

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-552254

(P2022-552254A)

(43)公表日 令和4年12月15日(2022.12.15)

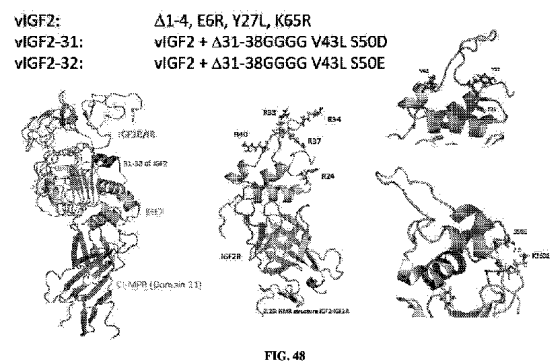
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/16 (2006.01)	C 1 2 N	15/16	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	2 0 0 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全171頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-521217(P2022-521217)	(71)出願人	507170099		
(86)(22)出願日	令和2年10月12日(2020.10.12)		アミカス セラピューティックス インコ		
(85)翻訳文提出日	令和4年6月3日(2022.6.3)		ーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/055251		アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 1		
(87)国際公開番号	WO2021/072372		0 4, フィラデルフィア, マーケット		
(87)国際公開日	令和3年4月15日(2021.4.15)		ストリート 3 6 7 5		
(31)優先権主張番号	62/913,677	(74)代理人	110002077		
(32)優先日	令和1年10月10日(2019.10.10)		園田・小林弁理士法人		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ドウ, ハング		
(31)優先権主張番号	62/929,054		アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8		
(32)優先日	令和1年10月31日(2019.10.31)		5 1 2, クランバリー, シダー プル		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	トウスケ, スティーヴン		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8		
	最終頁に続く		5 1 2, クランバリー, シダー プル		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 バリエント I G F 2 構築体

(57)【要約】

本明細書中で提供されるのは、リソソーム蓄積障害の処置のための、新規の I G F 2 ペプチド、融合タンパク質、並びに新規の I G F 2 ペプチド及び融合タンパク質をコードする核酸配列であり、I G F 2 ペプチドは、特性の増強、例えば、発現、分泌、及び細胞取込みの増強を付与する。本明細書中で提供される構築体は、酵素置換治療及び遺伝子治療の双方によってリソソーム蓄積障害を処置するのに有用である。

【選択図】 図 4 8



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 治療タンパク質をコードする核酸配列、及び

(b) 配列番号 90～103 から選択される少なくとも 1 つの配列と少なくとも 95 % 同一のバリエーション IGF2 (v IGF2) ペプチドをコードする核酸配列を含む核酸構築体。

【請求項 2】

前記 v IGF2 ペプチドは、配列番号 106、109、111、119、120、121 から選択される IGF2 バリエーション ペプチドと少なくとも 98 % 同一のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の核酸構築体。

【請求項 3】

前記 v IGF2 ペプチドは、配列番号 120 及び配列番号 121 からなる群から選択される IGF2 バリエーション ペプチドと少なくとも 98 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸構築体。

【請求項 4】

配列番号 181～188 からなる群から選択される配列と少なくとも 98 % 同一の配列を有するリンカーをコードする配列をさらに含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 5】

前記 v IGF2 ペプチドは、配列番号 80 のアミノ酸配列を有する v IGF2 ペプチドと比較して、治療タンパク質の発現及び／又は分泌を増大させることができる、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 6】

前記 v IGF2 ペプチドは、配列番号 80 のアミノ酸配列を有する v IGF2 ペプチドと比較して、CIE-MPR に対する親和性が増している、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 7】

前記 v IGF2 ペプチドは、細胞中への前記治療タンパク質の取込みを向上させることができる、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 8】

前記治療タンパク質は、遺伝的障害を有する対象において、前記遺伝的障害と関連する欠陥タンパク質又は欠乏タンパク質を置換することができる、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 9】

遺伝的障害はリソソーム蓄積障害である、請求項 8 に記載の核酸構築体。

【請求項 10】

前記遺伝的障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、ニューロンセロイドリポフスチン沈着症、CLN1/PPT1 病、CLN2/PPT1 病、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病 I 型、ゴーシェ病 II 型、ゴーシェ病 III 型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染性白質萎縮症、ムコリピドーシス I 型、ムコリピドーシス II 型、ムコリピドーシス III 型、ムコリピドーシス IV 型、ハーラー病、ハンター病、サンフィリップ病 A 型、サンフィリップ病 B 型、サンフィリップ病 C 型、サンフィリップ病 D 型、モルキオ病 A 型、モルキオ病 B 型、マロトー・ラミー病、スライ病、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・ピック病 C1 型、ニーマン・ピック病 C2 型、シンドラー病 I 型、シンドラー病 II 型、アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全 (ADA-SCID)、及びニューロンセロイドリポフスチン沈着症からなる群から選択される、請求項 8 に記載の核酸構築体。

【請求項 11】

前記遺伝的障害は、CLN1/PPT1 病、CLN2/PPT1 病、ポンペ病、及び MPS III B 病からなる群から選択される、請求項 8 又は 9 に記載の核酸構築体。

10

20

30

40

50

【請求項 12】

前記遺伝的障害は、CLN1 / PPT1 病又は CLN2 / PPT1 病である、請求項 1 に記載の核酸構築体。

【請求項 13】

前記治療タンパク質は、アルファ-ガラクトシダーゼ（A 又は B）、β-ガラクトシダーゼ、β-ヘキソサミニダーゼ（A 又は B）、ガラクトシルセラミダーゼ、アリルスルファターゼ（A 又は B）、β-グルコセレブロシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、リソソーム酸性リパーゼ、リソソーム酵素酸性スフィンゴリエリナーゼ、ホルミルグリシン生成酵素、イズロニダーゼ（例えばアルファ-L）、アセチル CoA：アルファ-グルコサミニド N-アセチルトランスフェラーゼ、グリコサミノグリカンアルファ-L-イズロノヒドロラーゼ、ヘパラン N-スルファターゼ、N-アセチル-α-D-グルコサミニダーゼ（NAGLU）、イズロナート-2-スルファターゼ、ガラクトサミン-6-スルファートスルファターゼ、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ、N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ、グリコサミノグリカン N-アセチルガラクトサミン 4-スルファターゼ、β-グルクロニダーゼ、ヒアルロニダーゼ、アルファ-N-アセチルノイラミニダーゼ（シアリダーゼ）、ガングリオシドシアリダーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、アルファ-グルコシダーゼ、アルファ-D-マンノシダーゼ、ベーター-D-マンノシダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、アルファ-L-フコシダーゼ、バツテニン、PPT1、TPP1、及び他のバツテン関連タンパク質（例えば、セロイド-リポフスチン沈着症ニューロンタンパク質 6）、又はそれらの酵素的に活性な断片からなる群から選択されるヒト酵素を含む、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 14】

前記治療タンパク質は、アルファ-グルコシダーゼ、又はその酵素的に活性な断片である、請求項 13 に記載の核酸構築体。

【請求項 15】

前記治療タンパク質は、ヒト PPT1 である、請求項 13 に記載の核酸構築体。

【請求項 16】

前記治療タンパク質は、ヒト TPP1 である、請求項 13 に記載の核酸構築体。

【請求項 17】

前記治療タンパク質は、ヒト NAGLU である、請求項 13 に記載の核酸構築体。

【請求項 18】

前記核酸構築体はさらに、シグナルペプチドをコードする配列を含む、請求項 1 に記載の核酸構築体。

【請求項 19】

前記シグナルペプチドは、配列番号 169～180 からなる群から選択される配列の 1 つである、請求項 18 に記載の核酸構築体。

【請求項 20】

前記 vIGF2 コード核酸配列は、治療タンパク質をコードする前記核酸配列に対して 5' 側にある、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 21】

前記 vIGF2 コード核酸配列は、治療タンパク質をコードする前記核酸配列に対して 3' 側にある、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 22】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載の核酸構築体を含む遺伝子治療ベクター。

【請求項 23】

ウイルスベクターである、請求項 22 に記載の遺伝子治療ベクター。

【請求項 24】

前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）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、ポックスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はヘルペスウイルスベクター

10

20

30

40

50

一である、請求項 23 に記載の遺伝子治療ベクター。

【請求項 25】

前記核酸構築体はプラスミドである、請求項 1～21 のいずれか一項に記載の核酸構築体。

【請求項 26】

治療的に有効な量の、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の核酸構築体、又は請求項 22～24 のいずれか一項に記載の遺伝子治療ベクター、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 27】

前記賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む、請求項 25 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

遺伝的障害を処置する方法であって、遺伝的障害の処置を必要とする対象に、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の核酸構築体、又は請求項 25 若しくは 26 に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 29】

前記遺伝的障害はリソソーム蓄積障害である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記遺伝的障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、ニューロンセロイドリポフスチン沈着症、CLN1 / PPT1 病、CLN2 / PPT1 病、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病 I 型、ゴーシェ病 II 型、ゴーシェ病 III 型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染性白質萎縮症、ムコリピドーシス I 型、ムコリピドーシス II 型、ムコリピドーシス III 型、ムコリピドーシス IV 型、ハーラー病、ハンター病、サンフィリップ病 A 型、サンフィリップ病 B 型、サンフィリップ病 C 型、サンフィリップ病 D 型、モルキオ病 A 型、モルキオ病 B 型、マロトー・ラミー病、スライ病、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・ピック病 C1 型、ニーマン・ピック病 C2 型、シンドラー病 I 型、シンドラー病 II 型、アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全 (ADA-SCID)、及び慢性肉芽腫症 (CGD) からなる群から選択される、請求項 27 又は 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記遺伝的障害は CLN1 / PPT1 病である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記遺伝的障害は CLN2 / TPP1 病である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

前記遺伝的障害はサンフィリップ病 B 型である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記投与は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、実質内、皮下、又はそれらの組合せに実行される、請求項 27～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記核酸、遺伝子治療ベクター、又は医薬組成物の投与は、脳内での蓄自家蛍光素材 (ASM) の蓄積を妨げ／引き下げ、又は食い止める、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

前記核酸、遺伝子治療ベクター、又は医薬組成物の投与は、脳内での神経膠線維性酸性タンパク質 (GFAP) の上昇を妨げ／引き下げ、又は食い止める、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 37】

前記核酸、遺伝子治療ベクター、又は医薬組成物の投与は、皮質又は視床内での蓄自家蛍光素材 (ASM) の蓄積を妨げ／引き下げ、又は食い止める、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

前記核酸、遺伝子治療ベクター、又は医薬組成物の投与は、脳皮質又は視床内での神経膠線維性酸性タンパク質（GFAP）の上昇を妨げ／引き下げ、又は食い止める、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記核酸は、配列番号 60～67 からなる群から選択される配列と少なくとも 98% 同一の配列を有する融合タンパク質をコードする、請求項 31、35～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記核酸は、配列番号 47～53 からなる群から選択される配列と少なくとも 98% 同一の配列を有する融合タンパク質をコードする、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 41】

a. 配列番号 106、109、111、119、120、及び 121 からなる群から選択される配列と少なくとも 98% 同一のアミノ酸配列；並びに

b. 配列番号 4、配列番号 4 の残基 21～306、配列番号 4 の残基 28～306、配列番号 8、配列番号 54～59、配列番号 54 の残基 24～743、及び配列番号 46 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 42】

配列番号 120 及び 121 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする配列を含む、請求項 41 に記載の核酸。

【請求項 43】

リソソーム切断ペプチドをコードする配列をさらに含む、請求項 41 又は 42 に記載の核酸。

【請求項 44】

前記融合タンパク質は、配列番号 60～67 及び配列番号 47～53 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一の配列を有する、請求項 43～45 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 45】

前記融合タンパク質は、配列番号 60～67 及び配列番号 47～53 からなる群から選択される配列と少なくとも 98% 同一の配列を有する、請求項 44 に記載の核酸。

【請求項 46】

請求項 41～44 のいずれか一項に記載の核酸、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 47】

配列番号 90～103 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列と少なくとも 98% 同一のバリエーション IGF2（vIGF2）ペプチド。

【請求項 48】

配列番号 106、109、111、119、120、121 から選択される少なくとも 1 つの配列と少なくとも 98% 同一である、請求項 47 に記載のバリエーション IGF2（vIGF2）ペプチド。

【請求項 49】

配列番号 4、配列番号 4 のアミノ酸残基 21～306、配列番号 4 のアミノ酸残基 28～306、配列番号 8、配列番号 46、配列番号 54、及び配列番号 54 のアミノ酸残基 24～743 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を有する治療タンパク質をさらに含む、請求項 47 又は 48 に記載のバリエーション vIGF2 ペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 50】

配列番号 60～67、配列番号 47～53、及び配列番号 54～59 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を有する、請求項 49 に記載の融合

10

20

30

40

50

タンパク質。

【請求項 5 1】

リソソーム切断ペプチドをさらに含む、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5 2】

前記 v I G F 2 ペプチドは、前記治療タンパク質の N 末端にある、請求項 4 9 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5 3】

前記 v I G F 2 ペプチドは、前記治療タンパク質の C 末端にある、請求項 4 9 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5 4】

前記融合タンパク質はシグナル配列を含む、請求項 4 9 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5 5】

前記シグナル配列は、配列番号 1 6 9 ～ 1 8 0 からなる群から選択される配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を有する、請求項 5 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5 6】

前記 v I G F 2 ペプチドは、配列番号 1 2 0 又は 1 2 1 と少なくとも 9 8 % 同一である、請求項 5 6 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5 7】

前記治療タンパク質は、P P T 1 又はその酵素的に活性な断片、T P P 1 又はその酵素的に活性な断片、及び N A G L U 又はその酵素的に活性な断片からなる群から選択される、請求項 5 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5 8】

前記融合タンパク質は、前記 v I G F 2 ペプチドを欠いている対応するタンパク質よりも、標的細胞によって効率的に取り込まれる、請求項 5 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5 9】

請求項 4 9 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 6 0】

リソソーム蓄積障害を処置する方法であって、請求項 5 9 に記載の医薬組成物を、リソソーム蓄積障害の処置を必要とする対象に投与することを含む方法。

【請求項 6 1】

前記リソソーム蓄積障害は、C L N 1 / P P T 1 病、C L N 2 / T P P 1 病、及びサンフィリップ B 型病からなる群から選択される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記投与は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、実質内、皮下、又はそれらの組合せに実行される、請求項 6 0 又は 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記医薬組成物の投与は、脳内での蓄自家蛍光素材 (A S M) の蓄積を妨げ／引き下げ、又は食い止める、請求項 6 1 又は 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記医薬組成物の投与は、脳内での神経膠線維性酸性タンパク質 (G F A P) の上昇を妨げ／引き下げ、又は食い止める、請求項 6 1 又は 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記医薬組成物の投与は、皮質又は視床内での蓄自家蛍光素材 (A S M) の蓄積を妨げ／引き下げ、又は食い止める、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記医薬組成物の投与は、脳皮質又は視床内での神経膠線維性酸性タンパク質 (G F A P) の上昇を妨げ／引き下げ、又は食い止める、請求項 6 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 67】

v I G F 2 及び治療タンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸であって、配列番号 189～250 からなる群から選択される配列と少なくとも 85 % 同一である核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年10月10日出願の米国仮特許出願第62／913,677号、及び2019年10月31日出願の米国仮特許出願第62／929,054号の優先権の利益を主張する。これらの出願は各々、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0002】

遺伝的障害は、ゲノムの遺伝子コード領域内に生じる遺伝性の、又は新規の変異を介して生じる。場合によっては、そのような遺伝的障害は、遺伝的障害を有する個体における、変異した遺伝子によってコードされるタンパク質を置換するタンパク質の投与によって、又はそのようなタンパク質をコードする遺伝子治療ベクターの投与によって処置される。しかしながら、そのような処置は課題がある。というのも、投与されるタンパク質、又は遺伝子治療ベクターによってコードされるタンパク質が常に、タンパク質が必要とされる器官、細胞、又は細胞小器官に到達するわけでないからである。細胞内標的化（例えば、リソソームに対する）が向上したタンパク質、及びこれをコードする遺伝子治療ベクターが所望される。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

特定の態様において：（a）治療タンパク質をコードする核酸配列、及び（b）バリエーション I G F 2（v I G F 2）ペプチドをコードする核酸配列を含む核酸構築体が提供される。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、表3の I G F 2 バリエーションペプチドと少なくとも90、95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、表3の配列番号90～123からなる群から選択される I G F 2 バリエーションペプチドと少なくとも90、95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドはさらに、配列番号181～188からなる群から選択される配列と少なくとも90、95、96、97、98、又は99%同一の配列を有するリンカーを含む。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、インスリン受容体及び I G F R 1 に対する親和性が、天然 I G F 2 ペプチドと比較して、低下しているか、又はない。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、C I - M P R に対する親和性が、天然 I G F 2 ペプチドと比較して、増している。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、天然 I G F 2 ペプチドと比較して、融合タンパク質の発現及び／又は分泌の向上を付与する。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、細胞内のリソソーム中への治療タンパク質の取込みを促進することができる。一部の実施形態において、治療タンパク質は、遺伝的障害を有する対象において、遺伝的障害と関連する欠陥タンパク質又は欠乏タンパク質を置換することができる。一部の実施形態において、遺伝的障害は、リソソーム蓄積障害である。一部の実施形態において、遺伝的障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、C L N 1、C L N 2、Cシスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病 I 型、ゴーシェ病 I I 型、ゴーシェ病 I I I 型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染性白質萎縮症、ムコリピドーシス I 型、ムコリピドーシス I I 型、ムコリピドーシス I I I 型、ムコリピドーシス I V 型、ハーラー病、ハンター病、サンフィリップ病 A 型、サンフィリップ病 B 型、サンフィリップ病 C 型、サンフィリップ病 D 型、モルキオ病 A 型、モルキオ病 B 型、マロトー・ラミー病、スライ病、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・

30

40

50

ピック病 C 1 型、ニーマン・ピック病 C 2 型、シンドラー病 I 型、シンドラー病 I I 型、
 アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全 (A D A - S C I D)、慢性肉芽腫症 (C G D)
)、及びニューロンセロイドリポフスチン沈着症からなる群から選択される。一部の実施
 形態において、遺伝的障害はポンペ病である。一部の実施形態において、遺伝的障害はニ
 ユロンセロイドリポフスチン沈着症である。一部の実施形態において、治療タンパク質
 は、アルファーガラクトシダーゼ (A 又は B)、 β -ガラクトシダーゼ、 β -ヘキソサミ
 ニダーゼ (A 又は B)、ガラクトシルセラミダーゼ、アシルスルファターゼ (A 又は B)
 、 β -グルコセレブロシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、リソソーム酸性リパーゼ、リ
 ソソーム酵素酸性スフィンゴミエリナーゼ、ホルミルグリシン生成酵素、イズロニダーゼ
 (例えばアルファール)、アセチル C o A : アルファールグルコサミニド N - アセチルトラ
 ンスフェラーゼ、グリコサミノグリカンアルファール - イズロノヒドロラーゼ (i d u r
 o n o h y d r o l a s e)、ヘパラン N - スルファターゼ、N - アセチル - α - D - グ
 ルコサミニダーゼ (N A G L U)、イズロナート - 2 - スルファターゼ、ガラクトサミン
 - 6 - スルファートスルファターゼ、N - アセチルガラクトサミン - 6 - スルファターゼ
 、N - スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ、グリコサミノグリカン N - アセチルガラ
 クトサミン 4 - スルファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、ヒアルロニダーゼ、アルファール
 N - アセチルノイラミニダーゼ (シアリダーゼ)、ガングリオシドシアリダーゼ、ホスホ
 トランスフェラーゼ、アルファールグルコシダーゼ、アルファール D - マンノシダーゼ、ベ
 ーター D - マンノシダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、アルファール - フコシダー
 ゼ、バッテニン (b a t t e n i n)、タンパク質パルミトイルチオエステラーゼ、及び
 10
 20
 30
 40
 50
 60
 70
 80
 90
 100
 110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180
 190
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000
 10010
 10020
 10030
 10040
 10050
 10060
 10070
 10080
 10090
 10100
 10110
 10120
 10130
 10140
 10150
 10160
 10170
 10180
 10190
 10200
 10210
 10220
 10230
 10240
 10250
 10260
 10270
 10280
 10290
 10300
 10310
 10320
 10330
 10340
 10350
 10360
 10370
 10380
 10390
 10400
 10410
 10420
 10430
 10440
 10450
 10460
 10470
 10480
 10490
 10500
 10510
 10520
 10530
 10540
 10550
 10560
 10570
 10580
 10590
 10600
 10610
 10620
 10630
 10640
 10650
 10660
 10670
 10680
 10690
 10700
 10710
 10720
 10730
 10740
 10750
 10760
 10770
 10780
 10790
 10800
 10810
 10820
 10830
 10840
 10850
 10860
 10870
 10880
 10890
 10900
 10910
 10920
 10930
 10940
 10950
 10960
 10970
 10980
 10990
 11000
 11010
 11020
 11030
 11040
 11050
 11060
 11070
 11080
 11090
 11100
 11110
 11120
 11130
 11140
 11150
 11160
 11170
 11180
 11190
 11200
 11210
 11220
 11230
 11240
 11250
 11260
 11270
 11280
 11290
 11300
 11310
 11320
 11330
 11340
 11350
 11360
 11370
 11380
 11390
 11400
 11410
 11420
 11430
 11440
 11450
 11460
 11470
 11480
 11490
 11500
 11510
 11520
 11530
 11540
 11550
 11560
 11570
 11580
 11590
 11600
 11610
 11620
 11630
 11640
 11650
 11660
 11670
 11680
 11690
 11700
 11710
 11720
 11730
 11740
 11750
 11760
 11770
 11780
 11790
 11800
 11810
 11820
 11830
 11840
 11850
 11860
 11870
 11880
 11890
 11900
 11910
 11920
 11930
 11940
 11950
 11960
 11970
 11980
 11990
 12000
 12010
 12020
 12030
 12040
 12050
 12060
 12070
 12080
 12090
 12100
 12110
 12120
 12130
 12140
 12150
 12160
 12170
 12180
 12190
 12200
 12210
 12220
 12230
 12240
 12250
 12260
 12270
 12280
 12290
 12300
 12310
 12320
 12330
 12340
 12350
 12360
 12370
 12380
 12390
 12400
 12410
 12420
 12430
 12440
 12450
 12460
 12470
 12480
 12490
 12500
 12510
 12520
 12530
 12540
 12550
 12560
 12570
 12580
 12590
 12600
 12610
 12620
 12630
 12640
 12650
 12660
 12670

される医薬組成物のいずれか1つを投与することを含む方法が提供される。一部の実施形態において、遺伝的障害はリソソーム蓄積障害である。一部の実施形態において、遺伝的障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、バッテン病、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病Ⅰ型、ゴーシェ病Ⅱ型、ゴーシェ病Ⅲ型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染性白質萎縮症、ムコリピドーシスⅠ型、ムコリピドーシスⅡ型、ムコリピドーシスⅢ型、ムコリピドーシスⅣ型、ハーラー病、ハンター病、サンフィリップ病Ⅰ型、サンフィリップ病Ⅱ型、サンフィリップ病Ⅲ型、サンフィリップ病Ⅳ型、モルキオ病Ⅰ型、モルキオ病Ⅱ型、マロトー・ラミー病、スライ病、ニーマン・ピック病Ⅰ型、ニーマン・ピック病Ⅱ型、ニーマン・ピック病Ⅲ型、ニーマン・ピック病Ⅳ型、シンドラー病Ⅰ型、シンドラー病Ⅱ型、アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全（ADA-SCID）、慢性肉芽腫症（CGD）、及びニューロンセロイドリポフスチン沈着症（バッテン病）からなる群から選択される。一部の実施形態において、遺伝的障害はポンペ病である。一部の実施形態において、遺伝的障害はニューロンセロイドリポフスチン沈着症である。一部の実施形態において、遺伝的障害はアスパルチルグルコサミン尿症である。一部の実施形態において、投与は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、実質内、皮下、又はそれらの組合せに実行される。一部の実施形態において、投与は髄腔内に実行される。

10

【0006】

更なる態様において、遺伝的障害を処置するのに使用される、本明細書中で提供される遺伝子治療ベクターのいずれか1つ、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。更なる態様において、遺伝的障害の処置のための薬剤の調製に使用される、本明細書中で提供される核酸構築体のいずれか1つ、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、遺伝的障害は、リソソーム蓄積障害である。一部の実施形態において、遺伝的障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、バッテン病、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病Ⅰ型、ゴーシェ病Ⅱ型、ゴーシェ病Ⅲ型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染性白質萎縮症、ムコリピドーシスⅠ型、ムコリピドーシスⅡ型、ムコリピドーシスⅢ型、ムコリピドーシスⅣ型、ハーラー病、ハンター病、サンフィリップ病Ⅰ型、サンフィリップ病Ⅱ型、サンフィリップ病Ⅲ型、サンフィリップ病Ⅳ型、モルキオ病Ⅰ型、モルキオ病Ⅱ型、マロトー・ラミー病、スライ病、ニーマン・ピック病Ⅰ型、ニーマン・ピック病Ⅱ型、ニーマン・ピック病Ⅲ型、ニーマン・ピック病Ⅳ型、シンドラー病Ⅰ型、シンドラー病Ⅱ型、アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全（ADA-SCID）、慢性肉芽腫症（CGD）、及びニューロンセロイドリポフスチン沈着症からなる群から選択される。一部の実施形態において、遺伝的障害はポンペ病である。一部の実施形態において、遺伝的障害はニューロンセロイドリポフスチン沈着症である。一部の実施形態において、遺伝的障害はアスパルチルグルコサミン尿症である。一部の実施形態において、組成物は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、又は皮下投与用に製剤化される。一部の実施形態において、組成物は髄腔内投与用に製剤化される。

20

30

【0007】

更なる態様において、配列番号47～53からなる群から選択される配列と少なくとも90、95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードする核酸が提供される。一部の実施形態において、核酸は、配列番号60～67からなる群から選択される配列と少なくとも85、90、95、96、97、98、又は99%同一である。

40

【0008】

更なる態様において、先の核酸のいずれか1つ、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む。

【0009】

50

更なる態様において、配列番号 47～53 及び配列番号 60～67 からなる群から選択される配列と少なくとも 90、95、96、97、98、又は 99% 同一のアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含む医薬組成物、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤。一部の実施形態において、賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む。

【0010】

更なる態様において、配列番号 47～53 及び配列番号 60～67 からなる群から選択される配列と少なくとも 90、95、96、97、98、又は 99% 同一のアミノ酸配列をコードする核酸；並びに配列番号 106、109、111、119、120、及び 121 からなる群から選択される配列と少なくとも 90、95、96、97、98、又は 99% 同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含む遺伝子治療ベクターが提供される。一部の実施形態において、遺伝子治療ベクターはウイルスベクターである。一部の実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) 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、ポックスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はヘルペスウイルスベクター、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤である。一部の実施形態において、賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む。

10

【0011】

更なる態様において、CLN1/PPT1 病又は CLN2/TPP1 病を処置する方法であって、CLN1/PPT1 病又は CLN2/TPP1 病の処置を必要とする対象に、治療的に有効な量の、本明細書中の核酸のいずれか 1 つ、本明細書中の融合タンパク質のいずれか 1 つ、本明細書中の遺伝子治療ベクターのいずれか 1 つ、又は本明細書中の医薬組成物のいずれか 1 つを投与することを含む方法が提供される。一部の実施形態において、投与は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、実質内、皮下、又はそれらの組合せに実行される。

20

【0012】

一部の実施形態において、核酸は、配列番号 189～250 からなる群から選択される配列と少なくとも 85、90、95、96、97、98、又は 99% 同一の核酸配列を有する。

30

【0013】

更なる態様において、本明細書中の核酸のいずれか 1 つ、薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む。

【0014】

一部の実施形態において、配列番号 90～103 からなる群から選択される配列と少なくとも 95、96、97、98、又は 99% 同一のバリエント IGF2 (vIGF2) ペプチドが提供される。

【0015】

一部の実施形態において、バリエント IGF2 (vIGF2) ペプチドは、配列番号 106、109、111、119、120、121 から選択される少なくとも 1 つの配列と少なくとも 98% 同一である。一部の実施形態において、vIGF2 ペプチドは、配列番号 120 又は 121 と少なくとも 95、96、97、98、又は 99% 同一である。

40

【0016】

一部の実施形態において、バリエント vIGF2 ペプチド、並びに配列番号 4、配列番号 4 のアミノ酸残基 21～306、配列番号 4 のアミノ酸残基 28～306、配列番号 8、配列番号 46、及び配列番号 54 からなる群から選択される配列と少なくとも 95、96、97、98、又は 99% 同一のアミノ酸配列を有する治療タンパク質を含む融合タンパク質が提供される。

【0017】

50

一部の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号 60～67、配列番号 47～53、及び配列番号 54～59 からなる群から選択される配列と少なくとも 95、96、97、98、又は 99 % 同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態において、融合タンパク質はさらに、リソソーム切断ペプチドを含む。一部の実施形態において、リソソーム切断ペプチドは配列番号 188 を有する。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、治療タンパク質の N 末端にある。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、治療タンパク質の C 末端にある。

【0018】

一部の実施形態において、融合タンパク質はシグナル配列を含む。一部の実施形態において、シグナル配列は、配列番号 169～180 からなる群から選択される配列と少なくとも 95、96、97、98、又は 99 % 同一のアミノ酸配列を有する。

10

【0019】

一部の実施形態において、治療タンパク質は、P P T 1 若しくはその酵素的に活性な断片、T P P 1 若しくはその酵素的に活性な断片、又は N A G L U 若しくはその酵素的に活性な断片である。

【0020】

一部の実施形態において、融合タンパク質は、v I G F 2 ペプチドを欠いている対応するタンパク質よりも、標的細胞によって効率的に取り込まれる。一部の実施形態において、融合タンパク質は、脳内の細胞によって取り込まれる。一部の実施形態において、融合タンパク質は、ニューロン細胞によって取り込まれる。一部の実施形態において、融合タンパク質は、神経膠細胞によって取り込まれる。

20

【0021】

また、本明細書中で提供されるのは、v I G F 2 ペプチド及び治療タンパク質を、薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤と共に有する融合タンパク質を含む医薬組成物である。また、リソソーム蓄積障害を処置する方法であって、そのような医薬組成物を、リソソーム蓄積障害の処置を必要とする対象に投与することを含む方法が、本明細書中で提供される。一部の実施形態において、リソソーム蓄積障害は、C L N 1 / P P T 1 病、C L N 2 / T P P 1 病、及びサンフィリップ B 型病からなる群から選択される。一部の実施形態において、融合タンパク質、又は融合タンパク質を含む医薬組成物は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、実質内、皮下、又はそれらの組合せに投与される。

30

【0022】

一部の実施形態において、医薬組成物の投与は、脳内での蓄自家蛍光素材 (A S M) の蓄積を妨げ／引き下げ、又は食い止める (r e v e r s e)。一部の実施形態において、医薬組成物の投与は、脳内での神経膠線維性酸性タンパク質 (G F A P) の上昇を妨げ／引き下げ、又は食い止める。一部の実施形態において、医薬組成物の投与は、皮質又は視床内での蓄自家蛍光素材 (A S M) の蓄積を妨げ／引き下げ、又は食い止める。一部の実施形態において、医薬組成物の投与は、脳皮質又は視床内での神経膠線維性酸性タンパク質 (G F A P) の上昇を妨げ／引き下げ、又は食い止める。

【0023】

さらに、本明細書中で提供されるのは、v I G F 2 及び治療タンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸であり、核酸は、配列番号 189～250 からなる群から選択される配列と少なくとも 85、90、95、96、97、98、又は 99 % 同一である。

40

【0024】

更なる態様において、本明細書中の融合タンパク質のいずれか 1 つ、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む。

【0025】

更なる態様において、配列番号 51 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列をコードす

50

る核酸を含む遺伝子治療ベクターが提供される。一部の実施形態において、遺伝子治療ベクターはウイルスベクターである。一部の実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）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、ポックスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はヘルペスウイルスベクターである。

【0026】

更なる態様において、本明細書中で提供される遺伝子治療ベクターのいずれか1つ、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む。

【0027】

別の態様において：（a）治療タンパク質をコードする核酸配列、及び（b）配列番号90～103から選択される少なくとも1つの配列と少なくとも95、96、97、98、又は99%同一のバリエーションIGF2（vIGF2）ペプチドをコードする核酸配列を含む核酸構築体が提供される。一部の態様において、vIGF2ペプチドは、配列番号106、109、111、119、120、121から選択されるIGF2バリエーションペプチドと少なくとも95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態において、vIGF2ペプチドは、配列番号120及び配列番号121からなる群から選択されるIGF2バリエーションペプチドと少なくとも95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を含む。

【0028】

一部の態様において、核酸はさらに、配列番号181～188からなる群から選択される配列と少なくとも95、96、97、98、又は99%同一の配列を有するリンカーをコードする配列を含む。一部の実施形態において、vIGF2ペプチドは、配列番号80のアミノ酸配列を有するvIGF2ペプチドと比較して、治療タンパク質の発現及び／又は分泌を増大させることができる。一部の実施形態において、vIGF2ペプチドは、配列番号80のアミノ酸配列を有するvIGF2ペプチドと比較して、CI-MPRに対する親和性が増している。一部の実施形態において、vIGF2ペプチドは、標的細胞、例えばヒト脳細胞中への治療タンパク質の取込みを向上させることができる。一部の実施形態において、ヒト脳細胞は、ニューロン細胞又は神経膠細胞である。

【0029】

特定の態様において、治療タンパク質は、遺伝的障害を有する対象において、遺伝的障害と関連する欠陥タンパク質又は欠乏タンパク質を置換することができる。一部の実施形態において、遺伝的障害はリソソーム蓄積障害である。一部の実施形態において、遺伝的障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、ニューロンセロイドリポフスチン沈着症、CLN1／PPT1病、CLN2／PPT1病、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病I型、ゴーシェ病II型、ゴーシェ病III型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染色性白質萎縮症、ムコリピドーシスI型、ムコリピドーシスII型、ムコリピドーシスIII型、ムコリピドーシスIV型、ハーラー病、ハンター病、サンフィリップ病A型、サンフィリップ病B型、サンフィリップ病C型、サンフィリップ病D型、モルキオ病A型、モルキオ病B型、マロトー・ラミー病、スライ病、ニーマン・ピック病A型、ニーマン・ピック病B型、ニーマン・ピック病C1型、ニーマン・ピック病C2型、シンドラー病I型、シンドラー病II型、アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全（ADA-SCID）、及びニューロンセロイドリポフスチン沈着症からなる群から選択される。一部の実施形態において、遺伝的障害は、CLN1／PPT1病、CLN2／PPT1病、ポンペ病、及びMPS III B病からなる群から選択される。一部の態様において、遺伝的障害は、CLN1／PPT1病又はCLN2／PPT1病である。

【0030】

一部の態様において、治療タンパク質は、アルファーガラクトシダーゼ（A又はB）、β-ガラクトシダーゼ、β-ヘキソサミニダーゼ（A又はB）、ガラクトシルセラミダー

10

20

30

40

50

ぜ、アリルスルファターゼ（A又はB）、 β -グルコセレブロシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、リソソーム酸性リパーゼ、リソソーム酵素酸性スフィンゴミエリナーゼ、ホルミルグリシン生成酵素、イズロニダーゼ（例えばアルファーL）、アセチルCoA：アルファーグルコサミニドN-アセチルトランスフェラーゼ、グリコサミノグリカンアルファーL-イズロノヒドロラーゼ、ヘパランN-スルファターゼ、N-アセチル- α -D-グルコサミニダーゼ（NAGLU）、イズロナート-2-スルファターゼ、ガラクトサミン-6-スルファートスルファターゼ、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ、N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ、グリコサミノグリカンN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、ヒアルロニダーゼ、アルファーN-アセチルノイラミニダーゼ（シアリダーゼ）、ガングリオシドシアリダーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、アルファーグルコシダーゼ、アルファーD-マンノシダーゼ、ベーターD-マンノシダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、アルファーL-フコシダーゼ、バツテニン、PPT1、TPP1、及び他のバツテン関連タンパク質（例えば、セロイドーリポフスチン沈着症ニューロンタンパク質6）、又はそれらの酵素的に活性な断片からなる群から選択されるヒト酵素を含む。一部の実施形態において、治療タンパク質は、ヒトリソソーム酵素又はその酵素的に活性な断片である。一部の実施形態において、ヒトリソソーム酵素は、アルファーグルコシダーゼ、PPT1、TPP1、又はNAGLUである。

10

【0031】

一部の態様において、核酸構築体はさらに、シグナルペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態において、シグナルペプチドは、配列番号169～180からなる群から選択される配列である。一部の実施形態において、vIGF2コード核酸配列は、治療タンパク質をコードする核酸配列に対して5'側にある。他の実施形態において、vIGF2コード核酸配列は、治療タンパク質をコードする核酸配列に対して3'側にある。

20

【0032】

さらに、本明細書中で提供されるのは、本明細書中に記載される核酸を含む遺伝子治療ベクターである。一部の実施形態において、遺伝子治療ベクターはウイルスベクターである。一部の実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）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、ポックスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はヘルペスウイルスベクターである。

30

【0033】

一部の態様において、本明細書中の核酸構築体は、プラスミド又は細菌人工染色体内にある。一部の実施形態において、本明細書中に記載される核酸構築体は、宿主細胞内にある。

【0034】

治療的に有効な量の、本明細書中に記載される核酸構築体、又は本明細書中に記載される核酸構築体を含む遺伝子治療ベクターを、薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤と共に含む医薬組成物がさらに提供される。一部の実施形態において、賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む。

40

【0035】

さらに、本明細書中で提供されるのは、遺伝的障害を処置する方法であって、遺伝的障害の処置を必要とする対象に、本明細書中に記載される核酸構築体、遺伝子治療ベクター、及び／又は医薬組成物を投与することを含む方法である。一部の実施形態において、遺伝的障害はリソソーム蓄積障害である。一部の実施形態において、遺伝的障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、ニューロンセロイドリポフスチン沈着症、CLN1／PPT1病、CLN2／PPT1病、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病I型、ゴーシェ病II型、ゴーシェ病III型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染性白質萎縮症、ムコリピドーシスI型、ムコリピドーシスII型、ムコリピドーシスIII型、ムコリピドーシスIV型、ハーラー病、ハンター病、サンフィリッポ病A型、サンフィリッ

50

ボ病 B 型、サンフィリップ病 C 型、サンフィリップ病 D 型、モルキオ病 A 型、モルキオ病 B 型、マロトー・ラミー病、スライ病、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・ピック病 C 1 型、ニーマン・ピック病 C 2 型、シンドラー病 I 型、シンドラー病 II 型、アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全 (ADA-SCID)、及び慢性肉芽腫症 (CGD) からなる群から選択される。一部の実施形態において、遺伝的障害は、バッテン病、例えば CLN1 / PPT1 病又は CLN2 / TPP1 病である。一部の実施形態において、遺伝的障害は、ポンペ病又はサンフィリップ病 B 型である。

【0036】

一部の実施形態において、投与は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、実質内、皮下、又はそれらの組合せに実行される。

10

【0037】

一部の態様において、核酸、遺伝子治療ベクター、融合タンパク質、又は医薬組成物の投与は、脳内での蓄自家蛍光素材 (ASM) の蓄積を妨げ／引き下げ、又は食い止める。一部の実施形態において、核酸、遺伝子治療ベクター融合タンパク質、又は医薬組成物の投与は、脳内での神経膠線維性酸性タンパク質 (GFAP) の上昇を妨げ／引き下げ、又は食い止める。一部の実施形態において、核酸、遺伝子治療ベクター、融合タンパク質、又は医薬組成物の投与は、皮質又は視床内での蓄自家蛍光素材 (ASM) の蓄積を妨げ／引き下げ、又は食い止める。一部の実施形態において、核酸、遺伝子治療ベクター、融合タンパク質、又は医薬組成物の投与は、脳皮質又は視床内での神経膠線維性酸性タンパク質 (GFAP) の上昇を妨げ／引き下げ、又は食い止める。

20

【0038】

一部の態様において、核酸は、配列番号 60～67 からなる群から選択される配列と少なくとも 95、96、97、98、又は 99% 同一の配列を有する融合タンパク質をコードする。一部の実施形態において、核酸は、配列番号 47～53 からなる群から選択される配列と少なくとも 98% 同一の配列を有する融合タンパク質をコードする。

【0039】

一部の態様において、核酸は：(a) 配列番号 106、109、111、119、120、及び 121 からなる群から選択される配列と少なくとも 95、96、97、98、又は 99% 同一のアミノ酸配列；並びに (b) 配列番号 4、配列番号 4 の残基 21～306、配列番号 4 の残基 28～306、配列番号 8、及び配列番号 46 からなる群から選択される配列と少なくとも 95、96、97、98、又は 99% 同一のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする。一部の実施形態において、核酸は、配列番号 120 及び 121 と少なくとも 95、96、97、98、又は 99% 同一の vIGF2 をコードする。一部の実施形態において、核酸は：(a) 配列番号 106、109、111、119、120、又は 121 の少なくとも 1 つ；並びに (b) 配列番号 4、配列番号 4 の残基 21～306、配列番号 4 の残基 28～306、配列番号 8、及び配列番号 46、配列番号 4 の残基 28～306、配列番号 8、及び配列番号 46 の少なくとも 1 つを含む融合タンパク質をコードする。

30

【0040】

一部の実施形態において、核酸はさらに、リソソーム切断ペプチドをコードする。

40

【0041】

一部の態様において、融合タンパク質は、配列番号 60～67 及び配列番号 47～53 の少なくとも 1 つと少なくとも 95、96、97、98、又は 99% 同一の配列を有する。一部の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号 60～67 及び配列番号 47～53 の少なくとも 1 つを含む。一部の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号 60～67 及び配列番号 47～53 からなるか、又はから本質的になる。

【0042】

更なる態様において、リソソーム蓄積病を処置する方法であって、リソソーム蓄積病の処置を必要とする対象に、治療的に有効な量の、本明細書中の核酸のいずれか 1 つ、本明細書中の融合タンパク質のいずれか 1 つ、本明細書中の遺伝子治療ベクターのいずれか 1

50

つ、又は本明細書中の医薬組成物のいずれか1つを投与することを含む方法が提供される。一部の実施形態において、投与は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、実質内、皮下、又はそれらの組合せに実行される。

【0043】

更なる態様において、CLN1／PPT1病及びCLN2／TPP1病が挙げられるバッテン病を処置する方法であって、バッテン病の処置を必要とする対象に、治療的に有効な量の、本明細書中の核酸のいずれか1つ、本明細書中の融合タンパク質のいずれか1つ、本明細書中の遺伝子治療ベクターのいずれか1つ、又は本明細書中の医薬組成物のいずれか1つを投与することを含む方法が提供される。一部の実施形態において、投与は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、実質内、皮下、又はそれらの組合せに実行される。

10

【0044】

更なる態様において、本明細書中で提供される核酸のいずれか1つ、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、賦形剤は、非イオン低浸透圧性化合物、バッファ、ポリマー、塩、又はそれらの組合せを含む。

【0045】

更なる態様において、本明細書中で提供される遺伝子治療ベクターのいずれか1つ、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。

【0046】

更なる態様において：(a) リソソーム酵素、及び(b) バリエーションIGF2 (vIGF2) ペプチドを含む融合タンパク質が提供され、vIGF2 ペプチドは、表3のIGF2 バリエーションペプチドと少なくとも95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、vIGF2 ペプチドは、配列番号69～131からなる群から選択されるIGF2 バリエーションペプチドと少なくとも95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、vIGF2 ペプチドは、配列番号90～123からなる群から選択されるIGF2 バリエーションペプチドと少なくとも95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、vIGF2 は修飾されて、野生型IGF2 の残基31～38が、4つのグリシン残基(Δ31～38GGGG)により置換されている。一部の実施形態において、vIGF2 はさらに、V43L変異によって修飾されている。一部の実施形態において、vIGF2 はさらに修飾されて、位置50におけるセリンが、酸性残基(アスパラギン酸又はグルタミン酸)により置換されている。一部の態様において、vIGF2 は、配列番号120又は121の配列を有する。

20

【0047】

一部の実施形態において、vIGF2 ペプチドはさらに、配列番号181～188からなる群から選択される配列と少なくとも95、96、97、98、又は99%同一の配列を有するリンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは切断可能である。一部の実施形態において、vIGF2 ペプチドは、インスリン受容体及びIGF R1に対する親和性が、天然IGF2 ペプチドと比較して、低下しているか、又はない。一部の実施形態において、vIGF2 ペプチドは、CI-MPRに対する親和性が、天然IGF2 ペプチドと比較して、増している。一部の実施形態において、vIGF2 ペプチドは、細胞内のリソソーム中へのリソソーム酵素の取込みを促進することができる。一部の実施形態において、リソソーム酵素は、リソソーム蓄積障害と関連する欠陥タンパク質又は欠乏タンパク質を置換することができる。一部の実施形態において、リソソーム蓄積障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、バッテン病、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病I型、ゴーシェ病II型、ゴーシェ病III型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染色性白質萎縮症、ムコリピドーシスI型、ムコリピドーシスII型、ムコリピドーシスIII型、ムコリピドーシスIV型、ハーラー病、ハンター病、サンフィリップ病A型、サンフィリップ病B型、サンフィリップ病C型、サンフィリップ病D型、モルキオ病A型、

30

40

50

モルキオ病 B 型、マロトー・ラミー病、スライ病、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・ピック病 C 1 型、ニーマン・ピック病 C 2 型、シンドラー病 I 型、シンドラー病 II 型、アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全 (A D A - S C I D)、慢性肉芽腫症 (C G D)、及びニューロンセロイドリポフスチン沈着症からなる群から選択される。一部の実施形態において、リソソーム蓄積障害はポンペ病である。一部の実施形態において、リソソーム蓄積障害はニューロンセロイドリポフスチン沈着症である。一部の態様において、リソソーム酵素は、アルファ-ガラクトシダーゼ (A 又は B)、β-ガラクトシダーゼ、β-ヘキソサミニダーゼ (A 又は B)、ガラクトシルセラミダーゼ、アシルスルファターゼ (A 又は B)、β-グルコセレブロシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、リソソーム酸性リパーゼ、リソソーム酵素酸性スフィンゴミエリナーゼ、ホルミルグリシン生成酵素、イズロニダーゼ (例えばアルファ-L)、アセチル C o A : アルファ-グルコサミニド N - アセチルトランスフェラーゼ、グリコサミノグリカンアルファ-L-イズロノヒドロラーゼ、ヘパラン N - スルファターゼ、N - アセチル-α-D-グルコサミニダーゼ (N A G L U)、イズロナート-2-スルファターゼ、ガラクトサミン-6-スルファートスルファターゼ、N - スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ、N - アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ、グリコサミノグリカン N - アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ、β-グルクロニダーゼ、ヒアルロニダーゼ、アルファ-N - アセチルノイラミニダーゼ (シアリダーゼ)、ガングリオシドシアリダーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、アルファ-グルコシダーゼ、アルファ-D-マンノシダーゼ、ベーター-D-マンノシダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、アルファ-L-フコシダーゼ、バツテニン、タンパク質パルミトイルチオエステラーゼ、及び他のバツテン関連タンパク質 (例えば、セロイド-リポフスチン沈着症ニューロンタンパク質 6)、又はそれらの酵素的に活性な断片からなる群から選択される酵素を含む。一部の実施形態において、リソソーム酵素は、アルファ-グルコシダーゼ又はその酵素的に活性な断片である。一部の実施形態において、リソソーム酵素はタンパク質パルミトイルチオエステラーゼである。一部の実施形態において、リソソーム酵素はトリペプチジルペプチダーゼ 1 である。一部の実施形態において、リソソーム酵素はアスパルチルグルコサミニダーゼである。

10

20

30

40

50

【0048】

加えて、本明細書中で提供されるのは、治療的に有効な量の、本明細書中で提供される融合タンパク質のいずれか 1 つ、及び薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物である。

