

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6976244号
(P6976244)

(45) 発行日 令和3年12月8日 (2021. 12. 8)

(24) 登録日 令和3年11月11日 (2021. 11. 11)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/12 (2006. 01)
 C 0 7 K 14/52 (2006. 01)
 C 0 7 K 14/475 (2006. 01)
 C 0 7 K 14/47 (2006. 01)
 C 1 2 N 15/19 (2006. 01)

C 1 2 N 15/12
 C 0 7 K 14/52 Z N A
 C 0 7 K 14/475
 C 0 7 K 14/47
 C 1 2 N 15/19

請求項の数 21 (全 115 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-524443 (P2018-524443)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月11日 (2016. 11. 11)
 (65) 公表番号 特表2018-536405 (P2018-536405A)
 (43) 公表日 平成30年12月13日 (2018. 12. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/061668
 (87) 国際公開番号 W02017/083750
 (87) 国際公開日 平成29年5月18日 (2017. 5. 18)
 審査請求日 令和1年11月6日 (2019. 11. 6)
 (31) 優先権主張番号 62/254, 139
 (32) 優先日 平成27年11月11日 (2015. 11. 11)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 508087044
 プレシゲン, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 バージニア州 2406
 O, ブラックスパーグ, クラフト ドライ
 ブ 1750, スイート 1400
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100141195
 弁理士 西澤 恵美子
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓状態および他の病態の処置のための複数の生物学的に活性なポリペプチドを単一のベクターから発現させるための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質 (S 1 0 0) ポリペプチド、ストロマ細胞由来因子 1 (S D F 1) ポリペプチド、および血管内皮成長因子 (V E G F) ポリペプチドをコードする治療用ポリヌクレオチドであって、

前記 S 1 0 0 ポリペプチド、前記 S D F 1 ポリペプチドおよび前記 V E G F ポリペプチドが、インビボ切断可能な 1 以上のリンカーによって結合され、かつ、対象における前記治療用ポリヌクレオチドの投与および発現の際に、インビボ切断可能な 1 以上の前記リンカーが切断され、機能性形態の前記 S 1 0 0 ポリペプチド、前記 S D F 1 ポリペプチドおよび前記 V E G F ポリペプチドが放出される、前記ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記 S 1 0 0 ポリペプチドが、S 1 0 0 A 1 であり、前記 S D F 1 ポリペプチドが、S D F 1、S D F - 1 α、および S D F - 1 β からなる群から選択され、かつ前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 2 1、V E G F 1 2 1 b、V E G F 1 4 5、V E G F 1 6 5、V E G F 1 6 5 b、V E G F 1 8 9、V E G F 1 9 1、および V E G F 2 0 6 からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記 S 1 0 0 ポリペプチドが配列番号 1 0 4 で示される配列を含み、前記 S D F ポリペプチドが配列番号 1 0 2 で示される配列を含み、および前記 V E G F ポリペプチドが配列番号 1 0 6 で示される配列を含む、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

10

20

【請求項 4】

インビボ切断可能な 1 以上の前記リンカーが、リボソームスキッピングによって切断可能である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記 1 以上のリンカーが、RAKRリンカー、fp2aリンカー、p2aリンカー、GSG-p2aリンカー、およびfmdvリンカーからなる群から選択される、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記 1 以上のリンカーが、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、または配列番号 40 で示される配列を含む、請求項 4 または 5 に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 7】

前記リンカーが、配列APVKQ（配列番号 42）、GPVKQ（配列番号 43）、VPVKQ（配列番号 44）、IPVKQ（配列番号 45）、MPVKQ（配列番号 46）、APIKQ（配列番号 47）、GPIKQ（配列番号 48）、VPIKQ（配列番号 49）、IPIKQ（配列番号 50）、MPIKQ（配列番号 51）、APAKQ（配列番号 52）、GPAKQ（配列番号 53）、VPAPKQ（配列番号 54）、IPAKQ（配列番号 55）、MPAKQ（配列番号 56）、APVRQ（配列番号 57）、GPVRQ（配列番号 58）、VPVRQ（配列番号 59）、IPVRQ（配列番号 60）、MPVRQ（配列番号 61）、APIRQ（配列番号 62）、GPIRQ（配列番号 63）、VPIRQ（配列番号 64）、IPIRQ（配列番号 65）、MPIRQ（配列番号 66）、APARQ（配列番号 67）、GPARQ（配列番号 68）、VPARQ（配列番号 69）、IPARQ（配列番号 70）、MPARQ（配列番号 71）、APVKN（配列番号 72）、GPVKN（配列番号 73）、VPVKN（配列番号 74）、IPVKN（配列番号 75）、MPVKN（配列番号 76）、APIKN（配列番号 77）、GPIKN（配列番号 78）、VPIKN（配列番号 79）、IPIKN（配列番号 80）、MPIKN（配列番号 81）、APAKN（配列番号 82）、GPAKN（配列番号 83）、VPAPKN（配列番号 84）、IPAKN（配列番号 85）、MPAKN（配列番号 86）、APVRN（配列番号 87）、GPVRN（配列番号 88）、VPVRN（配列番号 89）、IPVRN（配列番号 90）、MPVRN（配列番号 91）、APIRN（配列番号 92）、GPIRN（配列番号 93）、VPIRN（配列番号 94）、IPIRN（配列番号 95）、MPIRN（配列番号 96）、APARN（配列番号 97）、GPARN（配列番号 98）、VPARN（配列番号 99）、IPARN（配列番号 100）およびMPARN（配列番号 101）からなる群から選択される配列を含む、請求項 4 または 5 に記載のポリヌクレオチド。

20

30

【請求項 8】

S100カルシウム結合タンパク質（S100）ポリペプチドと、SDF1ポリペプチドまたはVEGFポリペプチドである第2ポリペプチドとを含むポリペプチドをコードする治療用ポリヌクレオチドであって、

前記S100ポリペプチドが、インビボ切断可能なリンカーによって前記第2ポリペプチドに結合され、かつ、対象への投与に際して、インビボ切断可能な前記リンカーが切断され、機能性形態の前記S100ポリペプチドおよび前記第2ポリペプチドが放出される、治療用ポリヌクレオチド。

40

【請求項 9】

インビボ切断可能である前記リンカーのうちの少なくとも 1 つが、フリンポリペプチドおよび 2Aポリペプチドを含む、請求項 4 または 8 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

インビボ切断可能である前記リンカーが、「リボソームスキッピング」翻訳作用を媒介する 2Aポリペプチドを含む、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

50

インビボ切断可能である前記リンカーが、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0 または配列番号 4 2 で示される配列を含む、請求項 8 から 1 0 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

【請求項 1 3】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターであり、前記ポリヌクレオチドが、構成的プロモーター、組織特異的プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結される、発現ベクター。

10

【請求項 1 5】

前記誘導性プロモーターが、小分子リガンド誘導性 2 ポリペプチドエクジソン受容体ベース遺伝子スイッチである、請求項 1 4 に記載の発現ベクター。

【請求項 1 6】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または請求項 1 4 もしくは 1 5 に記載の発現ベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 1 7】

対象における心疾患または障害を処置するための、請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 8】

心臓状態を処置するための、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む医薬組成物であって、前記処置が、心筋細胞を、治療有効量の前記ポリヌクレオチドと接触させることを含む、医薬組成物。

【請求項 1 9】

対象における心疾患または障害を処置するための、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む医薬組成物であって、前記処置が、

(i) 前記対象に、マイクロバブル複合体を含む組成物の治療有効量を投与するステップであって、前記マイクロバブル複合体が、脂質、ガス、および前記ポリヌクレオチドを含むプラスミドを含む、ステップと、

30

(i i) 前記マイクロバブル複合体を、超音波標的マイクロバブル破壊 (U T M D) をもたらすのに十分な超音波エネルギーと接触させるステップとを含む、医薬組成物。

【請求項 2 0】

前記心疾患または障害が、血管発生、うっ血性心不全、心筋症、不整脈、心膜疾患、大動脈疾患、マルファン症候群、または冠状動脈疾患であり、前記対象がヒトである、請求項 1 7 または 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記医薬組成物が、逆行性冠状静脈洞注入 (R C S I) を通じて接触または投与されるものである、請求項 1 6 から 2 0 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【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、2015 年 1 1 月 1 1 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 2 5 4 , 1 3 9 号の利益を主張し、これは、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】

配列表の参照

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出された配列表を含み、これは、参照によりそ

50

の全体が本明細書に組み込まれる。2016年11月11日に作成された前記ASCIIのコピーは、INX00339WO_20161111_SL.txtという名称であり、サイズが271,843バイトである。

【0003】

技術分野

本発明は、疾患、障害、および病態の多重遺伝子治療的処置のための、新規な核酸およびペクター、ならびにそれによってコードされるポリペプチドを提供する。より具体的には、本発明は、心疾患および障害の多重遺伝子の処置および予防のための新規な核酸、ペクター、ポリペプチド、および方法を提供する。さらに、本発明は、疾患、障害、および病態の多重遺伝子治療的処置に有用な、核酸およびペクターからの有利なタンパク質発現をもたらす、新規な核酸およびポリペプチドリンカーを提供する。

10

【背景技術】

【0004】

心疾患は、医療上の必要性が著しく対処されていない代表的なものであり、一部の推定では、世界中で少なくとも2500万人の患者がいることが示されている。さらに、米国(U.S.)政府のCenters for Disease Control and Prevention(CDC)の「Heart Failure Fact Sheet」によると、2013年の時点で、米国において500万人を超える人々が、心不全状態を有する。

【0005】

20

心不全は、9人に1人の死因であると推定されており、毎年、825,000人もの新しい症例がある。診断後の平均5年生存率は、約40%であり、あらゆる診断関連群のなかで、最も高い再入院を示す。米国における費用は、1年間で320億ドルにもなると推定されている。心不全処置の選択肢としては、投薬、侵襲的デバイス、および心臓移植が挙げられる。

【0006】

うっ血性心不全(CHF)は、心臓が、身体の代謝要求を満たすのに十分な心拍出量を提供できないことを表す。現在、世界中で2200万人を超える人々が、CHFと診断されており、米国には500万人を超える患者がいる。心臓疾患の発症および重症度は年齢とともに増加するため、全体的な発症は、老年人口に起因して今後増加することが予測される。CHFを有する患者の予後は、芳しくないままであり、5年死亡率は50%である。American Heart Association(AHA)によると、心血管疾患は、2013年に米国で810,000人の命を奪い、これは、報告されている死亡の約3人に1人である。終末期心不全の薬理学的管理は、次の3つの目標に焦点を当てている：1)罹患率および死亡率の改善(ACE阻害剤、アンジオテンシンIIのI型受容体アンタゴニスト、選択的β-遮断剤、およびアルドステロンアンタゴニスト)、2)症状の制御(利尿薬(最終的にはチアジド、加えてループ利尿薬)、ジギタリス剤(低用量)、一時的な変力薬、および選択的抗不整脈薬)、ならびに3)緩和(オピオイド、抗うつ薬、抗不安薬、酸素、および継続的な変力薬)。しかしながら、疾患が進行するにつれ、治療の選択肢は、心臓再同期療法(CRT)、植込み型除細動装置(ICD)の考慮、心臓移植、および心室補助デバイス(VAD)などに制限されるようになり、VADは、移植までの架け橋としておよびドナー心臓の不足に起因して次第に最終目的の療法としての両方として使用されている。全体的な5年生存率は、三重免疫抑制療法を受けた心臓移植患者において70~80%であるが、処置の選択肢としての心臓移植は、ドナー心臓の不足が続いていること、移植候補者の数が増えていること、および1年につき100,000ドルを超える非常に高い年間費用により、限られたものとなっている。Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support(INTERMACS)が収集したデータは、2006年6月23日から2013年6月30日までに、12,335人の患者が、FDAに承認された耐久性機械的循環補助(MCS)デバイスを受け、増加率は、1年間に

30

40

50

2, 000人の患者のペースで続いている。

【0007】

CHFの処置のための細胞および遺伝子治療に関する研究は増えているが、生物学的作用、細胞保持、送達のタイミング、および機序の欠如、または単一遺伝子作用の制限に付随する問題に起因して、限られた結果しかでていない。それでも、多くの遺伝子治療の臨床試験が、1年で軽度の効果を示している。遺伝子治療は、定義された作用機序を有するが、血管新生の改善、幹細胞ホーミング、または変力作用のための単一遺伝子の使用は、CHFを処置するには十分でなかった。CHFは、瘢痕形成、収縮機能の減少、および細胞消失という点で、多因子的であるため、多重遺伝子的アプローチであれば、これらの重症な患者を安全に保ちながら、これらの個々の因子により良好に対処することができる。

10

【0008】

従来的には、遺伝子治療のためのベクターは、単一遺伝子である。より複雑な多重遺伝子ベクターの必要性の増加が、近年、生じてきた。特に、この必要性は、がんおよび抗ウイルス処置のための組合せ療法の必要性によって刺激されている。組合せ遺伝子治療は、がんにおける変異および耐性を防止しようという医薬の最良の試みである。2つまたは3つの薬剤を組み合わせることにより、より完全かつ有効な応答を得ることが可能である。

【0009】

参照による組み込み

本明細書におけるすべての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれ個別の刊行物、特許、または特許出願が、具体的かつ個別に参照により組み込まれると示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書における開示と、組み込まれている参考文献における開示との間に矛盾が生じた場合には、本開示が優先される。

20

【発明の概要】

【0010】

うっ血性心不全（CHF）を有する患者の数が増え続けることにより、治療の選択肢が限られる状態が続いている。例えば、一般的なCHF処置は、最終目的として左室補助デバイス（LVAD）の留置に至る。したがって、CHFからの回復を促進する生物学的選択肢を含む異なるアプローチが必要とされている。

【0011】

心臓障害を処置するための単一遺伝子に基づくアプローチは、固有の遺伝子変異、すなわち、トロポニンIまたは重鎖ミオシンを有する患者においては妥当である。しかしながら、心臓病態を有するほとんどの患者において、終末期疾患は、複数の因子に起因している。したがって、そのような場合、単一遺伝子のアプローチでは機能する可能性が低い。心臓患者は、通常、細胞動員および／または血管新生を介した積極的なリモデリングを必要とする瘢痕組織を有する。それらは、通常、カルシウムまたは他の経路を介した変力機能の増加も必要とする。したがって、カルシウムの操作、細胞動員、および血管新生と一緒に達成する遺伝子の組合せにより、これらの終末期CHF患者を処置および回復させるために適した経路が得られる。さらに、心臓障害（CHFなどであるがこれに限定されない）を処置するために遺伝子に基づくアプローチを考慮する場合、ウイルスベクターの使用は、ヒト免疫系をアンタゴナイズし得るか、または患者がすでにこれまでに形成された抗ウイルス抗体（例えば、抗AAV1/AAV2抗体）を有している可能性があり、これにより、安全性および有効性の問題が生じ得る。したがって、ヒトにおいて有害な免疫応答が低いまたはほとんどなく、必要に応じて再投与することができるプラスミドDNAの使用により、治療用遺伝子の有利な送達様態が得られる。

30

40

【0012】

そのため、本発明の一実施形態は、心疾患および障害（例えば、CHFであるがこれに限定されない）の治療的処置のための三重エフェクター非ウイルスプラスミドに基づくDNAを提供する。一実施形態において、本発明は、三重エフェクター非ウイルスプラスミドに基づくDNAベクター（構築物）を提供する。本発明の特定の実施形態において、pXoXと称される発現プラスミドは、生物学的に活性なSDF1 α 、S100A1、およ

50

びVEGFをコードし、それらを発現し、ここで、これらの3つのエフェクター目的遺伝子(GOI)は、本明細書に記載される選択的に設計されたリンカー配列によって分離している。

【0013】

心疾患および障害(例えば、CHFであるがこれに限定されない)を処置するための多重遺伝子プラスミドDNAアプローチは、単一遺伝子を利用した他の研究における肯定的なインビトロでの前臨床および臨床のデータに基づく。以下に記載されるそれぞれの目的遺伝子は、変力(例えば、S100A1)、細胞ホーミング(例えば、SDF-1 α)、および血管新生(例えば、VEGF165)に特異的な機能を有する。各個別の遺伝子を別個の送達プラスミドに含むのではなく、単一のプラスミド構築物が3つすべての遺伝子を含む理由としては、単一遺伝子(個々の別個のベクターで)が細胞に送達された場合に、各遺伝子が細胞にトランスフェクトされる量を制御することができる手段がないためである。遺伝子送達におけるこの変動性により、本発明の単一の多重遺伝子構築物よりも単純なアプローチとなるとはいえ、療法が安全でなくなり、再現性のないものとなる。したがって、一実施形態において、pXoXなどのベクターにより、S100A1(細胞内タンパク質)、SDF-1 α (分泌タンパク質)、およびVEGF165(分泌タンパク質)を構成的に発現させる。pXoXを使用することで、pDNA構築物は、単一のmRNAとして転写され、これが、フリンおよびP2A(fp2a)の組合せ活性による切断を介して、3つの個々の機能性タンパク質として翻訳される。2A自己切断型ペプチドは、「リボソームスキッピング」、「ストップ・ゴー(stop-go)」、および「ストップ・キャリアオン(stop-carry on)」翻訳として知られる翻訳作用を媒介する配列(P2A)をコードし、これにより、単一のプロモーターの制御下において、単一の転写産物mRNAから、複数のタンパク質の共発現がもたらされる。構成的発現は、CAGプロモーター(ニワトリベーターアクチン(CBA)プロモーターをCMVエンハンサーおよびハイブリッドCBAエクソン1/ウサギベーターグロビンイントロンBとともに含むハイブリッドプロモーター)などであるがこれに限定されないプロモーターによって駆動される。本発明の構築物に含める3つのエフェクターおよびそれらの原理のさらなる説明を以下に示す。

【0014】

S100A1

S100A1は、Ca²⁺結合EFハンドタンパク質スーパーファミリーのメンバーである(Rohde et al, J Cardiovasc Transl Res, vol. 3, no. 5, pp. 525-537, 2010)。S100A1は、主として心筋細胞においてCa²⁺に制御されるネットワークおよび流動を調節して、収縮機能、興奮性、代謝、維持、および生存を制御するホモ二量体として機能する10.4 kDaのタンパク質である。動物およびヒトでの研究により、心不全におけるS100A1の発現の減少が示されている(Pleger et al., Circulation, vol. 115, no. 19, pp. 2506-2515, 2007およびRemppis et al., Biochim Biophys Acta, vol. 1313, no. 3, pp. 253-257, 1996)。S100A1のウイルス送達は、心不全の大規模な動物モデルにおいて使用が成功している。特に、ブタモデルにおいて評価されているAAV9-S100A1遺伝子治療では、血行動態の悪化からの保護、心臓機能の改善、および心拍の正常化が示されている(Rohde et al, J Mol Cell Cardiol, vol. 50, no. 5, pp. 777-784, 2011)。心不全のブタモデルにおいてAAV6-S100A1を使用した別の研究では、不整脈または右室機能不全の増加を示さず、S100A1の過剰発現の安全性が実証されている。しかしながら、左室駆出率および心臓リモデリングの大幅な増加があった(Weber et al, Gene Ther, vol. 21, pp. 131-138, 2014)。これらなどの研究は、終末期心不全を有するヒトにおけるS100A1療法の可能性を裏付ける。

【0015】

SDF-1 α

ストロマ細胞由来因子-1 α (SDF-1 α)は、間葉幹細胞上の受容体CXCR4と結合することによって、心臓幹細胞の動員、心筋細胞死の阻害、および心臓機能の改善に

において重要な役割を果たす8 k D a のケモカインである (Penn et al, Gene Ther, vol. 19, no. 6, pp. 583-587, 2012)。ヒト S D F-1 α をコードする非ウイルス D N A プラスミドの試験が、いくつかの臨床試験において行われた (Penn et al., Circ Res, vol. 112, no. 5, pp. 816-825, 2013および Chung et al, Eur Heart J, vol. 36, pp. 2228-238, 2015)。これらの試験による所見では、S D F-1 α の過剰発現は、不整脈またはさらなる心不全エピソードへの進行を含めて重大な予期せぬ関連有害事象を伴わず、比較的安全であることが示された。このような研究により、S D F-1 α の過剰発現が、15 m g または 30 m g の用量で C H F を心膜内注射した患者において機能を改善し得ることも示された。さらに、45 m g の用量での冠状静脈洞を介して逆行性に送達されるプラスミド D N A が安全であることが見出された。

10

【0016】**V E G F**

血管内皮成長因子 (V E G F) ファミリーのタンパク質は、新しい血管の形成、内皮細胞の遊走および活性化、幹細胞の動員、ならびに組織再生に関与する (Taimeh et al, Nat Rev Cardiol, vol. 10, no. 9, pp. 519-530, 2013)。血管調節の機能不全は、心不全の病態生理学の重要な要素であり、V E G F レベルの低減が、進行性心不全のモデルにおいて観察されている。V E G F には多数のアイソフォームが存在する。しかしながら、V E G F 165 が、前臨床モデルおよび臨床モデルの両方において使用されている。心不全の処置の選択肢として V E G F を標的とすることの有用性が、側副灌流 (collateral perfusion) および全体的な心臓機能の改善を示す動物モデルにおけるネイキッドプラスミド D N A およびアデノウイルスなどのベクターを用いた遺伝子移入を使用して示されている。V E G F 165 の臨床使用は、直接注射する p D N A およびウイルスベクターを介したものの両方として研究されており、肯定的だが限定された結果を得ている。ある特定の実施形態において、V E G F 165 は、本明細書に開示される V E G F 191 配列のアミノ酸 27~191 を含む配列を有する。ある特定の実施形態において、V E G F 165 は、本明細書に開示される V E G F 191 配列のアミノ酸 27、28、29、30、31、32、33、または 34~180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、または 191 を含む配列を有する。ある特定の実施形態において、V E G F 165 は、本明細書に開示される V E G F 191 配列のアミノ酸 30~185 を含む配列を有する。

20

30

【0017】

それぞれの個別の遺伝子 (すなわち、S100A1、S D F-1 α、および V E G F 165) と併せて用いられる C A G プロモーターは、瘢痕組織、心臓機能、およびリモデリングに対して個別的作用を示している。各遺伝子の作用は、心臓組織に固有である。3つすべての遺伝子の潜在的な増強作用は、インビトロにおいてのみ試験されている。しかしながら、S D F-1 α と組み合わせた V E G F の局所投与は、後肢虚血のマウスモデルにおいて、内皮前駆細胞に誘導される新血管形成を促進することによって強化されることが示されている (Yu et al, J Vasc Surg, vol. 50, no. 3, pp. 608-616, 2009)。

【0018】

したがって、第1の機能性 (すなわち、生物学的に活性な) ポリペプチド、第2の機能性ポリペプチド、および任意選択で第3の機能性ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド構築物 (非ウイルスプラスミドベクターなどであるがこれに限定されない) が、本明細書に提供される。

40

【0019】

S100 ポリペプチド、第2の機能性ポリペプチド、および任意選択で第3の機能性ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド構築物であって、第2および任意選択の第3の機能性ポリペプチドが、サイトカイン、ケモカイン、または血管新生ポリペプチドのうちのいずれか1つを含む、ポリヌクレオチド構築物が、本明細書に提供される。

【0020】

50

第1および第2の機能性ポリペプチドの分離のため、ならびに任意選択で第2および第3の機能性ポリペプチドの分離のための、ポリペプチドリンカー配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド構築物が、本明細書に提供される。

【0021】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが、提供される。本明細書に記載される少なくとも1つのポリヌクレオチドまたはベクターを含む細胞もまた、提供される。

【0022】

心臓状態を処置する方法であって、細胞を、治療有効量の本明細書に記載されるポリヌクレオチドと接触させるステップを含む、方法が、本明細書に提供される。一部の事例において、細胞は、心筋細胞である。

10

【0023】

対象における、例えば、うっ血性心不全（CHF）であるがこれに限定されない、心疾患および障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたはベクターを含む治療有効量の組成物を提供するステップを含む、方法が、本明細書に提供される。一部の事例において、対象は、哺乳動物対象またはヒト対象である。一部の事例において、対象には、少なくとも1つの追加の療法が投与される。

【0024】

本明細書に記載されるポリヌクレオチド、または本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物が、本明細書に提供される。

20

【0025】

少なくとも1つのプラスミドマイクロバブル複合体を含む組成物であって、マイクロバブルが、脂質、ガス、および本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むプラスミドを含む、組成物が、提供される。一部の実施形態において、脂質は、前記ガスおよびプラスミドを封入するシェルを形成する。一部の事例において、ガスは、パーフルオロカーボンガス、例えば、パーフルオロプロパンである。一部の実施形態において、マイクロバブル複合体は、1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール-3-ホスファチジルコリンおよび1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール-3-ホスファチジリエタノールアミングリセロールのうちの少なくとも1つを含む。

30

【0026】

対象に、本明細書に記載されるプラスミドマイクロバブル複合体組成物を投与するステップと、対象を、所定の組織または器官における少なくとも1つのマイクロバブルの超音波破壊をもたらすのに十分な超音波エネルギーと接触させるステップとを含む方法が、提供される。一部の事例において、前記所定の組織または器官における少なくとも1つのマイクロバブルの破壊により、前記プラスミドが前記組織または器官に送達される。一部の事例では、組織または器官は、器官であり、これは、心臓、肝臓、または腎臓であり得る。

【0027】

対象における心疾患または障害（例えば、うっ血性心不全、心筋症、不整脈、心膜疾患、大動脈疾患、マルファン症候群、および冠状動脈疾患であるがこれらに限定されない）を処置する方法であって、対象に、ある量の本明細書に記載されるプラスミドマイクロバブル複合体組成物を投与するステップと、対象を、少なくとも1つのマイクロバブルの超音波破壊をもたらすのに十分な超音波エネルギーと接触させるステップと、プラスミドを対象の心臓に送達するステップとを含む、方法が、提供される。

40

【0028】

本発明の独特かつ好ましい特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の特徴および利点を理解することは、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明および添付の図面を参照することによっても得てもよい。

【図面の簡単な説明】

50

【0029】

【図1】図1は、心臓エフェクター遺伝子の非ウイルス性送達が、本明細書に記載のリンカー配列を含む新規なベクター構築物の別の構成を介して達成される方法を示す。

【図2】図2は、SPBc2（リコンビナーゼ）トランスフェクションを用いたatt部位ルシフェラーゼを含むベクターの導入による、初代細胞（インビトロ）における本明細書に記載のリンカーを含む構築物からの心筋細胞におけるルシフェラーゼの持続的発現を示す。att部位またはリコンビナーゼのいずれかが欠如している細胞は、ベースライン発現レベルに急速に戻った。2日目（D2）、5日目（D5）、9日目（D9）、14日目（D14）。

【図3】図3は、本明細書に記載のリンカーによる分離を介して、心臓エフェクター遺伝子（生物学的に活性なSDF1 α 、S100A1、およびVEGFをコードするpXoX）を発現させ得るプラスミドベクター骨格由来の、齧歯類モデルで達成されたルシフェラーゼ発現のデータを示す。

【図4】図4は、心不全状態および対応する標準介護モードならびに介入および治療のための方法全体にわたる進行の様々な段階を示す。

【図5】図5Aおよび図5Bは、HUVEC増殖アッセイを示す。A. は、組換えVEGF処理後のHUVEC増殖を示し、B. は、VEGFトランスフェクト誘導性多能性幹細胞（iPSC）細胞上清での処理後のHUVEC増殖を示す。iPSC細胞をトランスフェクトし、96時間インキュベートした。上清を収集し、HUVESを培養するために使用した。HUVEC増殖は、CellTiter-Gloによって測定した。

【図6】図6は、トランスフェクトされた心筋細胞-iPSC上清による処理後のHUVEC増殖を示す。本明細書に開示されたリンカーを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる機能性ポリペプチドの発現および活性の成功を実証する、拡張型心筋症（DCM）、肥大性心筋症（HCM）または健常対照の患者から、心筋細胞-iPSCを得た。

【図7】図7は、本明細書中に開示されるリンカーを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる機能的ポリペプチドの発現および活性の成功を実証する、末梢血リンパ球（PBL）の遊走の上昇を示す、単一遺伝子、ダブル遺伝子および三重遺伝子SDF1ポリペプチド構築物でトランスフェクトされたiPSC-CMを示す。

【図8】図8は、AMD3100（CXCR4アンタゴニスト）が、SDF1-CXCR4依存性遊走を特異的に阻害した遊走アッセイを示す。データによって、AMD3100の存在下で遊走が減少するので、SDF1が二重遺伝子および三重遺伝子構築物において機能的であることが示される。

【図9】図9によって、生物発光画像が、レポータープラスミドの冠状静脈洞を通る逆行性灌流を示し、本明細書に記載のリンカーも組み込んで、24時間後に心臓への送達および送達されたレポーター遺伝子の発現を生じるブタの研究が示される。ブタ心臓冠状静脈洞を通したルシフェラーゼ発現プラスミドの逆行性注入の24時間後の放射輝度および分布。3つのプラスミド用量（40、80および120mg）を3回試験した。

【図10】図10は、SDF1を発現する二重遺伝子および三重遺伝子構築物で心筋細胞をトランスフェクトした遊走アッセイを示す。iPSC-CM由来の上清を使用したJurkat細胞の遊走は、トランスフェクトされたSDF1タンパク質が機能的であり、かつ本明細書に開示されるリンカーを含む本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる機能性ポリペプチドの発現および活性の成功を示す有意な遊走を生じることを示す。

【図11】図11は、SDF1を発現するダブル遺伝子および三重遺伝子構築物で心筋細胞をトランスフェクトした遊走アッセイを示す。iPSC-CMからの上清を用いたJurkat細胞の遊走により、トランスフェクションおよびSDF1タンパク質が機能的であり、有意な遊走を生じることが示される。データは、Jurkat細胞の用量依存的な遊走を示し、本明細書に開示されるリンカーを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる機能的ポリペプチドの成功した発現および活性を実証する。

10

20

30

40

50

【図12】図12は、SDF1をコードするダブル遺伝子および三重遺伝子構築物でトランスフェクトされた拡張型心筋症対象由来の心筋細胞を示す。データはSDF1に依存するJurkat細胞の遊走を示す。拡張型心筋症iPSC-CMにおけるダブル遺伝子および三重遺伝子ベクター構築物によって発現されるSDF1は機能的である。

【図13】図13は、SDF1をコードするダブル遺伝子および三重遺伝子構築物でトランスフェクトされた肥大型心筋症対象由来の心筋細胞を示す。データはSDF1に依存するJurkat細胞の遊走を示す。肥大型心筋症iPSC-CMにおけるダブル遺伝子および三重遺伝子構築物によって発現されるSDF1は機能的である。

【図14-A】図14Aおよび図14Bは、HUVECで実施された増殖アッセイを示す。A. は、ダブル遺伝子および三重遺伝子構築物を有するDCM対象由来のトランスフェクトされた心筋細胞が、HUVEC増殖を誘導することができる機能的VEGFタンパク質を産生することを示す。（注：試料8は、試行1、試行2で試験されなかった）。図14Bは、二重遺伝子および三重遺伝子構築物を有する健常な対象からのトランスフェクトされた心筋細胞が、HUVEC増殖を誘導し得る機能的VEGFタンパク質を産生することを示す。

10

【図14-B】図14Aおよび図14Bは、HUVECで実施された増殖アッセイを示す。A. は、ダブル遺伝子および三重遺伝子構築物を有するDCM対象由来のトランスフェクトされた心筋細胞が、HUVEC増殖を誘導することができる機能的VEGFタンパク質を産生することを示す。（注：試料8は、試行1、試行2で試験されなかった）。図14Bは、二重遺伝子および三重遺伝子構築物を有する健常な対象からのトランスフェクトされた心筋細胞が、HUVEC増殖を誘導し得る機能的VEGFタンパク質を産生することを示す。

20

【図15】図15Aおよび図15Bは、S100A1-SDF1をコードするダブル遺伝子ベクターでトランスフェクトされた293T細胞におけるSDF1タンパク質発現を示す。A. SDF1の吸光度を示すELISAアッセイ標準曲線。B. 293T上清中のSDF1濃度。データは、本明細書に開示されるリンカーを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる機能的（すなわち、生物学的に活性な）ポリペプチドの発現の成功を実証する。

【図16】図16Aおよび図16Bは、S100A1-VEGF191をコードするダブル遺伝子ベクターでトランスフェクトされた293T細胞におけるVEGFタンパク質発現を示す。A. VEGFの吸光度を示すELISAアッセイ標準曲線。B. 293T上清中のVEGF濃度。このデータは、本明細書に開示されるリンカーを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる機能的（すなわち、生物学的に活性な）ポリペプチドの発現の成功を実証する。

30

【図17】図17Aおよび図17Bは、S100A1-SDF1をコードするダブル遺伝子ベクターでトランスフェクトされた293T細胞におけるS100A1タンパク質発現を示す。A. S100A1の吸光度を示すELISAアッセイ標準曲線。B. 293T溶解物中のS100A1濃度。このデータは、本明細書に開示されるリンカーを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる機能的（すなわち、生物学的に活性な）ポリペプチドの発現の成功を実証する。

40

【図18】図18は、単一遺伝子、ダブル遺伝子および三重遺伝子構築物でトランスフェクトされた心筋細胞によって産生されるS100A1濃度の棒グラフを示す。

【図19】図19は、単一遺伝子、ダブル遺伝子および三重遺伝子構築物でトランスフェクトされた心筋細胞によって産生されるSDF-1 α 濃度の棒グラフを示す。

【図20】図20は、単一遺伝子、ダブル遺伝子および三重遺伝子構築物でトランスフェクトした心筋細胞によって産生されるVEGF濃度の棒グラフを示す。

【図21】図21は、単一遺伝子、ダブル遺伝子および三重遺伝子構築物でトランスフェクトされた心筋細胞によって産生されるS100A1ポリペプチド切断のウェスタンブロット（イムノブロット）検出を示す。

【図22】図22は、単一遺伝子、ダブル遺伝子および三重遺伝子構築物でトランスフェ

50

クトされた心筋細胞によって産生されたSDF-1 α ポリペプチド切断のウエスタンブロット（イムノブロット）検出を示す。

【図23】図23は、単一遺伝子、ダブル遺伝子および三重遺伝子構築物でトランスフェクトした心筋細胞によって産生されたVEGFポリペプチド切断のウエスタンブロット（イムノブロット）検出を示す。

【図24】図24は、非変性PAGEおよびイムノブロッティングによって検出された、本発明のリンカーを用いた三重遺伝子構築物から発現された二量体S100A1の形成を示す。

【図25】図25Aおよび図25Bは、拡張型心筋症患者対健常対照由来のiPSC細胞の比較を、A.（pStuffer、pS100A1をコードするベクター、または2Aテールを含むS100A1をコードするベクターでトランスフェクトしたiPSC細胞の拍動速度）、B.（PStuffer、pS100A1をコードするベクター、または2Aテールを含むS100A1をコードするベクターでトランスフェクトされたiPSC細胞の拍動速度の収縮持続時間）に関して示す。このデータは、S100A1をコードするベクターの3'末端に2Aテールが存在することがS100A1の機能に影響しないことを示す。（pStufferは、オープンリーディングフレーム（ORF）が、非発現、類似サイズのスタッパー配列で置換された、pXoXと同じ骨格構成を有するプラスミドである）。

【図26】図26A、図26Bおよび図26Cは、拡張型心筋症患者対健常対照由来のiPSC細胞の比較を、A.（DNA1（CAGStufferNXB-V2）、DNA2（CAG-S100A1（kozakなし）、DNA3（CAG-S100A1-fp2a-SDF1）、DNA4（CAG-S100A1-fp2a-SDF1-fp2a-VEGF）、DNA5（CAG-S100A1-CMV-SDF1-fp2a-VEGF191）でトランスフェクトされたiPSC細胞、または未トランスフェクト対照の拍動速度）、B.（DNA1、DNA2、DNA3、DNA4、DNA5、またはトランスフェクトしていない対照でトランスフェクトしたiPSC細胞の収縮速度）、C.（DNA1、DNA2、DNA3、DNA4、DNA5または非トランスフェクション対照の収縮持続時間）に関して示す。データは、健常対照レベルへのDCMの収縮特性の復旧を示す。

【図27】図27Aおよび図27Bは、S100A1、SDF-1アルファ、およびVEGF165をコードする三重遺伝子ベクターを示す。図27Aは、生物学的に活性なSDF1 α 、S100A1、およびVEGFをコードするpXoX三重遺伝子ベクターの模式図を示す。図27Bは、三重遺伝子ベクター中の個々の遺伝子エレメントを同定する。

【図28】図28は、リコンビナーゼ滴定実験におけるVEGFの発現についてのデータを示す。データによって、VEGFのゲノムDNAへの組込みが示される。

【図29】図29は、リコンビナーゼ滴定実験におけるSDF-1 α 発現のデータを示す。データは、SDF-1 α のゲノムDNAへの組込みを示す。

【図30】図30は、リコンビナーゼ滴定実験におけるS100A1の発現のためのデータを示す。データは、S100A1のゲノムDNAへの組込みを示す。

【図31】図31A～図31Cは、心臓構造の心エコー測定を介し、および短縮率の関数として、インビボ治療結果を示す。図31Aは、パーセント短縮率の関数としての結果を示す。図31Bは、pXoX構築物と比較した、pStuffer構築物の左心室後壁の厚さ（cm）を示す。図31Cは、pXoX構築物と比較した、pStuffer構築物のIVSd（cm）を示す。値は、平均 $\pm$ SEMとして示す。* $P < 0.001$ 対pStuffer。

【図32】図32は、心筋細胞の再生を示す心細胞におけるPHH3（ホスホーヒストンH3（Ser10））有糸分裂マーカーシグナルの核局在化の結果を示す。プラスミドあたり8匹のラットのうち4匹の代表的な画像。スケールバーは25 μ mである。

【図33】図33は、初期心臓前駆細胞のマーカーであるISL-1の陰性結果を示している画像化結果を示しており、これによって、前駆細胞が再生に関与していないことが確認される。したがって、観察された心筋細胞の再生は、UTMD-pXoX遺伝子治療の

10

20

30

40

50

結果である。プラスミドあたり8匹のラットのうち4匹の代表的な画像。スケールバーは25 μm である。

【発明を実施するための形態】

【0030】

以下の説明および実施例により、本発明の実施形態を詳細に例証する。本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態に制限されるものではなく、したがって、変動し得ることを理解されたい。当業者であれば、本発明の多数の変化形および修正形が存在し、本発明の範囲内に含まれることを認識するであろう。

【0031】

すべての用語は、当業者によって理解されるであろう通りに理解されることを意図する。別途定義されない限り、本明細書に使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって広く理解されているものと同じ意味を有する。以下の定義は当業者に補足を提供するものであり、本出願を対象としており、いずれの関係事例または無関係事例、例えば、いずれの共同所有の特許または出願にも帰属するものではない。本明細書に記載されるものに類似またはそれと同等のいずれの方法および材料も、本開示の試験の実施に使用することができるが、好ましい材料および方法が、本明細書に記載されている。したがって、本明細書において使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のものにすぎず、限定することを意図するものではない。

【0032】

S100ファミリーのタンパク質としては、例えば、S100A1、S100A2、S100A3、S100A4、S100A5、S100A6、S100A7、S100A8、S100A9、S100A10、S100A11、S100A12、S100A13、S100A14、S100A15、およびS100A16が挙げられる。一部の事例において、S100Aタンパク質に類似のタンパク質、例えば、S100A7L (S100カルシウム結合タンパク質A7様)がある。他のS100タンパク質としては、S100B、S100G、S100P、およびS100Z、ならびにそれらのバリエーションおよび断片が挙げられ、これらは、本明細書に記載される実施形態に含まれ得る。本明細書に記載されるベクターによって発現され得る偽遺伝子産物の結果であるS100タンパク質もまた、本明細書に記載される実施形態に含まれる[61]。

【0033】

SDFファミリーのタンパク質としては、例えば、インタークリンファミリーのストロマ細胞由来アルファケモカインメンバーをコードし得る抗微生物遺伝子によってコードされるタンパク質が挙げられる[62]。本明細書に記載される実施形態は、Gタンパク質共役型受容体であるケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体4のリガンドとして機能し得、胚形成、免疫監視、炎症応答、組織恒常性、ならびに腫瘍の成長および転移を含む、多数の多様な細胞機能において役割を果たし得る、コードされるタンパク質を含み得る。異なるアイソフォームをコードする転写産物バリエーションもまた含まれ、前記アイソフォームおよび転写産物バリエーションは、本明細書に記載されるベクターによって発現され得る。本明細書に記載される一部の実施形態において、最初の2つのシステイン残基が1つのアミノ酸によって分離されている、SDFファミリーのタンパク質がある(C-X-Cケモカイン)。以下のタンパク質アイソフォームが、ヒトにおいて特定されており、本明細書に記載されるベクターによって発現され得、本明細書に記載される方法および組成物に含まれ得る：SDF-1アルファ、SDF-1ベータ、SDF-1ガンマ、SDF-1デルタ、SDF-1イプシロン、およびSDF-1シータ、ならびにそれらの断片およびバリエーション。

【0034】

本明細書に記載されるVEGFファミリーのタンパク質には、PDGF/VEGF成長因子ファミリーのメンバーが含まれる。例えば、VEGF121、VEGF121b、VEGF145、VEGF165、VEGF165b、VEGF189、VEGF191、VEGF206のスプライスバリエーションおよびアイソフォームおよび断片および誘導体が

、本明細書に記載される方法および組成物に含まれ得る〔63〕。

【0035】

一部の事例において、S100ポリペプチドは、S100A1、およびその任意の機能性誘導体であり得る。一部の実施形態において、第2の機能性ポリペプチドは、血管新生ポリペプチドであり得る。血管新生ポリペプチドは、血管内皮成長因子（VEGF）ポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態において、VEGFポリペプチドは、VEGF121、VEGF121b、VEGF145、VEGF165、VEGF165b、VEGF189、VEGF191、VEGF206、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される。ある特定の実施形態において、VEGF165は、本明細書に開示されるVEGF191配列のアミノ酸27～191を含む配列を有する。ある特定の実施形態において、VEGF165は、本明細書に開示されるVEGF191配列のアミノ酸27、28、29、30、31、32、33、または34～180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、または191を含む配列を有する。ある特定の実施形態において、VEGF165は、本明細書に開示されるVEGF191配列のアミノ酸30～185を含む配列を有する。一部の事例において、本明細書に記載されるVEGFポリペプチドは、本明細書に開示されるVEGF191またはVEGF165の配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。一部の事例において、VEGFポリペプチドは、本明細書に開示されるVEGF191ポリペプチドの配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。

10

20

【0036】

他の実施形態において、第3の機能性ポリペプチドは、ケモカインであり得る。ケモカインは、ストロマ細胞由来因子1（SDF）ポリペプチドであり得る。SDFポリペプチドは、SDF1、SDF-1 α 、SDF-1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択され得る〔62〕。SDFポリペプチドは、本明細書に開示されるSDF1ポリペプチドの配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。

30

【0037】

本明細書に記載される一部の実施形態において、S100ポリペプチドは、第1のポリペプチドリンカーによって第2のポリペプチドに結合され得る。一部の事例において、ポリペプチドリンカーは、切断可能なリンカーであってもよく、または切断不可能なリンカーであってもよい。

【0038】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド構築物が、カルシウム結合タンパク質（S100）ポリペプチド、第2の機能性ポリペプチドを含み得、さらに、第3の機能性ポリペプチドを含み得る、実施形態が、本明細書に提供される。一部の事例において、第3の機能性ポリペプチドは、サイトカイン、ケモカイン、血管新生ポリペプチド、およびそれらの任意の機能性誘導体のうちのいずれか1つであり得る。

