'側で作動可能に連結された5'調節ドメインを含む、実施形態47に記載のベクター。

【0426】

49. 前記5'調節ドメインが、5'非翻訳領域に作動可能に連結される、実施形態48に記載のベクター。

【0427】

50. 前記5'調節ドメインが、構成的プロモーターまたは組織特異的プロモーターを含む、実施形態48または49のいずれかに記載のベクター。

【0428】

51. 前記構成的プロモーターが、CMVプロモーターである、実施形態50に記載のベクター。

【0429】

52. 実施形態1～46のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子を含む、プロウイルスプラスミド。

【0430】

53. 実施形態1～46のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)であって、前記AAVは、任意選択で、前記核酸トランススプライシング分子の5'側で作動可能に連結された5'調節ドメインを含む、前記AAV。

【0431】

54. 前記AAVが、前記CDSの5'側で作動可能に連結された5'調節ドメインを含む、実施形態53に記載のAAV。

【0432】

55. 前記5'調節ドメインが、5'非翻訳領域に作動可能に連結される、実施形態53または54のいずれかに記載のAAV。

【0433】

56. 前記5'調節ドメインが、構成的プロモーターを含む、実施形態53～55のい

10

20

30

40

50

れか 1 つに記載の A A V。

【 0 4 3 4 】

5 7 . 前記構成的プロモーターが、C M V プロモーターである、実施形態 5 6 に記載の A A V。

【 0 4 3 5 】

5 8 . 前記 A A V が、光受容細胞及び／または網膜色素上皮細胞を優先的に標的とする、実施形態 5 3 ～ 5 7 のいずれか 1 つに記載の A A V。

【 0 4 3 6 】

5 9 . 前記 A A V が、A A V 8、A A V 5、または A A V 2 である、実施形態 5 3 ～ 5 8 のいずれか 1 つに記載の A A V。

【 0 4 3 7 】

6 0 . 実施形態 1 ～ 4 6 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子、実施形態 4 7 ～ 5 1 のいずれか 1 つに記載のベクター、実施形態 5 2 に記載のプロウイルスプラスミド、または実施形態 5 3 ～ 5 9 のいずれか 1 つに記載の A A V を含む、組成物。

【 0 4 3 8 】

6 1 . 薬学的に許容される賦形剤を含む、実施形態 6 0 に記載の組成物。

【 0 4 3 9 】

6 2 . 標的細胞において生物学的に活性な A B C A 4 を発現させて、前記標的細胞における A B C A 4 タンパク質の機能的レベルを回復させる方法であって、前記方法は、前記標的細胞を実施形態 1 ～ 4 6 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子、実施形態 4 7 ～ 5 1 のいずれか 1 つに記載のベクター、実施形態 5 2 に記載のプロウイルスプラスミド、実施形態 5 3 ～ 5 9 のいずれか 1 つに記載の A A V、または実施形態 6 0 もしくは 6 1 に記載の組成物で形質導入することを含む、前記方法。

【 0 4 4 0 】

6 3 . 前記標的細胞内の前記標的 A B C A 4 m R N A の少なくとも 5 %、少なくとも 1 0 %、または少なくとも 1 5 % が置換される、実施形態 6 2 に記載の方法。

【 0 4 4 1 】

6 4 . 前記標的細胞内の前記標的 A B C A 4 m R N A の少なくとも 2 0 % が置換される、実施形態 6 3 に記載の方法。

【 0 4 4 2 】

6 5 . 前記標的細胞内の前記標的 A B C A 4 m R N A の少なくとも 3 5 % が置換される、実施形態 6 4 に記載の方法。

【 0 4 4 3 】

6 6 . A B C A 4 の機能レベルが、生物学的機能を有する完全長 A B C A 4 タンパク質を発現させることによって、前記標的細胞において回復する、実施形態 6 2 ～ 6 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 4 4 4 】

6 7 . 対象における B C A 4 関連リポフスチン及び／または A 2 E 蓄積を低減する方法であって、前記対象における標的網膜細胞を、実施形態 1 ～ 4 6 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子、実施形態 4 7 ～ 5 1 のいずれか 1 つに記載のベクター、実施形態 5 2 に記載のプロウイルスプラスミド、実施形態 5 3 ～ 5 9 のいずれか 1 つに記載の A A V、または実施形態 6 0 もしくは 6 1 に記載の組成物でトランスフェクトまたは形質導入することを含む、前記方法。

【 0 4 4 5 】

6 8 . 対象の標的細胞における A B C A 4 エクソン配列中の少なくとも 1 つの変異を補正する方法であって、前記対象に、実施形態 1 ～ 4 6 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子、実施形態 4 7 ～ 5 1 のいずれか 1 つに記載のベクター、実施形態 5 2 に記載のプロウイルスプラスミド、実施形態 5 3 ～ 5 9 のいずれか 1 つに記載の A A V、または実施形態 6 0 もしくは 6 1 に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

【 0 4 4 6 】

69. ABCA4 関連網膜ジストロフィーの治療を必要とする対象におけるその治療方法であって、前記対象に、実施形態1～46のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子、実施形態47～51のいずれか1つに記載のベクター、実施形態52に記載のプロウイルスプラスミド、実施形態53～59のいずれか1つに記載のAAV、または実施形態60もしくは61に記載の組成物を治療上有効な量で投与することを含む、前記方法。

【0447】

70. 前記対象に、実施形態1～46のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子、実施形態47～51のいずれか1つに記載のベクター、実施形態52に記載のプロウイルスプラスミド、実施形態53～59のいずれか1つに記載のAAV、または実施形態60もしくは61に記載の組成物を網膜下投与することを含む、実施形態67～69のいずれか1つに記載の方法。

10

【0448】

71. 前記対象が、非ヒト霊長類またはヒトである、実施形態67～70のいずれか1つに記載の方法。

【0449】

72. 前記対象が、ABCA4 関連網膜ジストロフィーと診断されている、実施形態67～71のいずれか1つに記載の方法。

【0450】

73. ABCA4 関連網膜ジストロフィーの治療を必要とする対象におけるその治療に使用するための、実施形態1～46のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子、実施形態47～51のいずれか1つに記載のベクター、実施形態52に記載のプロウイルスプラスミド、実施形態53～59のいずれか1つに記載のAAV、または実施形態60もしくは61に記載の組成物。

20

【0451】

74. ABCA4 関連網膜ジストロフィーの治療を必要とする対象におけるその治療のための薬剤の調製に使用するための、実施形態1～46のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子、実施形態47～51のいずれか1つに記載のベクター、実施形態52に記載のプロウイルスプラスミド、実施形態53～59のいずれか1つに記載のAAV、または実施形態60もしくは61に記載の組成物。

30

【0452】

75. 前記ABCA4 関連網膜ジストロフィーが、前記ABCA4 遺伝子のエクソン1～22に及ぶアレル病原性変異、及び錐体桿体ジストロフィー、スターガルト黄斑ジストロフィー、または黄色斑眼底と一致する表現型に関連する、実施形態67～72のいずれか1つに記載の方法。

【0453】

76. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号27、または配列番号27に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(b) 任意選択で、配列番号62を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、

40

(c) 任意選択で、配列番号63を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0454】

77. さらに、内因性ABCA4 pre-mRNA内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、

前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、実施形態76に記載の核

50

酸トランススプライシング分子。

【0455】

78. さらに、A B C A 4 エクソンを含む C D S を含み、
前記 C D S、前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 76 または実施形態 77 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0456】

79. 5' 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) G G T A A G T、または配列番号 61、または G G T A A G T もしくは配列番号 61 に対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する配列のうちの少なくとも 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

(b) 任意選択で、配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(c) 任意選択で、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、

存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記 5' 核酸トランススプライシング分子。

【0457】

80. 5' 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 62、または配列番号 62 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