【0049】

参照による組み込み

本明細書中で言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、あたかも個々の刊行物、特許、又は特許出願が参照によって組み込まれることが具体的に、且つ個々に示されているが如く、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0050】

特許出願ファイルは、少なくとも 1 つのカラー図面を含有する。カラー図面を有する本特許出願の写しは、請求及び必須の料金の支払いがあり次第、事務所によって提供されることとなる。本開示の特徴及び利点の理解は、本開示の原理が利用される、実例となる実施形態を示す以下の詳細な説明、及び添付の図面の参照によって得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図 1】図 1 は、固定された C I - M P R を用いたアフィニティークロマトグラフィを用いて、リン酸化オリゴ糖を介して C I - M P R と相互作用することができる G A A の割合を判定したことを示す。第 1 のピークは、カラム中を流れる材料であり、リン酸化グリカン含有していなかったことを示している。後のピークは、固定された C I - M P R に結合することができる材料である。当該材料は、M 6 P の増加勾配により溶出される。M 6 P により、G A A が、M 6 P 含有画分及び M 6 P 欠如画分の双方を含有することが明らかである。C I - M P R への結合が、受容体媒介エンドサイトーシスにとって必須の第 1 の工程

であるので、C I-M P Rに結合するr h G A A画分のみ、有効な細胞取込みができる。

【図2】図2は、I G F 2について、そしてモノリン酸化オリゴ糖及びビスリン酸化オリゴ糖について、異なる結合ドメインを含むC I-M P Rの構造を示す。

【図3】図3は、成熟ヒトI G F 2ペプチドの配列及び構造を示す。部位特異的アミノ酸置換は、他の受容体及び血清タンパク質への結合に影響を与えることが提示される。

【図4】図4は、表面プラスモン共鳴によって測定した、C I-M P Rへの野生型I G F 2 (w t I G F 2) ペプチドの結合を示す

【図5】図5は、表面プラスモン共鳴によって測定した、C I-M P RへのバリエーションI G F 2 (v I G F 2) ペプチドの結合を示す。

【図6】図6は、I G F 2 / C I-M P Rへの結合を増大させるためにv I G F 2をアルグルコシダーゼアルファに加える利点を示す。

【図7】図7は、I G F 2 / C I-M P Rへの結合を増大させるためにv I G F 2を組換えヒトN-アセチル- α -D-グルコサミニダーゼ (r h N A G L U) に加える利点を示す。

【図8】図8は、インスリン受容体への野生型ヒトI G F 2の結合を示す。

【図9】図9は、インスリン受容体へのv I G F 2の検出可能な結合がないことを示す。

【図10】図10は、インシュリン様成長因子1受容体への野生型I G F 2の結合を示す。

【図11】図11は、野生型I G F 2と比較した、インシュリン様成長因子1受容体へのv I G F 2ペプチドの結合の低下を示す。

【図12】図12は、元から存在するh G A A及び操作したh G A Aをコードする遺伝子治療発現カセットの2つの例を示す。元から存在するh G A Aは、十分にリン酸化されておらず、C I-M P Rに効率的に結合することができない。操作したh G A Aは、C I M P R結合 (v I G F 2) の向上のための要素が加えられており、2 G Sリンカーが組み込まれて、C I-M P Rとのv I G F 2-G A Aタンパク質のより大きな相互作用が可能となり、そしてB i Pシグナルペプチドが分泌を向上させることができる。

【図13】図13は、組換えヒトタンパク質パルミトイルチオエステラーゼ1 (P P T 1) (P P T 1-1)、v I G F 2標的化ドメイン (P P T 1-2) を有する組換えヒトP P T 1、並びにv I G F 2標的化ドメイン及びB i Pシグナル配列 (P P T 1-29) を有する組換えヒトP P T 1を発現する細胞由来のP P T 1のウェスタンブロットを示す。タンパク質発現は、用いたI G Fのバリエーションによって影響され得る。

【図14】図14は、C I-M P RへのP P T 1構築体の結合を示す。

【図15】図15は、操作したh G A A又は元から存在するh G A Aを発現するC H O細胞の条件培地中でのG A A活性を示す。

【図16】図16は、G A Aノックアウトマウスにおける遺伝子治療の4週マウス研究の研究設計を示す。

【図17】図17は、処理していない野生型 (「正常な」) マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置したG A AノックアウトマウスにおけるG A A血漿活性を示す。

【図18】図18は、処理していない野生型 (「正常な」) マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置したG A Aノックアウトマウスにおいて測定したG A Aレベルを示す。

【図19】図19は、示すように処置したマウスから得た血漿サンプル由来のr h G A Aの細胞表面受容体C I-M P R結合を示す。

【図20】図20は、処理していない野生型 (「正常な」) マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置したG A Aノックアウトマウスの前脛骨筋についてのG A A活性、及びクワド (q u a d) グリコーゲン組織病理学スコアを示す。

【図21】図21は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置したG A Aノックアウトマウス由来の前脛骨筋のグリコーゲンP A Sを示す。

10

20

30

40

50

【図 2 2】図 2 2 は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の前脛骨筋の h G A A 免疫組織化学を示す。

【図 2 3】図 2 3 は、処理していない野生型（「正常な」）マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の脳及び脊髄についての脳 G A A 活性、脳グリコーゲン、及び脊髄グリコーゲン組織病理学スコアリングを示す。

【図 2 4】図 2 4 は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の脳のグリコーゲン P A S を示す。

10

【図 2 5】図 2 5 は、処理していない野生型（「正常な」）マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の脳幹及び脈絡叢の h G A A 免疫組織化学を示す。

【図 2 6】図 2 6 は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の脊髄のグリコーゲン P A S を示す。

【図 2 7】図 2 7 は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の脊髄の h G A A 免疫組織化学を示す。

【図 2 8】図 2 8 は、処理していない野生型（「正常な」）マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の四頭筋の G A A 活性及びグリコーゲン組織病理学スコアリングを示す。

20

【図 2 9】図 2 9 は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の四頭筋についてのグリコーゲン l u x o l / P A S を示す。

【図 3 0】図 3 0 は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の四頭筋の h G A A 免疫組織化学を示す。

【図 3 1】図 3 1 は、処理していない野生型（「正常な」）マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウスについての三頭筋の G A A 活性及び組織病理学スコアリングを示す。

30

【図 3 2】図 3 2 は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の三頭筋のグリコーゲン l u x o l / P A S を示す。

【図 3 3】図 3 3 は、処理していない野生型マウス、又は、示すように遺伝子治療ベクター若しくはビヒクルで処置した G A A ノックアウトマウス由来の三頭筋の h G A A 免疫組織化学を示す。

【図 3 4】図 3 4 は、C I M P R に結合した、操作した P P T 1 及び野生型 P P T 1 を示す。

【図 3 5】図 3 5 は、C I M P R に結合した、操作した T P P 1 及び野生型 T P P 1 を示す。

40

【図 3 6】図 3 6 は、C I M P R に結合した、操作した A G A 及び野生型 A G A を示す。

【図 3 7】図 3 7 は、C I M P R に結合した、操作した G L A 及び野生型 G L A を示す。

【図 3 8】図 3 8 は、条件培地中で種々のミュータント v I G F 2 - G A A 構築体を発現する細胞由来の G A A のウェスタンブロットを示す。

【図 3 9】図 3 9 は、図 3 8 のウェスタンブロットの構築体 v I G F 2 - G A A と比較した、新しい I G F 2 - G A A バリエーションの分泌を示す。

【図 4 0】図 4 0 は、種々の v I G F 2 - G A A 構築体の C I - M P R 結合を示す。

【図 4 1】図 4 1 は、種々の v I G F 2 - G A A 構築体の C I M P R 結合についての B m a x 及び K d 値を示す。

50

- 【図 4 2】図 4 2 は、種々の v I G F 2 - G A A 構築体の C I - M P R 結合を示す。
- 【図 4 3】図 4 3 は、種々の v I G F 2 - G A A 構築体の C I M P R 結合についての B m a x 及び K d 値を示す。
- 【図 4 4】図 4 4 は、種々の v I G F 2 - G A A 構築体の C I - M P R 結合を示す。
- 【図 4 5】図 4 5 は、種々の v I G F 2 - G A A 構築体の C I M P R 結合についての B m a x 及び K d 値を示す。
- 【図 4 6】図 4 6 は、種々の v I G F 2 - G A A 構築体についての細胞取込みを示す。
- 【図 4 7】図 4 7 は、種々の v I G F 2 - G A A 構築体についての細胞取込みを示す。
- 【図 4 8】図 4 8 は、C I - M P R 又は I G F 2 R に結合している種々の v I G F 2 ペプチドを示す。
- 【図 4 9】図 4 9 は、ウェスタンブロットによって定量化した、条件培地中の P P T 1 を示す。
- 【図 5 0】図 5 0 は、ウェスタンブロットによって定量化した、条件培地中の P P T 1 を示す。
- 【図 5 1】図 5 1 は、活性によって定量化した、条件培地中の P P T 1 を示す。
- 【図 5 2】図 5 2 は、P P T 1 ウェスタンブロット定量化と活性定量化との相関を示す。
- 【図 5 3】図 5 3 は、C I - M P R への P P T 1 構築体の結合を示す。
- 【図 5 4】図 5 4 は、選択した P P T 1 構築体の構造ダイアグラムを示す。
- 【図 5 5】図 5 5 は、条件培地中に分泌された P P T 1 のウェスタンブロットを示す。
- 【図 5 6】図 5 6 は、ウェスタンブロットによる細胞中での P P T 1 のプロセッシングを示す。
- 【図 5 7】図 5 7 は、ウェスタンブロットによって定量化した、条件培地中の P P T 1 を示す。
- 【図 5 8】図 5 8 は、相対 P P T 1 活性を示す。
- 【図 5 9】図 5 9 は、C I - M P R への P P T 1 構築体の結合を示す。
- 【図 6 0】図 6 0 は、C I - M P R への P P T 1 構築体の結合を示す。
- 【図 6 1】図 6 1 は、I G F 2 - G A A のバリエーションのアラインメントを示す（1 : v I G F 2 ; 2 : v I G F 2 - 1 7 ; 3 : 及び 4 : I G F 2 - 2 2）。
- 【図 6 2】図 6 2 は、更なる P P T 1 構築体を示す。
- 【図 6 3】図 6 3 (A) は、ウェスタンブロットのバンド強度によって測定した、野生型のタグ付けされていない P P T 1 (構築体 1 0 0) に対して正規化した、P P T 1 構築体の発現を示す。4 反復の形質移入についての平均強度を、標準偏差誤差棒付きでサンプル毎に示す。(B) は、ウェスタンブロットのバンド強度によって測定した、野生型に対して正規化した、培地中での P P T 1 発現 / P P T 1 の分泌を示す。
- 【図 6 4】図 6 4 は、免疫蛍光によって測定した、P P T 1 構築体のラット大脳皮質ニューロン中への取込みを示す。(A) は、精製した P P T 1 - 1 0 1 及び P P T 1 - 1 0 4 のニューロン取込みを示す。(B) は、培地由来の P P T - 1 構築体 (精製せず) のニューロン取込みを示す。
- 【図 6 5】図 6 5 は、更なる N A G L U 構築体を示す。
- 【図 6 7】図 6 7 (A) は、ウェスタンブロットのバンド強度によって測定した、野生型のタグ付けされていない P P T 1 (構築体 1 0 0) に対して正規化した、N A G L U 構築体の発現を示す。4 反復の形質移入についての平均強度を、標準偏差誤差棒付きでサンプル毎に示す。(B) は、ウェスタンブロットのバンド強度によって測定した、野生型に対して正規化した、培地中での P P T 1 発現 / P P T 1 の分泌を示す。
- 【図 6 8】図 6 8 は、ウェスタンブロットのバンド強度によって測定した、野生型のタグ付けされていない T P P 1 に対して正規化した、T P P 1 構築体の発現を示す。
- 【図 6 9】図 6 9 は、T P P 1 構築体の C I M P R 結合を示す。
- 【図 7 0】図 7 0 は、R T - q P C R によって検出したヒト C L N 1 導入遺伝子発現を示す。
- 【図 7 1】図 7 1 ~ 図 7 2 は、リソソーム機能不全の相関物である脳蓄自家蛍光素材 (A

10

20

30

40

50

S M) 蓄積を示す。

【図 7 2】図 7 1 ~ 図 7 2 は、リソソーム機能不全の相関物である脳蓄自家蛍光素材 (A S M) 蓄積を示す。

【図 7 3】図 7 3 は、アストログリオシス及び神経炎症の相関物である神経膠線維性酸性タンパク質 (G F A P) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0052】

本明細書中で提供されるのは、発現、分泌、及び C I M P R 結合の増強が挙げられる特性の増強を伴う新規の、操作された I G F 2 ペプチドである。さらに本明細書中で提供されるのは、C I M P R 結合の増大、並びに発現及び分泌の向上等の特性の増強を伴う新規の I G F 2 ペプチド及びリソソーム酵素を含む融合タンパク質、及び融合タンパク質をコードする核酸である。本明細書中で提供される融合タンパク質及び核酸構築体は、リソソーム蓄積障害を処置する酵素置換治療及び遺伝子治療の双方に有用である。

10

【0053】

単一遺伝子の遺伝的障害のための遺伝子治療は、一部が寿命の初期に現れ、且つ時折、生涯にわたる障害につながる虞がある悲惨な病徴を有する疾患及び障害についての、潜在的に 1 回限りの処置を提示する。遺伝的障害、例えば神経学的障害又はリソソーム蓄積障害は、多くの場合、患者に、疾患状態又は障害状態において欠陥があるか、又は欠乏しているタンパク質の活性型である治療タンパク質を投与する酵素置換治療で処置される。しかしながら、現在の治療について、頻繁な処置、治療タンパク質に対する免疫応答の発達、及び罹患組織、細胞、又は亜細胞コンパートメントへの治療タンパク質の標的化の困難が挙げられる課題がある。遺伝子治療は、処置回数の引下げ、及び長期にわたる有効性が挙げられる利点をもたらす。

20

【0054】

本明細書中で提供されるのは、酵素置換治療又は遺伝子治療に向上をもたらす、例えば、必要とされる場合に、より治療的なタンパク質を提供することで処置有効性を向上させる、酵素置換治療としての投与のための、又は遺伝子治療ベクター用のベクターによってコードされる融合タンパク質である。そのような課題は、本明細書中で、発現及び細胞取込み、又は治療タンパク質の送達及び細胞内標的化若しくは亜細胞標的化を向上させることによって対処される。本明細書中で提供される具体的なツール又は構成要素として、以下に限定されないが、分泌を増大させるシグナルペプチド（例えば、結合免疫グロブリンタンパク質 (B i P) 及び G a u s s i a シグナルペプチド）、及び治療タンパク質のエンドサイトーシスを増大させるペプチド（例えば、細胞取込み及びリソソーム送達を増大させる、高い親和性で C I - M P R に結合するペプチド）が挙げられる。そのようなペプチドは、遺伝子治療ベクターによってコードされる治療タンパク質に融合する。一部の実施形態において、ペプチドは、I G F 2 (インスリン様成長因子 2) ペプチド又はそのバリエーションである。本明細書中で提供される遺伝子治療ベクターは、一部の実施形態において、遺伝子治療の有効性を最適化する、高い親和性で C I - M P R に結合するペプチドに融合した治療タンパク質をコードする核酸を含むことが意図される。

30

【0055】

酵素置換遺伝子治療のための遺伝子治療構築体を設計した。K o z a k 配列又は I R E S 配列、例えば、構築体の 5' 末端に位置決めされる、C r P V I R E S が挙げられるがこれらに限定されない翻訳開始配列に、G A A シグナルペプチド、アンチトリプシンインヒビタをコードする核酸、及び B i P 配列をコードする核酸の 1 つ以上から選択されるシグナルペプチドをコードする核酸が続く。これらに、v I G F - 2、H I R M a b、T f R M a b、又は他の細胞標的化ペプチド若しくはタンパク質であり得る細胞標的化ドメインをコードする核酸が続く。遺伝子治療構築体はさらに、リンカーをコードする核酸、及び補正酵素又はその酵素的に活性な断片をコードする核酸を含み、リンカーは、細胞標的化ドメインを補正酵素又はその酵素的に活性な断片に連結する。適切な補正酵素として、以下に限定されないが、アルファ-グルコシダーゼ (G A A)、アルファ-ガラクトシ

40

50

ダーゼ（GLA）、イズロニダーゼ（IDUA）、イズロン酸－２－スルファターゼ（IDS）、PPT1、TPP1、NAGLU、又はそれらの酵素的に活性な断片、及び個体において欠乏していることが見出された他の酵素が挙げられる。

【００５６】

治療タンパク質の細胞内標的化

ほとんどのリソソームタンパク質のN結合炭水化物が、マンノース６－リン酸（M6P）と呼ばれる特殊な炭水化物構造を含有するように修飾されている。M6Pは、膜結合M6P受容体を介した、リソソームへのリソソームタンパク質の輸送を可能にする生体シグナルである。リソソーム蓄積障害のための酵素置換治療は、治療タンパク質の取込み及びリソソームへの送達のためにM6P受容体を利用する。特定の治療薬は、セレザイム（登録商標）、及び組換えヒトGCASEの他のバージョンが挙げられるM6P受容体を利用せずに、タンパク質グリカン上の末端マンノースに結合して、リソソームに送達することができるマンノース受容体を利用する。特定の酵素置換治療学に直面する問題は、低い量のM6Pしか酵素治療薬に存在せず、治療有効性に至るにはより高用量を必要とすることである。これは、実質的により長い点滴時間、治療薬に対して免疫応答を発達させるより高い可能性、及びより高い薬物要求の原因となって、タンパク質製造の増大が必要となってコストが増す。

【００５７】

CI-MPRは、M6P含有リソソーム酵素を循環系から捕捉する。受容体は、M6P及びインシュリン様成長因子のための明白な結合ドメインを有する（ドメイン１～３及び７～９、図２参照）ので、IGF2／マンノース－６－リン酸受容体又はIGF2／CI-MPRとしても知られている。この受容体は、M6P－又はIGF2－又はIGF2バリエーション含有酵素置換治療薬を標的化するのに利用することができる。インシュリン様成長因子を含むこれらのリガンドに対するこの受容体の結合親和性を、表１に示す。特に、IGF2ペプチドは、モノ－又はビス－リン酸化オリゴ糖に対するよりも、CI-MPRに対する結合親和性が高い。

【００５８】

【表１】

表 1: CI-MPR のリガンド	
リガンド	結合親和性(見掛けの Kd; nM)
IGF2	0.03～0.2
[Leu27]IGF2	0.05
Bis-M6P	2
ベータ-ガラクトシダーゼ	20
ペンタマンノース-M6P	6,000
遊離 M6P	7,000

【００５９】

したがって、一部の実施形態において、例えば、リソソーム蓄積疾患等の疾患を処置する際に、安定性、CI-MPR結合、細胞取込み、及びリソソーム局在化が増大する治療融合タンパク質を形成する、向上したバリエーションIGF2（vIGF2）ペプチドを設計することが所望される。

【００６０】

一部の実施形態において、バリエーションvIGF2は、分解のためのIGF2の細胞取込

み及びリソソームへの送達を担うC I-M P Rへの結合が向上している。一部のバリエーションI G F 2ペプチドは、インシュリン様成長因子受容体1 (I G F 1 R) に対する親和性が低下している。一部の実施形態において、I G F 2は、インテグリンに対する親和性が低下しているか、又はない。一部の実施形態において、I G F 2はまた、少なくとも1つのインシュリン様成長因子結合タンパク質 (I G F B P 1-6) に対する親和性が低下しているか、又はない。一部の実施形態において、I G F 2バリエーションは、ヘパリンへの結合が低下しているか、又はない。一部の実施形態において、I G F 2バリエーション

【0061】

v I G F 2ペプチドの設計における目標は、v I G F 2の生物物理学的特性を向上させること、並びにC I-M P Rへの結合／細胞取込み及びリソソーム送達を増強する一方、他の機能を最小にすることであろう。したがって、v I G F 2ペプチドは、(1) v I G F 2の安定性／溶解性を向上させ；(2) I R／I G F 1 R／インテグリンへの結合親和性を弱め；且つ(3) C I-M P Rへの結合親和性を向上させてよい。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、重要でない残基に対して重要な残基、点変異、及びトランケーションを識別する構造指南合理的設計 (structure guided rational design) を用いて設計される。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、与えられる変異が、種々の結合パートナーに対する安定性及び親和性に影響を与えるかを判定するための体系的な変異研究を含むインシリコ計算実験、アラニンスキャニング変異誘発 (NAM D) を用いて、且つ／又は生物学的利用能であるI G F 2溶解性を向上させて、且つ／又は免疫原性を引き下げて、設計される。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、スプリットG F Pアッセイに基づく指向性進化を介して設計される。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、ファージディスプレイに基づく指向性進化を介して設計される。

【0062】

一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、与えられる変異がI G F 2ペプチドの安定性に影響を与えるかを判定するための体系的な変異研究を含むインシリコ計算実験を用いて設計される。一部の実施形態において、変異を有するペプチドの安定性は、野生型I G F 2と比較して同じであるか、又は増している。

【0063】

一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、インテグリンへの結合を引き下げるように設計されている。一部の実施形態において、インテグリンへの結合が引き下げられているv I G F 2ペプチドは、変異R 2 4 E／R 3 4 E、R 2 4 E／R 3 7 E／R 3 8 E、R 3 4 E／R 3 7 E／R 3 8 E、R 2 4 E／R 3 7 E、R 2 4 E／R 3 8 E、又はR 2 4 E／R 3 4 E／R 3 7 E／R 3 8 Eを含む。一部の実施形態において、例えば残基R 3 7、R 3 8、又はR 4 0に変異のあるv I G F 2ペプチドは、インテグリン及びヘパリンへの結合が引き下げられている。

【0064】

一部の実施形態において、変異T 1 6 I、T 1 6 V、T 1 6 L、T 1 6 F、T 1 6 Y、又はT 1 6 Wは、C I-M P Rへのv I G F 2の結合を増大させる。一部の実施形態において、変異T 1 6 V又はT 1 6 Yは、C I-M P Rへのv I G F 2の結合を増大させる。一部の実施形態において、D 2 3の変異、例えば、D 2 3 K又はD 2 3 Rは、C I-M P Rへのv I G F 2の結合を増大させる。一部の実施形態において、F 1 9の変異、例えばF 1 9 Wは、C I-M P Rへのv I G F 2の結合を増大させる。一部の実施形態において、S 5 0の変異、例えば、S 5 0 D又はS 5 0 Eは、C I-M P Rへのv I G F 2の結合を増大させる。一部の実施形態において、変異D 2 3 K及びS 5 0 Eを有するv I G F 2は、C I-M P Rへの結合が増大している。一部の実施形態において、変異Δ 1~4、E 6 R、Y 2 7 L、及びK 6 5 Rを有するv I G F 2は、C I-M P Rへの結合が増大している。一部の実施形態において、変異Δ 3 3~4 0、D 2 3 R、F 2 6 E、及びS 5 0 Eを有するv I G F 2は、C I-M P Rへの結合が増大している。

【0065】

一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、I G F R 1 結合が引き下げられるように設計されている。一部の実施形態において、I G F 1 R 結合に影響を与える変異は、C I - M P R 結合に影響を与える変異と比較して、I G F 2 の異なる面上にある。一部の実施形態において、F 2 6、Y 2 7、及び V 4 3 は、I G F 1 R への結合にとって重要である。一部の実施形態において、S 2 9 N、R 3 4 _ G S、S 3 9 _ P Q、R 3 4 _ G S / S 3 9 _ P Q、S 2 9 N / S 3 9 _ P Q、又は S 2 9 N / S 3 9 P Q、R 4 3 _ G S の変異を有する v I G F 2 ペプチドは、インスリン受容体及び I G F 1 R への結合が低下している。一部の実施形態において、S 3 9 _ P Q (S 3 9 の後ろへの P Q 挿入) の変異を有する v I G F 2 ペプチドは、インスリン受容体及び I G F 1 R への結合が低下している。一部の実施形態において、G 1 1、V 1 4、L 1 7、G 2 5、F 2 6、Y 2 7、F 2 8、S 2 9、R 3 0、P 3 1、A 3 2、S 3 3、V 3 5、S 3 6、R 3 7、S 3 9、G 4 1、I 4 2、V 4 3、E 4 4、F 4 8、T 5 3、Y 5 9、C 6 0、又は A 6 1 にて変異を有する v I G F 2 ペプチドは、I G F 1 R への結合が引き下げられている。一部の実施形態において、G 1 0、L 1 3、V 1 4、L 1 7、F 2 6、Y 2 7、F 2 8、S 2 9、R 3 0、P 3 1、A 3 2、S 3 3、V 3 5、G 4 1、I 4 2、V 4 3、T 5 8、又は Y 5 9 にて変異を有する v I G F 2 ペプチドは、I G F 1 R への結合が引き下げられている。一部の実施形態において、変異 V 1 4 D / F 2 6 A / F 2 8 R / V 4 3 D を有する v I G F 2 ペプチドは、I G F 1 R への結合が引き下げられている。一部の実施形態において、変異 F 2 6 S、Y 2 7 L、又は V 4 3 L を有する v I G F 2 ペプチドは、I G F 1 R 及び / 又はインスリン受容体への結合が引き下げられている。

10

20

【0066】

一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、C ドメイン (例えば、残基 3 2 ~ 4 1、S R V S R R S R) 内に欠失を有し、これにより v I G F 2 ペプチドは、I G F 1 R、インスリン受容体、ヘパリン、及びインテグリンへの結合が引き下げられる。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、変異 Δ 1 ~ 4、E 6 R、Δ 3 0 ~ 3 9 を有する。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、変異 Δ 1 ~ 4、E 6 R、Δ 3 3 ~ 4 0 を有する。

【0067】

一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、その不安定性指数を低下させる変異を有する。一部の実施形態において、安定性が増大する I G F 2 ペプチドの変異として、R 3 8 G、R 3 8 G / E 4 5 W、R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G、P 3 1 G / R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G、又は L 1 7 N / P 3 1 G / R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G が挙げられる。一部の実施形態において、安定性が増大する I G F 2 ペプチドの変異として、R 3 8 G、R 3 8 G / E 4 5 W、R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G、P 3 1 G / R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G、L 1 7 N / P 3 1 G / R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G、L 1 7 N / P 3 1 G / R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G / S 6 6 G、L 1 7 N / P 3 1 G / R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G / A 6 4 M / S 6 6 G、又は S 5 L / L 1 7 N / P 3 1 G / R 3 8 G / E 4 5 W / S 5 0 G / A 6 4 M / S 6 6 G が挙げられる。

30

【0068】

一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、凝集を引き下げるように変異している。一部の実施形態において、凝集の傾向がある残基として、残基 1 7 ~ 2 1 (L Q F V C)、4 1 ~ 4 9 (G I V E E C C F R)、又は 5 3 ~ 6 2 (L A L L E T Y C A T) が挙げられる。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、F 2 6、Y 5 9、Y 2 7、V 1 4、A 1、又は L 8 にて、凝集を引き下げないように変異している。

40

【0069】

一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、I G F B P への結合が引き下げられるように設計されている。一部の実施形態において、v I G F 2 ペプチドは、変異 L 8 A、V 2 0 A、又は L 5 6 A を有する。一部の実施形態において、E 6、L 8、R 2 4、G 2 5、F 2 6、Y 2 7、又は F 2 8 にて変異を有する v I G F 2 ペプチドは、I G F B P 4 への結合が引き下げられている。一部の実施形態において、T 7、G 1 0、V 1 4、V

50

43、E44、C47、又はF48にて変異を有するvIGF2ペプチドは、IGFBP4への結合が引き下げられている。一部の実施形態において、E6又はL8にて変異を有するvIGF2ペプチドは、IGFBP4への結合が引き下げられている。一部の実施形態において、変異E6Q又はT7Aを有するvIGF2ペプチドは、ヒト血清結合タンパク質への結合が引き下げられている。一部の実施形態において、変異Q18Y又はF19Lを有するvIGF2ペプチドは、ヒト血清結合タンパク質への結合が引き下げられている。一部の実施形態において、変異E6Q、T7A、Q18Y、又はF19Lを有するvIGF2ペプチドは、ヒト血清結合タンパク質への結合が引き下げられている。

【0070】

一部の実施形態において、vIGF2ペプチドは、残基31～38をGGGGで置換するように修飾されており（vIGF2Δ31～38GGGG）、そして当該vIGF2ペプチドの一部はさらに、V43L及びS50E又はS50D変異を含有する（配列番号120～121）。一部の実施形態において、配列番号120～121と少なくとも95%同一であるvIGF2ペプチドは、治療タンパク質の発現及び／又は分泌を増強する。一部の実施形態において、治療タンパク質は、PPT1若しくはTPP1、又はその酵素的に活性な断片である。

【0071】

遺伝子治療のための治療融合タンパク質

遺伝子治療ベクターから生成される治療融合タンパク質が、本明細書中で提供される。一部の実施形態において、融合タンパク質は、融合タンパク質をコードする遺伝子治療ベクターにより形質導入された細胞によって分泌される。一部の実施形態において、形質導入された細胞は、組織又は器官（例えば肝臓）内にある。細胞から分泌されると、融合タンパク質は、患者の血管系を通して運搬されて、注目する組織に到達する。一部の実施形態において、治療融合タンパク質は、分泌が向上するように操作されている。一部の実施形態において、融合タンパク質は、天然シグナルペプチドのみを有する、対応する治療タンパク質又は治療タンパク質を含む融合タンパク質と比較して、分泌レベルを向上させるシグナルペプチドを含む。

【0072】

提供された遺伝子治療ベクターは、一部の実施形態において、治療タンパク質の送達を向上させるように操作されている。例えば、場合によっては、例えば、治療タンパク質の、必要とされる部位への分配を妨げる物理的障壁及び／又は生物学的障壁に起因して、不十分な量の治療タンパク質しか、治療タンパク質を必要とする細胞に送達されないならば、遺伝子治療は、患者の体内で十分な量の治療タンパク質を単に生成するだけでは、意図される処置を達成し得ない。したがって、たとえ遺伝子治療が、血液又は組織を、飽和するくらいに高い濃度の治療タンパク質で満たすことができても、遺伝子治療は、十分に治療的ではあり得ない。加えて、生産に関係しない（non-productive）クリアランス経路が、大多数の治療タンパク質を除去する場合がある。たとえ治療タンパク質が、脈管構造から、組織（例えば筋線維）内の間質腔に運搬されとしても、十分な治療効果は保証されない。リソソーム蓄積障害の有効な処置のために、治療的に有効な量の治療タンパク質が、細胞エンドサイトーシス及びリソソーム送達を経て、意味がある有効性をもたらさなければならない。本開示は、これらの問題に、有効な処置をもたらす処置のための、標的細胞中への治療タンパク質のエンドサイトーシスを可能にするペプチドを含む融合タンパク質をコードする遺伝子治療ベクターを提供することによって対処する。一部の実施形態において、エンドサイトーシスを可能にするペプチドは、CI-MPRに結合するペプチドである。一部の実施形態において、CI-MPRに結合するペプチドは、vIGF2ペプチドである。組換えにより発現されたGLAは、十分にリン酸化されることで、CIMPRに結合することが知られていた。しかし、驚くべきことに、マウスにおいて発現されたGLAは、リン酸化が不足して（under-phosphorylated）、CIMPRに十分に結合しない。したがって、遺伝子治療に用いられるGLAは、予想外に、CIMPR結合を増強するような追加の工学（例えばIGF2タグ）を必要

10

20

30

40

50

とする。

【0073】

本明細書中で提供されるのは、処置のための標的細胞中への治療タンパク質のエンドサイトーシスを可能にするペプチドを含む融合タンパク質をコードする遺伝子治療ベクターである。一部の実施形態において、遺伝子治療ベクターは、C I - M P R に結合する治療タンパク質及びペプチドを含む融合タンパク質をコードする。遺伝子治療ベクターから発現される場合のそのような融合タンパク質は、治療タンパク質、例えば酵素置換治療薬を、これを必要とする細胞に向け、そのような細胞中への送達又はそのような細胞による細胞取込みを増大させ、且つ治療タンパク質を亜細胞位置（例えばリソソーム）に向ける。一部の実施形態において、ペプチドは、治療タンパク質をリソソームに向けることができる I G F 2 ペプチド又はそのバリエーションである。また、本明細書中の融合タンパク質は、一部の実施形態において、分泌、例えば B i P シグナルペプチド又は G a u s s i a シグナルペプチドを増大させるシグナルペプチドをさらに含む。一部の実施形態において、融合タンパク質は、リンカー配列を含む。一部の実施形態において、本明細書中の融合タンパク質をコードする核酸は、内部リボソームエン트리配列を含む。U h

10

【0074】

酵素置換治療のための治療融合タンパク質

酵素置換治療のために生成された治療融合タンパク質が、本明細書中で提供される。提供される融合タンパク質は、一部の実施形態において、治療タンパク質の送達を向上させるように操作されている。例えば、場合によっては、例えば、治療タンパク質の、必要とされる部位への分配を妨げる物理的障壁及び／又は生物学的障壁に起因して、不十分な量の治療融合タンパク質しか、治療タンパク質が必要な細胞中に送達されないならば、融合タンパク質は、意図される処置を達成し得ない。たとえ治療タンパク質が、脈管構造から、組織（例えば筋線維）内の間質腔に運搬されるとしても、十分な治療効果は保証されない。リソソーム蓄積障害の有効な処置のために、治療的に有効な量の治療タンパク質が、細胞エンドサイトーシス及びリソソーム送達を経て、意味がある有効性をもたらさなければならない。本開示は、これらの問題に、有効な処置をもたらす処置のための、標的細胞中への治療タンパク質のエンドサイトーシスを可能にするペプチドを含む融合タンパク質を提供することによって対処する。一部の実施形態において、エンドサイトーシスを可能にするペプチドは、C I - M P R に結合するペプチドである。一部の実施形態において、C I - M P R に結合するペプチドは、v I G F 2 ペプチドである。

20

30

【0075】

本明細書中で提供されるのは、処置のための標的細胞中への治療タンパク質のエンドサイトーシスを可能にするペプチドを含む融合タンパク質である。一部の実施形態において、融合タンパク質は、C I - M P R に結合するペプチドを含む。そのような融合タンパク質は、酵素置換治療薬として用いられ、そのようなタンパク質を必要とする細胞中への送達又はそのような細胞による細胞取込みを増大させ、且つ治療タンパク質を亜細胞位置（例えばリソソーム）に向ける。一部の実施形態において、ペプチドは、治療タンパク質をリソソームに向けることができる I G F 2 ペプチド又はそのバリエーションである。

40

【0076】

v I G F 2 ペプチドを含む酵素置換治療又は遺伝子治療のための治療タンパク質が、本明細書中で提供される。例示的なタンパク質を、以下の表 2 に示す。

【0077】

50

【表 2】

表2: アミノ酸配列		配列 番号
元から存在する hGAA	MGVRHPPCSHRL LAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSP VLEETHPAHQQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA PDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLE NLSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDP ANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLN TTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNR DLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAGHVFLNNSNAMDVVLQPSPA LSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHL CRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFN KDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLR	1

10

【 0 0 7 8 】

20

30

40

50

【表 3】

	RGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHD QVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQA ATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRST FAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVC GFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQ AMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWT VDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALG SLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLT TTESRQQPMALAVALT KGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIF LARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVS NFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC	
操作した hGAA (BiP- vIGF2- GAA)	MKLSLVAAML LLLS AARASRTL CGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPA SRVSRRSRGIVECCFRSCDLALLE TYCATPARSEGGGGSGGGSRP GPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFD CAPDKAITQE QCEARGCC YIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRT TPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHS RAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLST SLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPF YLALEDGGS AHGVFLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFL GPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYWG LGFHL CRWGYSS TAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRDFTFNKDGFRDFPAMVQELH QGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGK VWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPS NFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYN LHNLGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGD VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVC GFLGNTSEELCVRWT QLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPH LYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITP VLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSE GQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTS EGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVS	2

10

20

30

40

【 0 0 7 9 】

【表 4】

	LLMGEQFLVSWC	
hGAA Δ1-60	SRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQECCAR GCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGGYTATL TRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPH VHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFL QLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTGANLYG SHPFYLALEDGGSAGHVFLNNSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDV YIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYWGFGHLCRWGYSSTAITR QVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRDFTFNKDGFRDFPAMVQ ELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPL IGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMN EPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGLQAATICASSHQFLST HYNLHNLGYLGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHW TGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCV RWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYAL LPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALL ITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAI HSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAV ALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVR VTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDI CVSLLMGEQFLVSWC	3
wt- タンパク質 パルミトイル チオエステラーゼ 1 (PPT1)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDSDVPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSPLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	4
PPT1-2 (vIGF2- PPT1)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLSRTLGGELVDLTLQFVCG DRGFLFSRPASRVSRRSRGIVECCFRSCDLALLETCATPARSEGG GGSGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKK MVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDP	5

【 0 0 8 0 】

10

20

30

40

50

【表 5】

	KLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQQGVFG LPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWHDPKEDV YRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVD SEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATE GDHLQLSEEWFYAHIPFLG	
PPT1-29 (BiP2aa- vIGF2- PPT1)	MKLSLVAAMLLLLWVALLLLSAARAAASRTLCCGGELVDTLQFVCG DRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGG GGSGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKK MVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLVNSQVTTVCQALAKDP KLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQQGVFG LPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWHDPKEDV YRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVD SEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATE GDHLQLSEEWFYAHIPFLG	6
操作した PPT1	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGSGSGSTS SSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRE CDLALLETYCATPARSE	7
TPP1 野生型	MGLQACLLGLFALILSGKCSYSPEPDQRRTLPPGWVSLGRADPEEEL SLTFALRQQNVERLSELVQAVSDPSSPYGKYLTLENVADLVRPSPL TLHTVQKWLLAAGAQAQCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPGAFFHH YVGGPTETHVVRSPHPYQLPQALAPHVDFVGGGLHRFPPTSSLRQRPE PQVTGTVGLHLGVTPSVIRKRYNLTSQDVSGTSNNSQACAQFLEQ YFHDSDLAQFMRLFGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQ YLMSAGANISTWVYSSPGRHEGQEPFLQWMLLSNESALPHVHTVS YGDDDESLSSAYIQRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVS GRHQFRPTFPASSPYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPR	8

【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

【表 6】

	PSYQEEAVTKFLSSSPHLPPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVVS RVPIPWVSGTSASTPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHG AGLFDVTRGCHESCLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALL KTLLNP	
操作した TPP1	MGLQACLLGLFALILSGKCSRTLCCGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGSRP RAVPTQSYSPEPDQRRTLPPGWVSLGRADPEEELSLTFALRQQNVER LSELVQAVSDPSSPQYGYKYLTLNVADLVRPSPLTLHTVQKWLLAA GAQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPGAEFHHYVGGPTETHVVR SPHPYQLPQALAPHVDFVGGHLRFPPTSSLRQRPEPQVTGTVGLHLG VTPSVIRKRYNLTSQDVGSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQFMR LFGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMASAGANISTW VYSSPRHEGQEPFLQWLMLLSNESALPHVHTVSYGDDSDSLSSAY IQRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASS PYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVTKFL SSSPHLPPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVVSNRVPIPWVSGTSAS TPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRGCHES CLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNP	9
AGA 野生型	MARKSNLPVLLVPFLLCQALVRCSSPLPLVVNTWPFKNATEAAWR ALASGGSALDAVESGCAMCEREQCDGSGVFGGSPDELGETTLDAMI MDGTTMDVGAVGDLRRIKNAIGVARKVLEHTTHTLLVGESATTFA QSMGFINEDLSTTASQALHSDWLARNCPNYWRNVIPDPSKYCGPY KPPGILKQDIPHKETEDDRGHDTIGMVVIHKTGHIAAGTSTNGIKFK IHGRVGDSPGAGAYADDTAGAAAATGNGDILMRFLPSYQAVEY MRRGEDPTIACQKVISRIQKHFPEFFGAVICANVTGSYGAAKNLST FTQFSFMVYNSEKNQPTTEKVDCI	10
操作した AGA (N-末端 融合)	MARKSNLPVLLVPFLLCQALVRCSSRTLCCGELVDTLQFVCGDRGFL FSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGGSGG GGSRPRAVPTQSSPLPLVVNTWPFKNATEAAWRALASGGSALDAV ESGCAMCEREQCDGSGVFGGSPDELGETTLDAMIMDGTMDVGAV GDLRRIKNAIGVARKVLEHTTHTLLVGESATTFAQSMGFINEDLSTT ASQALHSDWLARNCPNYWRNVIPDPSKYCGPYKPPGILKQDIPHI	11

【0082】

10

20

30

40

50

【表 7】

	KETEDDRGHDTIGMVVIHKTGHIAAGTSTNGIKFKIHGRVGDSPiPG AGAYADDTAGAAAATGNGDILMRFLPSYQAVEYMRRGEDPTIACQ KVISRIQKHFPEFFGAVICANVTGSYGAACNKLSTFTQFSFMVYNSE KNQPTEEKVDCI	
GLA 野生型	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWL HWERFMCNLDQCQEEPSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYL CIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRPHGIRQLANYVHSGKLKLG IYA DVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDGCYCD SLENL ADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNH WRNFADIDDSWKSISILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDM LVIG NFGLSWNQVQTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDKD VIAINQDPLGKQGYQLRQGDNF EVWERPLSGLAWAVAMINRQEIG GPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWT SRLRSHI NPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL	12
操作した GLA	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWL HWERFMCNLDQCQEEPSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYL CIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRPHGIRQLANYVHSGKLKLG IYA DVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDGCYCD SLENL ADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNH WRNFADIDDSWKSISILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDM LVIG NFGLSWNQVQTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDKD VIAINQDPLGKQGYQLRQGDNF EVWERPLSGLAWAVAMINRQEIG GPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWT SRLRSHI NPTGTVLLQLENTMQMSLKDLLYIPAKQGLQGAQMGP GGGGSGG GGSR T LCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSR PASRVSR SRGIVEECCFR SCDLALLE TYCATPARSE	13
BiP-vIGF2- 17-2GS- GAA	MKLSLVAAML LLLS AARASRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPA SRVSR SRGIVEECCFRECDLALLE TYCATPARSEGGGGSGGGGSRP GPRDAQAH PGRPRAVPTQCDVPPNSRFD CAPDKAITQE QCEARGCC YIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATL TRT TPTFFPKDILTLRLDVM METENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHS RAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLST	14

【0083】

10

20

30

40

50

【表 8】

	SLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPF YLALEDGGSAGHVFLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFL GPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELH QGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGVFITNETGQPLIGK VWPGSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPS NFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGLTQAATICASSHQFLSTHYN LHNLYGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGD VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWT QLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPH LYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITP VLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSE GQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTS EGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVS LLMGEQFLVSWC	
BiP-vIGF2- 20-2GS- GAA	MKLSLVAAMLALLLSAARASRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPA SRVSRRSRGILECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSRP GPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQECCARGCC YIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRT TPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETYPHVHS RAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLST SLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPF YLALEDGGSAGHVFLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFL GPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELH QGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGVFITNETGQPLIGK VWPGSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPS NFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGLTQAATICASSHQFLSTHYN LHNLYGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGD VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWT QLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPH	15

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

【表 9】

	LYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITP VLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSE GQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTS EGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVS LLMGEQFLVSWC	
BiP-vIGF2- 22-2GS- GAA	MKLSLVAAML LLLS AARASRTL CGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRG GGGSRGIVEECCFRSCDLALLE TYCATPARSEGGGGSGGGGSRPGPR DAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQE QCEARGCCYIP AKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTPT FFPKDILTLRLDVMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAP SPLYSV EFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLP SQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLA LEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEP KSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHL CRWGYSSAITRQVVENM TRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGG RRYMMIVDPAISSSGPAGSYR PYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWP GSTAFP DFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIR GSEDGCPNNELENPPYVPGVVG GTLQAATICASSHQFLSTHYNLHN LYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWS SWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLG AFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYALLPHLYT LFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQ AGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGG WVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEG AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSL LMGEQFLVSWC	16
PPT1-3 (BiP-PPT1)	MKLSLVAAML LLLS AARADPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAI KKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALA KDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQG VFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYS KVVQERLVQAEYWH DPIKE	17

【 0 0 8 5 】

10

20

30

40

50

【表 10】

	DVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDP VDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLA TEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	
PPT1-4 (BiP-vIGF2- PPT1)	MKLSLVAAMLLLLSAARASRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGSGGGGSRP RAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYV LSLEIGKTLMEDVENSFFLVNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNAM GFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQQGVFGLPRCPGESSHI CDFIRKTLNAGAYSKVQERLVQAEYWHDDPIKEDVYRNHSIFLADI NQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSG QAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEW FYAHIPFLG	18
PPT1-5 (wt- PPT1- vIGF2)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVQERLVQAE YWHDDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGGSGGG GSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRS CDLALLETYCATPARSE	19
PPT1-9 (wt- PPT1)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVQERLVQAE YWHDDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	20
PPT1-10 (wt-PPT1- vIGF2_2)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVQERLVQAE	21

【0086】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

	YWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFL LNDIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGSGSGSTS SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSC DLALLETYCATPARSE	
PPT1-11 (BiP- PPT1_2)	MKLSLVAAML LLLS AARASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSCCN PLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTT VCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISV GGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEY YWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFL NDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNA GQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	22
PPT1-12 (BiPaa- PPT1_2)	MKLSLVAAML LLLS AARASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSCCN PLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTT VCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISV GGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEY YWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFL NDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNA GQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	23
PPT1-13 (BiPaa- PPT1)	MKLSLVAAML LLLS AAAAAADPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMG AIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQAL AKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQH GVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWHDP IKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIV DPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLV FLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	24
PPT1-14 (BiP1- vIGF2- PPT1)	MKLSLVAAML LLLS LVAAML LLLS AARASRTLCCGGELVDTLQFV C GDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAR SEG GGGSGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSM GAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQ ALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQ HQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEY WHDP	25

10

20

30

40

【0087】

【表 1 2】

	YRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVD SEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATE GDHLQLSEEWFYAHIIPFLG	
PPT1-15 (BiP1aa- vIGF2- PPT1)	MKLSLVAAML LLLSLVAAML LLLSAARAAASRTL CGGELVD TLQF VCGDRGFLFSRPASRVSR SRGIVEECCFRSCDLALLE TYCATPARS EGGGGSGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAI KKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLN VNSQVTTVCQALA KDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQH QG VFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYS KVVQERLVQA EYWH DPIKE DVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDP VDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLA TEGDHLQLSEEWFYAHIIPFLG	26
PPT1-16 (BiP1aa- PPT1_2)	MKLSLVAAML LLLSLVAAML LLLSAARAAASRALQHLDPPAPLPL VIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVE NSFFLN VNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQ RCPSPPMINLISVGGQH QGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYS K VVQERLVQA EYWH DPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLM ALKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQ DRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIPFLG	27
PPT1- 17(wt- PPT1-C6S)	MASPGSLWLLAVALLPWT CASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLN VNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQH QGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYS KVVQERLVQAE YWH DPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF FLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIPFLG	28
PPT1-18 (BiP2aa- PPT1)	MKLSLVAAML LLLWVALL LLSAARAAASRALQHLDPPAPLPLVIW HGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSF FLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQR C PSPPMINLISVGGQH QGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYS KVV QERLVQA EYWH DPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMAL KKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDR	29