40

【0039】

ある特定の実施形態において、第3の機能性ポリペプチドは、血管新生ポリペプチドであり得る。一部の実施形態において、血管新生ポリペプチドは、VEGFポリペプチドであり得る。VEGFポリペプチドは、VEGF121、VEGF121b、VEGF145、VEGF165、VEGF165b、VEGF189、VEGF191、VEGF206、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択され得る。VEGFポリペプチドは、VEGF165ポリペプチドの配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同

50

一性を有する配列を含み得る。一部の事例において、VEGFポリペプチドは、VEGF 191ポリペプチドの配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。

【0040】

一部の実施形態において、第3の機能性ポリペプチドは、ケモカインであり得る。ある特定の実施形態において、ケモカインは、SDFポリペプチドであり得る。一部の実施形態において、SDFポリペプチドは、SDF1、SDF-1 α 、SDF-1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される。一部の事例において、SDFポリペプチドは、本明細書に記載されるSDF1ポリペプチドの配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。

10

【0041】

一部の実施形態において、第3の機能性ポリペプチドは、任意選択で切断可能である第2のポリペプチドリンカーによって、前記S100ポリペプチドおよび前記第2の機能性ポリペプチドのうちの少なくとも1つに結合され得る。ポリペプチドリンカーは、本明細書に記載されるリンカーから独立して選択され得る。

【0042】

少なくとも第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む少なくとも1つのポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドであって、第1のポリペプチドが、血管新生ポリペプチドであり得、第2のポリペプチドが、ケモカインまたはそのバリエーションもしくは断片であり得る、ポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。一部の事例において、血管新生ポリペプチドは、VEGF121、VEGF121b、VEGF145、VEGF165、VEGF165b、VEGF189、VEGF191、VEGF206、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択されるVEGFポリペプチドであり得る。ポリペプチドは、VEGFポリペプチドの配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。

20

【0043】

VEGF191の配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含む、VEGFポリペプチドが、提供される。一部の事例において、第2のポリペプチドは、SDFポリペプチドであり得る。SDFポリペプチドは、SDF1、SDF-1 α 、SDF-1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択され得る。一部の事例において、SDFポリペプチドは、SDF1の配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。

30

【0044】

対象における血管発生を改善する方法であって、前記対象に、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたは本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含む治療有効量の組成物を提供するステップを含む、方法が、本明細書に提供される。

40

【0045】

SDF1ポリペプチド、S100A1ポリペプチド、VEGFポリペプチド、ならびにそれらの断片およびバリエーションから選択される少なくとも2つのポリペプチドに作動可能に連結された少なくとも1つのプロモーターを含む発現ベクターが、本明細書に提供される。一部の事例において、少なくとも2つのポリペプチドは、リンカーによって結合される。一部の事例において、少なくとも1つのプロモーターは、CAGプロモーター、CMVプロモーター、SV40プロモーター、アデノウイルスプロモーター、ベータアクチンプロモーター、メタロチオニン (metallothionin) プロモーター、EF1 α プロモーター

50

、ミオシン軽鎖プロモーター、ミオシン重鎖プロモーター、NCX1プロモーター、および他の好適な心臓のプロモーターからなる群から選択され得る。発現ベクターは、心臓発現ベクターであり得る。

【0046】

少なくとも第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含むポリペプチド構築物であって、第1のポリペプチドが、カルシウム結合タンパク質、またはそのバリエーションもしくは断片であり得、第2のポリペプチドが、血管新生ポリペプチド、ケモカイン、またはそれらのバリエーションもしくは断片であり得る、ポリペプチド構築物が、本明細書に提供される。少なくとも第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、および第3のポリペプチドを含むポリペプチド構築物であって、第1のポリペプチドが、血管新生ポリペプチド、またはそのバリエーションもしくは断片であり得、第2のポリペプチドが、ケモカイン、またはそのバリエーションもしくは断片であり得、第3のポリペプチドが、カルシウム結合タンパク質、またはそのバリエーションもしくは断片であり得る、ポリペプチド構築物もまた、開示される。一部の事例において、本明細書に記載されるポリペプチド構築物は、S100A1、そのバリエーションまたは断片を含み得る。一部の事例において、ポリペプチド構築物は、SDF1、そのバリエーションまたは断片を含み得る。さらなる事例において、本明細書に記載されるポリペプチド構築物は、VEGF、そのバリエーションまたは断片を含み得る。

10

【0047】

本明細書に記載されるポリヌクレオチド、または本明細書に提供されるポリペプチド構築物、または本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド構築物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物が、提供される。対象における心疾患および障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、または本明細書に提供されるポリペプチド構築物、または本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド構築物を含む治療有効量の組成物を提供するステップを含む、方法が、本明細書に提供される。

20

【0048】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物は、さらに、第2のリンカーポリペプチドによって第2の機能性ポリペプチドに結合される、第3の機能性ポリペプチドを含む。一部の事例において、第3の機能性ポリペプチドは、VEGF、SDF1、S100A1、それらのバリエーションおよび誘導体からなるリストから選択され得る。一部の事例において、第2のリンカーは、本明細書に記載される第1のリンカーと同じであってもよく、または異なってもよい。一部の事例において、リンカーおよび機能性ポリペプチドは、インフレーションで発現され得る。

30

【0049】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む細胞が、本明細書に提供される。

【0050】

少なくとも1つの心細胞を、少なくとも第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドと接触させるステップを含み、第1のポリペプチドが、血管新生ポリペプチドバリエーションまたはその断片であり、第2のポリペプチドが、ケモカイン、カルシウム結合タンパク質、またはそれらのバリエーションもしくは断片のうちの少なくとも1つである、方法が、本明細書に提供される。一部の実施形態において、血管新生ポリペプチドバリエーションまたはその断片は、VEGF121、VEGF121b、VEGF145、VEGF165、VEGF165b、VEGF189、VEGF191、VEGF206、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択されるVEGFポリペプチドであり得る。VEGFポリペプチドは、VEGF165の配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。ある特定の実施形態において、VEGF165は、本明細書に開示されるVEGF191配列のアミノ酸27~191を含む配列を有する。ある特定の実施形態において、VEGF165は、本明細書に開示されるVEGF191配列のアミノ酸27、28、29、30、

40

50

31、32、33、または34～180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、または191を含む配列を有する。ある特定の実施形態において、VEGF 165は、本明細書に開示されるVEGF 191配列のアミノ酸30～185を含む配列を有する。一部の事例において、本明細書に記載されるVEGFポリペプチドは、本明細書に開示されるVEGF 191またはVEGF 165の配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。VEGFポリペプチドは、VEGF 191の配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。一部の事例において、第2のポリペプチドは、ケモカインであり得る。ケモカインは、ストロマ細胞由来因子1（SDF）ポリペプチドであり得る。一部の事例において、本明細書に提供される組成物および方法において有用なSDFポリペプチドは、SDF1、SDF-1 α 、SDF-1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択され得る。SDFポリペプチドは、SDF1- α に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。

【0051】

一部の事例において、ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドは、エキスポで導入され得る。ある特定の実施形態において、ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドは、インビボで導入され得る。インビボでの導入は、経皮冠状動脈カテーテル法、冠状静脈遮断、心臓再循環、順行性冠状動脈注入、逆行性灌流、直接注射、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択され得る。

【0052】

対象における心疾患または障害を（例えば、限定されないが、血管発生、心臓機能、または心臓リモデリングを改善することによって）対象において処置する方法であって、前記対象に、VEGFポリペプチド、ならびにSDFポリペプチドおよびS100ポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む構築物をコードする、ある量のポリヌクレオチドを投与するステップを含む、方法が、本明細書に提供される。本明細書に記載される実施形態におけるVEGFポリペプチドは、VEGF121、VEGF121b、VEGF145、VEGF165、VEGF165b、VEGF189、VEGF191、VEGF206、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択され得る。VEGFポリペプチドは、VEGF165の配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。ある特定の実施形態において、VEGF 165は、本明細書に開示されるVEGF 191配列のアミノ酸27～191を含む配列を有する。VEGFポリペプチドは、VEGF 191の配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。SDFポリペプチドは、SDF1、SDF-1 α 、SDF-1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択され得る。S100ポリペプチドは、S100A1、その断片またはバリエーションであり得る。

【0053】

ある特定の実施形態において、本発明の方法および組成物で処置される対象は、うっ血性心不全（CHF）を有し得る。対象は、左室補助デバイス（LVAD）が留置されている場合がある。対象は、心筋症を有し得る。心筋症は、拡張型心筋症（DCM）、肥大型心筋症（HCM）、拘束型心筋症（RCM）、不整脈原性右室心筋症（ARVC）、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択され得る。

【0054】

さらなる実施形態において、本発明の方法および組成物で処置される対象は、動脈瘤、アテローム性動脈硬化症、先天性心疾患、心膜障害、急性非代償性心不全、狭心症、動脈硬化性心疾患、スポーツ心臓症候群、動静脈瘻、自己免疫性心疾患、心臓の褐色萎縮、心

10

20

30

40

50

アミロイドーシス、心臓性不整脈、心臓性喘息、心臓収縮調節、心臓X症候群、心原性ショック、心臓肥大、心筋症、心臓病恐怖症、心腎症候群、心臓毒性、心血管疾患、心臓炎、慢性リウマチ性心疾患、木靴心、冠状動脈瘤、冠状動脈奇形、冠状動脈疾患、冠状動脈解離、冠状動脈拡張、冠状動脈閉塞、冠盗血、冠状動脈血栓、冠状動脈萎縮、コクサッキーウイルス誘導型心筋症、拡張期心不全、ドレスラー症候群、デュロジ疾患、アイゼンメンゲル症候群、胎児性心音、胎児性リコール (embryonic recall)、心内膜弾性線維症、駆出率が保たれた心不全、心臓新生物、高拍出性心不全、前胸部高拍出量 (hyperdynamic precordium)、高血圧性心疾患、特発性巨細胞性心筋炎、炎症性心疾患、心室間同期不全、心室内同期不全、虚血性心疾患、限局性心房アミロイドーシス (isolated atrial amyloidosis)、ケシャン病、k o u n i s 症候群、マイジカー (mydicar)、心筋橋、心筋錯綜配列 (myocardial disarray)、心筋破裂、心筋癒痕、心筋気絶、心筋炎、非細菌性血栓性心内膜炎、入口部疾患 (ostial disease)、末梢動脈疾患、リンおよび非アテローム硬化性心疾患、心膜切開後症候群、圧力制御型間欠性冠状静脈洞閉塞 (p i c s o)、心肺蘇生法からの回復、外傷性心停止からの回復、右軸偏位、リウマチ性心疾患、ロエムヘルド症候群、飽和脂肪酸と心血管疾患の論争、癒痕 - f c、ショーン症候群、亜急性細菌性心内膜炎、心臓弁疾患、心室瘤、ならびにウイルス性心筋症のうちの1つまたは複数

10

【0055】

対象における心血管状態を処置または予防する方法であって、対象に、S100Aポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドを含むある量の構築物を投与するステップを含み、前記第2の機能性ポリペプチドが、サイトカイン、ケモカイン、および血管新生ポリペプチドのうちの少なくとも1つである、方法が、本明細書に提供される。一部の事例において、対象への投与は、予防的に行われ得る。一部の事例において、対象への投与は、治療的に行われ得る。一部の事例において、対象には、前記対象への少なくとも1つの追加の処置が投与され得る。一部の事例において、第2の機能性ポリペプチドは、VEGF、SDF、またはそれらの組合せであり得る。

20

【0056】

対象に、少なくとも2つの機能性タンパク質またはそれらの部分を含む本明細書に記載されるポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド、少なくとも1つのプロモーター、および少なくとも1つの操作された組換え部位を含む、少なくとも1つの非ウイルスベクターを投与するステップを含む方法であって、前記少なくとも1つのプロモーターが、前記少なくとも2つの機能性タンパク質の発現を駆動する、方法が、本明細書に提供される。一部の事例において、少なくとも1つのプロモーターは、構成的であり得る。一部の事例において、少なくとも1つのプロモーターは、組織特異的であり得る。一部の事例において、少なくとも1つのプロモーターは、誘導性であり得る。一部の事例において、少なくとも1つの組織特異的プロモーターは、ミオシン軽鎖 (MLC) プロモーターである。一部の事例において、誘導性プロモーターは、小分子リガンド誘導性2ポリペプチドエクジソン受容体ベース遺伝子スイッチ (small molecule ligand-inducible two polypeptide ecdysone receptor-based gene switch) である。

30

【0057】

誘導性プロモーターは、前記少なくとも2つの遺伝子の発現の用量調節型制御にリガンドを利用する。一部の事例において、リガンドは、エクジステロイド、9-シス-レチノイン酸、レチノイン酸の合成類似体、N, N'-ジアシルヒドラジン、オキサジアゾリン、ジベンゾイルアルキルシアノヒドラジン、N-アルキル-N, N'-ジアロイルヒドラジン、N-アシル-N-アルキルカルボニルヒドラジン、N-アロイル-N-アルキル-N'-アロイルヒドラジン、アルニドケトン (arnidoketone)、3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシ-N-イソブチル-ベンズアミド、8-O-アセチルハルパギド、オキシステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(S)ヒドロキシコレステロール、25-エポキシコレステロール、T0901317、5-アルファ-6-アルファ-エポキシコレステロール-3-スルフェート (ECHS)、7-ケトコレステロ

40

50

ールー3-スルフェート、フラメソル (framesol)、胆汁酸、1, 1-ビホスホネートエステル、幼若ホルモン I I I、RG-115819 (3, 5-ジメチルー安息香酸N-(1-エチルー2, 2-ジメチループロピル)-N'-(2-メチルー3-メトキシベンゾイル)-ヒドラジド)、RG-115932 ((R)-3, 5-ジメチルー安息香酸N-(1-tert-ブチルーブチル)-N'-(2-エチルー3-メトキシベンゾイル)-ヒドラジド)、およびRG-115830 (3, 5-ジメチルー安息香酸N-(1-tert-ブチルーブチル)-N'-(2-エチルー3-メトキシベンゾイル)-ヒドラジド)、ならびにそれらの任意の組合せからなる群から選択され得る。リンカーは、切断可能なリンカーであり得る。

【0058】

一部の実施形態において、第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドは、第1のリンカーポリペプチドによって結合され、第1のリンカーポリペプチドは、配列APVKQ (配列番号42) に対して少なくとも40%、50%、60%、80%、または100%の同一性を有する配列を含む。一部の事例において、リンカーポリペプチドは、APVKQ (配列番号42)、GPVKQ (配列番号43)、VPVKQ (配列番号44)、IPVKQ (配列番号45)、MPVKQ (配列番号46)、APIKQ (配列番号47)、GPIKQ (配列番号48)、VPIKQ (配列番号49)、IPIKQ (配列番号50)、MPIKQ (配列番号51)、APAKQ (配列番号52)、GPAKQ (配列番号53)、VPAKQ (配列番号54)、IPAKQ (配列番号55)、MPAKQ (配列番号56)、APVRQ (配列番号57)、GPVRQ (配列番号58)、VPVRQ (配列番号59)、IPVRQ (配列番号60)、MPVRQ (配列番号61)、APIRQ (配列番号62)、GPIRQ (配列番号63)、VPIRQ (配列番号64)、IPIRQ (配列番号65)、MPIRQ (配列番号66)、APARQ (配列番号67)、GPARQ (配列番号68)、VPARQ (配列番号69)、IPARQ (配列番号70)、MPARQ (配列番号71)、APVKN (配列番号72)、GPVKN (配列番号73)、VPVKN (配列番号74)、IPVKN (配列番号75)、MPVKN (配列番号76)、APIKN (配列番号77)、GPIKN (配列番号78)、VPIKN (配列番号79)、IPIKN (配列番号80)、MPIKN (配列番号81)、APAKN (配列番号82)、GPAKN (配列番号83)、VPAKN (配列番号84)、IPAKN (配列番号85)、MPAKN (配列番号86)、APVRN (配列番号87)、GPVRN (配列番号88)、VPVRN (配列番号89)、IPVRN (配列番号90)、MPVRN (配列番号91)、APIRN (配列番号92)、GPIRN (配列番号93)、VPIRN (配列番号94)、IPIRN (配列番号95)、MPIRN (配列番号96)、APARN (配列番号97)、GPARN (配列番号98)、VPARN (配列番号99)、IPARN (配列番号100) およびMPARN (配列番号101) からなる群から選択される配列を含む。一部の事例において、ポリペプチドリンカーはまた、1つまたは複数のGSリンカー配列、例えば、(GS)n (配列番号109)、(SG)n (配列番号110)、(SGS)n (配列番号111)、および(SSS)n (配列番号112) を含み得、ここで、nは、ゼロから15の任意の数であり得る。一部の実施形態において、第1の機能性ポリペプチドは、第2の機能性ポリペプチドと異なり得る。

【0059】

一部の実施形態において、方法は、さらに、対象に、少なくとも1つの二次ベクターを投与するステップを含み得る。少なくとも1つの二次ベクターは、mRNAであり得る。少なくとも1つの二次ベクターは、プラスミドであり得る。一部の実施形態において、少なくとも1つの二次ベクターは、少なくとも1つのリコンビナーゼを含み得る。リコンビナーゼは、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) ファージリコンビナーゼ、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) ファージリコンビナーゼ、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) ファージリコンビナーゼ、マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*) ファージリコンビナー

10

20

30

40

50

ぜ、およびマイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*) ファージリコンビナーゼからなる群から選択され得る。一部の実施形態において、少なくとも2つの遺伝子が、リコンビナーゼによって対象のゲノムに組み込まれ得る。一部の実施形態において、少なくとも1つの組換え部位は、ファージゲノム組換え結合部位 (attP) または細菌ゲノム組換え結合部位 (attB) であり得る。一部の実施形態において、本明細書に記載される本発明において使用されるリコンビナーゼは、SpBC2 などであるがこれに限定されない部位特異的セリンリコンビナーゼを含む (例えば、2015年5月19日に出願された米国特許第9,034,650号明細書 (米国特許出願公開第2006/0172377号明細書) を参照されたく、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

10

【0060】

ベクターは、適正製造規範 (GMP) 適合性であり得る。

【0061】

配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、および配列番号40からなる群から選択される配列に対して少なくとも40%、50%、60%、80%、または100%の同一性を有する配列を含むポリペプチドが提供される。一部の実施形態において、ポリペプチドは、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、および配列番号40からなる群から選択される配列に対して少なくとも40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含む。

20

【0062】

配列番号102、配列番号104、および配列番号106からなる群から選択される配列に対して少なくとも40%、50%、60%、80%、または100%の同一性を有する配列を含むポリペプチドが提供される。一部の実施形態において、配列番号102、配列番号104、および配列番号106からなる群から選択される配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含むポリペプチドがある。

【0063】

配列番号108の核酸配列によってコードされるポリペプチド配列に対して少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含むポリペプチドが提供される。

30

【0064】

第1のリンカーポリペプチドによって結合される第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドであって、第1のリンカーポリペプチドが、配列APVKQに対して少なくとも40%、50%、60%、80%、または100%の同一性を有する配列を含む、ポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。一部の事例において、リンカーポリペプチドは、APVKQ (配列番号42) からなる群から選択される配列を含む。一部の事例において、リンカーポリペプチドは、APVKQ (配列番号42)、GPVKQ (配列番号43)、VPVKQ (配列番号44)、IPVKQ (配列番号45)、MPVKQ (配列番号46)、APIKQ (配列番号47)、GPIKQ (配列番号48)、VPIKQ (配列番号49)、IPIKQ (配列番号50)、MPIKQ (配列番号51)、APAKQ (配列番号52)、GPAKQ (配列番号53)、VPAKQ (配列番号54)、IPAKQ (配列番号55)、MPAKQ (配列番号56)、APVRQ (配列番号57)、GPVRQ (配列番号58)、VPVRQ (配列番号59)、IPVRQ (配列番号60)、MPVRQ (配列番号61)、APIRQ (配列番号62)、GPIRQ (配列番号63)、VPIRQ (配列番号64)、IPIRQ (配列番号65)、MPIRQ (配列番号66)、APARQ (配列番号67)、GPARQ (配列番号68)、VPARQ (配列番号69)、IPARQ (配列番号70)、MPARQ (配列番号71)、APVKN (配列番号72)、GPVKN (配列番号73)、VPVKN (配列番号74)、IPVKN (配列番号75)

40

50

、MPVKN（配列番号76）、APIKN（配列番号77）、GPIKN（配列番号78）、VPIKN（配列番号79）、IPIKN（配列番号80）、MPIKN（配列番号81）、APAKN（配列番号82）、GPAKN（配列番号83）、VPAKN（配列番号84）、IPAKN（配列番号85）、MPAKN（配列番号86）、APVRN（配列番号87）、GPVRN（配列番号88）、VPVRN（配列番号89）、IPVRN（配列番号90）、MPVRN（配列番号91）、APIRN（配列番号92）、GPIRN（配列番号93）、VPIRN（配列番号94）、IPIRN（配列番号95）、MPIRN（配列番号96）、APARN（配列番号97）、GPARN（配列番号98）、VPARN（配列番号99）、IPARN（配列番号100）およびMPARN（配列番号101）からなる群から選択される配列を含む。一部の事例において、ポリペプチドリンカーはまた、1つまたは複数のGSリンカー配列、例えば、(GS)n（配列番号113）、(SG)n（配列番号114）、(GSG)n（配列番号115）、および(SGS)n（配列番号116）を含み得、ここで、nは、1から15の任意の数であり得る。一部の実施形態において、第1の機能性ポリペプチドは、第2の機能性ポリペプチドと異なり得る。他の事例において、前記第1および第2の機能性ポリペプチドのうち少なくとも1つは、タンパク質、ホルモン、抗体、糖タンパク質、またはそれらの誘導体もしくは断片であり得る。

10

【0065】

フリンポリペプチドおよび2Aポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドであって、フリンポリペプチドおよび2Aポリペプチドが、少なくとも3つの疎水性アミノ酸を含むポリペプチドリンカーによって結合される、ポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。一部の事例において、少なくとも3つの疎水性アミノ酸は、グリシン(Gly)(G)、アラニン(Ala)(A)、バリン(Val)(V)、ロイシン(Leu)(L)、イソロイシン(Ile)(I)、プロリン(Pro)(P)、フェニルアラニン(Phe)(F)、メチオニン(Met)(M)、トリプトファン(Trp)(W)からなるリストから選択される。

20

【0066】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、およびこれらのポリペプチドを含む組成物が、提供される。個体を、本明細書に開示されるポリヌクレオチドまたはそれにより発現されるポリペプチドまたはそれらの誘導体もしくはコン

30

【0067】

ポリペプチド構築物の改善された発現を得る方法であって、第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドを含む前記ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドを提供するステップであって、前記第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドが、配列APVKQ（配列番号42）に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を含むリンカーポリペプチドによって結合される、ステップと、前記ポリヌクレオチドを宿主細胞において発現させるステップであって、前記発現が、配列APVKQ（配列番号42）に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を含むリンカーポリペ

40

【0068】

参照される数値およびその文法上の同等物に関する「約」という用語は、本明細書において使用されるとき、数値そのもの、およびその数値から増減10%の範囲の値を含み得る。例えば、「約10」という量は、10および9~11の任意の量を含む。例えば、参照される数値に関する「約」という用語は、その値の増減10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%の範囲の値も含み得る。

【0069】

「心血管疾患」および「循環障害」という用語は、互換可能に使用され、循環系に対す

50

る損傷によって引き起こされる疾患または障害を示して本明細書に使用され、その損傷は、治療有効量の、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたは本明細書に開示されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド構築物を、対象の心臓および／または循環系の損傷した領域に提供することによって、低減および／または緩和され得る。本明細書において使用されるとき、「循環損傷」という用語は、多数の疾患または障害のうちのいずれかによって引き起こされ得る循環系への傷害を指して使用される。本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたは本明細書に開示されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド構築物、ならびに本発明による方法を使用して処置され得る心血管疾患の例としては、例えば、心筋梗塞、心筋症、末梢血管疾患、先天性心疾患、他の遺伝疾患、ならびに虚血、事故、環境的損傷によって引き起こされる傷害または外傷が挙げられる。加えて、治療有効量の、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたは本明細書に開示されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド構築物は、対象の脳内の部位への血流の不足もしくは虚血によって引き起こされるであろう、または脳および／もしくは脊髄への物理的傷害により生じた、前記対象における心臓発作の中樞神経系への影響を低減および／または排除するために使用され得る。

10

【0070】

「ベクター」という用語または文法上の同等物は、本明細書において使用されるとき、目的のポリペプチド構築物の発現を誘導することができ、目的のポリペプチド構築物を標的細胞に移入するのに有用である、任意のポリヌクレオチド構築物を指す。したがって、この用語には、クローニングビヒクルおよび発現ビヒクル、ならびに組み込みベクターが含まれる。

20

【0071】

選択肢が限られた（例えば、一般に、左室補助デバイス（LVAD）療法を最終目標とする要件に至る）うっ血性心不全（CHF）を有する患者の数が増え続けていることに基づいて、CHFからの回復を促進する生物学的選択肢が、必要とされている。したがって、本発明の一実施形態は、心臓の性能（例えば、最終目標のLVADSが植え込まれた患者において、術後少なくとも30日間、LVAD補助からの一時的な離脱の回数および期間を測定することによって評価される）を改善するための三重エフェクタープラスミドに基づくDNA-pXX（SDF1 α 、S100A1、およびVEGF）を提供する。LVADの植込み単独で、心臓機能の改善がもたらされ得るが、そのほとんどは、植込み後の最初のおよそ30日以内に生じる。また、通常、外科手術に関連する炎症プロセスは、術後30日までに新しいベースラインまで回復し、これにより、この危険性の高い患者集団に、pXXを用いた処置の危険性の減少がもたらされ得る。

30

【0072】

pXXプラスミドは、CAGプロモーターの制御下において、3つのタンパク質（S100A1、SDF-1 α 、およびVEGF165）を単一のmRNAとして、構成的に発現し、これが、翻訳中に、フリンおよび2A自己切断型ペプチド（fp2a）の組合せ活性による切断を介して、個々のエフェクタータンパク質にプロセッシングされる。プラスミド骨格は、カナマイシン選択マーカーおよびpBR322に由来する複製起点を含む。pXXプラスミドの例示は、以下に、図27Aおよび図27Bに提供される。

40

【0073】

本発明はまた、新規な多重遺伝子ベクター、遺伝子配列の組合せ、タンパク質（ポリペプチド）、および本明細書に記載され提供される技法を使用した、例えば、心臓関連の病態、状態、および障害（例えば、心不全、心筋症、不整脈、心膜疾患、大動脈疾患、マルファン症候群、および冠状動脈疾患）の処置に有用な、組成物および方法において使用するためのリンカーを提供する。本明細書において使用されるとき、「リンカー」という用語は、任意の1つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を、それぞれ、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に結合するために使用される任意のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を意味し得る（例えば、第1のGOI-リンカー-第2のGOI-リンカー-第3のGOI-リンカーなど）。例えば、一部の事例では、リンカーは、第

50

1 のポリペプチド配列が、介在アミノ酸配列によって第2のポリペプチド配列（および続けて第3、第4、第5などの同じオープンリーディングフレーム内の後続のポリペプチド）に共有結合で連結（「融合」）されるように、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドオープンリーディングフレームであり得る。本明細書において使用されるとき、「リンカー」はまた、第1のポリヌクレオチドコーディング領域（ORF）を第2のポリヌクレオチドコーディング領域（ORF）（および続いて第3、第4、第5などの後続のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム）に結合させるように機能する、プロモーター（例えば、CAGプロモーターまたはCMVプロモーター）またはIRES（内部リボソーム進入部位）などの非コーディング連結ポリヌクレオチド配列であってもよい。

【0074】

10

本明細書において使用される遺伝子治療は、遺伝的または後天的な疾患または状態を処置または予防するために、目的とされる本明細書に記載されるポリヌクレオチド（例えば、DNAまたはRNA）を対象に移入することを指す。目的のポリヌクレオチドは、インビボでの産生が所望される産物（例えば、ポリペプチド構築物）をコードし得る。一部の実施形態において、目的のポリヌクレオチドはまた、自殺遺伝子もコードする。一部の事例において、遺伝子治療は、本明細書に記載される心血管状態を処置するために使用され得る。

【0075】

ベクター

本明細書に記載されるポリヌクレオチドを使用することを含む、障害の遺伝子治療のためのベクターが、本明細書に提供され得る。ベクターは、DNA、mRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなど、外因性核酸を導入するために利用され得る。これらの巨大分子の大きなサイズおよび負の電荷を考慮して、それらの送達は、担体またはベクターによって媒介され得る。目的のベクターとしては、特に、任意のエピソーマルベクター、例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクター、人工染色体、ミニサークル（mini-circle）などが挙げられる。

20

【0076】

遺伝子送達系は、非ウイルス系および組換えウイルス系の2つのカテゴリーに分類することができ、これらのそれぞれは、遺伝子移入発現に関して固有のプロファイルを有し得る。非ウイルスベクターとしては、ネイキッドプラスミドDNA、リボソームDNA複合体、ポリマー担持DNA、およびオリゴヌクレオチドが挙げられる。プラスミドは、目的のタンパク質をコードする二本鎖環状DNA含有導入遺伝子であり得、エンハンサー配列およびプロモーター配列も有し得る。ベクターは、非ウイルスベクターであり得る。

30

【0077】

ベクターは、遺伝子またはその断片もしくはバリエーションを含み得、ここで、少なくとも1つの遺伝子、その断片、またはバリエーションは、本明細書に開示されるリンカーによって、別の遺伝子、その断片、またはバリエーションに結合される。ベクターは、単一遺伝子または複数の遺伝子、またはそれらの断片もしくはバリエーションを含み得る。ベクターは、遺伝子またはその断片もしくはバリエーションを含み得、ここで、少なくとも1つの遺伝子、その断片、またはバリエーションは、本明細書に開示されるリンカーによって、別の遺伝子、その断片、またはバリエーションに結合され得る。例えば、ベクターは、単一遺伝子、ダブル遺伝子（例えば、表1を参照されたい）、または三重遺伝子であり得、ここで、少なくとも1つの遺伝子、その断片、またはバリエーションは、本明細書に開示されるリンカーによって、別の遺伝子、その断片、またはバリエーションに結合される。ベクターは、1～10個の数の遺伝子またはその断片もしくはバリエーションを含み得る。ベクターは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の遺伝子、その断片、またはバリエーションを含み得る。三重遺伝子ベクターの例は、図20Aおよび図20Bに示されている。例示的なベクター配列は、表5に示される。一部の事例において、ベクターは、同じRNA転写産物から2つ、3つ、またはそれ以上のポリペプチドを別々に、同時に発現させる

40

50

のを可能にし得る。ベクターはまた、レポーターポリペプチドを含み得る。例えば、ベクターは、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のポリペプチド、およびレポーターポリペプチドを発現し得る。

【0078】

一部の事例において、ベクターは、少なくとも1つの遺伝子またはその断片を有して構築され得る。他の事例において、ベクターは、最大10個の遺伝子またはその断片を含み得る。発現され得る遺伝子またはその断片は、配列番号102～107によって示され得る。配列番号102～107の任意のホモログ、アイソフォーム、前駆体、または修飾された部分もまた、本明細書に記載されるベクターによって発現され得る。遺伝子またはその任意の断片は、本明細書に記載されるリンカーによって分離され得る。ベクターにおいて利用され得る様々なリンカーは、例えば、配列番号32～配列番号41に示される配列を含み得る。他の事例において、ベクターにおいて利用され得る関連リンカーは、例えば、配列番号42～101のいずれかに示される配列を含み得る。例えば、遺伝子の一部分は、SDF遺伝子（配列番号103、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）、VEGF遺伝子（配列番号105、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）、およびS100A遺伝子（配列番号107、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）のうちの少なくとも1つであり得、これに、第1のリンカー配列、SDF遺伝子（配列番号103、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）、VEGF遺伝子（配列番号105、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）、およびS100A遺伝子（配列番号107、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）から選択される第2の遺伝子またはその部分が続く、任意選択で、第2のリンカー配列、ならびに続いてSDF遺伝子（配列番号103、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）、VEGF遺伝子（配列番号105、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）、およびS100A遺伝子（配列番号107、またはそれに対して60%、70%、80%、90%、もしくは95%の同一性のものによってコードされる）から選択される第3の遺伝子またはその部分が続く得る。これらの構築物の様々な組合せは、例えば、配列番号1～配列番号31に記載され、治療目的で利用することができる。

【0079】

ベクターは、モジュラーであってもよい。モジュラーベクターは、例えば、制限酵素消化を使用して、1つの遺伝子または核酸セグメントと、異なる遺伝子または核酸セグメントとの置換えを可能にし得る。

【0080】

目的遺伝子またはタンパク質の多重遺伝子発現は、ベクターによって媒介され得る。プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどを含むがこれらに限定されない、任意のベクター系が使用され得る。宿主の抗ウイルス免疫応答を回避するという点で、プラスミドベクターが有利である。プラスミドは、エピソーマルかつ非組込み型であり得、これにより、ウイルスベクターと比較して、挿入による変異生成の危険性を低減することができる。一部の事例において、エンハンサーが、本発明のポリヌクレオチド構築物において使用され得る。エンハンサーは、転写開始部位から固定でない距離で機能し得る配列を指し、これは、転写単位に対して5'または3'のいずれであってもよい。さらに、エンハンサーは、イントロン内にあってもよく、同様に、コーディング配列自体に含まれてもよい。エンハンサーは、通常、長さが10～300塩基対であり、シスで機能する。エンハンサーは、10塩基対～50塩基対、

50塩基対～100塩基対、100塩基対～150塩基対、150塩基対～200塩基対、200塩基対～250塩基対、250塩基対～300塩基対であり得る。エンハンサーは、近傍のプロモーターからの転写を増加させるように機能し得る。エンハンサーは、転写制御を媒介する応答エレメントも含有し得る。哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、フェトプロテイン、およびインスリン）由来の多数のエンハンサー配列が、現在では公知であるが、全般的な発現のために真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用することもできる。エンハンサープロモーターの組合せの選択は、導入遺伝子発現のレベルおよび持続期間の両方に対して大きな影響を有する。エンハンサーは、数例挙げると、シミアンウイルス40（SV40）エンハンサー、ヒト免疫不全ウイルスI（HIV-I）エンハンサー、ジリス肝炎ウイルス（GHV）エンハンサー、アデノウイルスエンハンサー、ヒトプロトロンビン（hTHGB）エンハンサー、またはヒト補体C2遺伝子（hC2）エンハンサーであり得る。

10

【0081】

一部の実施形態において、エンハンサー配列は、遺伝子の発現を増加させるために使用され得る。例えば、CMVエンハンサーは、異なる細胞特異的プロモーターおよび異なる細胞型下において、導入遺伝子発現を増加させ得るため、導入遺伝子発現レベルを増加させるために広く適用可能なツールとなっている。

【0082】

一部の事例において、ミニサークルベクターが使用され得る。ミニサークルベクターは、複製起点を欠いていてもよく、細菌プラスミドに一般的に見られる薬物選択マーカー、例えば、 β -ラクタマーゼ、tetなどを欠いていてもよいという点で、細菌プラスミドベクターと異なり得る。ミニサークルは、リコンビナーゼハイブリッド産物配列、ならびに目的の配列、すなわち、転写される配列および発現に必要な制御配列以外のベクター配列を実質的に含まなくてもよい。一部の事例において、ドッグボーンベクターを利用してよい。ドッグボーンベクターは、細菌の使用を伴うことなく生成することができ、プラスミドと比較して、低減された細菌エレメントを有し得る。細菌エレメントが低減されることで、細胞、対象、または両方の組合せへのベクター導入の毒性が低減され得る。

20

【0083】

本明細書に記載される一部の実施形態は、ベクター（非ウイルスベクターおよびウイルスベクターを含む（DNAおよびRNA/mRNAベクターを含み、直鎖状ベクターであっても環状ベクターであってもよい））に組み込むことができるポリヌクレオチド（および前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド）を含み、ここで、前記ポリヌクレオチドは、

30

a) 5' - (プロモーター) - S100 - (リンカー) - SDF - (リンカー) - VEGF - 3' ;

b) 5' - (プロモーター) - S100 - (リンカー) - VEGF - (リンカー) - SDF - 3' ;

c) 5' - (プロモーター) - S100A1 - (リンカー) - SDF1 - (リンカー) - VEGF - 3' ;

d) 5' - (プロモーター) - S100A1 - (リンカー) - VEGF - (リンカー) - SDF1 - 3' ;

40

e) 5' - (プロモーター) - S100A1 - (リンカー) - SDF1 - (リンカー) - VEGF165 - 3' ;

f) 5' - (プロモーター) - S100A1 - (リンカー) - VEGF165 - (リンカー) - SDF1 - 3' ;

g) 5' - (プロモーター) - S100A1 - (リンカー) - SDF1 α - (リンカー) - VEGF165 - 3' ;

h) 5' - (プロモーター) - S100A1 - (リンカー) - VEGF165 - (リンカー) - SDF1 α - 3' ;

i) 5' - (プロモーター) - S100A1 - (リンカー) - SDF1 - (リンカー)

50

-) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
- j) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (リンカー) - V E G F 1 9 1 - (リンカー) - S D F 1 - 3 ' ;
- k) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (リンカー) - S D F 1 α - (リンカー) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
- l) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (リンカー) - V E G F 1 9 1 - (リンカー) - S D F 1 α - 3 ' ;
- m) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 - (f p 2 a) - S D F - (リンカー) - V E G F - 3 ' ;
- n) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 - (f p 2 a) - V E G F - (リンカー) - S D F - 3 ' ; 10
- o) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (リンカー) - V E G F - 3 ' ;
- p) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F - (リンカー) - S D F 1 - 3 ' ;
- q) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (リンカー) - V E G F 1 6 5 - 3 ' ;
- r) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - (リンカー) - S D F 1 - 3 ' ;
- s) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 α - (リンカー) - V E G F 1 6 5 - 3 ' ; 20
- t) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - (リンカー) - S D F 1 α - 3 ' ;
- u) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (リンカー) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
- v) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 9 1 - (リンカー) - S D F 1 - 3 ' ;
- w) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 α - (リンカー) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
- x) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 9 1 - (リンカー) - S D F 1 α - 3 ' ; 30
- y) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 - (f p 2 a) - S D F - (f p 2 a) - V E G F - 3 ' ;
- z) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 - (f p 2 a) - V E G F - (f p 2 a) - S D F - 3 ' ;
- a a) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (f p 2 a) - V E G F - 3 ' ;
- a b) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F - (f p 2 a) - S D F 1 - 3 ' ;
- a c) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - 3 ' ; 40
- a d) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - (f p 2 a) - S D F 1 - 3 ' ;
- a e) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 α - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - 3 ' ;
- a f) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - (f p 2 a) - S D F 1 α - 3 ' ;
- a g) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
- a h) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 9 1 - (50

- f p 2 a) - S D F 1 - 3 ' ;
 a i) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 α - (f p
 2 a) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
 a j) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 9 1 - (f
 p 2 a) - S D F 1 α - 3 ' ;
 a k) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 - (f p 2 a) - S D F - (f m d v) -
 V E G F - 3 ' ;
 a l) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 - (f p 2 a) - V E G F - (f m d v)
 - S D F - 3 ' ;
 a m) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (f m d 10
 v) - V E G F - 3 ' ;
 a n) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F - (f m d
 v) - S D F 1 - 3 ' ;
 a o) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (f m d
 v) - V E G F 1 6 5 - 3 ' ;
 a p) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - (f
 m d v) - S D F 1 - 3 ' ;
 a q) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 α - (f m
 d v) - V E G F 1 6 5 - 3 ' ;
 a r) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - (20
 f m d v) - S D F 1 α - 3 ' ;
 a s) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (f m d
 v) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
 a t) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 9 1 - (f
 m d v) - S D F 1 - 3 ' ;
 a u) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 α - (f m
 d v) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
 a v) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 9 1 - (f
 m d v) - S D F 1 α - 3 ' ;
 a w) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 - (f p 2 a) - S D F - (p 2 a) - V 30
 E G F - 3 ' ;
 a x) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 - (f p 2 a) - V E G F - (p 2 a) -
 S D F - 3 ' ;
 a y) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (p 2 a
) - V E G F - 3 ' ;
 a z) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F - (p 2 a
) - S D F 1 - 3 ' ;
 b a) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (p 2 a
) - V E G F 1 6 5 - 3 ' ;
 b b) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - (40
 p 2 a) - S D F 1 - 3 ' ;
 b c) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 α - (p 2
 a) - V E G F 1 6 5 - 3 ' ;
 d b) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 6 5 - (p
 2 a) - S D F 1 α - 3 ' ;
 b e) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 - (p 2 a
) - V E G F 1 9 1 - 3 ' ;
 b f) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - V E G F 1 9 1 - (p
 2 a) - S D F 1 - 3 ' ;
 b g) 5 ' - (プロモーター) - S 1 0 0 A 1 - (f p 2 a) - S D F 1 α - (p 2 50

- a) -VEGF191-3';
- b h) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF191-(p2a)-SDF1 α -3';
- b i) 5'-(プロモーター)-S100-(fp2a)-SDF-(GSG-p2a)-VEGF-3';
- b k) 5'-(プロモーター)-S100-(fp2a)-VEGF-(GSG-p2a)-SDF-3';
- b l) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1-(GSG-p2a)-VEGF-3';
- b m) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF-(GSG-p2a)-SDF1-3';
- b n) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1-(GSG-p2a)-VEGF165-3';
- b o) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF165-(GSG-p2a)-SDF1-3';
- b p) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(GSG-p2a)-VEGF165-3';
- b q) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF165-(GSG-p2a)-SDF1 α -3';
- b r) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1-(GSG-p2a)-VEGF191-3';
- b s) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF191-(GSG-p2a)-SDF1-3';
- b t) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(GSG-p2a)-VEGF191-3';および
- b u) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF191-(GSG-p2a)-SDF1 α -3'
- からなる群から選択される構築物構成を含み、
- 「プロモーター」は、任意の転写プロモーター配列であり、
- 「S100」は、S100タンパク質ファミリー内の任意のポリペプチド、そのアイソフォーム、または断片をコードし、
- 「SDF」は、SDFタンパク質ファミリー内の任意のポリペプチド、そのアイソフォーム、または断片をコードし、
- 「VEGF」は、VEGFタンパク質ファミリー内の任意のポリペプチド、そのアイソフォーム、または断片をコードし、
- 括弧符号「(」および「)」は、コーディング配列か非コーディング配列かに関係なく、任意の数の追加のヌクレオチド(nt)(0~1000nt)を示し、
- 「リンカー」は、隣接する生物学的に活性なポリペプチドの発現に有用な任意のリンカーを示し、
- 「S100A1」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号105のヌクレオチド配列または配列番号104のアミノ酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であるか、または100%同一であり、
- 「SDF-1 α 」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号103のヌクレオチド配列または配列番号102のアミノ酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であるか、または100%同一であり、
- 「VEGF165」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号127のヌクレオチド配列または配列番号126のアミノ酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であ

るか、または100%同一であり、

「VEGF191」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号107のヌクレオチド配列または配列番号106のアミノ酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であるか、または100%同一であり、

「fp2a」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号41のヌクレオチド配列または配列番号40のアミノ酸配列に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%同一であるか、または100%同一であり、

「fmdv」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号35のヌクレオチド配列または配列番号34のアミノ酸配列に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%同一であるか、または100%同一であり、