(b) 任意選択で、配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメイン、

(c) 任意選択で、配列番号 63 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤を含み、

存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、及び存在する場合前記翻訳増強剤は、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、前記 5' 核酸トランススプライシング分子。

【0458】

81. さらに、内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、

存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 79 または実施形態 80 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0459】

82. さらに、A B C A 4 エクソンを含む C D S を含み、

前記 C D S、存在する場合前記リンカードメイン、前記増強剤、存在する場合前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5' から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 79 ~ 81 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0460】

83. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 配列番号 63、または配列番号 63 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる翻訳増強剤、

(b) 任意選択で、配列番号 62 を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる増強剤、及び

(c) 任意選択で、配列番号 27、または配列番号 27 に対して少なくとも 90% の同一

10

20

30

40

50

性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるリンカードメインを含み、存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、及び前記翻訳増強剤は、5'から3'の方向に作動可能に連結される、前記核酸トランススプライシング分子。

【0461】

84. さらに、内因性 ABCA4 pre-mRNA 内の結合部位にアニーリングする結合ドメインを含み、存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、前記翻訳増強剤、及び前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、実施形態83に記載の核酸トランススプライシング分子。

10

【0462】

85. さらに、ABCA4エクソンを含むCDSを含み、前記CDS、存在する場合前記リンカードメイン、存在する場合前記増強剤、前記翻訳増強剤、及び存在する場合前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、実施形態83または実施形態84に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0463】

86. 核酸トランススプライシング分子であって、リンカードメイン及び増強剤を含むカセットを含み、前記カセットは、配列番号72を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、前記核酸トランススプライシング分子。

20

【0464】

87. 核酸トランススプライシング分子であって、リンカードメイン、増強剤、及び翻訳増強剤を含むカセットを含み、前記カセットは、配列番号73を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、前記核酸トランススプライシング分子。

【0465】

88. 核酸トランススプライシング分子であって、
(a) 配列番号66、または配列番号66に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる3'転写ターミネータードメインを含む、前記核酸トランススプライシング分子。

30

【0466】

89. 前記3'転写ターミネータードメインが、配列番号66と少なくとも96%の同一性、配列番号66と少なくとも97%の同一性、配列番号66と少なくとも98%の同一性、配列番号66と少なくとも99%の同一性を有する、または配列番号66に対して100%同一である核酸配列を含む、実施形態88に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0467】

90. 前記3'転写ターミネータードメインが、配列番号66を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態88または実施形態89に記載の核酸トランススプライシング分子。

40

【0468】

91. さらに、ABCA4エクソンを含むCDSを含み、前記CDS、前記カセット、及び存在する場合前記結合ドメインが、5'から3'の方向に作動可能に連結される、実施形態89または実施形態90に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0469】

92. 核酸トランススプライシング分子であって、
(a) 配列番号66、または配列番号66に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる3'転写ターミネータードメインを含む、前記核酸トランススプライシング分子。

50

【0470】

93. 前記3' 転写ターミネータードメインが、配列番号66と少なくとも96%の同一性、配列番号66と少なくとも97%の同一性、配列番号66と少なくとも98%の同一性、配列番号66と少なくとも99%の同一性を有するか、または配列番号66に対して100%同一である核酸配列を含む、実施形態92に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0471】

94. 前記3' 転写ターミネータードメインが、配列番号66を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態92または実施形態93に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0472】

実施形態の列挙 I I I

1. 核酸トランススプライシング分子であって、

(a) 潜在性スプライス部位において、野生型 A B C A 4 配列と比較して少なくとも1つのヌクレオチド変異を有する A B C A 4 エクソンを含むコードドメイン配列 (C D S)、及び

(b) 内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 内の結合部位に相補的である結合ドメインを含む、前記核酸トランススプライシング分子。

【0473】

2. 前記潜在性スプライス部位が、表3に列挙される潜在性スプライス部位である、実施形態1に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0474】

3. 前記少なくとも1つのヌクレオチド変異が、前記潜在性スプライス部位でのスプライシングを低減または排除する同義変異である、実施形態1または2に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0475】

4. 前記 C D S が、配列番号 92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、127、129、131、673、674、679、682、685、693、695、698、701、708、721、722、737、758、763、764、765、775、785、789、791、798、799、792、818、820、822、825、831、837、854、859、873、881、886、888、891、903、904、910、918、924、932、938、940、945、946、950、951、952、968、976、992、993、995、997、998、999、1003、1004、1010、1015、1026、1031、1040、1047、1070、1117、または1169の1つ以上を含む、実施形態1～3のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0476】

5. 前記 C D S が、前記少なくとも1つのヌクレオチド変異を有する A B C A 4 のエクソン1～22を含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0477】

6. 前記 C D S が、配列番号56～59のいずれか1つを含む、実施形態1～5のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0478】

7. 前記 C D S が、配列番号56を含む、実施形態1～6のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0479】

8. さらに、配列番号27に対して少なくとも85%の同一性を有する配列を含むリンカードメインを含み、前記 C D S、前記リンカードメイン、及び前記結合ドメインが、5'

10

20

30

40

50

から 3' の方向に作動可能に連結される、実施形態 1～7 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0480】

9. 前記結合ドメインが、前記内因性 ABCA4 pre-mRNA のイントロン 22 内の配列にアニーリングする、実施形態 1～8 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0481】

10. 前記結合ドメインが、配列番号 18 または 20 を含む、実施形態 1～9 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0482】

11. GGTAA GT または配列番号 61 を含む少なくとも 1 つの配列を含む増強剤をさらに含み、前記増強剤は、前記リンカードメインの 3' 側に作動可能に連結されている、実施形態 1～10 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0483】

12. 前記増強剤が、直列に配置された 3 つの配列を含み、前記 3 つの配列の各々は、GGTAA GT または配列番号 61 を含む、実施形態 11 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0484】

13. 前記増強剤が、直列に配置され、作動可能に連結した 3 つの配列を含み、前記 3 つの配列は合わせて、配列番号 62 を含む、実施形態 12 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0485】

14. 翻訳増強剤をさらに含み、前記翻訳増強剤は、前記増強剤の 3' 側に作動可能に連結された配列番号 63 に対して少なくとも 85 % の同一性を有する配列を含む、実施形態 1～13 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0486】

15. 配列 G T A A G T を含むスプライシングドメインをさらに含み、実施形態 1～14 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0487】

16. 5' 非翻訳領域をさらに含み、実施形態 1～15 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0488】

17. 配列番号 33 または配列番号 66 と少なくとも 85 % の同一性を有する MALAT1 配列を含む 3' 転写ターミネータードメインをさらに含み、実施形態 1～16 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0489】

18. 5' から 3' の方向に作動可能に連結された：

(a) 配列番号 13 または配列番号 64 を含む 5' 非翻訳領域、

(b) 配列番号 53～59 のいずれか 1 つを含む CDS、

(c) 配列 G T A A G T を含むスプライシングドメイン、

(d) 2 つの終止コドンであって、前記 2 つの終止コドンのうちの第 1 の配列が、前記スプライシングドメイン配列と部分的に重複し、前記 2 つの終止コドンと組み合わせた前記スプライシングドメインの前記配列が、配列番号 68 (G T A A G T A G T G A) を含む、前記 2 つの終止コドン、

(e) 配列番号 27 を含むリンカードメイン、

(f) 配列番号 62 を含む増強剤、

(g) 配列番号 63 を含む翻訳増強剤、

(h) 配列番号 18 または配列番号 20 を含む結合ドメイン、及び

(i) 配列番号 66 を含む 3' 転写ターミネータードメインを含む、実施形態 1～17 のいずれか 1 つに記載の核酸トランススプライシング分子。

10

20

30

40

50

【0490】

19. 配列番号69、配列番号78、または配列番号90を含む、実施形態1～18のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子。