【0088】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

	LGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIIPFLG	
PPT1-19 (GaussiaAA -PPT1_2)	MGVKVLFALICIAVAEAAASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSCCN PLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTT VCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISV GGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEY WHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFL NDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNA GQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIIPFLG	30
PPT1-20 (GaussiaAA -vIGF2- PPT1)	MGVKVLFALICIAVAEAAASRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSR PRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIY VLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNA MGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQQGVFGLPRCPGESS HICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWHDPIKEDVYRNHSIFLA DINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRS GQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEE WFYAHIIIPFLG	31
PPT1-21 (ppt2ss- PPT1)	MLGLWGQRLPAAWVLLLLPFLPLLLADPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIIPFLG	32
PPT1-22 (ppt2ss- PPT1_2)	MLGLWGQRLPAAWVLLLLPFLPLLLASRALQHLDPPAPLPLVIWH GMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFL NVNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPS PPMINLISVGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQ ERLVQAEYWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKK FVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGL KEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIIPFLG	33
PPT1-23	MASPSCLWLLAVALLPWSCAARALGHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC	34

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

【表 1 4】

(コンセンサス S-PPT1)	CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSPLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	
PPT1-24 (コンセンサス- PPT1)	MASPSCLWLLAVALLPWSCAARALGHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQILAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKAVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGVNESYKKNLMALKKFVMVK FLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETTLYTQDRLGLKEMD KAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLE	35
PPT1-25 (wt-PPT1 L283C H300C)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSPLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFCATEGDHLQLSEEWFYACIIPFLG	36
PPT1-26 (wt-PPT1 G113C L121C)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMCFSQGGQFCRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSPLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	37
PPT1-27 (wt-PPT1 A171C A183C)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGCYSKVVQERLVQCE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF	38

【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

50

【表 15】

	LNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	
PPT1-28 (BiP2aa- PPT1)	MKLSLVAAML LLLWVALLLLSAARAAASRALQHLDPPAPLPLVIW HGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSF FLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRC PSPPMINLISVGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVV QERLVQAEYWH DPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMAL KKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDR LGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLG	39
PPT1-31 (BiP1- vIGF2-PPT1)	MKLSLVAAML LLLSLVAAML LLLSAARASRTL CGGELVDTLQFVC GDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVECCFRSCDLALLE TYCATPARSEG GGGSGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKK MVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDP KLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQQGVFG LPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWH DPIKEDV YRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVD SEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATE GDHLQLSEEWFYAHIPFLG	40
PPT1-32 (wt-PPT1- vIGF2-32)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWH DPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGSGSGSTS SSRTL CGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRGGGSRGILECCFRECDLA LLE TYCATPARSE	41
PPT1-33 (wt-PPT1- vIGF2-8Q)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWH DPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF	42

【0091】

10

20

30

40

50

【表 16】

	LNSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGSGSGSTS SSRTLCCGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRE CDLALLETYCATPARSE	
PPT1-34 (wt-PPT1- vIGF2-8Q)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGSGSGSTS SSRTLCCGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRE CDLALLETYCATPARSE	43
PPT1-35 (wt-PPT1- vIGF2-8Q)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGSGSGSTS SSRTLCCGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRE CDLALLETYCATPARSE	44
ヒト TPP1 プロペプチド	SYSPEPDQRRTLPPGWVSLGRADPEEELSLTFALRQQNVERLSELVQ AVSDPSSPQYGKYLTLNVADLVRPSPLTLHTVQKWLLAAGAQKC HSVITQDFLTCWLSIRQAELLPGAEFHHYVGGPTETHVVRSPHPYQ LPQALAPHVDFVGGGLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTVG	45
ヒト TPP1 成熟ペプチド	LHLGVTPSVIRKRYNLTSQDVGSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLA QFMRLFEGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMSAGA NISTWVYSSPGRHEGQEPFLQWLMLLSNESALPHVHTVSYGDDSDS LSSAYIQRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPT FPASSPYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAV TKFLSSSPHLPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVVSNRVPIPWVS	46

【0092】

10

20

30

40

50

【表 17】

	GTSASTPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTR GCHESCLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNP	
pSvelte001- 天然 TPP1 シグナル ペプチド – vIGF2 – GS リンカー – Lyso 切断 – TPP1 プロペプチド – TPP1 成熟ペプチド	MGLQACLLGLFALILSGKCSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSRP RAVPTQSYSPEPDQRRTLPPGWVSLGRADPEEELSLTFALRQQNVER LSELVQAVSDPSSPQYGKYLTLENVADLVRPSPLTLHTVQKWLLAA GAQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPLGAEFHHYVGGPTETHVVR SPHPYQLPQALAPHVDFVGGHLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTVGLHLG VTPSVIRKRYNLTSQDVGSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQFMR LFGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMSAGANISTW VYSSPGRHEGQEPFLQWLMLLSNESALPHVHTVSYGDDEDSLSSAY IQRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASS PYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVTKFL SSSPHLPPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVVSNRVPIPWVSGTSAS TPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRGCHES CLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNPG	47
Svelte057 - 天然 TPP1 シグナル ペプチド – vIGF2v17 – GSリンカー – Lyso 切断 – TPP1 プロペプチド – TPP1 成熟ペプチド	MGLQACLLGLFALILSGKCSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRECDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSRP RAVPTQASYSPEPDQRRTLPPGWVSLGRADPEEELSLTFALRQQNV ERLSELVQAVSDPSSPQYGKYLTLENVADLVRPSPLTLHTVQKWLL AAGAQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPLGAEFHHYVGGPTETHV VRSPHPYQLPQALAPHVDFVGGHLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTVGLH LGVTSPVIRKRYNLTSQDVGSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQF MRLFGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMSAGANIS TWVYSSPGRHEGQEPFLQWLMLLSNESALPHVHTVSYGDDEDSLSS AYIQRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPA SSPYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVTKF LSSSPHLPPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVVSNRVPIPWVSGTS ASTPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRGCH ESCLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNPG	48
pSvelte059	MGLQACLLGLFALILSGKCSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRG	49

【0093】

10

20

30

40

50

【表 18】

-天然 TPP1シグナル ペプチド – vIGF2v22 – GSリンカー – Lyso 切断 – TPP1 プロペプチド – TPP1 成熟ペプチド	GGGSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSRPRA VPTQASYSPEDQRRTLPPGWVSLGRADPEEELSITFALRQQNVERL SELVQAVSDPSSPQYGKYLLENVADLVRPSPLTLHTVQKWLLAAG AQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPLGAEFHHYVGGPTETHVVRSP HPYQLPQALAPHVDFVGGGLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTVGLHLGV TPSVIRKRYNLTSQDVSGGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQFMRL FGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMASAGANISTWV YSSPGRHEGQEPFLQWMLLSNESALPHVHTVSYGDDSDSLSSAYI QRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASSP YVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVTKFLS SSPHLPSSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVSNRVPIPWVSGTSAS TPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRGCHES CLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNPG	
pSvelte060 - 天然 TPP1シグナル ペプチド – vIGF2v24 – GSリンカー – Lyso 切断 – TPP1 プロペプチド – TPP1 成熟ペプチド	MGLQACLLGLFALILSGKCSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRG GGGSRGILEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSRPRA VPTQASYSPEDQRRTLPPGWVSLGRADPEEELSITFALRQQNVERL SELVQAVSDPSSPQYGKYLLENVADLVRPSPLTLHTVQKWLLAAG AQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPLGAEFHHYVGGPTETHVVRSP HPYQLPQALAPHVDFVGGGLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTVGLHLGV TPSVIRKRYNLTSQDVSGGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQFMRL FGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMASAGANISTWV YSSPGRHEGQEPFLQWMLLSNESALPHVHTVSYGDDSDSLSSAYI QRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASSP YVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVTKFLS SSPHLPSSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVSNRVPIPWVSGTSAS TPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRGCHES CLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNPG	50
pSvelte061 天然 TPP1 シグナル ペプチド – vIGF2v30 –	MGLQACLLGLFALILSGKCSRTLCCGGELVDVLQFVCGRRGFLFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRDCDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGGS RPRAVPTQASYSPEDQRRTLPPGWVSLGRADPEEELSITFALRQQN VERLSELVQAVSDPSSPQYGKYLLENVADLVRPSPLTLHTVQKWL LAAGAQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPLGAEFHHYVGGPTETH	51

【0094】

10

20

30

40

50

【表 19】

GSリンカー – Lyso 切断 – TPP1 プロペプチド – TPP1 成熟ペプチド	VVRSPHPYQLPQALAPHVDFVGGGLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTGVL HLGVTPSVIRKRYNLTSQDVGSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQ FMRLFGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMSAGANI STWVYSSPGRHEGQEPFLQWLMLLSNESALPHVHTVSYGDDSDLS SAYIQRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFP ASSPYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVT KFLSSSPHLPPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVVSNRVPIPWVSG TSASTPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRG CHESCLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNPG*	
pSvelte062- 天然 TPP1 シグナル ペプチド – vIGF2v31 – GSリンカー – Lyso 切断 – TPP1 プロペプチド – TPP1 成熟ペプチド	MGLQACLLGLFALILSGKCSRTLCCGELVDLQFVCGDRGFLFSRG GGGSRGILEECCFRDCDLALLETYCATPARSEGSGGGSGGGSRPRA VPTQASYSPEPDQRRTLPPGWVSLGRADPEEEELSLTFALRQQNVERL SELVQAVSDPSSPYGKYLTLENVADLVRPSPLTLHTVQKWLLAAG AQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPLGAEFHHYVGGPTETHVVRSP HPYQLPQALAPHVDFVGGGLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTGVLHLGV TPSVIRKRYNLTSQDVGSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQFMRL FGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMSAGANISTWV YSSPGRHEGQEPFLQWLMLLSNESALPHVHTVSYGDDSDLS QRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASSP YVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVTKFLS SSPHLPPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVVSNRVPIPWVSGTSAS TPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRGCHES CLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNPG	52
pSvelte063- 天然 TPP1 シグナル ペプチド – vIGF2v32 – GSリンカー – Lyso 切断 – TPP1 プロペプチド –	MGLQACLLGLFALILSGKCSRTLCCGELVDLQFVCGDRGFLFSRG GGGSRGILEECCFRECDLALLETYCATPARSEGSGGGSGGGSRPRA VPTQASYSPEPDQRRTLPPGWVSLGRADPEEEELSLTFALRQQNVERL SELVQAVSDPSSPYGKYLTLENVADLVRPSPLTLHTVQKWLLAAG AQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLPLGAEFHHYVGGPTETHVVRSP HPYQLPQALAPHVDFVGGGLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTGVLHLGV TPSVIRKRYNLTSQDVGSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQFMRL FGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMSAGANISTWV YSSPGRHEGQEPFLQWLMLLSNESALPHVHTVSYGDDSDLS SAYI	53

【0095】

10

20

30

40

50

【表 20】

TPP1 成熟ペプチド	QRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASSP YVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVTKFLS SSPHLPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWVVSNRVIPWVSGTSAS TPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRGCHES CLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNPG	
Wt- NAGLU	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGDEAREAAAVRALVARLLGPGP AADFSVSVERALAANKPGLDTYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGL HRYLRDFCGCHVAWSGSQRLRLPRPLAVPGELTEATPNRYRYQQN VCTQSYSFVWWDWARWEREIDWMALNGINLALAWSGQEAIWQR VYLALGLTQAEINEFFTGAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQL YLQHRVLDQMRSFGMTPVLPAPAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGS WGHFNCSYSCSFLAPEDPIFPIIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNE MQPPSSEPSYLAATTAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLFGHQPPQF WGPAQIRAVLGAVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGPFIWCM LHNFGGNHGLFGALEAVNGGPEAARLFPNSTMVGTGMAPEGISQN EVVYSLMAELGWRKDPVPLAAWVTSFAARRYGVSHPDAGAAWR LLRSVYNCSGEACRGHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWR LLTSAPSLATSPAFRYDLDLTRQAVQELVSLYEEARSAYLSKEL ASLLRAGGVLAYELLPALDEVLASDSRFLGWSLEQARAAAVSEAE ADFYEQNSRYQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYTTPRWRLFL EALVDSVAQGIPFQQHQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTV LAKKIFLKYYPRWVAGSW	54
Wt NAGLU- HPC4	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGDEAREAAAVRALVARLLGPGP AADFSVSVERALAANKPGLDTYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGL HRYLRDFCGCHVAWSGSQRLRLPRPLAVPGELTEATPNRYRYQQN VCTQSYSFVWWDWARWEREIDWMALNGINLALAWSGQEAIWQR VYLALGLTQAEINEFFTGAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQL YLQHRVLDQMRSFGMTPVLPAPAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGS WGHFNCSYSCSFLAPEDPIFPIIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNE MQPPSSEPSYLAATTAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLFGHQPPQF WGPAQIRAVLGAVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGPFIWCM LHNFGGNHGLFGALEAVNGGPEAARLFPNSTMVGTGMAPEGISQN	55

【0096】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

	EVVYSLMAELGWRKDPVPLDAAWVTSFAARRYGVSHPDAGAAWR LLLRSVYNCSGEACRGHNRSPVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWR LLLTSAPSLATSPAIFYDLDDLTRQAVQELVSLYEEARSAYLSKEL ASLLRAGGVLAYELLPALDEVLASDSRFLGWSWLEQARAAAVSEAE ADFYEQNSRYQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYTTPRWRLFL EALVDSVAQGIPFQQHQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTV LAKKIFLKYYPYRWVAGSWGLEVLFQGPEDQVDPRLIDGK	
vIGF2- NAGLU- HPC4	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGDASRTLCCGGELVDTLQFVCGD RGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETCATPARSEGGG GSGGGGSRPRAVPTQAEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSVSVE RALAAKPGLDTYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGLHRYLRDFC GCHVAWSGSQRLRPLPAVPGELTEATPNRYRYQNVCTQSYSFV WWDWARWEREIDWMALNGINLALAWSGQEAIWQRYLALGLTQ AEINEFFTGAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQLYLQHRVLD QMRSEGMTVPVLPFAAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGSWGHEFNCSYS CSFLLAPEDPIFPIIGSLFLRELKEFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSY LAAATTAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLQFQHQPFQWGPQIRAVL GAVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGGQPFQWCMHNFGGNHGL FGALEAVNGGPEAARLFPNSTMVGTGMAPEGISQNEVVYSLMAEL GWRKDPVPLDAAWVTSFAARRYGVSHPDAGAAWRLLLSVYNCS GEACRGHNRSPVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWRLLLSAPSLA TSPAIFYDLDDLTRQAVQELVSLYEEARSAYLSKELASLLRAGGV LAYELLPALDEVLASDSRFLGWSWLEQARAAAVSEAEADFYEQNSR YQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYTTPRWRLFLLEALVDSVAQ GIPFQQHQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKY YPRWVAGSWGLEVLFQGPEDQVDPRLIDGK	56
vIGF2-17- NAGLU	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGDASRTLCCGGELVDTLQFVCGD RGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRECDLALLETCATPARSEGGG GSGGGGSRPRAVPTQAEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSVSVE RALAAKPGLDTYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGLHRYLRDFC GCHVAWSGSQRLRPLPAVPGELTEATPNRYRYQNVCTQSYSFV WWDWARWEREIDWMALNGINLALAWSGQEAIWQRYLALGLTQ	57

【0097】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

	AEINEFFTGAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQLYLQHRVLD QMRSGMTPVLPFAFAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGSWGHHFNCSYS CSFLLAPEDPIFPIIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSY LAAATTAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLFGHQPPQFWGPAQIRAVL GAVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGPFIWCMLHNFNGNHGL FGALEAVNGGPEAARLFPNSTMVGTMAGEPISQNEVVYSLMAEL GWRKDPVPDLAAWVTSFAARRYGVSHPDAGAAWRLLLRSVYNCS GEACRGHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWRLLLTSAPSLA TSPAIFYDLDDLTRQAVQELVSLYEEARSAYLSKELASLLRAGGV LAYELLPALDEVLASDSRFLGSLWLEQARAAA VSEAEADFYEQNSR YQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYYTTPRWRLFLEALVDSVAQ GIPFQQHQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKY YPRWVAGSWGLEVLFGPEDQVDPRLIDGK	
vIGF2-31- NAGLU- HPC4	MEAVAVAAA VGVLLLAGAGGAAGDASRTLCTGGELVDTLQFVCGD RGFLFSRGGGSGRGILECCFRDCDLALLETYCATPARSEGSGGSGG GGSRPRAVPTQAEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSVSVERALA AKPGLDITYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGLHRYLRDFCGCHV AWSGSQLRLPRPLPAVPGELTEATPNRYRYQNVCTQSYSFVWWD WARWEREIDWMALNGINLALAWSGQEAIWQRVYLALGLTQAEINE FFTGAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQLYLQHRVLDQMRSG GMTPVLPFAFAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGSWGHHFNCSYSCSFL APEDPIFPIIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSYLA AAATTAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLFGHQPPQFWGPAQIRAVLGA VPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGPFIWCMLHNFNGNHGLFGAL EAVNGGPEAARLFPNSTMVGTMAGEPISQNEVVYSLMAELGWRK DPVPDLAAWVTSFAARRYGVSHPDAGAAWRLLLRSVYNCSGEACR GHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWRLLLTSAPSLATSPA FRYDLDDLTRQAVQELVSLYEEARSAYLSKELASLLRAGGVLA YELLPALDEVLASDSRFLGSLWLEQARAAA VSEAEADFYEQNSR YQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYYTTPRWRLFLEALVDSVAQ GIPFQQHQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKY YPRWVAGSWGLEVLFGPEDQVDPRLIDGK	58

10

20

30

40

【0098】

【表 2 3】

vIGF2-32-NAGLU	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGDASRTLCTGGELVDTLQFVCGD RGFLFSRGGGSRGILEECCFRECDLALLETYCATPARSEGGGGSGG GGSRPRAVPTQAEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSVSVERALA AKPGLDITYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGLHRYLRDFCGCHV AWSGSQRLRPLPAVPGELTEATPNRYRYQNVCTQSYSFVWWD WARWEREIDWMALNGINLALAWSGQEIWQRVYLALGLTQAEINE FFTGPAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQLYLQHRVLDQMRSF GMTPVLPFAFAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGSWGHHFNCSSYSCSFL APEDPIFPIIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSYLA TAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLQFQHPQFWGPAQIRAVLGAVP RGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGPFIWCMHNFGGNHGLFGAL EAVNGGPEAARLFPNSTMVGTMAGEGISQNEVVYSLMAELGWRK DPVPDLAAWVTSFAARRYGVSHPDAGAAWRLLLRSVYNCSGEACR GHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWRLLLTSAPSLATSPA YDLLDLTRQAVQELVSLYEEARSAYLSKELASLLRAGGVLAYELL PALDEVLASDSRFLGSLWLEQARAAAVSEAEADFYEQNSRYQLTL WGPEGNILDYANKQLAGLVANYTTPRWRLFLEALVDSVAQGIPFQ QHQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKYYPRW VAGSWGLEVLFGQPEDQVDPRLIDGK	59
PPT1-101	MKLSLVAAMLWVALLLSAARAAASRTLCTGGELVDTLQFVCG DRGFLFSRGGGSRGILEECCFRDCDLALLETYCATPARSEGGGGSG GGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEK KIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQ GYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPMINLISVGGQHQQGVFGLPRCP GESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWHDPKEDVYRNHS IFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFG FYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQ LSEEWFYAHIPFLG	60
PPT1-104	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE	61

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

	YWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGSGSGSTS SSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRGGGSRGILEECCFRECDLA LLETYCATPARSE	
PPT1-112	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQHLLAASRTLCCGGELVDTLQFV CGDRGFLFSRGGGSRGILEECCFRDCDLALLETYCATPARSEGGS SGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKM VEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLVNSQVTTVCQALAKDPK LQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQQGVFGLP RCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVQERLVQAEYWHDPIKEDVYR NHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDIVDPVDSE WFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGD HLQLSEEWFYAHIPFLG	62
PPT1-114	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQHLLAASRTLCCGGELVDTLQFV CGDRGFLFSRGGGSRGILEECCFRECDLALLETYCATPARSEGGS SGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVE KKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLVNSQVTTVCQALAKDPKLQ QGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQQGVFGLPRC PGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVQERLVQAEYWHDPIKEDVYRNH SIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDIVDPVDSEWF GFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHL QLSEEWFYAHIPFLG	63
PPT1-115	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQHLLAADPPAPLPLVIWHGMGD SCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLVNS QVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMIN LISVGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVQERLVQ AEYWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMV KFLNDIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEM DNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGSGSGS TSSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRGGGSRGILEECCFRECD LALLETYCATPARSE	64

10

20

30

40

【0 1 0 0】

50

【表 2 5】

PPT1-116	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQH LAADPPAPLPLVIWHGMGD SCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNS QVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMIN LISVGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQ AEYWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMV KFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEM DNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGGGSG SGGGSSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRGGGGSRGILEECCFR ECDLALLETYCATPARSE	65
PPT1-117	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSC CNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQV TTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLIS VGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAE YWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKF LNDIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDN AGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGGGSGSG GGGSSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRGGGGSRGILEECCFREC DLALLETYCATPARSE	66
PPT1-118	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQH LAADPPAPLPLVIWHGMGD SCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNS QVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMIN LISVGGQHQQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQ AEYWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMV KFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEM DNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIPFLGRPRAVPTQGGGGSG GGGSSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRGGGGSRGILEECCFREC DLALLETYCATPARSE	67

【0101】

本明細書中で提供される融合タンパク質の構成要素を、以下でさらに説明する。

【0102】

C I - M P R に結合するペプチド（例えば v I G F 2 ペプチド）

本明細書中で提供されるのは、C I - M P R に結合するペプチドである。遺伝子治療ベクターから発現される場合のそのようなペプチド及び治療タンパク質を含む融合タンパク質は、治療タンパク質を、これを必要とする細胞に向け、そのような細胞による細胞取込みを増大させ、且つ治療タンパク質を垂細胞位置（例えばリソソーム）に向ける。一部の実施形態において、ペプチドは、治療ペプチドの N 末端に融合されている。一部の実施形態において、ペプチドは、治療タンパク質の C 末端に融合されている。一部の実施形態において、ペプチドは v I G F 2 ペプチドである。一部の v I G F 2 ペプチドは、C I - M

P Rに結合する高い親和性を維持する一方、I G F 1受容体、インスリン受容体、及びI G F結合タンパク質（I G F B P）に対するそれらの親和性は、低下しているか、又は除外されている。一部のv I G F 2ペプチドは、C I-M P Rへの結合の親和性を増している。ゆえに、一部のバリエーションI G F 2ペプチドは、w t I G F 2と比較して、実質的により選択的であり、且つ安全性リスクが引き下げられている。本明細書中のv I G F 2ペプチドとして、配列番号31、120、及び121のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。バリエーションI G F 2ペプチドとして、w t I G F 2（配列番号68）と比較して、位置6、26、27、31～38、43、48、49、50、54、55、又は65にバリエーションアミノ酸を有するものがさらに挙げられる。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、E 6 R、F 2 6 S、Y 2 7 L、V 4 3 L、F 4 8 T、R 4 9 S、S 5 0 E、S 5 0 I、A 5 4 R、L 5 5 R、及びK 6 5 Rからなる群の1つ以上の置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、E 6 Rの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、F 2 6 Sの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、Y 2 7 Lの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、V 4 3 Lの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、F 4 8 Tの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、R 4 9 Sの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、S 5 0 Iの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、S 5 0 Eの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、S 5 0 Eの置換を有する配列を有するv I G F 2ペプチドは、C I-M P Rへの結合が増大している。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、A 5 4 Rの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、L 5 5 Rの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、K 6 5 Rの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、E 6 R、F 2 6 S、Y 2 7 L、V 4 3 L、F 4 8 T、R 4 9 S、S 5 0 I、A 5 4 R、及びL 5 5 Rの置換を有する配列を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、N末端欠失を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、1つアミノ酸のN末端欠失を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、2つのアミノ酸のN末端欠失を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、3つのアミノ酸のN末端欠失を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、4つのアミノ酸のN末端欠失を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、4つのアミノ酸のN末端欠失、並びにE 6 R、Y 2 7 L、及びK 6 5 Rの置換を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、4つのアミノ酸のN末端欠失、並びにE 6 R及びY 2 7 Lの置換を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、5つのアミノ酸のN末端欠失を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、6つのアミノ酸のN末端欠失を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、7つのアミノ酸のN末端欠失を有する。一部の実施形態において、v I G F 2ペプチドは、7つのアミノ酸のN末端欠失、並びにY 2 7 L及びK 6 5 Rの置換を有する。一部の実施形態において、配列番号83によるC I M P R結合についてのB m a xは、配列番号80と比較して、増強される。

【0103】

10

20

30

40

【表 2 6】

表3: IGF2アミノ酸配列(バリエーション残基に下線を引いている)		
ペプチド	配列	配列 番号
野生型	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATP AKSE	68
F26S	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRG <u>S</u> YFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATP AKSE	69
Y27L	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRG <u>L</u> FSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPA KSE	70
V43L	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRG <u>I</u> EECCFRSCDLALLETYCATP AKSE	71
F48T	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECC <u>T</u> RSCDLALLETYCATP AKSE	72
R49S	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCF <u>S</u> SCDLALLETYCATP AKSE	73
S50I	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP	74

【 0 1 0 4 】

10

20

30

40

50

【表 27】

	ASRVSRRSRGIVEECCFR <u>I</u> CDLALLETYCATPA KSE	
A54R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDL <u>R</u> LLETYCATP AKSE	75
L55R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLA <u>R</u> LLETYCATP AKSE	76
F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRG <u>S</u> LFSRPA SRVSRRSRGIL <u>E</u> ECCT <u>S</u> ICDL <u>R</u> RLETYCATPAK SE	77
Δ1-6, Y27L, K65R	TLCGGELVDTLQFVCGDRG <u>F</u> LFSRPASRVSR RGIVEECCFRSCDLALLETYCATP <u>R</u> SE	78
Δ1-7, Y27L, K65R	LCGGELVDTLQFVCGDRG <u>F</u> LFSRPASRVSR RGIVEECCFRSCDLALLETYCATP <u>R</u> SE	79
Δ1-4, E6R, Y27L, K65R	S <u>R</u> TLCGGELVDTLQFVCGDRG <u>F</u> LFSRPASRV RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATP <u>R</u> SE	80
Δ1-4, E6R, Y27L	S <u>R</u> TLCGGELVDTLQFVCGDRG <u>F</u> LFSRPASRV RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	81
E6R	AYRPS <u>R</u> TLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATP AKSE	82
Δ1-4, E6R, Y27L, S50E, K65R	SRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRV RRSRGIVEECCFR <u>E</u> CDLALLETYCATPARSE	83
切断可能IGF2 バリエント-N末端	GGGGSGGGSRPRAVPTQ	84
切断可能IGF2 バリエント-C末端	YIPAKQGLQGAQMGPGGGGSGGGG	85
切断可能IGF2 バリエント-C末端	RPRAVPTQGGSGSGSTSS	86

【0105】

10

20

30

40

50

【表 28】

切断可能IGF2 バリエント-N末端	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSR RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEG GGGSGGGGSRPRAVPTQ	87
切断可能IGF2 バリエント-C末端	YIPAKQGLQGAQMGQPGGGGSGGGGSRTLC GGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRG IVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	88
切断可能IGF2 バリエント-C末端	RPRAVPTQGGSGSGSTSSSRTLCCGGELVDTLQ FVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRE CDLALLETYCATPARSE	89
vIGF2-1 (vIGF2_1_NGGW GMG)	SRTLCCGGELVDTN ~~Q~~ FVCGDRGFLFSRG ~~G~~ ASRV SR ~~G~~ SRGIVE ~~W~~ CCFR ~~G~~ CDLALLETYCATP ~~M~~ R ~~G~~ E	90
vIGF2-2 (vIGF2_2_GGWW MG)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRG ~~G~~ ASRV SR ~~G~~ SRGIVE ~~W~~ CCFR ~~G~~ CDLALLETYCATP ~~M~~ R ~~G~~ E	91
vIGF2-3 (vIGF2_3_NGGG MG)	SRTLCCGGELVDTN ~~Q~~ FVCGDRGFLFSRG ~~G~~ ASRV SR ~~G~~ SRGIVEECCFR ~~G~~ CDLALLETYCATP ~~M~~ R ~~G~~ E	92
vIGF2-4 (vIGF2_4_Δ32-41, 53aa)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPIVEEC CFRSCDLALLETYCATPARSE	93
vIGF2-5 (vIGF2 Δ 30-39, 53aa)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRGIVEEC CFRSCDLALLETYCATPARSE	94
vIGF2-6 (vIGF2 Δ 33-40, 55aa)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPAGIVE ECCFRSCDLALLETYCATPARSE	95
vIGF2-7 (vIGF2 Δ 30- 39/V14D/F28R/V4 3D/F26A)	SRTLCCGGEL ~~D~~ DTLQFVCGDRG ~~A~~ L ~~R~~ SRG ~~I~~ DEE CCFRSCDLALLETYCATPARSE	96
vIGF2-8 (vIGF2_8_REE)	SRTLCCGGELVDTLQFVCG ~~R~~ R ~~G~~ ~~E~~ LFSRPASRVSR RRSRGIVEECCFR ~~E~~ CDLALLETYCATPARSE	97
vIGF2-9	SRTLCCGGELVDTLQFVCG ~~R~~ R ~~G~~ ~~E~~ LFSRPAGIVE	98

10

20

30

40

【0106】

50

【表 2 9】

(vIGF2_9_ Δ 30-39-REE; vIGF2)	ECCFR <u>E</u> CDLALLETYCATPARSE	
vIGF2-10 (vIGF2_1Q; vIGF2 D23R)	SRTLCCGGELVDTLQFVCG <u>R</u> RGFLFSRPASRVS RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	99
vIGF2-11 (vIGF2_2Q; vIGF2 F19W)	SRTLCCGGELVDTLQ <u>W</u> VCGDRGFLFSRPASRV SRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	100
vIGF2-12 (vIGF2_3Q; vIGF2 T16W)	SRTLCCGGELVD <u>W</u> LQFVCGDRGFLFSRPASRV SRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	101
vIGF2-13 (vIGF2_4Q; vIGF2 D23K)	SRTLCCGGELVDTLQFVCG <u>K</u> RGFLFSRPASRVS RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	102
vIGF2-14 (vIGF2_5Q; vIGF2 T16Y)	SRTLCCGGELVD <u>Y</u> LQFVCGDRGFLFSRPASRVS RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	103
vIGF2-15 (vIGF2_6Q; vIGF2 F26E)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRG <u>E</u> LFSRPASRVS RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	104
vIGF2-16 (vIGF2_7Q; vIGF2 T16V)	SRTLCCGGELVD <u>V</u> LQFVCGDRGFLFSRPASRVS RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	105
vIGF2-17 (vIGF2_8Q; vIGF2 S50E)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVS RRSRGIVEECCFR <u>E</u> CDLALLETYCATPARSE	106
vIGF2-18 (vIGF2_9Q; vIGF2 S50D)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVS RRSRGIVEECCFR <u>D</u> CDLALLETYCATPARSE	107
vIGF2-19 (vIGF2 F26S V43L)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGSLFSRPASRVS RRSRGILEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	108
vIGF2-20 (vIGF2	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVS	109

10

20

30

40

【 0 1 0 7 】

50

【表 3 0】

V43L)	RRSRGILEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	
vIGF2-21 (vIGF2_ESRE; vIGF2 V14E F26S F28R V43E)	SRTLCEGGELEDTLQFVCGDRGSLRSPASRV RRSRGIEEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	110
vIGF2-22 (vIGF2 Δ 31-38GGGG)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGDRGFLFSRGGGGS RGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	111
vIGF2-23 (vIGF2 Δ 30-40GGGG)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGDRGFLFSGGGSGIV EECCFRSCDLALLETYCATPARSE	112
vIGF2-24 (vIGF2 Δ 31-38GGGG V43L)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGDRGFLFSRGGGGS RGILEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	113
vIGF2-25 (vIGF2 L8A)	SRTACGGELVDLTLQFVCGDRGFLFSRSPASRV RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	114
vIGF2-26 (vIGF2 R6Q T7A L8A)	SQAACGGELVDLTLQFVCGDRGFLFSRSPASRV SRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	115
vIGF2-27 (vIGF2 R24E R34E R37E R38E)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGDEGFLFSRPASEVS EESRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	116
vIGF2-28 (vIGF2 R24E R34E)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGDEGFLFSRPASEVS RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	117
vIGF2-29 (vIGF2 D23R S40D)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGRRGFLFSRSPASRV RRSRGIVEECCFRDCDLALLETYCATPARSE	118
vIGF2-30 (vIGF2 T16V D23R S50D)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGRRGFLFSRSPASRV RRSRGIVEECCFRDCDLALLETYCATPARSE	119
vIGF2-31 (vIGF2 Δ 31-38GGGG V43L S50D)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGDRGFLFSRGGGGS RGILEECCFRDCDLALLETYCATPARSE	120
vIGF2-32 (vIGF2 Δ 31-38GGGG)	SRTLCEGGELVDLTLQFVCGDRGFLFSRGGGGS RGILEECCFRECDLALLETYCATPARSE	121

【 0 1 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 3 1】

V43L S50E)		
vIGF2-33 (vIGF2-N1)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFRLPSRPVS RSHRRSRGIVEECCFQRCNLALLETYCATPARSE	122
vIGF2-34 (vIGF2-N1 V43L S50E)	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFRLPSRPVS RSHRRSRGILEECCFQECNLALLETYCATPARSE	123
vIGF2-1 R38G	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRGSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	124
vIGF2-2 R38G, E45W	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRGSRGIVEWCCFRSCDLALLETYCATPARSE	125
vIGF2-3 R38G, E45W, S50G	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRGSRGIVEWCCFRGCDLALLETYCATPARSE	126
vIGF2-4 P31G, R38G, E45W, S50G	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRGASRVSRGSRGIVEWCCFRGCDLALLETYCATPARSE	127
vIGF2-5 L17N, P31G, R38G, E45W, S50G	SRTLCCGGELVDTNQFVCGDRGFLFSRGASRVSRGSRGIVEWCCFRGCDLALLETYCATPARSE	128
vIGF2-6 L17N, P31G, R38G, E45W, S50G, S66G	SRTLCCGGELVDTNQFVCGDRGFLFSRGASRVSRGSRGIVEWCCFRGCDLALLETYCATPARGE	129
vIGF2-7 L17N, P31G, R38G, E45W, S50G, A64M, S66G	SRTLCCGGELVDTNQFVCGDRGFLFSRGASRVSRGSRGIVEWCCFRGCDLALLETYCATPMRGE	130
vIGF2-8 S5L, L17N, P31G, R38G, E45W, S50G, A64M, S66G	LRTLCCGGELVDTNQFVCGDRGFLFSRGASRVSRGSRGIVEWCCFRGCDLALLETYCATPMRGE	131

10

20

30

40

【 0 1 0 9 】

50

【表 3 2】

表4: IGF2 DNAコード配列		
ペプチド	DNA配列	配列番号
成熟 WT IGF2	GCTTACCGCCCCAGTGAGACCCTGTGCGGC GGGGAGCTGGTGGACACCCCTCCAGTTCGTC TGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGG CCCGCAAGCCGTGTGAGCCGTGCGAGCCGT GGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGC TGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGT GCTACCCCCGCCAAGTCCGAG	132
vIGF2 Δ1-4, E6R, Y27L, K65R	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	133
vIGF2 Δ1-4, E6R, Y27L, S50E, K65R	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGGAGTGTGACTTGGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	134
vIGF2-1 (vIGF2_1_NGGW GMG)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTAACCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCTCTTCTCTCGCGGCGCTTCCAGAG TTTCACGGGGCTCTAGGGGTATAGTAGAGT GGTGTTGTTTCAGGGGCTGTGACTTGGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAATGA GGGGCGAA	135

【 0 1 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 3】

vIGF2-2 (vIGF2_2_GGWWG MG)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCGGCGCTTCCAGAG TTTCACGGGGCTCTAGGGGTATAGTAGAGT GGTGTTGTTTCAGGGGCTGTGACTTGCGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAATGA GGGGCGAA	136
vIGF2-3 (vIGF2_3_NGGG MG)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTAACCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCGGCGCTTCCAGAG TTTCACGGGGCTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGGGCTGTGACTTGCGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAATGA GGGGCGAA	137
vIGF2-4 (vIGF2_4_Δ32-41, 53aa)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	138
vIGF2-5 (vIGF2 Δ 30-39, 53aa)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTAGGGGTATAGTAGAG GAGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	139
vIGF2-6 (vIGF2 Δ 33-40, 55aa)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTGGTATAG TAGAGGAGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTT GGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCC AGCCAGGTCCGAA	140

10

20

30

40

【 0 1 1 1 】

50

【表 3 4】

vIGF2-7 (vIGF2 Δ 30-39/V14D/F28R/V43D/F26A)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGAC GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGGCCCTCAGATCTAGGGGTATAGACGAG GAGTGTGTTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	141
vIGF2-8 (vIGF2_8_REE)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAAGACGC GGGGAGCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGA GTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAG GAGTGTGTTTTCAGGGAGTGTGACTTGCGC CTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCC AGGTCCGAA	142
vIGF2-9 (vIGF2_9_ Δ 30-39-REE; vIGF2 Homerun)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAAGACGC GGGGAGCTCTTCTCTCGCCCCGCTGGTATA GTAGAGGAGTGTGTTTTCAGGGAGTGTGAC TTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACG CCAGCCAGGTCCGAA	143
vIGF2-10 (vIGF2_1Q; vIGF2 D23R)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGACGTCGC GGGTTCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTGTTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	144
vIGF2-11 (vIGF2_2Q; vIGF2 F19W)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTGGGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTGTTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG	145

10

20

30

40

【 0 1 1 2 】

50

【表 3 5】

	GTCCGAA	
vIGF2-12 (vIGF2_3Q; vIGF2 T16W)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACTGGCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	146
vIGF2-13 (vIGF2_4Q; vIGF2 D23K)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GAACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAAAGCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	147
vIGF2-14 (vIGF2_5Q; vIGF2 T16Y)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACTATCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	148
vIGF2-15 (vIGF2_6Q; vIGF2 F26E)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GAACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGGAGCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGA GTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAG GAGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	149
vIGF2-16 (vIGF2_7Q; vIGF2 T16V)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACGTTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG	150

10

20

30

40

【 0 1 1 3 】

50

【表 3 6】

	TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	
vIGF2-17 (vIGF2_8Q; vIGF2 S50E)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTGTTTCAGGGAGTGTGACTTGGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	151
vIGF2-18 (vIGF2_9Q; vIGF2 S50D)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTGTTTCAGGGACTGTGACTTGGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	152
vIGF2-19 (vIGF2 F26S V43L)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGAGCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGA GTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATACTGGAG GAGTGTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	153
vIGF2-20 (vIGF2 V43L)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATACTGGAGG AGTGTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	154

10

20

30

40

【 0 1 1 4 】

50

【表 3 7】

vIGF2-21 (vIGF2_ESRE; vIGF2 V14E F26S F28R V43E)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGAG GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGAGCCTCAGATCTCGCCCCGCTTCCAGA GTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGAGGAG GAGTGTGTTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	155
vIGF2-22 (vIGF2 Δ 31-38GGGG)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGT TCTAGGGGTATAGTAGAGGAGTGTTGTTTC AGGTCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACC TATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAA	156
vIGF2-23 (vIGF2 Δ 30-40GGGG)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCTCTTCTCTGGTGGAGGTTCTGGTA TAGTAGAGGAGTGTTGTTTCAGGTCCTGTG ACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGA CGCCAGCCAGGTCCGAA	157
vIGF2-24 (vIGF2 Δ 31-38GGGG V43L)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGT TCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTTGTTTC AGGTCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACC TATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAA	158
vIGF2-25 (vIGF2 L8A)	TCTCAGGCCGCGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	159

10

20

30

40

【 0 1 1 5 】

50

【表 3 8】

vIGF2-26 (vIGF2 R6Q T7A L8A)	TCTCAGGCCGCGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	160
vIGF2-27 (vIGF2 R24E R34E R37E R38E)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATGAG GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCGAGG TTTCAGAGGAATCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	161
vIGF2-28 (vIGF2 R24E R34E)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATGAG GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCGAGG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCT CCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAG GTCCGAA	162
vIGF2-29 (vIGF2 D23R S40D)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAAGACGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGGACTGTGACTTGCGCT TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	163
vIGF2-30 (vIGF2 T16V D23R S50D)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACGTGCTTCAGTTCGTGTGTGGAAGACGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG	164

10

20

30

40

【 0 1 1 6 】

50

【表 3 9】

	AGTGTGTTGTTTCAGGGACTGTGACTTGGCGC TCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAA	
vIGF2-31 (vIGF2 Δ 31-38GGGG V43L S50D)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGT TCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTTGTTTC AGGGACTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACC TATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAA	165
vIGF2-32 (vIGF2 Δ 31-38GGGG V43L S50E)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGT TCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTTGTTTC AGGGAGTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACC TATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAA	166
vIGF2-33 (vIGF2- N1)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCTTGTTTCGATTGCCGTCCAGGCCCG TGTCCCGGCACAGTCACCGCAGGTCAAGGG GGATAGTTGAAGAATGTTGCTTTCAGAGGT GTAATTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCG CGACGCCAGCCAGGTCCGAA	167
vIGF2-34 (vIGF2- N1 V43L S50E)	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCTTGTTTCGATTGCCGTCCAGGCCCG TGTCCCGGCACAGTCACCGCAGGTCAAGGG GGATACTGGAAGAATGTTGCTTTCAGGAGT GTAATTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCG CGACGCCAGCCAGGTCCGAA	168

10

20

30

40

【0117】

内部リボソームエントリ配列

本明細書中で提供されるのは、翻訳開始のボトルネックを迂回することによって遺伝子発現を増大させるための内部リボソームエントリ配列（IRES）をさらに含む、障害を処置する際に有用な遺伝子治療構築体である。遺伝子治療のための発現を最適化するのに適した内部リボソームエントリ配列として、以下に限定されないが、クリケットパラリシスウイルス（CrPV）IRES、ピコルナウイルスIRES、アフトウイルスIRES、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスIRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、ペスチウイルスIRES、クリパウイルスIRES、ムギクビレアブラムシウイルスIR

50

E S、マレック病ウイルス I R E S、及び他の適した I R E S 配列が挙げられる。一部の実施形態において、遺伝子治療構築体は、C r P V I R E S を含む。一部の実施形態において、C r P V I R E S は、

【化 1】

AAAAATGTGATCTTGCTTGTAATACAATTTTGAGAGGTTAATAAATTACAAGTAG
TGCTATTTTTGTATTTAGGTTAGCTATTTAGCTTTACGTTCCAGGATGCCTAGTGGC
AGCCCCACAATATCCAGGAAGCCCTCTCTGCGGTTTTTCAGATTAGGTAGTCGAAA
AACCTAAGAAATTTACCTGCT (配列番号191)

10

の核酸配列を有する。一部の実施形態において、C r P V I R E S 配列は、配列番号 191 と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 % 同一である。

【0118】

シグナルペプチド

本明細書中で提供される遺伝子治療構築体は、一部の実施形態において、遺伝子治療構築体により形質導入された細胞からの治療タンパク質の分泌を向上させるシグナルペプチドをさらに含む。シグナルペプチドは、一部の実施形態において、治療タンパク質のタンパク質プロセッシングを向上させ、且つ発生期のポリペプチドリボソーム複合体の、E R への転位を促進して、適切な翻訳時修飾及び翻訳後修飾を確実にする。一部の実施形態において、シグナルペプチドは、(i) 翻訳開始配列と治療タンパク質との間に、又は (i i) 治療タンパク質の下流側位置に位置決めされている。遺伝子治療構築体に有用なシグナルペプチドとして、以下に限定されないが、H S P 70 タンパク質のファミリー由来の結合免疫グロブリンタンパク質 (B i P) シグナルペプチド (例えば、H S P A 5、熱ショックタンパク質ファミリー A メンバー 5)、及び G a u s s i a シグナルペプチド、並びにそれらのバリエーションが挙げられる。これらのシグナルペプチドは、シグナル認識粒子に対する親和性が極めて高い。B i P アミノ酸配列及び G a u s s i a アミノ酸配列の例を、以下の表 5 に示す。一部の実施形態において、シグナルペプチドは、配列番号 169 ~ 180 からなる群から選択される配列と少なくとも 90、95、96、97、98、又は 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態において、シグナルペプチドは、配列番号 169 ~ 180 からなる群から選択される配列と、5 つ以下、4 つ以下、3 つ以下、2 つ以下、又は 1 つのアミノ酸が異なる。一部の実施形態において、リソソームタンパク質の「内因性シグナルペプチド」と本明細書中で互換的に称される天然シグナルペプチドが用いられる。

20

30

【0119】

40

50

【表 4 0】

表 5: シグナルペプチド配列		
シグナルペプチド	アミノ酸配列	配列番号
天然ヒト BiP	MKLSLVAAMLLLLSAARA	169
修飾 BiP-1	MKLSLVAAMLLLLSLVAAMLLLLSAARA	170
修飾 BiP-2	MKLSLVAAMLLLLWVALLLLSAARA	171
修飾 BiP-3	MKLSLVAAMLLLLSLVALLLLSAARA	172
修飾 BiP-4	MKLSLVAAMLLLLALVALLLLSAARA	173
Gaussia	MGVKVLFALICIAVAEA	174
天然 PPT1 シグナル ペプチド(eSP)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHL	175
天然 PPT1 シグナル ペプチド(eSP AA)	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLLAA	176
天然 PPT1 シグナル ペプチド C6S (eSP C6S)	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQHL	177
天然 PPT1 シグナル ペプチド C6S (eSP C6S AA)	MASPGSLWLLAVALLPWTCASRALQHLLAA	178
天然 TPP1 シグナル ペプチド	MGLQACLLGLFALILSGKC	179
天然 NAGLU シグナルペプチド	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGD	180

【0120】

BiPシグナルペプチドーシグナル認識粒子(SRP)相互作用は、ERへの転位を促進する。この相互作用を、図20に示す。

【0121】

Gaussiaシグナルペプチドは、ガウシア・プリンセプス(Gaussia princeps)由来のルシフェラーゼから誘導されて、このシグナルペプチドに融合した治療タンパク質のタンパク質合成及び分泌の増大を導く。一部の実施形態において、Gaussiaシグナルペプチドは、配列番号174と少なくとも90、95、96、97、98、又は99%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態において、シグナルペプチドは、配列番号174と、5つ以下、4つ以下、3つ以下、2つ以下、又は1つのアミノ酸が異なる。

【0122】

10

20

30

40

50

リンカー

本明細書中で提供される遺伝子治療構築体は、一部の実施形態において、標的化ペプチドと治療タンパク質との間にリンカーを含む。そのようなリンカーは、一部の実施形態において、正確な間隔を維持して、v I G F 2 ペプチドと治療タンパク質との立体衝突を軽減する。リンカーは、一部の実施形態において、反復グリシン残基、反復グリシン-セリン残基、及びそれらの組合せを含む。一部の実施形態において、リンカーは、5～20個のアミノ酸、5～15個のアミノ酸、5～10個のアミノ酸、8～12個のアミノ酸、又は約5、6、7、8、9、10、11、12、若しくは13個のアミノ酸からなる。本明細書中の遺伝子治療に適したリンカー及び酵素置換治療構築体として、以下の表6に示されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0123】

【表41】

表6: リンカー配列		
GS リンカー	配列	配列番号
	GGGGSGGGG	181
	GGGS	182
	GGSGGGGS	183
	GGGGSGGGS	184
	GGSGSGSTS	185
	GGGGSGGGGS	186
	GGGGSGSGGGGS	187
リソソーム切断リンカー	RPRAVPTQA	188