「p2a」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号37のヌクレオチド配列または配列番号36のアミノ酸配列に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%同一であるか、または100%同一であり、

「GSG-p2a」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号39のヌクレオチド配列または配列番号40のアミノ酸配列に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%同一であるか、または100%同一である。

一部の実施形態において、有力候補の本発明の治療用ポリヌクレオチドは、ベクター（非ウイルスベクターおよびウイルスベクターを含む（DNAおよびRNA/mRNAベクターを含み、直鎖状ベクターであっても環状ベクターであってもよい））に組み込むことができるポリヌクレオチド（および前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド）を含み、ここで、前記ポリヌクレオチドは、

a) 5'-(プロモーター)-S100A1-(リンカー)-SDF1 α -(リンカー)-VEGF191-3' ;

b) 5'-(プロモーター)-S100A1-(リンカー)-VEGF191-(リンカー)-SDF1 α -3' ;

c) 5'-(プロモーター)-S100A1-(リンカー)-SDF1 α -(リンカー)-VEGF165-3' ;

d) 5'-(プロモーター)-S100A1-(リンカー)-VEGF165-(リンカー)-SDF1 α -3' ;

e) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(リンカー)-VEGF191-3' ;

f) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF191-(リンカー)-SDF1 α -3' ;

g) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(リンカー)-VEGF165-3' ;

h) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF165-(リンカー)-SDF1 α -3' ;

i) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(fp2a)-VEGF191-3' ;

j) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF191-(fp2a)-SDF1 α -3' ;

k) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(fp2a)-VEGF165-3' ;

l) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF165-(fp2a)-SDF1 α -3' ;

m) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(fmdv)-VEGF191-3';

n) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF191-(fmdv)-SDF1 α -3';

o) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(fmdv)-VEGF165-3';

p) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF165-(fmdv)-SDF1 α -3';

q) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(p2a)-VEGF191-3';

r) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF191-(p2a)-SDF1 α -3';

s) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(p2a)-VEGF165-3';

t) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF165-(p2a)-SDF1 α -3';

u) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(GSG-p2a)-VEGF191-3';

v) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF191-(GSG-p2a)-SDF1 α -3';

w) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-SDF1 α -(GSG-p2a)-VEGF165-3';および

x) 5'-(プロモーター)-S100A1-(fp2a)-VEGF165-(GSG-p2a)-SDF1 α -3'

からなる群から選択される構築物構成を含み、

「プロモーター」は、任意の転写プロモーター配列であり、

「S100」は、S100タンパク質ファミリー内の任意のポリペプチド、そのアイソフォーム、または断片をコードし、

「SDF」は、SDFタンパク質ファミリー内の任意のポリペプチド、そのアイソフォーム、または断片をコードし、

「VEGF」は、VEGFタンパク質ファミリー内の任意のポリペプチド、そのアイソフォーム、または断片をコードし、

括弧符号「(」および「)」は、コーディング配列か非コーディング配列かに関係なく、任意の数の追加のヌクレオチド(nt)(0~1000nt)を示し、

「リンカー」は、隣接する生物学的に活性なポリペプチドの発現に有用な任意のリンカーを示し、

「S100A1」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号105のヌクレオチド配列または配列番号104のアミノ酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であるか、または100%同一であり、

「SDF-1 α 」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号103のヌクレオチド配列または配列番号102のアミノ酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であるか、または100%同一であり、

「VEGF165」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号127のヌクレオチド配列または配列番号126のアミノ酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であるか、または100%同一であり、

「VEGF191」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号107のヌクレオチド配列または配列番号106のアミノ酸配列に対して

10

20

30

40

50

少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であるか、または100%同一であり、

「f p 2 a」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号41のヌクレオチド配列または配列番号40のアミノ酸配列に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%同一であるか、または100%同一であり、

「f m d v」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号35のヌクレオチド配列または配列番号34のアミノ酸配列に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%同一であるか、または100%同一であり、

10

「p 2 a」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号37のヌクレオチド配列または配列番号36のアミノ酸配列に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%同一であるか、または100%同一であり、

「G S G - p 2 a」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈において、それぞれ、配列番号39のヌクレオチド配列または配列番号40のアミノ酸配列に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%同一であるか、または100%同一である。

【0084】

好ましい実施形態において、本発明の組成物は、うっ血性心不全を処置するために使用され得る（例えば、本発明の組成物は、最終目標として左室補助デバイス（LVAD）が植え込まれた患者におけるうっ血性心不全を処置するために使用され得る）。

20

【0085】

好ましい実施形態において、本発明の組成物は、逆行性冠状静脈洞注入（RCSI）を通じて患者に投与される。

【0086】

一実施形態において、本発明の組成物は、動物モデル（例えば、ブタ（ブタモデル）であるがこれに限定されない）に投与され、ここで、心筋虚血の動物モデルの研究には、逆行性冠状静脈洞注入（RCSI）が使用される。

【0087】

30

ある特定の実施形態において、pXoXにおける各エフェクターの機能性を、トランスフェクトした健常者および罹患患者の人工多能性幹細胞（iPSC）に由来する心筋細胞において、エフェクター特異的アッセイを使用して検証した。特に、S100A1は、収縮特性の改善を呈した。SDF-1 α は、CXCR4依存性のJurkat細胞および末梢リンパ球（PBL）の遊走を誘導することが示された。VEGF165は、ヒト臍帯内皮細胞（HUEC）の増殖の増加を呈した。

【0088】

別の実施形態において、健常者および罹患患者の人工多能性幹細胞（iPSC）由来の心筋細胞におけるインビトロでのpXoXのトランスフェクションの安全性の試験は、心電図（ECG）のQT時間に対する作用と緊密に相関するフィールド電位間隔（MEA）における変化の評価に基づいて、心伝導に対する悪影響の危険性を示さなかった。

40

【0089】

別の実施形態において、pXoXのトランスフェクションにより、拡張型心筋症患者のiPSC-CMにおいて、心拍数、収縮間隔、および収縮速度が、健常な表現型由来のiPSC-CMにおいて見られるものに匹敵するレベルまで、回復した。好ましい実施形態において、収縮特性における最良の改善が、単一または二重エフェクターのプラスミドと比較して、pXoX三重エフェクタープラスミドで観察された。

【0090】

ある特定の実施形態において、本発明のベクターおよびポリヌクレオチド構築物は、表1に記載されるものなど、二重遺伝子（ダブル遺伝子）配列（および、それによってコー

50

ドされるポリペプチド)を含む。

【 0 0 9 1 】

【表 1 - 1】

表 1:ベクターの特性-二重遺伝子(ダブル遺伝子)構築物

配列 番号	名称*	配向 (N 末端から C 末端)	リンカ ー
1	CAG-S100A1-fmdv-SDF1-NXB-V2	S100A1-SDF1	fmdv
2	CAG-SDF1-fmdv-S100A1-NXB-V2	SDF1-S100A1	fmdv
3	CAG-SDF1-fmdv-VEGF191-NXB-V2	SDF1-VEGF191	fmdv
4	CAG-VEGF191-fmdv-SDF1-NXB-V2	VEGF191-SDF1	fmdv
5	CAG-S100A1-p2a-SDF1-NXB-V2	S100A1-SDF1	p2a
6	CAG-SDF1-p2a-S100A1-NXB-V2	SDF1-S100A1	p2a
7	CAG-SDF1-p2a-VEGF191-NXB-V2	SDF1-VEGF191	p2a
8	CAG-VEGF191-p2a-SDF1-NXB-V2	VEGF191-SDF1	p2a
9	CAG-S100A1-fp2a-SDF1-NXB-V2	S100A1-SDF1	fp2a
10	CAG-SDF1-fp2a-S100A1-NXB-V2	SDF1-S100A1	fp2a
11	CAG-SDF1-fp2a-VEGF191-NXB-V2	SDF1-VEGF191	fp2a
12	CAG-VEGF191-fp2a-SDF1-NXB-V2	VEGF191-SDF1	fp2a
13	CAG-VEGF191-fp2a-S100A1-NXB-V2	VEGF191-S100A1	fp2a
14	CAG-S100A1-fmdv-VEGF191-NXB-V2	S100A1-VEGF191	fmdv
15	CAG-VEGF191-fmdv-S100A1-NXB-V2	VEGF191-S100A1	fmdv
16	CAG-S100A1-p2a-VEGF191-NXB-V2	S100A1-VEGF191	p2a
17	CAG-VEGF191-p2a-S100A1-NXB-V2	VEGF191-S100A1	p2a
18	CAG-S100A1-fp2a-VEGF191-NXB-V2	S100A1-VEGF191	fp2a
19	IGE-641pCAGCAG(1660043)GAPDH(5883) Kozak1744359F3R(26319)	S100A1-SDF1	fmdv
20	IGE-642 pCAG CAG(1660043)GAPDH(5883) Kozak1744365F3R(26319)	SDF1-S100A1	fmdv
21	IGE-643 pCAG CAG(1660043)GAPDH(5883) Kozak+1744369F3R(26319)	SDF1-VEGF191	fmdv
22	IGE-644 pCAG CAG(1660043)GAPDH(5883) Kozak1744395F3R(26319)	VEGF191-SDF1	fmdv
23	IG E-645 pcag CAG(1660043)_GAPDH(5883)_ Kozak+1744405_F3R(26319)	S100A1-SDF1	p2a

【 0 0 9 2 】

【表 1 - 2】

配列 番号	名称*	配向 (N 末端から C 末端)	リンカ ー
24	IGE-646_pCAG_CAG(1660043)_GAPDH(5883)_ Kozak+1744407_F3R(26319)	SDF1-S100A1	p2a
25	IGE-647_pCAG_CAG(1660043)_GAPDH(5883)_ Kozak+1744420_F3R(26319)	SDF1-VEGF191	p2a
26	IGE-648_pCAG_CAG(1660043)_GAPDH(5883)_ Kozak+1744423_F3R(26319)	VEGF191-SDF1	p2a
27	IGE-649_pCAG_CAG(1660043)_GAPDH(5883)_ Kozak+1744427_F3R(26319)	S100A1-SDF1	fp2a
28	IGE-650pCAG CAG(1660043)GAPDH(5883) Kozak1744430F3R(26319)	SDF1-S100A1	fp2a
29	IGE-651 pCAG CAG(1660043)GAPDH(5883) Kozak1744431F3R(26319)	SDF1-VEGF191	fp2a
30	IGE-652 pCAG CAG(1660043)GAPDH(5883) Kozak1744432F3R(26319)	VEGF191-SDF1	fp2a
31	IGE-653 pCAG CAG(1660043)GAPDH(5883) Kozak1744433F3R(26319)	VEGF-S100A1	fp2a

* CAG」および「NXB-V2」は、CAG プロモーターに加えて 5'および 3'エレメント、なら
びに本発明の構築物において(以下に示される pXoX などにおいて)見出される新しい X ベ
クター骨格バージョン 2 を表す。

「C A G」および「N X B - V 2」ベクターエレメントの配列
【 0 0 9 3】

CAG_NXB-V2	配列番号 108 における ヌクレオチドの位置
NXB-V2 = プラスミド骨格成分:	1-114 (114 bp); 3753-3852 (100 bp); 3853-4904 (1052 bp); 4905-4960 (56 bp); 4961-5755 (795bp); および, 5756-6025 (270 bp)
CAG = CAG プロモーター + 5'および 3'エレメント:	115-1825 (1711 bp); 1841-1942 (102 bp); および 3266-3752 (487 bp)

【 0 0 9 4】

プロモーター

プロモーターは、発現の全体的な強度ならびに細胞特異性を決定し得る、ベクターゲノム設計内における主要なシス作用エレメントである。プロモーターは、偏在的プロモーター、細胞特異的プロモーター、またはそれらの組合せであり得る。偏在的プロモーターまたは構成的プロモーターは、数例挙げると、CMV、CBA (CAGおよびCBh)、EF-1アルファ、PKG、UBC、GUSB (hGBP)、UCOEであり得る。プロモーターは、目的とされる標的細胞内において活性を有するプロモーター、例えば、心臓関連プロモーターであり得る。一部の事例において、プロモーターは、CAGである。他の事例において、プロモーターは、Eflaなどの構成的プロモーターである。プロモーターは、ヒトEfla (hEfla) などのヒトプロモーターであり得る。双方向性プロモーターを使用することもできる。例えば、構成的双方向性プロモーターは、ヒトサイトメガロウイルスプロモーターであり得る。

10

【0095】

遺伝子産物ポリペプチドが分泌されるものなど、一部の実施形態において、すべての細胞型または選択的細胞型における偏在的発現が、所望される場合がある。ヒト伸長因子1 α -サブユニット (EF1 α)、最初期サイトメガロウイルス (CMV)、ニワトリ β -アクチン (CBA)、およびその誘導体CAG、 β グルクロニダーゼ (GUSB)、またはユビキチンC (UBC) などの構成的プロモーターは、ほとんどの組織において発現を促進するために使用することができる (Husain et al., 2009, Qin et al., 2010, Norrmann et al., 2010)。一般に、CBAおよびCAGは、構成的プロモーターの中でも、より大きな発現を促進するが (Xu et al., 2001, Yin et al., 2011)、しかしながら、約1.7 kbというサイズは、CMV (約0.8 kb) またはEF1 α (約1.2 kb) と比較して、パッケージングの制約を有するベクターでは使用が限定され得る。一部の事例において、GUSBまたはUBCプロモーターは、それぞれ、378塩基対および403塩基対というより小さなサイズで、偏在的な遺伝子発現をもたらすことができるが、それらは、CMVまたはCBAプロモーターよりも大幅に微弱であり得る (Husain et al., 2009, Qin et al., 2010)。したがって、発現に影響を及ぼすことなくサイズを縮小するために、構成的プロモーターに対する修飾が続けられており、例えば、CBh (約800塩基対) およびミニCBA (約800塩基対) などの例では、選択された組織において、同程度またはより高い発現を促進することができる (Gray et al., 2011)。一部の事例において、「偏在的」プロモーターは、サイレンシングを受けやすい可能性があるか、または選択された細胞型における差次的発現強度を促進し得る (McCown et al., 1996, Klein et al., 1998, Gray et al., 2011)。

20

30

【0096】

サイトメガロウイルス (CMV)、呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、およびシミアンウイルス40 (SV40) に由来するウイルスエンハンサーおよびプロモーターを使用して、心筋細胞など、広範な哺乳動物細胞型および組織型において、高レベルの発現を達成することができる。ヒトユビキチンC (UBC) プロモーターおよび真核生物翻訳伸長因子1アルファ1 (EEF1A1) プロモーターなどの構成的哺乳動物プロモーターは、より持続的な発現を有し得る。組織特異的プロモーターは、標的外の導入遺伝子発現を低減させるために利用することができる。ポリアデニル化シグナル、イントロン、および足場／マトリックス結合領域 (S/MAR) 52を含む、多数のシス作用配列は、一部の事例において、導入遺伝子発現のレベルおよび持続性を増加させ得る。

40

【0097】

細菌骨格を欠く小型のDNAベクター (例えば、ミニサークル) は、完全長DNAプラスミドと比較して、優れた遺伝子発現のレベルおよび持続期間を維持し得る。ドッグボーンベクターもまた、利用され得る。ドッグボーンベクターは、細菌の使用を伴うことなく生成することができる。一部の事例において、脂質に基づくDNAベクターもまた、使用され得、一部の事例においては、トランスポゾン系が、利用され得る。例えば、トランスポジション系 (transposition system) は、リコンビナーゼ phiC31、PiggyB

50

ac57、Sleeping Beauty、またはそれらの組合せであり得るか、またはそれらに基づくものであり得る。

【0098】

一部の事例において、本明細書に記載される心臓遺伝子エフェクターベクターは、リコンビナーゼの使用を介して細胞ゲノムに組み込まれ得る（図2）。リコンビナーゼは、結合部位リコンビナーゼであり得る。一部の事例において、リコンビナーゼは、米国特許第9,034,650号明細書、米国特許出願公開第2015/0275232号明細書、国際公開第2008/073154号パンフレットに記載されているリコンビナーゼから選択され得、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0099】

リコンビナーゼは、リコンビナーゼをコードするmRNAを介して細胞に導入され得る。ある特定の実施形態において、細胞ゲノムへのリコンビナーゼの組込みは、リコンビナーゼをコードするmRNAの使用を介したリコンビナーゼの導入および発現によって防止され得る。一部の事例において、リコンビナーゼをコードするmRNAは、合成mRNAまたはcGMPグレードのmRNAであり得る（図1）。

【0100】

一部の事例において、リコンビナーゼは、「自殺遺伝子」およびリコンビナーゼをコードする遺伝子を含む発現プラスミドを介して、細胞に導入され得る。ある特定の実施形態において、自殺遺伝子およびリコンビナーゼ遺伝子は、介在する内部リボソーム進入部位（IRES）によって分離され得る。

【0101】

一部の事例において、ベクターが導入され、ゲノムに組み込まれる（例えば、リコンビナーゼを介して）細胞は、初代細胞（例えば、心筋細胞などであるがこれに限定されない（図2））であり得る。一部の事例において、ベクター内のコードされる遺伝子は、細胞において標的とされるゲノム位置で、ゲノムに挿入され得る。

【0102】

内部リボソーム進入部位（IRES）エレメントは、1つの転写産物から複数の遺伝子の発現を可能にし得る（Mountford and Smith 1995）。「IRES」という用語は、本明細書において使用されるとき、内部リボソーム進入部位を意味することが意図され得る。IRES配列を含むベクターにおいて、第1の遺伝子は、キャップ依存性のリボソームスキニング機構によって、それ自体の5'-UTRとともに翻訳され得、一方で後続の遺伝子の翻訳は、キャップ非依存的様式で、IRESにリボソームを直接動員することによって、達成され得る。

【0103】

IRES配列により、真核生物リボソームが結合し、5'キャップ末端への結合を伴うことなく翻訳を開始することが可能となり得る。ある特定の実例において、IRES領域は、ピコルナウイルス、脳心筋炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなどのウイルスのIRES配列に由来し得る。他の事例において、IRES配列は、脳心筋炎ウイルスに由来し得る。「EMCV」または「脳心筋炎ウイルス」という用語は、本明細書において使用されるとき、ピコルナウイルス科の属の脳心筋炎ウイルス種の任意の分離株または株を指す。例としては、EMCV-R（Rueckert）株ウイルス、コロンビアSKウイルスである。一部の事例において、細胞IRESエレメント、例えば、真核生物開始因子4G、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質、c-myc癌原遺伝子、血管内皮成長因子、線維芽細胞成長因子-1 IRES、またはこれらの任意の組合せもしくは修飾形態が、使用され得る。一部の事例において、細胞IRESは、ウイルスIRESと比較した場合に、遺伝子発現の増加を有し得る。

【0104】

「CAP」または「キャップ」という用語は、本明細書において使用されるとき、修飾されたヌクレオチド、一般に、7-メチルグアノシンが3'から5'（7mGppp-G）で真核生物mRNAの5'末端に結合したものを指し、そのmRNAからのタンパ

10

20

30

40

50

ク質の発現の際に、通常の翻訳開始経路において必要とされるエレメントとして機能する。

【0105】

ウイルス、細胞、またはそれらの組合せのIRES配列が、ベクターにおいて利用され得る。IRESは、脳心筋炎(EMCV)またはポリオウイルス(PV)由来であり得る。

【0106】

一部の事例において、IRESエレメントは、ポリオウイルス(PV)、脳脊髄炎ウイルス(EMCV)、口蹄疫ウイルス(FMDV)、ブタテッシュウウイルス-1(PTV-1)、アイチウイルス(AiV)、セネカバレーウイルス(SVV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ブタコレラウイルス(CSFV)、ヒト免疫不全ウイルス-2(HIV-2)、ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)、潜伏型ヒトサイトメガロウイルス(pUL138)、エプスタイン・バーウイルス(EBNA-1)、マレック病ヘルペスウイルス(MDV RLORF9)、ポリシストロン性SV40 19S(SV40 19S)、ムギクビレアブラムシ(Rhopalosiphum padi)ウイルス(RhPV)、コオロギ麻痺ウイルス(CrPV)、ウスジロエダシャク(Ectropis obliqua)ピコルナ様ウイルス(EoPV)、チャパネアオカメムシ(Plautia stali)消化管ウイルス(PSIV)、サシガメウイルス(TrV)、ハチ麻痺ジシストロウイルス(IAPV、KBV)、クロフサスグリ退化(Black currant reversion)ウイルス(BRV)、テンジクアオイ(Pelargonium)花片モザイク(flower break)ウイルス(PFBV)、ハイビスカス退緑斑(Hibiscus chlorotic ringspot)ウイルス(HCRSV)、アブラナ感染性トバモウイルス(Crucifer-infecting tobamovirus)(CrTMV)、ジャガイモ葉巻ポレロウイルス(PLRV)、タバコエッチウイルス(TEV)、ジアルジアウイルス(GLV)、リーシュマニアRNAウイルス-1(LRV-1)、およびそれらの組合せまたは修飾形態からなる群から選択される。

【0107】

一部の事例において、IRESは、Apaf-1、XIAP、HIAP2/c-IAP1、DAP5、Bcl-2、c-myc、CAT-1、INR、分化LEF-1、PDGFR2、HIF-1a、VEGF、FGF2、Bip、BAG-1、CIRP、p53、SHMT1、PITSLREp58、CDK1、Rpr、hid、hsp70、grim、sk1、アンテナペディア、dFoxO、dInR、Adh-Adhr、HSP101、ADH、URE-2、GPR1、NCE102、YMR181a、MSN1、BOI1、FLO8、GIC1、およびそれらの任意の組合せまたは修飾形態からなる群から選択される。

【0108】

IRESElementが、2つのオープンリーディングフレーム(ORF)の間に含まれる場合、翻訳の開始は、第1のORFにおけるカノニカル5'-m7GpppNキャップ依存性機構、およびIRESElementの下流の第2のORFのキャップ非依存性機構によって生じ得る。

【0109】

一部の事例において、遺伝子は、内部リボソーム進入部位(IRES)によって連結され得る。IRESは、複数の遺伝子の同時発現を可能にし得る。例えば、IRES配列は、単一のmRNA転写産物からの複数のタンパク質の産生を可能にし得る。リボソームは、5'-キャップ非依存性様式でIRESに結合し、翻訳を開始し得る。

【0110】

一部の事例において、IRES配列は、約500塩基対であり得るか。IRES配列は、300塩基対~1000塩基対であり得る。例えば、IRESは、300塩基対、350塩基対、400塩基対、450塩基対、500塩基対、550塩基対、600塩基対、650塩基対、700塩基対、750塩基対、800塩基対、850塩基対、900塩基

10

20

30

40

50

対、950塩基対、または1000塩基対の長さであり得る。

【0111】

一部の事例において、IRES配列を含むベクター内の下流の遺伝子の発現が、低減され得る。例えば、IRES配列に続く遺伝子は、IRES配列に先行する遺伝子よりも発現が低減され得る。発現の低減は、先行する遺伝子よりも1%~99%の低減であり得る。

【0112】

一部の事例において、ウイルス2A配列が使用され得る。2A配列は、ピコルナウイルス2A配列に由来し得る。ピコルナウイルス2A配列は、エンテロウイルス2A配列、ライノウイルス2A配列、カルジオウイルス2A配列、アフトウイルス2A配列、肝炎ウイルス2A配列、エルボウイルス2A配列、コブウイルス2A配列、テッシュウウイルス2A配列、およびパレコウイルス2A配列からなる群から選択され得る。

【0113】

2Aエレメントは、IRESよりも短くてもよく、5~100塩基対を有する。一部の事例において、2A配列は、長さが5塩基対、10塩基対、15塩基対、20塩基対、25塩基対、30塩基対、35塩基対、40塩基対、45塩基対、50塩基対、55塩基対、60塩基対、65塩基対、70塩基対、75塩基対、80塩基対、85塩基対、90塩基対、または100塩基対であり得る。2Aが連結された遺伝子は、単一のオープンリーディングフレームにおいて発現され得、「自己切断」が、2AポリペプチドのC末端において、最後の2つのアミノ酸であるGPの間で同時翻訳的に生じ、等量のタンパク質の共発現が生じ得る。一部の事例において、2A配列を含むポリペプチドは、切断後に等量のタンパク質を生じない場合がある。一部の事例において、第1のタンパク質は、第2のタンパク質と比較して、濃度が、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または最大100%高い場合がある。一部の事例において、第2のタンパク質は、第2のタンパク質と比較して、濃度が、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または最大100%高い場合がある。

【0114】

ウイルス2A配列は、約20個のアミノ酸であり得る。一部の事例において、ウイルス2A配列は、コンセンサスモチーフAsp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro（配列番号117）を含み得る。コンセンサスモチーフ配列は、同時翻訳的に作用し得る。例えば、グリシン残基とプロリン残基との間の通常のペプチド結合の形成は、保存され得、これにより、リボソームスキッピングが生じ、それによって、発生するポリペプチドの「切断」が生じ得る。この作用により、等モルレベルで複数の遺伝子が産生され得る。

【0115】

2Aペプチドは、単一のオープンリーディングフレームにおける複数のタンパク質のポリペプチドへの翻訳を可能にし得、このポリペプチドが、続いて、リボソームスキッピング機構を通じて個々のポリペプチドに「切断」され得る（Funston, Kallioinen et al. 2008）。一部の実施形態において、「2A」配列としては、p2a、GSG-p2a、T2A、E2A、F2A、およびBmCPV2A、BmIFV2A、ならびにそれらの任意の組合せを挙げることができる。

【0116】

ベクターはまた、ポリペプチド産物の酵素切断によって、例えば、第2の遺伝子を起源とする発現産物の産生を可能にする、ポリシストロン遺伝子の間に位置する追加の2A/フリン配列を含み得る。一部の事例において、多重遺伝子ベクターにおいて複数の遺伝子の間の切断を促進するために、追加のリンカーが利用され得る。

【0117】

一部の事例において、ベクターは、IRES配列および2A配列を含み得る。他の事例において、2Aペプチドが連結された複数の遺伝子の発現は、2Aペプチドよりも前のスペーサー配列（GSG）によって促進され得る。一部の事例において、構築物は、スペー

10

20

30

40

50

サー、リンカー、アダプター、プロモーター、またはそれらの組合せを組み合わせることができる。例えば、構築物は、スパーサー（S G S G（配列番号118）またはG S G）およびフリンリンカー（R A K R（配列番号32））切断部位を、異なる2Aペプチドとともに有し得る。スパーサーは、I - C e u i（イントロンコーディングエンドヌクレアーゼ）であり得る。ある特定の実施形態において、心臓関連エフェクター遺伝子のうちの2つ以上は、介在する内部リボソーム進入部位（I R E S）によって分離される。

【0118】

ポリヌクレオチドリンカー

本明細書に記載された実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書に記載されたポリヌクレオチドにおいて利用することができる。ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターに適合する末端構造を作成するために添加されてもよい所望の制限部位を含有するDNAの二本鎖セグメントであり得る。一部の事例において、ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターを改変するのに有用であり得る。例えば、ポリヌクレオチドリンカーを含むベクターの改変は、マルチクロニングサイトの変化、またはポリヒスチジントールの付加であり得る。インサートDNAの平滑末端に適応させるためにポリヌクレオチドリンカーを使用して、制限酵素で切断された粘着最終末端を有するベクターにクローニングすることもできる。ポリヌクレオチドリンカーの使用は、ベクターへのブラントライゲーションよりも効率的である場合があり、下流での適用において、ベクターからインサートを放出させる方法を提供することができる。一部の事例において、インサートは、治療用途に有用なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であり得る（例えば、S D F 1ポリペプチド、S 1 0 0 A 1ポリペプチド、V E G Fポリペプチド並びにその断片およびバリエーション）。

【0119】

ポリヌクレオチドリンカーは、オリゴマーであり得る。例えば、リンカーは、5から20ヌクレオチド長であり得る。ポリヌクレオチドリンカーは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20ヌクレオチド長であってもよく、または約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20ヌクレオチド長であってもよい。ポリヌクレオチドリンカーは、DNA二本鎖、一本鎖、またはそれらの組合せであり得る。一部の事例において、リンカーは、RNAであってもよい。ポリヌクレオチドリンカーは、一部の事例において、T4リガーゼによって、本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターにライゲーションすることができる。ライゲーションを促進するために、過剰なポリヌクレオチドリンカーをインサートおよびベクターを含む組成物に添加することができる。一部の事例において、インサートおよびベクターは、リンカーを導入する前に前処置される。例えば、メチラーゼを用いる前処置により、インサートDNAの望ましくない切断を予防することができる。

【0120】

ポリペプチドリンカー

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されたポリヌクレオチドによってコードされた2個以上のポリペプチドをリンカーポリペプチドをコードする介在配列によって分離することができる。ある特定の実施形態において、リンカーは、切断されやすいリンカーである。一部の実施形態において、目的のポリペプチドは、切断されやすいリンカーポリペプチドによって連結された融合タンパク質として発現される。ある特定の実施形態において、切断されやすいリンカーポリペプチドは、以下のうちの任意の1つまたは2つであり得る：以下に記載したフリンリンク、f m d v、p 2 a、G S G - p 2 a、および／またはf p 2 a。一部の事例において、リンカーは、A P V K Q G S G（配列番号119）である。

【0121】

ある特定の場合には、リンカーポリペプチドは、アミノ酸配列「R A K R」（配列番号

10

20

30

40

50

32) を含む得る。ある特定の場合には、フリンリンカーポリペプチドは、「CGTGCAAAGCGT」を含むポリヌクレオチド配列（配列番号33）によってコードされ得る。

【0122】

ある特定の場合には、リンカーポリペプチドは、以下の表に開示された配列を含むリンカーであり得る。

【0123】

【表2】

表2 リンカーアミノ酸配列およびポリヌクレオチド配列

配列 番号	リンカー 名称	配列(N末端からC末端、又は該当する場合は5'から3')
32	フリンリンク1	RAKR
33	フリンリンク1	CGTGCAAAGCGT
34	fmdv	RAKRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
35	fmdv	AGAGCCAAGAGGGCACCAGGTGAAACAGACTTTGAATTTT GACCTTCTGAAGTTGGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCCTG GGCCC
36	p2a	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
37	p2a	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTG GAGGAGAACCCTGGACCT
38	GSG-p2a	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
39	GSG-p2a	GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCT GGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT
40	fp2a	RAKRAPVKQGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
41	fp2a	CGTGCAAAGCGTGCACCGGTGAAACAGGGAAGCGGAGCT ACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG GAGAACCCTGGACCT

【0124】

一部の実施形態において、リンカーは、本明細書に記載されたポリヌクレオチドにおいて利用され得る。リンカーは、可動性リンカー、剛性リンカー、インビボで切断可能なリンカー、またはそれらの任意の組合せであり得る。一部の事例において、リンカーは、（可動性および剛性リンカーと同様に）機能性ドメインと一緒に連結してもよく、またはインビボで切断可能なリンカーと同様に、インビボで遊離の機能性ドメインを放出してもよい。

【0125】

リンカーは、生物学的活性を改善し、発現量を増加させ、望ましい薬物動態プロファイルを達成してもよい。リンカーは、ヒドラゾン、ペプチド、ジスルフィド、またはチオエステル（thioester）を含むこともできる。

【0126】

一部の事例において、本明細書に記載されたリンカー配列は、可動性リンカーを含むことができる。可動性リンカーは、結合されたドメインによってある特定の動きの度合いま

たは相互作用が要求される場合に適用され得る。可動性リンカーは、小さな、非極性（例えば、G l y）または極性（例えば、S e rまたはT h r）のアミノ酸から構成され得る。可動性リンカーは、主に一連のG l yおよびS e r残基からなる配列（「G S」リンカー）を有する場合がある。可動性リンカーの例は、配列（G l y－G l y－G l y－G l y－S e r）*n*（配列番号120）を有する場合がある。コピー数「*n*」を調整することによって、この例示のG Sリンカーの長さを最適化して、機能性ドメインの適当な分離を実現するか、または必要なドメイン内相互作用を維持することができる。G Sリンカー以外に、他の可動性リンカーを組換え融合タンパク質のために利用することができる。一部の事例において、可動性リンカーには、G l yおよびS e rなどの小さいかまたは極性のアミノ酸が豊富に含まれる場合もあるが、可動性を維持するために、T h rおよびA l aなどの追加のアミノ酸を含有することはできない。他の事例において、L y sおよびG l uなどの極性のアミノ酸を使用して、可溶性を改善することができる。

10

【0127】

本明細書に記載されたリンカー配列に含まれる可動性リンカーは、良好な可動性および溶解性をもたらすために、G l yおよびS e rなどの小さいかまたは極性のアミノ酸を豊富に含むことができる。可動性リンカーは、融合タンパク質ドメインに関して、ある特定の動きまたは相互作用が所望される場合に適切な選択肢となり得る。さらに、可動性リンカーは、剛性の構造を有さなくてもよいが、機能性ドメイン間の距離を保つために、受動性リンカーとしての役割を果たすことができる。可動性リンカーの長さは、融合タンパク質の妥当なフォールディングを可能とするか、または最適な生物学的活性を実現するために調整することができる。

20

【0128】

本明細書に記載されたリンカーは、一部の事例において、剛性リンカーをさらに含むことができる。剛性リンカーは、ポリペプチドのドメイン間の固定距離を維持するために利用されてもよい。剛性リンカーの例は：いくつか例を挙げると、アルファヘリックス形成リンカー、プロリッチ配列、（X P）*n*（配列番号121）、X－P r o b a c k b o n e、A（E A A A K）*n* A（*n*＝2～5）（配列番号122）。剛性リンカーは、αヘリックス構造を取り入れることによって、または一部の事例において、複数のP r o残基を含有することによって、比較的硬い構造を示すことができる。

【0129】

30

本明細書に記載されたリンカーは、一部の事例において、切断可能であり得る。他の事例において、リンカーは切断可能ではない。切断可能ではないリンカーは、機能性ドメインと一緒に、共有結合により結合し、インビボプロセスまたはエクスピボプロセス全体を通して、1つの分子として作用する場合がある。切断可能なリンカーは、インビボで遊離の機能性ドメインを放出するために導入することができる。切断可能なリンカーは、いくつか例を挙げると、還元剤、プロテアーゼの存在によって切断され得る。例えば、ジスルフィド結合の還元を利用して切断可能なリンカーを生成してもよい。ジスルフィドリンカーの場合には、グルタチオンなどのチオールを用いるジスルフィド交換を介した切断事象により切断が生じ得る。他の事例において、組換え融合タンパク質におけるリンカーのインビボでの切断は、特定の細胞または組織において、病的状態下（例えば、がんまたは炎症）、インビボで発現され得るプロテアーゼによって実行され、ある特定の細胞区画内に限定される。一部の事例において、切断可能なリンカーは、標的化された切断を可能とする場合がある。例えば、多くのプロテアーゼの特異性により、限定された区画内でのリンカーのより緩徐な切断がもたらされ得る。切断可能なリンカーは、ヒドラゾン、ペプチド、ジスルフィド、またはチオエーテルを含むこともできる。例えば、ヒドラゾンは、血清の安定性を付与することができる。他の事例において、ヒドラゾンは、酸性区画内での切断を可能とすることができる。酸性区画は、最大7のpHを有し得る。リンカーは、チオエーテルを含むこともできる。チオエーテルは、非還元性であってもよい。チオエーテルは、細胞内のタンパク質分解のために設計することができる。

40

【0130】

50

ある特定の実施形態において、f m d v リンカーポリペプチドは、配列番号 3 4 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であり得る配列を含む。ある特定の実施形態において、f m d v リンカーポリペプチドは、2 つ以上の融合タンパク質を連結する単一のベクターにコードされた 1 つまたは複数のリンカーである。ある特定の場合には、f m d v リンカーポリペプチドは、ポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム (O R F) 核酸配列によってコードされ得る。一部の事例において、f m d v をコードする O R F は、配列番号 3 5 を含むかまたは配列番号 3 5 からなる。ある特定の実施形態において、f m d v をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 3 5 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である。

10

【0 1 3 1】

ある特定の場合には、リンカーポリペプチドは、「p 2 a」リンカーであり得る。ある特定の実施形態において、p 2 a ポリペプチドは、配列番号 3 6 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であり得る配列を含むことができる。ある特定の実施形態において、p 2 a リンカーポリペプチドは、2 つ以上の融合タンパク質を連結する単一のベクターにコードされた 1 つまたは複数のリンカーであり得る。一部の事例において、p 2 a リンカーポリペプチドは、ポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム (O R F) 核酸配列によってコードされ得る。ある特定の実施形態において、p 2 a をコードする O R F は、配列番号 3 7 を含むかまたは配列番号 3 7 からなる。ある特定の場合には、p 2 a をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 3 7 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % もしくは 1 0 0 % 同一であるか、または配列番号 3 7 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であり得る。

20

【0 1 3 2】

一部の事例において、リンカーポリペプチドは、「G S G-p 2 a」リンカーであり得る。ある特定の実施形態において、G S G-p 2 a リンカーポリペプチドは、配列番号 3 8 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であり得る配列を含むことができる。ある特定の実施形態において、G S G-p 2 a リンカーポリペプチドは、2 つ以上の融合タンパク質を連結する単一のベクターにコードされた 1 つまたは複数のリンカーであり得る。一部の事例において、G S G-p 2 a リンカーポリペプチドは、ポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム (O R F) 核酸配列によってコードされ得る。G S G-p 2 a をコードする O R F は、配列番号 3 9 の配列を含むことができる。一部の事例において、G S G-p 2 a をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 3 9 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % もしくは 1 0 0 % 同一であるか、または配列番号 3 9 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であり得る。

30

40

【0 1 3 3】

リンカーポリペプチドは、本明細書で提供される「f p 2 a」リンカーであり得る。ある特定の実施形態において、f p 2 a リンカーポリペプチドは、配列番号 4 0 と少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であり得る配列を含むことができる。ある特定の場合には、f p 2 a リンカーポリペプチドは、2 つ以上の融合タンパク質を連結する単一のベクターにコードされた 1 つまたは複数のリンカーであり得る。一部の事例において、f p 2 a リンカーポリペプチドは、ポリヌクレオチドオープンリーディ

50

ングフレーム（ORF）核酸配列によってコードされ得る。ある特定の実施形態において、f p 2 a リンカーをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 41 と少なくとも 45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % もしくは 100 % 同一であるか、または配列番号 41 と少なくとも約 45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であり得る。

【0134】

一部の事例において、リンカーは、操作され得る。例えば、リンカーは、疎水性などの化学的特徴を含むように設計され得る。一部の事例において、少なくとも 2 つのリンカー配列によって、同じタンパク質が生成され得る。配列は、配列番号 42 から配列番号 101 までの配列と少なくとも 45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % もしくは 100 % 同一であるか、または配列番号 42 から配列番号 101 までの配列と少なくとも約 45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であり得る。他の事例において、複数のリンカーをベクターにおいて使用することができる。例えば、目的遺伝子（例えば、S100A1、SDF-1 α 、および VEGF165）は、図 20A および図 20B に示されるように、少なくとも 2 つのリンカーによって分離され得る。一部の事例において、遺伝子は、2、3、4、5、6、7、8、9、または最大 10 個のリンカーによって分離され得る。

【0135】

リンカーは、操作されたリンカーであり得る。リンカーを設計する方法は、コンピューターの計算によるものであってもよい。一部の事例において、コンピューターによる計算方法は、グラフィック技法を含むことができる。コンピューターによる計算方法を使用して、データベースに由来する三次元ペプチド構造のライブラリーから適切なペプチドを検索することができる。例えば、Brookhaven Protein Data Bank（PDB）を使用して、リンカーの選択されたアミノ酸間の空間の距離を測ることができる。

【0136】

【表 3 - 1】

表 3: リンカーポリペプチド配列:

配列番号	配列
42	APVKQ
43	GPVKQ
44	VPVKQ
45	IPVKQ
46	MPVKQ
47	APIKQ
48	GPIKQ
49	VPIKQ
50	IPIKQ
51	MPIKQ
52	APAKQ
53	GPAKQ
54	VPAKQ
55	IPAKQ
56	MPAKQ
57	APVRQ
58	GPVRQ
59	VPVRQ
60	IPVRQ
61	MPVRQ
62	APIRQ
63	GPIRQ
64	VPIRQ
65	IPIRQ
66	MPIRQ
67	APARQ
68	GPARQ
69	VPARQ
70	IPARQ

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

【表 3 - 2】

配列番号	配列	
71	MPARQ	
72	APVKN	
73	GPVKN	
74	VPVKN	
75	IPVKN	10
76	MPVKN	
77	APIKN	
78	GPIKN	
79	VPIKN	
80	IPIKN	
81	MPIKN	
82	APAKN	20
83	GPAKN	
84	VPAKN	
85	IPAKN	
86	MPAKN	
87	APVRN	
88	GPVRN	
89	VPVRN	
90	IPVRN	30
91	MPVRN	
92	APIRN	
93	GPIRN	
94	VPIRN	
95	IPIRN	
96	MPIRN	
97	APARN	40
98	GPARN	
99	VPARN	
100	IPARN	
101	MPARN	

【0138】

一部の実施形態は、フリンポリペプチドおよび2 Aポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドであって、フリンポリペプチドおよび2 Aポリペプチ

ドが、少なくとも3つの疎水性アミノ酸を含むポリペプチドリンカーによって結合しているポリヌクレオチドである。一部の事例において、少なくとも3つの疎水性アミノ酸は、グリシン (Gly) (G)、アラニン (Ala) (A)、バリン (Val) (V)、ロイシン (Leu) (L)、イソロイシン (Ile) (I)、プロリン (Pro) (P)、フェニルアラニン (Phe) (F)、メチオニン (Met) (M)、トリプトファン (Trp) (W) からなるリストから選択される。一部の事例において、リンカーは、本明細書に開示された表3に提供される配列を含む。一部の事例において、ポリペプチドリンカーは、1種または複数のGSリンカー配列、例えば、(GS)n (配列番号: 109)、(SG)n (配列番号110)、(SGS)n (配列番号111) および (SGS)n (配列番号112) (nは、0から15までの任意の数であり得る) を含んでもよい。

10

【0139】

ポリペプチド構築物の改善された発現を得る方法であって、第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドを含む前記ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドを提供するステップであって、前記第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドが、配列APVKQ (配列番号42) に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を含むリンカーポリペプチドによって結合される、ステップと、前記ポリヌクレオチドを宿主細胞において発現させるステップであって、前記発現が、配列APVKQ (配列番号42) に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を含むリンカーポリペプチドを有さない対応するポリペプチド構築物と比較して、ポリペプチド構築物の改善された発現をもたらす、発現させるステップとを含む方法が提供される。一部の事例において、リンカーは、本明細書で開示された表3に提供される配列を含む。一部の事例において、ポリペプチドリンカーは、1種または複数のGSリンカー配列、例えば、(GS)n (配列番号109)、(SG)n (配列番号110)、(SGS)n (配列番号111) および (SGS)n (配列番号112) (nは、0から15までの任意の数であり得る) を含んでもよい。一部の事例において、改善された発現は、配列APVKQ (配列番号42) に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を含むリンカーポリペプチドを有さない対応するポリペプチド構築物と比較して、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%高い。

20

【0140】

好ましい実施形態において、本発明の特有の態様が提供され、本発明の構築物によってコードされたポリペプチドの特異的な順番によって可能となる。したがって、本発明の一態様では、S100A1タンパク質を特異的に配置することは、最初に、S100A1に残存する2AテールがS100A1の生物学的活性に干渉しないことが驚くべきことに発見されたので、生物学的に活性なS100A1分子の機能的発現を達成し、可能とする。これに対して、第2の遺伝子としてS100A1を配置することにより、構築物を介して発現した遺伝子の不完全な切断が生じることが発見された。