【0491】

20. 実施形態19に記載の核酸トランススプライシング分子から転写されたリボ核酸トランススプライシング分子。

【0492】

21. 実施形態1～19のいずれか1つに記載の核酸トランススプライシング分子を含むベクターまたはアデノ随伴ウイルス(AAV)。

【0493】

22. 前記ベクターが、配列番号82を含む、実施形態21に記載のベクター。

【0494】

23. 前記AAVが、光受容細胞及び／または網膜色素上皮細胞を優先的に標的とする、実施形態21または22に記載のAAV。

【0495】

24. 前記AAVが、AAV8、AAV5、またはAAV2である、実施形態23に記載のAAV。

【0496】

25. 実施形態21～24のいずれか1つに記載のAAV、及び医薬的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【0497】

26. ABCA4関連網膜ジストロフィーの治療を必要とする対象においてそれ治療する方法あって、前記対象に、治療上有効な量で実施形態25に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

【0498】

27. 標的細胞において生物学的に活性なABCA4を発現させる方法であって、前記方法は、前記標的細胞を核酸トランススプライシング分子でトランスフェクトまたは形質導入することを含み、前記核酸トランススプライシング分子は、

(a) 潜在性スプライス部位において、野生型ABCA4配列と比較して少なくとも1つのヌクレオチド変異を有するABCA4エクソンを含むコードドメイン配列(CDS)、及び

(b) 内因性ABCA4 pre-mRNA内の結合部位に相補的である結合ドメインを含む、前記方法。

【0499】

28. 前記CDSが、配列番号92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、127、129、131、673、674、679、682、685、693、695、698、701、708、721、722、737、758、763、764、765、775、785、789、791、798、799、792、818、820、822、825、831、837、854、859、873、881、886、888、891、903、904、910、918、924、932、938、940、945、946、950、951、952、968、976、992、993、995、997、998、999、1003、1004、1010、1015、1026、1031、1040、1047、1070、1117、または1169の1つ以上を含む、実施形態27に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0500】

29. ABCA4関連網膜ジストロフィーの治療を必要とする対象においてそれ治療する方法であって、前記対象に、

(a) 潜在性スプライス部位において、野生型ABCA4配列と比較して少なくとも1つのヌクレオチド変異を有するABCA4エクソンを含むコードドメイン配列(CDS)、

10

20

30

40

50

及び

(b) 内因性 A B C A 4 p r e - m R N A 内の結合部位に相補的である結合ドメインを含む、核酸トランススプライシング分子を投与することを含む、前記方法。

【0501】

30. 前記 A B C A 4 関連網膜ジストロフィーが、前記 A B C A 4 遺伝子のエクソン 1 ~ 22 内の 1 つ以上のアレル病原性変異、及び錐体桿体ジストロフィー（例えば、錐体桿体ジストロフィー - 3）、スターガルト黄斑ジストロフィー（例えば、スターガル病 - 1）、黄色斑眼底、網膜色素変性症 - 19、または加齢性黄斑変性 - 2 と一致する表現型に関連する、実施形態 29 に記載の核酸トランススプライシング分子。

【0502】

他の実施形態

この本明細書に記述される全ての刊行物、特許及び特許出願は、各独立した刊行物、または特許出願が、明確かつ個別に参照により組み込まれることが示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0503】

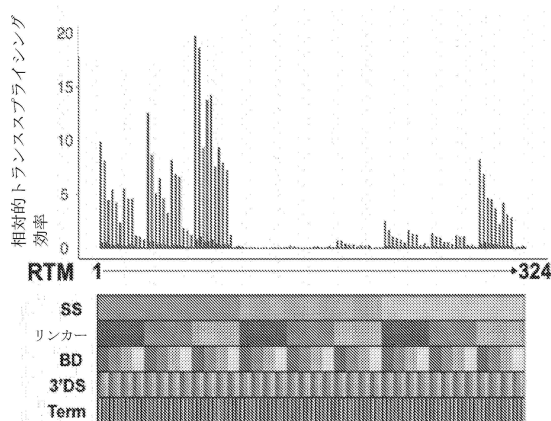
本発明は、その具体的実施形態と関連して説明されているが、さらなる修正が可能であり、本願は、一般に本発明の原理に従う、本発明の任意の変形例、用途、または適合を対象とすることを目的としており、本開示からのそのような逸脱を含むことは、本発明が関連する既知または慣例的実践の範囲内であり、上に記載され、特許請求の範囲で述べられる不可欠な特徴に適用され得ることを理解されるであろう。

【0504】

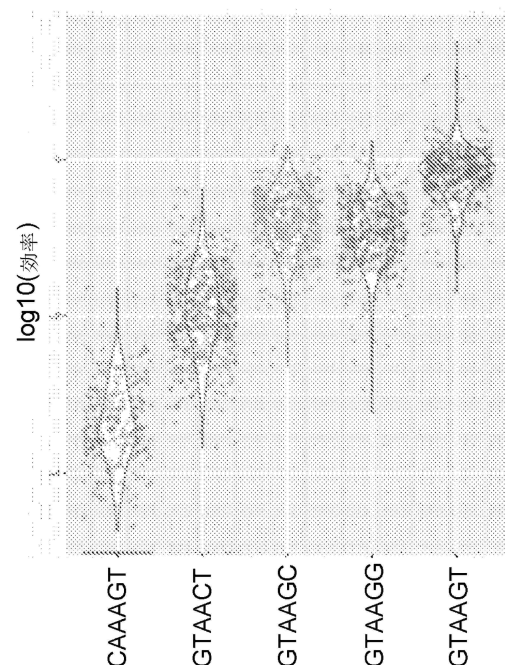
他の実施形態は、特許請求の範囲内である。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