【0124】

翻訳開始配列

本明細書中で提供される遺伝子治療構築体は、翻訳開始配列、例えばmRNAの翻訳の開始を補助するKozak配列を有する核酸を含む。本明細書中で意図されるKozak配列は、(gcc)RccATGGのコンセンサス配列を有し、小文字は、その位置にて最も一般的な塩基を表し、塩基は変異し、大文字は、稀にしか変異しない非常に保存された塩基が変わることを示す。Rは、プリン（アデニン又はグアニン）がその位置にて常に観察されることを示す。括弧内の配列(gcc)は、重要性が不確かである。一部の実施形態において、Kozak配列は、配列AX₁X₂ATGAを含み、X₁及びX₂の各々は、任意のヌクレオチドである。一部の実施形態において、X₁はAを含む。一部の実施形態において、X₂はGを含む。一部の実施形態において、Kozak配列は、AAGATGAと少なくとも85%同一の核酸配列を含む。一部の実施形態において、Kozak配列は、AAGATGAの配列と、1つ又は2つのヌクレオチドが異なる。一部の実施形態において、本明細書中で提供されるKozak配列は、AAGATGAの配列を有する。一部の実施形態において、Kozak配列は、GCAAGATGと少なくとも85%同一の核酸配列を含む。一部の実施形態において、Kozak配列は、GCAAGATGの配列と、1つ又は2つのヌクレオチドが異なる。一部の実施形態において、Kozak配列は、GCAAGATGを含む。一部の実施形態において、Kozak配列は、CACCAATGと少なくとも85%同一の核酸配列を含む。一部の実施形態において、Kozak配列は、CACCAATGの配列と、1つ又は2つのヌクレオチドが異なる。一部の実施形

態において、K o z a k 配列は、C A C C A T G を含む。

【 0 1 2 5 】

治療タンパク質

本明細書中で提供される遺伝子治療構築体は、タンパク質の不在又は欠陥をもたらす、個体における遺伝的欠陥に起因する遺伝的障害を処置するための治療タンパク質をコードする核酸を含む。遺伝子治療構築体から発現される治療タンパク質は、不在であるか、又は欠陥のあるタンパク質を置換する。したがって、治療タンパク質は、個体において処置が必要な遺伝的欠陥に基づいて選択される。一部の実施形態において、治療タンパク質は、構造タンパク質である。一部の実施形態において、治療タンパク質は酵素である。一部の実施形態において、治療タンパク質は調節タンパク質である。一部の実施形態において、治療タンパク質は受容体である。一部の実施形態において、治療タンパク質はペプチドホルモンである。一部の実施形態において、治療タンパク質は、サイトカイン又はケモカインである。

10

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態において、本明細書中の遺伝子治療構築体は、酵素、例えばリソソーム蓄積障害のある個体において遺伝的欠陥がある酵素をコードする。一部の実施形態において、遺伝子治療構築体は、リソソーム酵素、例えば、グリコシダーゼ、プロテアーゼ、又はスルファターゼをコードする。一部の実施形態において、本明細書中で提供される遺伝子治療構築体によってコードされる酵素として、以下に限定されないが、 α -D-マンノシダーゼ；N-アスパルチル- β -グルコサミニダーゼ； β -ガラクトシダーゼ；セラミダーゼ；フコシダーゼ；ガラクトセレブロシダーゼ；アシルスルファターゼ A；N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ；イズロン酸スルファターゼ；N-アセチルグルコサミニダーゼ；アセチル CoA： α -グルコサミニドアセチルトランスフェラーゼ；N-アセチルグルコサミン 6-スルファターゼ； β -グルクロニダーゼ；ヒアルロニダーゼ；シアリダーゼ；スルファターゼ；スフィンゴミエリナーゼ；酸性 β -マンノシダーゼ；カテプシン K；3-ヘキソサミニダーゼ A； β -ヘキソサミニダーゼ B； α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ；シアリン；ヘキソサミニダーゼ A；ベーターグルコシダーゼ； α -イズロニダーゼ； α -ガラクトシダーゼ A； β -グルコセレブロシダーゼ；リソソーム酸性リパーゼ；グリコサミノグリカンアルファ-L-イズロノヒドロラーゼ；イズロン酸-2-スルファターゼ；N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ；グリコサミノグリカン N-アセチルガラクトサミン 4-スルファターゼ；アルファ-グルコシダーゼ；ヘパランスルファミダーゼ；NADPH オキシダーゼの gp-91 サブユニット；アデノシンデアミナーゼ；サイクリン依存性キナーゼ様 5；及びタンパク質パルミトイルチオエステラーゼ 1 が挙げられる。一部の実施形態において、本明細書中で提供される遺伝子治療構築体によってコードされる酵素は、アルファ-グルコシダーゼを含む。一部の実施形態において、治療タンパク質は、嚢胞性線維症、アルファサラセミア及びベータサラセミア、鎌状血球貧血、マルファン症候群、脆弱 X 症候群、ハンチントン舞蹈病、血色素沈着症、先天性難聴（無症候性）、テイ・サックス、家族性高コレステロール血症、デュシェンヌ型筋ジストロフィ、シュタルガルト病、アッシュア症候群、コロイデレミア、色盲、X 連鎖性網膜分離症、血友病、ウィスコット・アルドリッチ症候群、X 連鎖性慢性肉芽腫症、芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素欠損症、劣性栄養障害性表皮水疱症、アルファ 1 アンチトリプシン欠損症、ハッチンソン・ギルフォード早老症候群（HGPS）、ヌーナン症候群、X 連鎖性重症複合型免疫不全（X-SCID）からなる群から選択される遺伝的障害と関連する。

20

30

40

【 0 1 2 7 】

遺伝子治療ベクターの例

遺伝子治療ベクター及び組成物

本明細書中で提供されるのは、核酸、例えば DNA が、場合によってはシグナルペプチドを有する、治療融合タンパク質、例えば v I G F 2 融合体をコードする、遺伝子治療ベクターである。遺伝子治療ベクターは、場合によっては、内部リボソームエントリ配列を

50

含む。レンチウイルス等のレトロウイルスに由来するベクターは、長期的遺伝子移入を達成するのに適したツールである。というのも、娘細胞における導入遺伝子及びその増殖の長期的な、安定した組込みを可能にするからである。レンチウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターは、非増殖細胞、例えば肝細胞及びニューロンを形質導入することができる点で、腫瘍レトロウイルス、例えばマウス白血病ウイルスに由来するベクターに勝る更なる利点を有する。また、免疫原性が低いという更なる利点も有する。

【0128】

本明細書中の例示的な遺伝子治療ベクターは、v I G F 2 ペプチドを含む治療タンパク質及び治療融合タンパク質をコードする。例示的な融合タンパク質アミノ酸配列をコードする核酸を、以下の表7に示す。

【0129】

【表42】

表7: DNA配列		
構築体	DNA配列	配列番号
Kozak-hGAA (元から存在するGAA)	GCAAGATGGGAGTGAGGCACCCGCCCTGCTCCCACCGGCTCCTG	189
	GCCGTCTGCGCCCTCGTGTCTTGGCAACCGCTGCACTCCTGGGG CACATCCTACTCCATGATTTCTGCTGGTTCCCCGAGAGCTGAGT GGCTCCTCCCCAGTCCTGGAGGAGACTCACCCAGCTCACCAGCA GGGAGCCAGTAGACCAGGGCCCCGGGATGCCCAGGCACACCCC GGCCGTCCCAGAGCAGTGCCCACACAGTGCGACGTCCCCCCCCAA CAGCCGCTTCGATTGCGCCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAAC AGTGCGAGGCCCCGCGGCTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGG CTGCAGGGAGCCCAGATGGGGCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCACC CAGCTACCCCAGCTACAAGCTGGAGAACCTGAGCTCCTCTGAAA TGGGCTACACGGCCACCCTGACCCGTACCACCCCCACCTTCTTCC CCAAGGACATCCTGACCCTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACT GAGAACCGCCTCCACTTCACGATCAAAGATCCAGCTAACAGGCG CTACGAGGTGCCCTTGAGAGCCCCGCATGTCCACAGCCGGGCAC CGTCCCCACTCTACAGCGTGGAGTTCTCCGAGGAGCCCTTCGGG GTGATCGTGCGCCGGCAGCTGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACAC GACGGTGGCGCCCCCTGTTCTTTGCGGACCAGTTCCCTTCAGCTGTC CACCTCGCTGCCCTCGCAGTATATCACAGGCCTCGCCGAGCACCT CAGTCCCCTGATGCTCAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCCCTGT GGAACCGGGACCTTGCGCCACGCCCCGGTGCGAACCTCTACGGG TCTACCCCTTTCTACCTGGCGCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACA CGGGGTGTTCTGCTAAACAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGC AGCCGAGCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTG GATGTCTACATCTTCTGCGCCAGAGCCCAAGAGCGTGCTGCA	20 30 40

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

【 表 4 3 】

GCAGTACCTGGACGTTGTGGGATACCCGTTTCATGCCGCCATACTG	
GGGCCTGGGCTTCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGC	
TATCACCCGCCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGGCCACTTCC	
CCCTGGACGTCCAGTGGAACGACCTGGACTACATGGACTCCCGG	
AGGGACTTCACGTTCAACAAGGATGGCTTCCGGGACTTCCCGGC	
CATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGCGGCCGGCGCTACATGATGA	10
TCGTGGATCCTGCCATCAGCAGCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTAC	
AGGCCCTACGACGAGGGTCTGCGGAGGGGGGTTTTCATCACCAA	
CGAGACCGGCCAGCCGCTGATTGGGAAGGTATGGCCCGGGTCCA	
CTGCCTTCCCCGACTTCACCAACCCACAGCCCTGGCCTGGTGGG	
AGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTCGACGGC	
ATGTGGATTGACATGAACGAGCCTTCCAACTTCATCAGGGGCTCT	
GAGGACGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGAGAACCCACCCTACGT	
GCCTGGGGTGGTTGGGGGGACCCCTCCAGGCGGCCACCATCTGTG	20
CCTCCAGCCACCAGTTTCTCTCCACACACTACAACCTGCACAACC	
TCTACGGCCTGACCGAAGCCATCGCCTCCCACAGGGCGCTGGTG	
AAGGCTCGGGGGACACGCCCATTGTGATCTCCCGCTCGACCTTT	
GCTGGCCACGGCCGATACGCCGGCCACTGGACGGGGGACGTGTG	
GAGCTCCTGGGAGCAGCTCGCCTCCTCCGTGCCAGAAATCCTGC	
AGTTTAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTCGGGGCCGACGTCTGC	
GGCTTCCTGGGCAACACCTCAGAGGAGCTGTGTGTGCGCTGGAC	
CCAGCTGGGGGCCTTCTACCCCTTCATGCGGAACCACAACAGCC	
TGCTCAGTCTGCCCCAGGAGCCGTACAGCTTCAGCGAGCCGGCC	30
CAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTCACCTGCGCTACGCACTCCT	
CCCCACCTCTACACACTGTTCCACCAGGCCACGTCGCGGGGG	
AGACCGTGGCCCGGCCCTCTTCCTGGAGTTCCCAAGGACTCTA	
GCACCTGGACTGTGGACCACCAGCTCCTGTGGGGGGAGGCCCTG	
CTCATCACCCAGTGCTCCAGGCCGGAAGGCCGAAGTGACTGG	
CTACTTCCCCTTGGGCACATGGTACGACCTGCAGACGGTGCCAGT	
AGAGGCCCTTGGCAGCCTCCCACCCACCTGCAGCTCCCCGTG	
AGCCAGCCATCCACAGCGAGGGGCAGTGGGTGACGCTGCCGGCC	
CCCCTGGACACCATCAACGTCCACCTCCGGGCTGGGTACATCATC	40

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

【表 4 5】

CGGGGTGTTCTTGCTAAACAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGC	
AGCCGAGCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTG	
GATGTCTACATCTTCCTGGGCCCAGAGCCCAAGAGCGTGGTGCA	
GCAGTACCTGGACGTTGTGGGATACCCGTTTCATGCCGCCATACTG	
GGGCCTGGGCTTCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGC	
TATACCCGCCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGGCCACTTCC	
CCCTGGACGTCCAGTGGAACGACCTGGACTACATGGACTCCCGG	10
AGGGACTTCACGTTCAACAAGGATGGCTTCCGGGACTTCCCGGC	
CATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGCGGCCGGCGCTACATGATGA	
TCGTGGATCCTGCCATCAGCAGCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTAC	
AGGCCCTACGACGAGGGTCTGCGGAGGGGGGTTTTCATCACCAA	
CGAGACCGGCCAGCCGCTGATTGGGAAGGTATGGCCCGGGTCCA	
CTGCCTTCCCCGACTTCACCAACCCACAGCCCTGGCCTGGTGGG	
AGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTCGACGGC	
ATGTGGATTGACATGAACGAGCCTTCCAACCTTCATCAGGGGCTCT	20
GAGGACGGCTGCCCCAACAAATGAGCTGGAGAACCCACCCTACGT	
GCCTGGGGTGGTTGGGGGGACCTCCAGGCGGCCACCATCTGTG	
CCTCCAGCCACCAGTTTCTCTCCACACACTACAACCTGCACAACC	
TCTACGGCCTGACCGAAGCCATCGCCTCCCACAGGGCGCTGGTG	
AAGGCTCGGGGGACACGCCCATTTGTGATCTCCCGCTCGACCTTT	
GCTGGCCACGGCCGATACGCCGGCCACTGGACGGGGGACGTGTG	
GAGCTCCTGGGAGCAGCTCGCCTCCTCCGTGCCAGAAATCCTGC	
AGTTTAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTCGGGGCCGACGTCTGC	
GGCTTCTGGGCAACACCTCAGAGGAGCTGTGTGTGCGCTGGAC	30
CCAGCTGGGGGCCTTCTACCCCTTCATGCGGAACCACAACAGCC	
TGCTCAGTCTGCCCCAGGAGCCGTACAGCTTCAGCGAGCCGGCC	
CAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTCACCTGCGCTACGCACTCCT	
CCCCACCTCTACACACTGTTCCACCAGGCCACGTCGCGGGGG	
AGACCGTGGCCCGGCCCTCTTCCTGGAGTTCCCAAGGACTCTA	
GCACCTGGACTGTGGACCACCAGCTCCTGTGGGGGGAGGCCCTG	
CTCATCACCCAGTGCTCCAGGCCGGAAGGCCGAAGTGACTGG	
CTACTTCCCCTTGGGCACATGGTACGACCTGCAGACGGTGCCAGT	40

【0 1 3 3】

10

20

30

40

【 0 1 3 4 】

【表 4 7】

CACTCTACAGCGTGGAGTTCTCCGAGGAGCCCTTCGGGGTGATC	
GTGCGCCGGCAGCTGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACACGACGGT	
GGCGCCCCTGTTCTTTGCGGACCAGTTCCTTCAGCTGTCCACCTC	
GCTGCCCTCGCAGTATATCACAGGCCTCGCCGAGCACCTCAGTCC	
CCTGATGCTCAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCTGTGGAACC	
GGGACCTTGCGCCACGCCCCGGTGCGAACCTCTACGGGTCTCAC	
CCTTTCTACCTGGCGCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACACGGGGT	10
GTTCTGCTAAACAGCAATGCCATGGATGTGGTCTGCAGCCGA	
GCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATGTC	
TACATCTTCCTGGGCCCAGAGCCCAAGAGCGTGGTGCAGCAGTA	
CCTGGACGTTGTGGGATACCCGTTTCATGCCGCCATACTGGGGCCT	
GGGCTTCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGCTATCAC	
CCGCCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGCCCCACTTCCCCCTGG	
ACGTCCAGTGGAACGACCTGGACTACATGGACTCCCGGAGGGAC	
TTCACGTTCAACAAGGATGGCTTCCGGGACTTCCCGGCCATGGTG	20
CAGGAGCTGCACCAGGGCGGCCGGCGCTACATGATGATCGTGGA	
TCCTGCCATCAGCAGCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTACAGGCCCT	
ACGACGAGGGTCTGCGGAGGGGGGTTTTCATCACCAACGAGACC	
GGCCAGCCGCTGATTGGGAAGGTATGGCCCCGGGTCCACTGCCTT	
CCCCGACTTCACCAACCCACAGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACA	
TGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTCGACGGCATGTGG	
ATTGACATGAACGAGCCTTCCAACCTTCATCAGGGGCTCTGAGGA	
CGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGAGAACCCACCCTACGTGCCTG	
GGGTGGTTGGGGGGACCCCTCAGGCGGCCACCATCTGTGCCTCC	30
AGCCACCAGTTTCTCTCCACACACTACAACCTGCACAACCTCTAC	
GGCCTGACCGAAGCCATCGCCTCCACAGGGCGCTGGTGAAGGC	
TCGGGGGACACGCCCATTGTGATCTCCCGCTCGACCTTTGCTGG	
CCACGGCCGATACGCCGGCCACTGGACGGGGGACGTGTGGAGCT	
CCTGGGAGCAGCTCGCCTCCTCCGTGCCAGAAATCCTGCAGTTTA	
ACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTCGGGGCCGACGTCTGCGGCTTCC	
TGGGCAACACCTCAGAGGAGCTGTGTGTGCGCTGGACCCAGCTG	
GGGGCCTTCTACCCCTTCATGCGGAACCACAACAGCCTGCTCAGT	40

【0 1 3 5】

【表 48】

	CTGCCCCAGGAGCCGTACAGCTTCAGCGAGCCGGCCCAGCAGGC CATGAGGAAGGCCCTCACCTGCGCTACGACTCCTCCCCACCT CTACACACTGTTCCACCAGGCCACGTCGCGGGGAGACCGTGG CCCGGCCCTCTTCTGGAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACCTGGA CTGTGGACCACCAGCTCCTGTGGGGGAGGCCCTGCTCATCACC CCAGTGCTCCAGGCCGGAAGGCCGAAGTGACTGGCTACTTCCC CTTGGGCACATGGTACGACCTGCAGACGGTGCCAGTAGAGGCC TTGGCAGCCTCCCACCCACCTGCAGCTCCCCGTGAGCCAGCCA TCCACAGCGAGGGGCAGTGGGTGACGCTGCCGGCCCCCTGGAC ACCATCAACGTCCACCTCCGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAG GGCCTGGCCTCACAACCACAGAGTCCCGCCAGCAGCCCATGGC CCTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGTGGGGAGGCCCGAGGGGAGC TGTTCTGGGACGATGGAGAGAGCCTGGAAGTGCTGGAGCGAGGG GCCTACACACAGGTCATCTTCTGGCCAGGAATAACACGATCGT GAATGAGCTGGTACGTGTGACCAGTGAGGGAGCTGGCCTGCAGC TGCAGAAGGTGACTGTCTGGGCGTGGCCACGGCGCCCCAGCAG GTCCTCTCCAACGGTGTCCCTGTCTCCAACCTCACCTACAGCCCC GACACCAAGGTCCTGGACATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGGAGA GCAGTTTCTCGTCAGCTGGTGT TAG	
コドン最適化 wt-PPT1 IDT	ATGGCATCACCGGGTTGCCTCTGGTTGTTGGCCGTTGCGTTGCTT CCGTGGACATGTGCATCAAGAGCTCTTCAACATCTGGATCCCCCA GCTCCCCCTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTTCATGT TGTAACCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAA GAAGATTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGA CACTGATGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATA GTCAGGTCACCTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAA CTTCAGCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACA GTTTCTTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCGATGAT TAACCTTATATCTGTCTGGGGGACAACACCAGGGTGTTTTGGTCT TCCTCGCTGTCTGGTGAAAGCTCCACATCTGTGATTTCATACG CAAAACGTTGAACGCAGGAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAAC GGCTTGTTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAGAAGAC	192

【0136】

10

20

30

40

50

【表 4 9】

	GTTTATAGGAATCACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAA CGCGGAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAA GAAATTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCC TGTCGATTGAGAAATGGTTCGGGTTCTACAGGTCTGGCCAGGCGA AGGAGACTATTCCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGAC AGACTCGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTT CTTGGCTACGGAAGGCGATCATCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGGT TCTATGCCCATATAATCCCGTTCTTGGGCTAA	
PPT1-2 (wt- vIGF2- PPT1; IDTコドン 最適化 ツールによって コドン最適化)	ATGGCATCCCCCGGATGTTTGTGGCTGCTGGCGGTTGCGCTTCTG CCATGGACGTGCGCCTCCCGAGCCCTCCAACACCTGTCCAGGAC ACTTTGCGGCGGAGAGTTGGTCGATACGCTTCAATTCGTGTGTGG GGATAGAGGCTTCCTTTTTTCTCGGCCCGCTAGCCGCGTGTCCCG AAGGTCCCGGGGTATCGTTGAGGAATGCTGTTCCGGTCTCTGCG ATCTTGCACTGTTGGAGACATACTGTGCTACGCCTGCGAGAAGC GAGGGTGGAGGGGGTTCTGGAGGTGGAGGGAGCCGGCCTCGGG CGGTTCCCACCCAGGATCCTCCAGCTCCTCTGCCTCTGGTCATCT GGCATGGGATGGGGGACTCATGTTGTAACCCGCTGAGTATGGGG GCAATTAAAAAATGGTTGAAAAGAAAATTCAGGTATTTATGT CCTCTCTCTTGAAATCGGTAAGACACTTATGGAGGATGTGGAAA ACTCCTTTTTTCCTTAATGTCAATTCTCAGGTCACAACAGTTTGTCA GGCTCTGGCGAAGGATCCTAAGCTGCAGCAAGGCTACAACGCCA TGGGTTTTTCCCAGGGAGGCCAATTTCTCAGAGCGGTAGCTCAGC GATGTCCATCACCACCGATGATAAATCTGATCAGTGTCGGCGGA CAACACCAGGGAGTTTTTCGGGCTGCCCAGGTGTCCGGGGGAATC TAGTCACATATGTGACTTCATTCGCAAGACCCTTAACGCCGGCGC TACTCAAAGGTGGTTCAAGAACGGCTTGTGCAGGCTGAATACT GGCACGATCCCATCAAGGAAGATGTATATAGGAACCACAGTATC TTTCTGGCAGACATAAATCAGGAAAGGGGTATTAACGAAAGCTA CAAGAAAAATCTCATGGCCCTGAAGAAATTTGTAATGGTTAAGT TTTTGAACGATTCTATAGTAGATCCTGTTGACTCCGAGTGGTTCG GGTTCATCGATCTGGTCAAGCCAAGGAGACGATTCCGCTTCAG GAAACTTCACTGTACACACAGGATCGGCTGGGACTCAAGGAGAT	193

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

【表 50】

	GGACAATGCGGGCCAGTTGGTGTCTTCTGGCTACAGAGGGAGACC ATCTCCAGTTGAGTGAAGAATGGTTCTATGCACATATTATCCCAT TCCTCGGCTAA	
PPT1-29 (BiP2aa- vIGF2- PPT1; 天然 ヒト配列)	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCTGGGTG GCACTGCTGCTGCTCAGCGCGGCGAGGGCCGCGCGAGTCGCAC GTTGTGTGGAGGTGAACTCGTCGACACCCTTCAGTTCGTATGTGG AGATCGCGGTTTCCTCTTCTCACGCCCAGCTTCCAGAGTTTCCCG AAGATCACGAGGAATAGTTGAGGAGTGCTGTTTTCGGTCTTGTG ATCTGGCTCTCCTCGAGACTTATTGTGCTACGCCGGCCCGCTCTG AAGGAGGTGGTGGCAGTGGAGGAGGAGGGAGTCGGCCTAGGGC AGTCCCAACCCAGGACCCGCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCT GGCATGGGATGGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGT GCTATTAAAAAATGGTGGAGAAGAAAAATACCTGGAATTTACGT CTTATCTTTAGAGATTGGGAAGACCCTGATGGAGGACGTGGAGA ACAGCTTCTTCTTGAATGTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTC AGGCACTTGCTAAGGATCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCT ATGGGATTCTCCCAGGGAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCA GAGATGCCCTTCACCTCCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGG ACAACATCAAGGTGTTTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGA GCTCTCACATCTGTGACTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGG GCGTACTCCAAAGTTGTTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATA CTGGCATGACCCCATAAAGGAGGATGTGTATCGCAACCACAGCA TCTTCTTGGCAGATATAAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAGTCC TACAAGAAAAACCTGATGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAA ATTCTCAATGATTCCATTGTGGACCCTGTAGATTTCGGAGTGGTT TGGATTTTACAGAAGTGGCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTAC AGGAGACCTCCCTGTACACACAGGACCGCTGGGGCTAAAGGAA ATGGACAATGCAGGACAGCTAGTGTCTTCTGGCTACAGAAGGGGA CCATCTTCAGTTGTCTGAAGAATGGTTTTATGCCCACATCATAACC ATTCCTTGGATGA	194
操作した PPT1	ATGGCGTCGCCCCGGCTGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGACCCGCC	195

【0138】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【 0 1 3 9 】

【表 5 2】

TGGCAGCCGGAGCCCAGAAGTGCCATTCTGTGATCACACAGGAC TTTCTGACTTGCTGGCTGAGCATCCGACAAGCAGAGCTGCTGCTC CCTGGGGCTGAGTTTCATCACTATGTGGGAGGACCTACGGAAAC CCATGTTGTAAGGTCCCCACATCCCTACCAGCTTCCACAGGCCTT GGCCCCCATGTGGACTTTGTGGGGGGACTGCACCGTTTTCCCCC AACATCATCCCTGAGGCAACGTCCTGAGCCGCAGGTGACAGGGA CTGTAGGCCTGCATCTGGGGGTAACCCCTCTGTGATCCGTAAGC GATACAACTTGACCTCACAAGACGTGGGCTCTGGCACCAGCAAT AACAGCCAAGCCTGTGCCCAGTTCCTGGAGCAGTATTTCCATGA CTCAGACCTGGCTCAGTTCATGCGCCTCTTCGGTGGCAACTTTGC ACATCAGGCATCAGTAGCCCGTGTGGTTGGACAACAGGGCCGGG GCCGGGCCGGGATTGAGGCCAGTCTAGATGTGCAGTACCTGATG AGTGCTGGTGCCAACATCTCCACCTGGGTCTACAGTAGCCCTGGC CGGCATGAGGGACAGGAGCCCTTCCTGCAGTGGCTCATGCTGCT CAGTAATGAGTCAGCCCTGCCACATGTGCATACTGTGAGCTATG GAGATGATGAGGACTCCCTCAGCAGCGCCTACATCCAGCGGGTC AACACTGAGCTCATGAAGGCTGCCGCTCGGGGTCTCACCCTGCT CTTCGCCTCAGGTGACAGTGGGGCCGGGTGTTGGTCTGTCTCTGG AAGACACCAGTTCCGCCCTACCTTCCCTGCCTCCAGCCCCTATGT CACCACAGTGGGAGGCACATCCTTCCAGGAACCTTTCCTCATCAC AAATGAAATTGTTGACTATATCAGTGGTGGTGGCTTCAGCAATGT GTTCCACGCGCCTTCATACCAGGAGGAAGCTGTAACGAAGTTCC TGAGCTCTAGCCCCCACCTGCCACCATCCAGTTACTTCAATGCCA GTGGCCGTGCCTACCCAGATGTGGCTGCACTTTCTGATGGCTACT GGGTGGTCAGCAACAGAGTGCCCATTCCATGGGTGTCCGGAACC TCGGCCTCTACTCCAGTGTTTGGGGGGATCCTATCCTTGATCAAT GAGCACAGGATCCTTAGTGGCCGCCCCCTCTTGGCTTTCTCAAC CCAAGGCTCTACCAGCAGCATGGGGCAGGACTCTTTGATGTAAC CCGTGGCTGCCATGAGTCCTGTCTGGATGAAGAGGTAGAGGGCC AGGGTTTCTGCTCTGGTCCTGGCTGGGATCCTGTAACAGGCTGGG GAACACCCAACCTCCAGCTTTGCTGAAGACTCTACTCAACCCCT GA	10 20 30 40
---	---

【 0 1 4 0 】

【表 5 3】

操作した TPP1	ATGGGACTCCAAGCCTGCCTCCTAGGGCTCTTTGCCCTCATCCTC TCTGGCAAATGCTCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGA CACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCG CCCCCTTCCAGAGTTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTGTTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATT GCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAAGGAGGTGGTGGCAGTGGAGG AGGAGGGAGTAGACCTAGAGCAGTGCCTACGCAGAGTTACAGCC CGGAGCCCGACCAGCGGAGGACGCTGCCCCCAGGCTGGGTGTCC CTGGGCCGTGCGGACCCTGAGGAAGAGCTGAGTCTCACCTTTGC CCTGAGACAGCAGAATGTGGAAGACTCTCGGAGCTGGTGCAGG CTGTGTCGGATCCCAGCTCTCCTCAATACGGAAAATACCTGACCC TAGAGAATGTGGCTGATCTGGTGAGGCCATCCCCACTGACCCTC CACACGGTGCAAAAATGGCTCTTGGCAGCCGGAGCCCAGAAGTG CCATTCTGTGATCACACAGGACTTTCTGACTTGCTGGCTGAGCAT CCGACAAGCAGAGCTGCTGCTCCCTGGGGCTGAGTTTCATCACT ATGTGGGAGGACCTACGGAACCCATGTTGTAAGGTCCCCACAT CCCTACCAGCTTCCACAGGCCTTGGCCCCCATGTGGACTTTGTG GGGGGACTGCACCGTTTTTCCCCAACATCATCCCTGAGGCAACG TCCTGAGCCGCAGGTGACAGGGACTGTAGGCCTGCATCTGGGGG TAACCCCTCTGTGATCCGTAAGCGATACAACTTGACCTCACAAG ACGTGGGCTCTGGCACCAGCAATAACAGCCAAGCCTGTGCCCAG TTCCTGGAGCAGTATTTCCATGACTCAGACCTGGCTCAGTTCATG CGCCTCTTCGGTGGCAACTTTGCACATCAGGCATCAGTAGCCCGT GTGGTTGGACAACAGGGCCGGGGCCGGGCGGGATTGAGGCCA GTCTAGATGTGCAGTACCTGATGAGTGCTGGTGCCAACATCTCCA CCTGGGTCTACAGTAGCCCTGGCCGGCATGAGGGACAGGAGCCC TTCCTGCAGTGGCTCATGCTGCTCAGTAATGAGTCAGCCCTGCCA CATGTGCATACTGTGAGCTATGGAGATGATGAGGACTCCCTCAG CAGCGCCTACATCCAGCGGGTCAACACTGAGCTCATGAAGGCTG CCGCTCGGGGTCTCACCTGCTCTTCGCCTCAGGTGACAGTGGGG CCGGGTGTGGTCTGTCTCTGGAAGACACCAGTTCCGCCCTACCT TCCCTGCCTCCAGCCCCTATGTCACCACAGTGGGAGGCACATCCT	197
--------------	---	-----

10

20

30

40

【0 1 4 1】

【表 5 4】

	TCCAGGAACCTTTCCTCATCACAAATGAAATTGTTGACTATATCA GTGGTGGTGGCTTCAGCAATGTGTTCCACGGCCTTCATACCAGG AGGAAGCTGTAACGAAGTTCCTGAGCTCTAGCCCCACCTGCCA CCATCCAGTTACTTCAATGCCAGTGGCCGTGCCTACCCAGATGTG GCTGCACTTTCTGATGGCTACTGGGTGGTCAGCAACAGAGTGCC CATTCCATGGGTGTCCGGAACCTCGGCCTCTACTCCAGTGTTTGG GGGGATCCTATCCTTGATCAATGAGCACAGGATCCTTAGTGGCC GCCCCCTCTTGCTTTCTCAACCCAAGGCTCTACCAGCAGCATG GGGCAGGACTCTTTGATGTAACCCGTGGCTGCCATGAGTCCTGTC TGGATGAAGAGGTAGAGGGCCAGGGTTTCTGCTCTGGTCCTGGC TGGGATCCTGTAACAGGCTGGGGAACACCCAACCTCCAGCTTT GCTGAAGACTCTACTCAACCCCTGA	
AGA 野生型	ATGGCGCGGAAGTCGAACCTGCCTGTGCTTCTCGTGCCGTTTCTG CTCTGCCAGGCCCTAGTGCGCTGCTCCAGCCCTCTGCCCCGGTC GTCAACACTTGCCCTTTAAGAATGCAACCGAAGCAGCGTGGAG GGCATTAGCATCTGGAGGCTCTGCCCTGGATGCAGTGGAGAGCG GCTGTGCCATGTGTGAGAGAGAGCAGTGTGACGGCTCTGTAGGC TTTGAGGAAGTCCTGATGAACCTGGAGAAACCACACTAGATGC CATGATCATGGATGGCACTACTATGGATGTAGGAGCAGTAGGAG ATCTCAGACGAATTAATAAATGCTATTGGTGTGGCACGGAAGTA CTGGAACATACAACACACACTTTTAGTAGGAGAGTCAGCCAC CACATTTGCTCAAAGTATGGGGTTTATCAATGAAGACTTATCTAC CACTGCTTCTCAAGCTCTTCATTGAGATTGGCTTGCTCGGAATTG CCAGCCAAATTATTGGAGGAATGTTATACCAGATCCCTCAAAAT ACTGCGGACCTACAAACCACCTGGTATCTTAAAGCAGGATATT CCTATCCATAAAGAAACAGAAGATGATCGTGGTCATGACACTAT TGGCATGGTTGTAATCCATAAGACAGGACATATTGCTGCTGGTA CATCTACAAATGGTATAAAATTCAAAATACATGGCCGTGTAGGA GACTCACCAATACCTGGAGCTGGAGCCTATGCTGACGATACTGC AGGGGCAGCCGCAGCCACTGGGAATGGTGATATATTGATGCGCT TCCTGCCAAGCTACCAAGCTGTAGAATACATGAGAAGAGGAGAA GATCCAACCATAGCTTGCCAAAAAGTGATTTCAGAATCCAGAA	198

10

20

30

40

【0 1 4 2】

50

【表 5 5】

	GCATTTTCCAGAATTCCTTTGGGGCTGTTATATGTGCCAATGTGAC TGGAAGTTACGGTGCTGCTTGCAATAAACTTTCAACATTTACTCA GTTTAGTTTCATGGTTTATAATTCCGAAAAAAATCAGCCAACTGA GGAAAAAGTGGACTGCATCTAA	
操作した AGA (N-末端 融合)	ATGGCGCGGAAGTCGAACTTGCCCTGTGCTTCTCGTGCCGTTTCTG CTCTGCCAGGCCCTAGTGCGCTGCTCTAGAACACTGTGCGGAGG GGAGCTTGTTAGACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTT CCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAGTTTCACGGAGGTCTAGGGG TATAGTAGAGGAGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGCGCCTCCT CGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAAGGAGGTGGTG GCAGTGGAGGAGGAGGGAGTAGACCTAGAGCAGTGCCTACGCA GTCCAGCCCTCTGCCCCTGGTCGTCAACACTTGGCCCTTTAAGAA TGCAACCGAAGCAGCGTGGAGGGCATTAGCATCTGGAGGCTCTG CCCTGGATGCAGTGGAGAGCGGCTGTGCCATGTGTGAGAGAGAG CAGTGTGACGGCTCTGTAGGCTTTGGAGGAAGTCCTGATGAACT TGGAGAAACCACACTAGATGCCATGATCATGGATGGCACTACTA TGGATGTAGGAGCAGTAGGAGATCTCAGACGAATTA AAAATGCT ATTGGTGTGGCACGGAAAGTACTGGAACATACAACACACACACT TTTAGTAGGAGAGTCAGCCACCACATTTGCTCAAAGTATGGGGT TTATCAATGAAGACTTATCTACCACTGCTTCTCAAGCTCTTCATT CAGATTGGCTTGCTCGGAATTGCCAGCCAAATTATTGGAGGAAT GTTATACCAGATCCCTCAA AATACTGCGGACCCTACAAACCACC TGGTATCTTAAAGCAGGATATTCCTATCCATAAAGAAACAGAAG ATGATCGTGGTCATGACACTATTGGCATGGTTGTAATCCATAAGA CAGGACATATTGCTGCTGGTACATCTACAAATGGTATAAAATTC AAAATACATGGCCGTGTAGGAGACTCACCAATACCTGGAGCTGG AGCCTATGCTGACGATACTGCAGGGGCAGCCGCAGCCACTGGGA ATGGTGATATATTGATGCGCTTCCTGCCAAGCTACCAAGCTGTAG AATACATGAGAAGAGGAGAAGATCCAACCATAGCTTGCCAAAA AGTGATTTCAAGAATCCAGAAGCATTTTCCAGAATTCTTTGGGGC TGTTATATGTGCCAATGTGACTGGAAGTTACGGTGCTGCTTGCAA TAAACTTTCAACATTTACTCAGTTTAGTTTCATGGTTTATAATTCC	199

10

20

30

40

【0 1 4 3】

【表 5 6】

	GAAAAAAATCAGCCAACTGAGGAAAAAGTGGACTGCATCTAA	
GLA 野生型	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGCG GCGCGGGCCCTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGG CTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACTGCCAGG AAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGGAGATG GCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGA GTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTC AGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGA TTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAAGCTA GGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCC TGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCAGACCTTTGCTGA CTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAG TTTGAAAATTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCT GAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGTA CTCTGTGAGTGGCCTC TTTATATGTGGCCCTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGAC AGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCT GGAAAAGTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAG GAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCC AGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGC AAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTAT TCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTC TCCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTG GGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGACAGGGAGACA ACTTTGAAGT GTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGTAGCTATGAT AAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAG TTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCA TCACACAGCTCCTCCCTGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAA TGGACTTCAAGGTAAAGAAGTCACATAAATCCCACAGGCACTGT TTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTT ACTTTAA	200
操作した GLA	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGCG GCGCGGGCCCTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGG	201

10

20

30

40

【0 1 4 4】

50

10

20

30

40

【 0 1 4 5 】

10

20

30

40

【 0 1 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 6 0】

	CAGCTGCAGAAGGTGACTGTCCTGGGCGTGGCCACGGCGCCCCA GCAGGTCCTCTCCAACGGTGTCCCTGTCTCCAACCTTCACCTACAG CCCCGACACCAAGGTCCTGGACATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGG AGAGCAGTTTCTCGTCAGCTGGTGTTAG	
BiP-vIGF2- 20-2GS- GAA	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGCG GCGCGGGCCTCTAGAACAAGTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACAC TCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCCC CGCTTCCAGAGTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATACTGGAGGAGT GTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCG CGACGCCAGCCAGGTCCGAAGGGGGCGGTGGCTCAGGTGGTGG AGGTAGCAGACCAGGGCCCCGGGATGCCAGGCACACCCCGGCC GTCCAGAGCAGTGCCACACAGTGCGACGTCCCCCCCCAACAGC CGCTTCGATTGCGCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAACAGTG CGAGGCCCCGCGGCTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGGCTGC AGGGAGCCCAGATGGGGCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCACCCAGC TACCCAGCTACAAGCTGGAGAACCTGAGCTCCTCTGAAATGGG CTACACGGCCACCCTGACCCGTACACCCCCACCTTCTTCCCCAA GGACATCCTGACCCTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGAGA ACCGCCTCCACTTCACGATCAAAGATCCAGCTAACAGGCGCTAC GAGGTGCCCTTGAGAGCCCCGCATGTCCACAGCCGGGCACCGTC CCCACTCTACAGCGTGGAGTTCTCCGAGGAGCCCTTCGGGGTGA TCGTGCGCCGGCAGCTGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACACGACG GTGGCGCCCCTGTTCTTTGCGGACCAGTTCCTTCAGCTGTCCACC TCGCTGCCCTCGCAGTATATCACAGGCCTCGCCGAGCACCTCAGT CCCCTGATGCTCAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCTGTGGAA CCGGGACCTTGCGCCACGCCCCGGTGCGAACCTCTACGGGTCTC ACCCTTTCTACCTGGCGCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACACGGG GTGTTCTTGCTAAACAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGCAGCC GAGCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATG TCTACATCTTCTGGGCCCAGAGCCCAAGAGCGTGGTGCAGCAG TACCTGGACGTTGTGGGATACCCGTTTCATGCCGCCATACTGGGGC CTGGGCTTCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGCTATC	203

10

20

30

40

【 0 1 4 8 】

【表 6 1】

ACCCGCCAGGTGGTGGTGGAGAACATGACCAAGGGCCCACTTCCCCCT GGACGTCCAGTGGAACGACCTGGACTACATGGACTCCCGGAGGG ACTTCACGTTCAACAAGGATGGCTTCCGGGACTTCCCGGCCATG GTGCAGGAGCTGCACCAGGGCGGCCGGCGCTACATGATGATCGT GGATCCTGCCATCAGCAGCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTACAGGC CCTACGACGAGGGTCTGCGGAGGGGGGTTTTTCATCACCAACGAG ACCGGCCAGCCGCTGATTGGGAAGGTATGGCCCGGGTCCACTGC CTTCCCCGACTTCACCAACCCACAGCCCTGGCCTGGTGGGAGG ACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTCGACGGCATG TGGATTGACATGAACGAGCCTTCCAACCTCATCAGGGGCTCTGA GGACGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGAGAACCCACCCTACGTGC CTGGGGTGGTTGGGGGGACCCTCCAGGCGGCCACCATCTGTGCC TCCAGCCACCAGTTTCTCTCCACACACTACAACCTGCACAACCTC TACGGCCTGACCGAAGCCATCGCCTCCCACAGGGCGCTGGTGAA GGCTCGGGGGACACGCCCATTTGTGATCTCCCGCTCGACCTTTGC TGGCCACGGCCGATACGCCGGCCACTGGACGGGGGACGTGTGGA GCTCCTGGGAGCAGCTCGCCTCCTCCGTGCCAGAAATCCTGCAGT TTAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTCGGGGCCGACGTCTGCGGCT TCCTGGGCAACACCTCAGAGGAGCTGTGTGTGCGCTGGACCCAG CTGGGGGCCTTCTACCCCTTCATGCGGAACCACAACAGCCTGCTC AGTCTGCCCCAGGAGCCGTACAGCTTCAGCGAGCCGGCCCAGCA GGCCATGAGGAAGGCCCTCACCTGCGCTACGCACTCCTCCCCC ACCTCTACACACTGTTCCACCAGGCCACGTCGCGGGGGAGACC GTGGCCCGGCCCTCTTCCTGGAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACC TGGACTGTGGACCACCAGCTCCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTCAT CACCCCAGTGCTCCAGGCCGGGAAGGCCGAAGTGACTGGCTACT TCCCCTTGGGCACATGGTACGACCTGCAGACGGTGCCAGTAGAG GCCCTTGGCAGCCTCCCACCCCCACCTGCAGCTCCCCGTGAGCCA GCCATCCACAGCGAGGGGGCAGTGGGTGACGCTGCCGGCCCCCT GGACACCATCAACGTCCACCTCCGGGCTGGGTACATCATCCCCCT GCAGGGCCCTGGCCTCACAAACCACAGAGTCCCGCCAGCAGCCCA TGCCCTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGTGGGGAGGCCCGAGGG	10 20 30 40
--	---

【 0 1 4 9 】

【表 6 2】

	GAGCTGTTCTGGGACGATGGAGAGAGCCTGGAAGTGCTGGAGCG AGGGGCCTACACACAGGTCATCTTCCTGGCCAGGAATAACACGA TCGTGAATGAGCTGGTACGTGTGACCAGTGAGGGAGCTGGCCTG CAGCTGCAGAAGGTGACTGTCCTGGGCGTGGCCACGGCGCCCCA GCAGGTCCTCTCCAACGGTGTCCCTGTCTCCAACCTTCACCTACAG CCCCGACACCAAGGTCCTGGACATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGG AGAGCAGTTTCTCGTCAGCTGGTGTTAG	
BiP-vIGF2- 22-2GS- GAA	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGCG GCGCGGGCCTCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACAC TCTTCAGTTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCTTCTCTCGCGG AGGTGGAGGTTCTAGGGGTATAGTAGAGGAGTGTTGTTTCAGGT CCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCA GGTCCGAAGGGGGCGGTGGCTCAGGTGGTGGAGGTAGCAGACC AGGGCCCCGGGATGCCCAGGCACACCCCGGCCGTCCCAGAGCAG TGCCACACAGTGCGACGTCCCCCAACAGCCGCTTCGATTGC GCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAACAGTGCGAGGCCCGCGG CTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGGCTGCAGGGAGCCCAGA TGGGGCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCACCCAGCTACCCAGCTACA AGCTGGAGAACCTGAGCTCCTCTGAAATGGGCTACACGGCCACC CTGACCCGTACCACCCCACTTCTTCCCAAGGACATCCTGACC CTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGAGAACCGCCTCCACTT CACGATCAAAGATCCAGCTAACAGGCGCTACGAGGTGCCCTTGG AGACCCCGCATGTCCACAGCCGGGCACCGTCCCCACTCTACAGC GTGGAGTTCTCCGAGGAGCCCTTCGGGGTGATCGTGCGCCGGCA GCTGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACACGACGGTGGCGCCCTGT TCTTTGCGGACCAGTTCCTTCAGCTGTCCACCTCGCTGCCCTCGC AGTATATCACAGGCCTCGCCGAGCACCTCAGTCCCCTGATGCTCA GCACCAGCTGGACCAGGATCACCTGTGGAACCGGGACCTTGCG CCCACGCCCCGGTGCGAACCTCTACGGGTCTCACCTTTCTACCTG GCGCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACACGGGGTGTTCTGCTAAA CAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGCAGCCGAGCCCTGCCCTTA GCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATGTCTACATCTTCCTG	204

10

20

30

40

【 0 1 5 0 】

【表 6 3】

[illegible]

【 0 1 5 1 】

【表 6 4】

	TCCACCTCCGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGCC TCACAACCACAGAGTCCCGCCAGCAGCCCATGGCCCTGGCTGTG GCCCTGACCAAGGGTGGGGAGGCCCCGAGGGGAGCTGTTCTGGGA CGATGGAGAGAGCCTGGAAGTGCTGGAGCGAGGGGCCTACACA CAGGTCATCTTCTGGCCAGGAATAACACGATCGTGAATGAGCT GGTACGTGTGACCAGTGAGGGAGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGG TGACTGTCCTGGGCGTGGCCACGGCGCCCCAGCAGGTCTCTCC AACGGTGTCCCTGTCTCCAACCTCACCTACAGCCCCGACACCAAG GTCCTGGACATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGGAGAGCAGTTTCTC GTCAGCTGGTGTTAG	
PPT1-3 (BiP-PPT1; コドン 最適化 IDT)	ATGAAACTGTCTCTGGTTGCAGCAATGCTCTTGCTGTTGAGTGCG GCCCCGCGCGGATCCACCTGCTCCCCTGCCCCCTCGTTATATGGCAT GGCATGGGAGATTCTGTTGTAATCCCCCTCAGCATGGGGGCCAT CAAAAAAATGGTGGAAAAAATAACCTGGCATATATGTACTCT CACTTGAAATCGGTAAGACCCTTATGGAAGACGTCGAAAATTCC TTCTTTTTGAACGTGAACTCACAAGTTACGACCGTCTGTCAAGCT CTCGCGAAAGACCCTAAGCTCCAGCAAGGTTATAATGCAATGGG CTTCTCACAGGGAGGTCAGTTCTTGCGAGCGGTAGCCCAGAGGT GTCCGTCTCCGCCAATGATCAACTTGATCTCAGTGGGGGGTCAGC ACCAAGGCGTTTTTGGACTCCCTAGATGCCCTGGAGAGAGCTCTC ACATTTGCGATTTTATACGGAAGACGCTGAATGCCGGCGCGTATT CAAAGGTCGTTCAAGAGCGACTCGTCCAGGCTGAATACTGGCAC GATCCGATTAAGGAAGACGTGTATCGAAACCATTCTATCTTTCTT GCCGACATTAACCAGGAGCGAGGGATCAACGAAAGTTATAAAA AAAACCTGATGGCACTCAAGAAATTTGTAATGGTTAAATTCCTG AACGATTCAATAGTTGATCCGGTGGATTCCGAGTGGTTCGGCTTC TACCGGTCCGGTCAGGCCAAGGAAACAATCCCATTGCAAGAAAC CAGTCTCTATACTCAGGACCGCCTGGGTCTGAAAGAAATGGACA ACGCTGGCCAACTTGTTTTTCTGGCAACGGAGGGTGATCACTTGC AGCTCTCTGAAGAATGGTTTTACGCACACATCATTCTTCCTTG GTAA	205
PPT1-4	ATGAAGTTGTCCCTCGTAGCTGCAATGTTGCTGCTCCTCAGTGCA	206