30

【0141】

したがって、以下の表13に示されるように、質量分析法を使用するpXoX発現の分析により、S100A1が、C末端2Aペプチドの除去をもたらすフリンの切断を示さない唯一のエフェクターであることが示された。よって、SDF1 α またはVEGFに残された2AのC末端テールは存在しない。S100A1のみが存在する2Aリンカーテールを有する。適格な終末のアミノ酸配列は、PGである。終末のPGP配列のGとPの間が切断される。よって、pXoXから発現したS100A1のC末端リンカーテールは、本明細書において「2Aテール」と称される場合のある(N末端)－RAKRAPVKQGS GATNFSLLKQAGDVEENPG－(C末端) (配列番号123) に融合したS101A1ポリペプチドの配列(NからC末端)を含む。例えば、一実施形態において、S100A1の最初のメチオニンから切断されたC末端終末のfp2aリンカーのテールまで、本発明の最初のGOIは、配列：

40

MGSELETAMETLINVFHAHSGKEGDKYKLSKKELKELLQT

50

ELSGFLDAQKD VDAVDKVMKELDENG DGEVDFQEYVVLVA
ALT VACNNFFWENSRAKRAPVKQGS GATNFSLLKQAGDVE
ENPG（配列番号124）を含み、これは、ポリヌクレオチド配列

ATGGGCGAGCGAACTGGAAACCGCCCATGGAGACTTTGATAA
ATGTTTTTCCACGCGCATAGCGGCAAGAGAGGGGACAAAGTA
CAAGCTGTCAAAAAGGAGCTGAAAGAACTGCTGCAGACC
GAATTGAGCGGCTTCTTGGACGCTCAGAAAGATGTCGATG
CCGTCGACAAAGTGATGAAAGAGCTTGACGAGAACGGGTGA
CGGTGAAGTCGATTTTTCAGGAATATGTGGTGTGCTGGTGGCC
GCCCTTACTGTAGCATGCAACCAATTTCTTTTGGGAAAAATT
CACGTGCAAAAGCGTGCACCGGTGAAACAGGGAAGCGGAGC
TACTAACTTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG
GAGAACCCCTGGA（配列番号125）によってコードされる場合があるか、または上記で言及した2Aテールと同じアミノ酸配列、もしくは上記で言及した2Aテールと少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、97%、98%もしくは99%同一であり得るアミノ酸配列もしくは核酸配列をコードするポリヌクレオチドを変性する場合がある。

10

【0142】

しかしながら、本明細書で提示されたデータによって提供されるように、このS100A1テールは「不活性」であり、すなわち、S100A1の機能（生物学的活性）に影響を及ぼさないことが実証された。

20

【0143】

ベクターの修飾

本明細書に記載された方法および組成物に対して有用なポリヌクレオチドベクターは、適正製造規範（GMP）適合性ベクターであり得る。例えば、GMPベクターは、非GMPベクターより純粋であってもよい。一部の事例において、純度は、バイオバーデンによって測定され得る。例えば、バイオバーデンは、ベクター組成物における好気性菌、嫌気性菌、孢子菌、真菌、またはそれらの組合せの有無であり得る。一部の事例において、純粋なベクターは、エンドトキシンが少量であるか、またはエンドトキシンを含まない可能性がある。純度は、二本鎖プライマーウォーキングシーケンスによっても測定され得る。プラスミドの同一性は、ベクターの純度を決定する情報源となり得る。本発明のGMPベクターは、非GMPベクターより10%から99%より高い純度であり得る。GMPベクターは、バイオバーデン、エンドトキシン、シーケエンシング、またはそれらの組合せの存在によって測定すると、非GMPベクターより10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%高い純度となり得る。

30

【0144】

一部の事例において、第1の遺伝子プログラムの終わりのターミネーター配列が使用される。ターミネーター配列により、第2の遺伝子プログラムが開始する前に転写が終結することを確実にすることができる。例えば、発現ベクターは、転写の終結およびmRNAの安定化のために必要な配列を含有してもよい。このような配列は、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'の非翻訳領域から通常利用でき、場合によっては、3'から利用できる。これらの領域は、mRNAの非翻訳部分のポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含有し得る。発現ベクターを含む細胞は、インビボまたはインビトロのいずれかで、所望のポリペプチドの発現をもたらす条件下で成長する。

40

【0145】

一部の事例において、ベクターのポリヌクレオチドによってコードされた第1のポリペプチドの末端において、スペーサー配列を使用することができる。他の事例において、ベ

50

クターの第2の遺伝子の末端において、スパーサー配列を使用することができる。スパーサー配列は、ベクターの第1の遺伝子および第2の遺伝子の後でも使用され得る。

【0146】

目的遺伝子、または目的遺伝子の部分によってコードされたポリペプチドを発現させるために、これらのベクターを使用することができる。遺伝子の部分または遺伝子は、ウイルスまたは非ウイルス性の任意の方法を使用することによって挿入され得る。例えば、方法は、非ウイルスベースの技法であり得る。

【0147】

一部の事例において、ベクターの改変がなされ得る。例えば、改変として、制御された遺伝子の発現を誘導する遺伝子スイッチの付加、順序の変化、および／または組み合わされる心臓のエフェクター遺伝子の選択、プロモーターの置き換え（例えば、強力な、左心室の特異的発現）、およびそれらの組合せを挙げることができる。

【0148】

ある特定の実施形態において、本発明のベクターにおいて、心臓のエフェクターポリペプチドをコードする配列に先行する翻訳開始配列は、Kozakコンセンサス配列を含む。これは、本明細書で与えられる説明において、「Kozak」=「Yes」として示される場合がある。

【0149】

ある特定の実施形態において、本発明のベクターにおいて、心臓のエフェクターポリペプチドをコードする配列に先行する翻訳開始配列は、Kozakコンセンサス配列を含まない。これは、本明細書で与えられる説明において、「Kozak」=「No」として示される場合がある。

【0150】

ある特定の実施形態において、任意の1、2、または3つの心臓のエフェクターポリペプチド（SDF1、s100A1およびVEGF191など）の発現が、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを介して駆動される場合がある。ある特定の場合には、少なくとも2つの遺伝子の発現は等しい。他の事例において、少なくとも2つの遺伝子の発現は等しくない。一部の事例において、上流の遺伝子は、下流の遺伝子よりも高い濃度で発現する場合がある。他の事例において、下流の遺伝子は、上流の遺伝子よりも高い濃度で発現する場合がある。リンカーは、発現レベルを制御するのに関与する場合がある。例えば、切断可能なリンカーは、切断がより効率的であるか、またはより非効率的であるように操作されてもよい。

【0151】

一部の事例において、誘導性プロモーターは、小分子リガンド誘導性2ポリペプチドエクジソン受容体ベース遺伝子スイッチであり得る。一部の事例において、遺伝子スイッチは、これらに限定されないが、以下に記載されたシステムのいずれかに記載されたエクジソンベースの受容体成分から選択され得る：それぞれ、参照によりその全体が組み込まれるPCT/US2001/009050（国際公開第2001/070816号パンフレット）；米国特許第7,091,038号明細書；同第7,776,587号明細書；同第7,807,417号明細書；同第8,202,718号明細書；PCT/US2001/030608（国際公開第2002/029075号パンフレット）；米国特許第8,105,825号明細書；同第8,168,426号明細書；PCT/1J52002/005235（国際公開第2002/066613号パンフレット）；米国特許出願第10/468,200号明細書（米国特許出願公開第20120167239号明細書）；PCT/US2002/005706（国際公開第2002/066614号パンフレット）；米国特許第7,531,326号明細書；同第8,236,556号明細書；同第8,598,409号明細書；PCT/US2002/005090（国際公開第2002/066612号パンフレット）；米国特許第8,715,959号明細書（米国特許出願公開第20060100416）；PCT/US2002/005234（国際公開第2003/027266号パンフレット）；米国特許第7,601,508号明細書

10

20

30

40

50

；同第7，829，676号明細書；同第7，919，269号明細書；同第8，030，067号明細書；PCT/U52002/005708（国際公開第2002/066615号パンフレット）；米国特許出願第10/468，192号明細書（米国特許出願公開第20110212528号明細書）；PCT/US2002/005026（国際公開第2003/027289号パンフレット）；米国特許第7，563，879号明細書；同第8，021，878号明細書；同第8，497，093号明細書；PCT/US2005/015089（国際公開第2005/108617号パンフレット）；米国特許第7，935，510号明細書；同第8，076，454号明細書；PCT/U52008/011270（国際公開第2009/045370号パンフレット）；米国特許出願第12/241，018号明細書（米国特許出願公開第20090136465号明細書）；PCT/US2008/011563（国際公開第2009/048560号パンフレット）；米国特許出願第12/247，738号明細書（米国特許出願公開第20090123441号明細書）；PCT/US2009/005510（国際公開第2010/042189号パンフレット）；米国特許出願第13/123，129号明細書（米国特許出願公開第20110268766号明細書）；PCT/US2011/029682（国際公開第2011/119773号パンフレット）；米国特許出願第13/636，473号明細書（米国特許出願公開第20130195800号明細書）；PCT/US2012/027515（国際公開第2012/122025号パンフレット）；および米国特許出願第14/001，943号明細書（米国特許出願公開第20140308247号明細書）。

【0152】

一部の事例において、エクジソン受容体ベース誘導性遺伝子スイッチ調節の用量調節型制御に使用されるリガンドは、これらに限定されないが、エクジステロイド、例えば、エクジソン、20-ヒドロキシエクジソン、ポナステロンA、ムリステロンAなど、9-cis-レチノイン酸、レチノイン酸の合成類似体、N，N'-ジアシルヒドラジン、例えば、米国特許第6，013，836号明細書；同第5，117，057号明細書；同第5，530，028号明細書；および同第5，378，726号明細書ならびに米国特許出願公開第2005/0209283号明細書および同第2006/0020146号明細書に開示されたもの；米国特許出願公開第2004/0171651号明細書に記載されたオキサジアゾリン；ジベンゾイルアルキルシアノヒドラジン、例えば、欧州特許出願公開第461，809号明細書に開示されたもの；N-アルキル-N，N'-ジアロイルヒドラジン、例えば、米国特許第5，225，443号明細書に開示されたもの；N-アシル-N-アルキルカルボニルヒドラジン、例えば、欧州特許出願公開第234，994号明細書に開示されたもの；N-アロイル-N-アルキル-N'-アロイルヒドラジン、例えば、米国特許第4，985，461号明細書に開示されたもの；アルニドケトン、例えば、米国特許出願公開第2004/0049037号明細書に開示されたもの（文献のそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる）ならびに3，5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシ-N-イソブチル-ベンズアミド、8-O-アセチルハルパギド、オキシステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(s)ヒドロキシコレステロール、25-エポキシコレステロール、T0901317、5-アルファ-6-アルファ-エポキシコレステロール-3-スルフェート(ECHS)、7-ケトコレステロール-3-スルフェート、フラメソル、胆汁酸、1，1-ビホスホネートエステル、幼若ホルモンIIIなどを含む他の同様の材料のいずれかから選択され得る。本発明において有用なジアシルヒドラジンリガンドの例として、RG-115819(3，5-ジメチル-安息香酸-N-(1-エチル-2，2-ジメチル-プロピル)-N'-(2-メチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、RG-115932((R)-3，5-ジメチル-安息香酸-N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、およびRG-115830(3，5-ジメチル-安息香酸-N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)が挙げられる。例えば、両方とも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出願第 1 2 / 1 5 5 , 1 1 1 号明細書、および P C T 出願第 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 0 6 7 5 7 号を参照のこと。

【0153】

一部の実施形態において、目的のポリペプチドを発現する 2 または 3 つの目的遺伝子（例えば、これらに限定されないが、心臓のエフェクター遺伝子）は、単一のプロモーターの制御下で、単一のベクターに組み込まれ、および／またはそれから発現され得る。ある特定の実施形態において、単一のプロモーターは構成的プロモーターである。ある特定の実施形態において、単一のプロモーターは小分子リガンド誘導性エクジソン受容体ベースプロモーターである。

【0154】

ある特定の実施形態において、遺伝子スイッチポリペプチドの発現は、ミオシン軽鎖（M L C）プロモーターの制御下にある。

【0155】

ベクターは、以下に記載するように、対象への投与により、典型的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内注入）または局所投与により、インビボで送達され得る。あるいは、ベクターは、エクスピボで、細胞、例えば、対象から外植された細胞（例えば、心筋細胞、心組織生検）に送達された後、通常はベクターが組み込まれた細胞を選択した後、対象に細胞を再移植され得る。選択の前または後に細胞は増殖され得る。

【0156】

本明細書に記載されたいずれかの核酸送達プラットフォーム、例えば、ヌクレオフェクションまたはエレクトロポレーションを用いる細胞のトランスフェクション効率は、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、99.9 %、または 99.9 % より高いか、約 20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、99.9 %、または 99.9 % より高い場合がある。

【0157】

遺伝子の細胞（例えば、これらに限定されないが、心筋細胞）への組込み効率は、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、99.9 %、または 99.9 % より高いか、約 20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、99.9 %、または 99.9 % より高い場合がある。

【0158】

本明細書に開示されたある特定の態様では、ベクターを利用することができる。例えば、使用できるベクターとして、これらに限定されないが、バクテリアの：p B s、p Q E-9（Q i a g e n）、p h a g e s c r i p t、P s i X 1 7 4、p B l u e s c r i p t S K、p B s K S、p N H 8 a、p N H 1 6 a、p N H 1 8 a、p N H 4 6 a（S t r a t a g e n e）；p T r c 9 9 A、p K K 2 2 3-3、p K K 2 3 3-3、p D R 5 4 O、p R I T 5（P h a r m a c i a）が挙げられる。真核生物の：p W L-neo、p S v 2 c a t、p O G 4 4、p X T 1、p S G（S t r a t a g e n e）p S V K 3、p B P v、p M S G、p S V L（P h a r m i a c i a）。任意の他のプラスミドおよびベクターも、選択された宿主内で複製可能であり生存可能である限り、使用することができる。任意のベクターおよび市販のもの（ならびにそのバリエーションまたは誘導体）は、本方法において使用するための 1 つまたは複数の組換え部位を含むように操作され得る。こ

10

20

30

40

50

のようなベクターは、例えば、Vector Laboratories Inc.、Invitrogen、Promega、Novagen、NEB、Clontech、Boehringer Mannheim、Pharmacia、EpiCenter、OriGenes Technologies Inc.、Stratagene、PerkinElmer、Pharmingen、およびResearch Geneticsから入手することができる。目的の他のベクターとして、真核生物発現ベクター、例えば、pFastBac、pFastBacHT、pFastBacDUAL、pSFV、ならびにpTet-Splice (Invitrogen)、pEUK-C1、pPUR、pMAM、pMAMneo、pBI101、pBI121、pDR2、pCMVEBNA、ならびにpYACneo (Clontech)、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、ならびにpKK232-8 (Pharmacia, Inc.)、p3'SS、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、ならびにpOG44 (Stratagene, Inc.)、ならびにpYES2、pAC360、pBlueBacHis A、B、およびC、pVL1392、pBlueBac111、pCDM8、pcDNA1、pZeoSV、pcDNA3 pREP4、pCEP4、ならびにpEBVHis (Invitrogen, Corp.)、ならびにそれらのバリエーションまたは誘導体が挙げられる。他のベクターとして、pUC18、pUC19、pBlueScript、pSPORT、cosmids、phagemids、YAC (酵母人工染色体)、BAC (バクテリア人工染色体)、P1 (大腸菌 (Escherichia coli) ファージ)、pQE70、pQE60、pQE9 (quagan)、pBSベクター、PhageScriptベクター、BlueScriptベクター、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A (Stratagene)、pcDNA3 (Invitrogen)、pGEX、pTrsfus、pTrc99A、pET-5、pET-9、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)、pSPORT1、pSPORT2、pCMVSPORT2. 0およびpSYSPORT1 (Invitrogen) ならびにそれらのバリエーションまたは誘導体が挙げられる。目的のさらなるベクターとして、InvitrogenからのpTrxFus、pThioHis、pLEX、pTrcHis、pTrcHis2、pRSET、pBlueBacHis2、pcDNA3. 1/His、pcDNA3. 1 (-)/Myc-His、pSectag、pEBVHis、pPIC9K、pPIC3. 5K、pA081S、pPICZ、pPICZA、pPICZB、pPICZC、pGAPZA、pGAPZB、pGAPZC、pBlueBac4. 5、pBlueBacHis2、pMelBac、pSinRep5、pSinHis、pIND、pIND (SP1)、pVgRXXR、pcDNA2. 1、pYES2、pZER01. 1、pZER0-2. 1、pCR-Blunt、pSE280、pSE380、pSE420、pVL1392、pVL1393、pCDM8、pcDNA1. 1、pcDNA1. 1/Amp、pcDNA3. 1、pcDNA3. 1/Zeo、pSe、SV2、pRc/CMV2、pRc/RSV、pREP4、pREP7、pREP8、pREP9、pREP 10、pCEP4、pEBVHis、pCR3. 1、pCR2. 1、pCR3. 1-Uni、およびpCRBac; PharmaciaからのX-ExCell、X-gt11、pTrc99A、pKK223-3、pGEX-1XT、pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-4T-1、pGEX-4T-2、pGEX-4T-3、pGEX-3X、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2、pGEX-5X-3、pEZ18、pRIT2T、pMC1871、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、pKK232-8、pSL1180、pNEO、およびpUC4K; NovagenからのpSCREEN-1b (+)、pT7Blue (R)、pT7Blue-2、pCITE-4-abc (+)、pOCUS-2、pTAg、pET-32LIC、pET-30LIC、pBAC-2 cp LIC、pBACgus-2 cp LIC、pT7Blue-2 LIC、pT7Blue-2、X-SCREEN-1、X-BlueSTAR、pET-3abcd、pET-7abc、pET9abcd、pET11abcd、pET12abc、pET-14b、pET-15

10

20

30

40

50

b、pET-16b、pET-17b-pET-17xb、pET-19b、pET-20b(+)、pET-21abcd(+)、pET-22b(+)、pET-23abcd(+)、pET-24abcd(+)、pET-25b(+)、pET-26b(+)、pET-27b(+)、pET-28abc(+)、pET-29abc(+)、pET-30abc(+)、pET-31b(+)、pET-32abc(+)、pET-33b(+)、pBAC-1、pBACgus-1、pBAC4x-1、pBACgus4x-1、pBAC-3cp、pBACgus-2cp、pBACsurf-1、p1g、Signalp1g、pYX、SelectaVecta-Neo、SelectaVecta-Hyg、およびSelectaVecta-Gpt;ClontechからのpLexA、pB42AD、pGBT9、pAS2-1、pGAD424、pACT2、pGADGL、pGADGH、pGAD10、pGilda、pEZM3、pEGFP、pEGFP-1、pEGFPN、pEGFP-C、pEBFP、pGFPuv、pGFP、p6xHis-GFP、pSEAP2-Basic、pSEAP2-Contral、pSEAP2-Promoter、pSEAP2-Enhancer、p13gal-Basic、p13gal-Control、p13gal-Promoter、p13gal-Enhancer、pCMV、pTet-Off、pTet-On、pTK-Hyg、pRetro-Off、pRetro-On、pIRES1neo、pIRES1hyg、pLXSN、pLNCX、pLAPSN、pMAMneo、pMAMneo-CAT、pMAMneo-LUC、pPUR、pSV2neo、pYEX4T-1/2/3、pYEX-S1、pBacPAK-His、pBacPAK8/9、pAcUW31、BacPAK6、pTriplex、2Xgt10、Xgt11、pWE15、およびXTriplex;StratageneからのLambdaZAPII、pBK-CMV、pBK-RSV、pBluescriptIIKS+/−、pBluescriptIISK+/−、pAD-GAL4、pBD-GAL4Cam、pSurfscript、LambdaFIXII、LambdaDASH、LambdaEMBL3、LambdaEMBL4、SuperCos、pCR-ScriptAmp、pCR-ScriptCam、pCR-ScriptDirect、pBS+/−、pBCKS+/−、pBCKS+/−、Phagescript、pCAL-n-EK、pCAL-n、pCAL-c、pCAL-kc、pET-3abcd、pET-11abcd、pSPUTK、pESP-1、pCMVLacI、pOPRSVI/MCS、pOPI3CAT、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMClneo、pMClneoPolyA、pOG44、pOG45、pFRTI3GAL、pNEOI3GAL、pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pRS413、pRS414、pRS415、およびpRS416、pPC86、pDBLeu、pDBTrp、pPC97、p2.5、pGAD1-3、pGAD10、pACT、pACT2、pGADGL、pGADGH、pAS2-1、pGAD424、pGBT8、pGBT9、pGAD-GAL4、pLexA、pBD-GAL4、pHISi、pHISi-1、placZi、pB42AD、pDG202、pJK202、pJG4-5、pNLexA、pYESTrp、ならびにそれらのバリエーションまたは誘導体も挙げることができる。

【0159】

療法の指標

対象における血管発生を改善するための方法および組成物が本明細書で提供される。心血管疾患に対する処置のための方法および組成物も提供される。一部の事例において、心血管疾患は心筋症であり得る。心筋症は、病理学的に異常な心筋によって定義され得る。心筋症の4つの主要な分類が存在する：拡張型(DCM)、肥大型(HCM)、拘束型(RCM)、および不整脈原性RV(ARVC)。本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターを使用して、遺伝子治療を使用して心筋症を処置することができる。一部の事例において、少なくとも1つの追加の療法もまた、遺伝子治療の処置の前、間、後、またはその任意の組合せで投与される。

【0160】

一部の事例において、ポリペプチドを本明細書に記載されたポリヌクレオチド配列に組み込むことができ、障害を有するかまたは血管発生の改善を必要とする対象に導入することができる。例えば、対象は、心筋症障害を有する場合があり、この障害を処置するために、本明細書に記載されたポリヌクレオチドの投与により処置され得る。一部の事例において、本明細書に記載された遺伝子またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、遺伝子治療によって導入することができる。心筋症を有する対象に導入され得る遺伝子およびポリペプチドとして、例えば、以下のものを挙げることができる：ATP-結合カセット、サブファミリーC、メンバー9（ABCC9）、アクチン、 α 、心筋1（ACTC1）、アクチニン、 α 2（ACTN2）、アンキリン反復ドメイン1（心筋）（ANKRD1）、BCL2-関連アタノジーン3（BAG3）、カルセケストリン2（心筋）（CASQ2）、カベオリン3（CAV3）、COX15ホモログ、シトクロムcオキシダーゼアセンブリタンパク質（COX15）、クリスタリン α Bシステインおよびグリシンリッチタンパク質3（CRYAB）、システインおよびグリシンリッチタンパク質3（CSR3）、カルジオトロフィニン1（CTF1）、デスミン（DES）、ジストロフィニン（DMD）、DnaJ（Hsp40）ホモログ、サブファミリーC、メンバー19（DNAJC19）、デスモコリン2（DSC2）、デスモグレイン2（DSG2）、デスモプラキン（DSP）、ジストロブレピン、 α （DTNA）、エメリン（EMD）、Eye absentホモログ4（EYA4）、4.5 LIMドメイン2（FHL2）、フクチン（FKTN）、フォークヘッドD4（FOXO4）、ガラクトシダーゼ、 α （GLA）、ジャンクションプラコグロビン（JUP）、ラミニン、 α 4（LAMA4）、リソソーム関連膜タンパク質2（LAMP2）、LIMドメイン結合3（LDB3）、Lamin A/C（LMNA）、ミオシン結合タンパク質C、心臓（MYBPC3）、ミオシン、重鎖6、心筋、 α （MYH6）、ミオシン、重鎖7、心筋、 α （MYH7）、ミオシン、軽鎖2、調節性、心臓、遅筋型（MYH12）、ミオシン、軽鎖3、アルカリ；心室性、骨格、遅筋型（MYL3）、ミオシン軽鎖キナーゼ2（MYLK2）、ミオゼニン2（MYOZ2）、ネキシリン（Fアクチン結合タンパク質）（NEXN）、プラコフィリン2（PKP2）、ホスホランバン（PLN）、タンパク質キナーゼ、AMP-活性化、 γ 2、非触媒性サブユニット（PRKAG2）、プレゼニリン1（PSEN1）、プレゼニリン2（PSEN2）、RNA結合モチーフタンパク質20（RBM20）、リアノジン受容体2（心臓）（RYR2）、ナトリウムチャネル、電位作動型、タイプV、 α サブユニット（SCN5A）コハク酸脱水素酵素複合体、サブユニットA、フラビントタンパク質（SDHA）、サルコグリカン、 δ （SGCD）、スペクトリン反復含有、核エンベロップ1（SYNE1）、スペクトリン反復含有、核エンベロップ2（SYNE2）、タファジン（TAZ）、チチン-キャップ（テレットニン）（TCAP）、膜貫通タンパク質43（TMEM43）、チモポエチン（TMPO）、トロポニンCタイプ1（遅筋型）（TNNC1）、トロポニンIタイプ3（心臓）（TNNI3）、トロポニンTタイプ2（心臓）（TNN2）、トロポミオシン1（ α ）チチン（TPM1）、トランスサイレチン（TTR）、チチン（TTN）、ビンクリン（VCL）、およびそれらの部分の任意の組合せ。心血管状態の処置および／または血管発生の改善のために導入され得るポリペプチドまたは遺伝子は、VEGF、SDF1、S100A1、もしくはその部分またはそれらの組合せであり得る。

【0161】

本明細書で開示されたリンカー構築物によって結合した機能性ポリペプチドを含むポリヌクレオチド構築物が本明細書で提供される。対象に、本明細書に記載されたポリヌクレオチド、またはそれによってコードされたポリペプチド、またはそのコンジュゲートもしくは誘導体を使用することまたは投与するステップを含む、処置、診断および他の療法目的のための方法も提供される。開示された方法および組成物は、疾患および状態の処置のために適用されてもよい。状態の例はがんであり得る。がんまたは悪性腫瘍として、これらに限定されないが、急性小児リンパ芽球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性リン

10

20

30

40

50

パ性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、成人（原発性）肝細胞がん、成人（原発性）肝がん、成人急性リンパ性白血病、成人急性骨髄性白血病、成人ホジキンリンパ腫、成人リンパ性白血病、成人非ホジキンリンパ腫、成人原発性肝がん、成人軟部組織肉腫、エイズ関連リンパ腫、エイズ関連悪性腫瘍、肛門がん、星状細胞腫、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳がん、腎盂尿管がん、中枢神経系（原発性）リンパ腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫、子宮頸がん、小児（原発性）肝細胞がん、小児（原発性）肝がん、小児急性リンパ芽球性白血病、小児急性骨髄性白血病、小児脳幹神経膠腫、小児小脳星状細胞腫、小児大脳星状細胞腫、小児頭蓋外胚細胞腫瘍、小児ホジキン病、小児ホジキンリンパ腫、小児視床下部および視覚路神経膠腫、小児リンパ芽球性白血病、小児髓芽腫、小児非ホジキンリンパ腫、小児松果体およびテント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児原発性肝がん、小児横紋筋肉腫、小児軟部組織肉腫、小児視経路および視床下部神経膠腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸がん、皮膚T細胞リンパ腫、内分泌膵島細胞癌、子宮内膜がん、上衣腫、上皮がん、食道がん、ユーイング肉腫および関連する腫瘍、膵外分泌がん、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼がん、女性乳がん、ゴーシェ病、胆嚢がん、胃がん（gastric cancer）、胃腸カルチノイド腫瘍、胃腸腫瘍、胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛腫瘍、毛様細胞性白血病、頭頸部がん、肝細胞がん、ホジキンリンパ腫、高ガンマグロブリン血症、下咽頭がん、腸がん、眼球内黒色腫、膵島細胞癌、島細胞膵がん、カポジ肉腫、腎がん、喉頭がん、唇および口腔がん、肝がん、肺がん、リンパ増殖性障害、マクログロブリン血症、男性乳がん、悪性中皮腫、悪性胸腺腫、髓芽腫、黒色腫、中皮腫、転移性原発不明扁平上皮性頸部がん、転移性原発性扁平上皮性頸部がん、転移性扁平上皮性頸部がん、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫／形質細胞腫、骨髄異形成症候群、ミエロイド性白血病、骨髄性白血病、骨髄増殖性障害、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽腔がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非黒色腫皮膚がん、非小細胞肺がん、原発不明転移性扁平上皮性頸部がん、中咽頭がん、骨線維肉腫／悪性線維性肉腫、骨肉腫／悪性線維性組織球腫、骨の骨肉腫／悪性線維性組織球腫、卵巣上皮がん、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵がん、パラプロテイン血症、紫斑病、副甲状腺がん、陰茎がん、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性肝がん、前立腺がん、直腸がん、腎細胞がん、腎盂および尿管のがん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、サルコイドーシス肉腫、セザリー症候群、皮膚がん、小細胞肺がん、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮性頸部がん、胃がん（stomach cancer）、テント上原始神経外胚葉性および松果体腫瘍、T細胞リンパ腫、精巣がん、胸腺腫、甲状腺がん、腎盂および尿管の移行細胞がん、腎盂尿管移行上皮がん、絨毛性腫瘍、尿管および腎盂細胞のがん、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、視経路および視床下部膠腫、外陰がん、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍、ならびに上に列挙した器官系に位置する、新生物を除く、任意の他の過剰増殖性疾患を挙げることができる。

【0162】

本明細書で開示されたリンカーポリペプチドによって結合された機能性ポリペプチドは、本明細書に記載された方法および組成物において有用である場合があり、悪性または前悪性の状態を処置し、これらに限定されないが、上述の障害を含む新生物性または悪性の状態の進行を防止するために使用してもよい。このような使用は、上記の新生物またはがんへの進行が知られたかまたは疑われる状態において、特に、過形成、化生からなる非新生物性細胞成長、または、とりわけ異形成が起こった場合に必要とされる。異形成はがんの前兆であることが多く、主に、上皮中に見出される。異形成は、非新生物性細胞成長の最も無秩序な形態であり、個々の細胞の均一性、および細胞の構造的配向の喪失を伴う。異形成は、慢性の刺激または炎症が存在する場所で発生することを特徴とする。処置することができる異形成障害として、これらに限定されないが、無汗性外胚葉異形成、前後異形成、窒息性胸郭異形成、心房指異形成、気管支肺異形成、脳異形成、子宮頸部異形成、軟骨外胚葉異形成、鎖骨頭蓋異形成、先天性外胚葉異形成、頭蓋骨幹異形成、頭蓋手根足根骨異形成、頭蓋骨幹端異形成、象牙質異形成、骨幹異形成、外胚葉異形成、エナメル質

10

20

30

40

50

異形成、脳眼異形成、半肢骨端異形成、多発性骨端異形成、点状骨端異形成、上皮異形成、顔面指趾生殖器異形成、下顎の家族性線維性異形成、家族性白色癩性異形成、線維筋性異形成、線維性骨異形成、開花性骨異形成、遺伝性腎一網膜異形成、発汗性外胚葉異形成、発汗減少症性外胚葉異形成、リンパ球減少性胸腺異形成、乳腺異形成、下顎顔面異形成、骨幹端異形成 (metaphysical dysplasia)、モンディーニ型内耳異形成、単骨性線維性骨異形成、粘膜上皮異形成、多発性骨端異形成、眼耳脊椎異形成、眼歯指異形成、眼脊椎異形成、歯原性異形成、眼下顎四肢異形成、根尖性セメント質異形成、多発性線維性骨異形成、偽軟骨發育不全脊椎骨端異形成、網膜異形成、中隔視神経異形成、脊椎骨端異形成、および心室横骨異形成が挙げられる。処置することができるさらなる前新生物性障害として、これらに限定されないが、良性異常増殖性障害（例えば、良性腫瘍、線維嚢胞性病態状態、組織肥大、腸ポリープまたはアデノーマ、および食道異形成）、白板症、角化症、ボーエン病、農夫皮膚、太陽性口唇炎、および日光角化症が挙げられる。一部の実施形態において、本明細書で開示されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド構築物は、本明細書で開示されたリンカーによって結合された少なくとも2つの機能性ポリペプチドを含み、がん、特に上に列挙したがんの成長、進行、および／または転移を阻害するために使用される。さらなる過剰増殖性疾患、障害、および／または状態として、これらに限定されないが、悪性腫瘍および関連する障害、例えば、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄球白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病を含む））および慢性白血病（例えば、慢性骨髄球（顆粒球性）白血病および慢性リンパ性白血病）を含む）、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーママクログロブリン血症、重鎖病、ならびに肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺腫、皮脂腺腫、乳頭腫、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝がん、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、希突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫を含むがこれらに限定されない固形腫瘍の進行、および／または転移が挙げられる。

【0163】

一部の実施形態において、本明細書で開示されたリンカーによって結合された少なくとも2つの機能性ポリペプチドを含む、本明細書で開示されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド構築物は、これらに限定されないが、クラスIII自己免疫疾患、例えば、急性特発性血小板減少性紫斑病および慢性特発性血小板減少性紫斑病などの免疫媒介性血小板減少、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、多発性硬化症、シデナム舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、糖尿病、ヘノッホーシェンライン紫斑病、レンサ球菌感染後の腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、アジソン病、関節リウマチ、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多型性紅斑、IgA腎症、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチュア症候群、閉塞性血栓血管炎、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活動性肝炎、関節リウマチ、多発性筋炎／皮膚筋炎、胆汁過多、尋常性天疱瘡、ヴェグナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨大細胞動脈炎／多筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎および線維化性肺炎、および若年性糖尿病を含む、免疫調節異常疾患および関連自己免疫疾患を含む疾患を処置するために使用される。

【0164】

一部の実施形態において、本明細書で開示されたリンカーによって結合された少なくとも2つの機能性ポリペプチドを含む、本明細書で開示されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド構築物は、感染性疾患を処置するために使用される。感染性疾患

10

20

30

40

50

は、バクテリア、リケッチア、マイコプラズマ、プロトゾア、真菌、ウイルス、寄生虫、または他の微生物剤などの病原体による感染であり得る。例としては、A I D Sの原因であるヒト免疫不全ウイルス (H I V)、結核のマイコバクテリウム、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、レジオネラ・ニューモフィリア (*Legionella pneumophila*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ナイセリア・ゴノレー (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、クリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラスマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、ヘモフィリスインフルエンザ B (*Hemophilis influenzae B*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、ライム病スピロヘータ (*Lyme disease spirochetes*)、ウエストナイルウイルス (*West Nile virus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、らい菌 (*Mycobacterium leprae*)、ウシ流産菌 (*Brucella abortus*)、狂犬病ウイルス (*rabies virus*)、インフルエンザウイルス (*influenza virus*)、サイトメガロウイルス (*cytomegalovirus*)、単純ヘルペスウイルス (*herpes simplex virus*) I、単純ヘルペスウイルス (*herpes simplex virus*) I I、ヒト血清パルボ様ウイルス (*human serum parvo-like virus*)、呼吸器合胞体ウイルス (*respiratory syncytial virus*)、水痘帯状疱疹ウイルス (*varicella-zoster virus*)、B型肝炎ウイルス (*hepatitis B virus*)、C型肝炎ウイルス (*hepatitis C virus*)、麻疹ウイルス (*measles virus*)、アデノウイルス (*adenovirus*)、ヒト T 細胞白血病ウイルス (*human T-cell leukemia virus*)、エプスタイン・バーウイルス (*Epstein-Barr virus*)、マウス白血病ウイルス (*murine leukemia virus*)、ムンプスウイルス (*mumps virus*)、水疱性口内炎ウイルス (*vesicular stomatitis virus*)、シンドビスウイルス (*sindbis virus*)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (*lymphocytic choriomeningitis virus*)、疣ウイルス (*wart virus*)、ブルータングウイルス (*blue tongue virus*)、センダイウイルス (*Sendai virus*)、ネコ白血病ウイルス (*feline leukemia virus*)、レオウイルス (*reo virus*)、ポリオウイルス (*polio virus*)、シミアンウイルス (*simian virus*) 40、マウス乳がんウイルス (*mouse mammary tumor virus*)、デングウイルス (*dengue virus*)、風疹ウイルス (*rubella virus*)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*)、ランゲルトリパノソーマ (*Trypanosoma rangeli*)、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*)、ローデシアトリパノソーマ (*Trypanosoma rhodesiense*)、ブルーストリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*)、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*)、ウシバベシア (*Babesia bovis*)、鶏盲腸コクシジウム (*Elmeria tenella*)、回旋糸状虫 (*Onchocerca volvulus*)、熱帯リーシュマニア (*Leishmania tropica*)、旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)、タイレリア・パルバ (*Theileria parva*)、胞状条虫 (*Taenia hydatigena*)、ヒツジ条虫 (*Taenia ovis*)、無鉤条虫 (*Taenia saginata*)、単包条虫 (*Echinococcus granulosus*)、メソセストイド・コルチ (*Mesocestoides corti*)、マイコプラズマ・アルスリチジス (*Mycoplasma arthritidis*)、マイコプラズマ・ヒオルヒニス (*M. hyorhinis*)、マイコプラズマ・オラレ (*M. orale*)、マイコプラズマ・アルギニニ (*M. arginini*)、アコレプラズマ・ライドラウィー (*Acholeplasma laidlawii*)、マイコプラズマ・サリバリウム (*M. salivarium*) および肺炎マイコプラズマ (*M. pneumoniae*) が挙げられる。

【0165】

一部の実施形態において、本明細書で開示されたリンカーによって結合された少なくとも2つの機能性ポリペプチドを含む、本明細書で開示されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド構築物は、化学療法剤とコンジュゲーションして、または化学療法剤に加えて、または化学療法剤と同時に使用される。「化学療法剤」または「化学療法化合物」およびその文法上の同義語は、本明細書で使用される場合、がんの処置において有用な化学化合物であり得る。

【0166】

遺伝子治療に有用なポリヌクレオチドによってコードされた遺伝子およびポリペプチドは、連続して、同時に、またはその組合せによって、対象に導入され得る。対象に投与される遺伝子およびポリペプチドは、単一のポリヌクレオチドベクター上か、または別々のポリヌクレオチドベクター上に存在し得る。一部の事例において、多重遺伝子ベクターは、単一のベクター構築物を使用して多重遺伝子を導入するために使用される。

【0167】

本明細書に記載されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド構築物

本明細書に記載されたポリペプチド構築物を利用して、対象における心血管疾患を処置し、および／または血管発生を改善することができる。例えば、心血管療法に対する分子標的は、VEGF-A、FGF4、筋小胞体Ca²⁺ ATPase、S100A1、ベーターアドレナリン受容体、アデニルルースクラゼ6、またはそれらの組合せであり得る。一部の事例において、心血管遺伝子治療で導入される遺伝子は、SDF1、S100A1、VEGF191、またはそれらの任意の組合せであり得る。

【0168】

S100は、細胞内調節活性に関係するCa^βによってモジュレートされるタンパク質のファミリーの部分である。S100A1は、心臓で最も豊富なS100タンパク質アイソフォームであり得る。S100A1は、リアノジン受容体(RYR)とSERCA2aの両方の活性を強化することによって、心臓の収縮および弛緩機能を促進することができる。

【0169】

S100は、ベーターアドレナリン刺激とは無関係に、心筋細胞Ca²⁺の恒常性および筋フィラメント機能のモジュレーションを介して、顕著なイオンチャネルの作用を発揮することができる。S100A1は、Ca²⁺から独立した方式で、RYRと相互作用することができる。SERCA2a-PLN複合体を安定化させる。S100A1は、Ca²⁺の弛緩性の漏出を減少させることもでき、心臓のチチンおよびミトコンドリアF1-ATPaseに影響を及ぼす。

【0170】

一部の実施形態において、血管新生ポリペプチドまたは遺伝子は、本明細書に記載された心血管療法または血管発生を改善のために利用することができる。VEGF-A165、アンジオポエチン、FGF、126、HIF-1α26、またはそれらの組合せなどの血管新生成長因子をコードするポリヌクレオチドの投与。これらのポリペプチドは、慢性重症虚血肢、心筋虚血症、アンギーナ、または末梢動脈閉塞性疾患などの虚血関連状態における側副血管の発生を促進させることができる。血管新生因子は、新たな血管網の形成を誘導することもでき、急性冠動脈症候群および末梢血管疾患を処置するための適切な療法の選択肢となり得る。いくつかのタイプの血管新生因子は、心血管疾患に対する療法の適用において調査された様々な特性を示す可能性がある。例えば、VEGFおよびVEGFのサブタイプを使用することができる。VEGFのサブタイプは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、胎盤成長因子(PLGF)、またはそれらの組合せを含む場合がある。これらの因子のいくつかによって、別個のアイソフォームも得られる。これらのVEGFサブタイプの細胞内シグナルは、3つの異なるチロシンキナーゼ受容体：VEGFR1、VEGFR2、およびVEGFR3によって、主に媒介され得る。これらのVEGFサブタイプとその同種の細胞受容体の間の特異的な相互作用によって、内皮細胞および心筋細胞における差次的な細胞応答が惹起され得る。一部の事例において、VEGF-A、VEGF-A165のアイソフォームは、血管新生性が高い。VEGF-A165は、VEGFR1およびVEGFR2と相互作用し得る。内皮細胞におけるVEGF-A165のVEGFR1との相互作用は、新たに形成された血管の血管安定性に寄与し得る。内皮細胞におけるVEGFR2との相互作用によって、血管新生、血管発生、および動脈形成、血管拡張、細胞生存、および細胞膜透過性の増大が誘導され得る。新たに形成された心筋細胞におけるVEGFR2の活性化によって、抗アポトーシスタン

10

20

30

40

50

パク質の発現が増大され、アポトーシス促進タンパク質の発現が低減され得る。一部の事例において、VEGFR2の活性化によって、虚血領域における局所的な心臓幹細胞の動員が誘導され得る。

【0171】

血管新生促進因子または遺伝子は、本発明のベクターと共に発現され得る。例えば、血管新生促進因子は、VEGF、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、または形質転換成長因子 $\beta-1$ (TGF $\beta-1$)、酸性線維芽細胞成長因子、アンジオゲニン、肝細胞成長因子、インターロイキン-8、胎盤成長因子、血小板由来成長因子、プレイオトロピン、プロリフェリン、腫瘍壊死因子- α 、およびそれらの任意の組合せであり得る。

【0172】

一部の事例において、本発明の心臓発現ベクターに使用され、組み込まれる心臓のエフェクター遺伝子またはポリペプチドは、SDF1、S100A1およびVEGF191のうちのいずれか1つから選択され得る。ある特定の場合には、本発明の心臓発現ベクターは、ベクターにおける順番の任意の組合せで、SDF1、S100A1およびVEGF191から選択される任意の2つの遺伝子を含むかまたはこれらからなる。ある特定の実施形態において、心臓発現ベクターは、ベクターにおける順番の任意の組合せで、SDF1、S100A1およびVEGF191をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0173】

ある特定の実施形態において、SDF1をコードする配列は、SDF1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態において、SDF1ポリペプチドは、配列番号102と少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一である。ある特定の場合には、SDF1をコードする配列は、SDF1コドン最適化オープンリーディングフレーム(ORF)、配列番号103を含む。

【0174】

ある特定の実施形態において、SDF1をコードするポリヌクレオチドは、配列番号103と少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一である。

【0175】

ある特定の場合には、S100A1をコードする配列は、S100A1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態において、S100A1ポリペプチドは、配列番号104と少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一である。ある特定の実施形態において、S100A1をコードする配列は、S100A1オープンリーディングフレーム(ORF)を含むかまたはこれらからなる。ある特定の場合には、S100A1をコードするポリヌクレオチドは、配列番号105と少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一である。