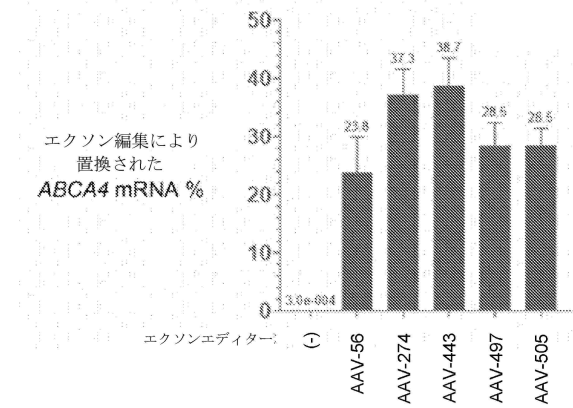
20

30

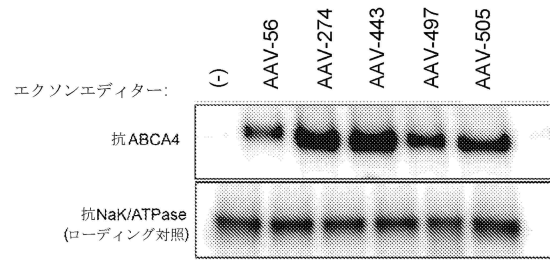
40

50

【図 3 A】

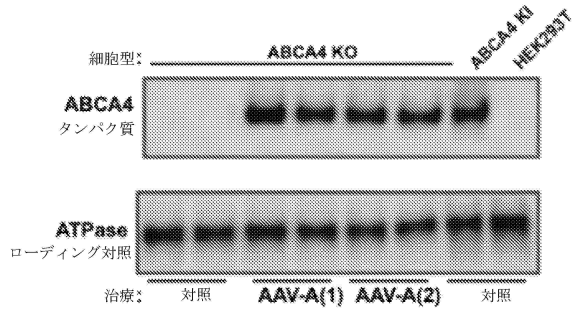


【図 3 B】

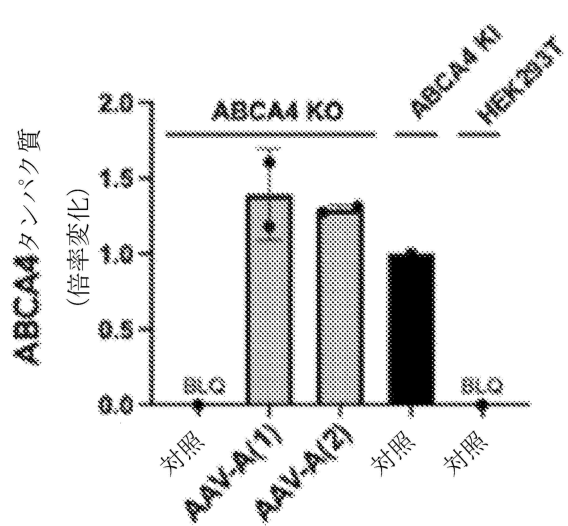


10

【図 3 C】



【図 3 D】



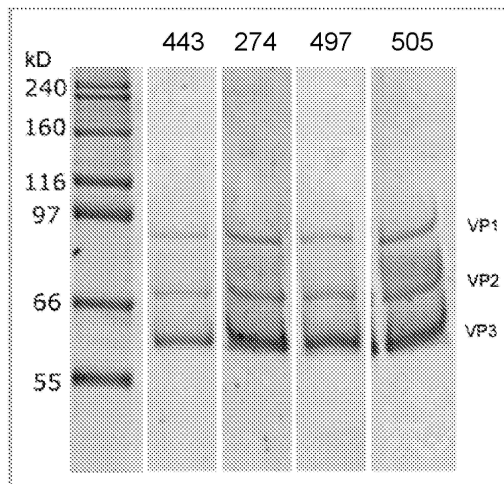
20

30

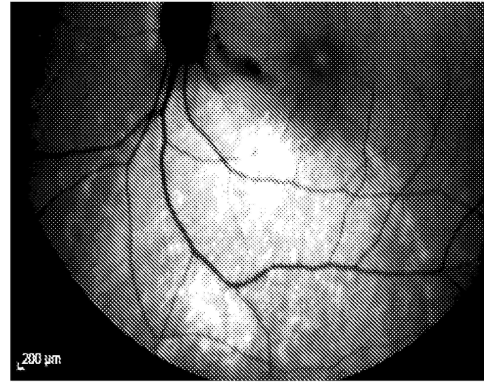
40

50

【図 4】

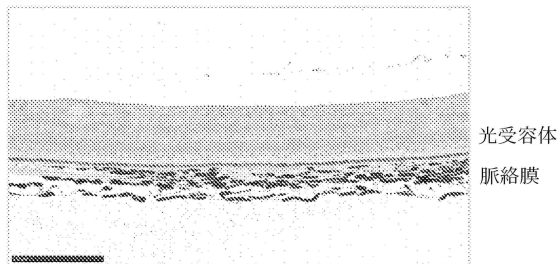


【図 5 A】

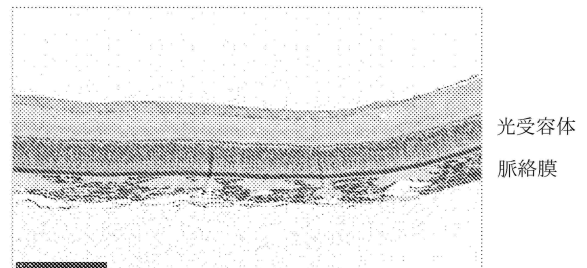


10

【図 5 B】



【図 5 C】



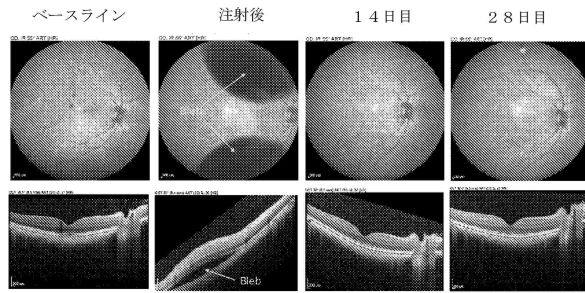
20

30

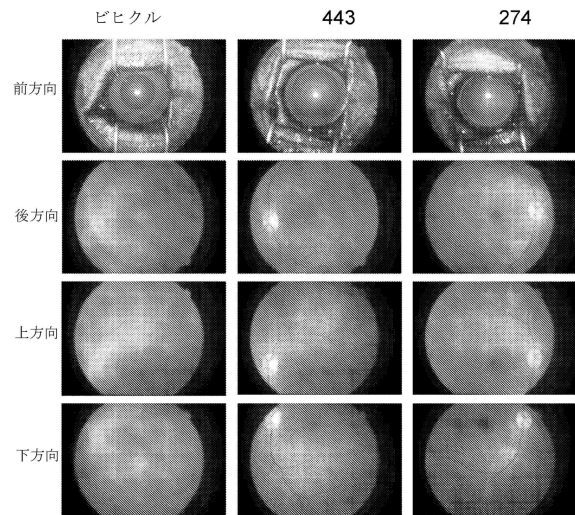
40

50