【 0 1 5 2 】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【 0 1 5 3 】

【表 6 6】

	CTTCAGCAAGGGTATAACGCTATGGGATTTAGCCAGGGCGGACA GTTCTGAGGGCGGTAGCACAGAGGTGTCTAGTCCACCAATGA TAAATCTCATCTCAGTCGGGGGCCAGCACCAGGGCGTCTTCGGG CTTCCTCGATGCCCCGGCGAATCCAGCCACATATGTGACTTCATT AGAAAACTTTGAATGCAGGGGCCTACAGTAAAGTGGTTCAAGA ACGCCTGGTACAAGCAGAGTATTGGCATGACCCGATTAAGGAAG ATGTCTACAGAAATCACTCTATTTTTTTGGCGGACATCAATCAGG AACGAGGCATTAACGAGTCTTACAAGAAGAACCTGATGGCGCTG AAAAAGTTTCGTCATGGTCAAGTTCTTGAATGACTCCATTGTCTGAT CCTGTAGACAGCGAGTGGTTTGGCTTCTACAGGTCTGGTCAAGC AAAGGAGACAATACCACTTCAGGAAACCAGTCTCTATACACAAG ACAGACTGGGTTTGAAGGAAATGGACAATGCAGGCCAACTGGTA TTCCTGGCTACAGAGGGAGATCATCTTCAACTGAGCGAAGAGTG GTTTTATGCCACATAATCCCCTTTCTGGGAAGACCTAGAGCAGT GCCTACGCAGGGTGGTGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTCCAGGA CTCTGTGTGGGGGCGAGCTGGTGGACACCTTGCAATTCGTGTGTG GCGACCGAGGATTTCTGTTTCAGTCGACCTGCCTCAAGAGTAAGC CGGAGGAGTCGGGGGATCGTTGAAGAATGCTGTTTCCGGAGCTG CGACTTGGCGTTGCTCGAGACTTATTGTGCCACACCTGCAAGGA GTGAGTGA	
PPT1-9 (wt- PPT1; 天然 ヒト配列)	ATGGCGTCGCCCCGGCTGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGACCCGCC GGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGATGGGAGACAGCT GTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAAAAAATGGTGGAG AAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTGGGAA GACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAATGTCA ATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACTTGCTAAGGATCCT AAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGGGAGG CCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCTCCCAT GATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTGTTTTTGG ACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGACTTCAT CCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAAAGTTGTTTCAGG	208

【 0 1 5 4】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【 0 1 5 5 】

【表 6 8】

	CGACCGAGGATTTCTGTTCAGTCGACCTGCCTCAAGAGTAAGCC GGAGGAGTCGGGGGATCGTTGAAGAATGCTGTTCCGGAGCTGC GACTTGCGTTCGCTCGAGACTTATTGTGCCACACCTGCAAGGAGT GAATGA	
PPT1-11 (BiP- PPT1_2; コドン 最適化 IDT)	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGCG GCGCGGGCCTCAAGAGCTCTTCAACATCTGGATCCCCCAGCTCCC CTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTCATGTTGTAA CCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAAGAAGA TTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGACACTGA TGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATAGTCAG GTCACTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAACTTCA GCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACAGTTTC TTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCCGATGATTAACC TTATATCTGTCGGGGGACAACACCAGGGTGTTTTTGGTCTTCCTC GCTGTCCTGGTGAAAGCTCCCACATCTGTGATTTTCATACGCAAAA CGTTGAACGCAGGAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAACGGCTT GTTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGACGTTTA TAGGAATCACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAACGCG GAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAAGAAA TTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCCTGTC GATTCAGAATGGTTCGGGTCTACAGGTCTGGCCAGGCGAAGGA GACTATTCCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGACAGACT CGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTTCTTGG CTACGGAAGGCGATCATCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGTTCTAT GCCCATATAATCCCGTTCCTGGGCTAA	210
PPT1-12 (BiPaa- PPT1_2; コドン 最適化 IDT)	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGCG GCGCGGGCCTCAAGAGCTCTTCAACATCTGGATCCCCCAGCTCCC CTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTCATGTTGTAA CCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAAGAAGA TTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGACACTGA TGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATAGTCAG GTCACTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAACTTCA	211

10

20

30

40

【 0 1 5 6 】

50

【表 6 9】

	GCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACAGTTTC TTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCCGATGATTAACC TTATATCTGTCTGGGGGACAACACCAGGGTGTTTTTGGTCTTCCTC GCTGTCTTGGTCAAAGCTCCACATCTGTGATTTTCATACGCAAAA CGTTGAACGCAGGAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAACGGCTT GTTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGACGTTTA TAGGAATCACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAACGCG GAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAAGAAA TTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCCTGTC GATTCAGAATGGTTCGGGTCTACAGGTCTGGCCAGGCGAAGGA GACTATTTCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGACAGACT CGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTTCTTGG CTACGGAAGGCGATCATCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGTTCTAT GCCCATATAATCCCGTTCCTGGGCTAA	
PPT1-13 (BiPaa- PPT1; コドン 最適化 IDT)	ATGAAACTGTCTCTGGTTGCAGCAATGCTCTTGCTGTTGAGTGCG GCCCCGCGCGGCGGCCGATCCACCTGCTCCCCTGCCCTCGTTATA TGGCATGGCATGGGAGATTCCCTGTTGTAATCCCCTCAGCATGGG GGCCATCAAAAAAATGGTGGAATAAATAACCTGGCATATATG TACTCTCACTTGAAATCGGTAAGACCCTTATGGAAGACGTCGAA AATTCCTTCTTTTTGAACGTGAACTCACAAGTTACGACCGTCTGT CAAGCTCTCGCGAAAGACCCTAAGCTCCAGCAAGGTTATAATGC AATGGGCTTCTCACAGGGAGGTCAGTTCTTGCGAGCGGTAGCCC AGAGGTGTCCGTCTCCGCCAATGATCAACTTGATCTCAGTGGGG GGTCAGCACCAAGGCGTTTTTGGACTCCCTAGATGCCCTGGAGA GAGCTCTCACATTTGCGATTTTATACGGAAGACGCTGAATGCCG GCGCGTATTCAAAGGTCGTTCAAGAGCGACTCGTCCAGGCTGAA TACTGGCACGATCCGATTAAGGAAGACGTGTATCGAAACCATTC TATCTTTCTTGCCGACATTAACCAGGAGCGAGGGATCAACGAAA GTTATAAAAAAACCTGATGGCACTCAAGAAATTTGTAATGGTT AAATTCCTGAACGATTCAATAGTTGATCCGGTGGATTCCGAGTG GTTCCGGCTTCTACCGGTCCGGTCAGGCCAAGGAAACAATCCCAT TGCAAGAAACCAGTCTCTATACTCAGGACCGCCTGGGTCTGAAA	212

【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 7 0】

	GAAATGGACAACGCTGGCCAACCTTGTTTTCTGGCAACGGAGGG TGATCACTTGCAGCTCTCTGAAGAATGGTTTTACGCACACATCAT TCCTTTCCTTGTTAA	
PPT1-14 (BiP1- vIGF2- PPT1; コドン 最適化 IDT)	ATGAAGCTCAGTCTCGTGGCAGCTATGCTCCTCCTGCTGTCCCTG GTTGCGGCAATGTTGCTCTTGCTGAGCGCCGCGAGAGCAAGTCG CACGTTGTGTGGAGGTGAACTCGTCGACACCCTTCAGTTCGTATG TGGAGATCGCGGTTTCCTCTTCTCACGCCCAGCTTCCAGAGTTTC CCGAAGATCACGAGGAATAGTTGAGGAGTGCTGTTTTCGGTCTT GTGATCTGGCTCTCCTCGAGACTTATTGTGCTACGCCGGCCCCGCT CTGAAGGAGGTGGTGGCAGTGAGGAGGAGGGAGTCGGCCTAG GGCAGTCCCAACCCAGGATCCCCCAGCACCCCTCCCCCTGGTAA TTTGGCATGGAATGGGTGATTCCTGCTGTAACCCACTCTCAATGG GGGCAATTAAGAAAATGGTAGAGAAAAAGATCCCTGGCATTAT GTTCTGTCACTCGAAATCGGTAAAACGCTCATGGAGGACGTAGA AAACAGCTTTTTTCTGAATGTAAATCACAGGTTACCACGGTCTG CCAAGCATTGGCAAAGGACCCGAAATTGCAACAAGGCTATAACG CGATGGGGTTCAGCCAAGGCGGGCAGTTTCTTCGAGCTGTGGCT CAGCGCTGCCCTTCCCCACCGATGATAAATTTGATTAGCGTAGGG GGACAACATCAAGGGGTTTTCGGTTTGCCAAGGTGTCCTGGCGA ATCTTCACATATTTGCGACTTTATACGGAAGACCTTGAATGCGGG GGCGTATAGTAAAGTCGTCCAGGAACGGCTTGTCCAAGCTGAAT ACTGGCACGATCCCATCAAAGAAGATGTCTATCGGAATCACAGC ATTTTTCTCGCCGACATAAACCAAGAACGCGGAATTAATGAGTC ATACAAGAAGAACTTGATGGCACTTAAAAAATTTGTGATGGTTA AGTTTTTGAATGATAGTATCGTAGATCCCGTAGATAGTGAATGGT TTGGTTTCTATCGATCCGGACAGGCTAAAGAAACGATACCATTG CAGGAAACCTCTTTGTATACTCAAGATAGGTTGGGCCTCAAGGA GATGGATAATGCGGGGCAACTTGTCTTCCTCGCGACTGAGGGTG ACCACCTCCAGCTCAGCGAGGAATGGTTTTACGCCACATCATTC CTTTCCTTGTTAA	213
PPT1-15 (BiP1aa-	ATGAAGCTCAGTCTCGTGGCAGCTATGCTCCTCCTGCTGTCCCTG GTTGCGGCAATGTTGCTCTTGCTGAGCGCCGCGAGAGCAGCAGC	214

【 0 1 5 8】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【 0 1 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 7 3】

	GCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGTACACACA GGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGACAGCTA GTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCTGAAGA ATGGTTTTATGCCCACATCATACCATTCCCTTGGATGA	
PPT1-18 (BiP2aa- PPT1; コドン 最適化 IDT)	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCTGGGTG GCACTGCTGCTGCTCAGCGCGGCGAGGGCCGCGCTCAAGAGC TCTTCAACATCTGGATCCCCCAGCTCCCCTGCCGCTCGTAATCTG GCACGGGATGGGGGATTGTTGTAACCCGTTGTCAATGGGCG CGATAAAAAAGATGGTTGAAAAGAAGATTCCAGGCATCTACGTT CTGTCCCTGGAAATCGGTAAGACACTGATGGAAGACGTGGAGAA CTCCTTCTTTCTCAACGTCAATAGTCAGGTCACTACCGTCTGTCA AGCATTGGCAAAGGACCCTAACTTCAGCAGGGGTACAATGCGA TGGGGTTTAGCCAGGGCGGACAGTTTCTTAGAGCCGTCGCACAG CGCTGTCCATCTCCCCCGATGATTAACCTTATATCTGTCTGGGGGA CAACACCAGGGTGTTTTTGGTCTTCCTCGCTGTCCTGGTGAAAGC TCCCACATCTGTGATTCATACGCAAAACGTTGAACGCAGGAGC TTATAGTAAAGTCGTCCAAGAACGGCTTGTTCAAGCGGAGTATT GGCATGACCCAATAAAAAGAAGACGTTTATAGGAATCACTCTATC TTCTTGGCCGATATCAACCAAGAACGCGGAATCAACGAAAGCTA CAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAAGAAATTTGTTATGGTGAAATT CCTTAATGACTCTATAGTAGATCCTGTGCTCAGATTCAGAATGGTTCGG GTTCTACAGGTCTGGCCAGGCGAAGGAGACTATTCCCCTCCAAG AAACGTCTCTCTATACACAAGACAGACTCGGACTGAAAGAGATG GATAATGCGGGCCAGTTGGTCTTCTTGGCTACGGAAGGCGATCA TCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGGTTCTATGCCCATATAATCCCGTT CCTGGGCTAA	217
PPT1-19 (GaussiaAA -PPT1_2; コドン 最適化 IDT)	ATGGGTGTAAAGGTGTTGTTTCGCTCTTATCTGCATTGCCGTTGCA GAAGCTGCCGCGTCAAGAGCTCTTCAACATCTGGATCCCCCAGC TCCCCTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTGTTG TAACCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAAGA AGATTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGACA CTGATGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATAGT	218

【 0 1 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 7 4】

	CAGGTCACCTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAACT TCAGCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACAGT TTCTTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCGATGATTA ACCTTATATCTGTCTGGGGGACAACACCAGGGTGTTCCTTGGTCTTC CTCGCTGTCCTGGTGAAAGCTCCCACATCTGTGATTCATACGCA AAACGTTGAACGCAGGAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAACGG CTTGTTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGACGT TTATAGGAATCACTCTATCTTCTTGCCGATATCAACCAAGAACG CGGAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAAGA AATTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCCTG TCGATTCAGAATGGTTCGGGTCTACAGGTCTGGCCAGGCGAAG GAGACTATTCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGACAG ACTCGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTTCT TGGCTACGGAAGGCGATCATCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGGTTC TATGCCCATATAATCCCGTTCCTGGGCTAA		10
PPT1-20 (GaussiaAA -vIGF2- PPT1; コドン 最適化 IDT)	ATGGGTGTAAAGGTGTTGTTCTGCTCTTATCTGCATTGCCGTTGCA GAAGCTGCAGCTAGTCGCACGTTGTGTGGAGGTGAACTCGTCGA CACCTTCAGTTTCGTATGTGGAGATCGCGGTTTCCTCTTCTCACG CCCAGCTTCCAGAGTTTCCCGAAGATCACGAGGAATAGTTGAGG AGTGCTGTTTTCTGGTCTTGTGATCTGGCTCTCCTCGAGACTTATTG TGCTACGCCGGCCCGCTCTGAAGGAGGTGGTGGCAGTGGAGGAG GAGGGAGTCGGCCTAGGGCAGTCCCAACCCAGGATCCCCCAGCA CCCCTCCCCCTGGTAATTTGGCATGGAATGGGTGATTCCTGCTGT AACCCACTCTCAATGGGGGCAATTAAGAAAATGGTAGAGAAAA AGATCCCTGGCATTTATGTTCTGTCACTCGAAATCGGTAAAACGC TCATGGAGGACGTAGAAAACAGCTTTTTTCTGAATGTTAATTAC AGGTTACCACGGTCTGCCAAGCATTGGCAAAGGACCCGAAATTG CAACAAGGCTATAACGCGATGGGGTTCAGCCAAGGCGGGCAGTT TCTTCGAGCTGTGGCTCAGCGCTGCCCTTCCCCACCGATGATAAA TTTGATTAGCGTAGGGGGACAACATCAAGGGGTTTTCGGTTTGCC AAGGTGTCCTGGCGAATCTTCACATATTTGCGACTTTATACGGAA GACCTTGAATGCGGGGGCGTATAGTAAAGTCGTCCAGGAACGGC	219	20

【0162】

【表 7 5】

	TTGTCCAAGCTGAATACTGGCACGATCCCATCAAAGAAGATGTC TATCGGAATCACAGCATTTTTCTCGCCGACATAAACCAAGAACG CGGAATTAATGAGTCATACAAGAAGAAGCTTGATGGCACTTAAAA AATTTGTGATGGTTAAGTTTTTGAATGATAGTATCGTAGATCCCG TAGATAGTGAATGGTTTGGTTTCTATCGATCCGGACAGGCTAAA GAAACGATACCATTGCAGGAAACCTCTTTGTATACTCAAGATAG GTTGGGCCTCAAGGAGATGGATAATGCGGGGCAACTTGTCTTCC TCGCGACTGAGGGTGACCACCTCCAGCTCAGCGAGGAATGGTTT TACGCCCACATCATTCCTTTCCTTGGTTAA	
PPT1-21 (ppt2ss- PPT1; コドン 最適化 IDT)	ATGCTGGGGCTCTGGGGGCAGCGCTCCCCGCGGCGTGGGTCCT GCTTCTGTTGCCTTTCCTGCCGCTGCTGCTGCTTGCAGATCCCCCA GCTCCCTGCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTTCATGT TGTAACCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAA GAAGATTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAATCGGTAAGA CACTGATGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATA GTCAGGTCACTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAA CTTCAGCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACA GTTTCTTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCGATGAT TAACCTTATATCTGTCGGGGGACAACACCAGGGTGTTTTTGGTCT TCCTCGCTGTCCTGGTGAAAGCTCCCACATCTGTGATTTTCATACG CAAAACGTTGAACGCAGGAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAAC GGCTTGTTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGAC GTTTATAGGAATCACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAA CGCGGAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAA GAAATTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCC TGTCGATTCAGAATGGTTCGGGTTCTACAGGTCTGGCCAGGCGA AGGAGACTATTCCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGAC AGACTCGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTT CTTGGCTACGGAAGGCGATCATCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGGT TCTATGCCCATATAATCCCGTTCCTGGGCTAA	220
PPT1-22 (ppt2ss-	ATGCTGGGGCTCTGGGGGCAGCGCTCCCCGCGGCGTGGGTCCT GCTTCTGTTGCCTTTCCTGCCGCTGCTGCTGCTTGCATCAAGAGC	221

【0 1 6 3】

10

20

30

40

50

PPT1_2; コドン 最適化 IDT)	TCTTCAACATCTGGATCCCCCAGCTCCCCCTGCCGCTCGTAATCTG GCACGGGATGGGGGATTCATGTTGTAACCCGTTGTCAATGGGCG CGATAAAAAAGATGGTTGAAAAGAAGATTCCAGGCATCTACGTT CTGTCCCTGGAAATCGGTAAGACACTGATGGAAGACGTGGAGAA CTCCTTCTTTCTCAACGTCAATAGTCAGGTCCTACCGTCTGTCA AGCATTGGCAAAGGACCCTAACTTCAGCAGGGGTACAATGCGA TGGGGTTTAGCCAGGGCGGACAGTTTCTTAGAGCCGTCGCACAG CGCTGTCCATCTCCCCCGATGATTAACCTTATATCTGTCGGGGGA CAACACCAGGGTGTTTTTGGTCTTCCTCGCTGTCCTGGTGAAAGC TCCCACATCTGTGATTTTCATACGCAAACGTTGAACGCAGGAGC TTATAGTAAAGTCGTCCAAGAACGGCTTGTTCAAGCGGAGTATT GGCATGACCCAATAAAAAGAAGACGTTTATAGGAATCACTCTATC TTCTTGGCCGATATCAACCAAGAACGCGGAATCAACGAAAGCTA CAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAAGAAATTTGTTATGGTGAAATT CCTTAATGACTCTATAGTAGATCCTGTGATTGAGAATGGTTCGG GTTCTACAGGTCTGGCCAGGCGAAGGAGACTATTCCCCTCCAAG AAACGTCTCTCTATACACAAGACAGACTCGGACTGAAAGAGATG GATAATGCGGGCCAGTTGGTCTTCTTGGCTACGGAAGGCGATCA TCTCCAACCTCTCCGAAGAGTG GTTCTATGCCCATATAATCCCGTT CCTGGGCTAA	
PPT1-23 (コンセンサS S-PPT1; コドン 最適化 IDT)	ATGGCAAGTCCCTTCCTGTCTTTGGCTGCTGGCTGTTGCCTTGCTTC CTTGGTCTTGTGCGGCGCGGGCACTCGGCCATTGGAACCCACCAG CCCCACTGCCCTTG GTTATATGGCATGGAATGGGAGATAGTTGCT GTAATCCACTGAGCATGGGAGCCATAAAGAAAATGGTTGAGAAA AAAATACCGGGAATATATGTTCTGAGCCTGGAGATAGGTAAGAC ACTCATGGAAGACGTTGAAAACCTATTTTTTTTGAACGTGAATAG TCAAGTCACAACGGTCTGTCAAGCTCTGGCTAAAGATCCTAAGTT GCAACAGGGTTACAATGCGATGGGATTTAGTCAAGGTGGACAGT TCCTGCGGGCCGTCGCACAGAGGTGCCCGAGTCCGCCAATGATA AATCTCATTTAGTAGGCGGACAACATCAGGGCGTGTTTCGGTCTT CCTCGCTGCCCGGGTGAGTCTTCTCACATTTGCGATTCATACGC AAAACACTTAACGCGGGGGGCTTACTCCAAGGTAGTTCAAGAAAG	222

40

50

【表 7 7】

	GCTCGTGCAGGCCGAATACTGGCATGATCCAATCAAAGAAGACG TCTATAGAAATCACTCTATATTCTTGGCCGACATCAACCAAGAGC GAGGTATAAATGAAAGTTACAAGAAAAACCTCATGGCTCTTAAA AAATTTGTTATGGTAAAATTTCTTAATGACTCTATCGTTGACCCG GTCGATAGTGAGTGGTTTGGGTTTTATAGGAGCGGACAGGCCAA AGAGACAATTCCGTTGCAGGAGACAAGTTTGTACACGCAGGATA GGCTTGGTCTTAAGGAGATGGACAACGCGGGCCAACTTGTATTT TTGGCTACTGAAGGTGATCACCTCCAATTGTCTGAAGAGTGGTTT TATGCGCATATTATTCCTTTCCTCGGCTAA	
PPT1-24 (コンセンサス- PPT1; コドン 最適化 IDT)	ATGGCAAGCCCTTCCTGCCTCTGGTTGCTTGCTTGTGCTTC CTTGGTCTTGTGCTGCAAGAGCACTTGGCCACCTTGATCCTCCTG CACCTCTCCCGCTCGTTATATGGCACGGCATGGGGGATAGCTGTT GTAATCCACTGTCAATGGGGGCTATTAAGAAAATGGTGGAGAAG AAAAATCCGGGAATTTATGTGCTCTCCCTGGAGATAGGCCAAAAC GCTTATGGAAGACGTGGAGAACAGTTTTTTTTCTTAACGTAAATTC ACAGGTTACCACCGTCTGTCAAATTTTGGCCAAAGATCCCAAAC GCAACAAGGGTATAACGCTATGGGCTTCAGTCAAGGGGGTCAAT TTTTGAGGGCGGTTGCGCAACGCTGCCCTAGTCCGCCCATGATAA ACTTGATCAGTGTTGGGGGACAGCACCAGGGAGTATTTGGTCTG CCGAGGTGTCCAGGCGAGTCTTCACACATCTGTGACTTTATTCGC AAGACCTTGAACGCGGGCGCTTATTCCAAGGCTGTGCAGGAAAG GCTTGTGCAAGCGGAATATTGGCACGATCCTATAAAGGAAGATG TGTATCGCAACCACTCTATCTTCCTGGCGGATATCAATCAAGAAC GAGGAGTCAATGAGTCCTACAAGAAAAATCTGATGGCGCTTAAA AAGTTCGTAATGGTCAAGTTCCTGAATGACAGCATAGTAGATCC GGTGGATTCTGAATGGTTCGGATTCTACCGGTCAGGACAGGCCA AGGAGACAATCCCCCTTCAAGAGACGACCCTGTACACACAAGAT AGATTGGGACTGAAAGAAATGGATAAGGCCGGTCAATTGGTCTT CTTGGCCACAGAAGGGGACCATCTCCAACCTGAGTGAAGAATGGT TTTATGCACATATAATTCCCTTCCTGGAGTAA	223
PPT1-25 (wt-PPT1)	ATGGCATCACCGGTTGCCTCTGGTTGTTGGCCGTTGCGTTGCTT CCGTGGACATGTGCATCAAGAGCTCTTCAACATCTGGATCCCCCA	224

【 0 1 6 5 】

10

20

30

40

50

L283C H300C; コドン 最適化 IDT)	GCTCCCCCTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTCATGT TGTAACCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAA GAAGATTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGA CACTGATGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATA GTCAGGTCACTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAA CTTCAGCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACA GTTTCTTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCCGATGAT TAACCTTATATCTGTCTGGGGGACAACACCAGGGTGTTTTTTGGTCT TCCTCGCTGTCCTGGTGAAAGCTCCACATCTGTGATTCATACG CAAAACGTTGAACGCAGGAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAAC GGCTTGTTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGAC GTTTATAGGAATCACTCTATCTTCTTGCCGATATCAACCAAGAA CGCGGAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAA GAAATTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCC TGTCGATTCAGAATGGTTCGGGTCTACAGGTCTGGCCAGGCGA AGGAGACTATTCCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGAC AGACTCGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTT CTGCGCTACGGAAGGCGATCATCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGGT TCTATGCCTGCATAATCCCGTTCCTGGGCTAA	
PPT1-26 (wt-PPT1 G113C L121C; コドン 最適化 IDT)	ATGGCATCACCGGGTTGCCTCTGGTTGTTGGCCGTTGCGTTGCTT CCGTGGACATGTGCATCAAGAGCTCTTCAACATCTGGATCCCCCA GCTCCCCTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTCATGT TGTAACCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAA GAAGATTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGA CACTGATGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATA GTCAGGTCACTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAA CTTCAGCAGGGGTACAATGCGATGTGCTTTAGCCAGGGCGGACA GTTTTGCAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCCGATGAT TAACCTTATATCTGTCTGGGGGACAACACCAGGGTGTTTTTTGGTCT TCCTCGCTGTCCTGGTGAAAGCTCCACATCTGTGATTCATACG CAAAACGTTGAACGCAGGAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAAC GGCTTGTTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGAC	225

20

30

40

【 0 1 6 6 】

【表 7 9】

	GTTTATAGGAATCACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAA CGCGGAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAA GAAATTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCC TGTCGATTCAGAATGGTTCGGGTCTACAGGTCTGGCCAGGCGA AGGAGACTATTCCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGAC AGACTCGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTT CTTGGCTACGGAAGGCGATCATCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGGT TCTATGCCCATATAATCCCGTTCCTGGGCTAA	
PPT1-27 (wt-PPT1 A171C A183C; コドン 最適化 IDT)	ATGGCATCACCGGGTTGCCTCTGGTTGTTGGCCGTTGCGTTGCTT CCGTGGACATGTGCATCAAGAGCTCTTCAACATCTGGATCCCCCA GCTCCCCTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTCAATGT TGTAACCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAA GAAGATTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGA CACTGATGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATA GTCAGGTCACCTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAA CTTCAGCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACA GTTTCTTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCCGATGAT TAACCTTATATCTGTCTGGGGGACAACACCAGGGTGTTTTTTGGTCT TCCTCGCTGTCCTGGTGAAAGCTCCCACATCTGTGATTTTCATACG CAAAACGTTGAACGCAGGATGCTATAGTAAAGTCGTCCAAGAAC GGCTTGTTCAATGCGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGAC GTTTATAGGAATCACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAA CGCGGAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAA GAAATTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCC TGTCGATTCAGAATGGTTCGGGTCTACAGGTCTGGCCAGGCGA AGGAGACTATTCCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGAC AGACTCGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTT CTTGGCTACGGAAGGCGATCATCTCCAACCTCTCCGAAGAGTGGT TCTATGCCCATATAATCCCGTTCCTGGGCTAA	226
PPT1-28 (BiP2aa- PPT1;	ATGAAACTTAGTCTCGTCGCAGCAATGTTGCTTCTCCTGTGGGTT GCCCTCCTGTTGCTCAGCGCAGCTAGGGCTGCTGCGTCTCGGGCG CTGCAGCATCTGGACCCGCCGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTG	227

【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

50

【表 80】

天然ヒト 配列)	GCATGGGATGGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAAGCATGGGTG CTATTAAAAAATGGTGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGTC TTATCTTTAGAGATTGGGAAGACCCTGATGGAGGACGTGGAGAA CAGCTTCTTCTTGAATGTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCA GGCACTTGCTAAGGATCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTA TGGGATTCTCCCAGGGAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAG AGATGCCCTTCACCTCCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGA CAACATCAAGGTGTTTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAG CTCTCACATCTGTGACTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGC GTACTCCAAAGTTGTTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATACT GGCATGACCCCATAAAGGAGGATGTGTATCGCAACCACAGCATC TTCTTGGCAGATATAAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTA CAAGAAAAACCTGATGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAAT TCCTCAATGATTCCATTGTGGACCCTGTAGATTCGGAGTGGTTTG GATTTTACAGAAGTGGCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAG GAGACCTCCCTGTACACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAAT GGACAATGCAGGACAGCTAGTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACC ATCTTCAGTTGTCTGAAGAATGGTTTTATGCCACATCATACCAT TCCTTGATGA	
PPT1-101	<u>ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCTGGGTG</u> <u>GCACTGCTGCTGCTCAGCGCGGGCAGGGCCGCCGCTCTAGAAC</u> ACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCAGTTCGTGTGTG GAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGTTCTAGG GGTATACTGGAGGAGTGTTGTTTCAGGGACTGTGACTTGGCGCTC CTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGGCAGGTCCGAAGGAGGTGG TGGCAGTGGAGGAGGAGGGAGTGGCCTAGGGCAGTCCCAACC CAGGACCCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGAT GGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTA AAATGGTGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTA GAGATTGGGAAGACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTT CTTGAATGTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACTTGC TAAGGATCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCT	228

【 0 1 6 8 】

10

20

30

40

【表 8 1】

	CCCAGGGAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCT TCACCTCCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAA GGTGTTTTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATC TGTGACTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAA AGTTGTTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACC CCATAAAGGAGGATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCA GATATAAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAA CCTGATGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATG ATTCCATTGTGGACCCTGTAGATTCGGAGTGGTTTGGATTTTACA GAAGTGGCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCC CTGTACACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGC AGGACAGCTAGTGTCTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGT TGTCTGAAGAATGGTTTTATGCCACATCATACCATTCCCTGGAT GA	
PPT1-31 (BiP1- vIGF2- PPT1; 天然ヒト 配列)	ATGAAGCTCAGTCTCGTGGCAGCTATGCTCCTCCTGCTGTCCCTG GTTGCGGCAATGTTGCTCTTGCTGAGCGCCGCGAGAGCAAGTCG CACGTTGTGTGGAGGTGAACTCGTCGACACCCTTCAGTTCGTATG TGGAGATCGCGGTTTCCTCTTCTCACGCCCAGCTTCCAGAGTTTC CCGAAGATCACGAGGAATAGTTGAGGAGTGCTGTTTTTCGGTCTT GTGATCTGGCTCTCCTCGAGACTTATTGTGCTACGCCGGCCCGCT CTGAAGGAGGTGGTGGCAGTGGAGGAGGAGGGAGTCGGCCTAG GGCAGTCCCAACCCAGGACCCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGA TCTGGCATGGGATGGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATG GGTGCTATTAAAAAATGGTGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTA CGTCTTATCTTTAGAGATTGGGAAGACCCTGATGGAGGACGTGG AGAACAGCTTCTTCTTGAATGTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGT GTCAGGCACTTGCTAAGGATCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAAT GCTATGGGATTCTCCCAGGGAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGC TCAGAGATGCCCTTACCTCCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGG GGGACAACATCAAGGTGTTTTTGGACTCCCTCGATGCCAGGAG AGAGCTCTCACATCTGTGACTTCATCCGAAAAACACTGAATGCT	229

【 0 1 6 9 】

【表 8 2】

	GGGGCGTACTCCAAAGTTGTTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGA ATACTGGCATGACCCCATAAAGGAGGATGTGTATCGCAACCACA GCATCTTCTTGGCAGATATAAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAG TCCTACAAGAAAAACCTGATGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGT GAAATTCCTCAATGATTCCATTGTGGACCCTGTAGATTCGGAGTG GTTTGGATTTTACAGAAGTGGCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCT TACAGGAGACCTCCCTGTACACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAG GAAATGGACAATGCAGGACAGCTAGTGTTTCTGGCTACAGAAGG GGACCATCTTCAGTTGTCTGAAGAATGGTTTTATGCCACATCAT ACCATTCCTTGGATGA	
PPT1-32 (wt-PPT1- vIGF2-32; 天然ヒト 配列)	ATGGCGTCGCCCCGGCTGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGACCCGCC GGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGATGGGAGACAGCT GTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAAAAAAATGGTGGAG AAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTGGGAA GACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAATGTCA ATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACTTGCTAAGGATCCT AAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGGGAGG CCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCTCCCAT GATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTGTTTTTGG ACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGACTTCAT CCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAAAGTTGTTTCAGG AACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACCCCATAAAGGAG GATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCAGATATAAATCA GGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGATGGCCC TGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGATTCCATTGTGG ACCCTGTAGATTCGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAAGTGGCCAA GCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGTACACACA GGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGACAGCTA GTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCTGAAGA ATGGTTTTATGCCACATCATACCATTCTTGAAGACCTAGAGC AGTGCCTACGCAGGGAGGGAGTGGGAGTGGATCCACTTCATCCT	230

10

20

30

40

【0 1 7 0】

50

【表 8 3】

	CTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCAGTTC GTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGT TCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTTGTTTCAGGGAGTGTGACTT GGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAAT GA	
PPT1-33 (wt-PPT1- vIGF2-8Q; 天然ヒト 配列)	ATGGCGTCGCCCCGGCTGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGACCCGCC GGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGATGGGAGACAGCT GTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAAAAAAATGGTGGAG AAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTGGGAA GACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAATGTCA ATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAAGGCACTTGCTAAGGATCCT AAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGGGAGG CCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCTCCCAT GATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTGTTTTTGG ACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGACTTCAT CCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAAAGTTGTTTCAGG AACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACCCCATAAAGGAG GATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCAGATATAAATCA GGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGATGGCCC TGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGATTCCATTGTGG ACCCTGTAGATTTCGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAAGTGGCCAA GCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGTACACACA GGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGACAGCTA GTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCTGAAGA ATGGTTTTATGCCACATCATAACCATTCCTTGGAAGACCTAGAGC AGTGCCTACGCAGGGAGGGAGTGGGAGTGGATCCACTTCATCCT CTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCAGTTC GTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGA GTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGGAGTGTTGTTTCAG GGAGTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAG CCAGGTCCGAATGA	231

10

20

30

40

【 0 1 7 1 】

50

【表 8 4】

PPT1-34 (wt-PPT1- vIGF2-8Q; コドン 最適化 GENEius)	ATGGCCTCCCCAGGCTGCTTATGGTTGCTGGCCGTAGCACTTTTA CCATGGACATGTGCTAGTCGAGCTTTACAACACTTAGACCCGCC AGCGCCTCTTCCTTTAGTTATCTGGCACGGCATGGGCGACTCGTG TTGTAACCCGCTCAGTATGGGTGCCATAAAGAAGATGGTGGAGA AGAAAATTCCCGGAATCTATGTGCTTAGCCTCGAAATCGGCAAA ACACTTATGGAGGACGTAGAGAACTCATTCTTCCTGAATGTAAA TAGCCAAGTCACCACGGTATGTCAAGCTCTAGCGAAGGACCCTA AACTCCAGCAGGGGTATAACGCAATGGGATTTTCTCAGGGCGGC CAGTTTCTGCGTGCTGTGCGACAGCGTTGCCCTTCTCCGCCTATG ATAAACTTAATTTCCGTAGGAGGGCAACACCAAGGGGTATTTCGG CTTACCGAGGTGTCCAGGCGAATCTTCACATATATGCGACTTCAT CCGAAAGACCCCTTAATGCCGGGGCCTATTCCAAGGTGGTACAGG AACGGTTGGTGCAAGCTGAGTATTGGCACGACCCTATAAAGGAA GATGTGTATCGGAATCACTCAATCTTTCTTGCGGATATAAATCAA GAGCGCGGCATTAACGAGAGCTACAAGAAGAACCTCATGGCTCT TAAGAAATTCGTCATGGTCAAATTCCTCAACGACAGTATAGTTG ATCCCGTCGATTCCGAGTGGTTTGGATTCTACCGCTCTGGGCAAG CCAAAGAGACCATAACCACTACAGGAAACATCGCTATATACCCAA GATCGCTTGGGTTTGAAAGAAATGGATAACGCCGGTCAGCTTGT GTTCTTAGCGACAGAGGGTGATCATCTCCAGCTGTCGGAAGAAT GGTTCTATGCCCACATAATACCTTTCCTTGACGACCCCGTGCGG TCCCAACGCAGGGTGGATCAGGTAGCGGCTCAACTAGTTCAGC CGTACGTTGTGCGGCGGAGAACTAGTAGACACTCTTCAATTCGTT TGTGGGGATCGGGGCTTCCTCTTCAGCAGGCCAGCGTCACGCGT GTCGCGTCGGAGCCGAGGTATAGTGGAAGAATGCTGCTTCCGCG AATGTGATCTAGCACTCCTTGAAACCTACTGCGCGACGCCTGCCC GAAGTGAATGA	232
PPT1-35 (wt-PPT1- vIGF2-8Q; コドン 最適化)	ATGGCTTCCCCTGGCTGCCTGTGGCTGCTCGCTGTGGCCCTCCTG CCCTGGACCTGTGCTTCTCGGGCCCTTCAGCATCTGGACCCTCCA GCCCCCTCCCCTTGGTCATCTGGCACGGCATGGGCGACAGCTGC TGCAACCCTCTGTCCATGGGGGCCATCAAGAAAATGGTTGAGAA GAAGATCCCAGGCATCTACGTGCTGAGCCTGGAAATTGGCAAGA	233

【 0 1 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 8 5】

COOL)	CACTGATGGAGGATGTGGAAAACAGCTTCTTCCTGAATGTGAAC TCCCAGGTGACCACCGTGTGCCAGGCTCTGGCCAAAGATCCCAA GCTGCAGCAGGGCTACAATGCCATGGGATTCAGCCAGGGGGGCC AGTTTCTGCGGGCTGTTGCCAGAGGTGCCCCAGCCCCCCCATGA TCAATCTCATCTCTGTGGGCGGGCAGCACCAAGGGTGTGTTTGGCC TGCCTCGCTGCCCTGGAGAAAGCAGCCACATTTGTGATTTCATCA GGAAGACCTTAAATGCTGGAGCCTACAGCAAGGTGGTCCAGGAA AGGCTGGTGCAGGCAGAGTACTGGCATGACCCCATCAAAGAGGA CGTGTACAGAAACCACAGCATCTTCCTGGCTGACATCAACCAGG AGAGAGGAATTAATGAGAGCTACAAGAAGAACCTCATGGCCTTG AAAAAGTTTGTGATGGTGAAGTTCTTGAATGACTCCATCGTGGAT CCTGTGGACAGTGAATGGTTTGGGTTCTACCGCTCTGGACAGGCC AAGGAAACCATCCCCCTGCAAGAAACATCCCTGTACACCCAGGA CCGCCTGGGGCTGAAGGAGATGGACAACGCCGGCCAACTGGTCT TCCTTGCCACAGAAGGAGACCACCTGCAGCTGTCTGAGGAGTGG TTCTATGCCACATCATCCCCTTCCTGGGCCGGCCAGGGCCGTG CCCACACAGGGAGGCAGTGGCAGCGGCTCCACCAGCTCCAGCAG GACCCTGTGTGGCGGCGAGCTGGTTGACACCCTCCAGTTCGTGTG TGGGGACAGAGGCTTCCTCTTCTCCAGGCCCGCCAGCCGGGTGA GCCGCCGCTCCCGGGGCATTGTGGAGGAATGTTGCTTCCGGGAG TGTGACCTGGCCCTGCTGGAGACCTACTGTGCCACCCCTGCCCGG AGTGAGTGA	
PPT1-101 (シグナル ペプチドを コードする 配列に 下線)	<u>ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCTGGGTG</u> <u>GCACTGCTGCTGCTCAGCGCGGCGAGGGCCCGCGTCTAGAAC</u> ACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCAGTTCGTGTGTG GAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGTTCTAGG GGTATACTGGAGGAGTGTTGTTTCAGGGACTGTGACTTGCGCTC CTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAAGGAGGTGG TGGCAGTGGAGGAGGAGGGAGTCGGCCTAGGGCAGTCCCAACC CAGGACCCGCCGCGCGCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGAT GGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAAAA AAATGGTGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTA	234

【0 1 7 3】

10

20

30

40

50

【表 8 6】

	GAGATTGGGAAGACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTT CTTGAATGTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACTTGC TAAGGATCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCT CCCAGGGAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCT TCACCTCCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAA GGTGTTTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATC TGTGACTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAA AGTTGTTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACC CCATAAAGGAGGATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCA GATATAAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAA CCTGATGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATG ATTCCATTGTGGACCCTGTAGATTCGGAGTGGTTTGGATTTTACA GAAGTGGCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCC CTGTACACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGC AGGACAGCTAGTGTCTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGT TGTCTGAAGAATGGTTTTATGCCCACATCATACCATTCCCTGGAT GA	
PPT1-104 (シグナル ペプチドを コードする 配列に 下線)	<u>ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCTCTG</u> <u>CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGACCCGCC</u> GGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGATGGGAGACAGCT GTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAAAAAAATGGTGGAG AAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTGGGAA GACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAATGTCA ATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACTTGCTAAGGATCCT AAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGGGAGG CCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCTCCCAT GATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTGTTTTTGG ACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGACTTCAT CCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAAAGTTGTTTCAGG AACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACCCCATAAAGGAG GATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCAGATATAAATCA	235

【0 1 7 4】

10

20

30

40

50

【表 8 7】

	GGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGATGGCCC TGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGATTCCATTGTGG ACCCTGTAGATTTCGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAAGTGGCCAA GCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGTACACACA GGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGACAGCTA GTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCTGAAGA ATGGTTTTATGCCCACATCATACCATTCCTTGGAAGACCTAGAGC AGTGCCTACGCAGGGAGGGAGTGGGAGTGGATCCACTTCATCCT CTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCAGTTC GTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGT TCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTGTTTTCAGGGAGTGTGACTT GGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAAT GA	
PPT-112 (シグナル ペプチドを コードする 配列に 下線)	<u>ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG</u> <u>CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGCCGCGTCT</u> AGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCAGTTCGT GTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCGGAGGTGGAGGTTC TAGGGGTATACTGGAGGAGTGTGTTTTCAGGGACTGTGACTTGG CGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAAGGA GGTGGTGGCAGTGGAGGAGGAGGGAGTCCGGCCTAGGGCAGTCC CAACCCAGGACCCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCAT GGGATGGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTAT TAAAAAAATGGTGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTAT CTTTAGAGATTGGGAAGACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGC TTCTTCTTGAATGTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCA CTTGCTAAGGATCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGG ATTCTCCCAGGGAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGAT GCCCTTCACCTCCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAAC ATCAAGGTGTTTTTGGACTCCCTCGATGCCAGGAGAGAGCTCTC ACATCTGTGACTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTAC TCCAAAGTTGTTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCA	236

【0 1 7 5】

10

20

30

40

50

【表 8 9】

	TTACAGAAGTGGCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGA CCTCCCTGTACACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGAC AATGCAGGACAGCTAGTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCT TCAGTTGTCTGAAGAATGGTTTTATGCCACATCATACCATTTCCT TGGATGA	
PPT1-115 (シグナル ペプチドを コードする 配列に 下線)	<u>ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG</u> <u>CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGCTGCCGAC</u> CCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGATGGGAGA CAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAATAAATGG TGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTG GGAAGACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAAT GTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACCTTGCTAAGGA TCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGG GAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCT CCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTGT TTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGA CTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAAAGTTG TTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACCCCAT AAGGAGGATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCAGATAT AAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGA TGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGATTCCA TTGTGGACCCTGTAGATTCTGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAAGTG GCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGTAC ACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGAC AGCTAGTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCTG AAGAATGGTTTTATGCCACATCATACCATTCCCTTGGAAGACCTA GAGCAGTGCCTACGCAGGGAGGGAGTGGGAGTGGATCCACTTCA TCCTCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCA GTTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCTCTTCTCTCGCGGAGGTGG AGGTTCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTTGTTTCAGGGAGTGTG ACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCC	238

10

20

30

40

【 0 1 7 7 】

【表 90】

	GAATGA	
PPT-116 (シグナル ペプチドを コードする 配列に 下線)	<u>ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG</u> <u>CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGCTGCCGAC</u> CCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGATGGGAGA CAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAATAAATGG TGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTG GGAAGACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAAT GTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACCTGCTAAGGA TCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGG GAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCT CCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTGT TTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGA CTTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAAAGTTG TTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACCCCAT AAGGAGGATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCAGATAT AAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGA TGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGATTCCA TTGTGGACCCTGTAGATTCGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAAGTG GCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGTAC ACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGAC AGCTAGTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCTG AAGAATGGTTTTATGCCACATCATACCATTCCTTGGAAGACCTA GAGCAGTGCCTACGCAGGGAGGGGGTGGCAGTGGCAGTGGAGG CGGCGGTTCTCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACA CTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCG GAGGTGGAGGTTCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTTGTTTCAGG GAGTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGC CAGGTCCGAATGA	239
PPT1-117 (シグナル	<u>ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG</u> <u>CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGACCCGCC</u>	240

【0178】

10

20

30

40

50

ペプチドを コードする 配列に 下線)	GGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGATGGGAGACAGCT GTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAATAAATGGTGGAG AAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTGGGAA GACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAATGTCA ATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACTTGCTAAGGATCCT AAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGGGAGG CCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCTCCCAT GATCAATCTGATCTCGGTTGGGGACAACATCAAGGTGTTTTTGG ACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGACTTCAT CCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAAAGTTGTTTCAGG AACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACCCCATAAAGGAG GATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCAGATATAAATCA GGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGATGGCCC TGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGATTCCATTGTGG ACCCGTGATGATTCGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAAGTGGCCAA GCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGTACACACA GGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGACAGCTA GTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCTGAAGA ATGGTTTATGCCACATCATACCATTCCCTTGAAGACCTAGAGC AGTGCCTACGCAGGGAGGGGGTGGCAGTGGCAGTGGAGGCGGC GGTTCCTCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCT TCAGTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCGGAGG TGGAGGTTCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTGTTTTCAGGGAGT GTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGG TCCGAATGA	
PPT-118 (シグナル ペプチドを コードする 配列に 下線)	<u>ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG</u> <u>CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGCTGCCGAC</u> CCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGATGGGAGA CAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTATTAATAAATGG TGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTG GGAAGACCTGATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAAT	241

40

50

【表 9 2】

	GTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACTTGCTAAGGA TCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGG GAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCT CCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTGT TTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGA CTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCCAAAGTTG TTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGACCCCAT AAGGAGGATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCAGATAT AAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGA TGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGATTCCA TTGTGGACCCTGTAGATTTCGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAAGTG GCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGTAC ACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGAC AGCTAGTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCTG AAGAATGGTTTTATGCCACATCATAACCATTCCTTGGAAGACCTA GAGCAGTGCCTACGCAGGGAGGGGGTGGCAGTGGAGGCGGCGG TTCCTCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCA GTTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCGGAGGTGG AGGTTCTAGGGGTATACTGGAGGAGTGTGTTTTCAGGGAGTGTG ACTTGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCC GAATGA		10
BiP2AA	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTGCTGGGTG GCACTGCTGCTGCTCAGCGCGGCGAGGGCCGCCGCG	242	30
eSP C6S	ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTG	243	
eSP C6S (PPT1-112 及びPPT1- 114に用いた)	ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGCCGCG	244	40