【0176】

ある特定の実施形態において、VEGF191をコードする配列は、VEGF191ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。ある特定の実施形態において、VEGF191ポリヌクレオチドは、配列番号106と少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一である。

【0177】

ある特定の場合には、VEGF191をコードする配列は、VEGF191オープンリーディングフレーム(ORF)を含むことができる。ある特定の実施形態において、VEGF191をコードするポリヌクレオチドは、配列番号107と少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一である。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 8 】

【 表 4 - 1 】

表 4: ポリペプチド配列およびポリヌクレオチド配列

配列 番号	遺伝子名	配列(5'から 3')
102	SDF-1 アル ファ	MNAKVVVVLVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARA NVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLE KALNK
103	SDF-1 アル ファ	ATGAATGCCAAGGTCGTTGTGGTGCTTGTACTTGTGCTGAC TGCTCTGTGTCTGAGCGACGGAACAGTCTCCCTCAGCT ACAGGTGCCCATGCCGATTCTTCGAATCTCATGTGGCCCGG GCCAATGTGAAGCACTTGAAAATCCTGTCTTCGAATCTCAT GTGGCCCGGGCCAATGTGAAGCACTTGAAAATCCTGAATA CACCCAAGTGCAGCGTTGCAGATCGTGGCCCGCCTGAAAAA TAATAATAGGCAGGTATGTATCGATCCAAAGCTTAAGTGG ATCCAGGAGTATCTGGAAAAGGCTCTCAATAAA
104	S100A1	MGSELETAMETLINVFHAHSGKEGDKYKLSKKELKELLQTEL SGFLDAQKDVAVDKVMKELDENG DGEVDFQEYVVLVAAL TVACNNFFWENS
105	S100A1	ATGGGCAGCGAACTGGAAACCGCCATGGAGACTTTGATAA ATGTTTTCCACGCGCATAGCGGCAAAGAAGGGGACAAAGTA CAAGCTGTCAAAAAAGGAGCTGAAAGAACTGCTGCAGACC GAATTGAGCGGCTTCCTGGACGCTCAGAAAGATGTCGATG CCGTCGACAAAGTGATGAAAGAGCTTGACGAGAACGGTGA CGGTGAAGTCGATTTTCAGGAATATGTGGTGCTGGTGGCCG CCCTTACTGTAGCATGCAACAATTTCTTTTGGGAAAATTCA
106	VEGF191 (この配列の アミノ酸 27 ～191 は VEGF165 を 形成する)	MNFLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHE VVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRC GGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHN KCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNT DSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

10

20

30

40

【 0 1 7 9 】

【表 4 - 2】

配列 番号	遺伝子名	配列(5'から 3')
107	VEGF191	ATGAATTTTCTGCTCTCTTGGGTGCACTGGTCACTGGCACT GCTGCTGTATCTGCACCATGCAAAATGGTCCCAAGCAGCTC CCATGGCAGAGGGAGGTGGACAGAATCATCATGAGGTTGT CAAATTTATGGATGTCTACCAGCGGAGCTACTGCCACCCAA TTGAGACGTTGGTAGACATTTTTTCAGGAATATCCAGACGAG ATTGAGTACATTTTCAAGCCTAGCTGTGTGCCCTTGATGCG ATGCGGTGGCTGTTGCAATGATGAGGGACTCGAGTGTGTC CCCACCGAGGAAAGCAATATAACCATGCAAATCATGCGAA TCAAACCCCACCAGGGCCAGCATATCGGCGAGATGTCTTTC TTGCAACATAACAAATGCGAGTGTCTGGCCAAAGAAGGACA GGGCTCGCCAGGAAAATCCCTGTGGTCCTTGTTTCAGAGCGC AGGAAGCATCTTTTCGTCCAGGATCCGCAGACTTGTAATG TTCATGCAAGAATACCGATTCTAGGTGTAAGGCGAGGCAA CTCGAGCTTAACGAGAGAACCTGTAGGTGTGACAAACCTA GAAGA
126	VEGF165 (予測された 成熟形態;す なわち、 VEGF191 マ イナスシグ ナルペプチ ド)	APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDE IEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPH QGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLF VQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

10

20

30

【表 4－3】

配列 番号	遺伝子名	配列(5'から 3')
127	VEGF165 (予測された 成熟形態;す なわち、 VEGF191 マ イナスシグ ナルペプチ ドをコード する)	GCTCCCATGGCAGAGGGAGGTGGACAGAATCATCATGAGG TTGTCAAATTTATGGATGTCTACCAGCGGAGCTACTGCCAC CCAATTGAGACGTTGGTAGACATTTTTTCAGGAATATCCAGA CGAGATTGAGTACATTTTCAAGCCTAGCTGTGTGCCCTTGA TGCGATGCGGTGGCTGTTGCAATGATGAGGGACTCGAGTG TGTCCCCACCGAGGAAAGCAATATAACCATGCAAATCATG CGAATCAAACCCCACCAGGGCCAGCATATCGGCGAGATGT CTTTCTTGCAACATAACAAATGCGAGTGTCGGCCAAAGAA GGACAGGGCTCGCCAGGAAAATCCCTGTGGTCCTTGTTCA GAGCGCAGGAAGCATCTTTTCGTCCAGGATCCGCAGACTT GTAAATGTTTCATGCAAGAATACCGATTCTAGGTGTAAGGC GAGGCAACTCGAGCTTAACGAGAGAACCTGTAGGTGTGAC AAACCTAGAAGA

【0181】

医薬組成物および製剤：

全体を通して記載された組成物は、医薬品への製剤となり、疾患、例えば、心血管疾患を有すると診断された、それを必要とするヒトまたは哺乳動物を処置するために使用することができる。一部の実施形態において、本明細書に記載された心血管療法または血管発生の改善のために利用された、本明細書に記載された組成物。これらの医薬は、1つまたは複数のベクターと同時投与され得る。

【0182】

操作されたCRISPR、TALEN、Argonaut、トランスポゾン系、ZEN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL分子、トランスポゾンおよび／またはトランスジーンをコードする核酸を含有するウイルスまたは非ウイルスベクターを含む、本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターは、インピボで細胞のトランスフェクションまたは形質導入に関する生物に直接投与することもできる。あるいは、本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むネイキッドDNAまたはmRNAを投与することもできる。投与は、分子を血液または組織細胞と最終的に接触させるよう導入するために通常使用される任意の経路によるものであり、これらに限定されないが、注射、注入、局所投与およびエレクトロポレーションが挙げられる。1つ以上の経路を使用して、特定の組成物を投与することもできる。薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物、および組成物を投与するために使用される特定の方法によって、部分的に決定される。

【0183】

一部の事例において、本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターは、第2の療法と併せて、または別々に、それを必要とする対象に投与することができる。第2の療法は、血管発生、肺高血圧の改善のための薬剤、アルドステロン受容体アンタゴニスト、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体ブロッカー、アンジオテンシン受容体ブロッカーおよびネプリライシンの阻害剤、抗アドレナリン薬、中枢作用性抗アドレナリン薬、末梢作用性抗アドレナリン薬、抗不整脈剤、I群抗不整脈剤、II群抗不整脈薬、III群抗不整脈薬、IV群抗不整脈薬、V群抗不整脈薬、抗コリン性変時性

薬、抗高血圧薬の組合せ、カルシウムチャネル遮断薬を伴うACE阻害剤、チアジドを伴うACE阻害剤、カルシウムチャネルブロッカーを伴うアンジオテンシンII阻害剤、チアジドを伴うアンジオテンシンII阻害剤、チアジドを伴う抗アドレナリン薬（中枢）、チアジドを伴う抗アドレナリン薬（末梢）、チアジドを伴うベータブロッカー、チアジドを伴うカリウム保持性利尿薬、ベータアドレナリン遮断薬、心選択性ベータブロッカー、非心選択性ベータブロッカー、カルシウムチャネル遮断薬、カテコールアミン、利尿薬、炭酸脱水酵素阻害剤、ループ利尿薬、カリウム保持性利尿薬、チアジド利尿薬、変力剤、末梢血管拡張薬、レニン阻害剤、硬化剤、血管拡張薬、バソプレッシンアンタゴニスト、昇圧薬であり得る。

【0184】

10

抗血管新生剤は、本明細書に記載されたポリヌクレオチドと併せて使用することもできる。開示された方法および組成物において使用するのに適する抗血管新生剤として、ヒト化およびキメラ抗体を含む抗VEGF抗体、抗VEGFアプタマーおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。一部の事例において、例えば、がんを処置する組成物、製剤および方法において、投与される組成物または製剤の単位投薬量は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgであり得る。

【0185】

血管新生の他の阻害剤として、アンジオスタチン、エンドスタチン、インターフェロン、インターロイキン1（ α および β を含む）インターロイキン12、レチノイン酸、およびメタロプロテイナーゼ1および2の組織阻害剤（TIMP-1および2）が挙げられる。抗血管新生活性を有するトポイソメラーゼII阻害剤であるラゾキササンなどのトポイソメラーゼを含む小分子を使用することもできる。

20

【0186】

一部の事例において、例えば、がんを処置する組成物、製剤および方法において、投与される組成物または製剤の単位投薬量は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgであり得る。一部の事例において、投与される組成物または製剤の総量は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100gであり得る。

30

【0187】

方法および指標

本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターを、本明細書に記載されるように構築し、対象に導入することができる。これらのベクターは、遺伝子治療に使用することができる。これらのベクターを使用して、レシピエント（例えば、ヒト）の疾患を処置することができる。例えば、本明細書に記載されたポリヌクレオチドおよび／または本明細書に記載されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドを対象に投与して、心血管疾患を処置するか、または対象における血管発生を改善することができる。本明細書に記載された方法によって、または本明細書に記載された組成物と接触させるかもしくはこれを投与することによって処置される対象は、ヒト対象、非ヒト霊長類、イヌ科哺乳類、ネコ科哺乳類または任意の他の哺乳類である場合がある哺乳動物対象である場合がある。

40

【0188】

レシピエントにおける疾患（例えば、心血管疾患）を処置する方法であって、本明細書に記載された少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む少なくとも1つのベクターを、心血管疾患を有する対象に導入するステップを含む方法が、本明細書に記載されている。一部の事例において、ベクターは細胞に導入される。

【0189】

50

一部の事例において、心血管疾患は心筋症であり得る。心筋症は、病理学的に異常な心筋によって定義され得る。心筋症の4つの主要な分類が存在する：拡張型（DCM）、肥大型（HCM）、拘束型（RCM）、および不整脈原性RV（ARVC）。心筋症は、心エコーまたは、増加傾向にある心臓MRIのいずれかを用いるインビボ画像化により診断され得る。DCMは、心臓の拡大を指す場合があり、特に疾患の後期に、4つすべての心室に影響を及ぼすことが多い。最も一般的には、DCMはLV機能または収縮機能の低下を伴うが、疾患の初期には、LVは広がっている場合もあるが、最小限の機能低下しか示さない。対照的に、HCMは、LV壁の肥厚によって特徴付けることができ、RVからLVを分離する隔壁が標的とされることが多い。RCMは、一部の事例において、分かりにくい場合があり、これは、部分的には、心臓が形態的に通常に近い外観である場合があり、壁の肥厚もわずかで、LVの駆出率も穏やかにしか低下していないからである。RCMの根底にある浸潤プロセスは、最も感度の高い画像化技法を用いても、インビボで容易に検出できない場合がある。RCMは、心拍出量を低減する、拡張機能障害として知られる心臓の充満度が損なわれることによって特徴付けることができる。ARVCは、機能低下と、MRIで見ることのできる線維脂肪性浸潤を有するRVの薄化によって特徴付けることができる。一部の事例において、心筋症の患者を本発明のベクターで処置することができる。

10

【0190】

本明細書で提供される方法は、これらに限定されないが、がん、心血管疾患、肺疾患、肝疾患、皮膚疾患、または神経疾患を含む疾患を処置または予防するために使用され得る。本明細書で提供される方法は、対象の血管発生を改善するために使用され得る。

20

【0191】

「改善する」およびその文法上の同義語は、本明細書で使用される場合、当業者によって認識される任意の改善を意味し得る。例えば、心血管疾患を改善することは、望ましくない作用または症状の低下、減少、または減退を包含し得る不整脈の減少を意味する場合がある。別の例では、疾患を改善することは、望ましくない作用または症状の低下、減少、または減退を包含し得る腫瘍量の減少を意味する場合がある。例えば、いくつか改善例を挙げると、対象は、腫瘍量の低減、生存の延長、完全寛解、安定化を経験する場合がある。

【0192】

30

改善の別の指標は、対象が療法を必要としない日数である場合がある。例えば、本明細書で提供される処置を投与した後、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれより長い日数、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれより長い日数の間、療法を必要としない場合がある。このことにより、処置が成功したことを示すことができる。このことにより、本明細書に記載されたポリ核酸の投与に関連する毒性が存在しないことを示すこともできる。

【0193】

対象は、少なくとも1日の間療法を必要としない場合がある。レシピエントは、少なくとも7日間療法を必要としない場合がある。レシピエントは、少なくとも14日間療法を必要としない場合がある。レシピエントは、少なくとも21日間療法を必要としない場合がある。レシピエントは、少なくとも28日間療法を必要としない場合がある。レシピエントは、少なくとも60日間療法を必要としない場合がある。さらに、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年またはそれより長い間療法を必要としない場合がある。

40

【0194】

改善の別の指標は、レシピエントが療法の低減を必要とする日数である場合がある。例えば、本明細書で提供される処置の後、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより長い日数、療法の投与の低減を必要とする場合がある。このことにより、処置が成功したことを示すことができる。

【0195】

50

例えば、レシピエントは、少なくとも1日の間療法の低減を必要とする場合がある。レシピエントは、少なくとも7日間療法の低減を必要とする場合もある。レシピエントは、少なくとも14日間療法の低減を必要とする場合がある。レシピエントは、少なくとも21日間療法の低減を必要とする場合がある。レシピエントは、少なくとも28日間療法の低減を必要とする場合がある。レシピエントは、少なくとも60日間療法の低減を必要とする場合がある。さらに、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年またはそれより長い間療法の低減を必要とする場合がある。

【0196】

心疾患の処置では、経皮の冠状動脈カテーテル法は、心臓の各区域への均一な遺伝子送達を可能にすることができる、低侵襲性の手段であり得る。一部の事例において、重篤な冠状動脈疾患を有する患者では、遺伝子送達が妨害される場合がある。例えば、冠状動脈への注入の間、冠状血流を中断することなく、ベクターをカテーテルに注射することができる。

10

【0197】

一部の事例において、冠循環におけるベクター滞留時間の亢進は、冠状静脈の閉鎖により実現可能であり得る。例えば、心筋の遺伝子発現を増強した冠状動脈と冠状静脈の両方を短期間閉塞させて順行性に冠血管に注入することにより、ベクター滞留時間を亢進することができる。

【0198】

他の事例において、全身への分布を最小限にしながら内皮へのベクターの曝露期間を最大にするために、心臓再循環手法を使用することができる。この場合には、体外装置が、閉塞用カテーテルを使用して冠静脈洞から血液を排出し、ぜん動ポンプにより酸素化した環状静脈血を左主幹冠動脈に戻すことができる(V-Focus; Osprey Medical Inc.)。この方法を利用することにより、全身的副作用なしで、内皮透過剤を選択的に投与することが可能となり得る。

20

【0199】

一部の事例において、トランスフェクション効率は、冠状血流量ならびに曝露時間およびベクター濃度と相関し得る。例えば、動脈内バルーンポンプを使用して、例えば、冠状血流量を増加させることによって支持される、順行性冠状動脈注入により、心臓の遺伝子移入がさらに高まる。

30

【0200】

一部の事例において、心臓へのベクターの直接注射が実施され得る。ベクターは、標的領域に、心外膜または心内膜注射され得る。一部の事例において、直接注射により内皮バリアを回避することができる。これは、注射部位において高い局所濃度を生じ得る。一部の事例において、直接注射により循環血液への曝露を避けることができる。他の事例において、心臓へのベクターの直接注射により、循環DNAseまたは中和抗体によりベクターの不活性化を避けることができる。ベクターの直接注射は、非標的器官へのベクターの曝露を低減することもできるが、局所投与により、一部の全身的なベクターの分布を完全に避けることができる訳ではない。高いベクター濃度で少量用いることにより、心筋におけるベクターの滞留が増加する場合もある。

40

【0201】

一部の事例において、開胸術の間にベクターを導入することができる。ベクターは、心膜から導入することもできる。一部の事例において、例えば、図9に開示されているように、逆行性灌流を使用してベクターを導入することもできる。

【0202】

遺伝子治療の後、トランスフェクト細胞は、レシピエントにおいて機能性となり得る。機能性により、一部の事例において、遺伝子治療が成功であったか否かを決定することができる。例えば、トランスフェクト細胞は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれより長い日数、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれより長い日数の間、機能性となり得る。このことは、遺伝子

50

治療が成功したことを示し得る。このことは、移植細胞またはベクターが拒絶されていないことも示すことができる。

【0203】

ある特定の場合には、トランスフェクト細胞は、少なくとも1日の間機能性となり得る。トランスフェクト細胞はまた、少なくとも7日間機能性となり得る。トランスフェクト細胞は、少なくとも14日間機能性となり得る。トランスフェクト細胞は、少なくとも21日間機能性となり得る。トランスフェクト細胞は、少なくとも28日間機能性となり得る。トランスフェクト細胞は、少なくとも60日間機能性となり得る。

【0204】

投与経路

以前は、心臓への療法の送達技術には、心筋内投与（経心外膜的にまたは経心内膜的に）または冠状動脈への順行性の送達が含まれた。経心外膜経路では、外科的侵襲性という欠点を被る。経心内膜手法は、この技法は穿孔を引き起こすことがあるため、薄化した心筋を有する患者に適用されないNOGAデバイスなどのシステムを使用する複雑な電磁マッピングを必要とする。Biocardiaヘリカル注入カテーテルまたはCelyad-C-Cathなどの他のデバイスは、壁厚の制限も有する。

【0205】

冠状動脈への順行性の投与は、心筋内投与と比較して、低い生体保持を伴う[12]。さらに、冠状動脈への生物製剤の投与は、冠動脈塞栓およびST部分上昇のリスクの増加を示した[13][14][15][16][17]。pDNA投与に関しても、多量の血液量と直接接触させることで、標的組織に侵入する前に作用を低下させる場合がある。

【0206】

逆行性投与

ヒトでは、冠静脈洞は、心収縮の大半を担う心室腔の静脈系を排出する。冠静脈洞への逆行性送達技術は、順行性送達と比較して、心筋全体への溶液の優れた分布に一部起因して、心停止液の投与に対して広く使用されてきた[18]。さらに、この手順は、リスクの高い経皮的冠動脈形成術の間の酸素化血液投与に対する臨床上的安全性を実証した[19][20][21]。冠静脈洞への逆行性投与プロセスは、バルーンカテーテルとその後の流出血液に対する投与によって、求心的な冠循環の一時的な閉塞に関与する。これは、後毛細管細静脈により心筋に侵入する溶液を生じる。小動脈または毛細管に対して、後毛細管細静脈は、最小の血管経を有し、物質が間質に最も多く移入することを概念的に可能にする[22]。生理的に、後毛細管細静脈は、ELAM-1[23]、ICAM-1[24]、CD18[25]、およびCD44[26]などの接着分子の発現に一部起因して、および一部生体力学特性のために、内皮を横切る免疫/炎症細胞の移動の主要な標的であることが知られている。Patelらは、REVIVE Trialにおいて、この前臨床試験で提案されたものと同じ送達カテーテル（Cook Regentec）を使用して、30億個を超える有核細胞が、最終ステージCHFを有する患者の冠静脈洞へ60ccの用量で安全に送達され得ることを実証した[27]。

【0207】

逆行性投与による遺伝子治療

いくつかの研究により、心筋再生の領域で、逆行性投与を利用することに成功した。Boekstegersら[32]は、冠状動脈への順行性の送達または前心臓静脈を介した逆行性送達と比較して、ベクターgalおよびルシフェラーゼを発現するアデノウイルスをブタの心筋に送達した。順行性に比べて、均一な様式の梗塞組織における著しく高い遺伝子発現が、逆行性方法を介して観察された。同様の結果が、ネイキッドDNAを用いる逆行性方式で注射したブタの心臓におけるeGFPの間質発現を観察したAlinoら[33]によって再現された。別の研究では、ブタにおいて逆行性方法を使用するベクターgalをコードするプラスミドの投与により、順行性の筋肉内投与と比較して高い心筋の遺伝子発現を生じた[34]。心筋内送達と比較した、この優れたレベルの遺伝子発現は、他の研究でも再度報告された[35]。逆行性投与の使用は、タンパク質療法の送達

を実施するのに成功した。Von Degenfeldら[36]は、FGF-2タンパク質の逆行性投与を使用して、実験的に誘導される狭窄を予防したブタでの研究を報告した。逆行性で処理したブタの心筋の放射標識したFGF-2のレベルは、順行性の注入を使用して達成したレベルのほぼ2倍であった。さらに、FGF-2が逆行性方法により投与された場合に、経壁血流および部分的心筋機能の顕著な改善が報告された。心不全患者のSDF-1 α p-DNAの逆行性送達の安全な使用についても報告された(RETRO-HF)。

【0208】

したがって、本発明の好ましい実施形態は、冠静脈洞を介した逆行性投与の使用を含む。本発明の別の実施形態は、冠動脈内または心筋内投与経路の使用を含む。

10

【0209】

超音波標的マイクロバブル破壊遺伝子送達(UTMD)

ガスを封入したマイクロバブルは、有用な超音波造影剤である。一部の実施形態において、マイクロバブルは、本明細書に記載されたベクター、遺伝子および/または構築物を対象の組織および/または器官に送達するために使用される。[65]一部の事例において、送達は、器官または組織特異的であり得る。共鳴周波数付近の超音波で処理した場合、マイクロバブルは振動する。より高い超音波エネルギーでは、振動の振幅が増大し、マイクロバブルの破壊を導く。この現象を使用して、例えば、本明細書に記載された組成物または遺伝子治療ベクターに負荷されたマイクロバブルを投与し(例えば、静脈内注射によって)、次に、標的部位でマイクロバブルの破壊を生じる超音波エネルギーに曝露することによって、本明細書に記載されたベクターまたは組成物を標的器官に送達する。

20

【0210】

UTMDの実施形態において、本明細書に記載されたプラスミドベクター、本明細書に記載された遺伝子構築物をコードするポリヌクレオチドなどの生理活性分子を、例えば、脂質マイクロバブル造影剤のカチオン性シェルに添加する。これらのベクターを保有するマイクロバブルは、対象に対して、例えば、他の投与選択肢の中でも、静脈内に、または心臓の左心室に直接投与され得る。一部の対象では、マイクロバブルであるそれらは、冠動脈内カテーテルを介して注入され得る。血液の循環から標的器官への次の送達は、マイクロバブルの共鳴周波数における音波キャビテーションによって起こる。一部の実施形態において、マイクロバブルの破壊によって生じる力学的エネルギーは、標的化部分の微小血管系の内皮細胞内または内皮細胞間に一時的なポア形成を生じる場合がある。一部の実施形態において、内皮細胞へのおよび内皮細胞を横切るトランスフェクション効率が増大し、導入遺伝子をコードするベクターが周囲組織に堆積される。このように、本明細書に記載されたベクターがUTMDによって送達される一部の事例において、血液の循環中に残存するさらなるプラスミドDNAは、血液中のヌクレアーゼによって分解される可能性があり、それによって、超音波処理に曝露された器官への高度に特異的な標的器官トランスフェクションを生じ、非超音波処理組織への送達の可能性を低減する。

30

実施例

【実施例1】

【0211】

40

A t t 部位介在性組換えのための心筋細胞のトランスフェクション

心筋細胞を、a t t 部位を伴うまたは伴わない(すなわちプラス(+)またはマイナス、およびプラス(+)またはマイナス(-)のS p B C 2リコンビナーゼ(-))のルシフェラーゼベクターを用いてトランスフェクトした。その後、ルシフェラーゼ発現を経時的にモニターしてa t t 部位介在性組換えを評価した。S p B C 2およびその提案された活性部位(A t t 部位)の部位特異性および効力を決定するために、心筋細胞を、S p B C 2プラスミドおよびホタルルシフェラーゼ(「F L U C」または「L u c」)プラスミドベクター(目的遺伝子周囲のa t t 部位を含む)で同時トランスフェクトした。含まれた対照は、S p B C 2を含まないA t t -L u cプラスミド(無作為な組込みを測定するため)、S p B C 2を有するN o -A t t -L u cプラスミド(非a t t 部位の特異的組

50

込みを測定するため)、およびSPBC2を含まないNo-Att-Lucプラスミド(一過性発現を測定するため)であった。細胞をDNAフェクチン(Applied Biological Materials Inc.、Richmond、BC、Canada)を介してトランスフェクトし、14日間培養し、細胞を周期的に継代培養し、ルシフェラーゼアッセイによって細胞を試験し、qPCRアッセイのために細胞を採取した。

【0212】

トランスフェクションは、完全増殖培地およびトランスフェクション培地(FBS/抗生物質を含まないPrigrow I)を利用して行った。トランスフェクションの少なくとも1時間前に、培地を、心筋細胞から取り出し、新鮮な増殖培地と交換した。6ウェルプレートでは3mL/ウェル、または12ウェルプレートでは1.5mL/ウェルである。使用前にDNAフェクチン試薬を室温まで温め、短時間ボルテックスして混合した。DNAフェクチン-プラスミドDNA複合体の様々な組合せを、以下のようにトランスフェクション培地中で調製した：

【0213】

プラスミドベクター 組合せ	DNA (μ g)
Att-Luc	0.375
SPBc2	0.375
Att-Luc	0.375
Stuffer	0.375
Luc	0.375
SPBc2	0.375
Luc	0.375
Stuffer	0.375

「Att-Luc」= att 部位およびルシフェラーゼ遺伝子を有するベクター

「Luc」= ルシフェラーゼ遺伝子を有し、att 部位を有さないベクター

「SPBc2」= SPBc2 リコンビナーゼをコードするベクター;および、

「Stuffer」=(または pStuffer)は、pXoX と同じ骨格構成を有し、非発現性の、同様のサイズの非エフェクター配列で置き換えられたオープンリーディングフレーム(ORF)を有するプラスミドである。

【0214】

DNAをトランスフェクション培地に添加した。混合物を室温で20分間インキュベートした。300 μ L/ウェルのDNAフェクチン-DNA複合体を細胞に添加した。

【0215】

qPCR、ルシフェラーゼアッセイのための継代および採取

トランスフェクションの48時間後、培地を12ウェルプレート中の細胞から除去した。細胞をトリプシン処理し、微量遠心管に採取した。次いで、細胞を1mLの新鮮な増殖培地に再懸濁した。細胞を5e4細胞/ウェルで新しい12ウェルプレートに播種し、ルシフェラーゼを測定した。残りの細胞をqPCRのために採取した。

【0216】

結果：

2週間の経過にまたがって、Att-Luc+SPBc2リコンビナーゼからのFLUC発現は、ほぼ10倍低下したが、他のトランスフェクション条件(att部位なしまたはリコンビナーゼなしのいずれか)からのFLUC発現は100~1000倍減少し、バ

ックグラウンドレベルの発現までほぼ戻った（データは示されていない）。心筋細胞ゲノムへのFLUC GOI（目的遺伝子）のatt部位介在性組換えも観察された（データは示されていない）。

【実施例2】

【0217】

HUVEC増殖アッセイ

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）増殖アッセイを使用して、pXoXによって発現されるVEGF165の機能性を評価した。血清飢餓状態のHUVECを、pXoXまたは単一のエフェクター対照（pVEGF165陽性対照、pSDF-1α陰性対照）でトランスフェクトした患者（拡張型、肥大型）または健常なiPSC由来の心筋細胞からの馴化培地で処置した。インキュベーションの96時間後、発光アッセイを用いてHUVEC増殖を定量した。アッセイを3回繰り返した（例えば、CM-1、CM-2、CM-3）。

10

【0218】

誘導された多能性幹細胞

iPSC心筋細胞を、S100A1およびVEGF；S100A1、SDF1、およびVEGF；またはVEGFのみをコードする単一遺伝子、二重遺伝子、または三重遺伝子ベク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、細胞上清を収集した。HUVECを、トランスフェクトされたiPSC細胞から収集された上清中に、約1：10、1：100、および1：1000の密度で6ウェルプレートに播種した。上清が導入されてから96時間後、HUVEC増殖を、CellTiter-Glo Assayによって測定した。図5Aおよび図5Bは、実験データを示す。図14および図14Bは、拡張型心筋症患者由来のiPSC細胞について同様の結果を示す。

20

【0219】

心筋症患者および健常対照由来の心筋細胞

心筋細胞-iPSC細胞は、拡張型心筋症（DCM）、肥大型心筋症（HCM）または健常対照を有する患者から得た。iPSC細胞を、S100A1およびVEGF；S100A1、SDF1、およびVEGF；またはVEGFのみをコードする単一遺伝子、二重遺伝子、または三重遺伝子ベク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、細胞上清を収集した。HUVECを、トランスフェクトされたiPSC細胞から収集された上清中に、約1：10、1：100、および1：1000の密度で6ウェルプレートに播種した。上清が導入されてから96時間後、HUVEC増殖を、CellTiter-Glo Assayによって測定し、図6は実験データを示す。

30

【0220】

結果

単一遺伝子、二重遺伝子、または三重遺伝子ベクター構築物でトランスフェクトしたiPSC-CMは、両方の場合においてHUVEC増殖の4～10倍の増大を示した。したがって、結果によって、本明細書で提供されるリンカーを使用する場合（すなわち、単一のVEGF165エフェクタープラスミドを用いて観察されるものと同様のHUVEC増殖を誘導する場合）、二重遺伝子および三重遺伝子発現ベクターからの多重遺伝子連結構築物の一部として発現されるとき、VEGFが機能的（すなわち、生物学的に活性）であることが首尾良く実証される。

40

【実施例3】

【0221】

内皮管形成アッセイ

HUVEC増殖アッセイに加えて、内皮管形成アッセイ（CBA200、Cell Biolabs Inc.、San Diego、CA、USA）を使用する。ECMゲルを、4℃で解凍し、冷却ピペットチップを使用して均一に混合する。細胞培養プレート（96ウェル）を、ECMゲルの薄層を用いて底部にコーティングし（50μl／ウェル）、これを37℃で60分間重合させた。本明細書に記載のリンカーによって連結されてい

50

る S100A1 および VEGF；本明細書に記載のリンカーによって連結されている S100A1、SDF1、および VEGF；または VEGF のみをコードする単一遺伝子、二重遺伝子または三重遺伝子ベクターでトランスフェクトされた iPSC 心筋細胞から収集した上清中の細胞培養プレートに HUVEC (2~3×10⁴個の細胞) を播種する。150 μl の上清-HUVEC 混合物を、固化した ECM ゲル上の各ウェルに加える。そのプレートを 37℃ で 12~18 時間インキュベートする。Calcein AM で染色した後、蛍光顕微鏡を用いて内皮管を定量する。3つの顕微鏡視野を無作為に選択し、撮影する。チューブ形成能力は、4×対物レンズおよびウェル当たり4つの異なる視野の下で、細胞クラスター(ノット)および分枝の総数を数えることによって定量する。結果は、対照群と比較した分岐の平均倍数変化として表される。各実験は少なくとも3回実施する。

10

【実施例4】

【0222】

SDF-1α 機能-遊走アッセイ

24ウェルトランスウェル走化性チャンバ技術(Millipore、Billerica、MA、USA)を用いて走化性実験を行った。要約すると、健常ボランティアから得た試料から末梢血白血球(PBL)を単離し、本明細書に記載のリンカーにより連結された S100A1 および VEGF、または本明細書に記載のリンカーにより結合された S100A1、SDF1 および VEGF をコードするダブル遺伝子または三重遺伝子ベクターでトランスフェクトした。200 μL の培地中の合計 1×10⁵ PBL を、上部チャンバ(孔径 8 μm)に播種した。阻害実験のために、PBL の半分を、10 nmol/L の CXCR4 アンタゴニスト(AMD3100)と30分間プレインキュベートしてから播種した。次いで、PBL および培地を上部チャンバに移した。次に、チャンバを、5% CO₂を含む加湿雰囲気中、37℃で12時間インキュベートした。膜(Millipore)を除去し、その上面を綿棒で拭き取り、固定の PBL を除去した。次に膜を中性ホルマリン中で、室温で10分間固定し、次いで0.1%クリスタルバイオレットで5分間染色した。膜の下面に移動した PBL の数を、光学顕微鏡(Nikon Eclipse、Nikon Instruments、Inc.、Melville、NY、USA)下で10のランダム高倍率視野(HPF)で計数した。

20

【0223】

化学走性指数(CI)を算出して、刺激遊走：CI = 刺激遊走(HPFあたりのCSCの数) / ランダム遊走(HPFあたりのCSCの数)を表した。各アッセイは3つのウェルで行った。

30

【0224】

結果

AMD3100(CXCR4アンタゴニスト)を用いたSDF1特異的遊走の検証は成功した。AMD3100は、SDF1-CXCR4依存性遊走の完全な阻害を示した(試料番号2、6)。iPSC-CMで発現されるSDF1は、AMD3100の存在下で遊走が減少するので、本発明者らのダブル遺伝子および三重遺伝子構築物において機能的である(試料番号7、12、13)。図7および図8は、実験データを示す。VEGF発現ベクター構築物を用いて行った同様の実験によって、同様の結果が示される(図6)。したがって、これらの結果は、本明細書で提供されるリンカーを使用する場合、二重遺伝子および三重遺伝子発現ベクターからの多重遺伝子連結構築物の一部として発現されるとき、SDF-1αが機能的(すなわち、生物学的に活性)であることを首尾良く実証する。

40

【実施例5】

【0225】

実施例5A SDF-1α 機能-Jurkat 遊走アッセイ

トランスフェクトされたJurkat細胞は、細胞遊走を支援する機能的SDF1タンパク質を産生する

SDF-1αを、Jurkat細胞および末梢血リンパ球(PBL)という2つの細胞

50

型のC X C R 4 媒介遊走を実証することによって、機能性について調べた。J u r k a t 細胞の遊走に関しては、無血清培地中の細胞を、トランスウェルインサートの上部に播種した。下部チャンバは、p X o X または単一のエフェクター対照でトランスフェクトされた患者（拡張型、肥大型）または健常な i P S C 由来の心筋細胞からの馴化培地で満たした。2 時間後に馴化培地を含有する下部チャンバにトランスウェル挿入物を通して遊走した細胞の数を、発光アッセイを用いて定量した。

【0226】

J u r k a t 細胞に、S D F 1 をコードする単一遺伝子、ダブル遺伝子、および三重遺伝子遺伝子構築物をトランスフェクトした。J u r k a t 対照細胞およびA M D 3 1 0 0 (C X C R 4 アンタゴニスト) に暴露されたJ u r k a t を、薬物添加の2 時間後に遊走効率について測定した。図8および図10は実験データを示す。S D F 1 をコードするダブル遺伝子および三重遺伝子ベクターを用いてトランスフェクトされたヒト i P S C 由来の上清と共に培養されたJ u r k a t 細胞で実施された同様の実験は、同様の結果を示す(図11)。

【0227】

結果

組換えS D F 1 へのJ u r k a t の遊走は、C X C R 4 依存性である。したがって、これらの結果は、本明細書で提供されるリンカーを用いる場合、二重遺伝子および三重遺伝子発現ベクターからの多重遺伝子連結構築物の一部として発現されるとき、S D F - 1 α が機能的（すなわち、生物学的に活性）であること実証するのに成功している。

【0228】

実施例5B 心筋症患者からのトランスフェクトされた心筋細胞は、細胞遊走を支持する機能性S D F 1 タンパク質を産生する

心筋細胞-i P S C 細胞(i P S C - C M) は、拡張型心筋症(D C M)、肥大型心筋症(H C M) を有する患者または健常対照から得た。i P S C 細胞に、本明細書に記載のリンカーによって連結されたS 1 0 0 A 1 およびV E G F; 本明細書に記載のリンカーによって連結されているS 1 0 0 A 1、S D F 1、およびV E G F; またはV E G F のみをコードする単一遺伝子、二重遺伝子(ダブル遺伝子)、または三重遺伝子ベクターを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、細胞上清を収集した。J u r k a t 細胞を、トランスフェクトされたi P S C 細胞から収集された上清中に、約1:10, 1:100、および1:1000の密度で、6ウェルプレートに播種した。上清が導入されてから96時間後、J u r k a t 細胞遊走を測定した。図12は、拡張型心筋症モデルにおける実験データを示す。図13は、肥大型心筋症モデルにおける実験データを示す。

【0229】

結果

単一遺伝子、二重遺伝子または三重遺伝子ベクター構築物でトランスフェクトされた i P S C - C M は、両方の場合においてH U V E C 増殖の4~10倍の増大を示した。

【実施例6】

【0230】

E L I S A

トランスフェクトされた293T細胞は、定量可能なタンパク質レベルを産生する

293T細胞を、X o g e n e x 単一遺伝子、二重遺伝子(ダブル遺伝子)、三重(三重遺伝子) 遺伝子構築物および適切な対照構築物でF u g e n e 6 (P r o m e g a) を介してトランスフェクトした。所望の時点(複数可)で細胞上清および溶解物を採取した。293T細胞を、図15~17にまとめたように、K o z a k 配列の存在または非存在、リンカー(フリン-A P - F 2 A、G S G - P 2 A、フリン-A P V K Q G S G - P 2 A) (配列番号119) またはなしという点で異なるベクターを利用して、本明細書に記載のリンカーによって結合されるS 1 0 0 A、S D F 1、V E G F 1 9 1 またはそれらの種々の組合せをコードするベクター構築物でトランスフェクトした。

【0231】

結果

S100A、SDF1、VEGF191、またはそれらの様々な組合せをコードするダブル遺伝子ベクターでトランスフェクトされた293T細胞は、測定可能なレベルのタンパク質を産生する。図15Aおよび図15Bは、SDF1タンパク質のレベルを示す。図16Aおよび図16Bは、VEGFタンパク質のレベルを示す。図17Aおよび図17Bは、S100A1タンパク質のレベルを示す。

【実施例7】

【0232】

三重遺伝子発現構築物

二重遺伝子（ダブル遺伝子）、三重遺伝子、および四重遺伝子（四遺伝子）構築物のマトリックス（多様性）を以下の表5に示すように設計した。

【0233】

【表5】

表5-多重遺伝子プラスミド構築物設計のマトリックス

#	5'のプロモーター	遺伝子-1	リンカー	遺伝子-2	任意選択の第2のリンカー、プロモーター、または介在性配列	3'の任意遺伝子-3
1	CAG	S100A1	fp2a	SDF1 α	fmdv	VEGF191
2	CAG	S100A1	fp2a	SDF1 α	p2a	VEGF191
3	CAG	S100A1	fp2a	VEGF191	p2a	SDF1 α
4	CAG	S100A1	fp2a	SDF1 α	fp2a	VEGF191
5	CAG	S100A1	fp2a	VEGF191	fp2a	SDF1 α
6	CAG	S100A1	fp2a	SDF1 α	IRES	VEGF191
7	CAG	S100A1	fp2a	VEGF191	IRES	SDF1 α
8	CAG	S100A1	fp2a	SDF1 α	CMV	VEGF191
9	CAG	S100A1	fp2a	VEGF191	CMV	SDF1 α
10	CAG	S100A1	fp2a	SDF1 α	CMV	S100A1
11	CAG	S100A1	fp2a	VEGF191	CMV	S100A1
				*上記の3'末端へ連結:	任意選択の第3のリンカー	任意選択の遺伝子-4
				#10	fp2a	VEGF191
				#11	fp2a	SDF1 α

* S100A1の結合価を増大する(すなわち、S100A1二量体の産生を増大する)任意選択の第3のリンカーおよび遺伝子-4

【0234】

拡張型心筋症および肥大型心筋症を有する健常なドナー、ドナー（患者）の各々からのモデル細胞型（すなわち、293T細胞、SV40形質転換心筋細胞、およびiPSC由来の心筋細胞）においてポリペプチド発現および切断効率を試験した。発現の結果、切断効率の結果、および種々のリンカー（すなわち、連結配列）の組合せに関する発現の考慮のまとめを、以下の表6に示す。

【0235】

【表 6】

表 6 - ポリペプチド切断/リンカー/目的遺伝子(Gene of Interest:GOI)発現相違

リンカー組成	GOI ポリペプチド発現レベル (ELISA アッセイ)	GOI ポリペプチド/ リンカー切断 (ウエスタンブロット/イムノブロット アッセイ)	以下の 生物学的局面 を考慮する:	全体的能力 ランキング
f2pa-fp2a	高い	3 つ全ての GOI 完全切断	2AC 末端テール の存在	#1
f2pa-fmdv	高い	3 つ全ての GOI 完全切断	2AC 末端テール の存在	#2
f2pa-CMV	高い	3 つ全ての GOI 完全切断	GOI およびプロモーター サイレンシングの種々の化学 量論的発現比	#3
f2pa-CMV-fp2a	高い	3 つ全ての GOI 完全切断	GOI およびプロモーター サイレンシングの種々の化学 量論的発現比	#4
f2pa-p2a	極めて高い	第 2 と第 3 の GOI の間の乏しい切断	n/a	n/a
f2pa-IRES	乏しい(第 3 の GOI:IRES の 3')	n/a	n/a	n/a

【 0 2 3 6 】

リード構築物の構成:

(5') - CAG プロモーター - S100A1 - fp2a (リンカー) - SDF1α - fp2a (リンカー) - VEGF191 - (3')

(5') - CAG プロモーター - S100A1 - fp2a (リンカー) - VEGF191 - fp2a (リンカー) - SDF1α - (3')

【 0 2 3 7 】

ELISA アッセイ - 三重遺伝子構築物からの S100A1 の発現

ELISA アッセイを実施して、単一遺伝子 pXoX 対照および以前に同定されたリード候補である二重遺伝子構築物と比較して、三重遺伝子 pXoX 構築物からの S100A1 の発現を定量した。SV40 形質転換心筋細胞を、試験プラスミド構築物の各々でトランスフェクトし、細胞上清および溶解物を所望の時点（複数可）で採取した。心筋細胞を、本明細書に記載され、それぞれ第 1、第 2 および第 3 のリンカー配列（例えば、fp2a、fmdv、p2a、IRES、CMV、または連結配列なし）として下記の表 7 に示すリンカー配列によって連結された S100A、SDF1α、VEGF191 またはそれらの様々な組合せをコードするベクター構築物でトランスフェクトした。産生されたタンパク質の濃度を、ELISA により測定した。図 18 を参照のこと；試料番号は、下記の表 7 に示す試料番号に対応する。