【図 6】

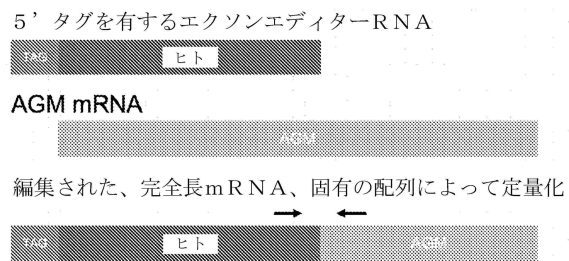


【図 7】

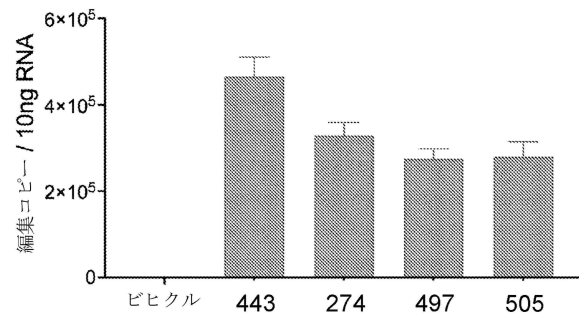


10

【図 8 A】



【図 8 B】



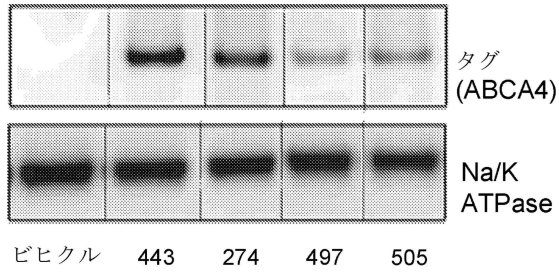
20

30

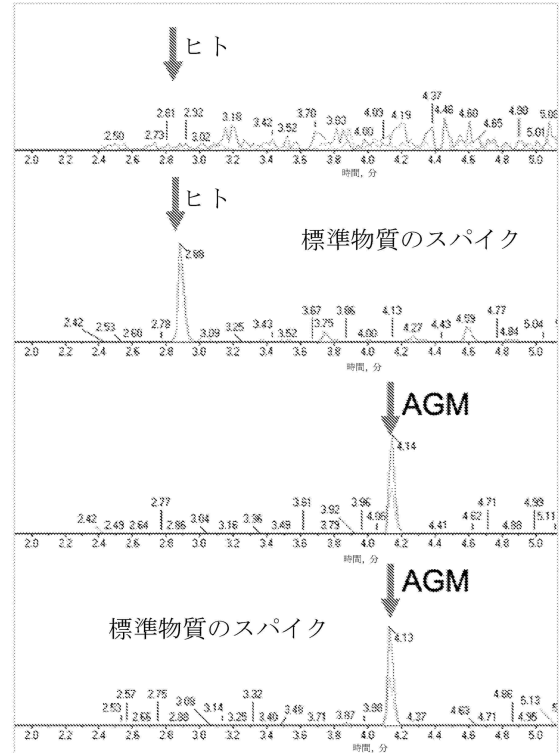
40

50

【図 9】



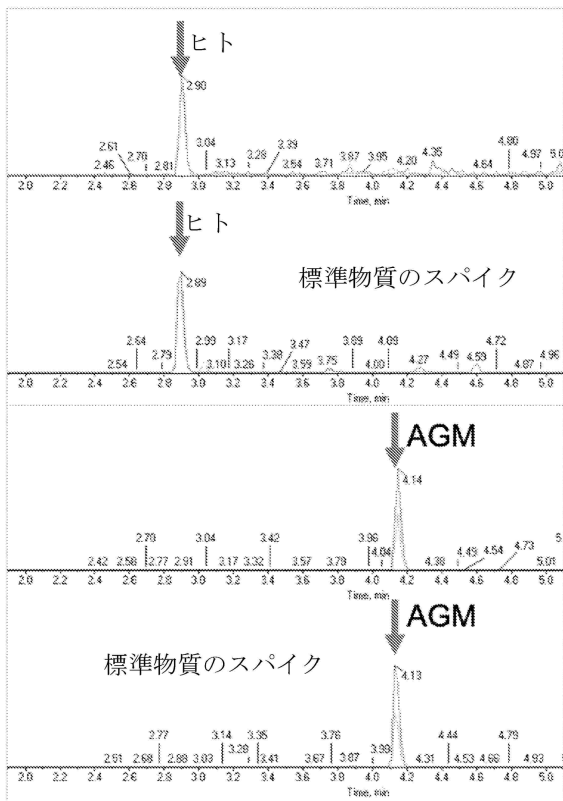
【図 10 A】



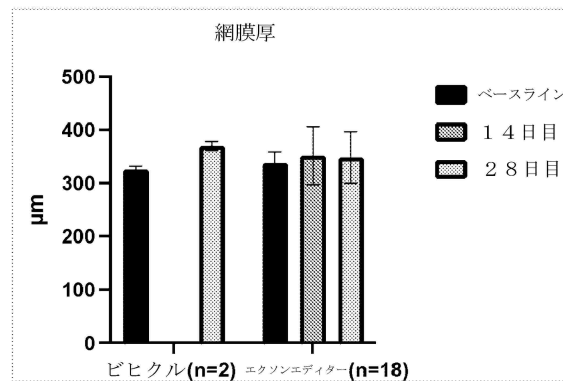
10

20

【図 10 B】



【図 11 A】

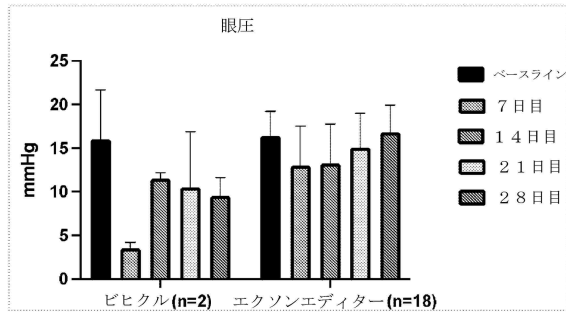


30

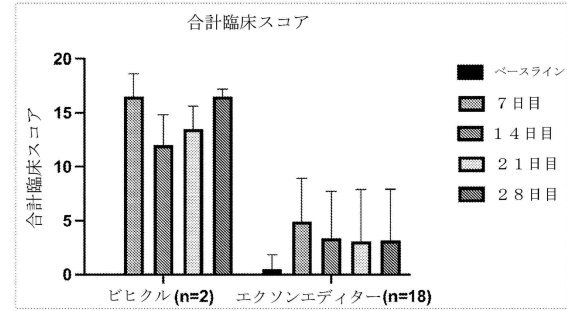
40

50

【図 1 1 B】

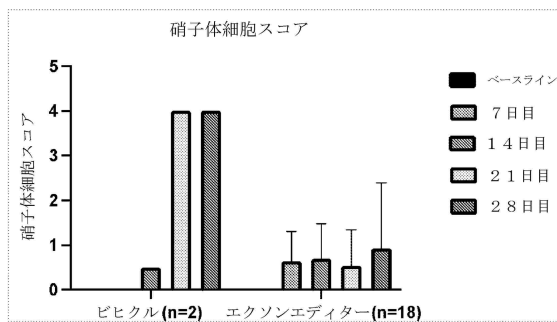


【図 1 1 C】

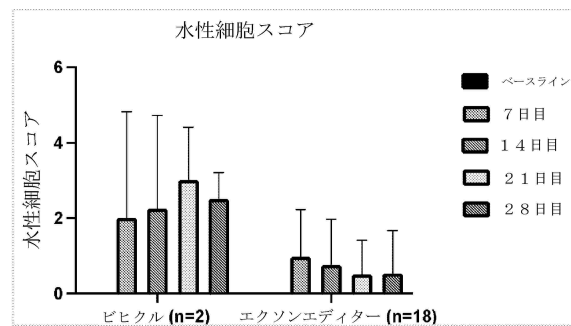


10

【図 1 1 D】

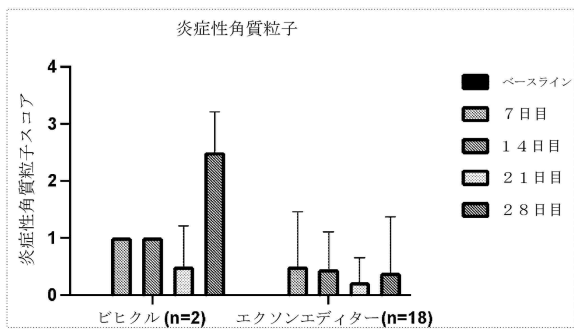


【図 1 1 E】

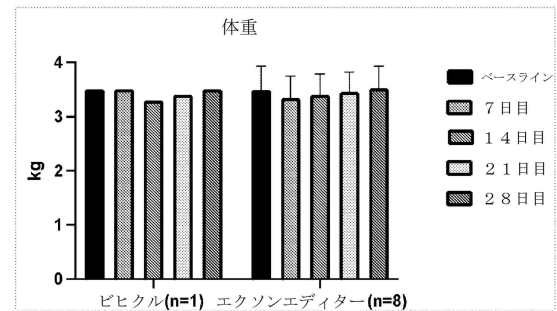


20

【図 1 1 F】



【図 1 2 A】

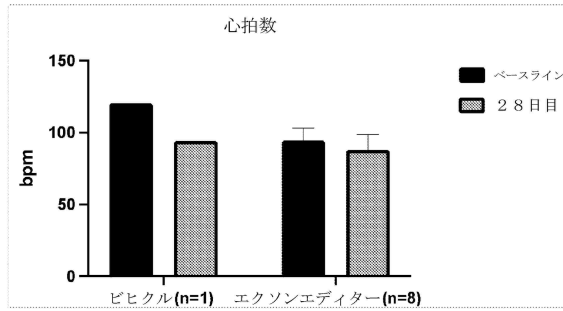


30

40

50

【図 1 2 B】

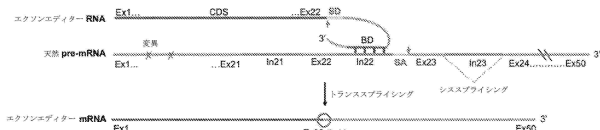


【図 1 3】

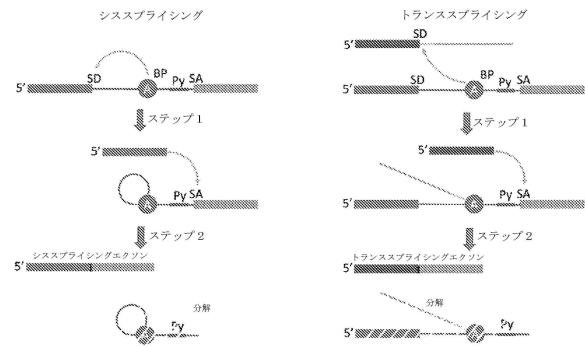


10

【図 1 4 A】

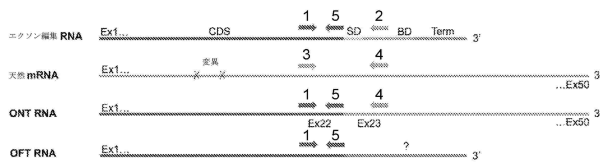


【図 1 4 B】

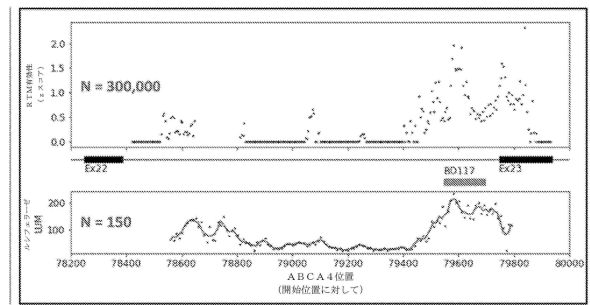


20

【図 1 5】



【図 1 6】

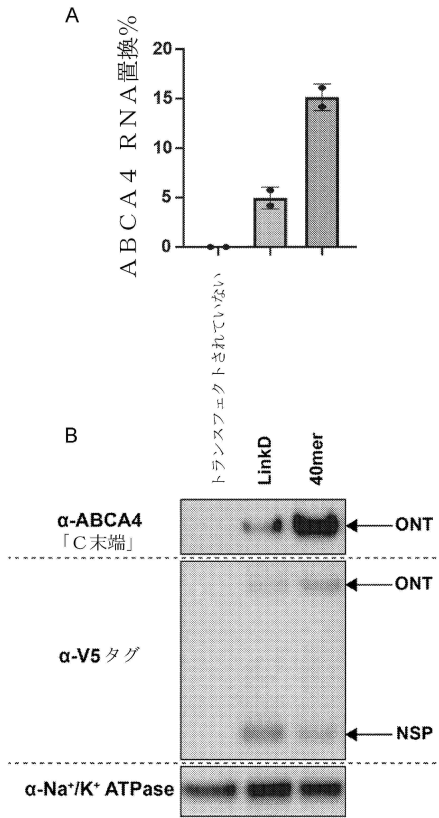


30

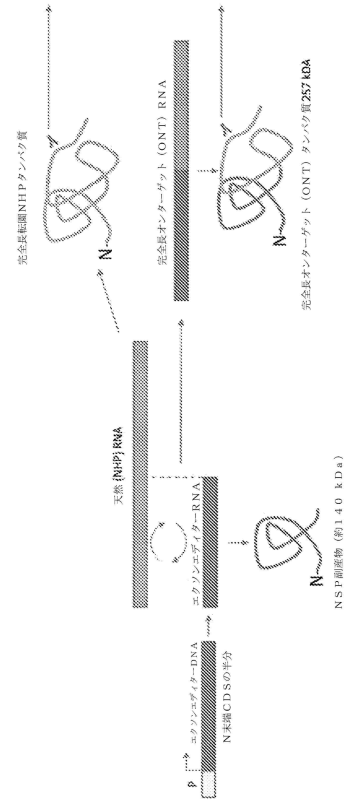
40

50