【 0 1 8 0 】

【表 9 3】

eSP C6S AA (PPT1- 115, PPT1- 116, 及び PPT1-118に 用いた) – AA部分に ついて, 異なるコドン 使用	ATGGCGTCGCCCCGGCAGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTCCTG CCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGGCTGCC	245
WT NAGLU- HPC4 (HPC4を コードする 配列は 大文字)	ATGgaggccgtggccgtggccgcccgtgggcgtgctgctgctggccggcggcgccgccc ggcgacgaggccccgggaggccgcccgtgcgggcccgtggggcccggtgctggggccccggcccc ggcgccgacttcagcgttagcgtggagcgggcccgtggccgccaagcccgccctggacacctacagcctg ggcgggcgccggcgccgcccgggtgcgggtgcggggcagcaccggcggtggccggccgcccggcctg caccgggtatctcggggacttctcgggctgccacgtggcctggagcggcagccagctgcggctgccccgg cccctgcccggcgtggccggcgagctgaccgagggccaccccaaccggatcggtactaccagaacgtg tgcaccagagctacagcttcgtgtggtgggactgggcccgggtgggagcgggagatcgactggatggcc ctgaacggcatcaacctggccctggcctggagcggccaggaggccatctggcagcgggtgtacctggcc ctgggctgacctaggccgagatcaacgagttcttcaccggccccgccttcctggcctggggccggatgg gcaacctgcacacctgggacggccccctgctccaagctggcacatcaagcagctgtacctgcagcaccg ggtgtggaccagatgcggagcttcggcatgacccccgtgctcccgccttcgccggccacgtcccag ggcgtgacccgggtgttccccaagttaacctgaccaagatgggcagctggggccacttcaactgcagcta cagctgcagcttctgctggccccgaggaccccatcttcccatcatcggcagcctgttctcgggagct gatcaaggagtgcggcaccgaccacatctacggcgccgacaccttcaacgagatgcagcctccaagcagc gagcccagctacctggccggccaccaccgcccgtgtacgaggccatgaccgcccgtggacaccgaggc cgtgtggctgctgcaggcgtggctgttcagcaccagccccagttctggggacctgcccagatccgggcc gtgctggcgccgtgcctagaggacggctgctggtgctggacctgttcgccgagagccagcccgtgtaca cccgaccggcagcttcaggggcagccctcatctggtgatgctgcacaacttcggcggaaccacgg cctgttcggcgccctggaggccgtgaacggcgggccccgaggccggcggtgttcccaacagcaccat ggtgggcaccggcatggccccgaggggcatcagccagaacgaggtggtgtacagcctgatggccgagc	246

10

20

30

40

【 0 1 8 1】

50

【表 9 4】

	tgggctggcggaaggaccccggtgcccacgtgcccgcctgggtgaccagcttcgccgcccggcggtac ggcgtgagccaccccgacgcccggcgccgcctggcggtgctgctgcggagcgtgtacaactgcagcgg cgaggcctgccggggccacaaccggagccccctggtgcccggcgccagcctgcagatgaacaccagc atctggtacaaccggagcgacgtgttcgaggcctggcggtgctgctgaccagcggccccagcctggcca ccagccccgccttcagatacagcctgctggacctgacctggcaggccgtgcaggagctggtgagcctgta ctacgaggaggcccgagcgccctacctgagcaaggagctggccagcctgctgcggcgccggcggtgc tggcctacgagctgctgcccgcctggacgaggtgctggccagcgacagccgggtcctgctgggcagctg gctggagcaggcccgccggcgcccggtgagcgaggccgaggccgacttctacgagcagaacagccgg tatcagctgacctgtggggacctgagggcaacatcctggactacccaacaagcagctggccggcctgg tggccaactactacaccaagggtggcggtgttctggaggccctggtggacagcgtggccaggggcat ccccttcagcagcaccagttcgacaagaacgtgtccagctggagcaggccctgctgctgagcaagcagc ggtatccagccagcctagaggagacaccgtggacctggccaagaagatcttctgaagtactacccccg gtgggtggccggcagctggggaCTTGAGGTACTGTTCCAAGGGCCCCGAGGAC CAGGTAGACCCACGACTCATTGATGGAAAATAG		10
vIGF2- NAGLU- HPC4	ATGGAGGCTGTGGCTGTGGCAGCTGCGGTGGGGGTCTTCTCCT GGCCGGGGCCGGGGGCGCGGCAGGCGACGcTTCTAGGACGTTGT GTGGTGGGGAAC TTGTCGACACACTGCAGTTTGTCTGCGGCGAC CGAGGATTTCTTTTTTCCAGGCCTGCCTCAAGAGTATCTAGGAGG TCCCGCGGTATTGTTGAAGAGTGCTGTTTTAGGTCATGCGACCTT GCGTTGTTGGAGACATATTGTGCTACCCCTGCACGCTCTGAAGGT GGAGGTGGTTTCAGGTGGTGGAGGTTCCAGGCCAAGGGCGGTCCC TACTCAGGCCgaggcccgaggcccgcccgctgcccggccctggtggcccggtgctgggccc ccggcccccgccgacttcagcgttagcgtggagcgggcccctggccgccaagccggcctggacacct acagcctggcggcggcgccgcccgggtgcccgtgcccggcagcaccggcgtggccggcgccg ccggcctgcaccggtatctgcccgttctgcccgtgccacgtggcctggagcggcagccagctgcccgt gccccggccccgcccggcgtgcccggcgagctgaccgagggcaccaccaaccggatcgttactacca gaacgtgtgacccagagctacagcttcgtgtgtgggactgggcccgggtgggagcgggagatcagctg gatggccctgaacggcatcaacctggccctggcctggagcggccaggaggccatctggcagcgggtgta cctggccctgggctgaccaggccgagatcaacagttcttcaccggccccgccttcctggcctggggc cggatgggcaacctgcacacctgggacggccccctgcctccaagctggcacatcaagcagctgtacctgc agcaccgggtgctggaccagatgcggagcttcggcatgacccccgtgctgcccgccttcggcgccacgt	247	20

【 0 1 8 2 】

【表 9 5】

	gcccgaggccgtgacccgggtgttcccccaagttaacgtgaccaagatgggcagctggggccacttcaac tgacgtacagctgcagcttctgctggtccccgaggacccatcttccccatcatcggcagcctgttctg cgggagctgatcaaggagttcggcaccgaccacatctacggcgccgacacittcaacgagatgcagcctc caagcagcagagccagctacctggccgccgaccaccgctgtacgagggcatgaccgccgtggac accgaggccgtgtgctgctgcaggctggctgttcagcaccagccccagttctggggacgtgccaga tccggggcgtgctggcgccgtgcctagaggacggctgctggtgctggacctgttcgccgagagccagc ccgtgtacaccggaccgccagcttcagggccagcccttcatctggtgcatgtgcacaacttcggcggc aaccacggcctgttcggcgccctggaggccgtgaacggcggccccgaggccgcccggtgttccccaac agcaccatggtgggcaccggcatggccccgaggccatcagccagaacagggtggtgtacagcctgatg gccgagctgggtggcggaaggaccccggtccccacctggcgccctgggtgaccagcttcgccggccg gcggtacggcgtgagccacccgacggcgccgctggcggtgctgctgcggagcgtgtacaact gcagcggcgagcctgccggggccacaaccggagccccctggtgcggcgccagcctgcagatgaa caccagcatctgttacaaccggagcgacgtgttcgagcctggcggtgctgctgaccagcgccccag cctggccaccagccccgcttcagatacagctgctggacctgacctggcagggcgtgcaggagctggt gagcctgtactacgaggagggcgagcgctacctgagcaaggagctggccagcctgctgcggggcg gcggcgtgctggcctacgagctgctggccgctggacgaggtgctggccagcgacagccggttctgct gggcagctggtgagcagggccggcgccgctgagcgaggccgagggcgacttctacgagcag aacagccggtatcagctgacctgtggggacctgagggcaacatcctggactacgccaacaagcagctgg ccggcctggtggccaactactacaccccaaggtggcgctgttctggaggccctggtggacagcgtggc ccagggcaccccttcagcagcaccagttcgacaagaacgtgttcagctggagcagcccttcgtgctga gcaagcagcgggtatccagccagcctagaggagacaccgtggacctggccaagaagatcttctgaagta ctacccccggtgggtggcggcagctggggaCTTGAGGTACTGTTCCAAGGGCCC GAGGACCAGGTAGACCCACGACTCATTGATGGAAAATAG	
vIGF2-17- NAGLU- HPC4	ATGGAGGCTGTGGCTGTGGCAGCTGCGGTGGGGGTCTTCTCCT GGCCGGGGCCGGGGGCGCGGCAGGCGACGcTagcagaacactttgtggcgga gagctggtggacacctgcagtttgtgtgtggcgacagaggcttctgttcagcagacctgcatccagagt agcaggcgggtccagaggaatcgtggaagagtgtgttcagaGAAtgcgatctggccctgctggaaac ctactgtgccacaccagccagatctgaaGGTGGAGGTGGTTCAGGTGGTGGAGGT TCCAGGCCAAGGGCGGTCCCTACTCAGGCCgaggccccggaggccggccg gtgcggggcctggtggccggctgctggggccccggccccggcgccgacttcagcgttagcgtggagcgg gccctggccgccaagccggcctggacacctacagcctggcgggcgggcgccgccccgggtgcggg	248

【 0 1 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 9 6】

tgcggggcagcaccggcgtggccgccgccggcctgcaccggatctgcgggacttctgcggctgcc acgtggcctggagcggcagccagctgcggctgccccggcccctgcccgcctgcccggcagctgacc gagggcaccaccaaccggtatcggtactaccagaacgtgtgcaccagagctacagcttcgtgtgtggg actggggcccggtgggagcgggagatcgactggatggccctgaacggcatcaacctggccctggcctgga gcggccagggagccatctggcagcgggtgtacctggccctggcctgaccagggcgagatcaacgagt tcttcaccggccccgccttctggcctggggccggatgggcaacctgcacacctgggacggccccctgcc tccaagctggcacatcaagcagctgtacctgcagcaccgggtgctggaccagatgcggagcttcggcatg acccccgtgctccccgccttcgccggccacgtgcccagggcgtgacccgggtgtcccccaagtaacg tgaccaagatgggcagctggggccacttcaactgcagctacagctgcagcttctgctggccccgagga ccccatctccccatcatcggcagcctgttctgcgggagctgatcaaggagtgcggcaccgaccacatcta cgggcccgacaccttcaacgagatgcagcctccaagcagcagcccagctacctggccgccgccaccac cgccgtgtacgagggcatgaccgccgtggacaccgagggcctgtgtgctgctgcagggctggctgttccag caccagccccagttctggggacctgcccagatccggccgtgctggcgccgtgcctagaggacggctg ctggtgctggacctgttcgccgagagccagcccgtgtacacccggaccgccagcttccaggccagccct tcatctggtgcatgctgcacaacttcggcggaaccacggcctgttcggcgccctggaggccgtgaacgg cggccccgagggcccccggctgttccccaacgacccatggtgggcaccggcatgcccccgagggca tcagccagaacgaggtggtgtacagcctgatggccgagctgggctggcggaaggaccccgtgcccgacc tgccgcctgggtgaccagcttcgccccccggcggtacggcgtgagccacccgacggccggcggcc tgggcgctgctgctgcggagcgtgtacaactgcagcggcgagggcctgccggggccacaaccggagccc cctggtgcggggccccagcctgcagatgaacaccagcatctgttacaaccggagcgacgtgttcgaggc ctggcggtgctgctgaccagcggccccagcctggccaccagccccgccttcagatacgacctgctggac ctgacccggcagggcgtgcaggagctggtgagcctgtactacgaggagggcccgagcgccctacctgagc aaggagctggccagcctgctgcggcgccggcggtgctggcctacgagctgctgcccgcctggacga ggtgctggccagcgacagccgggtcctgctgggcagctggctggagcagggccggccggccgctga gcgaggccgagggcacttctacgagcagaacagccggatcagctgacctgtggggacctgagggca acatcttgactacgccaacaagcagctggccggcctggtggccaactactacacccaagtgcgggct gttcttgaggccctggtggacagcgtggccagggcatccccctccagcagcaccagttcgacaagaac gtgttccagctggagcagggccttcgtgctgagcaagcagcggtatcccagccagcctagaggagacaccg tggacctggccaagaagatctctgaagtactacccccgggtgggtggccggcagctggggaCTTGA GGTACTGTTCCAAGGGCCCGAGGACCAGGTAGACCCACGACTCA TTGATGGAAAATAG	10 20 30 40
--	---

【0184】

【表 9 7】

vIGF2-31- NAGLU- HPC4	ATGGAGGCTGTGGCTGTGGCAGCTGCGGTGGGGTCTTCTCCT GGCCGGGGCCGGGGGCGCGGCAGGCGACGcTagcagaacactttgtggcga gagctggtggacacctgcagtttgtgtggcgacagaggcttctgttcagcagaGGTGGAGGT GGAtctagaggaatcCTGgaagagtgtgttcagaGATtgcgatctggccctgttgaaacctact gtgccacaccagccagatctgaaGGTGGAGGTGGTTCAGGTGGTGGAGGTTTC CAGGCCAAGGGCGGTCCCTACTCAGGCCgagggccgggagggccggccgtg cgggccctggtggccggctgtgtggccccggccccggcccgacttcagcgttagcgtggagcgggc cctggccgccaagccccggcctggacacctacagcctggggcgccggcgccggccgggggtgcgggtg cggggcagcaccggcggtggccggccggccggcctgcaccggtatctgcgggacttctgcggctgccac gtggcctggagcggcagccagctgcggctggccccggccccggccggcgtggccggcgagctgaccga ggccaccccccaaccggtatcgggtactaccagaacgtgtgcacccagagctacagcttcgtgtgtgggact ggggcccggtgggagcgggagatcgactggatggccctgaacggcatcaacctggccctggcctggagc ggccaggaggccatctggcagcgggtgtacctggccctgggctgaccaggccgagatcaacgagttc ttaccggccccgccttctggcctggggccggatgggcaacctgcacacctgggacggccccctgcctc caagctggcacatcaagcagctgtacctgcagcaccgggtgtgtgaccagatcgggagcttcggcatgac ccccgtgtgtccccgccttcggccggccacgtggccgagggcgtgaccgggtgttcccccaagttaacgtg accaagatgggcagctggggccacttcaactgcagctacagctgcagcttctgtgtggccccgaggacc ccatcttcccatcatcggcagcctgttctgcgggagctgatcaaggagttcggcaccgaccacatctacg gcggcgacaccttcaacgagatgcagcctccaagcagcgagccagctacctggccggccgcccaccgg ccgtgtacgagggccatgaccggcgtggacaccgaggccgtgtggctgtgcaggcgtggctgttcagca ccagccccagttctggggacctgcccagatccggggcgtgtgtggcgccgtgcctagaggacggctgt ggtgtgtgacctgttcggcgagagccagccgtgtacacccggaccgccagcttcaggggccagcccttc atctgtgtcatgtgcacaacttcggcggcaaccacggcctgttcggcgccctggaggccgtgaacggcg ggcccgaggccggccggctgttcccaacagcaccatggtgggcaccggcatggccccgaggggcatc agccagaacgaggtgtgtgtacagcctgatggccgagctgggctggcggaaggaccccggtggccgacct ggccgcctgggtgaccagcttcggccggcggtacggcgtgagccaccccgacggcgccggcgcct ggcggctgtgtgtggagcgtgtacaactgcagcggcgaggcctgcggggccacaaccggagcccc ctggtgcggcgcccgacctgcagatgaacaccagcatctgttacaaccggagcgacgtgttcgaggcct ggcggtgtgtgtgaccagcgccccagcctggccaccagccccgccttcagatacgacctgtggacct gacccggcaggccgtgcaggagctgtgtgacctgtactacaggaggcccgagcgcctacctgagca aggagctggccagcctgtgtggcgccggcggtgtgtggcctacgagctgtgtggccctgtgacgag gtgtgtggccagcgacagccggttctgtgtggcagctgtgtggagcagggccggcgccggcgtgag	249
-----------------------------	---	-----

10

20

30

40

【 0 1 8 5 】

【表 9 8】

	cgaggccgagggcacttctacgagcagaacagccggtatcagctgaccctgtggggacctgagggcaa catcctggactacgccaacaagcagctggccggcctgtggccaactactacacccaaggtggcggctg ttctggaggccctggtggacagcgtggcccaggcatccccctccagcagcaccagttcgacaagaacg tgttccagctggagcaggccttcgtgctgagcaagcagcgggtatccagccagcctagaggagacaccgt ggacctggccaagaagatcttctgaagtactacccccggtgggtggccggcagctggggaCTTGA GGTACTGTTCCAAGGGCCCGAGGACCAGGTAGACCCACGACTCA TTGATGGAAAATAG	
vIGF2-32- NAGLU- HPC4	ATGGAGGCTGTGGCTGTGGCAGCTGCGGTGGGGGTCTTCTCCT GGCCGGGGCCGGGGGCGCGGCAGGCGACGcTagcagaacactttgtggcga gagctggtggacaccctgcagtttgtgtggcgacagaggcttctgttcagcagaGGTGGAGGT GGAAttagaggaatcCTGgaagagtgtgtcttcagaGAAtcgatctggccctgttgaaacctac tgtgccacaccagccagatctgaaGGTGGAGGTGGTTCAGGTGGTGGAGGTTC CAGGCCAAGGGCGGTCCCTACTCAGGCCgagggccgggagggccggccgctg cggggccctggtggcccgctgtggggcccgcccgccgacttcagcgttagctggagcgggc cctggccgccaagccccggcctggacacctacagcctggggcggcgccggcgccggcggtg cggggcagcaccggcggtggcccgccggccgctgcaccggtatctgcggacttctcgggctgccac gtggcctggagcggcagccagctgcggctgccccggccctgcccggcgtggcgagctgaccga ggccacccccaaaccggtatcggtactaccagaacgtgtgcacccagagctacagcttcgtgtgtgggact ggggcccggtgggagcgggagatcgactggatggccctgaacggcatcaacctggccctggcctggagc ggccaggaggccatctggcagcgggtgtacctggccctgggctgacctaggccagatcaacgagttc ttaccggccccgccttctggcctggggccggatgggcaacctgcacacctgggacggccccctgcctc caagctggcacatcaagcagctgtacctgcagcaccgggtgtgaccagatgcggagcttcggcatgac ccccgtgtgctggccgcttcgccggccacgtggccgagggcgtgacctgggtgttccccaaagttaacgtg accaagatgggcagctggggccacttcaactgcagctacagctgcagcttctgtggccccgaggacc ccatcttccccatcatcgccagcctgttctgcgggagctgatcaaggagttcggcaccgaccacatctacg gcggcgacaccttaacgagatgcagcctccaagcagcagcggcagctacctggccggccgaccaccg ccgtgtacgagccatgaccggcgtggacaccgagggcgtgtggctgtgcagggtggtgtgtccagca ccagccccagttctggggacctgcccagatccggggcgtgtggcgccgtgcctagaggacggctgt gggtgtggacctgttcgccgagagccagcccgtgtacaccggaccggcagcttcaggggccagcccttc atctggtgcatgtgcacaacttcggcggcaaccacggcctgttcggcgccctggaggccgtgaacggcg gccccgaggccgcccggctgttcccaacagcaccatggtgggcaccggcatggccccgagggcac	250

10

20

30

40

【 0 1 8 6 】

50

【表 9 9】

	agccagaacgaggtggtgtacagcctgatggccgagctgggctggcggaaggaccccggtgcccacct ggccgcctgggtgaccagcttcgcccccggcggtacggcgtgagccaccccgacgcccggcgccgcct ggcggctgctgctgcggagcgtgtacaactgcagcggcgagggcctgccggggccacaaccggagcccc ctggtgcggcgccccagcctgcagatgaacaccagcatctggtacaaccggagcgcagtggttcgaggcct ggcggctgctgctgaccagcgccccagcctggccaccagccccgccttcagatacgacctgctggacct gacccggcaggccgtgcaggagctggtgagcctgtactacgaggaggcccgagcgcctacctgagca aggagctggccagcctgctgcggggccggcggtgctggcctacgagctgctgcccgcctggacgag gtgtggccagcgacacccggttcctgctgggcagctggctggagcaggcccgggccgcccgtgag cgaggccgaggccgacttctacgagcagaacagccggatcagctgacctgtggggacctgagggcaa catcctggactacgccaacaagcagctggccggcctggtggccaactactacaccccaaggtggcggtg ttcctggaggccctggtggacagcgtggcccaggcgatcccccttcagcagcaccagttcacaagaacg tgtccagctggagcaggccttcgtgctgagcaagcagcggtatccagccagcctagaggagacaccgt ggacctggccaagaagatcttctgaagtactacccccgggtgggtggccggcagctggggaCTTGA GGTACTGTTCCAAGGGCCCGAGGACCAGGTAGACCCACGACTCA TTGATGGAAAATAG	
--	--	--

10

20

【0187】

一部の実施形態において、本明細書中で提供される、場合によっては内部リボソームエントリ配列を有する、所望の治療融合タンパク質、例えば、v I G F 2 融合体又はシグナルペプチド融合体をコードする核酸を含むベクターは、アデノ随伴ウイルスベクター（A 5 / 3 5）である。

【0188】

一部の実施形態において、治療融合タンパク質、例えば v I G F 2 融合体をコードする核酸は、場合によっては内部リボソームエントリ配列を有しており、種々のタイプのベクター中にクローニングすることができる。例えば、一部の実施形態において、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス、及びコスミドが挙げられるが、これらに限定されないベクター中にクローニングされている。注目するベクターとして、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、及びシーケンシングベクターが挙げられる。

【0189】

さらに、場合によっては内部リボソームエントリ配列を有する、治療融合タンパク質、例えば v I G F 2 融合体又はシグナルペプチド融合体をコードする発現ベクターは、一部の実施形態において、ウイルスベクターの形態で細胞に提供される。ウイルスベクター技術は、例えば、Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYに、そして他のウイルス学及び分子生物学のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用であるウイルスとして、以下に限定されないが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルスが挙げられる。一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモータ配列、都合のよい制限酵素部位、及び1つ以上の選択マーカーを含有する（例えば、国際公開第01 / 96584号；国際公開第01 / 29058号；及び米国特許第6,326,193号）。

30

40

50

【0190】

また、本明細書中で提供されるのは、遺伝子移入のための組成物及び系である。いくつかのウイルスベースの系が、哺乳動物細胞中への遺伝子導入用に開発されてきた。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系にとって便利なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子が、一部の実施形態において、適切な技術を用いて、ベクター中に挿入されて、レトロウイルス粒子内にパッケージングされる。続いて、組換えウイルスは、単離されて、対象の細胞にインピボで、又はエキスピボで送達される。いくつかのレトロウイルス系が、遺伝子治療に適している。一部の実施形態において、アデノウイルスベクターが用いられる。いくつかのアデノウイルスベクターが、遺伝子治療に適している。一部の実施形態において、アデノ随伴ウイルスベクターが用いられる。いくつかのアデノ随伴ウイルスが、遺伝子治療に適している。一実施形態において、レンチウイルスベクターが用いられる。

10

【0191】

本明細書中で提供される遺伝子治療構築体は、注目する遺伝子がクローニングされているベクター、又は別の方法で、注目する遺伝子を含むベクター（又は遺伝子治療発現ベクター）を、ベクターのヌクレオチド配列が、注目する遺伝子の発現を可能にする（構成的であるか、又は別の、何らかの方法で調節される）ように含む。本明細書中で提供されるベクター構築体は、注目する組織に送達することができ、且つ注目する選択された組織において、注目する遺伝子の発現を実現することとなる、適切なあらゆる遺伝子発現ベクターを含む。

20

【0192】

一部の実施形態において、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。その理由は、血脳関門を越えるAAVベクターの能力、及びニューロン組織の形質導入のためである。本明細書中で提供される方法において、あらゆる血清型のAAVが用いられることが意図される。特定の実施形態において用いられるウイルスベクターの血清型は、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAVrhSベクター、AAVrh10ベクター、AAVrh33ベクター、AAVrh34ベクター、AAVrh74ベクター、AAV Anc80ベクター、AAV PHP.Bベクター、AAV hu68ベクター、AAV-DJベクター、及び遺伝子治療に適した他のものからなる群から選択される。

30

【0193】

AAVベクターは、哺乳動物にとって非病原性であるDNAパルボウイルスである。手短かに言うと、AAVベースのベクターは、ウイルスゲノムの96%を占めるrepウイルス遺伝子及びcapウイルス遺伝子が除去されて、ウイルスDNA複製、パッケージング、及び組込みを開始するのに用いられる、側面に位置する2つの145塩基対の逆位末端配列（ITR）が残されている。

【0194】

更なる実施形態は、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAVrhSベクター、AAVrh10ベクター、AAVrh33ベクター、AAVrh34ベクター、AAVrh74ベクター、AAV Anc80ベクター、AAV PHP.Bベクター、AAV-DJベクター、及び遺伝子治療に適した他のものを生じさせるための他の血清型カプシドの使用を含む。場合によっては、AAVウイルスカプシドは、AAV2/9、AAV9、AAVrhS、AAVrh10、AAV Anc80、又はAAV PHP.Bである。

40

【0195】

更なるプロモータ要素、例えばエンハンサが、転写開始の頻度を調節する。典型的には、当該プロモータ要素は、開始部位の上流30～110bpの領域内に位置決めされるが、いくつかのプロモータが、開始部位の下流に機能要素を同様に含有することが示されて

50

いる。プロモータ要素間の高頻度の間隔配置はフレキシブルであるので、プロモータ機能は、要素が互いに対して反転するか移動した場合にも保存される。チミジンキナーゼ (tk) プロモータにおいて、プロモータ要素間の間隔配置は多くの場合、活性が落ち始める前の 50 bp まで離して増やされる。プロモータに応じて、個々の要素が協働的に、又は独立して転写を活性化するように機能するようである。

【0196】

場合によっては内部リボソームエントリ配列を有する、治療融合タンパク質、例えば v I G F 2 融合体又はシグナルペプチド融合体導入遺伝子を哺乳動物 T 細胞において発現させることができるプロモータの例として、E F 1 a プロモータがある。天然 E F 1 a プロモータは、リボソームへのアミノアシル t R N A の酵素的送達を担う伸長因子-1 複合体のアルファサブユニットの発現を駆動する。E F 1 a プロモータは、哺乳動物発現プラスミドにおいて広範囲にわたって用いられており、レンチウイルスベクター中にクローニングされた導入遺伝子からの発現を駆動するのに有効であることが示されている (例えば、M i l l o n e e t a l . , M o l . T h e r . 1 7 (8) : 1 4 5 3 - 1 4 6 4 (2 0 0 9) 参照)。プロモータの別の例として、最初期のサイトメガロウイルス (C M V) プロモータ配列がある。このプロモータ配列は、作動可能に連結されているあらゆるポリヌクレオチド配列の高いレベルの発現を駆動することができる強い構成的プロモータ配列である。しかしながら、他の構成的プロモータ配列もまた時折用いられており、以下に限定されないが、ニフトリβアクチンプロモータ、P 5 4 6 プロモータ、シミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) 初期プロモータ、マウス乳腺腫瘍ウイルス (M M T V) 、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) の長い末端反復 (L T R) プロモータ、M o M u L V プロモータ、トリ白血病毒プロモータ、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモータ、ラウス肉腫ウイルスプロモータ、並びにヒト遺伝子プロモータ、例えば、以下に限定されないが、アクチンプロモータ、ミオシンプロモータ、伸長因子-1 a プロモータ、ヘモグロビンプロモータ、及びクレアチンキナーゼプロモータが挙げられる。さらに、遺伝子治療ベクターが、構成的プロモータの使用に制限されることは意図されない。また、誘導性プロモータがここでも意図される。誘導性プロモータは、作動可能に連結されているポリヌクレオチド配列の発現を、発現が所望される場合にオンにすることができ、且つ発現が所望されない場合に発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモータの例として、以下に限定されないが、メタロチオネインプロモータ、グルココルチコイドプロモータ、プロゲステロンプロモータ、及びテトラサイクリン調節プロモータが挙げられる。

【0197】

場合によっては内部リボソームエントリ配列又はその部分を有する、治療融合タンパク質、例えば v I G F 融合体又はシグナルペプチド融合体の発現を評価するために、細胞中に導入されることとなる発現ベクターは、多くの場合、選択マーカー遺伝子若しくはリポーター遺伝子、又は双方を含有して、ウイルスベクターを介して形質移入又は感染されることが求められる細胞の集団からの発現細胞の識別及び選択を促進する。他の態様において、選択マーカーは多くの場合、別個の D N A に引き継がれて、共形質移入手順で用いられる。選択マーカー及びリポーター遺伝子は双方とも、時折、宿主細胞における発現を可能にするのに適切な調節配列が側面に位置する。有用な選択マーカーの例として、抗生物質耐性遺伝子、例えば n e o が挙げられる。

【0198】

細胞中に遺伝子を導入して発現させるための方法及び組成物が、本明細書中の方法に適している。発現ベクターの文脈において、ベクターは、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、又は昆虫細胞中に、当該技術におけるあらゆる方法によって容易に導入される。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、又は生物学的手段によって宿主細胞中に移される。

【0199】

宿主細胞中にポリヌクレオチドを導入するための物理的な方法及び組成物として、リン

酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、遺伝子ガン、及びエレクトロポレーションが挙げられる。ベクター及び／又は外来核酸を含む細胞を生成する方法が、本明細書中の方法に適している（例えば、Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY 参照）。宿主細胞中へのポリヌクレオチドの導入のための一方法が、リン酸カルシウム形質移入である。

【0200】

宿主細胞中にポリヌクレオチドを導入するための化学的手段及び組成物として、コロイド分散系、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、並びに水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、核酸-脂質粒子、及びリポソームが挙げられる脂質ベースの系が挙げられる。インビトロ送達ビヒクル及びインビボ送達ビヒクルとして用いられる例示的なコロイド系として、リポソーム（例えば人工膜小胞）がある。核酸の最新技術の標的送達の方法が利用可能であり、例えば、標的ナノ粒子又は他の適切なサブミクロンサイズの送達系によるポリヌクレオチドの送達がある。

【0201】

非ウイルス送達系が利用される場合には、例示的な送達ビヒクルはリポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞中への核酸の（インビトロ、エクスビボ、又はインビボ）導入が意図される。別の態様において、核酸は、脂質と結合される。脂質と結合した核酸は、一部の実施形態において、リポソームの水性内部にカプセル化され、リポソームの脂質二重層内に散在され、リポソームに、リポソーム及びオリゴヌクレオチドの双方と結合される連結分子を介して付着され、リポソーム内にトラップされ、リポソームと複合体形成され、脂質を含有する溶液中に分散され、脂質と混合され、脂質と組み合わせられ、脂質中に懸濁液として含有され、ミセルと共に含有されるか、もしくはミセルと複合体形成され、又は別の方法で脂質と結合される。組成物が結合される脂質、脂質／DNA、又は脂質／発現ベクターは、溶液中で特定のいかなる構造にも限定されない。例えば、一部の実施形態において、二重層構造でミセルとして、又は「崩壊した」構造で存在する。これ以外にも、単純に溶液中で散在しており、おそらくサイズ及び形状が均一でない凝集体を形成する。脂質は、一部の実施形態において、天然に存在するか、又は合成脂質である脂肪物質である。例えば、脂質として、細胞質内に天然に存在する脂肪滴、並びに長鎖脂肪族炭化水素及びその誘導体、例えば、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドを含有する化合物のクラスが挙げられる。

【0202】

使用に適した脂質は、市販の源から得られる。例えば、一部の実施形態において、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）が、Sigma, St. Louis, Mo. から得られ；一部の実施形態において、リン酸ジセチル（「DCP」）が、K & K Laboratories (Plainview, N. Y.) から得られ；コレステロール（「Choi」）が、一部の実施形態において、Calbiochem-Behring から得られ；ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）及び他の脂質が多くの場合、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.) から得られる。脂質のクロロホルム又はクロロホルム／メタノールストック溶液が、多くの場合、約-20℃にて貯蔵される。クロロホルムは唯一の溶媒として用いられる。というのも、メタノールよりも容易に蒸発するからである。「リポソーム」は、閉鎖脂質二重層又は凝集体の生成によって形成される種々の単一且つ多層の脂質ビヒクルを包含する総称語である。リポソームは、多くの場合、リン脂質二重層膜及び内部水性媒体を有する小胞性の構造を有すると特徴付けられる。多層リポソームは、水性媒体によって区切られた複数の脂質層を有する。多層リポソームは、過剰の水溶液中にリン脂質が懸濁された場合に、自発的に形成される。脂質成分は、自己再配置を経てから閉鎖構造を形成して、脂質二重層の間に水及び溶解溶質をトラップする（Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5:505-10）。しかしながら、正常な

小胞性構造とは異なる構造を溶液中で有する組成物もまた包含される。例えば、脂質は、一部の実施形態において、ミセル構造をとるか、又は脂質分子の非均一凝集体として単に存在する。また、意図されるのは、リポフェクタミン-核酸複合体である。

【0203】

宿主細胞中に外来核酸を導入するのに、又はそうでなければ細胞を、本明細書中で提供される、場合によっては内部リボソームエントリ配列を有する、治療融合タンパク質、例えば、v I G F 2 融合体又はシグナルペプチド融合体に曝露するのに用いられる方法に拘らず、宿主細胞内の組換えDNA配列の存在を確認するために、種々のアッセイが実行されることが意図される。そのようなアッセイの例として、本明細書中の方法に適した「分子生物学的」アッセイ、例えばサザンブロッティング及びノザンブロッティング、R T - P C R 及び P C R ; 例えば、免疫学的手段 (E L I S A 及びウェスタンブロッティング) によって、又は本明細書中の範囲に入る剤を識別するための本明細書中に記載されるアッセイによって、例えば特定のペプチドの存在又は不在を検出する、「生化学」アッセイが挙げられる。

10

【0204】

本開示はさらに、場合によっては内部リボソームエントリ配列を有する、治療融合タンパク質、例えば v I G F 2 融合体又はシグナルペプチド融合体コード核酸分子を含むベクターを提供する。一態様において、治療融合体タンパク質ベクターは、細胞中に直接形質導入することができる。一態様において、ベクターは、クローニングベクター又は発現ベクター、例えば、1つ以上のプラスミド (例えば、発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクター、二重微小染色体)、レトロウイルスベクター構築体、及びレンチウイルスベクター構築体が挙げられるが、これらに限定されないベクターである。一態様において、ベクターは、哺乳動物細胞において v I G F 2 治療融合タンパク質構築体を発現させるのに用いることができる。一態様において、哺乳動物細胞はヒト細胞である。

20

【0205】

処置の使用及び方法

また、本明細書中で提供されるのは、遺伝子治療を用いて遺伝的障害を処置する方法であって、個体に、本明細書中で開示される、場合によっては内部リボソームエントリ配列を有する、治療融合タンパク質 (例えば、v I G F 2 融合体又はシグナルペプチド融合体又はシグナルペプチド-v I G F 2 融合体) をコードする核酸を投与することを含む方法である。本明細書中の方法を用いる処置に適した遺伝的障害は、発現の欠如又はミュータント遺伝子による機能不全タンパク質の発現を引き起こすゲノム内の1つ以上の変異によって引き起こされる、個体における障害を含む。

30

【0206】

さらに、本明細書中で提供されるのは、遺伝子治療ベクター、例えば、本明細書中で開示される、場合によっては内部リボソームエントリ配列を有する、治療融合タンパク質 (例えば、v I G F 2 融合体又はシグナルペプチド融合体又はシグナルペプチド-v I G F 2 融合体) をコードする核酸を含む遺伝子治療ベクター、及び遺伝的障害の処置のための薬剤の調製に用いられる、薬学的に許容されるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物である。

40

【0207】

一部の実施形態において、本明細書中で提供される方法を用いる処置に適した遺伝的障害は、リソソーム蓄積障害である。一部の実施形態において、リソソーム蓄積障害は、本明細書中で、欠けているか、又は欠陥のある酵素を患者に送達するための遺伝子治療を用いて処置される。一部の実施形態において、本明細書中の方法は、v I G F 2 に融合した、又はシグナルペプチドに融合した酵素を患者に送達して、当該酵素を、これが必要とされる細胞に送達する。一部の実施形態において、リソソーム蓄積障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、バッテン病、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病 I 型、ゴーシェ病 I I 型、ゴーシェ病 I I I 型、ポンペ病、テイ・サックス病、サンドホフ病、異染性白質

50

50

ドβ-ガラクトシダーゼ；GALC；PSAP；アリルスルファターゼA；ARSA；α-レイズロニダーゼ；イズロン酸2-スルファターゼ；ヘパランN-スルファターゼ；N-α-アセチルグルコサミニダーゼ；ヘパランアセチルCoA：α-グルコサミニドアセチルトランスフェラーゼ；N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ；ガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ；β-ガラクトシダーゼ；ヒアルロニダーゼ；アリルスルファターゼB；β-グルクロニダーゼ；ノイラミニダーゼ；NEU1；N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼのガンマサブユニット；ムコリピン-1；スルファターゼ修飾因子-1；酸性スフィンゴミエリナーゼ；SMPD1；NPC1；及びNPC2からなる群から選択される。

【0208】

一部の実施形態において、本明細書中の方法を介した処置は、治療タンパク質が必要な細胞に、治療タンパク質をコードする遺伝子を送達する。一部の実施形態において、処置は、個体における全ての体細胞に遺伝子を送達する。一部の実施形態において、処置は、標的細胞において欠陥遺伝子を置換する。一部の実施形態において、治療タンパク質を発現するようにエクスピボ処理された細胞が、個体に送達される。

【0209】

本明細書中で開示される障害の遺伝子治療は、長い点滴処置を必要としないため、酵素置換治療が挙げられる従来の処置よりも優れた処置結果をもたらす。

【0210】

定義

本明細書中で用いられる「エクスピボ遺伝子治療」は、例えば治療遺伝子を発現するように、患者細胞が対象の外側で遺伝的に修飾される方法を指す。続いて、新しい遺伝的情報を有する細胞が、由来した対象に返される。

【0211】

本明細書中で用いられる「インピボ遺伝子治療」は、治療遺伝子を有するベクターが対象に直接投与される方法を指す。

【0212】

本明細書中で用いられる「融合タンパク質」及び「治療融合タンパク質」は、本明細書中で互換的に用いられており、少なくとも1つの更なるタンパク質、ペプチド、又はポリペプチドが連結された治療タンパク質を指す。一部の例において、融合タンパク質は、化学リンカーなしで、各ペプチド鎖内のペプチド結合を介して共有結合的に連結された2つ以上のタンパク質又はそれらの断片を含有する単一のタンパク質分子である。一部の実施形態において、融合タンパク質は、治療タンパク質、及び融合タンパク質のエンドサイトーシスを増大させるペプチドであるシグナルペプチド、又は双方を含む。一部の実施形態において、エンドサイトーシスを増大させるペプチドは、CI-MPRに結合するペプチドである。

【0213】

本明細書中で互換的に用いられる「ベクター」又は「遺伝子治療ベクター」は、治療遺伝子を細胞に送達する遺伝子治療送達ビヒクル又はキャリアを指す。遺伝子治療ベクターは、遺伝子治療での使用に適したあらゆるベクター、例えば、患者の標的細胞（例えば感覚ニューロン）中への核酸ポリマー（ポリペプチド又はそのバリエーションをコードする）の治療送達に適したあらゆるベクターである。一部の実施形態において、遺伝子治療ベクターは、治療タンパク質又は治療融合タンパク質をコードする核酸を細胞に送達し、そこで治療タンパク質又は融合体は発現されて、細胞から分泌される。ベクターは、あらゆるタイプのものであってよく、例えば、プラスミドベクターであってもミニサークルDNAであってもよい。典型的には、ベクターはウイルスベクターである。ベクターとして、遺伝的に抑制されたウイルス、例えばアデノウイルス、及び非ウイルスベクター、例えばリポソームの双方が挙げられる。ウイルスベクターは、例えば、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、又はアデノウイルスに由来してもよい。AAV由来ベクター。当該ベクターは、AAVゲノム又はその誘導体を含

10

20

30

40

50

んでもよい。

【0214】

本明細書中で用いられる「構築体」は、治療タンパク質又は融合タンパク質をコードし、そして場合によっては、更なる配列、例えば翻訳開始配列又はIRES配列を含む核酸分子又は配列を指す。

【0215】

本明細書中で用いられる「プラスミド」は、染色体DNAと独立した、細胞内で複製するDNAの環状二本鎖単位を指す。

【0216】

本明細書中で用いられる「プロモータ」は、酵素RNAポリメラーゼが結合して、RNAへのDNAの転写を開始するDNA上の部位を指す。

10

【0217】

本明細書中で用いられる「体細胞治療」は、細胞における遺伝子発現の操作が、患者にとって調整的である(corrective to)が、次世代によって遺伝されない方法を指す。体細胞として、ヒト体内の全ての非生殖細胞が挙げられる。

【0218】

本明細書中で用いられる「体細胞」は、生殖細胞以外の全ての体細胞を指す。

【0219】

本明細書中で用いられる「指向性」は、特定の細胞又は組織型についての、ベクター、例えばウイルスの選択を指す。種々の要因が、特定の細胞に感染するベクターの能力を決定する。ウイルスは、例えば、細胞に入るには、特定の細胞表面受容体に結合しなければならない。ウイルスは典型的に、必須の受容体を細胞が発現しないならば、細胞に感染することができない。

20

【0220】

用語「形質導入」は、レシピエント細胞による機能ポリペプチドの発現をもたらす、本開示の複製欠損性rAAVを介した、標的細胞への、治療タンパク質をコードする核酸のインビボ又はインビトロ投与／送達を指すのに用いられる。本開示のrAAV等の遺伝子治療ベクターによる細胞の形質導入は、rAAVによってコードされるポリペプチド又はRNAの発現の持続をもたらす。ゆえに、本開示は、対象に、治療タンパク質をコードするrAAV等の遺伝子治療ベクターを、クモ膜下腔内、網膜内、眼内、硝子体内、側脳室内、実質内、若しくは静脈経路、又はそれらのあらゆる組合せによって投与／送達する方法を提供する。「クモ膜下腔内」送達は、脳又は脊髄のクモ膜下の腔中への送達を指す。一部の実施形態において、クモ膜下腔内投与は、大槽内投与を介する。また、本開示は、治療タンパク質をコードするrAAVベクター等の遺伝子治療ベクターでエクスピボ形質導入された細胞を、クモ膜下腔内、網膜内、眼内、硝子体内、側脳室内、実質内、若しくは静脈経路、又はそれらのあらゆる組合せによって投与／送達する方法を提供する。

30

【0221】

用語「レシピエント」、「個体」、「対象」、「宿主」、及び「患者」は、本明細書中で互換的に用いられ、そして場合によっては、診断、処置、又は治療が所望されるあらゆる哺乳動物対象、特にヒトを指す。処置のための「哺乳動物」は、哺乳動物と分類されるあらゆる動物を指し、ヒト、家畜及び農場動物、並びにラボ、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、サルが挙げられる。一部の実施形態において、哺乳動物はヒトである。

40

【0222】

本明細書中で用いられる用語「処置」、「処置すること」、及び「病徴を寛解させること」等は、場合によっては、統計学的に有意に、又は臨床的に著しく、障害の少なくとも1つの態様又はマーカーを阻害するか、弱めるか、引き下げるか、妨げるか、変更することが挙げられる治療効果を得るために、剤を投与するか、手順を実行すること指す。用語「寛解させる」又は「処置する」は、基礎をなす容体についての治癒を述べることも暗示

50

することもない。本明細書中で用いられる「処置」又は「寛解させること」（等）は、哺乳動物、特にヒトを処置することを含んでもよく、そして：（a）障害又は障害の病徴が、当該障害の体質であり得るが、当該障害を患っているとまだ診断されていない対象において起こることから予防すること（例えば、原発性障害と関連し得るか、又は原発性障害によって引き起こされ得る障害が挙げられる）；（b）障害を阻害すること、すなわちその発症を抑制すること；（c）障害を和らげること、すなわち障害の緩解を引き起こすこと；及び（d）障害の少なくとも1つの病徴を向上させることを含む。処置することは、客観的又は主観的なあらゆるパラメータ、例えば減退；寛解；病徴を縮小すること、若しくは障害症状を、患者にとってより耐えられるようにすること；衰退若しくは衰弱の速度を遅くすること；又は衰退の最終点をあまり衰弱させないことが挙げられる、障害の処置又は寛解又は予防における成功のあらゆる徴候を指し得る。病徴の処置又は寛解は、医師による試験の結果が挙げられる、1つ以上の客観的又は主観的なパラメータに基づく。したがって、用語「処置すること」は、障害と関連する病徴又は症状の進行を予防するか、若しくは遅延させるための、軽減するための、又は抑制若しくは阻害するための本発明の化合物又は剤の投与を含む。用語「治療効果」は、対象における、障害、障害の病徴、又は障害の副作用の引下げ、除去、又は予防を指す。

10

【0223】

用語「親和性」は、分子とその結合パートナー又は受容体との間の結合の強度を指す。

【0224】

本明細書中で用いられるフレーズ「高親和性」は、例えば、C I - M P R への親和性が、C I - M P R に結合するペプチドのない治療タンパク質よりも約100～1,000倍、又は500～1,000倍高い、そのようなペプチドを含有する治療融合を指す。一部の実施形態において、親和性は、当該ペプチドなしよりも少なくとも100倍、少なくとも500倍、又は少なくとも1000倍高い。例えば、治療タンパク質及びC I - M P R が、比較的等しい濃度で組み合わせられる場合、高親和性のペプチドは、利用可能なC I - M P R に結合して、結果として生じる高濃度の複合体に平衡をシフトすることとなる。

20

【0225】

本明細書中で用いられる「分泌」は、注目する組織、又は治療タンパク質の作用部位に運ばれるような、細胞から、例えば血流中へのタンパク質の放出を指す。遺伝子治療生成物が、器官の間質腔中に分泌される場合、分泌により、隣接する細胞の交差補正（c r o s s - c o r r e c t i o n）が可能となり得る。

30

【0226】

本明細書中で用いられる「送達」は、薬物送達を意味する。一部の実施形態において、送達のプロセスは、原薬（例えば、遺伝子治療ベクターで形質導入された細胞から産生される治療タンパク質又は融合タンパク質）を、細胞の外側（例えば、血液、組織、又は間質腔）から、原薬の治療活性の標的細胞中に運搬することを意味する。

【0227】

本明細書中で用いられる「工学」又は「タンパク質工学」は、所望の特性、又は特定の構造を有するタンパク質の合成をもたらすのに適した、タンパク質をコードする核酸配列を提供することによる、タンパク質の構造の操作を指す。

40

【0228】

「治療的に有効な量」は、場合によっては、障害を処置するために対象に投与される場合に、当該障害の処置を達成するのに十分な量を意味する。

【0229】

本明細書中で用いられる用語、数値の「約」は、当該数値の10%未満から10%超に及ぶ範囲を指し、範囲内の数値、例えば数値それ自体を含む。

【0230】

本明細書中で用いられる用語、特許請求の範囲の要素を「含む」は、当該要素を指すが、更なる要素の包含を排除しない。

【実施例】

50

【0231】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態を説明する目的で与えられており、本発明をいかなる形であれ制限するものではない。本実施例は、本明細書中に記載される方法と共に、好ましい実施形態の現在の代表的、例示的なものであり、本発明の範囲に対する制限として意図されない。特許請求の範囲によって定義される本発明の精神に包含される変更及び他の使用が、当業者に思い浮かぶであろう。

【0232】

実施例1：バリエントIGF2ペプチドの、CI-MPR受容体への結合

表面プラスモン共鳴（SPR）実験を、Biacoreを用いて行って、CI-MPR受容体への野生型及びバリエントIGF2（vIGF2）の結合を測定した。野生型ヒト成熟IGF2ペプチド（wt IGF2）は、配列番号68に示す配列を有する。vIGF2配列は、残基1～4を欠いており、且つ以下の変異：E6R、Y27L、及びK65Rを含有する点で、wt IGF2と異なる。vIGF2配列は、アミノ酸配列：

SRTL CGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVE
ECCFRSCDLALLLETYCATPARSE（配列番号80）を有する。また、vIGF2は、配列GGGGS GGGG（配列番号181）のN末端リンカーを有する。組み合わせた配列は、

GGGGS GGGGSRTL CGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRV
SRRSRGIVEECCFRSCDLALLLETYCATPARSEである。図4は、予想されるように、野生型IGF2ペプチドが、高い親和性（0.2 nM）でCI-MPR受容体に結合することを示している。図5は、バリエントIGF2ペプチド（vIGF2）もまた、高い親和性（0.5 nM）でCI-MPR受容体に結合することを示している。これらのデータは、治療薬をリソソームに向けるために、vIGF2ペプチドが、意図されるCI-MPR受容体に対して高い親和性を有することを示している。

【0233】

SPRを利用して、インスリン受容体に結合するペプチドを測定して、潜在的副作用を評価した。インスリンは、インスリン受容体に、高い親和性（約8 nM；データ示さず）で結合する。野生型IGF2及びvIGF2を試験した。ここで、vIGF2は、配列GGGGS GGGG（配列番号181）のN末端リンカーを有する、配列

SRTL CGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVE
ECCFRSCDLALLLETYCATPARSE（配列番号80）を有した。図8は、野生型IGF2もまた、インスリン受容体に比較的高い親和性（約100 nM）で結合することを示している。Biomarin/Zystor IGF2-GAA融合タンパク質（BMN-701）由来のIGF2ペプチドもまた、インスリン受容体に高い親和性で結合して、臨床試験において低血糖を引き起こすことが示された。図9は、vIGF2ペプチドの、インスリン受容体への測定可能な結合がないことを示している。これらのデータは、vIGF2ペプチドが、wt IGF2ペプチド融合体と比較して、優れた安全性プロファイルを示している。

【0234】

同じSPR結合分析を利用して、IGF1受容体とのvIGF2ペプチド相互作用を特徴付けた。図10は、野生型IGF2ペプチドが、IGF1受容体に比較的高い親和性（約100 nM）で結合することを示している。図11は、vIGF2ペプチドの、IGF1受容体への測定可能な結合がないことを示しており、これは、wt IGF2と比較して、安全性プロファイルの向上を示している。

【0235】

10

20

30

40

50

【表 100】

表 8: SPR 親和性結果		
受容体	wt IGF2 Kd (nM)	vIGF2 Kd (nM)
CI-MPR	0.2	0.5
インスリン受容体	100	検出された結合なし
IGF1 受容体	100	検出された結合なし

10

【0236】

実施例 2：v I G F 2 は、C I - M P R に対して低い親和性のリガンドを、高い親和性の E R T に変換する

N 末端リンカー（配列番号 181）を有する v I G F 2 ペプチド（配列番号 80）を、v I G F 2 - アルグルコシダーゼアルファとしてここで示すアルグルコシダーゼアルファに化学的にカップリングして、v I G F 2 ペプチドが、C I - M P R に対する親和性を向上させることができるかを判定した。図 6 に示すように、アルグルコシダーゼアルファ及び v I G F 2 - アルグルコシダーゼアルファの結合親和性を、直接、C I - M P R でコーティングした 96 ウェルプレートでの C I - M P R プレート結合アッセイを用いて比較した。結合していない酵素を洗い流してから、結合酵素活性を測定した。双方の酵素調製物の種々の濃度を、遊離 W T I G F 2 ペプチドあり、又は無しで用いた。v I G F 2 は、C I - M P R に対する親和性を実質的に向上させた。さらに、v I G F 2 - アルグルコシダーゼアルファの結合は、遊離 W T I G F 2 によってブロックされており、このことは、結合が I G F 2 依存的であったことを示している（データ示さず）。v I G F 2 ペプチドのカップリングは、G A A 酵素活性を弱めなかった。

20

【0237】

v I G F 2 を、組換えヒト N - アセチル - α - D - グルコサミニダーゼ（r h N A G L U）にカップリングした。R r h N A G L U は、ペプチドが、非リガンドを、C I - M P R に対して高い親和性のリガンドに変換することができるかを判定するための、M 6 P を欠いているリソソーム酵素である。この実験において、r h N A G L U 及び v I G F 2 - r h N A G L U を、直接、C I - M P R コーティングしたプレートを利用する C I - M P R プレート結合アッセイを用いて比較した。結合していない酵素を洗い流してから、結合酵素活性を測定した。双方の酵素調製物の種々の濃度を、遊離 v I G F 2 ペプチドあり、又は無しで用いた。図 7 に示すように、v I G F 2 - r h N A G L U は、v I G F 2 を欠いている r h N A G L U よりも、C I - M P R に対して有意に高い親和性を有する。さらに、v I G F 2 - r h N A G L U 結合は、遊離 v I G F 2 ペプチドによってブロックされた。このことは、受容体結合が I G F 2 ペプチドに特異的であったことを示している。これらの結果は、v I G F 2 ペプチドが、リソソームに対する薬物標的化を向上させるのに利用することができることを示している。

30

40

【0238】

実施例 3：v I G F 2 - G A A 融合タンパク質の筋芽細胞取込み

v I G F 2 - G A A 融合タンパク質（実施例 1～2 におけるのと同じ配列）を投与して、酵素の L 6 筋芽細胞取込みを測定した。図 6 は、r h G A A 及び M 6 P - G A A と比較した、v I G F 2 - r h G A A の優れた取込みを示す。したがって、v I G F 2 は、G A A を細胞に向けるのに有効である。

【0239】

実施例 4：遺伝子治療によって送達される E R T のための構築体

2 つの異なる構築体を図 12 に示す。上部のパネルには、K o z a k 配列、及び「元か

50

ら存在する h G A A」(配列番号 189)をコードする天然シグナルペプチドによる組換えヒト G A A をコードする核酸を含有する構築体がある。中央のパネルには、「操作された h G A A」(配列番号 190)をコードする構築体 K o z a k - B i P - v I G F 2 - 2 G S - G A A がある。この構築体は、K o z a k 配列、B i P シグナルペプチドをコードする核酸、配列番号 80 に示される配列を有する v I G F 2 ペプチドをコードする核酸、並びに 2 G S リンカー(配列番号 181)をコードする核酸に続く、v I G F 2 の早期プロセッシング及び除去を妨げるために N 末端 60 アミノ酸が除去された組換えヒト G A A (配列番号 1)をコードする核酸によって特徴付けられる。「操作された h G A A」のアミノ酸配列を、配列番号 2 に示す。

【0240】

実施例 5：遺伝子治療構築体の分泌の増強

操作した h G A A は、分泌がより大きく、そして細胞取込み及びリソソーム標的化に適切な細胞表面受容体と相互作用することができる

以下でより詳細に記載する操作した h G A A、又は元から存在する h G A A を発現する C H O を培養して、条件培地を、G A A 活性の測定のために収集した。図 15 は、操作された h G A A 及び元から存在する h G A A の相対活性を示しており、これは、操作された h G A A は、元から存在する h G A A と比較して、活性が増大することを示しており、操作された h G A A のより有効な分泌を示している。

【0241】

実施例 6：条件培地中の P P T 1 の分析

P P T 1 構築体のクローニング

P P T 1 構築体を、C M V プロモータを含有する p c D N A 3.1 発現ベクター (T h e r m o F i s h e r c a t # V 7 9 0 2 0) 中にクローニングした。試験した構築体は、P P T 1 - 1 (W T - P P T 1) (配列番号 4) ; P P T 1 - 2 (W T - v I G F 2 - P P T 1) (配列番号 5) ; P P T 1 - 2 9 (B i P 2 a a - v I G F 2 - P P T 1) (配列番号 6) を含んだ。

【0242】

P P T 1 分泌及び結合

P P T 1 構築体を、H E K 2 9 3 T 細胞において 3 日間、一過的に発現させて、P P T 1 を培地中に分泌させた。分泌された P P T 1 を、ウェスタンブロッティングによって定量化して、C I - M P R 結合について、確立された方法を用いてアッセイした。分泌された P P T 1 を図 13 に示す。C I - M P R 結合を図 14 に示す。

【0243】

実施例 7：ポンペ病の動物モデルにおける試験遺伝子治療ベクター

ポンペ遺伝子治療：概念研究設計の前臨床プルーフ

前臨床研究を、構築体の最初の比較のために、G A A ノックアウト (G A A K O) マウスにおいて、高い用量を用いて行った。構築体を図 12 に示す。マウスを、ビヒクル、又は 2 つの構築体、元から存在する - h G A A 又は操作した - h G A A の 1 つにより処置した。マウスに、5 e 1 1 g c / マウス (おおよそ 2.5 e 1 3 g c / k g) を投与した。2 ヶ月齢の G A A ノックアウトマウスを用いた。正常な (野生型) マウスを対照として用いた。研究設計を図 16 に概説している。

【0244】

ポンペ遺伝子治療：血漿

血漿を、野生型 (正常) マウス、又はビヒクル若しくは示す遺伝子治療ベクターで処置した G A A K O マウスから収集して、G A A 活性及び細胞表面結合を測定した。データを、図 17、図 27、及び図 19 に要約する。類似した高い G A A レベルを、遺伝子治療ベクターで処置したマウスにおいて見た (図 17、図 18)。しかしながら、操作した構築体で、より多くの細胞標的化受容体結合が観察された (図 19)。

【0245】

ポンペ遺伝子治療：四頭筋

10

20

30

40

50

G A A 活性及びグリコーゲン貯蔵／細胞質空胞化を、正常な（野生型）マウス及び処置した G A A K O マウスにおいて評価した（図 2 8）。四頭筋における G A A 活性は、野生型よりも約 2 0 倍高かった。また、グリコーゲン P A S（図 2 9）及び免疫組織化学（図 3 0）を評価した。免疫組織化学は、野生型と比較して、操作した h G A A のより大きなリソソーム標的化を示した。グリコーゲン引下げは、P A S 染色によって、操作した h G A A についてより一貫していた。

【0 2 4 6】

ポンペ遺伝子治療：三頭筋

G A A 活性及びグリコーゲン貯蔵／細胞質空胞化を、正常な（野生型）マウス及び処置した G A A K O マウスにおいて評価した（図 3 1）。G A A 活性は、野生型よりも約 1 0 ～ 1 5 倍高かった。また、免疫組織化学及びグリコーゲン P A S を評価した（図 3 2 及び図 3 3）。免疫組織化学は、野生型 G A A と比較して、操作した h G A A のより大きなリソソーム標的化を示した。グリコーゲン引下げは、P A S 染色によって測定して、操作した h G A A についてより一貫していた。

10

【0 2 4 7】

ポンペ遺伝子治療：前脛骨筋（T A）

G A A 活性及びグリコーゲン貯蔵／細胞質空胞化を、正常な（野生型）マウス及び処置した G A A K O マウスにおいて評価した（図 2 0）。T A における G A A 活性は、野生型よりも約 1 5 ～ 2 0 倍高かった。また、免疫組織化学及びグリコーゲン P A S を評価した（図 2 1 及び図 2 2）。免疫組織化学は、野生型 G A A と比較して、操作した h G A A のより大きなリソソーム標的化を示した。グリコーゲンレベルは、野生型レベルに近かった。グリコーゲン引下げは、P A S 染色によって、操作した h G A A についてより一貫していた。

20

【0 2 4 8】

ポンペ遺伝子治療：脳及び脊髄

G A A 活性、グリコーゲン含量、及びグリコーゲン貯蔵／細胞質空胞化を、正常な（野生型）マウス及び処置した G A A K O マウスにおいて評価した（図 2 3）。脳における G A A 活性は、野生型よりも約 5 倍低かった。また、免疫組織化学及びグリコーゲン P A S を評価した（図 2 4、図 2 5、図 2 6、図 2 7）。免疫組織化学は、一部の細胞の直接的形質導入が存在し得ることを示した。しかしながら、元から存在する構築体によるグリコーゲンクリアランスは、ほとんど得られなかった。グリコーゲンレベルは、操作した構築体について、野生型レベルに近かったとはいえ、活性が野生型の 2 0 % しかなかった。脊髄における P A S 染色は、元から存在する構築体によるグリコーゲンクリアランスをほとんど示さない。操作した構築体について野生型に近いグリコーゲンレベルが、運動ニューロンを含む前角において観察された。免疫組織化学は、脊髄ニューロンにおける直接的形質導入を実証した。脈絡叢及びニューロン細胞によって産生される操作した h G A A は、脊髄において交差補正によってグリコーゲンを引き下げることができた一方、グリコーゲン引下げは、元から存在する h G A A についてほとんど観察されなかった。

30

【0 2 4 9】

結論

全体として、本実施例におけるデータは、脳及び脊髄における効果が挙げられる、操作した遺伝子治療構築体の、組織中への取込み及びグリコーゲン引下げが、従来の処置に用いられている野生型 G A A よりも劇的に良好であることを実証した。

40

【0 2 5 0】

実施例 8：動物研究プロトコール

記載されるように、A A V h u 6 8 ベクターを生成して、P e n n V e c t o r C o r e によって滴定した（L o c k , A l v i r a e t a l . 2 0 1 0 , 「R a p i d , s i m p l e , a n d v e r s a t i l e m a n u f a c t u r i n g o f r e c o m b i n a n t a d e n o - a s s o c i a t e d v i r a l v e c t o r s a t s c a l e .」H u m G e n e T h e r 2 1 (1 0) : 1 2 5 9 - 1

50

271)。

【0251】

C57BL/6/129バックグラウンド創始者においてGaaノックアウトしたポンペマウスであるハツカネズミ (*Mus musculus*) を、Jackson Labsにて購入した (stock #004154、別名6neoマウス)。

【0252】

マウスに、0.1 mL中 5×10^{11} GC (およそ 2.5×10^{13} GC/kg) のAAVhu68.CAG.hGAA (元から存在するhGAA (配列番号189) 又は操作したhGAA (配列番号190) のいずれかを含む) を、外側尾静脈を介して受けさせて、ベクター投与後7日目及び21日目に血漿単離のために採血して、最終的に、注射後28日目に (血漿単離のために) 採血して、全採血によって安楽死させた。組織を、脳から始めて速やかに収集した。

10

【0253】

GAA活性

血漿を、5.6 mM 4-MU- α -グルコピラノシド、pH 4.0と混合して、37°Cにて3時間インキュベートした。反応を、0.4 M炭酸ナトリウム、pH 11.5で停止した。Victor 3蛍光計を励起355 nm及び放射460 nmにて用いて、相対蛍光単位RFUを測定した。nmol/mL/hrの単位での活性を、4-MUの標準曲線から補間法によって算出した。個々の組織サンプルにおける活性をさらに、ホモジェネートにおける総タンパク質含量に基づいて正規化した。

20

【0254】

LC/MSによるGAAシグネチャーペプチド

血漿を、100%メタノール中で沈殿させて、遠心分離した。上清を破棄した。ペレットを、内部標準としてhGAAに固有の安定した同位体標識ペプチドでスパイクして、トリプシンにより再懸濁させて、37°Cにて1時間インキュベートした。消化を、10%ギ酸で停止した。トリプシンペプチドを、C-18逆相クロマトグラフィによって分離して、ESI-質量分光法によって識別且つ定量化した。血漿中の総GAA濃度を、シグネチャーペプチド濃度から算出した。

【0255】

細胞表面受容体結合アッセイ

96ウェルプレートを受容体でコーティングして、洗浄して、BSAでブロックした。AAV処置したマウス由来の28日目の血漿を、一連の濃度低下を与えるように段階希釈して、カップリングした受容体とインキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄して、結合していないいかなるhGAAも除去して、4-MU- α -グルコピラノシドを37°Cにて1時間加えた。反応を、1.0 Mグリシン、pH 10.5で停止して、RFUをSpectramax 蛍光計；励起370、放射460によって読んだ。サンプル毎のRFUを、4-MUの標準曲線から補間法によって、活性 (nmol/mL/hr) に変換した。非線形回帰を、GraphPad Prismを用いて行った。

30

【0256】

組織学

組織をホルマリン固定して、パラフィン包埋した。筋肉スライドをPASで染色した；CNSスライドを、luxol fast blue/Periodic Acid-Schiff (PAS) で染色した。委員会認定の獣医病理学者 (JH) が、組織学的スライドを盲目的にレビューした。グリコーゲン蓄積及び細胞質空胞化がある細胞の総パーセンテージの半定量的推定を、スキャンしたスライドで行った。0から4のスコアを、以下の表に記載するように考えた。

40

【0257】

50

【表 101】

表 9: 組織学スコアリング	
	蓄積/空胞化
0	0
1	1~9%
2	10~49%
3	50~74%
4	75~100%

10

【0258】

免疫組織化学 (IHC)

本発明者らは、抗ヒトGAA抗体 (Sigma HPA029126) を用いて免疫染色したスライドから、導入遺伝子発現及び細胞局在化を研究した。

【0259】

実施例 9: ポンペ病の動物モデルにおける組織学—組織プロセッシング—プロトコール及び結果

全ての組織を、10% NBF (中性緩衝ホルマリン) 中で固定した。アッセイ (PAS 及び IHC) は、当該分野においてルーチンの用いられている。

20

【0260】

四頭筋及び三頭筋の PAS 染色 (図 29 及び図 32) —組織を、10% NBF 中で固定して、パラフィン中に包埋した。切片を、1% 過ヨウ素酸中でポスト固定 (post-fix) して、シッフ試薬で染色した。その後、切片を、ヘマトキシリンにより対比染色した。グリコーゲンは、マゼンタ色の凝集体 (リソソーム境界) 又は散乱したピンク色 (サイトソル) として現れる; 核は青い。画像に基づいて、そして各々が群の代表であると仮定して、グリコーゲンクリアランスに関するランク付け順位は: 操作した hGAA > 元から存在する hGAA である。操作した hGAA 構築体は、休止と比較して、画像全体にわたって、より多くの染色をもたらした。このことは、CI-MPR への vIGF2 の結合により媒介された GAA タンパク質のエンドサイトーシスの向上を示している。

30

【0261】

脊髄の PAS 染色 (図 26) —組織を、10% NBF 中で固定した。1% 過ヨウ素酸中でのポスト固定を、パラフィン包埋の前に、又は後に行うことができた。切片を、シッフ試薬で染色して、適したメチレンブルーにより対比染色した。グリコーゲンは、マゼンタ色の凝集体 (リソソーム境界) として現れる; 神経線維は青く見える。画像は、脊髄の前角、及び運動ニューロンにおけるグリコーゲン蓄積に焦点を合わせた。操作した hGAA は、構築体間で、グリコーゲン引下げに最も効果的であるように見えた。

【0262】

GAA IHC (図 22、図 25、図 27、図 30、及び図 35) —組織を、10% NBF 中で固定して、パラフィン中に包埋した。切片を、抗 GAA 一次抗体に続いて、一次抗体を認識して、酵素タグ HRP を有する二次抗体とインキュベートした。その後、酵素反応を実行して、茶色の沈殿生成物が形成された。続いて、切片を、ヘマトキシリンにより対比染色した。構築体は、筋線維中への GAA 取込みを示した (図 31)。操作した hGAA > 元から存在する hGAA。BiP-vIGF2 構築体は、休止と比較して、画像全体にわたって、より多くの散乱した染色があった。

40

【0263】

他のベクターと比較して、操作した hGAA は、筋線維の内側に斑点様 (punctum-like) の外観を伴う、より多くの GAA IHC シグナルをもたらした。このことは、かなり有効なリソソーム標的化を示している (図 22)。

50

【0264】

全てにおいて、操作したhGAAは一貫して、構築体間で、種々の組織において、組織取込み、リソソーム標的化、及びグリコーゲン引下げの優位性を実証した。

【0265】

実施例10：融合タンパク質の、CIMPRへの結合

本実施例において、治療酵素を、CIMPRに向かうように操作した。本実施例におけるデータは、融合タンパク質が、vIGF2タグを含有する場合にCIMPRにより良好に結合することを示している。これは、十分にリン酸化されていることが知られている酵素、例えばPPT1についても示された。

【0266】

各導入遺伝子を、pIREShyg3プラスミド中にクローニングして、DNAを、PEI形質移入試薬を用いて懸濁HEK293K細胞内に形質移入した。細胞を、FreeStyle293発現培地中で増殖させた。条件培地を、形質移入の3～4日後に細胞から収穫した。条件培地中に分泌された酵素の量を、活性アッセイによって、又はシグネチャーペプチドアッセイによって判定した。これらの濃度を用いて、CIMPR結合アッセイをセットアップした。

【0267】

結合アッセイにおいて、プレートを最初に、CIMPRでコーティングした。次に、注目する酵素を含有するサンプルを、プレート上でインキュベートした。プレートを、CIMPRに結合した物質のみがプレート上に残るように洗浄した。プレートに結合した注目する酵素の量を、酵素アッセイによって、又は質量分析法によって判定した。結合アッセイを、注目する酵素の広範な濃度にて実行して、結合曲線を得た。

【0268】

プレートに結合した、タグ付けされた酵素及びタグ付けされていない酵素の量を判定して、結合曲線を構築した。AGA及びTPP1の場合では、酵素活性アッセイを実行して、この判定を行った。その他の場合では、シグネチャーペプチドアッセイを実行して、酵素結合の量を判定した。

【0269】

TPP1活性アッセイは、www.rndsystems.com/products/recombinant-human-tripeptidyl-peptidase-1-tp1-protein-cf_2237-se#product-detailsにて解説されている。

【0270】

AGA活性アッセイは、YaV, et al. Applications of a new fluorometric enzyme assay for the diagnosis of aspartylglucosaminuria. J Inher Metab Disease 1993及びBanning, et al. Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. Sci Rep 2016にて解説されている。

【0271】

図34は、野生型PPT1と比較した、操作したPPT1の結合の増大を示す。図35は、野生型TPP1と比較した、操作したTPP1の結合の増大を示す。図36は、野生型AGAと比較した、操作したAGAの結合の増大を示す。図37は、野生型GLAと比較した、操作したGLAの結合の増大を示す。

【0272】

実施例11：PPT1融合体のクローニング

全てのPPT1構築体を、タカラバイオ株式会社のIn-Fusionクローニングキットを用いて、pcDNA3.1発現ベクター中にアSEMBルした。

10

20

30

40

50

【0273】

線状化 p c D N A 3 . 1 ベクター及び各 P P T 1 遺伝子断片を、I n F u s i o n 反応を介して組み換えて、明示した P P T 1 構築体を保有する最終 p c D N A 3 . 1 ベクターを得た。

【0274】

実施例 12 : クローニング v I G F 2 ミュータント

v I G F 2 ミュータントを全て、タカラバイオ株式会社の I n - F u s i o n クローニングキットを用いて、p c D N A 3 . 1 - B i P - v I G F 2 - 2 G S - G A A 発現ベクター中にスワップした。

【0275】

I n F u s i o n 反応を介した、順序付けた v I G F 2 断片と線状化 p c D N A 3 . 1 - G A A ベクターの組換えにより、最終 p c D N A 3 . 1 - B i P - v I G F 2 * - 2 G S - G A A 環状発現ベクターを得た。

【0276】

実施例 13 : v I G F 2 - G A A 構築体の特性評価

p c D N A 3 . 1 - v I G F 2 - G A A プラスミドによる H E K 2 9 3 T 細胞の一過性形質移入

F u g e n e H D 形質移入試薬を用いて、H E K 2 9 3 T 細胞を、1 μ g の D N A により一過的に形質移入した。培養体を、5 % C O ₂ を補充しながら 37 °C にてさらに 2 ~ 5 日間インキュベートしてから、条件培地及び細胞ペレットを収穫した。

【0277】

条件培地中の v I G F 2 - G A A のウェスタンブロット分析

ウェスタンブロットは、L i c o r O d y s s e y 検出系を用いる一般的な標準方法を用いて実行した。v I G F 2 - G A A 検出に用いた一次抗体は、自社ウサギ抗 G A A 抗体 (F L 0 5 9) であった。G A A に用いた二次抗体は、ヤギ抗ウサギ D y L i g h t 8 0 0 (T h e r m o F i s h e r c a t # S A 5 - 3 5 5 7 1) であった。

【0278】

G A A 活性アッセイ

G A A 活性を、先に述べたように測定した。

【0279】

C I - M P R 結合アッセイ

C I - M P R 結合を、先に述べたように測定した。

【0280】

細胞取込みアッセイ

30 + I G F 2 - G A A 構築体の作出の結果は、以下の通りである。

【0281】

元々の v I G F 2 の 80 % 以上の分泌／発現レベルを示した v I G F 2 - G A A 構築体は、v I G F 2 ~ 4、5、10、11、14、16、17、31、及び 32 である (図 38 及び図 39)。

【0282】

元々の v I G F 2 の 50 % 以上の分泌／発現レベルを示した v I G F 2 - G A A 構築体は、v I G F 2 ~ 4、5、6、9 ~ 14、16 ~ 23、25、27、及び 29 ~ 34 である (図 38 及び図 39)。

【0283】

全ての v I G F 2 - G A A 構築体は、細胞の内側で正確にプロセッシングされたようであり、70 / 76 K D a の成熟 G A A ペプチド断片が観察された (図 38)。

【0284】

v I G F 2 - 17 は、一貫して、元々の v I G F 2 よりも有意に高い C I - M P R 結合 B m a x を示した (図 40、図 41、図 44、及び図 45)。

【0285】

v I G F 2 - 2 4 は、元々の v I G F 2 よりも有意に良好に、C I - M P R に結合した (図 4 2 及び図 4 3)。

【0286】

P M 2 5 細胞取込み特性が、元々の v I G F 2 に対して匹敵するか、又はより良好な v I G F 2 - G A A 構築体として、v I G F 2 - 7、v I G F 2 - 1 0、v I G F - 1 7、v I G F 2 - 1 8、v I G F 2 - 2 0、v I G F 2 - 2 2、及び v I G F 2 - 2 3 が挙げられる (図 4 6 及び図 4 7)。

【0287】

実施例 1 4 : P P T 1 構築体の試験

本明細書中の他の場所で考察するように、v I G F 2 ペプチドを設計した。バリエーションを、C I - M P R への選択的結合の増大及びタンパク質発現の向上に基づいて選択した。例示的なペプチド及びその構造を、図 4 8 に示す。

【0288】

p c D N A 3 . 1 - P P T 1 プラスミドによる H E K 2 9 3 T 細胞の一過性の形質移入

1 2 ウェル培養において 5 % F B S を補充した 1 m L O p t i M E M 培地中で約 8 0 % のコンフルエンスまで増殖させた H E K 2 9 3 T 細胞を、F u g e n e H D 形質移入試薬を用いて、1 μ g の DNA で一過的に形質移入した。培養体を、5 % C O ₂ を補充しながら 3 7 °C にてさらに 2 ~ 5 日間インキュベートしてから、条件培地及び細胞ペレットを収穫した。

【0289】

条件培地中の P P T 1 のウェスタンブロット分析

ウェスタンブロットは、L i c o r O d y s s e y 検出系を用いる一般的な標準方法を用いて実行した。P P T 1 検出に用いた一次抗体は、A b c a m のマウスポリクローナル抗体 (カタログ cat # a b 8 9 0 2 2) であった。P P T 1 に用いた二次抗体は、ヤギ抗マウス D y L i g h t 8 0 0 (T h e r m o F i s h e r cat # S A 5 - 3 5 5 2 1) であった。

【0290】

P P T 1 発現のウェスタンブロット及びバンド強度を示すグラフを、図 4 9 に示す。ウェスタンブロットによって定量化される、条件培地中の P P T 1 を示すグラフを図 5 0 に示す。

【0291】

P P T 1 活性アッセイ

用いた P P T 1 活性アッセイは、本質的に、V a n D i g g e l e n e t a l . (M o l G e n e t M e t a b . 6 6 : 2 4 0 - 2 4 4 , 1 9 9 9) によって解説されているものであった。手短に言うと、典型的な P P T 1 活性アッセイにおいて、分泌された P P T 1 を含有する条件培地の 1 0 μ l を、9 6 ウェル黒色クリアボトムプレート (C o r n i n g cat # 3 6 3 1) 内で、7 5 μ M M U - 6 S - P a l m - β G l c (4 - メチルウンベリフェリル - 6 - チオ - パルミタート - β - D - グルコピラノシド、C a y m a n C h e m i c a l ; C A S 2 2 9 6 4 4 - 1 7 - 1)、2 U / m L β - グルコシダーゼ (S i g m a C h e m i c a l s ; C A S 9 0 0 1 - 2 2 - 3 ; G 4 5 1 1)、2 0 m M シトレート pH 4 . 0、5 m M D T T、0 . 0 2 % トリトン X - 1 0 0、及び 5 0 m M N a C l を含有する反応バッファの 9 0 μ l と混合した。3 3 0 n m の励起波長及び 4 5 0 n m の放射波長を用いて、蛍光を、S p e c t r a M a x M 2 を用いて、2 5 °C にて 1 時間にわたって 3 0 秒の間隔にて監視した。時間経過蛍光データを線形回帰とフィットさせることによって、P P T 1 反応の速度を抽出した。

【0292】

活性によって定量化した、条件培地中の P P T 1 を示すグラフを図 5 1 に示す。活性は、ウェスタンブロット結果との強い相関を有することが見出された。図 5 2 は、活性とウェスタンブロット定量化との相関を示す。

【0293】

10

20

30

40

50

PPT1 安定性アッセイ

手短に言うと、典型的な安定性アッセイにおいて、PPT1を含有する条件培地の180 μ Lを、20 μ Lの10×PBS、pH7.4で希釈して、37℃にてインキュベートした。異なる時点にて、15 μ Lのアリコートをとって、ドライアイスで冷却したエタノール中で急速凍結させた。時間経過実験の終了後、凍結したサンプルを解凍して、PPT1活性を、PPT1活性アッセイを用いて測定した。

【0294】

CI-MPR 結合アッセイ

CI-MPRプレート結合アッセイを、前述のように実行してから、結合量をPPT1活性アッセイによって判定した。

【0295】

M6Pの存在下でのCI-MPRへのPPT1構築体の結合が、以下の表中にある。結合曲線を図53に示す。

【0296】

【表102】

表10: M6Pの存在下でのCI-MPRへのPPT1構築体の結合

	Bmax	相対Kd
PPT1-9		ND
PPT1-27		ND
PPT1-28		ND
PPT1-29	8.58	0.107
PPT1-30	4.88	0.056
PPT1-32	6.05	0.121
PPT1-33	9.19	0.143
PPT1-2		ND

【0297】

6つのPPT1構築体を、更なる分析のために選択した。これらの6つの構築体を図54に示す。培地中へのPPT1分泌（図55）、細胞内でのPPT1プロセッシング（図56）、ウェスタンブロットによるPPT1定量化（図57）、及び活性（図58）を、これらの6つの構築体について判定した。

【0298】

実施例15 更なるPPT1 IGF2融合構築体の工学及び試験

更なるPPT1構築体を、図62に示すように設計して、クローニングした。これらの構築体は、C6S変異（配列番号177）を、場合によっては切断を向上させる2つのアラニン伸長部（配列番号178）を有する内因性シグナル配列、又は修飾BIPシグナルペプチドであるBIP-2（配列番号171）のいずれか、野生型ヒトPPT1（配列番号4）のアミノ酸残基21～306若しくは28～306を含むPPT1配列、GSリンカー（配列番号181～187）、及びバリエーションIGF2-31若しくは32（配列番号120又は121）（リソソーム切断部位であるRPRAVPTQA（配列番号188））によって分離されている）を含有する。

【0299】

全てのPPT1構築体（図62）を、FreeStyle 293懸濁細胞内で一過的に発現させた。手短に言うと、形質移入試薬としてポリエチレンイミン（PEI）を用いて、FreeStyle 293細胞を、pcDNA3.1骨格内の各PPT1構築体により形質移入した。FreeStyle 293発現培地における発現の4日後に、各形質移入由来の条件培地を収集して、ウェスタンブロットでランして、抗PPT1一次抗体を用いた。培地における相対PPT1レベルを、これらのウェスタンブロット上のバンド

密度から定量化した。図 6 3 は、試験したいくつかの構築体の、培地中に分泌されるレベルが、WT PPT1 よりも高いことを示している。条件培地中のより高い PPT1 レベルは、細胞からの良好な発現及び有効な分泌の双方を反映している。vIGF2-31（配列番号 120）及び vIGF2-32（配列番号 32）を、CIMPR 結合を向上させるように設計したが、驚くべきことに、初期の IGF2 バリエーション（配列番号 80）と比較して、PPT1 の発現及び分泌が増強した。

【0300】

精製したタンパク質構築体 PPT1-101 及び PPT1-104 によるニューロン取込み実験は、双方のタンパク質の首尾良い取込みを示し、PPT1-104 が、PPT1-101 のおよそ 2 倍も取り込まれた（図 6 4 A）。この実験のために、ラット大脳皮質ニューロンを、NeuroCult 培地中で培養して、ポリ-L-リシンコーティングしたカバースリップ上にプレATINGした。ニューロンを、Alexa Fluor 680 蛍光色素で標識した、5 µg/ml の精製 PPT1-101 又は PPT1-104 で処理した。1 時間のインキュベーションの後に、細胞を固定して、透過化処理して、Leica SP8 共焦点顕微鏡を用いて画像化した。

【0301】

条件培地によるニューロン取込み実験を、前述のように、FreeStyle 293 細胞形質移入から得た条件培地を用いて実行した。培地中の各 PPT1 構築体タンパク質の濃度を、最初に、知られている濃度の PPT1 のサンプルを用いて作成した標準曲線を用いて、ウェスタンブロットを介して判定した。条件培地の各サンプルを濃縮してから、ニューロンを処理した。ラット大脳皮質ニューロンを、Primary Neuron Growth Medium 中で培養して、ポリ-L-リシンコーティングしたカバースリップ上にプレATINGした。ニューロンを、以下の濃度の、培地中の PPT1 タンパク質で処理した：

【0302】

【表 103】

WT	PPT1-101	PPT1-104	PPT1-112	PPT1-114	PPT1-117
5.6 ug/ml	6.8 ug/ml	12.8 ug/ml	14.8 ug/ml	15.4 ug/ml	17.8 ug/ml

【0303】

1 時間のインキュベーションの後に、細胞を固定して、透過化処理して、Leica SP8 共焦点顕微鏡を用いて画像化した。全 PPT1 バリエーションによる取込みは、WT PPT1 によるよりも高かった；PPT1-104 及び PPT1-117 は、最も高い取込みレベルを示した（図 6 4 B）。

【0304】

実施例 16 NAGLU 構築体の分析

シグナルペプチドと NAGLU タンパク質との間に N 末端 vIGF2 タグを挿入した組換えヒト NAGLU タンパク質を含むミュータント融合タンパク質を、図 6 5 に示すように設計した。vIGF2（配列番号 80）、vIGF2-17（配列番号 106）、vIGF2-31（配列番号 120）、及び vIGF2-32（配列番号 121）を含む融合タンパク質が挙げられるいくつかのバリエーションを調製した。融合タンパク質を、HEK293F 細胞中で発現させた。溶解液及び培地画分中の、ab214671（R&D Systems）によるウェスタンブロットティングによって判定した NAGLU 含量を、試験した融合タンパク質毎に示す（図 6 6 A～図 6 6 B）。融合タンパク質毎の条件培地中の酵素活性を、4-MU アッセイによって判定した（図 6 6 C）。条件培地中のタンパク質量は正規化／平均化しなかった。活性データは、タンパク質の等しい量の相対比活性ではなく、条件培地中への構築体の相対分泌を表す。図 6 6 に見られるように、バリエーション IGF2 の存在は、タグ付けされていない NAGLU と比較して、発現及び分泌の低下に至っ

た。しかしながら、IGF2 タグ付き NAGLU の CIMPR 結合は、タグ付けされていない NAGLU と比較して、有意に向上した（図 67）。特に、WT と比較して約 2.5 倍少ない IGF2 タグ付き NAGLU を、結合アッセイのためのインプットとして用いた（固定された受容体に結合した WT と比較して、タグ付きはさらに多い）。

【0305】

実施例 17 TPP1 構築体の分析

IGF2 バリエーションに連結された TPP1 融合タンパク質を発現する一連の核酸構築体を設計して、発現、分泌、及び CIMPR 結合について試験した。融合タンパク質は、シグナルペプチド（配列番号 179、バリエーション IGF2 配列（配列番号 80、106、111、133、119～121）、GS リンカー（GGGSGGGGS、配列番号 186）、リソソーム切断部位（RPRAVPTQA、配列番号 188）、TPP1 プロペプチド（配列番号 45）、及び TPP1 成熟ペプチド（配列番号 46）を含む。N 末端に、そして C 末端に vIGF2 タグを付けた構築体を生成して、試験した。設計且つ試験した PPT1 融合タンパク質の例を表 11 に示す。

【0306】

【表 104】

表11. TPP1融合構築体

PPT1 構築体	配列番号
pSvelte001-天然 TPP1 シグナルペプチド-vIGF2 – GS リンカー-Lyso 切断-TPP1 プロペプチド-TPP1 成熟ペプチド	47
pSvelte057 -天然 TPP1 シグナルペプチド-vIGF2v17 – GS リンカー-Lyso 切断-TPP1 プロペプチド-TPP1 成熟ペプチド	48
pSvelte059 -天然 TPP1 シグナルペプチド-vIGF2v22 – GS リンカー-Lyso 切断-TPP1 プロペプチド-TPP1 成熟ペプチド	49
pSvelte060 -天然 TPP1 シグナルペプチド-vIGF2v24- GS リンカー-Lyso 切断-TPP1 プロペプチド-TPP1 成熟ペプチド	50
pSvelte061 -天然 TPP1 シグナルペプチド-vIGF2v30 – GS リンカー-Lyso 切断-TPP1 プロペプチド-TPP1 成熟ペプチド	51
pSvelte062 -天然 TPP1 シグナルペプチド-vIGF2v31 – GS リンカー-Lyso 切断-TPP1 プロペプチド-TPP1 成熟ペプチド	52
pSvelte063-天然 TPP1 シグナルペプチド-vIGF2v32 – GS リンカー-Lyso 切断-TPP1 プロペプチド-TPP1 成熟ペプチド	53

10

20

30

40

50

【0307】

発現及び分泌

構築体毎に、Freestyle 293細胞 (Freestyle 293培地の1.5ml中370万個の細胞)を、1mg/ml PEI及び3µg DNAの9µlにより形質移入して、24ウェルディープウェルプレート内で振盪条件 (37℃、5%CO₂、80%RH、250RPM) 下で増殖させた。形質移入の約24時間後に、バルプロ酸 (最終濃度2.2mM) 及び追加の1.5ml freestyle培地を形質移入に加えた。培養体を、形質移入の3日後に収穫して、遠心分離して、細胞及び条件培地を分離した。条件培地中のタンパク質を、SDS-PAGEゲル上で分離させて、ニトロセルロース膜に移した。膜を、5%ミルクでブロックして、抗TPP1 (abcam EPR16537) 及びLicor抗ウサギ800CW (926-32213) で探査した。プロットを画像化して、バンドを、図68に示すように、Licor Odyssey CLXで定量化した。

10

【0308】

CIMPR結合

CIMPR結合を、本質的に、実施例10に記載するように測定した。結果を図69に示す。rhTPP1 (R&D system#2237-SE-010、マウス骨髄腫NS0細胞中で発現させた) 及びWT TPP1 (配列番号8) を対照として含めた。図69に示すように、新規のTPP1構築体は全て、rhTPP1と比較して、結合の向上を示した。

20

【0309】

実施例18 新規のPPT1バリエーションCLN1マウスモデルの試験

PPT1-101 (配列番号60) 構築体及びPPT1-104 (配列番号61) 構築体を、CLN1^{R151X}マウスモデルにおいて試験した (Miller, 2014, Human Molecular Genetics, 24 (1) 185-196)。PPT1-101 (配列番号228) 及びPPT1-104 (配列番号235) のコード配列を含む遺伝子治療構築体を調製した。出産後1日目 (P1) のマウスに、ウイルス構築体 (又はPBS対照) を、5×10¹⁰、1×10¹⁰、又は1×10⁹vg/動物の用量にて側脳室内に注入した。野生型PPT1 (p546) を対照として含めた。導入遺伝子を、AAV9ベクターを用いて導入した。転帰を、生後2ヵ月にて評価した。

30

【0310】

導入遺伝子発現

ヒトCLN1導入遺伝子発現を、RT-qPCRによって検出した。図70に見られるように、脳抽出物及び脊髄抽出物は、種々の構築体間で類似した遺伝子発現を示し、皮質において発現がより高かった。

【0311】

蓄自家蛍光素材の引下げ

図71～図72は、各構築体の、リソソーム機能不全の相関物である脳蓄自家蛍光素材 (ASM) 蓄積に及ぼす効果を示す。皮質における5×10¹⁰及び1×10¹⁰の用量にて、そして視床における1×10¹⁰及び1×10⁹の用量にて、101構築体及び104構築体は、WT p546構築体と比較して、ASMのより大きな引下げに向かう。

40

【0312】

神経膠線維性酸性タンパク質 (GFAP) の引下げ

図73は、各構築体の、アストログリオシス及び神経炎症の相関物である神経膠線維性酸性タンパク質 (GFAP) に及ぼす効果を示す。皮質における1×10⁹の用量にて、104構築体は、GFAPのより大きな引下げに向かった。皮質における1×10⁹の用量にて、104構築体は、GFAPのより大きな引下げに向かった。視床における1×10¹⁰の用量にて、101構築体は、GFAPのより大きな引下げに向かった。GFAP陽性細胞は、反応性星状細胞表現型と形態学的に一致していた。

【0313】

50

ゆえに、新規の P P T 1 1 0 1 遺伝子治療構築体及び P P T 1 1 0 4 遺伝子治療構築体は、C L N 1 マウスモデルにおける野生型 P P T 1 と比較して、交差補正の向上を示し、皮質及び視床における A S M 及び G F A P の双方のより大きな引下げに至った。

【 0 3 1 4 】

本発明の好ましい実施形態が、本明細書中で示されて説明されてきたが、当業者にとって、そのような実施形態は、一例としてのみ提供されることが明らかであろう。多数の変形、変更、及び置換が直ちに、本発明を逸脱しない範囲で、当業者に思い浮かぶであろう。本明細書中に記載される実施形態に対する種々の代替物が使用されてもよいことを理解すべきである。以下の特許請求の範囲が、本発明の範囲を定義すること、そして特許請求の範囲内の方法及び構造、並びにそれらの均等物が、特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

10

【 図 面 】

【 図 1 】

【 図 2 】

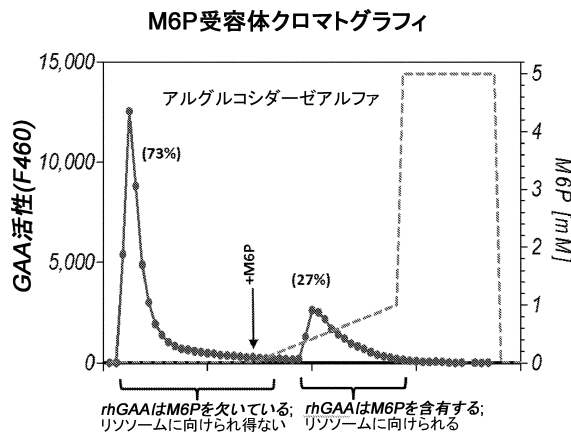


図1

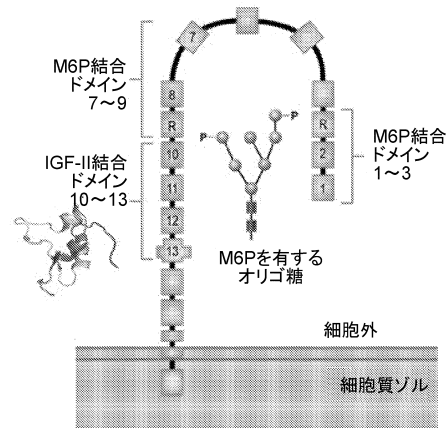


図2

20

30

40

50

【図 3】

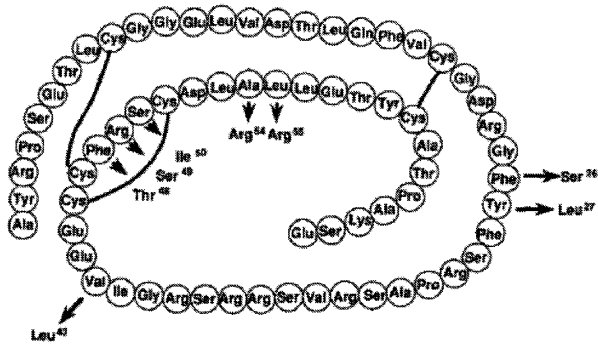


FIG. 3

【図 4】

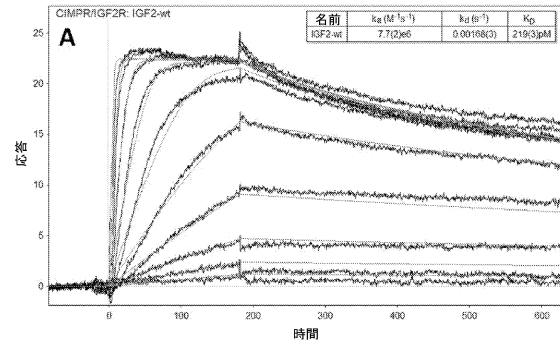


図4

【図 5】

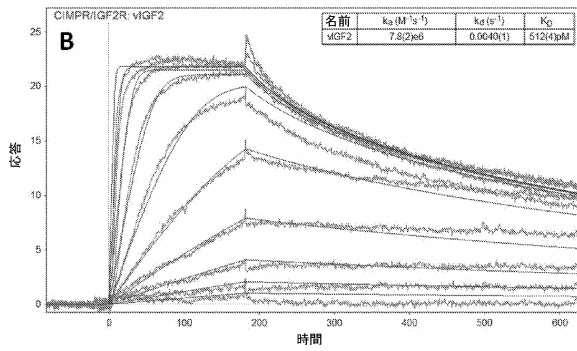


図5

【図 6】

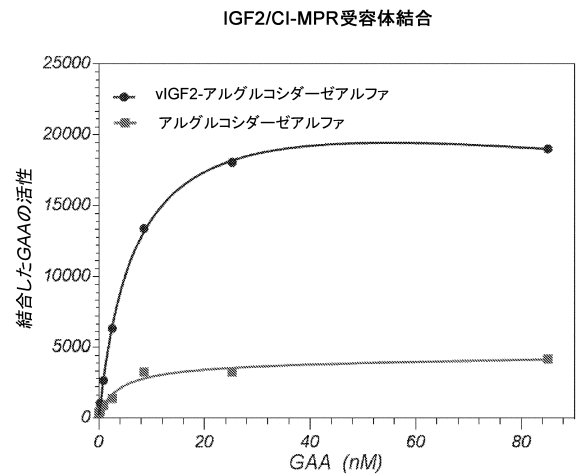


図6

10

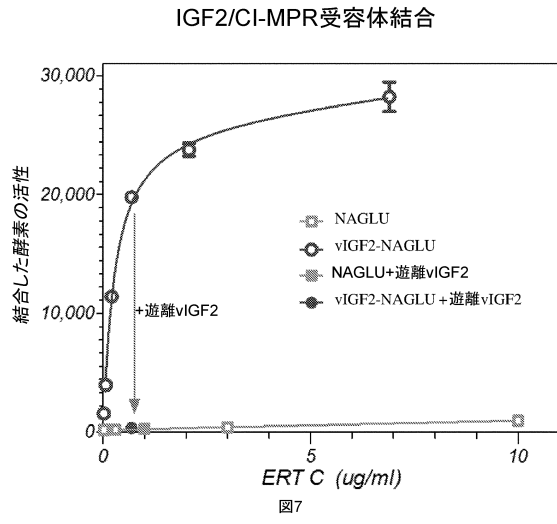
20

30

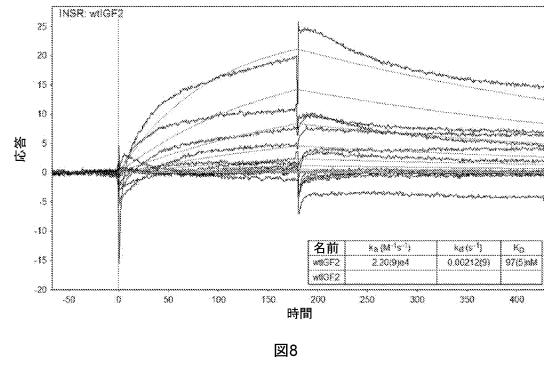
40

50

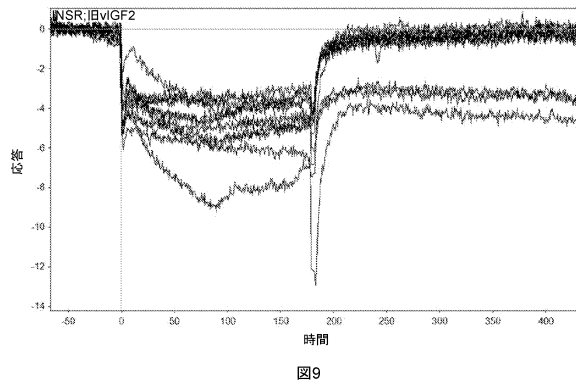
【 図 7 】



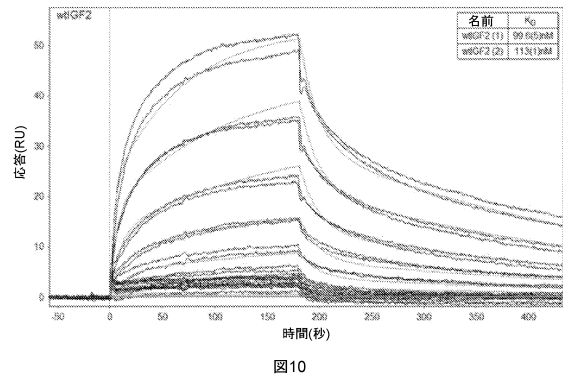
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



10

20

30

40

50

【図 1 1】

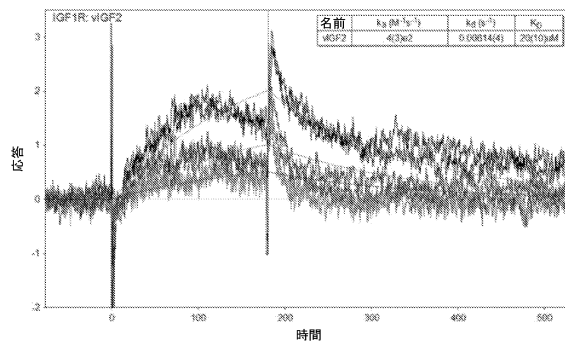


図11

【図 1 2】

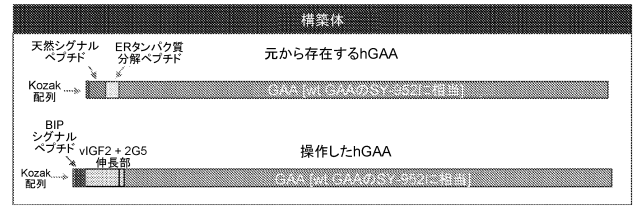


図12

10

【図 1 3】

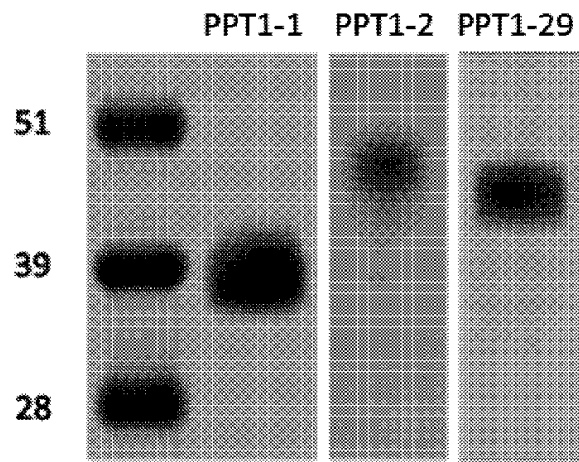


FIG. 13

【図 1 4】

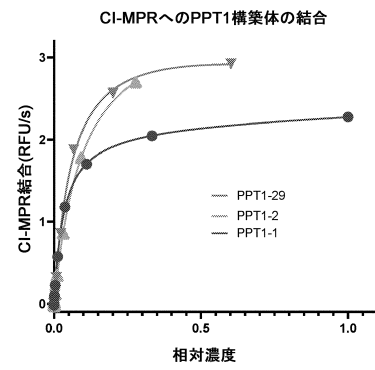


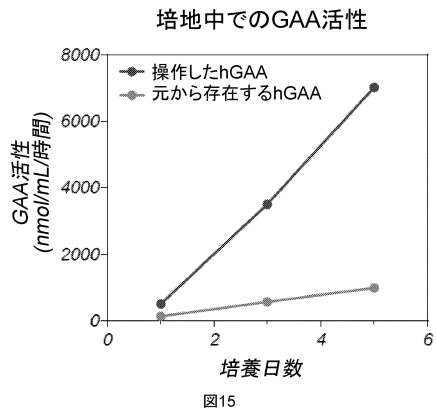
図14

30

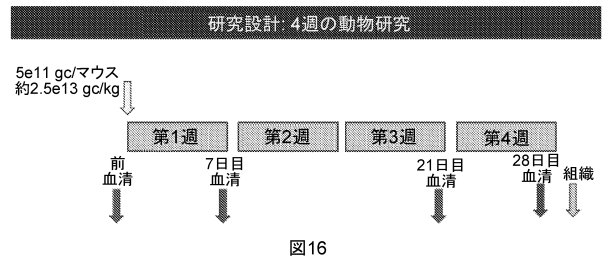
40

50

【図 15】

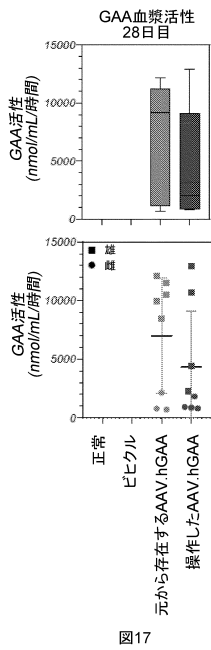


【図 16】

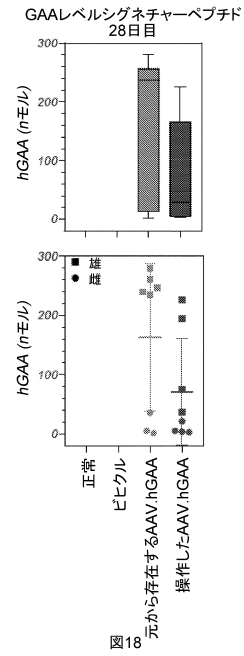


10

【図 17】



【図 18】



20

30

40

50

【図 19】

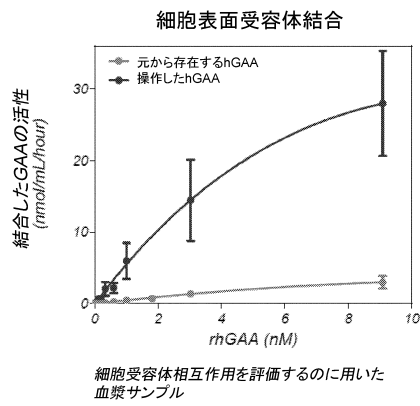


図19

【図 20】

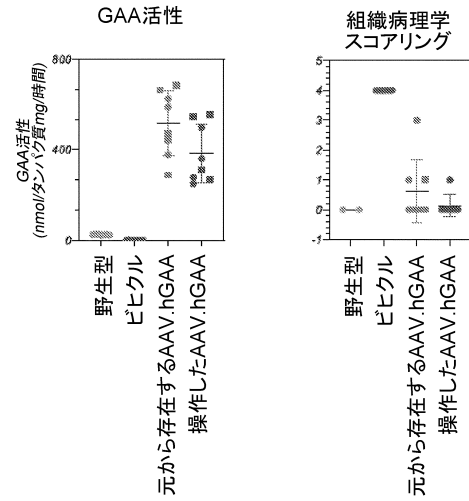


図20

【図 21】

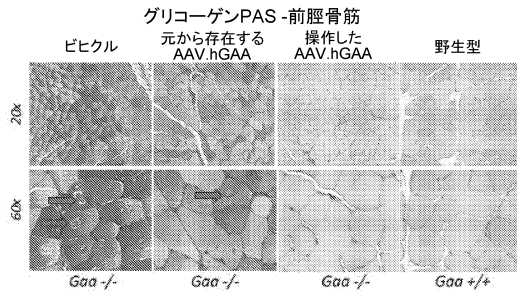


図21

【図 22】

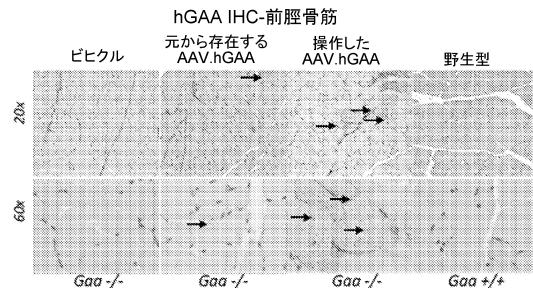


図22

10

20

30

40

50

【図 2 3】

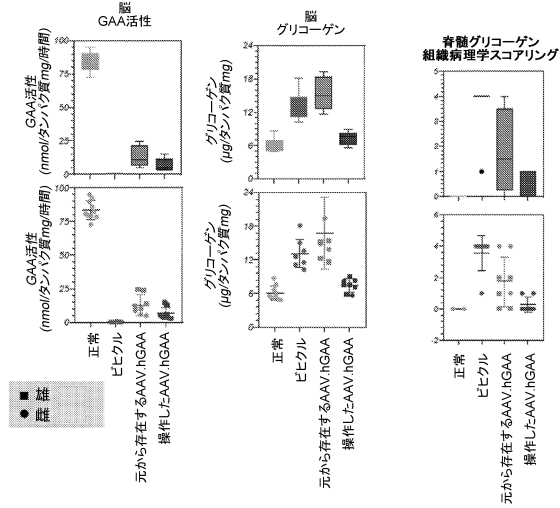


図23

【図 2 4】

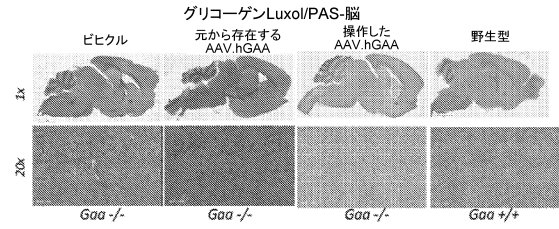


図24

10

20

【図 2 5】

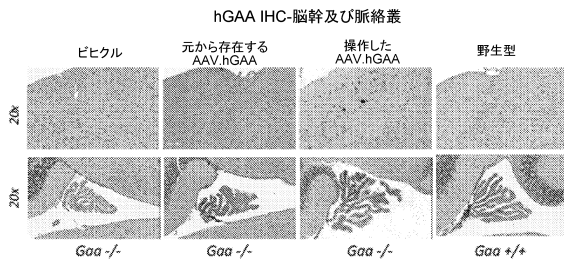


図25

【図 2 6】

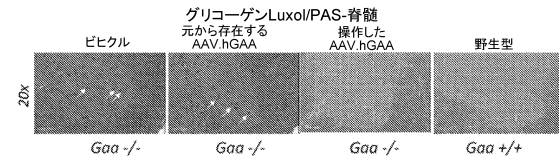


図26

30

40

50

【図 2 7】

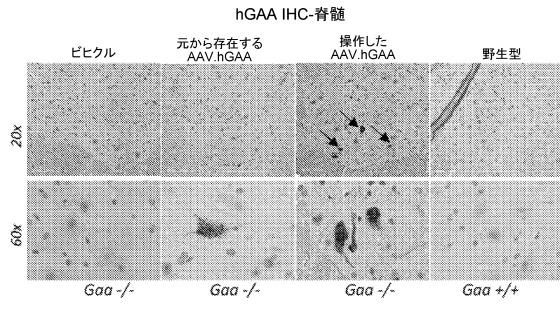


図27

【図 2 8】

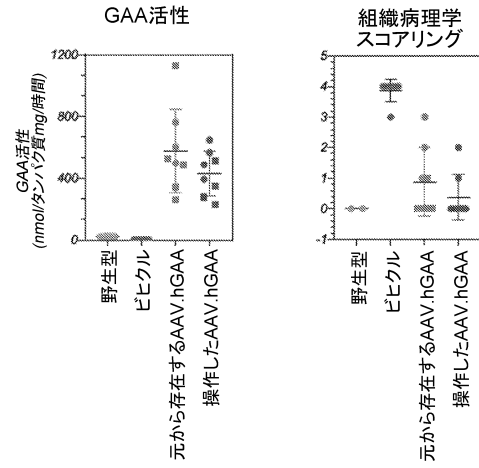


図28

【図 2 9】

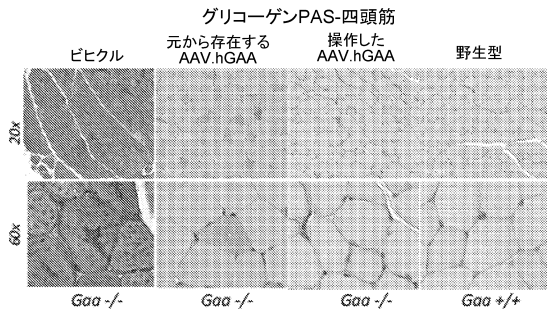


図29

【図 3 0】

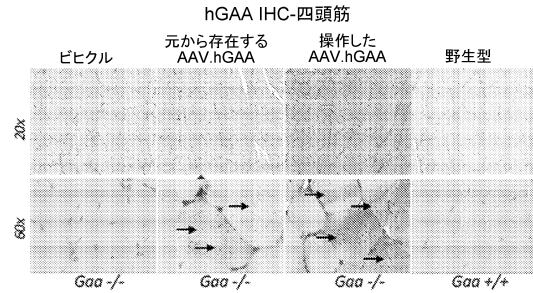


図30

10

20

30

40

50

【図 3 1】

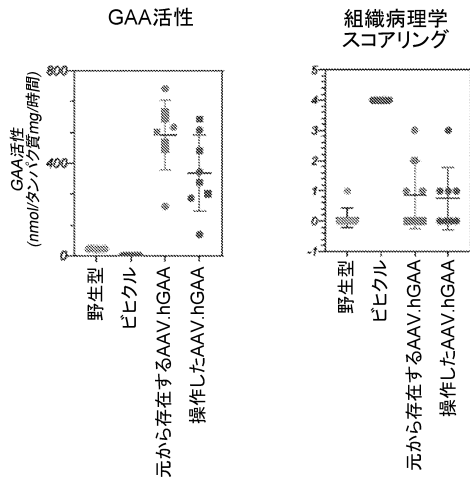


図31

【図 3 2】

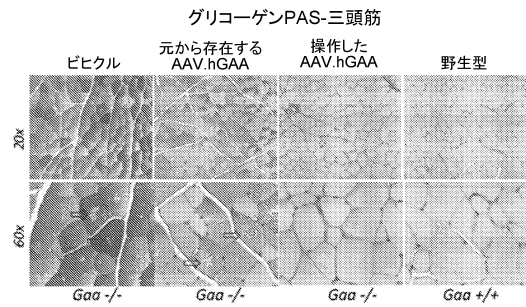


図32

【図 3 3】

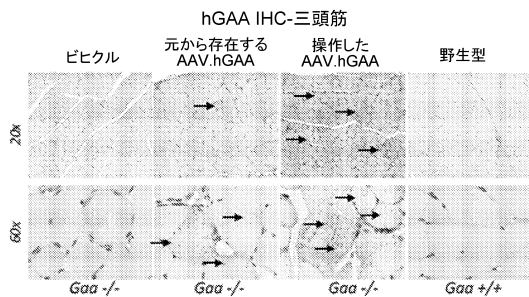


図33

【図 3 4】

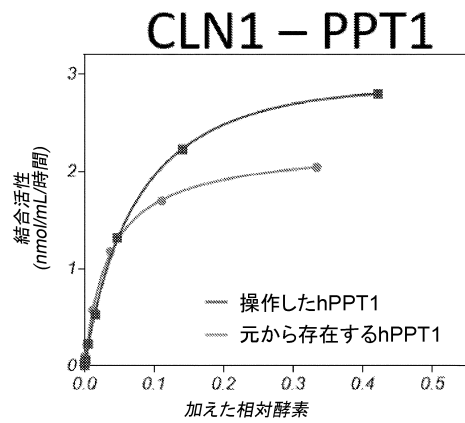


図34

10

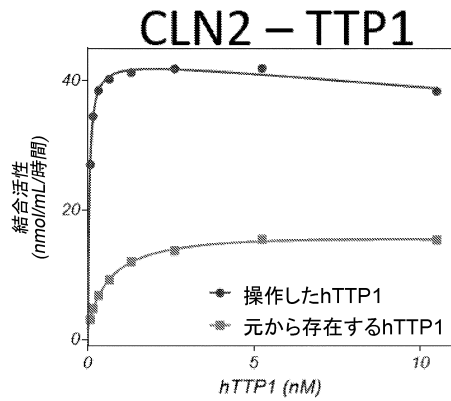
20

30

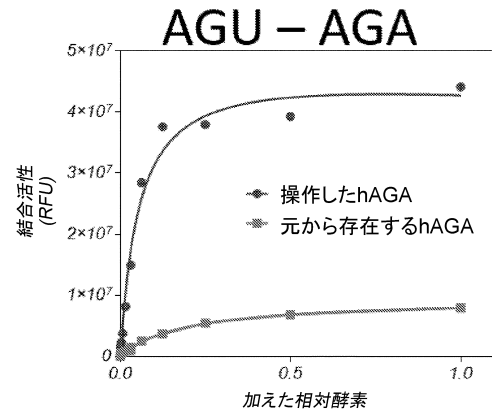
40

50

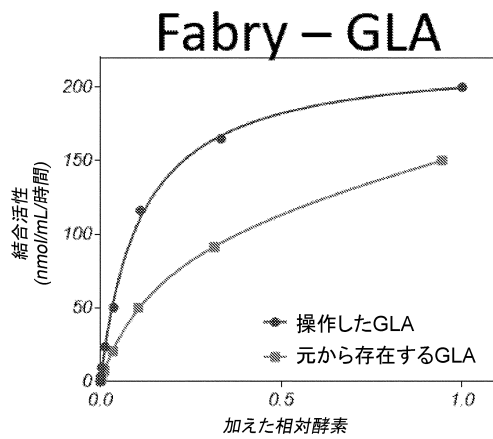
【図 3 5】



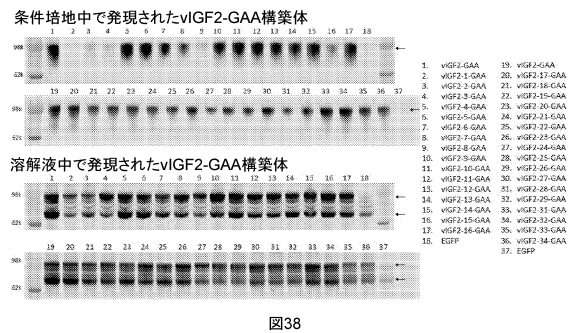
【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



10

20

30

40

50

【図 39】

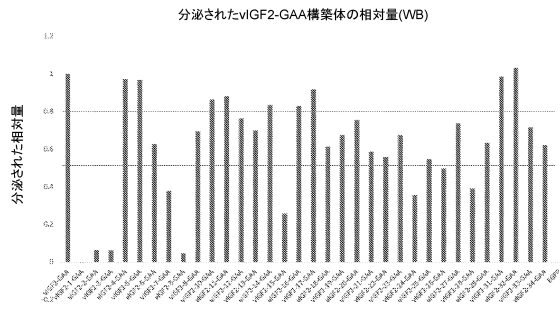


図39

【図 40】

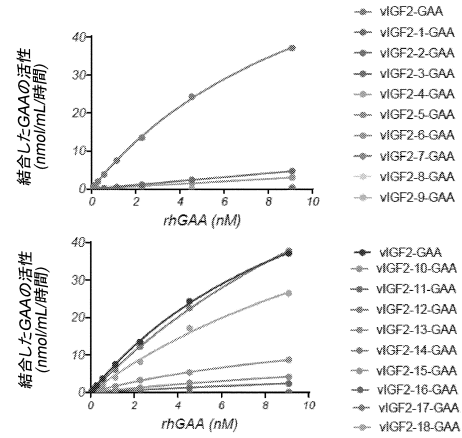


図40

10

【図 41】

構築体	Bmax (nmol/mL/hr)	Kd (nM)
viGF2-GAA	85	12
viGF2-1-GAA	-	-
viGF2-2-GAA	-	-
viGF2-3-GAA	-	-
viGF2-4-GAA	-	-
viGF2-5-GAA	-	-
viGF2-6-GAA	-	-
viGF2-7-GAA	-	-
viGF2-8-GAA	-	-
viGF2-9-GAA	-	-
viGF2-10-GAA	21	13
viGF2-11-GAA	-	-
viGF2-12-GAA	-	-
viGF2-13-GAA	16	25
viGF2-14-GAA	-	-
viGF2-15-GAA	-	-
viGF2-16-GAA	14	45
viGF2-17-GAA	124	21
viGF2-18-GAA	82	19

図41

【図 42】

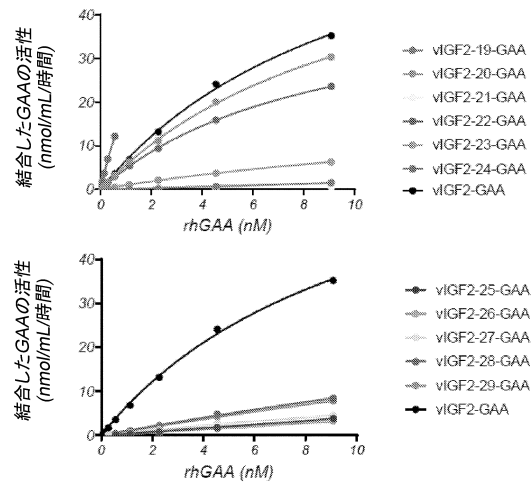


図42

20

30

40

50

【図 4 3】

構築体	Bmax (nmol/mL/hr)	Kd (nM)
vIGF2-GAA	78	11
vIGF2-19-GAA	-	-
vIGF2-20-GAA	-	-
vIGF2-21-GAA	67	11
vIGF2-22-GAA	46	8.7
vIGF2-23-GAA	20	19
vIGF2-24-GAA	50	1.8
vIGF2-25-GAA	-	-
vIGF2-26-GAA	-	-
vIGF2-27-GAA	24	39
vIGF2-28-GAA	66	62
vIGF2-29-GAA	69	70

図43

【図 4 4】

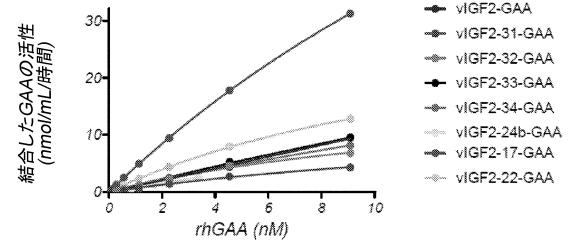


図44

10

20

【図 4 5】

構築体	Bmax (nmol/mL/hr)	Kd (nM)
vIGF2-GAA	-	-
vIGF2-31-GAA	14	20
vIGF2-32-GAA	18	15
vIGF2-33-GAA	87	74
vIGF2-34-GAA	54	51
vIGF2-17-GAA	132	29
vIGF2-22-GAA	35	16
vIGF2-24b-GAA	-	-

図45

【図 4 6】

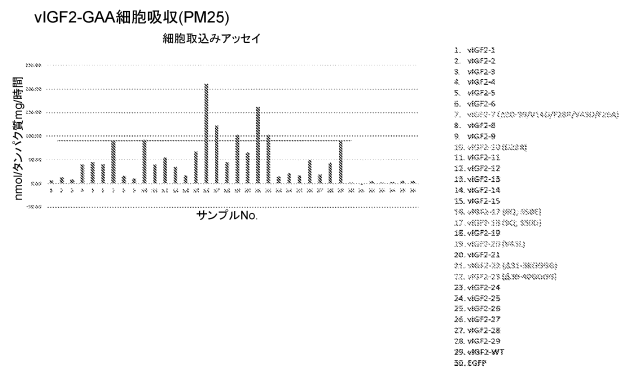


図46

30

40

50

【図 5 5】

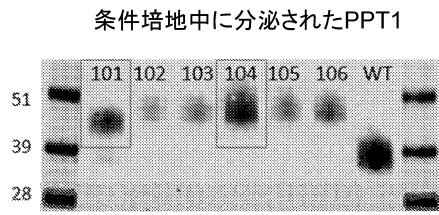


図55

【図 5 6】

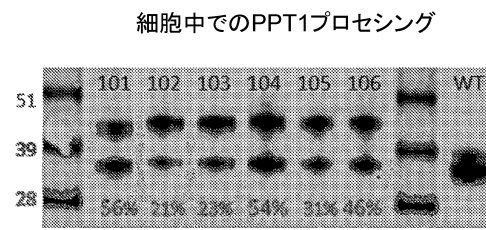


図56

10

【図 5 7】

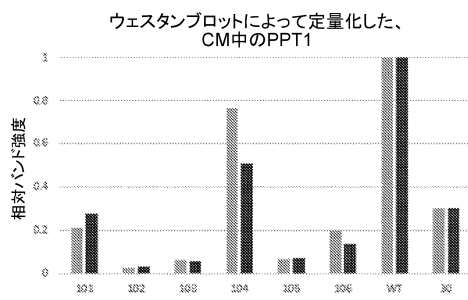


図57

【図 5 8】

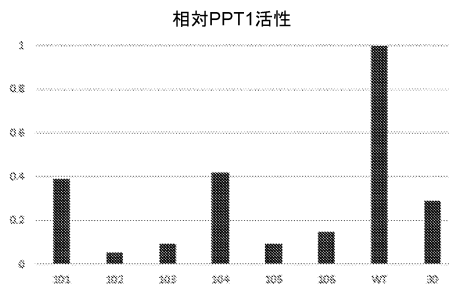


図58

20

30

40

50

【図 59】

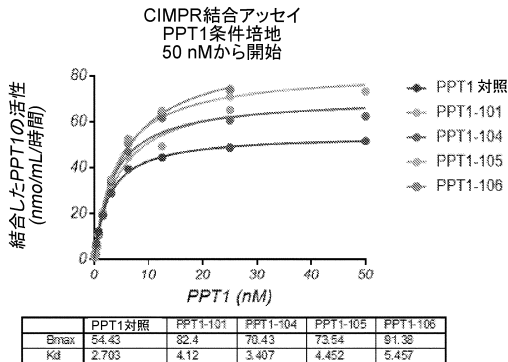


図59

【図 60】

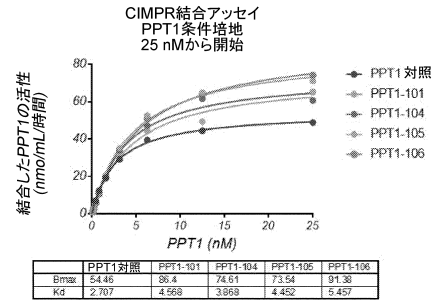


図60

10

【図 61 - 1】

コンセンサス
1. v1GF2
2. v1GF2-17
3. v1GF2-18
4. v1GF2-23

-----SNTLCGGELVDTLQFYCCDRGFLSRPASRVSRSSRGIVECCFRSCDLALLETCATPARS
1 -----SNTLCGGELVDTLQFYCCDRGFLSRPASRVSRSSRGIVECCFRSCDLALLETCATPARS 62
2 -----SNTLCGGELVDTLQFYCCDRGFLSRPASRVSRSSRGIVECCFRSCDLALLETCATPARS 62
3 -----SNTLCGGELVDTLQFYCCDRGFLSRPASRVSRSSRGIVECCFRSCDLALLETCATPARS 62
4 -----SNTLCGGELVDTLQFYCCDRGFLSRPASRVSRSSRGIVECCFRSCDLALLETCATPARS 62

EGGGSGGGGSRPGPRDAQHPRRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQCCGARGCCYIPAKQGLQAGMGQWCFPP
1 EGGGSGGGGSRPGPRDAQHPRRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQCCGARGCCYIPAKQGLQAGMGQWCFPP 140
2 EGGGSGGGGSRPGPRDAQHPRRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQCCGARGCCYIPAKQGLQAGMGQWCFPP 140
3 EGGGSGGGGSRPGPRDAQHPRRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQCCGARGCCYIPAKQGLQAGMGQWCFPP 140
4 EGGGSGGGGSRPGPRDAQHPRRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQCCGARGCCYIPAKQGLQAGMGQWCFPP 138

PSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVMETENLHFTIKDPANRRYVPLETPHVNRSAPSLYS
1 PSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVMETENLHFTIKDPANRRYVPLETPHVNRSAPSLYS 222
2 PSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVMETENLHFTIKDPANRRYVPLETPHVNRSAPSLYS 222
3 PSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVMETENLHFTIKDPANRRYVPLETPHVNRSAPSLYS 222
4 PSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVMETENLHFTIKDPANRRYVPLETPHVNRSAPSLYS 218

VFSEEPFGVIVRRQDGRVLLNTTVAFLFAQFLQLSTLSPQYITGLAHLSPMLSLSTWTRITLWNRDLAPTPGAN
1 VFSEEPFGVIVRRQDGRVLLNTTVAFLFAQFLQLSTLSPQYITGLAHLSPMLSLSTWTRITLWNRDLAPTPGAN 302
2 VFSEEPFGVIVRRQDGRVLLNTTVAFLFAQFLQLSTLSPQYITGLAHLSPMLSLSTWTRITLWNRDLAPTPGAN 302
3 VFSEEPFGVIVRRQDGRVLLNTTVAFLFAQFLQLSTLSPQYITGLAHLSPMLSLSTWTRITLWNRDLAPTPGAN 302
4 VFSEEPFGVIVRRQDGRVLLNTTVAFLFAQFLQLSTLSPQYITGLAHLSPMLSLSTWTRITLWNRDLAPTPGAN 298

LYGSHPFYALGEGGSAHGVFLKSNANDVLLQSPALSWSRSGGILDVYFLGPEPKSVVQYLQVGVYFPPFPYWGLE
1 LYGSHPFYALGEGGSAHGVFLKSNANDVLLQSPALSWSRSGGILDVYFLGPEPKSVVQYLQVGVYFPPFPYWGLE 382
2 LYGSHPFYALGEGGSAHGVFLKSNANDVLLQSPALSWSRSGGILDVYFLGPEPKSVVQYLQVGVYFPPFPYWGLE 382
3 LYGSHPFYALGEGGSAHGVFLKSNANDVLLQSPALSWSRSGGILDVYFLGPEPKSVVQYLQVGVYFPPFPYWGLE 382
4 LYGSHPFYALGEGGSAHGVFLKSNANDVLLQSPALSWSRSGGILDVYFLGPEPKSVVQYLQVGVYFPPFPYWGLE 378

FHLCRWGSSTAITRQVVENMTRAHFLDQVQNDLDYDSRRDFTFNKDFROFFANVQLHGGRYVMIVDPAISGSG
1 FHLCRWGSSTAITRQVVENMTRAHFLDQVQNDLDYDSRRDFTFNKDFROFFANVQLHGGRYVMIVDPAISGSG 462
2 FHLCRWGSSTAITRQVVENMTRAHFLDQVQNDLDYDSRRDFTFNKDFROFFANVQLHGGRYVMIVDPAISGSG 462
3 FHLCRWGSSTAITRQVVENMTRAHFLDQVQNDLDYDSRRDFTFNKDFROFFANVQLHGGRYVMIVDPAISGSG 462
4 FHLCRWGSSTAITRQVVENMTRAHFLDQVQNDLDYDSRRDFTFNKDFROFFANVQLHGGRYVMIVDPAISGSG 460

PAGSYRYPDEGLRGVFTINETGQLIGKVPMSSTAFDFNTPTALAWEDVAFEDQVPPFGMNIQNEPFIKSGE
1 PAGSYRYPDEGLRGVFTINETGQLIGKVPMSSTAFDFNTPTALAWEDVAFEDQVPPFGMNIQNEPFIKSGE 542
2 PAGSYRYPDEGLRGVFTINETGQLIGKVPMSSTAFDFNTPTALAWEDVAFEDQVPPFGMNIQNEPFIKSGE 542
3 PAGSYRYPDEGLRGVFTINETGQLIGKVPMSSTAFDFNTPTALAWEDVAFEDQVPPFGMNIQNEPFIKSGE 542
4 PAGSYRYPDEGLRGVFTINETGQLIGKVPMSSTAFDFNTPTALAWEDVAFEDQVPPFGMNIQNEPFIKSGE 528

図61

【図 61 - 2】

DGCPMNELENPPYVPGVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHLYGLTEATASHRALVKAROTRPFVISRSTFAGHGRYA
1 DGCPMNELENPPYVPGVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHLYGLTEATASHRALVKAROTRPFVISRSTFAGHGRYA 622
2 DGCPMNELENPPYVPGVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHLYGLTEATASHRALVKAROTRPFVISRSTFAGHGRYA 622
3 DGCPMNELENPPYVPGVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHLYGLTEATASHRALVKAROTRPFVISRSTFAGHGRYA 622
4 DGCPMNELENPPYVPGVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHLYGLTEATASHRALVKAROTRPFVISRSTFAGHGRYA 618

SHWTDGVWSMEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGVADVCGLONTSEELCVMTQLGAFYPMFRNHSLSLPQEPYSFSEP
1 SHWTDGVWSMEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGVADVCGLONTSEELCVMTQLGAFYPMFRNHSLSLPQEPYSFSEP 702
2 SHWTDGVWSMEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGVADVCGLONTSEELCVMTQLGAFYPMFRNHSLSLPQEPYSFSEP 702
3 SHWTDGVWSMEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGVADVCGLONTSEELCVMTQLGAFYPMFRNHSLSLPQEPYSFSEP 702
4 SHWTDGVWSMEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGVADVCGLONTSEELCVMTQLGAFYPMFRNHSLSLPQEPYSFSEP 698

AQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTDHQLLWGEALLITPVLQAGKAETVGYPLG
1 AQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTDHQLLWGEALLITPVLQAGKAETVGYPLG 782
2 AQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTDHQLLWGEALLITPVLQAGKAETVGYPLG 782
3 AQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTDHQLLWGEALLITPVLQAGKAETVGYPLG 782
4 AQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTDHQLLWGEALLITPVLQAGKAETVGYPLG 778

TWYDLQTVPEALGSLPPPAAPREPAIHSEGGQWTLPAPLDTINVHLRAGYIIPQLQPLTTTESRQQPMALAVALTG
1 TWYDLQTVPEALGSLPPPAAPREPAIHSEGGQWTLPAPLDTINVHLRAGYIIPQLQPLTTTESRQQPMALAVALTG 862
2 TWYDLQTVPEALGSLPPPAAPREPAIHSEGGQWTLPAPLDTINVHLRAGYIIPQLQPLTTTESRQQPMALAVALTG 862
3 TWYDLQTVPEALGSLPPPAAPREPAIHSEGGQWTLPAPLDTINVHLRAGYIIPQLQPLTTTESRQQPMALAVALTG 862
4 TWYDLQTVPEALGSLPPPAAPREPAIHSEGGQWTLPAPLDTINVHLRAGYIIPQLQPLTTTESRQQPMALAVALTG 858

GEARGELFMDGSELEVLERGAYTVIFLARNTIYNELVRYTSEGAGLQKQVTLGVATAPQVLSNGVPSNFTYSP
1 GEARGELFMDGSELEVLERGAYTVIFLARNTIYNELVRYTSEGAGLQKQVTLGVATAPQVLSNGVPSNFTYSP 942
2 GEARGELFMDGSELEVLERGAYTVIFLARNTIYNELVRYTSEGAGLQKQVTLGVATAPQVLSNGVPSNFTYSP 942
3 GEARGELFMDGSELEVLERGAYTVIFLARNTIYNELVRYTSEGAGLQKQVTLGVATAPQVLSNGVPSNFTYSP 942
4 GEARGELFMDGSELEVLERGAYTVIFLARNTIYNELVRYTSEGAGLQKQVTLGVATAPQVLSNGVPSNFTYSP 938

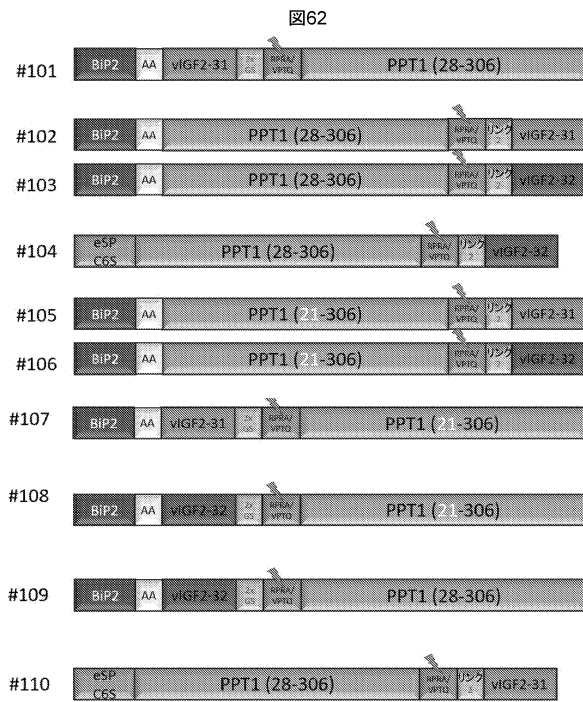
DTKVLDICVSLLMGEQLVSWC
1 DTKVLDICVSLLMGEQLVSWC 964
2 DTKVLDICVSLLMGEQLVSWC 964
3 DTKVLDICVSLLMGEQLVSWC 964
4 DTKVLDICVSLLMGEQLVSWC 960

図61 (続き)

40

50

【図 6 2 - 1】



【図 6 2 - 2】

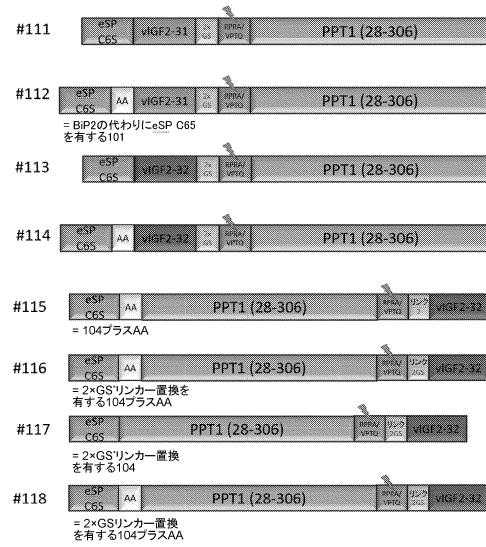
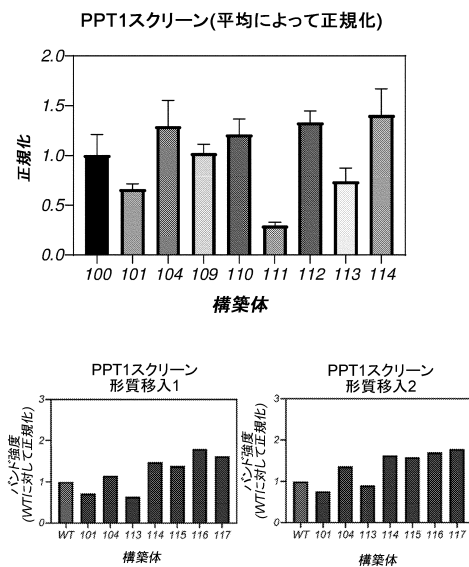


図62 (続き)

【図 6 3】

図63

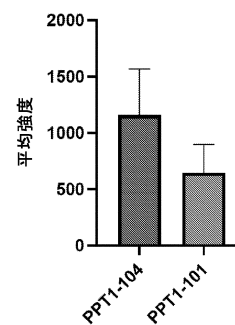


【図 6 4】

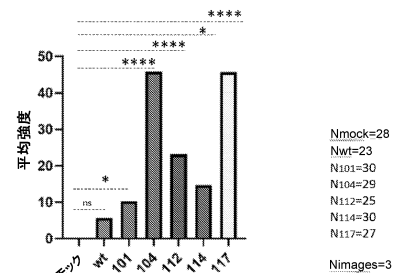
図64

A

PPT1 AF680



B



10

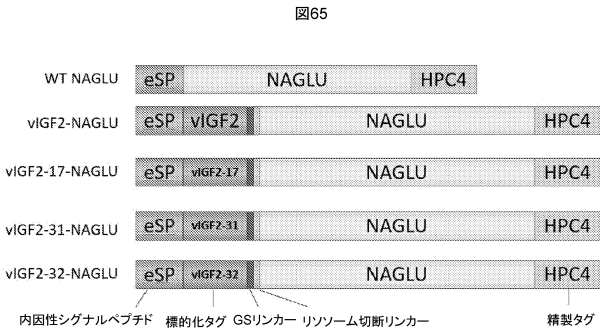
20

30

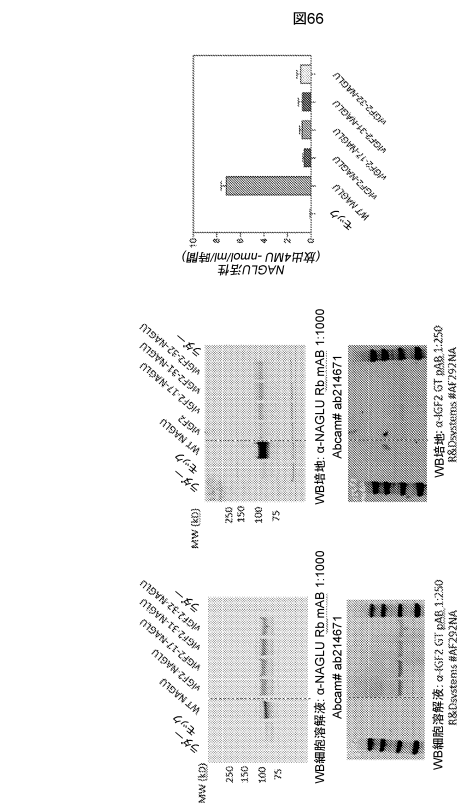
40

50

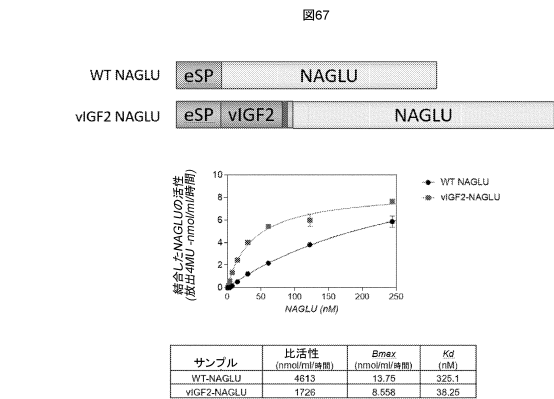
【図 6 5】



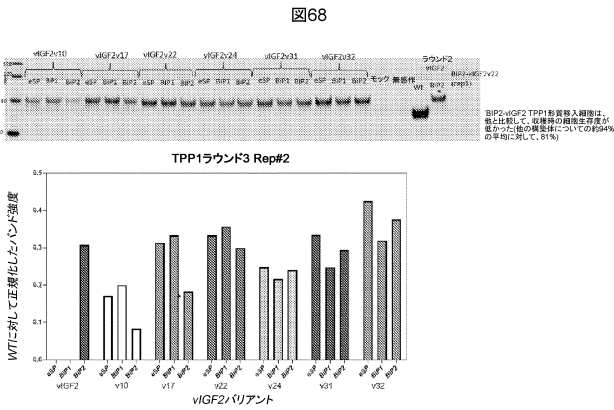
【図 6 6】



【図 6 7】



【図 6 8】



10

20

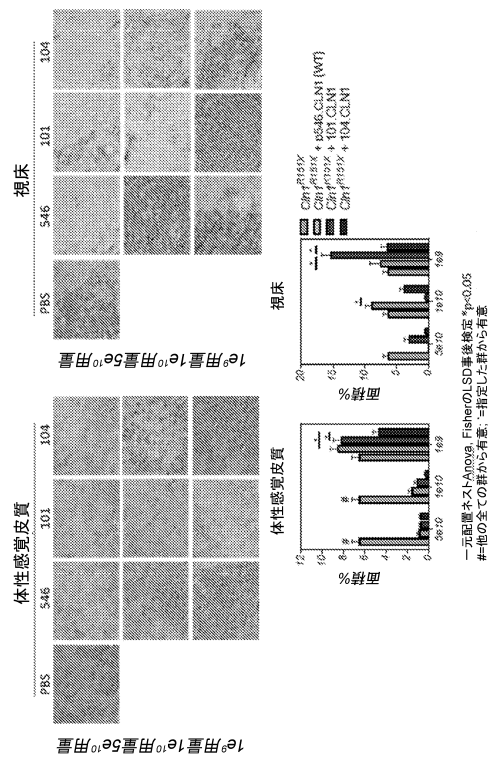
30

40

50

【図 7 3】

図73



10

20

【配列表】

2022552254000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/055251

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/30; C07K 14/65; C12N 15/62 (2020.01)

CPC - A61K 38/30; C07K 14/65; C07K 2319/00; C12N 15/62 (2020.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

see Search History document

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

see Search History document

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

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/082080 A2 (CALLIDUS BIOPHARMA, INC.) 30 May 2014 (30.05.2014) entire document	47, 48
--		
Y		1, 2, 4, 18, 19, 49, 50
X	US 2017/0355744 A1 (BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.) 14 December 2017 (14.12.2017) entire document	67
--		
Y		1, 2, 4, 18, 19, 49, 50
P, X	WO 2019/213180 A1 (AMICUS THERAPEUTICS, INC.) 07 November 2019 (07.11.2019) entire document	1-4, 18, 19, 47-50, 67
A	US 2017/0319710 A1 (AMICUS THERAPEUTICS, INC.) 09 November 2017 (09.11.2017) entire document	1-4, 18, 19, 47-50, 67
A	US 2012/0195896 A1 (GLASS et al) 02 August 2012 (02.08.2012) entire document	1-4, 18, 19, 47-50, 67
A	US 2019/0194728 A1 (IMMUNEXPRESS PTY LTD) 27 June 2019 (27.06.2019) entire document	1-4, 18, 19, 47-50, 67

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 January 2021

Date of mailing of the international search report

03 FEB 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/055251

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 4, 8, 46-54, 90-103, 106, 109, 111, 119-121, and 169-197 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/055251

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-17, 20-40, 51-00
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54		
C 1 2 N	15/56 (2006.01)	C 1 2 N	15/56		
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63		Z
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861		Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0	Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867		Z
C 1 2 N	15/863 (2006.01)	C 1 2 N	15/863		Z
C 1 2 N	15/869 (2006.01)	C 1 2 N	15/869		Z
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86		Z
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		
C 0 7 K	14/575 (2006.01)	C 0 7 K	14/575		
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47		
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62		Z
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02		
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/761		
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	35/763		
A 6 1 K	38/47 (2006.01)	A 6 1 K	47/62		
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/47		
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	38/46		
		A 6 1 K	47/42		

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

ック ドライブ 1

(72)発明者 ゴッシャル, ラッセル

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 5 1 2, クランバリー, シダー ブルック ドライブ 1

(72)発明者 リュウ, セ フェン

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 5 1 2, クランバリー, シダー ブルック ドライブ 1

F ターム (参考)

4B065 AA95X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44

4C076 AA95 BB11 BB13 BB15 BB16 CC01 CC07 CC21 CC27 CC29
CC41 EE41 EE59

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA03 BA41 BA44 DC22 DC50 MA05
MA66 NA05 NA13 ZA011 ZA151 ZB091 ZB211 ZB261 ZC191 ZC211

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA05 MA66 NA05 NA13 ZA01 ZA15
ZB09 ZB21 ZB26 ZC19 ZC21

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA42 DA38 EA28 FA74