【 0 2 3 8 】

構築物および S100A1 発現結果の構成を表 7（下記）に示す。

【 0 2 3 9 】

【表 7】

表 7 他の構築物と比較した三重遺伝子からの S100A1 ポリペプチド発現

試料	名称	リンカー	GOI	S100A1 ng/mL
1	三重 1	fp2a-fmdv	S100A1-SDF1-VEGF	3176
2	三重 2	fp2a-p2a	S100A1-SDF1-VEGF	4616
3	三重 3	fp2a-p2a	S100A1-VEGF-SDF1	5792
4	三重 4	fp2a-fp2a	S100A1-SDF1-VEGF	2335
5	三重 5	fp2a-fp2a	S100A1-VEGF-SDF1	4258
6	三重 6	fp2a-IRES	S100A1-SDF1-VEGF	4440
7	三重 7	fp2a-IRES	S100A1-VEGF-SDF1	4042
8	三重 8	fp2a-CMV	S100A1-SDF1-VEGF	6096
9	三重 9	fp2a-CMV	S100A1-VEGF-SDF1	7342
10	三重 10	fp2a-CMV-fp2a	S100A1-SDF1- S100A1-VEGF	7290
11	三重 11	fp2a-CMV-fp2a	S100A1-VEGF- S100A1-SDF1	6541
12	単一遺伝子対照	N/A	S100A1	724
13	単一遺伝子対照	N/A	SDF1	0
14	単一遺伝子対照	N/A	VEGF	0
15	二重リード#13	fp2a	S100A1-SDF1	6988
16	二重リード#14	fp2a	S100A1-VEGF	7121
17*	二重リード#15	fp2a	SDF1-S100A1	0
18	GFP	N/A	GFP	0
19	未トランスフェクト	N/A	N/A	0

【0240】

ELISA アッセイ—三重遺伝子構築物からの SDF1 α の発現

ELISA アッセイを実施して、単一遺伝子 pXoX 対照および以前に同定されたリード候補、二重遺伝子構築物と比較して、三重遺伝子 pXoX 構築物からの SDF1 α の発現を定量した。SV40 形質転換心筋細胞を、試験プラスミド構築物の各々でトランスフェクトし、細胞上清および溶解物を、所望の時点（複数可）で採取した。心筋細胞を、本明細書に記載され、それぞれ第 1、第 2、および第 3 のリンカー配列（例えば、fp2a、fmdv、p2a、IRES、CMV、または連結配列なし）として下記の表 8 に示されるリンカー配列によって連結された S100A、SDF1 α 、VEGF191 またはそれらの様々な組合せをコードするベクター構築物でトランスフェクトした。産生されたタンパク質の濃度を ELISA により測定した。図 19 を参照のこと；試料番号は、下記の表 8 に示す試料番号に対応する。

【0241】

【表 8】

表 8 他の構築物と比較した三重遺伝子からの SDF1 α ポリペプチド発現

試料	名称	リンカー	GOI	SDF1 α ng/mL
1	三重 1	fp2a-fmdv	S100A1-SDF1-VEGF	9.66
2	三重 2	fp2a-p2a	S100A1-SDF1-VEGF	18.63
3	三重 3	fp2a-p2a	S100A1-VEGF-SDF1	24.65
4	三重 4	fp2a-fp2a	S100A1-SDF1-VEGF	9.55
5	三重 5	fp2a-fp2a	S100A1-VEGF-SDF1	21.45
6	三重 6	fp2a-IRES	S100A1-SDF1-VEGF	26.07
7	三重 7	fp2a-IRES	S100A1-VEGF-SDF1	7.16
8	三重 8	fp2a-CMV	S100A1-SDF1-VEGF	18.64
9	三重 9	fp2a-CMV	S100A1-VEGF-SDF1	31.99
10	三重 10	fp2a-CMV-fp2a	S100A1-SDF1- S100A1-VEGF	13.73
11	三重 11	fp2a-CMV-fp2a	S100A1-VEFG- S100A1-SDF1	28.17
12	単一遺伝子対照	N/A	S100A1	0.46
13	単一遺伝子対照	N/A	SDF1	27.95
14	単一遺伝子対照	N/A	VEGF	0.51
15	二重リード#13	fp2a	S100A1-SDF1	30.94
16	二重リード#14	fp2a	S100A1-VEGF	0.64
17	二重リード#15	fp2a	SDF1-S100A1	16.40
18	GFP 対照	N/A	GFP	1.12
19	未トランスフェクト	N/A	N/A	0

【0242】

E L I S A アッセイー三重遺伝子構築物からの V E G F 1 9 1 の発現

E L I S A アッセイを実施して、単一遺伝子 p X o X 対照および以前に同定されたリード候補、二重遺伝子構築物と比較して、三重遺伝子 p X o X 構築物からの V E G F 1 9 1 の発現を定量した。S V 4 0 形質転換心筋細胞を、試験プラスミド構築物の各々でトランスフェクトし、細胞上清および溶解物を、所望の時点（複数可）で採取した。本明細書に記載の、および下記の表 9 に、それぞれ第 1 のリンカー配列、第 2 のリンカー配列および第 3 のリンカー配列（例えば、f p 2 a、f m d v、p 2 a、I R E S、C M V、または連結配列なし）として示される、リンカー配列によって連結された S 1 0 0 A、S D F 1 α 、V E G F 1 9 1 またはそれらの様々な組合せをコードするベクター構築物で心筋細胞をトランスフェクトした。産生されたタンパク質の濃度を、E L I S A により測定した。図 20 を参照のこと；試料番号は、下記の表 9 に示す試料番号に対応する。

【0243】

【表 9】

表 9:他の構築物と比較した三重遺伝子からの VEGF191 ポリペプチド発現

試料	名称	リンカー	GOI	VEGF191 ng/mL
1	三重 1	fp2a-fmdv	S100A1-SDF1-VEGF	197.1
2	三重 2	fp2a-p2a	S100A1-SDF1-VEGF	281.9
3	三重 3	fp2a-p2a	S100A1-VEGF-SDF1	169.6
4	三重 4	fp2a-fp2a	S100A1-SDF1-VEGF	73.1
5	三重 5	fp2a-fp2a	S100A1-VEGF-SDF1	99.9
6	三重 6	fp2a-IRES	S100A1-SDF1-VEGF	24.0
7	三重 7	fp2a-IRES	S100A1-VEGF-SDF1	111.2
8	三重 8	fp2a-CMV	S100A1-SDF1-VEGF	226.5
9	三重 9	fp2a-CMV	S100A1-VEGF-SDF1	149.4
10	三重 10	fp2a-CMV-fp2a	S100A1-SDF1- S100A1-VEGF	231.0
11	三重 11	fp2a-CMV-fp2a	S100A1-VEFG- S100A1-SDF1	239.6
12	単一遺伝子対照	N/A	S100A1	1.5
13	単一遺伝子対照	N/A	SDF1	1.7
14	単一遺伝子対照	N/A	VEGF	427.5
15	二重リード#13	fp2a	S100A1-SDF1	1.1
16	二重リード#14	fp2a	S100A1-VEGF	265.3
17	二重リード#15	fp2a	SDF1-S100A1	1.4
18	GFP 対照	N/A	GFP	1.1
19	未トランスフェクト	N/A	N/A	5.5

【0244】

ウエスタンブロット（イムノブロット）アッセイで、三重遺伝子構築物からの S100A1、SDF-1α および VEGF191 の効率的な切断を確認する

関連する細胞型内の個々のエフェクタータンパク質の適切なサイズおよび配列の確認は、イムノブロットおよび質量分析によって実証された（本明細書中でさらに記載されるように）。複数の妥当な細胞系を、pXoX でトランスフェクトし、細胞溶解物（S100A1 について）または馴化培地（SDF-1α および VEGF165 について）のいずれかを分析した。イムノブロット分析用の対照は、適切な単一エフェクター（pS100A1、pSDF-1α、pVEGF165）および対応する市販の精製された組換えタンパク質でトランスフェクトされた細胞由来の溶解物／馴化培地であった。

【0245】

SDS-PAGE／イムノブロットの結果は、試験した全ての細胞系（293T、SV40 不死化心筋細胞、健常個体、拡張型心筋症患者、肥大型心筋症患者由来の iPSC）

にまたがって一貫していた。SV40不死化心筋細胞からのイムノブロットデータを、以下の図21～図23に示しており、ここでは、指示されたエフェクタータンパク質の各々の予想されるサイズを矢印で示す。

【0246】

各GOIについて、イムノブロット解析を、製造業者の指示に従って標準的な手順を用いて行った。検出試薬条件は以下のとおりであった：

S100A1検出－抗S100A1抗体（R&D Systems、Inc.）を1：200に希釈し、ブロットで、4℃で一晩インキュベートし；1：20,000に希釈した抗ヒツジHRP（セイヨウワサビペルオキシダーゼ）抗体（KPL Inc.、Gaithersburg, MD, USA）を、ブロットで、室温（RT）で30分間インキュベートし；LUMIGLO（登録商標）Ultra（KPL Inc.）によりシグナル検出；

SDF-1α検出－1：2000に希釈した抗SDF-1α抗体（R&D Systems、Inc.）をブロットで、4℃で一晩インキュベートした；1：20,000に希釈した抗ヤギHRP（Jackson ImmunoResearch Laboratories、Inc.、West Grove, PA, USA）抗体を、ブロットで、室温（RT）で30分間インキュベートした；LUMIGLO（登録商標）Ultra（KPL Inc.）によるシグナル検出。

VEGF検出－抗VEGF抗体（Abcam、Plc.、Cambridge, MA）を1：2000に希釈し、ブロットで、4℃で一晩インキュベートした；1：20,000に希釈した抗ウサギHRP（Jackson ImmunoResearch Laboratories、Inc.）抗体をブロットで、室温（RT）で30分間インキュベートした；LUMIGLO（登録商標）Ultra（KPL Inc.）によるシグナル検出。

【0247】

例示的なイムノブロットを図21、図22および図23に示す

【0248】

【表10】

表10- 種々の構築物を発現する細胞由来の試料を、レーン1～9に示す(レーン「L」は、ポリペプチド分子量対照ラダーを示す(220、120、100、80、60、50、40、30、20、14、6および3kDaのマーカ))。

レーン	GOI	リンカー	GOI	リンカー	GOI	リンカー	GOI
L	ラダー-分子量マーカー						
1	S100A1	fp2a	SDF1α	fmdv	VEGF191		
2	S100A1	fp2a	SDF1α	p2a	VEGF191		
3	S100A1	fp2a	VEGF191	p2a	SDF1α		
4	S100A1	fp2a	SDF1α	fp2a	VEGF191		
5	S100A1	fp2a	VEGF191	fp2a	SDF1α		
6	S100A1	fp2a	SDF1α	CMV	VEGF191		
7	S100A1	fp2a	VEGF191	CMV	SDF1α	fp2a	VEGF191
8	S100A1	fp2a	SDF1α	CMV	S100A1		
9	S100A1	fp2a	VEGF191	CMV	S100A1		

【0249】

結果は、3つのGOIのそれぞれが、三重遺伝子構築物から発現されるにつれて効率的に切断されることを示す。

【0250】

質量分析アッセイ多重遺伝子発現産物を質量分析法によって評価した。

リード候補の切断産物を、質量分析法を用いて検証した。トリプシン、キモトリプシンおよびエラスターゼ消化を、標準的な手順を用いて行った。各ゲル消化物を、ThermoFisher Q Exactive HF (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) にインターフェースした、Waters NanoAcquity HPLCシステム (Waters Corp., Milford, MA, USA) を用いて、ナノLC/MS/MS*によりさらに分析した。データは、マスコット (Masco t) データベースを使用して処理した。マスコットDATファイルは、検証、フィルタリングのため、および試料ごとに非冗長リストを作成するために、Scaffoldソフトウェアで解析した。データは、90%の最小タンパク質値、50%の最小ペプチド値 (Prophetスコア) を用いおよびタンパク質あたり少なくとも2つのユニークなペプチドを必要とする条件で濾過した。上記のウエスタンブロット (イムノブロット) 分析と一致して、リード二重遺伝子および三重遺伝子構築物から発現された場合、質量分析の結果によりS100A1、SDF-1およびVEGFのタンパク質分解切断がさらに確認された。表11を参照のこと。

*LC/MS/MSは、質量分析計 (MS) による液体クロマトグラフィー (LC) を示す。MS/MSは、1つの質量分析装置に2つの質量分析器を組み合わせたものである。第1のMSは、前駆イオンを濾過し、続いて高エネルギーを有する前駆イオン、および例えば窒素ガスの断片化が続いた。次いで、第2の質量分析器は、断片化によって生成された生成イオンをフィルタリングする。MS/MSの利点は感度の向上である。

【0251】

【表11】

表11- リード候補構築物の質量分析によって分析されたポリペプチド切断の要約

	構築物の構成 (任意選択のプロモータータイプ)- GOI#1-リンカー-GOI#2-リンカー- GOI#3	S100A1 切断	SDF 切断	VEGF 切断
リード二重 #13	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1	あり	あり	n/a
リード二重 #14	(CAG)-S100A1-fp2a-VEGF	あり	n/a	あり
三重#1	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1-fmdv-VEGF	あり	あり	あり
三重#2	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1-p2a-VEGF	あり	あり	あり
三重#3	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1-CMV-VEGF	あり	あり	あり
三重#4	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1-fp2a-VEGF	あり	あり	あり
三重#5	(CAG)-S100A1-fp2a-VEGF-fp2a-SDF1	あり	あり	あり

【0252】

質量分析 (MS) を用いて、各GOIの末端 (C末端) でリンカーアミノ酸残基の有無を評価した。MSは上記のように実施した。結果を以下の表12に示す。

【0253】

【表 1 2】

表 12 - リード候補構築物の C 末端リンカーアミノ酸残基の MS 分析

	構築物の構成 (任意選択のプロモータータイプ)- GOI#1-リンカー-GOI#2-リンカー- GOI#3	リンカーAA 残基の存在(C 末端)?*		
		S100A1	SDF	VEGF
二重リード	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1	あり	なし	n/a
	(CAG)-S100A1-fp2a-VEGF	あり	n/a	なし
一次三重リード	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1-fp2a-VEGF	あり	なし	なし
	(CAG)-S100A1-fp2a-VEGF-fp2a-SDF1	あり	なし	あり
二次三重リード	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1-fmdv-VEGF	あり	なし	なし
	(CAG)-S100A1-fp2a-SDF1-CMV-VEGF	あり	なし	なし
三次三重リード	(CAG)-S100A1-CMV-SDF1-fp2a-VEGF	n/a	なし	なし
	(CAG)-S100A1-CMV-VEGF-fp2a-SDF1	n/a	なし	あり

*「あり」は、C 末端テール上の>2 アミノ酸(AA)(それより多い)残基の存在を示す(これは、本明細書においては、「リンカーテール」と呼ばれる場合がある)。「なし」は、C 末端テール上の<2A または=2A(それより少ないまたは等しい)の存在を示す。

【0 2 5 4】

S 1 0 0 A 1 ポリペプチド二量体化のウェスタンブロット (イムノブロット) 解析

二重遺伝子および三重遺伝子構築物から発現された S 1 0 0 A 1 ポリペプチドの二量体形成を評価するために、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を実施した。トランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞の馴化培地を、S 1 0 0 A 1 の単量体レベルおよび二量体レベルについてのネイティブ PAGE / イムノブロットによって分析した。結果は、リード二重およびリード三重候補から切断された S 1 0 0 A 1 が、主に二量体型である一方、単一エフェクター構築物 p S 1 0 0 A 1 および S 1 0 0 A 1 に対して CMV リンカー C 末端を有する三重遺伝子構築物によって発現される S 1 0 0 A 1 が、主として単量体であることを示す。図 2 4 を参照のこと。

【0 2 5 5】

特に、本発明の独特の態様が提供され、本発明の構築物によってコードされるポリペプチドの特定の連続的な順序によって可能になる。したがって、本発明の一態様では、S 1 0 0 A 1 タンパク質を特異的に配置することは、最初に、S 1 0 0 A 1 に残存する 2 A テールが S 1 0 0 A 1 の生物学的活性に干渉しないことが驚くべきことに発見されたので、生物学的に活性な S 1 0 0 A 1 分子の機能的発現を達成し、可能とする。これに対して、第 2 の遺伝子として S 1 0 0 A 1 を配置することにより、構築物を介して発現した遺伝子の不完全な切断が生じることが発見された。

【0 2 5 6】

したがって、以下の表 1 3 に示されるように、質量分析を用いた p X o X 発現の分析によって、S 1 0 0 A 1 が、C 末端 2 A ペプチドの除去をもたらすフリン切断を示さない唯一のエフェクターであることが示された。したがって、S D F 1 α または V E G F 上には 2 A の C 末端テールが残っていない。S 1 0 0 A 1 のみが 2 A のリンカーテールを有する。正確な終結アミノ酸配列は、P G である。それは P G P 配列の終わりを G と P の間で切断する。したがって、p X o X から発現される S 1 0 0 A 1 上の C 末端リンカーテールは、R A K R A P V K Q G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G (配列番号 1 2 3) に融合された配列 (N 末端から C 末端への) S 1 0 1 A 1 ポリペプチドを含む; これを本明細書では「2 A テール」と呼ぶ場合がある。例えば、一実施形態では、S 1 0 0 A 1 の最初のメチオニンから f p 2 a 切断リンカーテールの C 末端まで、本発明の第 1 の G O

I は、以下の配列を含む：

MGSELETAMETLINVFHAHSGKEGDKYKLSKKE LKELLQT
ELSGFLDAQKDVD AVDKVMKELDENG DGEVDFQEYVVLVA
ALTVACNNFFWENSRAKRAPVKQGS GATNFSLLKQAGDVE
ENPG（配列番号124）

【0257】

しかしながら、本明細書中に提示されるデータを介して提供されるように、このS100A1テールは「不活性」である、すなわちS100A1の機能（生物学的活性）に影響しないことが実証されている。

【0258】

【表13】

表 13- pXoX から発現されたタンパク質の質量分析

pXoX 中のエフェクター	細胞での場所	予想されるタンパク質分解性切断	2A テールの非存在
S100A1	細胞内	あり	なし
SDF-1α	分泌型	あり	あり
VEGF165	分泌型	あり	あり

【実施例 8】

【0259】

三重遺伝子ベクタートランスフェクション

293T細胞を、6ウェルプレートに1ウェルあたり750,000細胞でプレートし、プレートで一晩、37℃/5%CO₂までインキュベーターで一晩インキュベートした。翌日、OptiMEM培地（Life Technologies）で希釈した100ng/mlでプラスミドベクターを用いて、単一（単一遺伝子）、二重（ダブル遺伝子）、三重（三重遺伝子）、表14、遺伝子構築物および適切な対照構築物を有するFuGENE 6（Promega）を用いて、細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞をインキュベートした。細胞上清および溶解物を必要に応じて72時間で採取した。

【0260】

【表14-1】

表 14: pXoX 三重遺伝子ベクター配列

配列番号	構築物	配列
108	pXoX	TAAC TATAACGGTCCTAAGGTAGCGACGTACGAACCGT TGGGCGCGCCTGGGGATAGCGATCGCTGCTGGCGCGGT CCGCTATGAGGTCTCTGATAGACCACAGACGCGTCGAC ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTA CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC AACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCA ATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCCACTTGGCAG TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCC CAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTAC ATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTG AGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCC

【0261】

【表 1 4 - 2】

	TCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTAT TTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCG CGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG GGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGA GCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTATGGCGAGGCGG CGGCGGCGGGCGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGC GGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCCTCGCCCCGTGCC CGCTCCGCCCGCCCTCGCGCCCGCCCGCCCGGCTCTGA CTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG CCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATG ACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGA GGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCT CGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGAGCGCC GCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTG CGGGCGCGGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGC GCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTG CGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGG GGTGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGC GTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCG AGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCC GTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGCGGG GGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGG CGCTCGGGCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGG CGGCCCCGAGCGCGCGGCGGCTGTCGAGGCGCGCGA GCCGAGCCATTGCCTTTATGGTAATCGTGCGAGAGG GCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGTGCGGAGCC GAAATCTGGGAGGCGCGCGCACCCCTCTAGCGGGC GCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGAGGAAGGAAAT GGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCGCGTC CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGG ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTC GGCTTCTGGCGTGTGACGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCT AACCATGTTTCATGCCTTCTCTTTTCTACAGCTCCTGG GCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTGGCA AGAATTCCCTGCAGGAAATTGAGCCCGCAGCCTCCCG
--	---

10

20

30

【表 1 4 - 3】

	CTTCGCTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGACAGTCAGCCGCAT CTTCTTTTGCCTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACA CCGCTAGCATGGGCAGCGAACTGGAAACCGCCATGGAG ACTTTGATAAATGTTTTCCACGCGCATAGCGGCAAAGA AGGGGACAAGTACAAGCTGTCAAAAAGGAGCTGAAA GAACTGCTGCAGACCGAATTGAGCGGCTTCCTGGACGC TCAGAAAGATGTCGATGCCGTCGACAAAGTGATGAAAG AGCTTGACGAGAACGGTGACGGTGAAGTCGATTTTCAG GAATATGTGGTGCTGGTGGCCGCCCTTACTGTAGCATGC AACAAATTTCTTTGGGAAAATTCACGTGCAAAGCGTGC ACCGGTGAAACAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCC TGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGG ACCTATGAATGCCAAGGTCGTTGTGGTGCTTGTACTTGT GCTGACTGCTCTGTGCTGAGCGACGAAAACCACTCT CCCTCAGCTACAGGTGCCCATGCCGATTCTTCAATCTC ATGTGGCCCGGGCCAATGTGAAGCACTTGAAAATCCTG AATACACCCAACCTGCGCGTTGCAGATCGTGGCCCGCCT GAAAAATAATAATAGGCAGGTATGTATAGATCCAAAGC TTAAGTGGATCCAGGAGTATCTGGAAAAGGCTCTCAAT AAACGTGCAAAGCGTGCACCGGTGAAACAGGGAAGCG GAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGAC GTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGAATTTTCTGCTCTCT TGGGTGCACTGGTCACTGGCACTGCTGCTGTATCTGCAC CATGCAAAATGGTCCCAAGCAGCTCCCATGGCAGAGGG AGGTGGACAGAATCATCATGAGGTTGTCAAATTTATGG ATGTCTACCAGCGGAGCTACTGCCACCCAATTGAGACG TTGGTAGACATTTTTCAGGAATATCCAGACGAGATTGA GTACATTTTCAAGCCTAGCTGTGTGCCCTTGATGCGATG CGGTGGCTGTTGCAATGATGAGGGACTCGAGTGTGTCC CCACCGAGGAAAGCAATATAACCATGCAAATCATGCGA ATCAAACCCCAACAGGGCCAGCATATCGGCGAGATGTC TTTCTTGCAACATAACAAATGCGAGTGTGCGCCAAAAGA AGGACAGGGCTCGCCAGGAAAATCCCTGTGGTCTTGT TCAGAGCGCAGGAAGCATCTTTTCGTCCAGGATCCGCA GACTTGTAATGTTCATGCAAGAATACCGATTCTAGGT
--	---

10

20

30

【表 1 4 - 4】

	GTAAGGCGAGGCAACTCGAGCTTAACGAGAGAACCTGT AGGTGTGACAAACCTAGAAGATAAATCGATTACGCTCC TCTACTCTTTGAGACATCACTGGCCTATAATAAATGGGT TAATTTATGTAACAAAATTGCCTTGGCTTGTAACTTTA TTAGACATTCTGATGTTTGCATTGTGTAATACTGTTGT ATTGGAAAAGCGTGCCAAGATGGATTATTGTAATTCAG TGTCTTTTTTAGTAGCGTCACGTGCCAAACACTGTTAGT CACAGAGGGCATGAGACAGCCTGTGCTGGAACAGCTCA GTTTCATAGGGCTATGGAGATGGGGAGAAAGGGGCGCTT CTGTGAGAGACAAGCTGTGGTCTGGGAAGGCCTTAGCA CTAAAAGCACCACAATGAGAAGCAACCGCCAGAAGCA GGGCCCCGAGGCCTTTGTTCAGCTGCAAAGAGAAAGG AAAAAGTGGGGAATAAGAGTTGGGGCTGCGGAGGGGG TGGGGAGCATTGTGCAGGTTCGGTACTTGAACAGAAAG CAGGGACCAACACAAGGAAGGCTCGAGCTGGCGGAAT AGGTTCCAATCTGTGCGGCCGCATTACCCTGTTATCCC TAATCTCGTTTAACTATGACTCTCTTAAGGTAGCCAAAT TCCGGAACATAAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT CCAGTCGGGAAACCTGTGTCGTCAGCTGCATAAATGAA TCGGCCAAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGG CGCGCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG GTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTCC ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGA CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATA AAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGT CCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATA GCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTT GCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCA CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG TCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG
--	--

10

20

30

【 0 2 6 4 】

【表 1 4 - 5】

		GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC GGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCT GCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCT CTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGT TTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA AGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC TGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTT TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC CTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGT ATATATGAGTAAACTTGGTCTGACATGCGCATCTGACG CTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTC ATGCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGC GATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCA CGAGGAAGCGGTCAGCCATTTCGCCCAAGCTCTTCA GCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCG GTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAG AAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAG GCATCGCCATGGGTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGG CATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCG CGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGA CAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATG CGATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGG ATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGA TGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGG AGATCCTGCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTC CCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGC AAGGAACGCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCT GCCTCGTCCTGCAGTTTATTAGGGACCGGACAGGTC GGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACA GCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGT TGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGC GGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCAT GCGAAACGATCCTCATTCAATTTATCAGGGTTATTGTCTC ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGGCTGAGCA TCTATGTCGGGTGCGGAGAAAGAGTAATGAAATGGCA
--	--	---

10

20

30

【表 1 4 - 6】

		GGCGCCTTTTCGTTAGATATGTAGTAAGTATCTTAATA TACAGCTTTATCTGTTTTTAAGATACTTACTACTTTCT TAGTGGAACTATTAGTGGCTGTAAATTAAGCTAGTACT ACCCAAGATTTGACAGAATGCATCGTTTGCATTGCAA
--	--	--

40

【0 2 6 5】

【表 15】

表 15: pXoX の成分

pXoX の成分		配列番号 108 中の ヌクレオチド位置
プラスミド骨格		1-114 (114 bp); 3753-3852 (100 bp); 4905-4960 (56 bp); および, 5756-6025 (270 bp)
CAG プロモーター		115-1825 (1711 bp)
GAPDH 5' UTR		1841-1942 (102 bp)
S100A1		1949-2230 (282 bp)
フリン切断部位	fp2a リンカー	2231-2242 (12 bp)
5 アミノ酸リンカー		2243-2257 (15 bp)
GSG/P2A		2258-2323 (66 bp)
SDF-1 α		2324-2590 (267 bp)
フリン切断部位	fp2a リンカー	2591-2602 (12 bp)
5 アミノ酸リンカー		2603-2617 (15 bp)
GSG/P2A		2618-2683 (66 bp)
VEGF		2684-3259 (576 bp)
F3R 合成 3' UTR		3266-3752 (487 bp)
ORI6		3853-4904 (1052 bp)
カナマイシン耐性遺伝子		4961-5755 (795 bp)

【0266】

結果

pXoX 由来のエフェクターが単一の多重遺伝子 mRNA として発現されるので、各エフェクターの相対的発現は固定される。pXoX の各エフェクターの相対発現レベルを決定するために、いくつかの関連する細胞株をトランスフェクトし、タンパク質発現を ELISA によって評価した。個々のエフェクター (pS100A1、pSDF-1 α または pVEGF165) のそれぞれまたは 3 つのエフェクター (pXoX) の全てについて、細胞をプラスミドでトランスフェクトした。

【0267】

したがって、表 16 に示すように、S100A1、SDF-1 α および VEGF165 をコードする pXoX 三重遺伝子ベクターでトランスフェクトされた様々な細胞は、ELISA アッセイによって検出されるように、測定可能なレベルのタンパク質を産生した。試験した細胞型は、293T 細胞、SV40 形質転換心筋細胞、健常個体由来の iPSC-CM (心筋細胞)、拡張型心筋症患者由来の iPSC-CM、および肥大型心筋症患者由来の iPSC-CM を含んだ。

【0268】

トランスフェクションの 72 時間後、培地および細胞溶解物を収集し、別々に分析して

、分泌タンパク質（VEGF165およびSDF-1 α ）または細胞内タンパク質（S100A1）の発現を評価した。以下の表16は、各エフェクターを個別に発現するプラスミドによって達成されるレベルと比較した、各エフェクターのタンパク質レベルを、ng/mLとして表す。

【0269】

【表16】

表16: 様々な細胞型における単一遺伝子および三重遺伝子発現プラスミドからのポリペプチド発現の検出。

	プラスミド 構築物	S100A1 [ng/mL]	SDF-1 α [ng/mL]	VEGF165 [ng/mL]
293T 細胞	偽	0.0	0.0	0.0
	pS100A1 のみ	182.6	0.0	0.0
	pSDF-1 α のみ	0.0	114.3	0.0
	pVEGF165 のみ	0.0	0.0	>600.0
	pXoX	1466.6	92.2	>600.0
SV40 心筋細胞	偽	0.0	0.6	0.4
	pS100A1 のみ	57.8	0.1	0.4
	pSDF-1 α のみ	0.0	20.9	0.4
	pVEGF165 のみ	0.0	0.2	386.1
	pXoX	155.3	7.4	50.0
健常個体由来 の iPSC-CM	偽	0.0	0.3	0.0
	pS100A1 のみ	1182.0	0.3	0.0
	pSDF-1 α のみ	0.0	13.2	0.0
	pVEGF165 のみ	0.0	0.4	190.5
	pXoX	1082.4	4.3	17.3
拡張型心筋症 患者由来の iPSC-CM	偽	0.0	0.1	0.0
	pS100A1 のみ	518.0	0.7	0.0
	pSDF-1 α のみ	0.0	6.0	0.0
	pVEGF165 のみ	0.0	1.0	191.0
	pXoX	257.0	1.9	15.6
肥大型心筋症 患者由来の iPSC-CM	偽	23.3	0.1	0.0
	pS100A1 のみ	361.7	0.1	0.0
	pSDF-1 α のみ	23.2	7.7	0.0
	pVEGF165 のみ	19.4	0.7	180.5
	pXoX	118.0	1.6	13.6

【0270】

実施例8 心筋細胞トランスフェクション

SV40不死化心筋細胞

SV40不死化心筋細胞を、少なくとも2つの遺伝子が本明細書に記載のリンカーによって連結されているXogene単一遺伝子、二重遺伝子（ダブル遺伝子）、三重遺伝子構築物、および適切な対照構築物を用いてDNAフェクチン Plus（ABM）を介してトランスフェクトした。6ウェルプレートを、細胞外マトリックス（ABM）で一晩コーティングした。24時間後、心筋細胞を、各ECMコーティングウェル中に225,000細胞／ウェルで、6ウェルプレートに播種した。その細胞を37℃／5%CO₂で一晩インキュベートした。72時間後、培地を細胞から2mLの深いウェルブロックに集め、タンパク質産生の検出および定量的ためにELISA用に保存した。

10

【0271】

iPSC心筋細胞

iPSC心筋細胞を、GeneJammerトランスフェクション試薬（Agilent）を介してXogene単一遺伝子、二重遺伝子（ダブル遺伝子）、三重遺伝子構築物および適切な対照構築物でトランスフェクトした。12ウェルプレートを、フィブロネクチン（ThermoScientific）でコーティングし、37℃／5%CO₂で1時間インキュベートした。DNaseを超純水中で10mg／mLの最終濃度に再構成した。心筋細胞を、TrypLEおよび1X DNase Iを用いてトリプシン処理し、37℃で5分間または細胞がフラスコから剥がれるまでインキュベートした。iPSC細胞を、12ウェルプレートの各フィブロネクチンコーティングウェルに4e5細胞／ウェルで播種した。プレートした細胞を、37℃／5%CO₂インキュベーターで24時間インキュベートした。翌日、心筋細胞を、プラスミドDNAを用いて2μgでトランスフェクトした（pXoXおよび対照）。

20

【0272】

結果

S100A、SDF1、VEGF165をコードする三重遺伝子ベクターでトランスフェクトした不死化および一次心筋細胞は、測定可能なレベルのタンパク質を産生した（図21）。

【実施例9】

30

【0273】

トランスフェクトされた心筋細胞によるタンパク質産生の定量化

293T細胞、SV40 CMおよびiPSC CM由来の溶解産物を、BuPH炭酸塩－重炭酸緩衝液パック（0.2M）（ThermoFisher）で1：100に希釈し、ELISAアッセイによって分析した。

【0274】

結果

トランスフェクトされた293T細胞、SV40 CMおよびiPSC CMの細胞溶解物において、S100A1、SDF-1α、およびVEGF165タンパク質が検出された（図21）。

40

【実施例10】

【0275】

拍動速度および収縮持続時間

pXoXの有効性およびpXoXによって発現されるS100A1の機能を評価するために、pXoXまたは適切な対照でトランスフェクトされた健常な個体および拡張型心筋症患者由来のiPSC－心筋細胞（心臓TNNT2遺伝子におけるR173W突然変異を有する）の収縮特性を、Sony S18000 Live Cell Imaging Systemで測定した。細胞収縮は、高解像度および高フレームレートの映像（2048×2048ピクセル、150fps、1ウェルあたり10秒）として記録された。収縮映像をさらにソニーS18000Cアナライザソフトウェアで分析し、収縮パラメータ

50

を、個々のウェルごとに取り出した。インキュベーションの30分以内に記録された収縮特性に基づいて、 β -アドレナリン刺激（イソプロテレノール（ISO、100 nM））に対するiPSC-CMの応答性を測定した。研究の間に3つの収縮パラメータ、すなわち拍動速度、収縮速度（速度）および収縮持続時間を評価した。

【0276】

結果

拍動速度および収縮持続時間によって、S100A1をコードするベクターの3'末端に2Aテールが存在することがS100A1の機能に影響しないことが示される（図18Aおよび図18B）。別の実験では、示された拍動速度および収縮持続時間（図19A、図19B、図19C）は、トランスフェクトされたiPSC-CM細胞から産生されたタンパク質による健全な対照レベルへのDCM収縮特性の回復を示す。

【0277】

したがって、これらの結果は、拡張型心筋症患者に由来するiPSC-心筋細胞のインビトロ収縮特性が、pStufferおよび非トランスフェクション対照と比較して、pS100A1、pS100A1-SDF-1 α 、およびpXoXで改善されたことを実証する。（pStufferは、オープンリーディングフレーム（ORF）が非発現、類似サイズのスタッパー配列で置換された、pXoXと同じ骨格構成を有するプラスミドである）。

【0278】

pS100A1およびpS100A1-SDF-1 α は、匹敵する機能的出力（拍動速度の増大、収縮持続時間の改善）を示しており、これによって、pS100A1-SDF-1 α およびpXoXにおけるS100A1の3'末端の2Aテールの存在がS100A1機能に影響を及ぼさないことが示唆されている。

【0279】

pXoXは、拡張型心筋症患者の収縮特性を健全な個体で観察されるレベルに回復するのに最も有効であり、これによってpXoXのエフェクターが相補的であることが示唆されている。

【実施例11】

【0280】

リコンビナーゼ滴定

図28では、pXoX三重遺伝子発現ベクターとリコンビナーゼとの様々な比を有する、SV40形質転換心筋細胞にトランスフェクトした場合の、VEGFの発現の持続性を検出するためにELISA分析を行ったリコンビナーゼ滴定実験におけるVEGFの発現データを示す。トランスフェクション後3日目に、SPBc2群とStuffer群との間にVEGF発現に有意差はなかった。トランスフェクション後10、17、および24日目に、ルシフェラーゼ：リコンビナーゼ比が1：0.2～1：0.04である場合、SPBc2群は、対照（Stuffer）群より有意に多くのVEGF分泌を示した。

【0281】

図29は、リコンビナーゼ滴定実験におけるSDF-1 α 発現のデータを示しており、ここでは、ELISA分析を行って、SV40形質転換心筋細胞にトランスフェクトされたときのSDF-1 α の発現の持続性を、pXoX三重遺伝子発現ベクターとリコンビナーゼとの様々な比で検出した。トランスフェクション後3日目に、SPBc2群とStuffer群との間のSDF1発現に有意差はなかった。SDF1タンパク質レベルは、トランスフェクションの10日後および17日後の検出の限界未満であった。SDF1タンパク質レベルは、トランスフェクション後24日で検出され、このポイントでは、ルシフェラーゼ：リコンビナーゼ比が1：0.2～1：0.04である場合、SPBc2群が、対照（Stuffer）群より有意に多くのSDF1分泌を示した。

【0282】

図30は、リコンビナーゼの有無でトランスフェクトした心筋細胞におけるS100A1の発現のデータを示す。トランスフェクション後3日目に、SPBc2群とStuffer

er群との間でS100A1発現の有意差はなかった。トランスフェクション後、10、17および24日目に、SPBc2群は、対照(Suffer)群よりも有意に多くのS100A1分泌を示した。

【実施例12】

【0283】

ラットにおけるプラスミド骨格発現研究

pXoXは、カナマイシン耐性遺伝子を有する標準的なプラスミド骨格を有する。さらに、エフェクタータンパク質の発現は、ハイブリッドCAGプロモーターによって駆動され、表15に記載されるような合成3'UTR/ポリAテールを利用する。この骨格構成が心臓における遺伝子発現を維持する能力を経時的に検証するために、pXoX中のエフェクターORFをルシフェラーゼ(fLuc)レポーター遺伝子(pCAG-fLuc)に置き換え、心臓へのプラスミド注入後のルシフェラーゼ発現持続時間中の生きた動物の画像化によって評価した。プラスミドサイズおよびバックグラウンドfLuc発現の対照として、CMVプロモーターおよび非発現スタッパー配列(pCMV-stuffer)を有する同様のプラスミドを用いた。

【0284】

この発現研究のために、プラスミドDNA(250μg)を、12~14週齢の雌性Sprague Dawleyラットの左室壁に注射した(1群あたりn=5)。ラットを経時的にモニターし、生存インビボ画像化システム(IVIS)を用いてルシフェラーゼ発現レベルを測定した。pCAG-fLucを注射したラットにおけるルシフェラーゼ活性は、対照pCMV-fLuc構築物を注射したラットで観察されたバックグラウンドレベルよりも最初に2対数高かった。発現レベルは、一時的にプラスミドを発現することで期待されるように、投薬後28日にわたって徐々に低下した。これらの知見によって、このプラスミド骨格が、28日目に対照レベル近くまで徐々に減少するタンパク質発現を開始することができることが示されている。データは示さず。

【実施例13】

【0285】

送達方法—豚の冠状静脈洞を通る逆行性注入

冠状静脈洞を介した逆行性注入は、非ウイルスプラスミド構築物(限定されないが、pXoXなど)の心臓への送達の提案された方法である。この送達方法の技術的な複雑性によって、マウスおよびラットのような小動物モデルではその評価が不可能になる。したがって、薬理学および毒物学/生体内分布研究での使用のためにはブタが提案されている。この方法の実現可能性を試験するために、試験対象としてブタでパイロット研究を行った。標準的な介入技術を用いて、バルーンカテーテル(Cook Regentec)を、ワイヤーを介して冠状静脈洞に入れた。バルーンを膨らませ、閉塞を確認し、ルシフェラーゼレポータープラスミドの注入を続けた。3つの異なる用量(40mg、80mgおよび120mg)を、1mg/mLのプラスミド濃度で試験した。合計9匹の動物を研究し、各用量について3回繰り返した。各動物において、全ての容量が投与されるまで、10mL刻みで注入を行った。注入は、10mL/分であり、注入後のバルーン閉塞は10分間であった。

【0286】

プラスミド注入の約24時間後、大きな心臓静脈をカテーテル挿入し、D-ルシフェリン基質溶液(約0.125mg/mL濃度)を、冠動脈系に注入した。次いで、動物を安楽死させ、心臓を外植した。外植された心臓を、続いて、IVIS(登録商標)Lumina画像化システムを用いて、CCDカメラカウントを介して生物発光について評価した。単離された心臓の注入後24時間でのルシフェラーゼ放射強度および分布を示す生物発光画像を図9に示し、これは、投与後24時間以内に心臓細胞によるプラスミド媒介ルシフェラーゼ発現が起こることを示している。

【0287】

プラスミド媒介性ルシフェラーゼ発現のさらなる生体内分布を、心臓および肺組織切片

において研究した。RT-PCRデータは、120mg処置群のブタの心臓左心室においてのみシフェラーゼ発現をさらに確認した（データ示さず）。予定された屠殺の前に死ぬ動物はいなかった。したがって、この研究によって、pXoXなどの非ウイルスプラスミドの送達が安全で実用的であり、プラスミドの全身分布が制限されることが実証された。

【実施例14】

【0288】

超音波標的マイクロバブル破壊（UTMD）法〔64〕を用いたラットにおけるアドリマイシン誘発性心筋症におけるpXoXによるインビボの心筋細胞再生

心筋症を誘発するアドリマイシンは、うっ血性心不全（CHF）の十分に確立されたモデルである。アドリマイシン誘発性心筋症においてラット心臓にpXoX（生物学的に活性なSDF1 α 、S100A1、およびVEGFを発現する）を送達するために、超音波標的マイクロバブル破壊（UTMD）法を使用した。確立されたアドリマイシン誘発性心筋症を有する合計16匹のラットを、8匹の2つの群に分けた。各群は：（1）pStufferまたは（2）pXoXの2つのプラスミドのうちの1つで処理した。pStufferは、非発現の類似のサイズの「stuffer」配列で置換したオープンリーディングフレーム（ORF）を有する、pXoXと同じ骨格構成を有する陰性対照プラスミドである。リポフェクタミン3000（Invitrogen、Carlsbad、CA）50mlに溶解した2mgのプラスミドと混合した、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン2.5mg/ml、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルエタノールアミン0.5mg/ml、および10%グリセロールの溶液中で、プラスミド含有脂質安定化マイクロバブルを調製した。0.5mlのこのリン脂質-プラスミド溶液のアリコート、1.5mlの透明なバイアルに入れた；残りのヘッドスペースを、パーフルオロプロパンガス（Air Products、Inc、Allentown、PA）で充填した。各バイアルを、4℃で30分間インキュベートした後、歯科用アマルガム装置（Vialmix（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Medical Imaging N. Billerica、MA）により30秒間機械的に振とうした。左心室ビューの2D胸骨短軸の下で、Mモードで12MHz広帯域トランスデューサ（S12プローブ、Philips Ultrasound、Bothell、WA）で取得したデジタル画像から、短縮率、LV後壁厚、および心室中隔拡張末期および収縮末期（IVSd）の心エコー測定を行った。

【0289】

心臓の構造および機能の心エコー測定の結果、UTMD-pXoX遺伝子治療が、短縮率指数、LV後壁径、およびIVSdを回復させることが実証される（図31A、図31B、および図31C）。値は、平均±SEMとして示される。* $P < 0.001$ 対pStuffer。結果によって、心エコー検査により、単一のUTMD-pXoX処置後の確立されたADM心筋症の逆転が実証されたことが示され、それにより生物学的に活性なSDF1 α 、S100A1、およびVEGFを発現する（リンカーを有する三重遺伝子）pXoX構築物の投与によるうっ血性心不全モデルにおける心筋症のインビボ治療の成功が示される。

【0290】

pStufferまたはpXoXプラスミドを投与されたラットの心細胞におけるPHH3（リン酸化ヒストンH3（Ser10））有糸分裂マーカーシグナルの核局在の結果を図32に示しており、これは、心筋細胞の再生を示す。PHH3有糸分裂マーカーは、UTMD-pXoXを用いて、確立された心不全を有する成体ラット心筋細胞の増殖を確認した。早期心臓前駆細胞のマーカーであるISL-1の陰性の結果は、前駆細胞が同じラットにおいて再生に関与しないことを確認している（図33）。心筋細胞の再生が確認されたISL-1の陰性の結果は、真にUTMD-pXoX遺伝子治療の結果である。