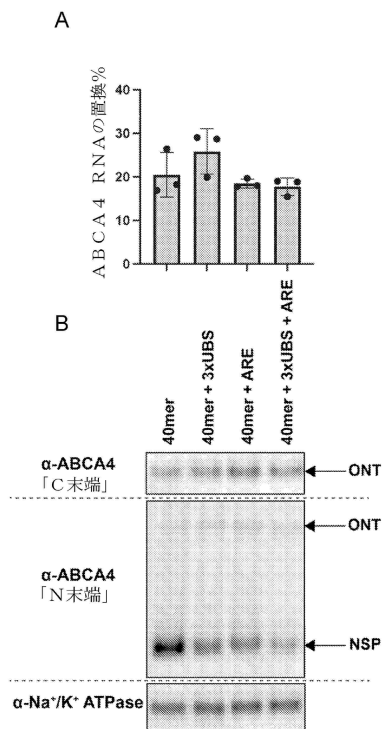
【図 17】



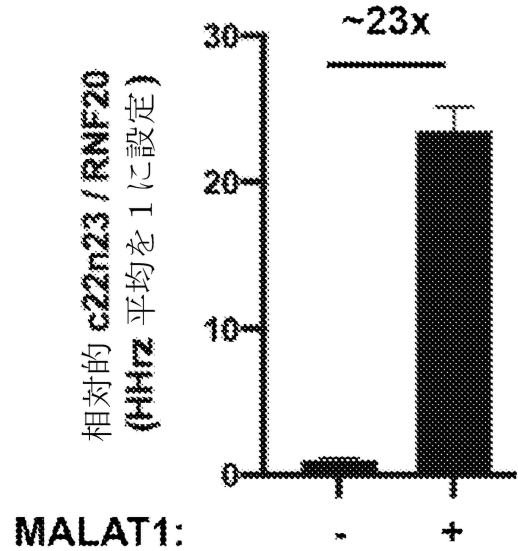
【図 18】



【図 19】



【図 20 A】



10

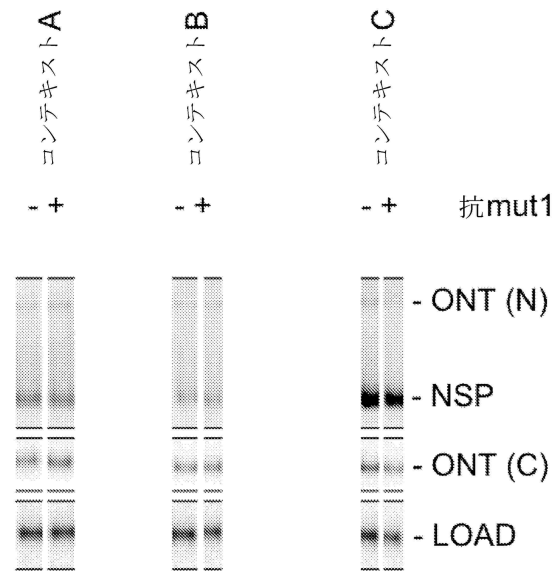
20

30

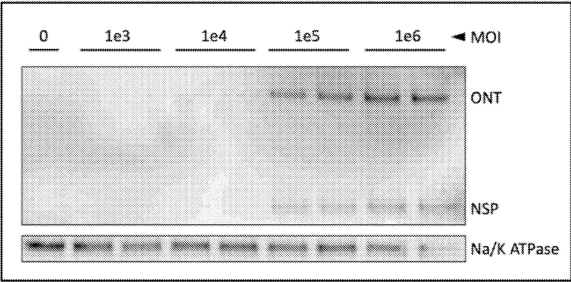
40

50

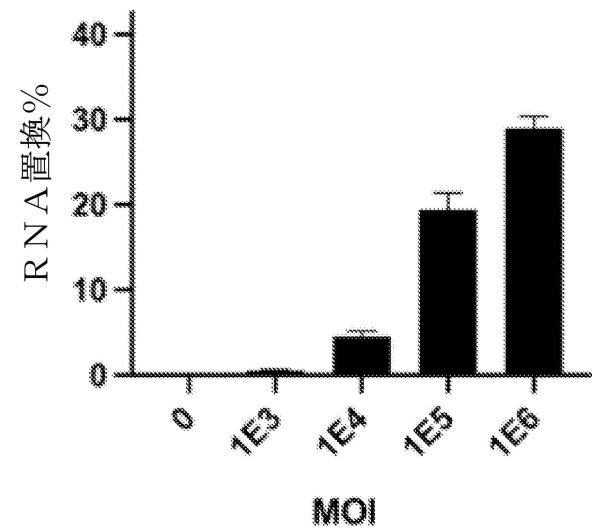
【図 2 0 B】



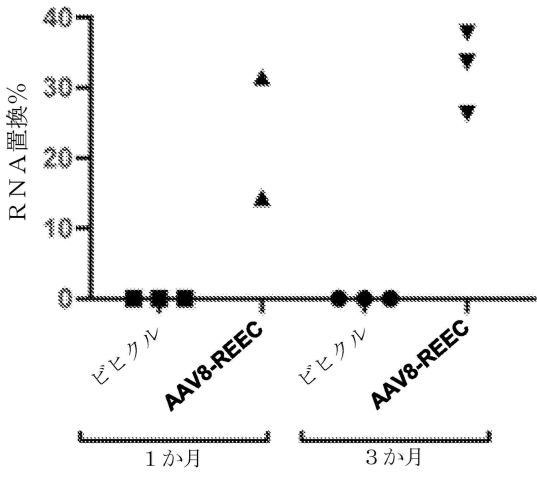
【図 2 1 A】



【図 2 1 B】



【図 2 2 A】



10

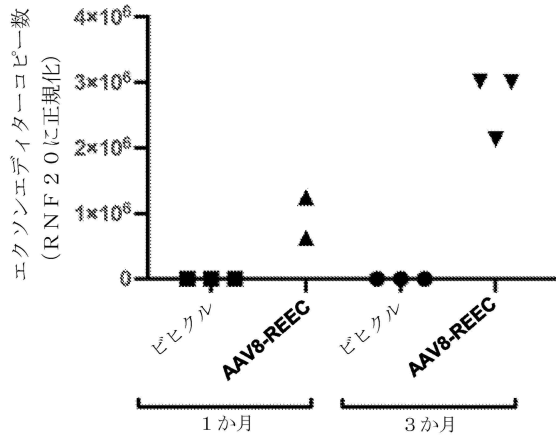
20

30

40

50

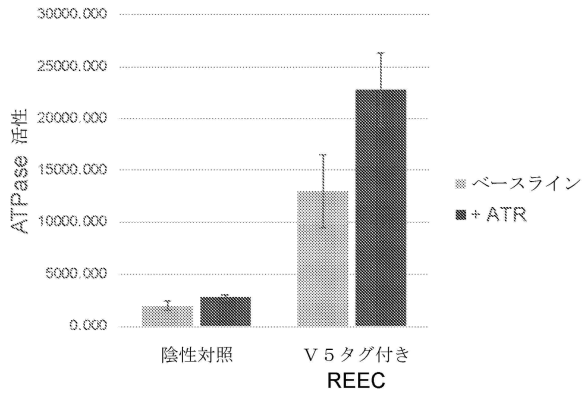
【図 2 2 B】



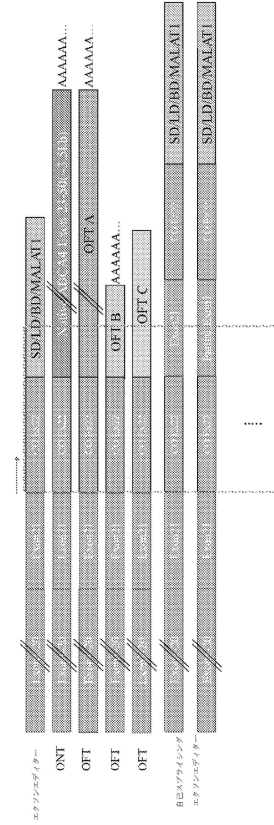
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



10

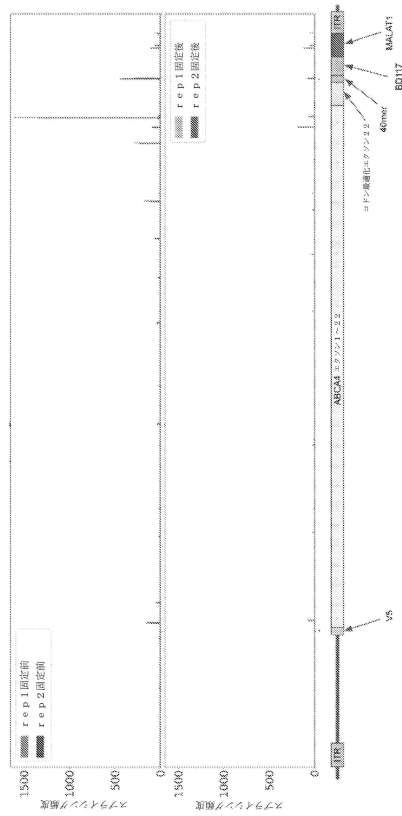
20

30

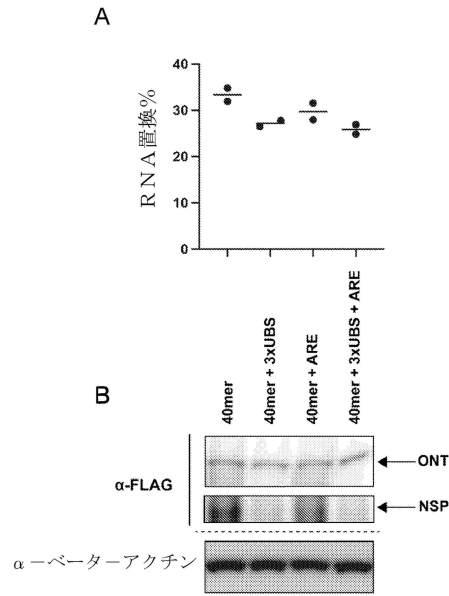
40

50

【図 2 6】



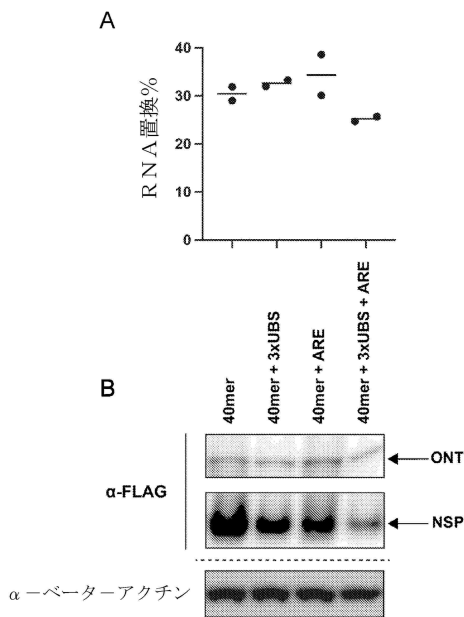
【図 2 7】



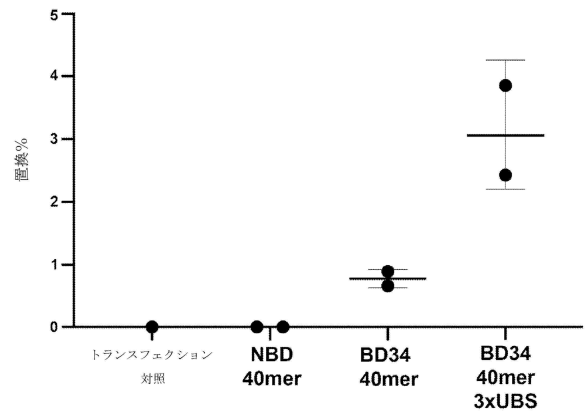
10

20

【図 2 8】



【図 2 9】

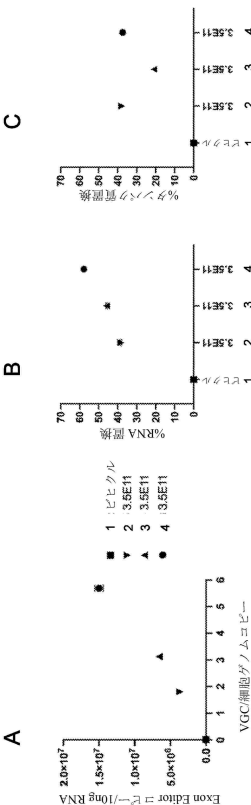


30

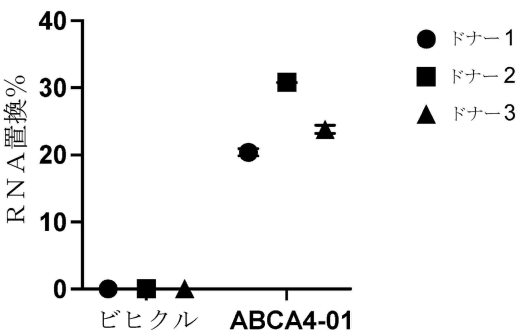
40

50

【図 3 0】



【図 3 1】



【配列表】

2025521102000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 15/90 (2023.01)

ADD. C12N 9/22 (2023.01)

CPC - INV. C07K 14/705

ADD. C07K 2319/80, C12N 2750/14143

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)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/214990 A1 (ASCIDIAN THERAPEUTICS, INC.) 22 October 2020 (22.10.2020); pg 14, ln 10-13, 26-29; pg 19, ln 41-42	1-2, 5/(1-2), 14-15, 76-78
A	WO 2016/005524 A1 (LEXOGEN GMBH) 14 January 2016 (14.01.2016); abstract; pg 101, para 3	1, 5/(1), 14-15, 76-78
A	WO 2020/223180 A1 (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY) 05 November 2020 (05.11.2020); abstract; Table 6; Table 6 Legend	2, 5/(2)
A	WO 2019/204514 A1 (LIMELIGHT BIO, INC. et al.) 24 October 2019 (24.10.2019); abstract; pg 2, ln 4-5; claim 28	14-15

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

06 October 2023

Date of mailing of the international search report

NOV 08 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Karl Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/68969

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/US 23/66969

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.: 6-13, 17-35, 40-75, 82
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 Supplemental Box --

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 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.: 1-2, 5/(1-2), 14-15, 76-78, limited to SEQ ID NOs: 53, 92, 27, 18

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66969

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-5, 14-16, 36-39, 76-81, 83-94, directed to a nucleic acid trans-splicing molecule. The nucleic acid trans-splicing molecule will be searched to the extent that the nucleic acid trans-splicing molecule encompasses (a) a CDS comprising, consisting essentially of, or consisting of a variant of SEQ ID NO: 53, comprising nucleotide variation in a single cryptic splice site listed in Table 3, comprising SEQ ID NO:92, (b) a linker domain comprising SEQ ID NO: 27, and (c) a binding domain comprising SEQ NO: 18 (note, these are the first claimed sequences for the inventive nucleic acid trans-splicing molecule). The first named invention was determined based on the first claimed components and sequences (claims 1, 2, 14) for the inventive nucleic acid trans-splicing molecule embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-2, 5 (in part), 14-15, 76-78 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the nucleic acid trans-splicing molecule encompasses (a) a CDS comprising, consisting essentially of, or consisting of a variant of SEQ ID NO: 53, comprising nucleotide variation in a single cryptic splice site listed in Table 3, comprising SEQ ID NO:92, (b) a linker domain comprising SEQ ID NO: 27, and (c) a binding domain comprising SEQ NO: 18. Additional nucleic acid trans-splicing molecule(s) comprising additional component(s) (e.g., UTR, potentiator, terminator etc.) and/or sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected nucleic acid trans-splicing molecule(s) comprising additional component(s) (e.g., UTR, potentiator, terminator etc.) and/or sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a nucleic acid trans-splicing molecule comprising (a) a CDS comprising, consisting essentially of, or consisting of a variant of SEQ ID NO: 53, comprising nucleotide variation in a single cryptic splice site listed in Table 3, comprising SEQ ID NO:92, (b) a linker domain comprising SEQ ID NO: 27, and (c) a binding domain comprising SEQ NO: 20 (claims 1-2, 5 (in part), 14-15, 76-78).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Groups I+ each include the special technical feature of a unique nucleic acid sequence. Each nucleic acid sequence encodes a unique peptide, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

Group I+ inventions share the technical features of including:

a nucleic acid trans-splicing molecule comprising:

(a) a coding domain sequence (CDS) comprising ABCA4 exons;

(b) a linker domain; and

(c) a binding domain that anneals to a binding site within endogenous ABCA4 pre-mRNA, wherein the CDS, the linker domain, and the binding domain are operatively linked in a 5'-to-3' direction.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2020/214990 A1 to Ascidian Therapeutics, Inc. (hereinafter "Ascidian").

Ascidian discloses a nucleic acid trans-splicing molecule (pg 14, In 10-13"ABCA4 trans-splicing molecules are useful for treating diseases and disorders associated with a mutation in an ABCA4 gene by replacing one or more exons in the ABCA4 gene (e.g., an ABCA4 gene having a mutated ABCA4 exon). In some embodiments, nucleic acid trans-splicing molecule": pg 14, In - "the nucleic acid trans-splicing molecule is a pre- RNA trans-splicing molecule (RTM)" comprising:

(a) a coding domain sequence (CDS) comprising ABCA4 exons;

(b) a linker domain; and

(c) a binding domain that anneals to a binding site within endogenous ABCA4 pre-mRNA, wherein the CDS, the linker domain, and the binding domain are operatively linked in a 5'-to-3' direction (pg 14, In 26-29 - "In a 5' trans-splicing molecule, the coding domain, splice site, and binding domain are operatively linked in a 5'-to-3' direction, such that the trans-splicing molecule is configured to replace the 5' end of the endogenous gene with the coding domain, which includes a functional ABCA4 exon to replace the mutated ABCA4 exon").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4 above: claims 6-13, 17-35, 40-75, 82 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K	38/02	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/67	(2006.01)	C 1 2 N	15/67	Z

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,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,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 クランバツハ, レベッカ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 5, 8 0 ゲスト ストリート ボストン

(72)発明者 ドーリー, スコット

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 5, 8 0 ゲスト ストリート ボストン

(72)発明者 ドイ, アキコ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 5, 8 0 ゲスト ストリート ボストン

(72)発明者 バークハート, カーク

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 5, 8 0 ゲスト ストリート ボストン

(72)発明者 グレイ, ジェシー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 5, 8 0 ゲスト ストリート ボストン

(72)発明者 ペン, リンタオ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 5, 8 0 ゲスト ストリート ボストン

(72)発明者 ウー, デニス

(72)発明者 アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 0 2 1 3 5 , 8 0 ゲスト ストリート ボストン
ノマ，アキコ

(72)発明者 アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 0 2 1 3 5 , 8 0 ゲスト ストリート ボストン
ゴシック，カーク

(72)発明者 アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 0 2 1 3 5 , 8 0 ゲスト ストリート ボストン
スロモヴィッチ，シミン

(72)発明者 アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 0 2 1 3 5 , 8 0 ゲスト ストリート ボストン
クレメンス，アダム

(72)発明者 アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 0 2 1 3 5 , 8 0 ゲスト ストリート ボストン
ベル，ロバート

 アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 0 2 1 3 5 , 8 0 ゲスト ストリート ボストン

F ターム（参考） 4C084 AA13 MA16 MA58 MA66 NA13 NA14 ZA33 ZC02 ZC21

 4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 MA16 MA58 MA66 NA13 NA14

 ZA33 ZC02 ZC21