【0291】

これらの結果により、生物学的に活性なSDF1 α 、S100A1、およびVEGFを

10

20

30

40

50

発現する p X o X 構築物の投与が、うっ血性心不全モデルにおける心筋細胞再生および心筋症の良好な処置に有用であることが示される。この結果によってまた、超音波標的マイクロバブル破壊 (U T M D) が、例えば心臓病および他の病状の治療のための p X o X などの多重遺伝子構築物を含む、本明細書に記載のベクターおよび遺伝子構築物を投与する首尾良い方法であることも示されている。

【0292】

本発明の好ましい実施形態が本明細書に示され説明されたが、当業者には、そのような実施形態は単なる例示として提供されることは明らかであろう。本発明から逸脱することなく、当業者にはここで数多くの変形、変更、および置換が可能である。本明細書に記載された本発明の実施形態に対する様々な代替物が、本発明の実施において採用され得ることを理解すべきである。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲を定義していること、ならびにこれらの特許請求の範囲内の方法および構造ならびにそれらの等価物がその特許請求の範囲によってカバーされることが意図される。

10

本発明は以下の態様を含み得る。

〔1〕

S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質 (S 1 0 0) ポリペプチドおよび第 2 の機能性ポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドであって、前記第 2 の機能性ポリペプチドが、サイトカイン、ケモカイン、血管新生ポリペプチド、およびそれらの任意の機能性誘導体のうちの少なくとも 1 つである、ポリヌクレオチド。

20

〔2〕

前記 S 1 0 0 ポリペプチドが、S 1 0 0 A 1、その断片またはバリエーションである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

〔3〕

前記第 2 の機能性ポリペプチドが、血管新生ポリペプチドである、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

〔4〕

前記血管新生ポリペプチドが、血管内皮成長因子 (V E G F) ポリペプチドである、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

〔5〕

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 2 1、V E G F 1 2 1 b、V E G F 1 4 5、V E G F 1 6 5、V E G F 1 6 5 b、V E G F 1 8 9、V E G F 1 9 1、V E G F 2 0 6、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

30

〔6〕

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 6 5 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 4 から 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

〔7〕

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 9 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 4 から 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

40

〔8〕

前記第 2 の機能性ポリペプチドが、ケモカインである、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

〔9〕

前記ケモカインが、ストロマ細胞由来因子 1 (S D F) ポリペプチドである、請求項 8 に記載のポリヌクレオチド。

〔10〕

前記 S D F ポリペプチドが、S D F 1、S D F - 1 α 、S D F - 1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

〔11〕

50

前記 S D F ポリペプチドが、S D F 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 9 から 1 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 2]

前記 S 1 0 0 ポリペプチドが、第 1 のポリペプチドリンカーによって前記第 2 のポリペプチドに結合される、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 3]

前記リンカーが、切断可能なリンカーである、請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

[1 4]

前記ポリペプチド構築物が、第 3 の機能性ポリペプチドをさらに含む、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 5]

前記第 3 の機能性ポリペプチドが、サイトカイン、ケモカイン、血管新生ポリペプチド、およびそれらの任意の機能性誘導体のうちの少なくとも 1 つである、請求項 1 4 に記載のポリヌクレオチド。

[1 6]

前記第 3 の機能性ポリペプチドが、血管新生ポリペプチドである、請求項 1 4 から 1 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 7]

前記血管新生ポリペプチドが、V E G F ポリペプチドである、請求項 1 6 に記載のポリヌクレオチド。

[1 8]

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 2 1、V E G F 1 2 1 b、V E G F 1 4 5、V E G F 1 6 5、V E G F 1 6 5 b、V E G F 1 8 9、V E G F 1 9 1、V E G F 2 0 6、およびそれらの断片またはバリエーションからなる群から選択される、請求項 1 7 に記載のポリヌクレオチド。

[1 9]

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 6 5 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 7 から 1 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[2 0]

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 9 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 7 から 1 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[2 1]

前記第 3 の機能性ポリペプチドが、ケモカインである、請求項 1 4 から 1 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[2 2]

前記ケモカインが、S D F ポリペプチドである、請求項 2 1 に記載のポリヌクレオチド。

[2 3]

前記 S D F ポリペプチドが、S D F 1、S D F - 1 α 、S D F - 1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される、請求項 2 2 に記載のポリヌクレオチド。

[2 4]

前記 S D F ポリペプチドが、S D F 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 2 2 から 2 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[2 5]

前記第 3 の機能性ポリペプチドが、任意選択で切断可能である第 2 のポリペプチドリンカーによって、前記 S 1 0 0 ポリペプチドおよび前記第 2 の機能性ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つに結合される、請求項 1 4 から 2 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[2 6]

前記第 1 および第 2 のポリペプチドリンカーが、f p 2 a、p 2 a、G S G - p 2 a、

10

20

30

40

50

および f m d v からなるリストから独立して選択される、請求項 1 2 から 2 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[2 7]

請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

[2 8]

請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞。

[2 9]

心臓状態を処置する方法であって、細胞を、治療有効量の請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドと接触させるステップを含む、方法。

10

[3 0]

前記細胞が、心筋細胞である、請求項 2 9 に記載の方法。

[3 1]

対象における心筋症を処置する方法であって、前記対象に、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む治療有効量の組成物を提供するステップを含む、方法。

[3 2]

前記対象が、ヒト対象である、請求項 3 1 に記載の方法。

[3 3]

前記対象が、少なくとも 1 つの追加の療法によって処置される、請求項 3 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

[3 4]

請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、または前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

[3 5]

少なくとも第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドを含む少なくとも 1 つのポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドであって、

i . 前記第 1 のポリペプチドが、血管新生ポリペプチドであり、

i i . 前記第 2 のポリペプチドが、ケモカインまたはそのバリエーションもしくは断片である、ポリヌクレオチド。

30

[3 6]

前記血管新生ポリペプチドが、V E G F 1 2 1、V E G F 1 2 1 b、V E G F 1 4 5、V E G F 1 6 5、V E G F 1 6 5 b、V E G F 1 8 9、V E G F 1 9 1、V E G F 2 0 6、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される V E G F ポリペプチドである、請求項 3 5 に記載のポリヌクレオチド。

[3 7]

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 6 5 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 3 6 に記載のポリヌクレオチド。

[3 8]

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 9 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 3 6 に記載のポリヌクレオチド。

40

[3 9]

前記第 2 のポリペプチドが、S D F ポリペプチドである、請求項 3 5 に記載のポリヌクレオチド。

[4 0]

前記 S D F ポリペプチドが、S D F 1、S D F - 1 α、S D F - 1 β、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される、請求項 3 9 に記載のポリヌクレオチド。

[4 1]

前記 S D F ポリペプチドが、S D F 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有す

50

る配列を含む、請求項 39 から 40 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[4 2]

対象における血管発生を改善する方法であって、前記対象に、請求項 35 から 41 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含む治療有効量の組成物を提供するステップを含む、方法。

[4 3]

S D F 1 ポリペプチド、S 1 0 0 A 1 ポリペプチド、V E G F ポリペプチド、ならびにそれらの断片およびバリエーションから選択される少なくとも 2 つのポリペプチドに作動可能に連結された少なくとも 1 つのプロモーターを含む発現ベクター。

[4 4]

前記少なくとも 2 つのポリペプチドが、リンカーによって結合される、請求項 43 に記載の発現ベクター。

[4 5]

前記少なくとも 1 つのプロモーターが、C A G プロモーター、C M V プロモーター、S V 4 0 プロモーター、アデノウイルスプロモーター、ベータアクチンプロモーター、メタロチオニンプロモーター、E F 1 a プロモーター、ミオシン軽鎖プロモーター、ミオシン重鎖プロモーター、および N C X 1 プロモーターからなる群から選択される、請求項 43 から 44 のいずれか一項に記載の発現ベクター。

[4 6]

前記発現ベクターが、心臓発現ベクターである、請求項 43 から 45 のいずれか一項に記載の発現ベクター。

[4 7]

少なくとも第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドを含むポリペプチド構築物であって、

i . 前記第 1 のポリペプチドが、カルシウム結合タンパク質、またはそのバリエーションもしくは断片であり、

i i . 前記第 2 のポリペプチドが、血管新生ポリペプチド、ケモカイン、またはそれらのバリエーションもしくは断片である、ポリペプチド構築物。

[4 8]

少なくとも第 1 のポリペプチド、第 2 のポリペプチド、および第 3 のポリペプチドを含むポリペプチド構築物であって、

i . 前記第 1 のポリペプチドが、血管新生ポリペプチド、またはそのバリエーションもしくは断片であり、

i i . 前記第 2 のポリペプチドが、ケモカイン、またはそのバリエーションもしくは断片であり、

i i i . 前記第 3 のポリペプチドが、カルシウム結合タンパク質、またはそのバリエーションもしくは断片である、ポリペプチド構築物。

[4 9]

S 1 0 0 A 1、そのバリエーションまたは断片を含む、請求項 47 から 48 のいずれか一項に記載の構築物。

[5 0]

S D F 1、そのバリエーションまたは断片を含む、請求項 47 から 49 のいずれか一項に記載の構築物。

[5 1]

V E G F、そのバリエーションまたは断片を含む、請求項 47 から 50 のいずれか一項に記載の構築物。

[5 2]

少なくとも 1 つの受容体と複合体を形成した、請求項 47 から 51 のいずれか一項に記載の構築物を含む複合体。

[5 3]

10

20

30

40

50

請求項 4 7 から 5 1 のいずれか一項に記載の構築物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

[5 4]

対象における心筋症を処置する方法であって、前記対象に、請求項 4 7 から 5 1 のいずれか一項に記載の構築物を含む治療有効量の組成物を提供するステップを含む、方法。

[5 5]

少なくとも 1 つの心細胞を、少なくとも第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドと接触させるステップを含み、前記第 1 のポリペプチドが、血管新生ポリペプチド、そのバリエーションまたは断片であり、前記第 2 のポリペプチドが、ケモカイン、カルシウム結合タンパク質、またはそれらのバリエーションもしくは断片である、方法。

10

[5 6]

前記血管新生ポリペプチド、そのバリエーションまたは断片が、VEGF 1 2 1、VEGF 1 2 1 b、VEGF 1 4 5、VEGF 1 6 5、VEGF 1 6 5 b、VEGF 1 8 9、VEGF 1 9 1、VEGF 2 0 6、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される VEGF ポリペプチドである、請求項 5 5 に記載の方法。

[5 7]

前記 VEGF ポリペプチドが、VEGF 1 6 5 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 5 6 に記載のポリヌクレオチド。

[5 8]

前記 VEGF ポリペプチドが、VEGF 1 9 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 5 6 に記載のポリヌクレオチド。

20

[5 9]

前記第 2 のポリペプチドが、ケモカインである、請求項 5 5 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

[6 0]

前記ケモカインが、ストロマ細胞由来因子 1 (SDF) ポリペプチドである、請求項 5 9 に記載の方法。

[6 1]

前記 SDF ポリペプチドが、SDF 1、SDF-1 α 、SDF-1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される、請求項 6 0 に記載の方法。

30

[6 2]

前記 SDF ポリペプチドが、SDF 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 6 0 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

[6 3]

ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、エキスピボで導入される、請求項 5 5 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

[6 4]

ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、インビボで導入される、請求項 5 5 から 6 2 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

[6 5]

前記インビボでの導入が、経皮冠状動脈カテーテル法、冠状静脈遮断、心臓再循環、順行性冠状動脈注入、逆行性灌流、直接注射、超音波標的マイクロバブル破壊、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

[6 6]

少なくとも 1 つの追加の療法の投与をさらに含む、請求項 5 5 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

[6 7]

対象における血管発生を改善する方法であって、前記対象に、VEGF ポリペプチド、ならびに SDF ポリペプチドおよび S 1 0 0 ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つを含む

50

構築物をコードする、ある量のポリヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。

[6 8]

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 2 1、V E G F 1 2 1 b、V E G F 1 4 5、V E G F 1 6 5、V E G F 1 6 5 b、V E G F 1 8 9、V E G F 1 9 1、V E G F 2 0 6、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される、請求項 6 7 に記載の方法。

[6 9]

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 6 5 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 6 8 に記載の方法。

[7 0]

前記 V E G F ポリペプチドが、V E G F 1 9 1 の配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 6 8 に記載の方法。

10

[7 1]

前記 S D F ポリペプチドが、S D F 1、S D F - 1 α 、S D F - 1 β 、それらの断片およびバリエーションからなる群から選択される、請求項 6 7 から 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

[7 2]

前記 S 1 0 0 ポリペプチドが、S 1 0 0 A 1、その断片またはバリエーションである、請求項 6 7 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

[7 3]

前記対象が心筋症を有する、請求項 6 7 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

[7 4]

前記心筋症が、拡張型心筋症 (D C M)、肥大型心筋症 (H C M)、拘束型心筋症 (R C M)、不整脈原性右室心筋症 (A R V C)、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 7 3 に記載の方法。

[7 5]

対象における心血管状態を処置または予防する方法であって、前記対象に、S 1 0 0 A ポリペプチドおよび第 2 の機能性ポリペプチドを含むある量の構築物を投与するステップを含み、前記第 2 の機能性ポリペプチドが、サイトカイン、ケモカイン、および血管新生ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つである、方法。

[7 6]

前記投与が、予防的に行われる、請求項 7 5 に記載の方法。

30

[7 7]

前記投与が、治療的に行われる、請求項 7 5 に記載の方法。

[7 8]

前記対象への少なくとも 1 つの追加の処置の投与をさらに含む、請求項 7 5 から 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

[7 9]

前記第 2 の機能性ポリペプチドが、V E G F、S D F、またはそれらの組合せである、請求項 7 5 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

[8 0]

遺伝子治療の方法であって、対象に、
a. 機能性タンパク質またはその部分をコードする少なくとも 2 つの遺伝子、
b. 少なくとも 1 つのプロモーター、および
c. 少なくとも 1 つの操作された組換え部位
を含む、少なくとも 1 つの非ウイルスベクターを投与するステップを含み、
前記少なくとも 1 つのプロモーターが、前記少なくとも 2 つの遺伝子の発現を駆動する、
方法。

40

[8 1]

前記少なくとも 1 つのプロモーターが、構成的である、請求項 8 0 に記載の方法。

[8 2]

50

前記少なくとも1つのプロモーターが、組織特異的である、請求項80に記載の方法。

[83]

前記少なくとも1つのプロモーターが、誘導性である、請求項80に記載の方法。

[84]

前記少なくとも1つの組織特異的プロモーターが、ミオシン軽鎖（MLC）プロモーターである、請求項82に記載の方法。

[85]

前記誘導性プロモーターが、小分子リガンド誘導性2ポリペプチドエクジソン受容体ベース遺伝子スイッチである、請求項83に記載の方法。

[86]

前記誘導性プロモーターが、前記少なくとも2つの遺伝子の発現の用量調節型制御にリガンドを利用する、請求項83または85に記載の方法。

[87]

前記リガンドが、エクジステロイド、9シス-レチノイン酸、レチノイン酸の合成類似体、N, N'-ジアシルヒドラジン、オキサジアゾリン、ジベンゾイルアルキルシアノヒドラジン、N-アルキル-N, N'-ジアロイルヒドラジン、N-アシル-N-アルキルカルボニルヒドラジン、N-アリール-N-アルキル-N'-アリールヒドラジン、アルニドケトン、3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシ-N-イソブチル-ベンズアミド、8-O-アセチルハルパギド、オキシステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(S)ヒドロキシコレステロール、25-エポキシコレステロール、T0901317、5-アルファ-6-アルファ-エポキシコレステロール-3-スルフェート(ECHS)、7-ケトコレステロール-3-スルフェート、フラメソル、胆汁酸、1, 1-ビホスホネートエステル、幼若ホルモンIII、RG-115819(3, 5-ジメチル-安息香酸N-(1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル)-N'-(2-メチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、RG-115932((R)-3, 5-ジメチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、およびRG-115830(3, 5-ジメチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、ならびにそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項86に記載の方法。

[88]

前記リンカーが、切断可能なリンカーである、請求項80から87のいずれか一項に記載の方法。

[89]

前記リンカーが、配列APVKQ(配列番号42)、GPVKQ(配列番号43)、VPVKQ(配列番号44)、IPVKQ(配列番号45)、MPVKQ(配列番号46)、APIKQ(配列番号47)、GPIKQ(配列番号48)、VPIKQ(配列番号49)、IPIKQ(配列番号50)、MPIKQ(配列番号51)、APAKQ(配列番号52)、GPAKQ(配列番号53)、VPAKQ(配列番号54)、IPAKQ(配列番号55)、MPAKQ(配列番号56)、APVRQ(配列番号57)、GPVRQ(配列番号58)、VPVRQ(配列番号59)、IPVRQ(配列番号60)、MPVRQ(配列番号61)、APIRQ(配列番号62)、GPIRQ(配列番号63)、VPIRQ(配列番号64)、IPIRQ(配列番号65)、MPIRQ(配列番号66)、APARQ(配列番号67)、GPARQ(配列番号68)、VPARQ(配列番号69)、IPARQ(配列番号70)、MPARQ(配列番号71)、APVKN(配列番号72)、GPVKN(配列番号73)、VPVKN(配列番号74)、IPVKN(配列番号75)、MPVKN(配列番号76)、APIKN(配列番号77)、GPIKN(配列番号78)、VPIKN(配列番号79)、IPIKN(配列番号80)、MPIKN(配列番号81)、APAKN(配列番号82)、GPAKN(配列番号83)、VPAKN(配列番号84)、IPAKN(配列番号85)、MPAKN(配列番号86)

10

20

30

40

50

、A P V R N（配列番号 8 7）、G P V R N（配列番号 8 8）、V P V R N（配列番号 8 9）、I P V R N（配列番号 9 0）、M P V R N（配列番号 9 1）、A P I R N（配列番号 9 2）、G P I R N（配列番号 9 3）、V P I R N（配列番号 9 4）、I P I R N（配列番号 9 5）、M P I R N（配列番号 9 6）、A P A R N（配列番号 9 7）、G P A R N（配列番号 9 8）、V P A R N（配列番号 9 9）、I P A R N（配列番号 1 0 0）または M P A R N（配列番号 1 0 1）を含む、請求項 8 8 に記載の方法。

[9 0]

前記少なくとも 1 つの組換え部位が、ファージゲノム組換え結合部位（a t t P）または細菌ゲノム組換え結合部位（a t t B）である、請求項 8 0 から 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

[9 1]

前記対象に、少なくとも 1 つの二次ベクターを投与することをさらに含む、請求項 8 0 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

[9 2]

前記少なくとも 1 つの二次ベクターが、m R N A である、請求項 9 1 に記載の方法。

[9 3]

前記少なくとも 1 つの二次ベクターが、プラスミドである、請求項 9 1 に記載の方法。

[9 4]

前記少なくとも 1 つの二次ベクターが、少なくとも 1 つのリコンビナーゼを含む、請求項 9 1 から 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

[9 5]

前記リコンビナーゼが、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) ファージリコンビナーゼ、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) ファージリコンビナーゼ、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) ファージリコンビナーゼ、マイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) ファージリコンビナーゼ、マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*) ファージリコンビナーゼ、および S P B c 2 リコンビナーゼからなる群から選択される、請求項 9 2 に記載の方法。

[9 6]

前記少なくとも 2 つの遺伝子が、前記リコンビナーゼによって前記対象のゲノムに組み込まれる、請求項 8 0 から 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

[9 7]

前記ベクターが、適正製造規範 (good manufacturing practices) (G M P) 適合性である、請求項 8 0 から 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

[9 8]

配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、および配列番号 4 0 からなる群から選択される配列に対して少なくとも 6 0 % の同一性を有する配列を含むポリペプチド。

[9 9]

配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、および配列番号 4 0 からなる群から選択される配列に対して少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 9 8 に記載のポリペプチド。

40

[1 0 0]

配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 4、および配列番号 1 0 6 からなる群から選択される配列に対して少なくとも 6 0 % の同一性を有する配列を含むポリペプチド。

[1 0 1]

配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 4、および配列番号 1 0 6 からなる群から選択される配列に対して少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 0 0 に記載のポリペプチド。

50

[1 0 2]

配列番号 1 0 8 の核酸配列によってコードされるポリペプチド配列に対して少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含むポリペプチド。

[1 0 3]

配列 A P V K Q (配列番号 4 2) に対して少なくとも 6 0 % の同一性を有する配列を含む第 1 のリンカーによって結合される第 1 の機能性ポリペプチドおよび第 2 の機能性ポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド。

[1 0 4]

前記リンカー配列が、配列 A P V K Q (配列番号 4 2) に対して 8 0 % または 1 0 0 % の同一性のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 3 に記載のポリヌクレオチド。

10

[1 0 5]

A P V K Q、G P V K Q、V P V K Q、I P V K Q、M P V K Q、A P I K Q、G P I K Q、V P I K Q、I P I K Q、M P I K Q、A P A K Q、G P A K Q、V P A K Q、I P A K Q、M P A K Q、A P V R Q、G P V R Q、V P V R Q、I P V R Q、M P V R Q、A P I R Q、G P I R Q、V P I R Q、I P I R Q、M P I R Q、A P A R Q、G P A R Q、V P A R Q、I P A R Q、M P A R Q、A P V K N、G P V K N、V P V K N、I P V K N、M P V K N、A P I K N、G P I K N、V P I K N、I P I K N、M P I K N、A P A K N、G P A K N、V P A K N、I P A K N、M P A K N、A P V R N、G P V R N、V P V R N、I P V R N、M P V R N、A P I R N、G P I R N、V P I R N、I P I R N、M P I R N、A P A R N、G P A R N、V P A R N、I P A R N、および M P A R N、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される配列に対して少なくとも 6 0 %、8 0 %、または 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む第 1 のリンカーによって結合される第 1 の機能性ポリペプチドおよび第 2 の機能性ポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド。

20

[1 0 6]

前記第 1 のリンカーが、剛性リンカー、可動性リンカー、切断可能なリンカー、自己切断型リンカー、ペプチドリンカー、リボソームスキッピングによって切断可能なリンカー、またはそれらの任意の組合せである、請求項 1 0 3 から 1 0 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

30

[1 0 7]

前記第 1 のリンカーが、タンパク質分解によって切断可能である、請求項 1 0 6 に記載のポリヌクレオチド。

[1 0 8]

前記第 1 のリンカーが、1 ~ 1 0 個の切断部位を含む、請求項 1 0 7 に記載のポリヌクレオチド。

[1 0 9]

前記切断が、還元反応、酵素反応、または両方の組合せである、請求項 1 0 7 から 1 0 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

40

[1 1 0]

前記切断が、酵素反応を含む、請求項 1 0 9 に記載のポリヌクレオチド。

[1 1 1]

酵素反応を含む前記切断が、プロテアーゼによって行われる、請求項 1 1 0 に記載のポリヌクレオチド。

[1 1 2]

前記プロテアーゼが、フリンおよびカテプシン B からなる群から選択される、請求項 1 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

[1 1 3]

前記プロテアーゼが、フリンである、請求項 1 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

[1 1 4]

50

前記フリンが、R A K Rを切断する、請求項 1 1 3 に記載のポリヌクレオチド。

[1 1 5]

前記第 1 の機能性ポリペプチドが、前記第 2 の機能性ポリペプチドと異なる、請求項 1 0 3 から 1 1 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 1 6]

前記第 1 および第 2 の機能性ポリペプチドのうちの少なくとも一方が、タンパク質、ホルモン、糖タンパク質、またはそれらの誘導体もしくは断片である、請求項 1 0 3 から 1 1 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 1 7]

(G S) n、(S G) n、(G S G) n、および (S G S) n から選択される少なくとも 1 つの配列をさらに含み、n が、1 から 1 5 の数である、請求項 1 0 3 から 1 1 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

10

[1 1 8]

前記ポリペプチドが、第 2 のリンカーをさらに含む、請求項 1 0 3 から 1 1 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 1 9]

前記第 2 のリンカーが、第 3 の機能性ポリペプチドを前記第 1 の機能性ポリペプチドまたは前記第 2 の機能性ポリペプチドに結合する、請求項 1 1 8 に記載のポリヌクレオチド。

[1 2 0]

第 3 の機能性ポリペプチドを前記第 1 の機能性ポリペプチドまたは前記第 2 の機能性ポリペプチドに結合する前記第 2 のリンカーが、自己切断型リンカーである、請求項 1 1 9 に記載のポリヌクレオチド。

20

[1 2 1]

前記自己切断型リンカーが、2 A 配列を含む、請求項 1 2 0 に記載のポリヌクレオチド。

[1 2 2]

前記 2 A 配列が、F 2 A 配列または P 2 A 配列である、請求項 1 2 1 に記載のポリヌクレオチド。

[1 2 3]

K o z a k 配列をさらに含む、請求項 1 0 3 から 1 2 2 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

30

[1 2 4]

前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドをさらに含む、請求項 1 0 3 から 1 2 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 2 5]

請求項 1 0 3 から 1 2 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその誘導体もしくはバリエーション。

[1 2 6]

請求項 1 0 3 から 1 2 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドと、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

40

[1 2 7]

配列 A P V K Q (配列番号 4 2) に対して少なくとも 6 0 % の同一性を有する配列を含むポリ核酸を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、処置の方法。

[1 2 8]

前記配列が、配列 A P V K Q (配列番号 4 2) に対して 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または最大 1 0 0 % の同一性を有する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

[1 2 9]

前記ポリ核酸が、機能性ポリペプチドをコードする、請求項 1 2 6 から 1 2 7 のいずれ

50

か一項に記載の方法。

[1 3 0]

前記機能性ポリペプチドが、インビボで切断される、請求項 1 2 9 に記載の方法。

[1 3 1]

インビボで切断される前記機能性ポリペプチドが、少なくとも 2 つの機能性タンパク質を産生する、請求項 1 2 9 から 1 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3 2]

インビボで切断される前記機能性ポリペプチドが、少なくとも 3 つの機能性タンパク質を産生する、請求項 1 2 9 から 1 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3 3]

前記少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つの機能性タンパク質が、それを必要とする前記対象を処置するための組合せ療法の一部である、請求項 1 3 0 から 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3 4]

前記投与が、予防的、治癒的、慣例的、またはそれらの組合せである、請求項 1 2 4 から 1 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3 5]

前記投与が、慣例的である、請求項 1 2 7 から 1 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3 6]

前記投与が、1 時間毎の投与、毎日投与、毎週投与、毎月投与、毎年投与、または定期的投与を含む、請求項 1 3 5 に記載の方法。

[1 3 7]

前記対象が、急性疾患、慢性疾患、終末期疾患、またはそれらの組合せを有する、請求項 1 2 7 から 1 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3 8]

前記対象が、がん、心臓疾患、糖尿病、神経障害、眼障害、ウイルス障害、またはそれらの任意の組合せを有する、請求項 1 2 4 から 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3 9]

少なくとも 1 つの二次処置をさらに含む、請求項 1 2 4 から 1 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

[1 4 0]

配列 A P V K Q (配列番号 4 2) に対して少なくとも 6 0 % の同一性を有する配列を含む第 1 のリンカーによって結合される第 1 の機能性ポリペプチドおよび第 2 の機能性ポリペプチドを含むポリヌクレオチドを作製する方法。

[1 4 1]

配列 A P V K Q (配列番号 4 2) に対して少なくとも 6 0 % の同一性を有する配列を含むベクターから遺伝子を発現させる方法であって、前記遺伝子の切断効率が、質量分析法によって測定すると、少なくとも 5 0 % である、方法。

[1 4 2]

前記ベクターが、2 つの生物学的に活性なポリペプチド、3 つの生物学的に活性なポリペプチド、または 3 つ超の生物学的に活性なポリペプチドの発現のための遺伝子を含む、請求項 1 4 1 に記載の方法。

[1 4 3]

前記ベクターが、3 つの生物学的に活性なポリペプチドの発現のための遺伝子を含む、請求項 1 4 2 に記載の方法。

[1 4 4]

前記遺伝子が、切断の後に機能性となる、請求項 1 4 1 から 1 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

[1 4 5]

前記遺伝子の前記切断効率が、質量分析法によって測定すると、少なくとも 5 5 %、6

10

20

30

40

50

0 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または最大100 %を含む、請求項141から144のいずれか一項に記載の方法。

[146]

フリンポリペプチドおよび2Aポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドであって、前記フリンポリペプチドおよび前記2Aポリペプチドが、少なくとも3つの疎水性アミノ酸を含むポリペプチドリンカーによって結合される、ポリヌクレオチド。

[147]

前記少なくとも3つの疎水性アミノ酸のうちの少なくとも1つが、グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、プロリン (Pro)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、トリプトファン (Trp) からなるリストから選択される、請求項146に記載のポリヌクレオチド。

[148]

前記ポリペプチドリンカーが、配列APVKQ、GPVKQ、VPVKQ、IPVKQ、MPVKQ、APIKQ、GPIKQ、VPIKQ、IPIKQ、MPIKQ、APAKQ、GPAKQ、VPAKQ、IPAKQ、MPAKQ、APVRQ、GPVRQ、VPVRQ、IPVRQ、MPVRQ、APIRQ、GPIRQ、VPIRQ、IPIRQ、MPIRQ、APARQ、GPARQ、VPARQ、IPARQ、MPARQ、APVKN、GPVKN、VPVKN、IPVKN、MPVKN、APIKN、GPIKN、VPIKN、IPIKN、MPIKN、APAKN、GPAKN、VPAKN、IPAKN、MPAKN、APVRN、GPVRN、VPVRN、IPVRN、MPVRN、APIRN、GPIRN、VPIRN、IPIRN、MPIRN、APARN、GPARN、VPARN、IPARNまたはMPARNを含む、請求項147に記載のポリヌクレオチド。

[149]

ポリペプチド構築物の改善された発現を得る方法であって、第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドを含む前記ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドを提供するステップであって、前記第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドが、配列APVKQに対して少なくとも60 %の同一性を有する配列を含むポリペプチドリンカーによって結合される、ステップと、

前記ポリヌクレオチドを宿主細胞において発現させるステップであって、前記発現が、配列APVKQに対して少なくとも60 %の同一性を有する配列を含むポリペプチドリンカーを有さない対応するポリペプチド構築物と比較して、前記ポリペプチド構築物の改善された発現をもたらす、ステップとを含む、方法。

[150]

前記改善された発現が、配列APVKQに対して少なくとも60 %の同一性を有する配列を含むポリペプチドリンカーを有さない対応するポリペプチド構築物と比較して、少なくとも10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または100 %である、請求項149に記載の方法。

[151]

少なくとも1つのプラスミドマイクロバブル複合体を含む組成物であって、前記マイクロバブルが、脂質、ガス、ならびに請求項1から27および35から41のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むプラスミドを含む、組成物。

[152]

前記脂質が、前記ガスおよびプラスミドを封入するシェルを形成する、請求項151に記載の組成物。

[153]

10

20

30

40

50

前記ガスが、パーフルオロカーボンガスである、請求項 1 5 1 から 1 5 2 のいずれか一項に記載の組成物。

[1 5 4]

前記ガスが、パーフルオロプロパンである、請求項 1 5 3 に記載の組成物。

[1 5 5]

前記マイクロバブル複合体が、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリンおよび1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルエタノールアミングリセロールのうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 5 1 から 1 5 4 のいずれか一項に記載の組成物。

[1 5 6]

対象に、請求項 1 5 1 から 1 5 5 のいずれか一項に記載の組成物を投与するステップと

前記対象を、所定の組織または器官における少なくとも1つのマイクロバブルの超音波破壊をもたらすのに十分な超音波エネルギーと接触させるステップとを含む方法。

[1 5 7]

前記所定の組織または器官における前記少なくとも1つのマイクロバブルの破壊により、前記プラスミドが前記組織または器官へ送達される、請求項 1 5 6 に記載の方法。

[1 5 8]

前記組織または器官が、器官であり、前記器官が、心臓である、請求項 1 5 7 に記載の方法。

[1 5 9]

対象における心疾患または障害を処置する方法であって、
前記対象に、少なくとも1つのマイクロバブルを含むある量の組成物を投与するステップであって、前記マイクロバブルが、脂質、ガス、ならびに請求項 1 から 2 7 および 3 5 から 4 1 のいずれか一項に記載のポリスクレオチドを含むプラスミドを含む、ステップと、
前記対象を、前記少なくとも1つのマイクロバブルの超音波破壊をもたらすのに十分な超音波エネルギーと接触させ、前記プラスミドを前記対象の心臓に送達するステップとを含む、方法。

[1 6 0]

前記脂質が、前記ガスおよびプラスミドを封入するシェルを形成する、請求項 1 5 9 に記載の方法。

[1 6 1]

前記ガスが、パーフルオロカーボンガスである、請求項 1 5 9 から 1 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

[1 6 2]

前記ガスが、パーフルオロプロパンである、請求項 1 6 1 に記載の方法。

[1 6 3]

前記マイクロバブルが、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリンおよび1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルエタノールアミングリセロールのうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 5 9 から 1 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

[1 6 4]

前記心疾患または障害が、うっ血性心不全、心筋症、不整脈、心膜疾患、大動脈疾患、マルファン症候群、および冠状動脈疾患のうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 5 9 から 1 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 9 3 】

参考文献

[1] J. L. Hellawell and K. B. Marguiles, "Myocardial reverse remodeling," Cardiovasc Ther, vol. 30, no. 3, pp. 172-181, 2012.

10

20

30

40

50

- [2] D. Rohde, J. Ritterhoff, M. Voelkers, H. Katus, T. G. Parker and P. Most, "S100A1: a multifaceted therapeutic target in cardiovascular disease," *J Cardioasc Transl Res*, vol. 3, no. 5, pp. 525-537, 2010.
- [3] S. T. Pleger, P. Most, M. Boucher and S. Soltys, "Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue," *Circulation*, vol. 115, no. 19, pp. 2506-2515, 2007.
- [4] A. Remppis, T. Greten, B. Schafer and P. Hunziker, "Altered expression of the Ca²⁺-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1313, no. 3, pp. 253-257, 1996.
- [5] D. Rohde, H. Brinks, J. Ritterhoff, G. Qui, S. Ren and P. Most, "S100A1 gene therapy for heart failure: a novel strategy on the verge of clinical trials," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 50, no. 5, pp. 777-784, 2011. 10
- [6] C. Weber, I. Neacsu, B. Krautz, P. Schlegel, S. Sauer, P. Raake, J. Ritterhoff, A. Jungmann, A. B. Remppis, M. Stangassinger, W. J. Koch, H. A. Katus, O. J. Muller, P. Most and S. T. Pleger, "Therapeutic safety of high myocardial expression levels of the molecular inotrope S100A1 in a preclinical heart failure model," *Gene Ther*, vol. 21, pp. 131-138, 2014.
- [7] M. S. Penn, J. Pastore, T. Miller and R. Aras, "SDF-1 in myocardial repair," *Gene Ther*, vol. 19, no. 6, pp. 583-587, 2012.
- [8] M. S. Penn, F. O. Mendelsohn, G. L. Schaer, W. Sherman, M. Farr, J. Pastore, D. Rouy, R. Clemens, R. Aras and D. W. Losordo, "An open-label dose escalation study to evaluate the safety of administration of nonviral stromal cell-derived factor-1 plasmid to treat symptomatic ischemic heart failure," *Circ Res*, vol. 112, no. 5, pp. 816-825, 2013. 20
- [9] E. S. Chung, L. Miller, A. N. Patel, R. D. Anderson, F. O. Mendelsohn, J. Traverse, K. H. Silver, J. Shin, G. Ewald, M. J. Farr and S. Anwaruddin, "Changes in ventricular remodelling and clinical status during the year following a single administration of stromal cell-derived factor-1 non-viral gene therapy in chronic ischaemic heart failure patients: the STOP-HF randomized Phase II trial," *Eur Heart J*, vol. 36, pp. 2228-2238, 2015. 30
- [10] Z. Taimeh, J. Loughran, E. J. Birks and R. Bolli, "Vascular endothelial growth factor in heart failure," *Nat Rev Cardiol*, vol. 10, no. 9, pp. 519-530, 2013.
- [11] J. X. Yu, X. F. Huang, W. M. Lv, C. S. Ye, X. Z. Peng, H. Zhang, L. B. Xiao and S. M. Wang, "Combination of stromal-derived factor-1 α and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization," *J Vasc Surg*, vol. 50, no. 3, pp. 608-616, 2009.
- [12] E. Perin, G. V. Silva, J. A. Assad, D. Vela, L. M. Buja, A. L. Sousa, S. Litovsky, J. Lin, W. K. Vaughn, S. Coulter and M. R. Fernandes, "Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 44, no. 3, pp. 486-495, 2008. 40
- [13] S. Robinson, P. W. Cho, H. I. Levitsky, J. L. Olson, R. H. Hruban, M. A. Ackerman and P. D. Kessler, "Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts," *Cell Transplant*, vol. 5, no. 1, pp. 77-91, 1996.
- [14] K. Suzuki, N. J. Brand, R. T. Smolenski, J. Jayakumar, B. Murtuza and M. H. Yacoub, "Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery," *Circulation*, vol. 102, no. 19 Suppl 3, pp. III359-64, 2000. 50

- [15] K. Suzuki, B. Murtuza, N. Suzuki, R. T. Smolenski and M. H. Yacoub, "Intra coronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure," *Circulation*, vol. 104, no. 12 Suppl 1, pp. I213-7, 2001.
- [16] P. Musialek, L. Tekieli, M. Kostkiewicz, M. Majka, W. Szot, Z. Walter and M. Olszowska, "Randomized transc coronary delivery of CD34(+) cells with perfusion versus stop-flow method in patients with recent myocardial infarction: Early cardiac retention of (m)Tc-labeled cells activity," *J Nuclear Cardiol*, vol. 18, no. 1, pp. 104-16, 2011.
- [17] P. W. Musialek, A. B. Tracz, K. Skotnicki, P. Zmudka, Z. Pieniazek and W. M. Szostek, "Transc coronary stem cell delivery using physiological endothelium-targeting perfusion technique: the rationale and a pilot study involving a comparison with conventional over-the-wire balloon coronary occlusions in patients after recent myocardial infarction," *Kardiologia Pol*, vol. 64, no. 5, pp. 489-98, 2006. 10
- [18] L. Noyez, J. A. van Son, J. T. Van Der Werf, J. Knape, J. Gimbere, W. N. van Asten, L. K. Lacquet and W. Flameng, "Retrograde versus antegrade delivery of cardioplegic solution in myocardial revascularization. A clinical trial in patients with three-vessel coronary artery disease who underwent myocardial revascularization with extensive use of the internal mammary artery," *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 105, no. 5, pp. 854-63, 1993. 20
- [19] P. Boekstegers, W. Giehl, G. von Degenfeld and G. Steinbeck, "Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty," *J Am Coll Cardiol*, vol. 31, no. 7, pp. 1525-33, 1998.
- [20] T. Pohl, W. Giehl, B. Reichart, C. Kupatt, P. Raake, S. Paul, H. Reichenspurner, G. Steinbeck and P. Boekstegers, "Retroinfusion-supported stenting in high-risk patients for percutaneous intervention and bypass surgery: results of the prospective randomized myoprotect I study," *Cath Cardiovasc Intervent*, vol. 62, no. 3, pp. 323-30, 2004. 30
- [21] R. Incorvati, S. G. Tauberg, M. J. Pecora, R. S. Macherey, S. B. Dianzumba, B. C. Donohue and M. W. Krucoff, "Clinical applications of coronary sinus retroperfusion during high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty," *J Am Coll Cardiol*, vol. 22, no. 1, pp. 127-34, 1993.
- [22] Z. a. G. M. Lokmic, "Visualisation and stereological assessment of blood and lymphatic vessels," *Histolog Histopathol*, vol. 26, no. 6, pp. 781-96, 2011.
- [23] D. Rohde, W. Schluter-Wigger, V. Mielke, P. von den Driesch, B. von Gaudecker and W. Sterry, "Infiltration of both T cells and neutrophils in the skin is accompanied by the expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1): an immunohistochemical and ultrastructural study," *J Invest Dermatol*, vol. 98, no. 5, pp. 794-9, 1992. 40
- [24] S. Anderson, R. Shiner, M. D. Brown and O. Hudlicka, "ICAM-1 expression and leukocyte behavior in the microcirculation of chronically ischemic rat skeletal muscles," *Microvasc Res*, vol. 71, no. 3, pp. 205-11, 2006.
- [25] H. Habazettl, C. Kupatt, S. Zahler, B. F. Becker and K. Messmer, "Selectins and beta 2-integrins mediate post-ischaemic venular adhesion of polymorphonuclear leukocytes, but not capillary plugging, in isolated hearts," *Pflugers Arch*, vol. 438, no. 4, pp. 479-85, 1999.
- [26] J. Lesley, I. Gal, D. J. Mahoney, M. R. Cordell, M. S. Rugg, R. Hyman, A. J. Day and K. Mikecz, "TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and ce 50

- ll surface CD44," J Biol Chem, vol. 279, no. 24, pp. 25745-54, 2004.
- [27] A. N. Patel, S. Mittal, G. Turan, A. A. Winters, T. D. Henry, H. Ince and N. Trehan, "REVIVE Trial: Retrograde Delivery of Autologous Bone Marrow in Patients With Heart Failure," Stem Cells Transl Med, vol. 4, pp. 1021-1027, 2015.
- [28] R. E. Henschler, E. Deak and E. Seifried, "Homing of Mesenchymal Stem Cells," Infusionsther Transfusionsmed, vol. 35, no. 4, pp. 306-312, 2008.
- [29] B. Ruster, S. Gottig, R. J. Ludwig, R. Bistran, S. Muller, E. Seifried, J. Gille and R. Henschler, "Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells," Blood, vol. 108, no. 12, pp. 3938-44, 2006. 10
- [30] C. Hart, D. Drewel, G. Mueller, J. Grassinger, M. Zaiss, L. A. Kunz - Schughart, R. Andreesen, A. Reichle, E. Holler and B. Hennemann, "Expression and function of homing-essential molecules and enhanced in vivo homing ability of human peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells after stimulation with stem cell factor," Stem Cells, vol. 22, no. 4, pp. 580-9, 2004.
- [31] C. Rampon, N. Weiss, C. Deboux, N. Chaverot, F. Miller, D. Buchet, H. Trioire - Leignel, S. Cazaubon, B.-V. Evercooren and P.-O. Couraud, "Molecular mechanism of systemic delivery of neural precursor cells to the brain: assembly of brain endothelial apical cups and control of transmigration by CD44," Stem Cells, vol. 26, no. 7, pp. 1673-82, 2008. 20
- [32] E. Bachrach, A. L. Perez, Y. H. Choi, B. M. Illigens, S. J. Jun, P. D. Nido, F. X. McGowan, S. Li, A. Flint, J. Chamberlain and L. M. Kunkel, "Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation," Muscle Nerve, vol. 34, no. 1, pp. 44-52, 2006.
- [33] P. Boekstegers, G. Von Degenfeld, D. Giehl, R. Heinrich, C. Hullin, G. Kupatt, G. Steinbeck, G. Baretton, G. Middeler, H. Katus and W. M. Franz, "Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins," Gene Ther, vol. 7, no. 3, pp. 232-40, 2000.
- [34] S. Alino, M. Jose Herrero, V. Bodi, I. Noguera, L. Mainar, F. Dasi, A. Semper, M. Sanchez, A. Diaz, L. Sabater and S. Lledo, "Naked DNA delivery to whole pig cardiac tissue by coronary sinus retrograde injection employing non-invasive catheterization," J Gene Med, vol. 12, no. 11, pp. 920-6, 2010. 30
- [35] E. Youssef, P. Zhang, P. I. Rogers, P. Tremble, J. Rokovich, B. H. Johnstone, K. L. March and D. Hou, "Enhancing myocardial plasmid expression by retrograde coronary venous delivery," Cath Cardiovasc Intervent, vol. 65, no. 4, pp. 528-34, 2005.
- [36] P. Raake, G. von Degenfeld, R. Hinkel, R. Vachenaue, T. Sandner, S. Belle, M. Andrees, C. Kupatt, G. Schuler and P. Boekstegers, "Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery," J Am Coll Cardiol, vol. 44, no. 5, pp. 1124-9, 2004. 40
- [37] G. von Degenfeld, P. Raake, C. Kupatt, C. Leberhz, R. Hinkel, F. J. Gildehaus, W. Munzing, A. Kranz, J. Waltenberger, M. Simoes and M. Schwaiger, "Selective pressure-regulated retroinfusion of fibroblast growth factor-2 into the coronary vein enhances regional myocardial blood flow and function in pigs with chronic myocardial ischemia," J Am Coll Cardiol, vol. 42, no. 6, pp. 1120-8, 2003.
- [38] K. Suzuki, B. Murtuza, S. Fukushima, R. T. Smolenski, A. Varela-Carver, S. R. Coppen and M. H. Yacoub, "Targeted cell delivery into infarcted rat hearts by retrograde intracoronary infusion: distribution, dynamics, and influence on cardiac function," Circulation, vol. 110, no. 11 Suppl 1, pp. 11225-30, 2004. 50

- [39] J. George, J. Goldberg, M. Joseph, N. Abdulhameed, J. Crist, H. Das and V. J. Pompili, "Transvenous intramyocardial cellular delivery increases retention in comparison to intracoronary delivery in a porcine model of acute myocardial infarction," *J Interv Cardiol*, vol. 21, no. 5, pp. 424-31, 2008.
- [40] C. Thompson, B. A. Nasser, J. Makower, S. Houser, M. McGarry, T. Lamson, I. Pomerantseva, J. Y. Chang, H. K. Gold, J. P. Vacanti and S. N. Oesterle, "Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty: A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation," *J Am Coll Cardiol*, vol. 41, no. 11, pp. 1964-71, 2003.
- [41] P. W. Raake, R. Hinkel, S. Muller, S. Delker, R. Kreuzpointner, C. Ku
patt, H. A. Katus, J. A. Kleinschmidt, P. Boekstegers and O. J. Muller, "Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors," *Gene Ther*, vol. 15, no. 1, pp. 12-7, 2008. 10
- [42] J. Tuma, R. Fernandez-Vina, A. Carrasco, J. Castillo, C. Cruz, A. Carrillo, J. Ercilla, C. Yarleque, J. Cunha, T. D. Henry and A. N. Patel, "Safety and feasibility of percutaneous retrograde coronary sinus delivery of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with chronic refractory angina," *J Transl Med*, vol. 9, p. 183, 2011.
- [43] N. T. Wright, K. M. Varney, K. C. Ellis, J. Markowitz, R. K. Gitti, D. B.
Zimmer and D. J. Weber, "The three-dimensional solution structure of Ca(2+)-bound S100A1 as determined by NMR spectroscopy," *J Mol Biol*, vol. 353, no. 2, pp. 410-426, 2005. 20
- [44] R. Donato, "Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1450, no. 3, pp. 191-231, 1999.
- [45] D. B. Zimmer, P. Wright Sadosky and D. J. Weber, "Molecular mechanisms of S100-target protein interactions," *Microsc Res Tech*, vol. 60, no. 6, pp. 552-559, 2003.
- [46] L. Hove-Madsen and D. M. Bers, "Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes," *Circ Res*, vol. 73, no. 5, pp. 820-828, 1993. 30
- [47] J. James, Y. Zhang, K. Wright, S. Witt and E. Glascock, "Transgenic rabbits expressing mutant essential light chain do not develop hypertrophic cardiomyopathy," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 34, no. 7, pp. 872-882, 2002.
- [48] J. Woda, S. J. Fisher, J. Pastore and A. N. Patel, "Coronary Sinus Delivery of SDF-1 Plasmid for the Treatment of Heart Failure," *American Society of Gene and Cell Therapy*, p. poster presentation, 2014.
- [49] M. Hedman, J. Hartikainen, M. Syvanne, J. Stjernvall, A. Hedman, A. Kivela, E. Vanninen, H. Mussalo, E. Kauppila, S. Simula and O. Narvanen, "Safety and Feasibility of Catheter-Based Local Intracoronary Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transfer in the Prevention of Postangioplasty and In-Stent Restenosis and in the Treatment of Chronic Myocardial Ischemia. Phase II Results of the Kuopio," *Circulation*, vol. 107, pp. 2677-2683, 2003. 40
- [50] M. G. Katz, A. S. Fargnoli, A. P. Kendle, R. J. Hajjar and C. R. Bridges, "Gene Therapy in Cardiac Surgery: Clinical Trials, Challenges and Perspectives," *Ann Thorac Surg*, vol. 101, pp. 2407-2416, 2016.
- [51] P. Kolsut, M. Malecki, P. Zelazny, B. Teresinska, P. Firek, P. Janik and Z. Religa, "Gene therapy of coronary artery disease with phvegf165-early outcome," *Kardiologia Pol*, vol. 59, pp. 373-384, 2003.
- [52] M. Ruel, R. S. Beanlands, M. Lortie, V. Chan, N. Camack, E. J. Suuronen, F 50

- . D. Rubens, J. N. DaSilva, F. W. Sellke, D. J. Stewart and T. G. Mesana, "Concomitant treatment with oral L-arginine improves the efficacy of surgical angiogenesis in patients with severe diffuse coronary artery disease: the Endothelial Modulation in Angiogenic Therapy randomized controlled trial," *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 135, pp. 762-770, 2008.
- [53] S. T. Pleger, C. Shan, J. Ksienzyk, R. Bekeredjian, P. Boekstegers, R. Hinkel, S. Schinkel, B. Leuchs, J. Ludwig, G. Qiu and C. Weber, "Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model," *Sci Transl Med*, vol. 3, no. 92, pp. 92ra64-92ra64, 2011.
- [54] R. J. Lee, M. L. Springer, W. E. Blanco-Bose, R. Shaw, P. C. Ursell and H. M. Blau, "VEGF Gene Delivery to Myocardium: Deleterious Effects of Unregulated Expression," *Circulation*, vol. 102, pp. 898-901, 2000. 10
- [55] J. J. Lopez, R. Laham, A. Stamler, J. D. Pearlman, S. Bunting, A. Kaplan, J. P. Carrozza, F. W. Sellke and M. Simons, "VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs," *Cardiovasc Res*, pp. 272-281, 1998.
- [56] M. Katz, A. Fargnoli, R. Williams and C. Bridges, "Gene Therapy Delivery Systems for Enhancing Viral and Nonviral Vectors for Cardiac Diseases: and Nonviral Vectors for Cardiac Diseases: Current Concepts and Future Applications," *Human Gene Ther*, vol. 24, pp. 914-927, 2013.
- [57] Brinks H, D. Rohde, M. Voelkers, G. Qiu and S. Pleger, "S100A1 genetically targeted therapy reverses dysfunction of human failing cardiomyocytes," *J Am Coll Cardiol*, vol. 58, no. 9, pp. 966-973, 2011. 20
- [58] F. J. Giordano, "Retrograde coronary perfusion: a superior route to deliver therapeutics to the heart?," *J Am Coll Cardiol*, vol. 42, no. 6, pp. 1129-1131, 2003.
- [59] Y. Wang, F. Wang, R. Wang, P. Zhao and Q. Xia, "2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*," *Sci Rep*, vol. 5, no. 16273, pp. 1-10, 2015.
- [60] M. C. Scimia, A. M. Gumpert and W. J. Koch, "Cardiovascular gene therapy for myocardial infarction," *Expert Opin Biol Ther*, vol. 14, no. 2, pp. 183-195, 2014. 30
- [61] I. Marenholz, C. W. Heizmann, G. Fritz, "S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)," *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 322, no. 4, pp. 1111-22, 2004.
- [62] T. Nagasawa, "CXCL12/SDF-1 and CXCR4," *Front. Immunol*, vol. 6, pp. 301, 2015.
- [63] David I.R. Holmes, I. Zachary, "The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Family: Angiogenic Factors in Health and Disease." *Genome Biol*. Vol. 6, no. 2, pp. 209, (2005).
- [64] S. Chen, J. Chen, P Huang, XL Meng, . Clayton, JS Shen, PA Graybum, "Myocardial regeneration in adriamycin cardiomyopathy by nuclear expression of GLP1 using ultrasound targeted microbubble destruction." *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 458, no. 4, pp. 823-9, 2015. 40
- [65] C.R. Mayer, N.A. Geis, H.A. Katus, R. Bekeredjian, "Ultrasound targeted microbubble destruction for drug and gene delivery." *Expert Opin Drug Deliv.*, vol. 5, no. 10, pp. 1121-38, 2008.

【図 1】

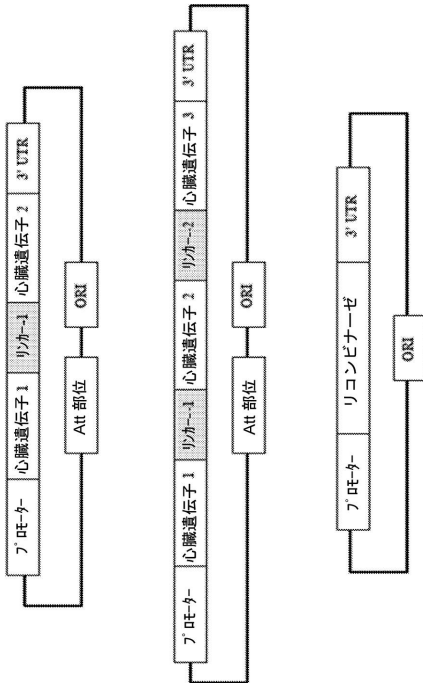


図 1

【図 2】

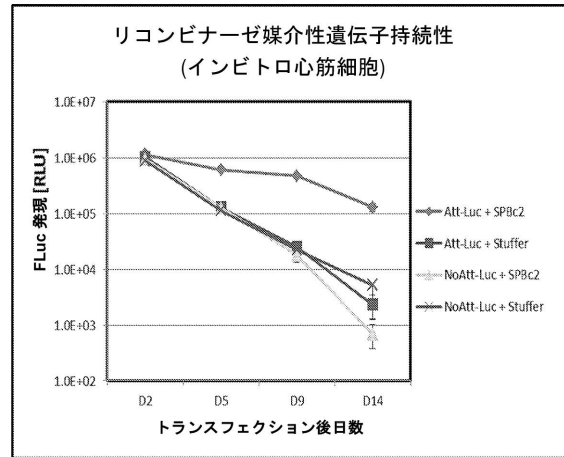


図 2

【図 3】

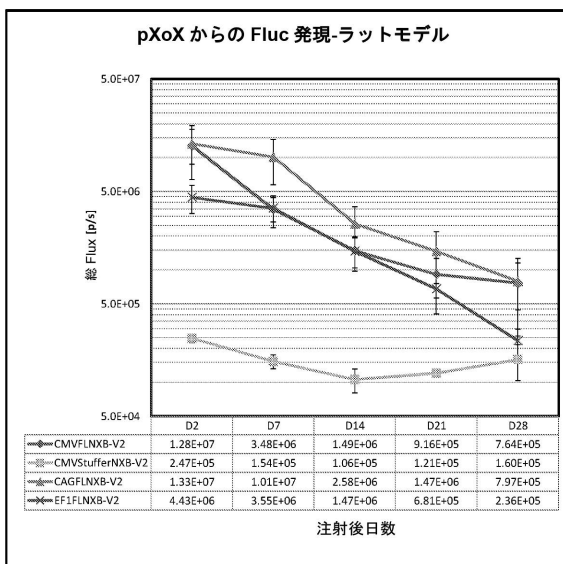


図 3

【図 4】

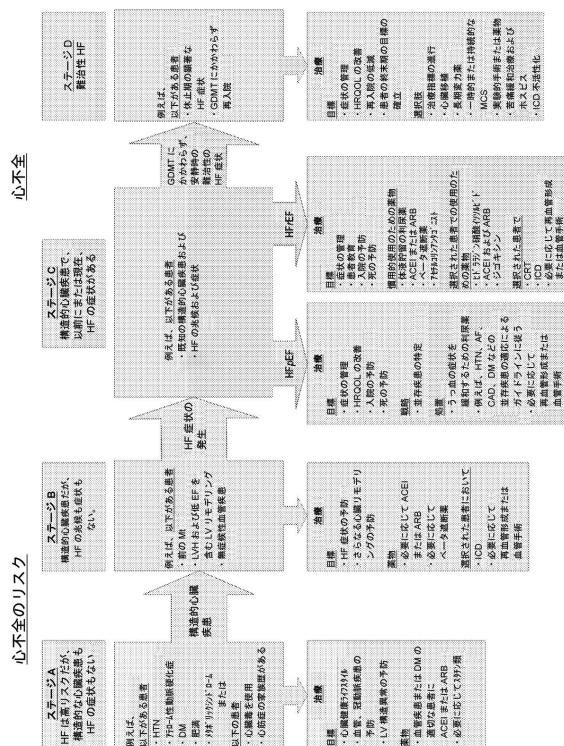


図 4

【図 5】

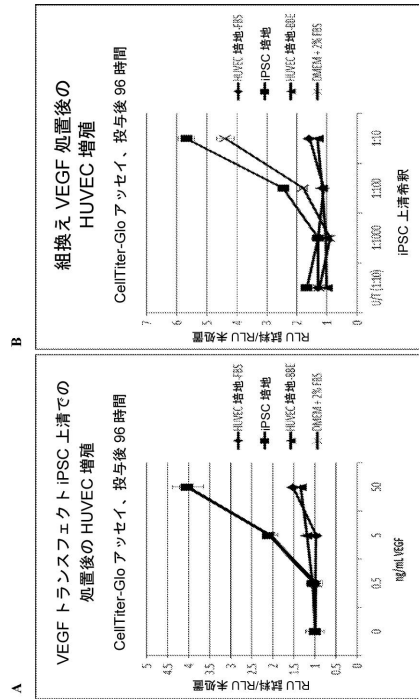


図 5

【図 6】

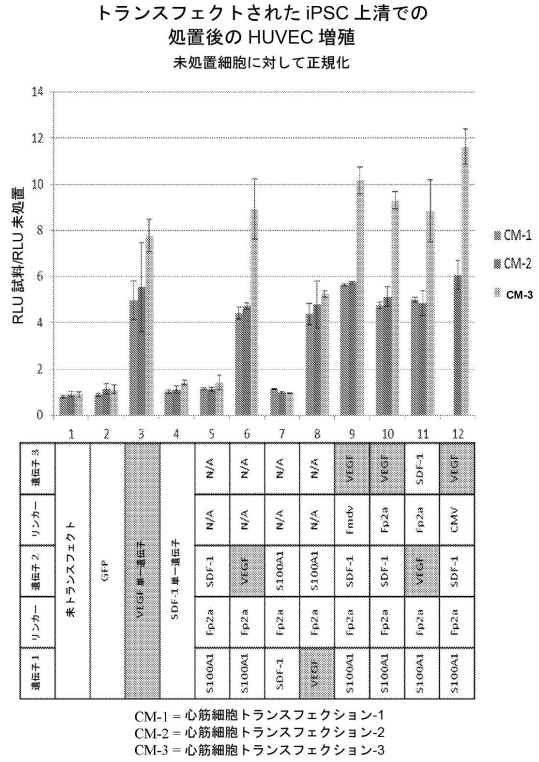


図 6

【図 7】

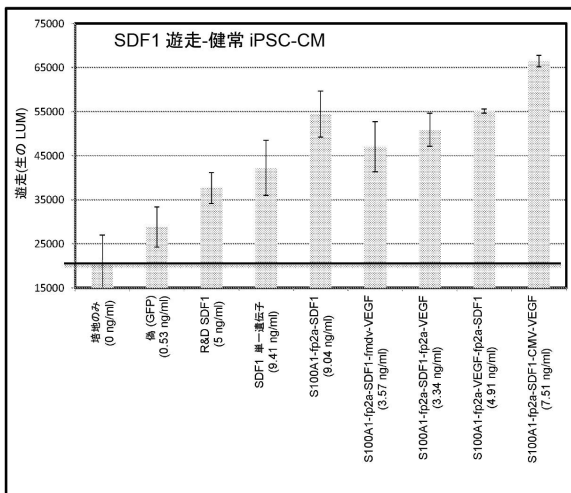


図 7

【図 8】

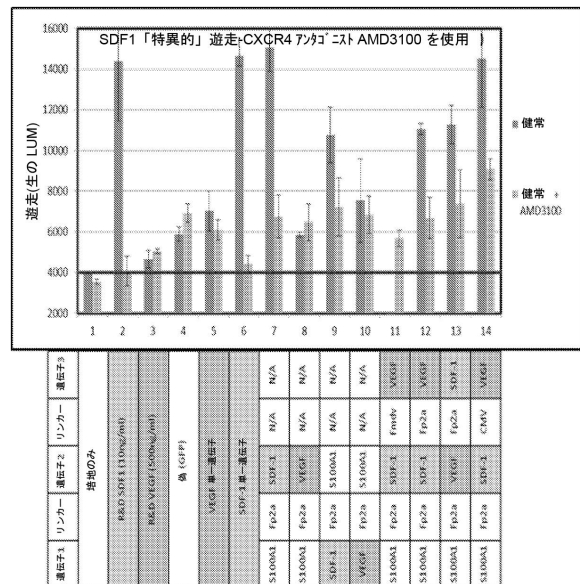


図 8

【図 9】

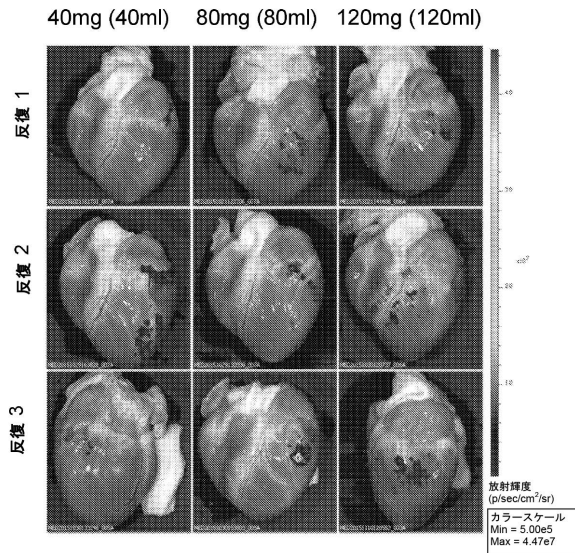


図 9

【図 10】

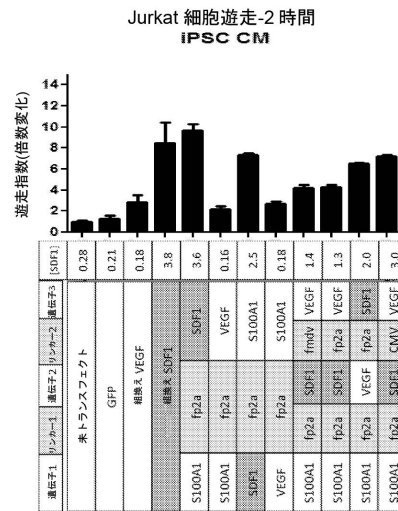


図 10

【図 11】

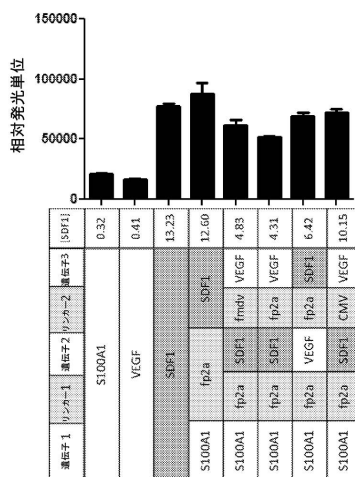


図 11

【図 12】

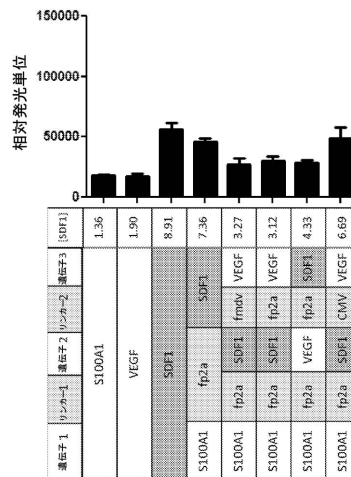


図 12

【図 13】

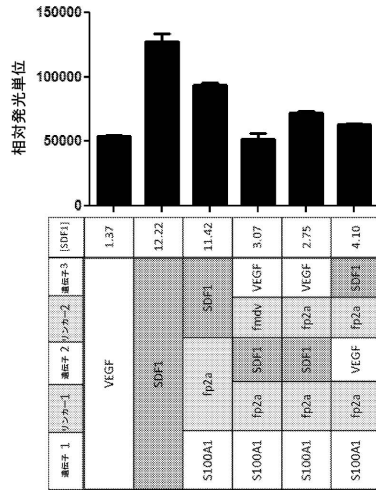


図 13

【図 14 - A】

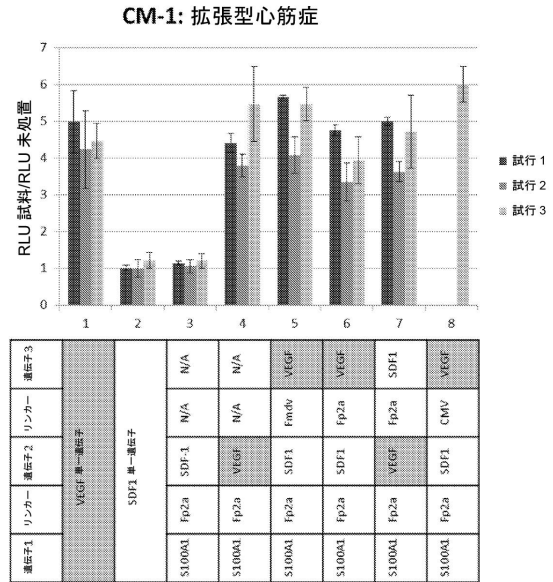


図 14A

【図 14 - B】

CM-4: 健康

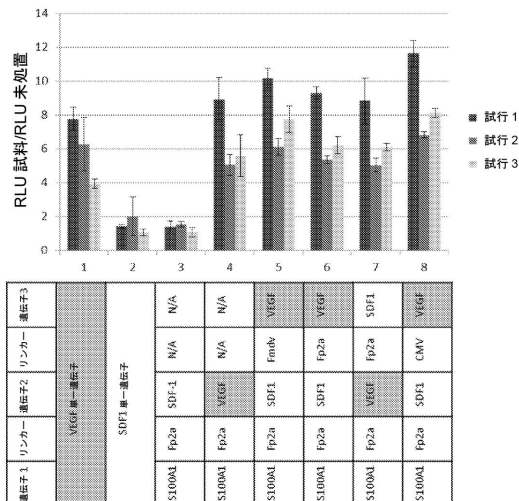
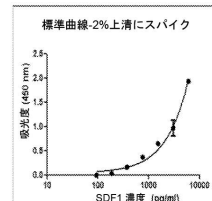


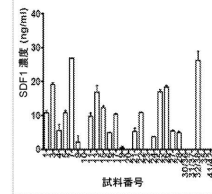
図 14B

【図 15】

A.



B.



Kozak	リンカー	GOI	[SDF1] (ng/ml)
1		S100A1-SDF1	10.84
3	フリン-(AP)-F2A	SDF1-S100A1	19.17
4		SDF1-VEGF191	5.56
5		VEGF191-SDF1	10.77
7		S100A1-SDF1	26.90
9		SDF1-S100A1	2.69
10		SDF1-VEGF191	0
11		VEGF191-SDF1	9.77
13		S100A1-SDF1	16.68
15	フリン-(APVKG)GSG-	SDF1-S100A1	12.27
16	P2A	SDF1-VEGF191	4.99
17		VEGF191-SDF1	10.36
19		SDF1-VEGF191	0.43
20	フリン-(AP)-F2A	VEGF191-SDF1	0
21		S100A1-SDF1	5.33
22		SDF1-S100A1	10.94
23		SDF1-VEGF191	0
24		VEGF191-SDF1	3.74
25		S100A1-SDF1	16.95
26		SDF1-S100A1	18.45
27	フリン-(APVKG)GSG-	SDF1-VEGF191	5.42
28	P2A	VEGF191-SDF1	4.96
30/36		VEGF191	0
31/37		S100A1	0
32/38		SDF1	26.22
35		偽	0
41/42		未トランスフェクト	0

図 15

【図 16】

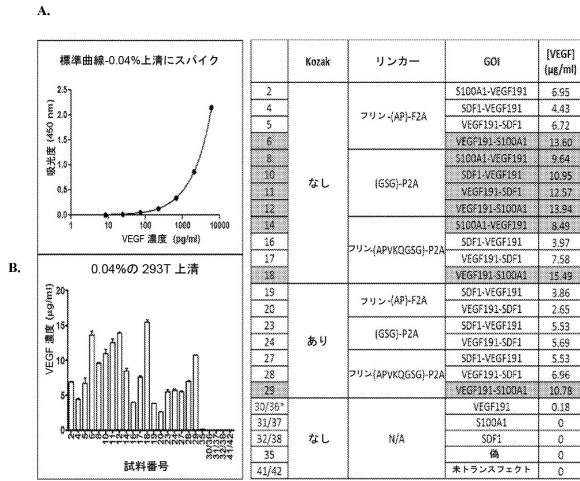


図 16

【図 17】

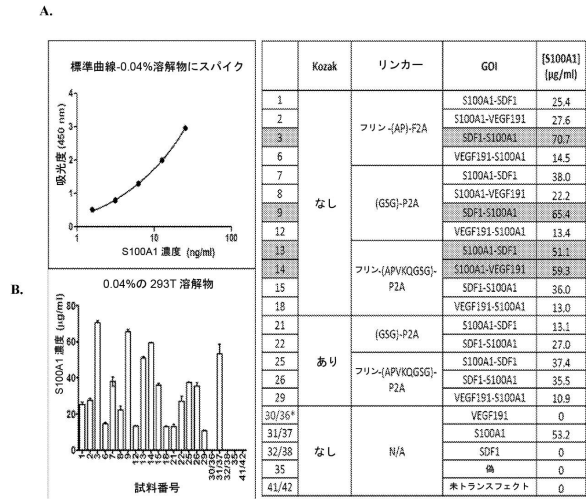


図 17

【図 18】

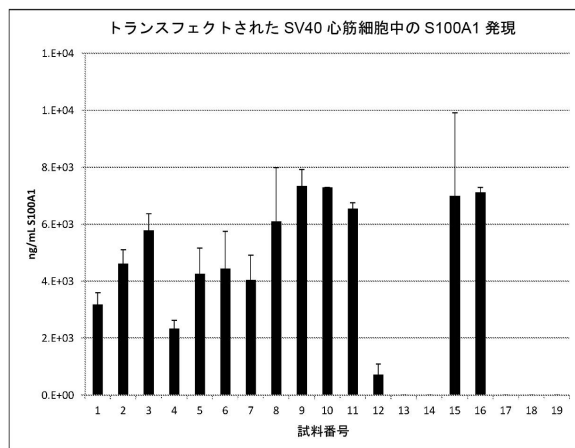


図 18

【図 19】

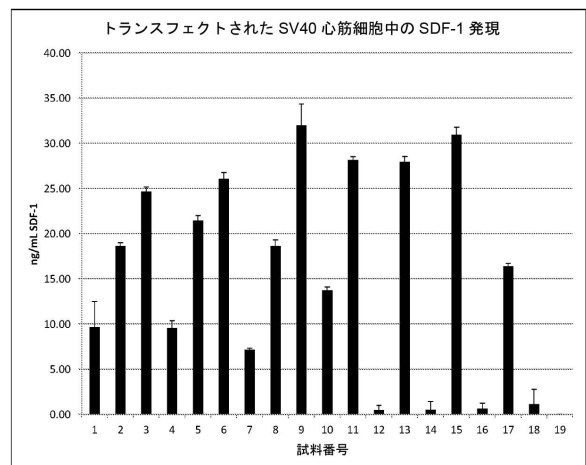


図 19

【図 20】

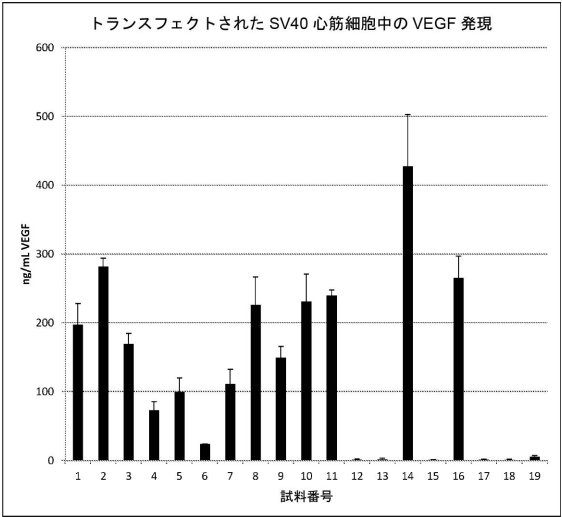


図 20

【図 21】

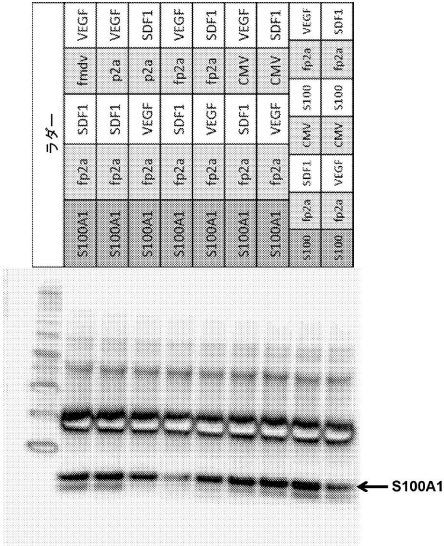


図 21

【図 22】

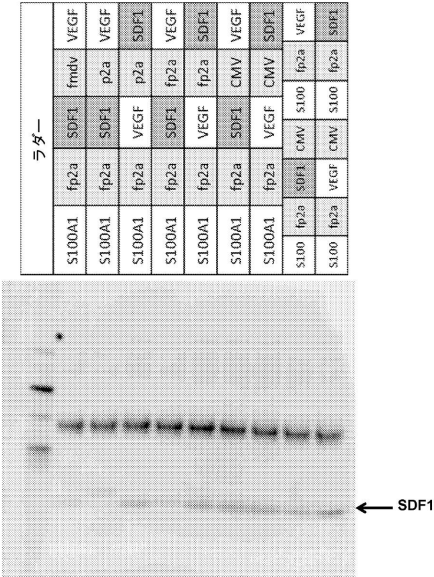


図 22

【図 23】

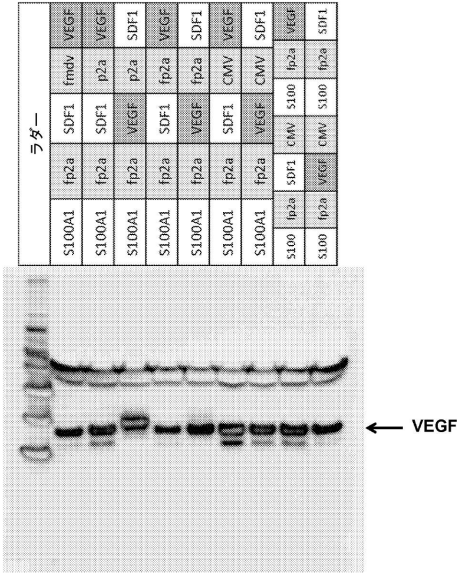


図 23

【図 24】

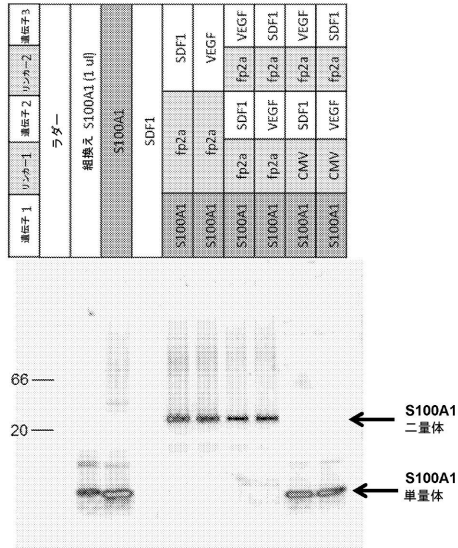


図 24

【図 25】

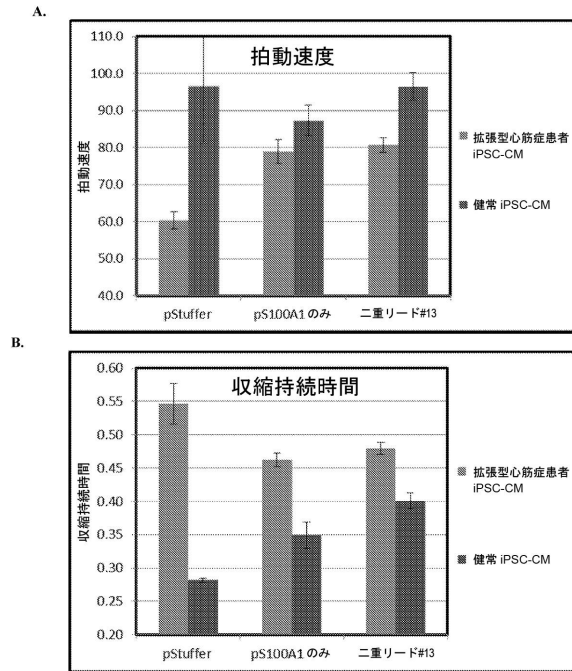


図 25

【図 26】

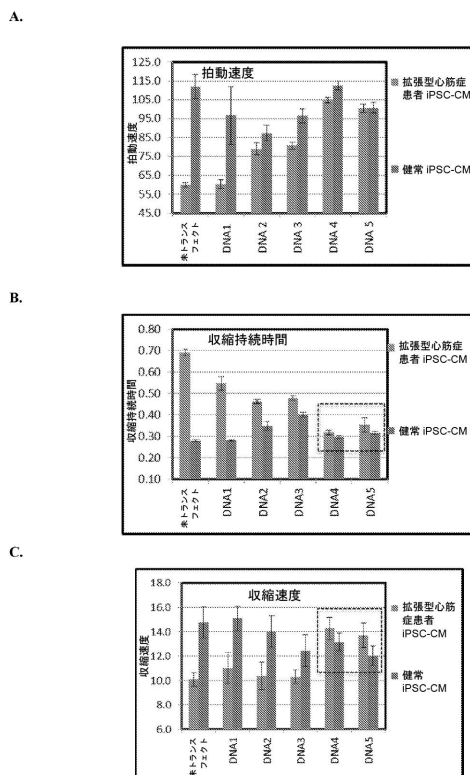


図 26

【図 27】

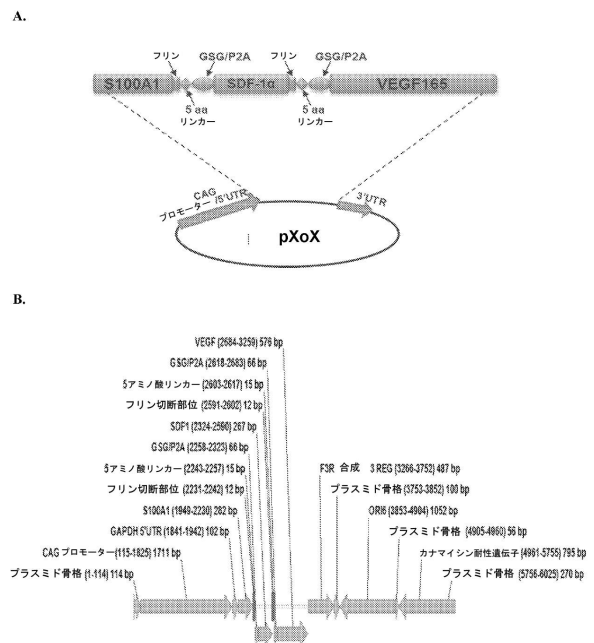


図 27

【図 28】

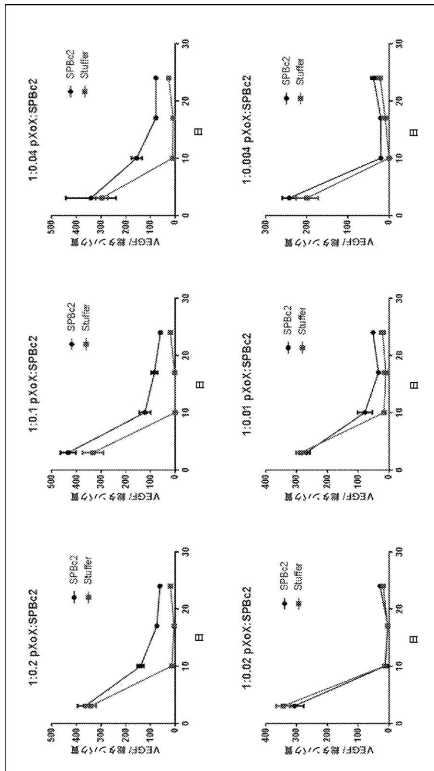


図 28

【図 29】

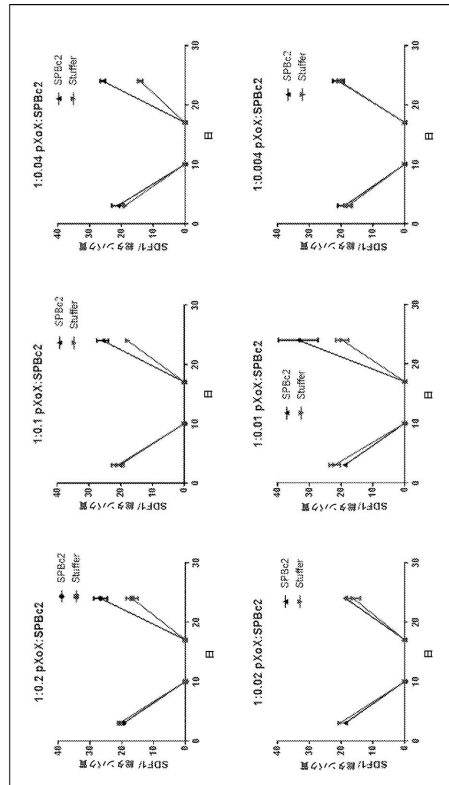


図 29

【図 30】

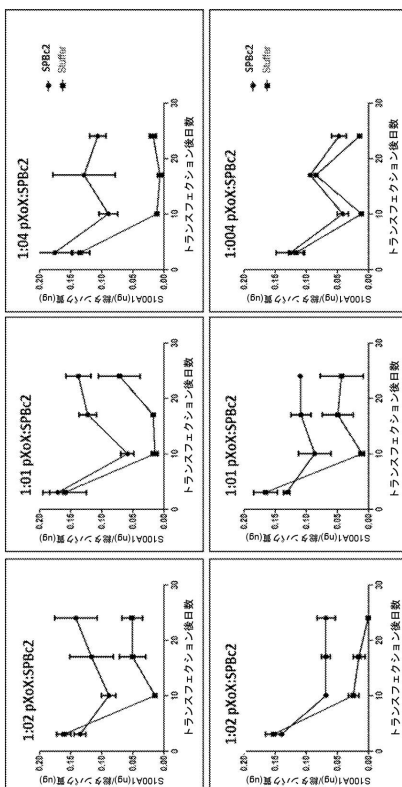


図 30

【図 31】

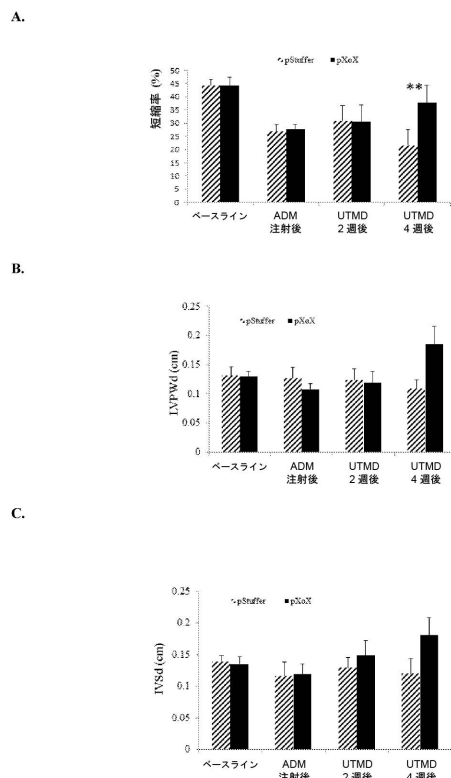


図 31

【図 3 2】

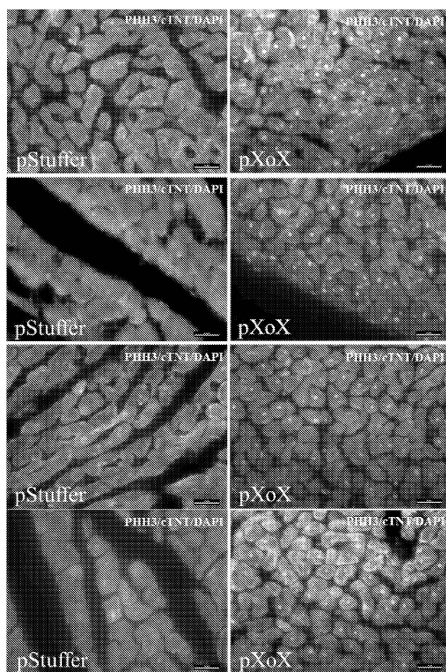


図 32

【図 3 3】

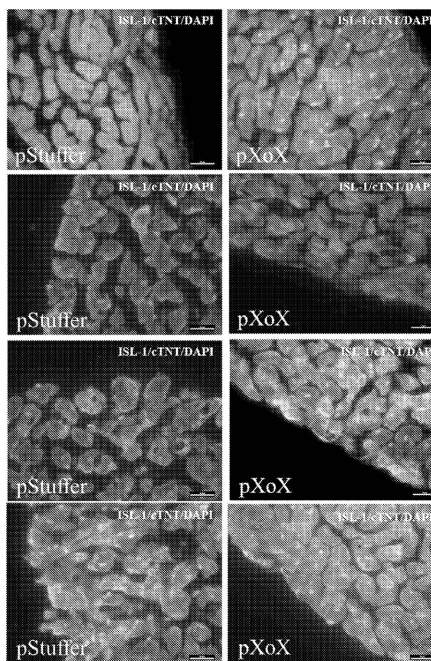


図 33

【配列表】

0006976244000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/85	(2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	9/50	(2006.01)	A 6 1 K	9/50	
A 6 1 K	47/44	(2017.01)	A 6 1 K	47/44	
A 6 1 K	47/06	(2006.01)	A 6 1 K	47/06	
A 6 1 K	47/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12	

(72)発明者 パテール, ディムキ エス.

アメリカ合衆国 メリーランド州 20876, ジャーマンタウン, セネカ メドーズ パークウ
エイ 20358

(72)発明者 パテール, アミット エヌ.

アメリカ合衆国 ユタ州 84103, ソルトレークシティー, チャートウェル シーティー.
1040

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表2010-540534 (JP, A)

Cell Transplantation, 2016年05月10日, Vol. 25, pp. 1591-1607

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00

C 1 2 N 5/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq