(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-515979
(P2025-515979A)
(43)公表日　令和7年5月22日(2025.5.22)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/11　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/12		４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ　15/864 (2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	1/15		４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	1/19		

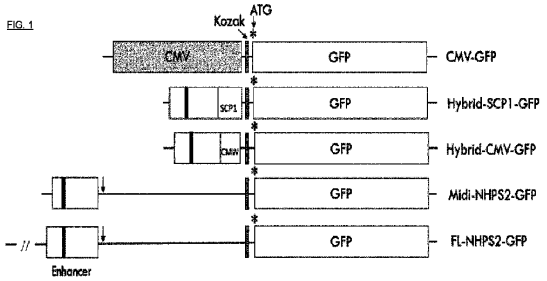
審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全36頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-565108(P2024-565108)
(86)(22)出願日　令和5年4月28日(2023.4.28)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月27日(2024.12.27)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/061388
(87)国際公開番号　WO2023/213738
(87)国際公開日　令和5年11月9日(2023.11.9)
(31)優先権主張番号　22382421.0
(32)優先日　令和4年5月2日(2022.5.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　513020308
フンダシオ ホスピタル ウニベルシタリバル ヘブロン－インスティチュート デ レセルカ
スペイン国 イー－０８０３５ バルセロナ パセイグ バル デブロン １１９－１２９
(71)出願人　521440507
ウニベルシタ アウトノマ デ バルセロナ
スペイン国，０８１９３ バルセロナ セルダニョーラ デル バリェス，カンプス デ ラ ウアベ エセ／エネ，エディフィシア
(71)出願人　513019977
インスティトゥシオ カタラーナ デ レ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ポドサイト特異的発現のための核酸コンストラクト及びベクター

(57)【要約】
本発明は、新規なポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター及びそれを含む遺伝子コンストラクトに関する。本発明はまた、新しい医薬組成物も包含する。それらはすべて、医薬品として使用するためのものであり、特に腎疾患の予防及び／又は治療に使用するためのものである。



10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）配列番号１３（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧ）を含むポドサイト特異的エンハンサー配列、又は配列番号１３と少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有する配列と、
（ｂ）コアプロモーター配列であって、
（ｂ１）配列番号２（ＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ）と８５～１００％の同一性パーセンテージを有する８１ヌクレオチド長の最小コアプロモーター配列、及び
（ｂ２）配列番号２０（ＧＧＣＧＴＴＴＡＣＴＡＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＴＣＧＴＴＴＡＧＴＧＡＡＣＣＧＴＣＡＧＡＴＣ）と８５～１００％の同一性パーセンテージを有する５６ヌクレオチド長の最小コアプロモーター
から選択されるコアプロモーター配列と
を含むポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター。
【請求項２】
配列番号１のポリヌクレオチド配列、又は前記配列番号１（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧＴＡＧＡＡＴＡＡＣＴＡＧＧＧＣＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ）と少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有するヌクレオチド配列のみからなる、請求項１に記載のポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター。
【請求項３】
請求項１～２のいずれかに定義される単離されたポリヌクレオチドハイブリッドプロモーターと、前記ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された目的の遺伝子又は遺伝子の断片のヌクレオチド配列とを含むポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項４】
（ａ）ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列；
（ｂ）タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列；
（ｃ）転写後調節エレメントのヌクレオチド配列；並びに
（ｄ）５’及び３’逆方向末端反復ヌクレオチド配列
のうちの１つ以上をさらに含む、請求項３に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項５】
５’→３’方向に、
（ｉ）５’逆方向末端反復ヌクレオチド配列と、
（ｉｉ）請求項１～２のいずれかに定義される単離されたポリヌクレオチドハイブリッドプロモーターと、
（ｉｉｉ）タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列と、
（ｉｖ）目的の遺伝子又は遺伝子の断片のヌクレオチド配列と、
（ｖ）転写後調節エレメントのヌクレオチド配列と、
（ｖｉ）ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列と、

（ｖｉｉ）３’逆方向末端反復ヌクレオチド配列と
を含む、請求項３又は４のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項６】
前記タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列がコザックコンセンサス配列である、請求項３～５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項７】
前記転写後調節エレメントのヌクレオチド配列が、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）である、請求項３～６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項８】
前記ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列が、ウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）ポリアデニル化シグナル、初期ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル、合成ポリアデニル化シグナル（ＳｐＡ）、及び５０ヌクレオチド未満だけ離れている少なくとも２つの細胞質ポリアデニル化エレメントと、第１又は第２の細胞質ポリアデニル化エレメントから１００ヌクレオチド未満だけ離れている細胞質ポリアデニル化シグナルとを含む目的の遺伝子又は遺伝子の断片のポリヌクレオチド配列に対して３’位（３’－ＵＴＲ）の非翻訳配列から選択される、請求項３～７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項９】
前記ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された前記目的の遺伝子が、
－１つ以上の腎疾患に関連する遺伝子、及び／又は
－最大４．０～５．０キロベース（ｋｂ）の長さを有する遺伝子
から選択される、請求項３～８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項１０】
請求項１若しくは２のいずれかに定義されるポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター、又は請求項３～９のいずれか一項に定義されるポリヌクレオチドコンストラクトを含むベクター。
【請求項１１】
特に血清型ＡＡＶ１９、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ－ＬＫ０３、ＡＡＶ－ＤＪ及びＡＡＶ－ＤＪ／８のうちの１つ以上から選択される、腎細胞及びポドサイトに対する指向性を有するアデノ随伴ウイルスベクター（ＡＡＶ）である、請求項１０に記載のベクター。
【請求項１２】
請求項１若しくは２のいずれかに定義されるポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター、又は請求項３～９のいずれかに記載のポリヌクレオチドコンストラクト、又は請求項１０～１１のいずれかに記載のベクターを含む細胞。
【請求項１３】
治療有効量の請求項３～９のいずれかに記載のポリヌクレオチドコンストラクト、請求項１０～１１のいずれかに記載のベクター又は請求項１２に記載の細胞を、１つ以上の薬学的に許容され得る賦形剤及び／又は担体と一緒に含む医薬組成物。
【請求項１４】
医薬品として使用するための、請求項３～９のいずれかに定義されるポリヌクレオチドコンストラクト、請求項１０～１１のいずれかに定義されるベクター、又は請求項１２に定義される細胞、又は請求項１３に定義される医薬組成物。
【請求項１５】
腎疾患の予防及び／又は治療に使用するための、請求項１４に記載の使用のためのポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本発明は、腎臓のポドサイトにおける遺伝子治療のための遺伝子の選択的発現の分野に関する。
【背景技術】
【０００２】
遺伝子治療の分野では、例えば、動作しない又は非機能性のタンパク質につながる変異遺伝子を置換するために、主な関心事の１つは、目的の細胞（すなわち、標的）に遺伝子のコピーを提供することであり、そこでこの場合その機能を果たすために正しい形態が発現される。
【０００３】
遺伝子治療は、多くの腎疾患の場合など、多くの疾患に対して提案されているアプローチの１つである。
【０００４】
所望の組織又は組織中の細胞における発現のこの標的化は、通常、標的細胞において特異的であるか又は主に作動可能である発現プロモーターと作動可能に連結された目的の遺伝子を含む遺伝子コンストラクト（すなわち、ポリヌクレオチドコンストラクト）を用いて行われる。
【０００５】
この一例は、国際公開第２０２０１４８５４８号の国際特許出願（Ｔｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｂｒｉｓｔｏｌ）に開示されており、この出願では、最小ネフリンプロモーターＮＰＨＳ１の制御下又はポドシンプロモーターＮＰＨＳ２の制御下にあるネフローゼ症候群（ＮＳ）導入遺伝子を含むアデノ随伴ウイルスベクターが提案されている。著者らの目的は、そこで遺伝子治療を行うためにポドサイトを選択的に達成することであった。
【０００６】
したがって、機能性タンパク質に翻訳される遺伝子コンストラクトは、通常、前述のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などの発現ベクターに組み込まれる。
【０００７】
この発現ベクターの使用の主な問題の１つは、転写産物（プレ－ｍＲＮＡ又はｍＲＮＡ）の発現及び最初の安定性を可能にするために必要なエレメントのために、ロードされ得る遺伝子又は断片が低キロベースのものであることである。したがって、およそ１ｋｂを超える動作しない遺伝子の置換を遺伝子治療が目的とする場合、いくつかの相補的コンストラクト（すなわち、遺伝子の異なる断片のトランススプライシング及び連結のために調製されたコンストラクト）が使用され、結果として治療が複雑になる。
【０００８】
より高いキロベースの遺伝子を導入する試みにおいて、最も使用されている戦略の１つは、最小プロモーターを使用し、ＡＡＶ中の調節エレメントの数又は種類を減少させることである。しかしながら、これは、発現が著しく損なわれることを意味することがある。ＡＡＶベクターゲノムは、それらのパッケージング制限のため、長さが４．８キロベース（ｋｂ）に制限されてきた。プラスミドにコードされたベクターのサイズ又はカプシド型に関係なく長さが４．８ｋｂを超えるＡＡＶベクターゲノムは、切断型ゲノム及び深刻な製造／産生の問題を示す。
【０００９】
腎疾患（アルポート症候群）の遺伝子治療を開示する別の文献の例は、国際公開第２０２１１８１１１８号（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｂｒｉｓｔｏｌ　ｅｔ　ａｌ）の国際特許出願に開示されている。この文書は、（２６５ｂｐの）最小ネフリンプロモーターを有するコンストラクトを使用し、これにより著者らはヒトポドサイトに５ｋｂを超える完全な遺伝子（すなわち、ＣＯＬ４ａ３及びＣＯＬ４ａ５）を首尾よく形質導入することができた。発現がポドサイトにおいてであったことが示されているが、損傷した又は非機能性のポドサイトにおいて刺激される発現、パッケージングされたウイルスの選択性及び

ゲノム完全性に関しては何も述べられていない。
【００１０】
遺伝子治療の追加の目的は、さらに、同じ組織の細胞群内の欠陥細胞を標的とすることである。腎疾患の分野では、これは依然として満たされていないニーズであり、例えば発現がポドサイトにおいて優勢であり得る場合であっても、すべてのポドサイトが導入遺伝子を発現し、一方で、これらの損傷した又は非機能性のポドサイトにおける発現をより高い程度で刺激することが望ましい。
【００１１】
したがって、多くの努力が行われてきたが、依然としてカバーされていないニーズ及び遺伝子治療を首尾よく効率的に行う遺伝子治療のための代替方法のニーズがある。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１２】
【特許文献１】国際公開第２０２０１４８５４８号（Ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｂｒｉｓｔｏｌ）
【特許文献２】国際公開第２０２１１８１１１８号（Ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｂｒｉｓｔｏｌ ｅｔ ａｌ．）
【特許文献３】国際公開第２０１７１５３６０６号（Ｆｕｎｄａｃｉｏ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ｄｅ Ｒｅｃｅｒｃａ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａ（ＩＲＢ Ｂａｒｃｅｌｏｎａ），ｅｔ ａｌ．）
【非特許文献】
【００１３】
【非特許文献１】Ｐｉｑｕｅ ｅｔ ａｌ著「Ａ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｃｏｄｅ ｆｏｒ ＣＰＥ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｎｔｒｏｌ」Ｃｅｌｌ ２００８，１３２（３）：４３４－４８
【非特許文献２】Ｊｕｖｅｎ－Ｇｅｒｓｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，「ｒａｔｉｏｎａｌ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｓｕｐｅｒ ｃｏｒｅ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｔｈａｔ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ」，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ－２００６，ｖｏｌ．ｎｏ．３（１１），ｐｐ．９１７－９２２
【非特許文献３】Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３
【非特許文献４】ＥＭＢＯＳＳ：Ｔｈｅ Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｏｐｅｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｓｕｉｔｅ，Ｒｉｃｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．１６：２７６－２７７
【非特許文献５】Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，「Ｂａｓｉｃ ｌｏｃａｌ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｓｅａｒｃｈ ｔｏｏｌ」，１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，ｖ．２１５，ｐａｇｅｓ ４０３－４１０
【非特許文献６】Ｈａｒｅｎｄｚａ ｅｔ ａｌ．２００９
【非特許文献７】Ｍｏｅｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．２００３
【発明の概要】
【００１４】
本発明者らは、驚くべきことに、ＴＡＴＡボックスモチーフ（すなわち、ＳＣＰ１）を含むスーパーコアプロモーターと組み合わせてＮＰＨＳ２モチーフＬｍｘ１ｂ－ＦｏｘＣ２を含むポドシン遺伝子エンハンサー（ＮＰＨＳ２エンハンサー）として公知の断片が、従来技術の他のプロモーターよりもはるかに多く、ポドサイト及び腎細胞株における目的の遺伝子の選択的発現を可能にすることを見出した。コアプロモーター、特に、サイトメガロウイルスのプロモーターに由来する最小プロモーターで同様の結果が達成可能である。
【００１５】
エンハンサーエレメント及びコア領域を含むハイブリッドプロモーターは公知であるが

、細胞特異性及び発現能に関するそれらの挙動は予測可能ではない。

【００１６】

最小プロモーターは、ハイブリッドプロモーターであっても、一般に、転写開始の開始コドンから遠くないエレメントを含む。

【００１７】

したがって、本発明の第１の態様は、

（ａ）配列番号１３（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧ）を含むポドサイト特異的エンハンサー配列、又は配列番号１３と少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有する配列と、

（ｂ）コアプロモーター配列であって、

（ｂ１）配列番号２（ＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ）と８５～１００％の同一性パーセンテージを有する８１ヌクレオチド長の最小コアプロモーター配列と、

（ｂ２）配列番号２０（ＧＧＣＧＴＴＡＣＴＡＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＴＣＧＴＴＴＡＧＴＧＡＡＣＣＧＴＣＡＧＡＴＣ）と８５～１００％の同一性パーセンテージを有する５６ヌクレオチド長の最小コアプロモーターと

から選択されるコアプロモーター配列と

を含むポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターである。

【００１８】

実際、このポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターは、

（ａ）ヒトコーディングポドシン（ＮＰＨＳ２）遺伝子プロモーターから単離された２００～２５０ヌクレオチド（又は塩基対）を含むポドサイト特異的エンハンサー配列であって、前述の単離された配列が配列番号７（ＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡ）を含み、これはＮＰＨＳ２遺伝子プロモーター中の転写因子Ｌｍｘ１ｂ及びＦｏｘｃ２の結合モチーフを含む配列である、ポドサイト特異的エンハンサー配列と、

（ｂ）ＴＡＴＡボックスモチーフが８０～３５０ヌクレオチド（又は塩基対）、特に１２３～１２６ヌクレオチドのエンハンサー中の配列番号７の最後のヌクレオチドから分離されているコアプロモーター配列と

を含むものである。前の段落の配列番号１３には、配列番号７が記載されている。

【００１９】

いかなる理論にも束縛されるものではないが、本発明者らは、前述の配列番号７とＴＡＴＡボックスとの間の（ヌクレオチド単位での又は同じ塩基対である）距離が発現の誘導に関連しており、特定のコアの選択が、先行技術の他のハイブリッドプロモーター又は天然に存在するプロモーターと比較して、ポドサイトにおける選択的な方法又はより高い程度に発現を促進すると考えている。

【００２０】

本発明の第２の態様は、第１の態様で定義されるような単離されたポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターと、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された目的の遺伝子（すなわち、目的のポリヌクレオチド）のヌクレオチド配列又は断片とを含むポリヌクレオチドコンストラクトである。

【００２１】

本発明の第３の態様は、第１の態様で定義されるようなポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター、又は第２の態様で定義されるようなポリヌクレオチドコンストラクトを含むベクターである。

【００２２】

本発明の第４の態様は、第１の態様で定義されるようなポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター又は第２の態様で定義されるようなポリヌクレオチドコンストラクト、又は第３の態様によるベクターを含む細胞である。

【００２３】

第５の態様では、本発明は、治療有効量の第２の態様によるポリヌクレオチドコンストラクト、第３の態様によるベクター又は第４の態様による細胞を、１つ以上の薬学的に許容され得る賦形剤及び／又は担体と共に含む医薬組成物を包含する。

【００２４】

本発明のハイブリッドプロモーター、コンストラクト、又は細胞が、プロモーターに作動可能に連結された遺伝子を含み、前述の遺伝子が、例えば、ある突然変異に起因する疾患に関連する遺伝子である場合、先に列挙した態様のすべてを、ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された前述の遺伝子からの機能性タンパク質の発現を可能にする医薬品として使用することができる。したがって、第６の態様では、本発明は、医薬品として使用するための、第１の態様で定義されるようなプロモーター、第２の態様で定義されるようなポリヌクレオチドコンストラクト、第３の態様で定義されるようなベクター、第４の態様で定義されるような細胞、又は第５の態様で定義されるような医薬組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】実施例１に関連して、すべて緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の遺伝子を含有する、本発明によるポリヌクレオチドコンストラクト及び従来技術によるポリヌクレオチドコンストラクトのスキームを示す。

【図２】実施例１に関連し、図１のコンストラクトを形質導入した細胞において緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）が発する共焦点顕微鏡での蛍光を示す図である。

【図３】実施例１に関連して、選択された細胞株におけるＬｍｘ１ｂ転写因子及びＦｏｘｃ２転写因子の発現を示す。

【図４】実施例２に関連して、ポドサイトにおけるこのタンパク質の発現を決定するためのプロモーター及びルシフェラーゼ遺伝子の概略図である（アッセイされたコンストラクトの各々についてのポドサイトにおける相対ルシフェラーゼユニット（ＲＬＵ））。

【図５】実施例３に関連して、ポリアデニル化シグナル（すなわち、ＳＶ４０ポリＡ又はＣＰＥポリＡ）が異なる（配列番号１のハイブリッドプロモーターを有する）本発明のコンストラクトの（ボックス内の）エレメントのスキームを示す。該図は、小胞体ストレス条件下（ＥＲストレス）でのＨＥＫ２９３細胞における発現を示す。タンパク質発現（相対ルシフェラーゼ発現）及びｍＲＮＡレベル（相対ｍＲＮＡ発現）を含むデータがＥＲストレスの時間に沿って提供される。

【図６】図６は、配列番号１のプロモーターを有するポリヌクレオチドコンストラクトを使用したＨＥＫ２９３細胞におけるクラムス（Ｃｒｕｍｂｓ）細胞極性複合体成分２遺伝子（ＣＲＢ２、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｑ５ＩＪ４８、配列バージョン２（２００６年１０月１７日））の相対発現の棒グラフを、サイトメガロウイルスプロモーター（ＣＭＶ）を保有するコンストラクトと比較したものである。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

本出願において本明細書で使用されるすべての用語は、特に明記しない限り、当該技術分野で知られている通常の意味で理解されるものとする。本出願で使用される特定の用語の他のより具体的な定義は、以下に示されるとおりであり、特に明示的に記載された定義がより広い定義を提供しない限り、明細書及び特許請求の範囲を通して均一に適用することを意図している。

【００２７】

本明細書で使用される場合、不定冠詞「ａ」及び「ａｎ」は、「少なくとも１つ」又は「１つ以上」と同義である。特に明記しない限り、本明細書で使用される「ｔｈｅ」など

の定冠詞は、名詞の複数形も含む。

【００２８】

「プロモーター」という用語は、あるタンパク質が結合して、その下流のＤＮＡから単一のＲＮＡの転写を開始させるＤＮＡの配列を指す。プロモーターを構成する３つの主要部分：コアプロモーター、近位プロモーター及び遠位プロモーターがある。コアプロモーター領域は、開始コドンの最も近位に位置し、ＲＮＡポリメラーゼ結合部位、ＴＡＴＡボックス及び転写開始部位（ＴＳＳ）を含む。ＲＮＡポリメラーゼはこのコアプロモーター領域に安定に結合し、鋳型鎖の転写を開始することができる。ＴＡＴＡボックスは、一般転写因子タンパク質及びヒストンが結合することができるコアプロモーター領域内のＤＮＡ配列（５’－ＴＡＴＡＡＡ－３’）である。ヒストンは、ＤＮＡをヌクレオソームにパッケージングする真核細胞に見出されるタンパク質である。ヒストン結合は転写の開始を妨げるが、転写因子は転写の開始を促進する。コアプロモーターの最も多くの３’部分（遺伝子の開始コドンに最も近い）は、転写が実際に始まる場所であるＴＳＳである。しかしながら、真核生物及び古細菌のみがこのＴＡＴＡボックスを含有する。ほとんどの原核生物は、機能的に等価であると考えられる配列を含有し、通常６つのヌクレオチドＴＡＴＡＡＴからなるプリブノーボックスと呼ばれる。コアプロモーターのさらに上流には、多くの一次調節エレメントを含有する近位プロモーターを見出すことができる。近位プロモーターは、ＴＳＳのおよそ２５０塩基対上流に見出され、一般転写因子が結合する部位である。プロモーター領域の最後の部分は、近位プロモーターの上流にある遠位プロモーターと呼ばれる。遠位プロモーターはまた、転写因子結合部位を含有するが、ほとんどが調節エレメントを含有する。

【００２９】

「最小プロモーター」という用語は、下流遺伝子を発現することができる天然プロモーター（主にコアプロモーター）の最小配列を指す。

【００３０】

「ハイブリッドプロモーター」という表現は、異なるプロモーター（すなわち、天然に存在するプロモーター）に由来するエレメントの組み合わせとして理解されるべきである。例えば、ハイブリッドプロモーターは、所望の導入遺伝子発現を達成するために、１つの既存のプロモーターに由来する近位又は遠位のプロモーター領域と、別の既存のプロモーターに由来するコアプロモーターとを含み得る。

【００３１】

「エンハンサー又はエンハンサー配列」とは、特定の遺伝子の転写が起こる可能性を高めるためにタンパク質（活性化因子）によって結合され得るＤＮＡの短い（１５～１５００ｂｐ）領域である。これらのタンパク質は、通常、転写因子と呼ばれる。エンハンサーはシス作用性である。それらは、開始部位の上流又は下流で、遺伝子から最大１Ｍｂｐ（１，０００，０００万ｂｐ）離れて位置することができる。

【００３２】

ポリヌクレオチドの配列が示される場合、それらは有益な分子を指し、１つの鎖のみが示される。それにもかかわらず、当業者は、例えば鋳型及び相補鎖を含むデスオキシリボ核酸、又は一本鎖リボ核酸、例えばメッセンジャーＲＮＡの場合、それらが一本鎖又は二本鎖核酸ポリマーの形態であり得ることを理解するであろう。本明細書で示されるポリヌクレオチドの配列は、ヌクレオチドの長さに関して、又は核酸塩基若しくはそれらの倍数（例えば、キロベース、ｋｂ）に関して開示されるが、塩基はヌクレオチドの一部であるので同じであるので、それらは同じである。「塩基対」という表現が使用される場合、それは水素結合によって互いに結合した２つの核酸塩基からなる二本鎖核酸の基本単位に関する。塩基対の数は、二本鎖分子と呼ばれる場合、ポリヌクレオチドの長さを示す別の同等の方法である。

【００３３】

前で示したように、本発明の第１の態様は、

（ａ）配列番号１３（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣ

ＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧ）を含むポドサイト特異的エンハンサー配列、又は配列番号１３と少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有する配列と、

（ｂ）コアプロモーター配列であって、

（ｂ１）配列番号２（ＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ）と８５～１００％の同一性パーセンテージを有する８１ヌクレオチド長の最小コアプロモーター配列と、

（ｂ２）配列番号２０（ＧＧＣＧＴＴＴＡＣＴＡＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＴＣＧＴＴＴＡＧＴＧＡＡＣＣＧＴＣＡＧＡＴＣ）と８５～１００％の同一性パーセンテージを有する５６ヌクレオチド長の最小コアプロモーターと

から選択されるコアプロモーター配列と

を含むポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターである。

【００３４】

実際、このポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターは、

（ａ）ヒトコーディングポドシン（ＮＰＨＳ２）遺伝子プロモーターから単離された２００～２５０ヌクレオチド（又は塩基対）を含むポドサイト特異的エンハンサー配列であって、前述の単離された配列が配列番号７（ＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡ）を含み、これはＮＰＨＳ２遺伝子プロモーター中の転写因子Ｌｍｘ１ｂ及びＦｏｘｃ２の結合モチーフを含む配列である、ポドサイト特異的エンハンサー配列と、

（ｂ）ＴＡＴＡボックスモチーフが８０～３５０ヌクレオチド（又は塩基対）、特に１２３～１２６ヌクレオチドのエンハンサー中の配列番号７の最後のヌクレオチドから分離されているコアプロモーター配列と

を含むものである。前の段落の配列番号１３には、配列番号７が記載されている。

【００３５】

ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターの特定の実施形態では、ポドサイト特異的エンハンサー配列は、配列番号３と８５～１００％の同一性％を有する２１９ヌクレオチド長の配列である。この配列番号３は配列番号１３を含む。

【００３６】

ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターの特定の実施形態では、それは、

（ａ）配列番号３を含むか又はそれのみからなるポドサイト特異的エンハンサー配列と、

（ｂ）配列番号２（ＳＣＰ１）（ＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ）と８５～１００％の同一性％を有する８１ヌクレオチド長の最小コアプロモーターと

を含む。

【００３７】

より特定の実施形態では、ポドサイト特異的プロモーターは、配列番号１、又は前述の配列番号１と少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有するヌクレオチド配列を含むか又はそれのみからなる。

ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧＴＡＧＡＡＴＡＡＣＴＡＧＧＧＣＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧ

ＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ

（配列番号１は、本明細書では０．３ＮＰＨＳ２－ＳＦＰ１－３００ｂｐとも略記される）

【００３８】

この単離されたポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターはまた、配列番号１又はこの配列番号１と少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有する配列を含むか又はそれのみからなる、３００～３３０ヌクレオチド（又は塩基対）の長さを有するポリヌクレオチドとして定義され得る。

【００３９】

この配列番号１の詳細な分析から、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターは、

－配列番号２

（ＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ）

と８５～１００％の同一性％を有する８１ヌクレオチド長の最小コアプロモーターと、

－配列番号３（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧＴＡＧＡＡＴＡＡＣＴＡＧＧＧＣ）と８５～１００％の同一性％を有する２１９ヌクレオチド長のポドサイト特異的エンハンサーと

を含む。

【００４０】

この配列番号１において、ヌクレオチド１～２１９［１：２１９］はＮＰＨＳ２エンハンサーに対応する；ヌクレオチド８０～９８［８０：９８］はモチーフＬｍｘ１ｂ－ＦｏｘＣ２（すなわち、転写因子が結合している場合、下線が引かれている）に対応する；スーパーコア最小プロモーター１（ＳＣＣ１）として知られる最小プロモーターはヌクレオチド２２０～３００［２２０：３００］まで延び、この最小プロモーター中のＴＡＴＡボックスはヌクレオチド２２５～２３１［２２５：２３１］に位置する（二重下線）。ＳＣＰ１は、Ｊｕｖｅｎ－Ｇｅｒｓｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，「Ｒａｔｉｏｎａｌ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｓｕｐｅｒ ｃｏｒｅ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｔｈａｔ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ－２００６，ｖｏｌ．ｎｏ．３（１１）、ｐｐ．９１７－９２２で広く定義されている。

【００４１】

さらに別の特定の実施形態では、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターは、

（ａ）配列番号１３（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧ）を含むか又はそれのみからなるポドサイト特異的エンハンサー配列と、

（ｂ）配列番号２０（ＧＧＣＧＴＴＴＡＣＴＡＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＴＣＧＴＴＴＡＧＴＧＡＡＣＣＧＴＣＡＧＡＴＣ）と８５～１００％の同一性％を有する、より具体的には配列番号２０のみからなる、５６ヌクレオチド長の最小コアプロモーター配列と

を含む。

【００４２】

より特定の実施形態では、ポドサイト特異的プロモーターは、配列番号４［本明細書及び図面では０．２ＮＰＨ２＋最小ＣＭＶとも標識される］（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧＧＧＣＧＴＴＴＡＣＴＡＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＴＣＧＴＴＴＡＧＴＧＡＡＣＣＧＴＣＡＧＡＴＣ）を含むか又はそれのみからなる。

【００４３】

代替的に、第１の態様のハイブリッドプロモーターは、それを含む同定された機能を有する部分配列によって定義することができる（上記参照）。

【００４４】

第１の態様のプロモーターを定義する配列（例えば、配列番号１、配列番号４、又はそれらと少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有する配列、又は実施形態において前に開示されたもののいずれか）は、目的の遺伝子若しくはその断片の配列、又は目的のポリヌクレオチドの配列に作動可能に連結されたポリヌクレオチドコンストラクトのプロモーター配列である。したがって、同様に示されるように、本発明の第２の態様は、第１の態様で定義されるような単離されたポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターと、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された目的の遺伝子のヌクレオチド配列又は断片とを含むポリヌクレオチドコンストラクトである。

【００４５】

タンパク質バリアントは、当業者にはよく理解されており、ヌクレオチド修飾に由来するアミノ酸配列修飾を含み得る。例えば、アミノ酸配列修飾は、典型的には、置換バリアント、挿入バリアント、又は欠失バリアントの３つのクラスの１つ以上に分類される。同様に、ヌクレオチド配列バリアントは、その安定化された役割（すなわち、遺伝子のプロモーター、遺伝子配列のコード化など）とは無関係に、ヌクレオチドの欠失、挿入、変化を含むヌクレオチド配列修飾も含み得る。

【００４６】

本発明において、「同一性」という用語は、配列（アミノ酸又は核酸のいずれか）が最適にアラインメントされたときに２つの配列において同一である残基のパーセンテージを指す。最適なアラインメントにおいて、第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸又はヌクレオチド残基によって占められている場合、配列は、その位置に関して同一性を示す。同一性パーセンテージは、所与のアラインメントにおける規定の長さにわたる同一の残基の数を決定する。したがって、２つの配列又は（「パーセント配列同一性」）の間の同一性のレベルは、比較される位置の数に対する配列によって共有される同一の位置の数の比として測定される（すなわち、パーセント配列同一性＝（同一の位置の数／比較された位置の総数）×１００）。ギャップ、すなわち、残基が一方の配列に存在するが他方には存在しないアラインメント中の位置は、非同一の残基を有する位置とみなされ、比較された位置としてカウントされる。

【００４７】

最適なアラインメントを迅速に得て、２つ以上の配列間の同一性を計算するためのいくつかの数学的アルゴリズムが知られており、いくつかの利用可能なソフトウェアプログラムに組み込まれている。本発明の目的のために、２つのアミノ酸配列又は２つのヌクレオチド配列間の配列同一性は、好ましくはＥＭＢＯＳＳパッケージ（ＥＭＢＯＳＳ：Ｔｈｅ Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｏｐｅｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｓｕｉｔｅ，Ｒｉｃｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．１６：２７６－２７７）のＮｅｅｄｌｅプログラムで実施される、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓ

ｃｈアルゴリズム（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３）などのグローバルアラインメントに基づくアルゴリズム；又はＢＬＡＳＴ Ｇｌｏｂａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔツール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，「Ｂａｓｉｃ ｌｏｃａｌ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｓｅａｒｃｈ ｔｏｏｌ」，１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，ｖ．２１５，ｐａｇｅｓ ４０３－４１０）を使用して、デフォルト設定を使用して決定されることが好ましい。比較される配列が実質的に同じ長さである場合、局所アラインメントも使用することができる。

【００４８】

本発明の第１の態様の特定の実施形態では、任意選択的に以下に提供される実施形態のいずれか１つと組み合わせて、その中の同定された配列（すなわち、エンハンサー、コアプロモーター）のいずれかとの同一性パーセンテージは、示された配列と少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８８．５％、少なくとも８９％、少なくとも８９．５％、少なくとも９０％、少なくとも９０．５％、少なくとも９１％、少なくとも９１．５％、少なくとも９２％、少なくとも９２．５％、少なくとも９３％、少なくとも９３．５％、少なくとも９４％、少なくとも９４．５％、少なくとも９５％、少なくとも９５．５％、少なくとも９６％、少なくとも９６．５％、少なくとも９７％、少なくとも９７．５％、少なくとも９８％、少なくとも９８．５％、少なくとも９９％、又は少なくとも９９．５％同一である。

【００４９】

本発明の第１の態様の特定の実施形態では、任意選択的に以下に提供される実施形態のいずれか１つと組み合わせて、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターは、配列番号１の配列又はその機能的バリアントからなり、前述のバリアントは、配列番号１と少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８８．５％、８９％、８９．５％、９０％、９０．５％、９１％、９１．５％、９２％、９２．５％、９３％、９３．５％、９４％、９４．５％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、又は９９．５％同一の配列のみからなる。

【００５０】

配列番号４の配列又は配列番号４と少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８８．５％、８９％、８９．５％、９０％、９０．５％、９１％、９１．５％、９２％、９２．５％、９３％、９３．５％、９４％、９４．５％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、又は９９．５％同一の配列のみからなるその機能的バリアントのみからなるポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターが開示される。

【００５１】

「核酸コンストラクト」又は「ポリヌクレオチドコンストラクト」という用語は、組換えＤＮＡ技術の使用から生じる人工核酸分子を指す。核酸コンストラクトは、一本鎖又は二本鎖のいずれかの核酸分子であり、これは核酸のセグメントを含有するように修飾されており、これは普通なら自然界には存在しない様式で組み合わされ、並置されている。核酸コンストラクトは、通常、「ベクター、すなわち外因的に作製されたＤＮＡを宿主細胞に送達するために使用される核酸分子である。これはまた、発現プロモーターに作動可能に連結された目的のタンパク質をコードする配列を含むポリヌクレオチド配列を指す場合、「遺伝子コンストラクト」又は「発現カセット」と命名することもでき、前述のプロモーターはタンパク質をコードする配列の発現を制御する。「作動可能に連結された」とは、タンパク質をコードする配列がプロモーターの配列の後に（５’－３’方向に）、又は制限部位が含まれる場合、又は遺伝子構築の他の安定化エレメントが存在する場合にはプロモーターの近くに配置されることを理解されたい。発現カセット自体も発現系であり、遺伝子コンストラクトを保護するために、又はウイルスベクターの場合には細胞への進入を促進するためにさらに使用されるベクター又はプラスミドである。「ポリヌクレオチド配列」については、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを含む核酸分子（ＤＮＡ若しくはＲＮＡ）として理解されるべきである。核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得、

それには、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれるが、これらに限定されない。

【００５２】

第２の態様の特定の実施形態では、このポリヌクレオチドコンストラクトは、

（ａ）ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列；

（ｂ）タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列；

（ｃ）転写後調節エレメントのヌクレオチド配列；並びに

（ｄ）５’及び３’逆方向末端反復ヌクレオチド配列

のうちの１つ以上をさらに含む。

【００５３】

これらのエレメント（ａ）～（ｄ）はすべて、プロモーターに作動可能に連結された遺伝子の適切な発現を可能にする配列である。

【００５４】

第２の態様の特定の実施形態では、ポリヌクレオチドコンストラクトは、第１の態様で定義されるようなポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターと、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された目的の遺伝子又は遺伝子の断片のヌクレオチド配列と、ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列；タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列；及び転写後調節エレメントのヌクレオチド配列のうちの１つ以上とを含む。

【００５５】

ポリアデニル化シグナルは、さらに翻訳される転写産物ｍＲＮＡを安定化することによって転写を促進する配列である。ポリアデニル化は、ポリ（Ａ）尾部のメッセンジャーＲＮＡへの付加である。ポリ（Ａ）尾部は、複数のアデノシン一リン酸のみからなる；言い換えれば、アデニン塩基のみを有するＲＮＡのストレッチである。ポリ（Ａ）尾部は、ｍＲＮＡの核外輸送、翻訳、及び安定性にとって重要である。したがって、ポリアデニル化シグナルを含めることにより、目的の遺伝子の発現を増強することができる。

【００５６】

タンパク質翻訳開始部位とは、リボソームアセンブリ及び翻訳開始を媒介することによって翻訳の開始を促進するヌクレオチド配列である。

【００５７】

転写後調節エレメントは、パッケージング細胞におけるウイルス（すなわち、ベクター）安定性を増強し、パッケージングされたウイルスのより高い力価、したがって、導入遺伝子（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された目的の遺伝子）の発現をもたらす配列である。

【００５８】

５’及び３’逆方向末端反復配列（５’－ＩＴＲ及び３’－ＩＴＲ）は、ウイルスゲノム複製の起点として働く反対方向を指すアデノ随伴ウイルスゲノムの両端に存在する配列が本質的に同一の領域である。ＩＴＲは、通常、プロモーターと共に所望の遺伝子に隣接しており、一本鎖ベクターＤＮＡが宿主細胞ＤＮＡポリメラーゼ複合体によって二本鎖ＤＮＡに変換された後、核内でのコンカテマー形成を助ける。当業者は、どの種類の配列が５’－ＩＴＲ及び３’－ＩＴＲとして働くかを知っているであろう。

【００５９】

第２の態様のより特定の実施形態では、ポリヌクレオチドコンストラクトは、５’→３’方向に、

（ｉ）５’逆方向末端反復ヌクレオチド配列と、

（ｉｉ）第１の態様（請求項１）で定義されるような単離されたポリヌクレオチドハイブリッドプロモーターと、

（ｉｉｉ）タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列と、

（ｉｖ）目的の遺伝子又は遺伝子の断片のヌクレオチド配列と、

（ｖ）転写後調節エレメントのヌクレオチド配列と、

（ｖｉ）ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列と、
（ｖｉｉ）３’逆方向末端反復ヌクレオチド配列と
を含む。

【００６０】

第２の態様によるポリヌクレオチドコンストラクトのより特定の実施形態では、タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列はコザックコンセンサス配列である。コザック配列は、翻訳プロセスの開始において主要な役割を果たすことが知られており、したがって目的の遺伝子の発現を増強することができる。コザックコンセンサス配列（コザックコンセンサス又はコザック配列）は、ほとんどの真核生物ｍＲＮＡ転写産物においてタンパク質翻訳開始部位として機能する核酸モチーフである。

【００６１】

ポリヌクレオチドコンストラクトの別の特定の実施形態では、任意選択的に上記又は下記のこのポリヌクレオチドコンストラクトの実施形態のいずれかと組み合わせて、転写後調節エレメントのヌクレオチド配列は、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）である。ＷＰＲＥは、転写されると、発現を増強する三次構造を作り出すＤＮＡ配列である。ＷＰＲＥエレメントを含めると、このポリヌクレオチドコンストラクトがベクター内にある場合、ベクターによって送達される導入遺伝子の発現が増加し得る。より特定の実施形態では、ＷＰＲＥは、配列番号１２（ＧＡＴＡＡＴＣＡＡＣＣＴＣＴＧＧＡＴＴＡＣＡＡＡＡＴＴＴＧＴＧＡＡＡＧＡＴＴＧＡＣＴＧＧＴＡＴＴＣＴＴＡＡＣＴＡＴＧＴＴＧＣＴＣＣＴＴＴＴＡＣＧＣＴＡＴＧＴＧＧＡＴＡＣＧＣＴＧＣＴＴＴＡＡＴＧＣＣＴＴＴＧＴＡＴＣＡＴＧＣＴＡＴＴＧＣＴＴＣＣＣＧＴＡＴＧＧＣＴＴＴＣＡＴＴＴＴＣＴＣＣＴＣＣＴＴＧＴＡＴＡＡＡＴＣＣＴＧＧＴＴＡＧＴＴＣＴＴＧＣＣＡＣＧＧＣＧＧＡＡＣＴＣＡＴＣＧＣＣＧＣＣＴＧＣＣＴＴＧＣＣＣＧＣＴＧＣＴＧＧＡＣＡＧＧＧＧＣＴＣＧＧＣＴＧＴＴＧＧＧＣＡＣＴＧＡＣＡＡＴＴＣＣＧＴＧＧＴ）のＷＰＲＥ３である。ＷＰＲＥ３は、ＷＰＲＥよりも短い。ＷＰＲＥは５９８塩基対を含み、ＷＰＲＥ３は２４８ｂｐの２４８塩基対を含むが、導入遺伝子の発現を増加させるのに同様に効率的である。

【００６２】

ポリヌクレオチドコンストラクトの別の特定の実施形態では、任意選択的に上記又は下記のこのポリヌクレオチドコンストラクトの実施形態のいずれかと組み合わせて、ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列は、
（ｉ）ウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）ポリアデニル化シグナル、
（ｉｉ）初期ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル、
（ｉｉｉ）合成ポリアデニル化シグナル（ＳｐＡ）、及び
（ｉｖ）５０ヌクレオチド未満だけ離れている少なくとも２つの細胞質ポリアデニル化エレメント（ＣＰＥ）と、第１又は第２の細胞質ポリアデニル化エレメントから１００ヌクレオチド未満だけ離れている細胞質ポリアデニル化シグナルとを含む目的の遺伝子又は遺伝子の断片のポリヌクレオチド配列に対して３’位（３’－ＵＴＲ）の非翻訳配列
から選択される。

【００６３】

ポリヌクレオチドコンストラクトのより特定の実施形態では、任意選択的に上記又は下記のこのポリヌクレオチドコンストラクトの実施形態のいずれかと組み合わせて、ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列は、５０ヌクレオチド未満だけ離れている少なくとも２つの細胞質ポリアデニル化エレメントと、第１又は第２の細胞質ポリアデニル化から１００ヌクレオチド未満だけ離れている細胞質ポリアデニル化シグナルとを含む非翻訳配列である。

【００６４】

本明細書で使用される「細胞質ポリアデニル化エレメント」又は「ＣＰＥ」という用語は、メッセンジャーＲＮＡの３’ＵＴＲに見出される配列を指す。ＣＰＥは、通常、配列５’－ＵＵＵＵＡｉ＿２　Ｕ－３’（コンセンサス配列とも呼ばれる）を有するが、他のバ

リアント、例えば非コンセンサス配列：ＵＵＵＵＡＣＵ、ＵＵＵＣＡＵ及びＵＵＵＵＣＣＵも可能である。ＣＰＥは、ＣＰＥ結合タンパク質（ＣＰＥＢ）によって結合され、これは、既存のポリアデニル化尾部の伸長、及び一般にｍＲＮＡの翻訳を促進する。当業者は、特定の配列がＣＰＥであるかどうかを、Ｐｉｑｕｅ ｅｔ ａｌ著「Ａ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｃｏｄｅ ｆｏｒ ＣＰＥ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｎｔｒｏｌ」Ｃｅｌｌ ２００８，１３２（３）：４３４－４８に記載されている方法によって決定することができる。

【００６５】

特定の実施形態では、核酸コンストラクトがＲＮＡ分子である場合、第１のＣＰＥはコンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＡｉ＿２ Ｕ－３’を有する。核酸コンストラクトがＤＮＡ分子である場合、ＣＰＥは、転写されると上記の配列をもたらす配列を含む。

【００６６】

特定の実施形態では、核酸コンストラクトがＲＮＡ分子である場合、第２のＣＰＥはコンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＡｉ＿２ Ｕ－３’を有する。核酸コンストラクトがＤＮＡ分子である場合、ＣＰＥは、転写されると上記の配列をもたらす配列を含む。

【００６７】

特定の実施形態では、核酸コンストラクトがＲＮＡ分子である場合、第１及び第２のＣＰＥはコンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＡｉ＿２ Ｕ－３’を有する。核酸コンストラクトがＤＮＡ分子である場合、ＣＰＥは、転写されると上記の配列をもたらす配列を含む。

【００６８】

より特定の実施形態では、第１のＣＰＥは、コンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＵＡＡ－３’を有する。

【００６９】

より特定の実施形態では、第２のＣＰＥはコンセンサス配列５’－ＵＵＵＡＡＵ－３’を有する。

【００７０】

さらにより特定の実施形態では、核酸コンストラクトがＲＮＡ分子である場合、又は核酸コンストラクトがＤＮＡ分子である場合、第１のＣＰＥはコンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＵＡＡ－３’を有し、第２のＣＰＥはコンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＡＡＵ－３’を有し、すなわち、転写されると上記の配列をもたらす配列である。

【００７１】

特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲは、第３のＣＰＥをさらに含む。より特定の実施形態では、第３のＣＰＥは非コンセンサス配列を有する。さらにより特定の実施形態では、核酸コンストラクトがＲＮＡ分子である場合、又は核酸コンストラクトがＤＮＡ分子である場合、第３のＣＰＥは非コンセンサス配列５’－ＵＵＵＡＣＵ－３’を有し、すなわち、転写されると上記の配列をもたらす配列である。

【００７２】

特定の実施形態では、第３のＣＰＥは、第１のＣＰＥに対して３’位置にあるが、細胞質ポリアデニル化シグナルに対して５’位置にある。別の特定の実施形態では、第３のＣＰＥは、第１のＣＰＥ及び細胞質ポリアデニル化シグナルに対して５’位置に位置する。別の特定の実施形態では、第３のＣＰＥは、第１のＣＰＥと第２のＣＰＥとの間に、細胞質ポリアデニル化シグナルに対して３’位置に位置する。

【００７３】

特定の実施形態では、核酸コンストラクトがＲＮＡ分子である場合、又は核酸コンストラクトがＤＮＡ分子である場合、第１のＣＰＥはコンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＵＡＡ－３’を有し、第２のＣＰＥはコンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＡＡＵ－３’を有し、３’ＵＴＲはさらに非コンセンサス配列５’－ＵＵＵＵＡＣＵ－３’を有する第３のＣＰＥを有し、すなわち、転写されると上記の配列をもたらす配列である。

【００７４】

核酸コンストラクトがＲＮＡ分子である場合、前述の核酸コンストラクトはポリアデニ

ンテールをさらに含む。

【００７５】

第１の態様の核酸コンストラクトの３’ＵＴＲは、第２のＣＰＥから１００ヌクレオチド未満離れている細胞質ポリアデニル化シグナルを含む。本明細書で使用される「細胞質ポリアデニル化シグナル」という用語は、ｍＲＮＡの３’ＵＴＲに存在し、ｍＲＮＡの細胞質ポリアデニル化を促進する核酸配列を指す。特定の実施形態では、細胞質ポリアデニル化シグナルはヘキサヌクレオチドＡＡＵＡＡＡである。

【００７６】

「第１又は第２のＣＰＥから１００ヌクレオチド未満離れている」という表現は、第１又は第２のＣＰＥの最後のヌクレオチドと細胞質ポリアデニル化シグナルの第１のヌクレオチドとの間のヌクレオチド数が１００ヌクレオチド未満であることを意味する。特定の実施形態では、第１又は第２のＣＰＥと細胞質ポリアデニル化シグナルとの間のヌクレオチド数は、９０未満、８０未満、７０未満、６０未満、５０未満、４０未満、３０未満、２０未満、１０未満、５未満のヌクレオチドである。より特定の実施形態では、第１又は第２のＣＰＥと細胞質ポリアデニル化シグナルとの間の距離は２５ヌクレオチドである。特定の実施形態では、第２のＣＰＥと細胞質ポリアデニル化シグナルとの間にヌクレオチドは存在しない。別の特定の実施形態では、第２のＣＰＥと細胞質ポリアデニル化シグナルとは部分的に重複する。

【００７７】

特定の実施形態では、細胞質ポリアデニル化シグナルは、第１及び第２のＣＰＥに対して３’位置に位置する。

【００７８】

別の実施形態では、第２の細胞質ポリアデニル化エレメントは、細胞質ポリアデニル化シグナルと重複し得る。特定の実施形態では、第２のＣＰＥは、細胞質ポリアデニル化シグナルと少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、又は少なくとも６ヌクレオチド重複する。

【００７９】

別の特定の実施形態では、３’ＵＴＲは第３のＣＰＥを含み、細胞質ポリアデニル化シグナルは第３のＣＰＥに対して３’位に位置する。

【００８０】

ＣＰＥエレメントを含むポリアデニル化シグナル及び細胞質ポリアデニル化シグナルのこれらの特定の実施形態は、国際公開第２０１７１５３６０６号（Ｆｕｎｄａｃｉｏ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ｄｅ Ｒｅｃｅｒｃａ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａ（ＩＲＢ Ｂａｒｃｅｌｏｎａ），ｅｔ ａｌ）で広くコメントされている。この文献は、癌細胞において目的の遺伝子を選択的に発現するためのコンストラクトにおけるこれらの３’ＵＴＲ配列を提案している。しかしながら、腫瘍細胞の挙動は、いかなる他の疾患細胞（すなわち、腎臓）にも直接置き換えられるものではなく、矛盾する結果を伴う書誌も存在する。

【００８１】

実施例に示されるように、特定の示されたハイブリッドプロモーターとＣＰＥエレメントを含むポリアデニル化シグナルとの組み合わせは、より高い程度で（すなわち、刺激される）損傷したすべてのポドサイトにおいて所望の遺伝子治療導入遺伝子を発現させることを可能にする。遺伝子治療発現がポドサイトのより健康な状態を回復させることができる場合、遺伝子治療導入遺伝子発現は依然として基礎レベルで発現され、したがって導入遺伝子はすべてのポドサイトで発現され、好ましくは損傷したポドサイトでより高度に発現される。

【００８２】

ポリヌクレオチドコンストラクトの別の特定の実施形態では、任意選択的に上記又は下記の実施形態のいずれか又はこのポリヌクレオチドコンストラクトと組み合わせて、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された目的の遺伝子又はその断片は、

－１つ以上の腎疾患に関連する遺伝子、及び／又は
－５ｋｂまで、より具体的には最大４．５ｋｂ、さらに具体的には最大４．０ｋｂの長さを有する遺伝子
から選択される。

【００８３】

より特定の実施形態では、遺伝子又はその断片は、クラムス細胞極性複合体成分２遺伝子（ＣＲＢ２）、ネフェリン遺伝子（ＮＰＨＳ１）、ポドシン遺伝子（ＮＰＨＳ２）；ａａｒＦドメイン含有キナーゼ４（ＡＤＣＫ４）遺伝子；キトビオシルジホスホドリコールβ－マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子（ＡＬＧ１）；Ｒｈｏ　ＧＴＰアーゼ活性化タンパク質２４遺伝子（ＡＲＨＧＡＰ２４）；ＡＲＧＨＤＩＡ　ＣＤ１５１－ＣＤ２ＡＰ；補酵素Ｑ２、ポリプレニルトランスフェラーゼ遺伝子（ＣＯＱ２）；補酵素Ｑ６、モノオキシゲナーゼ遺伝子（ＣＯＱ６）；ジアシルグリセロールキナーゼイプシロン遺伝子（ＤＧＫＥ）；Ｅ２Ｆ転写因子３遺伝子（Ｅ２Ｆ３）；上皮膜タンパク質２遺伝子（ＥＭＰ２）；ＫＮモチーフ及びアンキリンリピートドメイン２遺伝子（ＫＡＮＫ２）；Ｌ抗原ファミリーメンバー３遺伝子（ＬＡＧＥ３）；ＬＭＮＡ遺伝子（ＬＭＮＡ）；ＬＩＭホメオボックス転写因子１－ベータ遺伝子（ＬＭＸ１Ｂ）；転写因子ＭａｆＢ遺伝子（ＭＡＦＢ）；ヌクレオポリン８５遺伝子（ＮＵＰ８５）；ヌクレオポリン９３遺伝子（ＮＵＰ９３）；核ＲＮＡ核外輸送因子５遺伝子（ＮＸＦ５）；Ｏ－シアロ糖タンパク質エンドペプチダーゼ遺伝子（ＯＳＧＥＰ）；対になったボックス遺伝子（ＰＡＸ）；デカプレニル二リン酸シンターゼサブユニット２遺伝子（ＰＤＳＳ２）；ホスホマンノムターゼ２遺伝子（ＰＭＭ２）；ポドカリキシン様遺伝子（ＰＯＤＸＬ）；スカベンジャー受容体クラスＢメンバー２遺伝子（ＳＣＡＲＢ２）；スフィンゴシン－１－リン酸リアーゼ１遺伝子（ＳＧＰＬ１）；ＳＭＡＤファミリーメンバー７遺伝子（Ｓｍａｄ７）；ＴＰ５３調節キナーゼ遺伝子（ＴＰ５３ＲＫ）；ＴＰ５３ＲＫ結合タンパク質遺伝子（ＴＰＲＫＢ）；ビタミンＤ受容体遺伝子（ＶＤＲ）；ＷＤリピートドメイン７３遺伝子（ＷＤＲ７３）；ウィルムス腫瘍１遺伝子（ＷＴ１）；亜鉛メタロペプチダーゼ遺伝子（ＺＭＰＳＴＥ２）；アポリポタンパク質Ｌ１遺伝子（ＡＰＯＬ１）、ＩＶ型コラーゲンα３鎖遺伝子（ＣＯＬ４Ａ３）；ＩＶ型コラーゲンα４鎖遺伝子（ＣＯＬ４Ａ４）、ＩＶ型コラーゲンα５鎖遺伝子（ＣＯＬ４Ａ５）、ＩＶ型コラーゲンα６鎖遺伝子（ＣＯＬ４Ａ６）、クロトータンパク質遺伝子（Ｋｌｏｔｈｏ）、線維芽細胞増殖因子２３遺伝子（ＦＧＦ２３）、骨形成タンパク質７遺伝子（ＢＭＰ７）、及び血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）Ｃ遺伝子のうちの１つ以上から選択される。これらの遺伝子はすべて、本発明のコンストラクトに含まれる場合、特定の実施形態では、形態又はミニ遺伝子である。したがって、それらは、遺伝子が野生型遺伝子と同じ方法でそれ自体を発現するのに必要な１つ以上のエクソン及び制御領域を含む遺伝子断片である。

【００８４】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドコンストラクトは、
配列番号６、又は配列番号６と少なくとも８５％の同一性を有する機能的に等価なバリアントと、
配列番号１８、又は配列番号１８と少なくとも８５％の同一性を有する機能的に同等のバリアント（本明細書では０．３ＮＰＨＳ２－ＳＣＰ１＿Ｋｃｏ．ｈＣＲＢ２＿最小ＳＶ４０ｐＡとも標識される）と、
配列番号１９、又は配列番号１９と少なくとも８５％の同一性を有する機能的に等価なバリアントと
からなる群より選択される。

【００８５】

別の特定の実施形態では、ポリヌクレオチドコンストラクトは、
配列番号８、又は配列番号８と少なくとも８５％の同一性を有する機能的に同等のバリアント（０．３＿Ｌｕｃ＿最小ＳＶ４０［２３７５ｂｐ］ミニハイブリッド（ＭｉｎｉＨｙｂｒｉｄ）ＮＴＸ、実施例２参照）と、

配列番号９、又は配列番号９と少なくとも８５％の同一性を有する機能的に等価なバリアント（０．３＿Ｌｕｃ＿ＣＰＥ［２３０９ｂｐ，０．３＿Ｌｕｃ＿ＣＰＥ［２３０９ｂｐ］、実施例３参照）と、
配列番号１０、又は配列番号１０と少なくとも８５％の同一性を有する機能的に同等のバリアント（０．３ＮＰＨＳ２－ＳＣＰ１＿ＫＴｕｒｂｏＧＦＰ＿ＷＰＲＥ３＿最小ＳＶ４０ｐＡ、実施例１参照）と、
配列番号１１、（０．２ＮＰＨＳ２－最小ＣＭＶ＿ＫＴｕｒｂｏＧＦＰ＿ＷＰＲＥ３＿最小ＳＶ４０ｐＡ、実施例１参照）と
からなる群より選択される。

【００８６】

第３の態様では、本発明は、第１の態様で定義されるようなポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター又は第２の態様で定義されるようなポリヌクレオチドコンストラクトを含むベクターに関する。

【００８７】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、１つ以上の目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に送達することができ、好ましくはさらに発現することができるコンストラクトを指す。ベクターの例としては、ウイルスベクター、裸のＤＮＡ又はＲＮＡ発現ベクター、プラスミド、コスミド又はファージベクター、カチオン性凝縮剤と会合したＤＮＡ又はＲＮＡ発現ベクター、リポソームに封入されたＤＮＡ又はＲＮＡ発現ベクター、及びプロデューサー細胞などのある真核細胞が挙げられるが、これらに限定されない。この用語はまた、ゲノムＤＮＡへの標的化コンストラクトのランダムな又は部位特異的な組み込みを可能にする標的化コンストラクトに関する。そのような標的化コンストラクトは、好ましくは、相同組換え又は異種組み込みのいずれかに十分な長さのＤＮＡを含む。

【００８８】

ベクターの特定の実施形態では、これは発現ベクターである。

【００８９】

「発現ベクター」という用語は、細胞、好ましくは真核細胞、より好ましくは哺乳動物細胞において本発明の核酸コンストラクトを発現させるために使用される複製ＤＮＡコンストラクトを指す。発現ベクターは、タンパク質の産生のためのバイオテクノロジーにおける基本的なツールである。発現ベクターは、複製起点、選択可能マーカー、及び多重クローニング部位などの遺伝子の挿入に適した部位など、任意のベクターが有し得る特徴を有する。発現ベクターはまた、好ましくは、細菌におけるベクター増殖に必要な原核生物における複製起点を含有する。さらに、発現ベクターは、細菌の選択遺伝子、例えば、抗生物質、例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどに対する耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子を含有することもできる。発現ベクターはまた、１つ以上のマルチクローニング部位を含有することができる。

【００９０】

本発明のベクターのさらにより特定の実施形態では、それは、特に血清型ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＡＶ－ＤＪ及びＡＡＶ－ＤＪ／８のうちの１つ以上から選択されるアデノ随伴ウイルスベクター（ＡＡＶ）である。特に、腎臓組織、より具体的にはポドサイト又は尿細管細胞に対する親和性を有する任意の他のＡＡＶ。

【００９１】

本明細書で使用される「アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）」という用語は、分裂中及び静止中の霊長類（及びヒト）細胞の両方に感染するウイルスベクターを指す。それらは病原性効果を欠いているようであり、通常はゲノムの同じ場所（１９番染色体のＡＡＶＳ１部位）に組み込まれるので、このウイルスベクターは、遺伝子治療用途において外来ＤＮＡをヒト細胞に形質導入するために安全に使用することができる。一般に、ＡＡＶ血清型は、アミノ酸レベル及び核酸レベルで有意な相同性のゲノム配列を有し、同一の遺伝子機能のセットを提供し、本質的に物理的及び機能的に等価なビリオンを産生し、組織特異的調

節を必要とする導入遺伝子を発現するように操作することができる。

【００９２】

本発明の第４の態様は、第１の態様で定義されるようなポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター、又は第２の態様で定義されるようなポリヌクレオチドコンストラクト、又は第３の態様によるベクターを含む細胞である。細胞は、それらが機能的であるような様式で、すなわち、それらが目的の遺伝子又は断片の発現を可能にするような様式で、これらの列挙されたエレメントの１つ以上を含む。

【００９３】

特定の実施形態では、細胞は、動物細胞、より具体的には哺乳動物細胞、さらにより具体的にはヒト細胞である。

【００９４】

コンストラクト、ベクター、並びに細胞トランスフェクション又は形質導入のためのすべての分子生物学的ツールの合成のための方法は、当業者に周知であり、分子生物学のプロトコルで十分に確立されている。特定の条件が実施例に示されている。

【００９５】

本発明はまた、治療有効量の本発明によるポリヌクレオチドコンストラクト、本発明によるベクター、又は本発明による細胞のいずれかを、１つ以上の薬学的に許容され得る賦形剤及び／又は担体と共に含む医薬組成物を包含する。

【００９６】

「医薬」という用語は、「獣医学的組成物」の概念も包含する。したがって、それらは、ヒトを含む任意の動物に任意の所望の又は適用可能な経路によって投与される場合に治療上有効な組成物に関する。

【００９７】

本明細書で使用される「治療有効量」という表現は、投与された場合、対処される疾患の症候の１つ以上の発症を予防するか、又はある程度緩和するのに十分な化合物の量を指す。本発明に従って投与される化合物の特定の用量は、当然のことながら、投与される化合物、投与経路、処置される特定の症状、及び同様の考慮事項を含む、症例を取り巻く特定の状況によって決定される。

【００９８】

「薬学的に許容され得る賦形剤又は担体」という表現は、薬学的に許容され得る材料、組成物又はビヒクルを指す。各成分は、医薬組成物の他の成分と適合性であるという意味で薬学的に許容されなければならない。それはまた、合理的な利益／リスク比に見合った過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性又は他の問題若しくは合併症なしに、ヒト及び動物の組織又は器官と接触して使用するのに適していなければならない。適切な許容され得る賦形剤の例は、溶媒、分散媒体、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散剤又は懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤又は乳化剤、防腐剤、固体結合剤、潤滑剤などである。任意の従来の賦形剤媒体が、任意の望ましくない生物学的効果を生じること、又はそうでなければ医薬組成物の任意の他の成分と有害な様式で相互作用することなどによって、物質又はその誘導体と適合しない場合を除いて、その使用は本発明の範囲内であると考えられる。

【００９９】

適切な薬学的に許容され得る賦形剤の例は、溶媒、分散媒体、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散剤又は懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤又は乳化剤、防腐剤、固体結合剤、潤滑剤などである。任意の従来の賦形剤媒体が、任意の望ましくない生物学的効果を生じること、又はそうでなければ医薬組成物の任意の他の成分と有害な様式で相互作用することなどによって、物質又はその誘導体と適合しない場合を除いて、その使用は本発明の範囲内であると考えられる。

【０１００】

本発明の医薬組成物中の有効成分、薬学的に許容され得る賦形剤、及び／又は任意の追加の成分の相対量は、治療される対象の同一性、サイズ、及び／又は症状に応じて、さら

に組成物が投与される経路に応じて変化する。

【０１０１】

医薬組成物の製造に使用される薬学的に許容され得る賦形剤には、不活性希釈剤、分散剤及び／又は造粒剤、界面活性剤及び／又は乳化剤、崩壊剤、結合剤、保存剤、緩衝剤、潤滑剤及び／又は油が含まれるが、これらに限定されない。着色剤、コーティング剤、甘味剤、及び香味剤などの賦形剤は、処方者の判断に従って、組成物中に存在することができる。

【０１０２】

本発明によるポリヌクレオチドコンストラクト、本発明によるベクター、又は本発明の細胞を含有する医薬組成物は、任意の剤形、例えば固体又は液体で提示することができ、任意の適切な経路、例えば経口、非経口、直腸、局所、鼻腔内、眼内、腹腔内又は舌下経路によって投与することができ、そのために、それらには所望の剤形の製剤に必要な薬学的に許容され得る賦形剤、例えば局所製剤（軟膏、クリーム、リポゲル、ヒドロゲルなど）、点眼剤、エアロゾルスプレー、注射用ヒドロゲル、注射用溶液、浸透圧ポンプなどが含まれる。

【０１０３】

例示的な希釈剤としては、限定されないが、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウムラクトース、スクロース、セルロース、微結晶セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、コーンスターチ、粉糖、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【０１０４】

例示的な造粒剤及び／又は分散剤としては、限定されないが、ジャガイモデンプン、コーンスターチ、タピオカデンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、粘土、アルギン酸、グアーガム、柑橘類パルプ、寒天、ベントナイト、セルロース及び木材製品、天然スポンジ、カチオン交換樹脂、炭酸カルシウム、シリケート、炭酸ナトリウム、架橋ポリビニルピロリドン（クロスポビドン）、カルボキシメチルスターチナトリウム（デンプングリコール酸ナトリウム）、カルボキシメチルセルロース、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（クロスカルメロース）、メチルセルロース、アルファ化デンプン（デンプン１５００）、微結晶デンプン、水不溶性デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（Ｖｅｅｇｕｍ）、ラウリル硫酸ナトリウム、第四級アンモニウム化合物、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【０１０５】

例示的な結合剤としては、デンプン（例えば、コーンスターチ及びデンプンペースト）；ゼラチン、糖（例えば、スクロース、グルコース、デキストロース、デキストリン、糖蜜、ラクトース、ラクチトール、マンニトール）；天然及び合成ゴム（例えば、アカシア、アルギン酸ナトリウム、アイリッシュモスの抽出物、パンワールガム（ｐａｎｗａｒｇｕｍ）、ガティガム、イサポールハスクの粘液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、微結晶セルロース、酢酸セルロース、ポリビニルピロリドン）、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（Ｖｅｅｇｕｍ）、カラマツ（ｌａｒｃｈ　ａｒａｂｏｇａｌａｃｔａｎ）；アルギネート；ポリエチレンオキシド；ポリエチレングリコール；無機カルシウム塩；ケイ酸；ポリメタクリレート；ワックス；水；アルコール；及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０６】

例示的な防腐剤としては、酸化防止剤、キレート剤、抗菌防腐剤、抗真菌防腐剤、アルコール防腐剤、酸性防腐剤、及び他の防腐剤が挙げられ得る。例示的な酸化防止剤としては、アルファトコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビル、オレイン酸アスコルビルブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、メタ重亜硫酸カリウム、プロピオン酸、没食子

酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、及び亜硫酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なキレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、クエン酸一水和物、エデト酸二ナトリウム、エデト酸二カリウム、エデト酸、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸及びエデト酸三ナトリウムが挙げられる。

【０１０７】

例示的な緩衝剤としては、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グルセプチン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、Ｄ－グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペンタン酸、二塩基性リン酸カルシウム、リン酸、三塩基性リン酸カルシウム、水酸化リン酸カルシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、二塩基性リン酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、パイロジェンフリー水、等張食塩水、リンゲル溶液、エチルアルコール、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０８】

例示的な潤滑剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、シリカ、タルク、麦芽、グリセリルベハネート、水素化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ラウリル硫酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、及びそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０１０９】

これらすべての医薬組成物の調製は、当業者に知られている一般的な慣行に従う。

【０１１０】

本発明のハイブリッドプロモーター、コンストラクト又は細胞が、プロモーターに作動可能に連結された遺伝子を含み、前述の遺伝子が、例えば変異しているときに疾患に関連する遺伝子である場合、本発明のすべての前述の態様及びそれらのそれぞれの実施形態を医薬品として使用することができ、ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された前述の遺伝子からの機能性タンパク質の発現を可能にする。したがって、第５の態様では、本発明は、医薬品として使用するための、第１の態様で定義されるようなプロモーター、第２の態様で定義されるようなポリヌクレオチドコンストラクト、第３の態様で定義されるようなベクター若しくは第４の態様で定義されるような細胞、又はそれらの１つ以上を含む医薬組成物に関する。

【０１１１】

より特定の実施形態では、先の態様による使用のためのハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物であって、医薬品は腎疾患の予防及び／又は治療に使用するためのものである。

【０１１２】

この実施形態はまた、腎疾患を予防及び／又は治療するための医薬品を製造するための上記で定義されるようなハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物の使用として製剤化することができる。本発明はまた、ヒトを含む、腎疾患の治療及び／又は予防を必要とする対象において、治療有効量の上記に定義されるようなハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物を、薬学的に許容され得る賦形剤又は担体と共に投与することを含む、腎疾患の治療及び／又は予防のための方法に関する。

【０１１３】

より特定の実施形態では、腎疾患は、常染色体劣性ステロイド耐性ネフローゼ症候群、

常染色体優性ステロイド耐性ネフローゼ症候群、Ｄｅｎｙｓ－Ｄｒａｓｈ症候群、Ｆｒａｓｉｅｒ症候群、ＷＡＧＲ（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、泌尿生殖器異常、遅延）症候群、ピアソン症候群、Ｎａｉｌ－ｐａｔｅｌｌａ症候群、シムケ免疫骨性ジストロフィー、ステロイド耐性ネフローゼ症候群を伴うミトコンドリア障害、ファブリー病、アルポート症候群、良性家族性血液尿症（薄基底膜腎症）、フェクトナー症候群（巨大血小板減少症を伴うアルポート症候群）、平滑筋腫症及び家族性アミロイドーシスを伴うアルポート症候群、並びにＩｇＡ腎症、糖尿病性腎症及びデント病などの他の腎障害を含む糸球体遺伝性障害の１つ以上から選択される。

【０１１４】

本発明によるハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物は、非経口的に、例えば静脈内に、又は注入技術によって投与される使用のためのものである。それらのうちの１つ以上は、特定の実施形態では、溶液を血液と等張にするために、例えば他の物質、塩又はグルコースを含有する滅菌水溶液の形態で投与される。水性物は、特に緩衝化されている（好ましくは３～９のｐＨまで）。医薬組成物は、それに応じて製剤化され得る。滅菌条件下での適切な非経口製剤の調製は、当業者に周知の標準的な医薬技術によって容易に達成される。本発明によるハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物は、示される使用のためのものであり、静脈内注射などによって全身投与されるように適合されている。

【０１１５】

本発明によるハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物は、別の特定の実施形態では、示される使用に適合し、例えば腎臓への投与を標的とすることによって局所投与される。適切には、それらは、腎動脈、若しくは腎静脈への注射によって、又は尿管若しくは被膜下注射によって投与される使用のためのものである。本発明の実施形態では、ハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物は、腎動脈への注射によって投与されるべきである。本発明の代替実施形態では、それらは逆行性投与によって、例えば、尿カテーテルを使用して尿管を介して投与されるべきである。

【０１１６】

マウスの腎静脈への特定の投与のために、本発明者らは、低容量（約５０マイクロリットル）の投与を可能にする方法を提案する。この低い投与は、腎臓における細胞損傷を回避する。

【０１１７】

特定の投与方法は、門部及び尿管のクランプを含む。この場合、本発明のベクター、又は本発明のポリヌクレオチドコンストラクト、又は細胞を含む組成物、又はそれらのうちの１つ以上を含む任意の医薬組成物約５０μｌを腎静脈に注射する。特に、それは腎静脈に逆行性に注射される。マウスにおける特定の用量は、５＊１０Ｅ１０ベクターゲノム（ｖｇ）／マウス～５＊１０Ｅ１１ｖｇ／マウスである。これらの用量は、同等の尺度に従ってヒトに転用ことができる。

【０１１８】

この投与様式により、本発明者らは、構成的プロモーター（サイトメガロウイルス）を有するポリヌクレオチドコンストラクトを参照例として使用して、目的のレポーター遺伝子を投与することができた。示されるように、通常約１００μｌの注入量が５０μｌに減少した。さらに、腎臓組織に対して高い圧力の障害があったにもかかわらず、低いが有効な用量（すなわち、体積）のために、細胞損傷は観察されなかった（データは示さず）。本発明者らは、この投与様式及び構成的プロモーターにより、発現が肝臓においても効果を発揮することを検出した。これは、この投与様式によって、注射されたコンストラクト、ベクター、細胞などが体循環に入ることを証明している。これは注目に値し、なぜなら、以下の実施例でも実証されるように、本発明のハイブリッドプロモーターを有するコンストラクト、ベクター、又は細胞がポドサイトに対して高度に選択的であり、先行技術の

他のコンストラクトよりもわずかに肝細胞で発現されたためである。したがって、提案されるプロモーター及び誘導体ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター又は細胞は、全身投与された場合、所望の標的におけるそれらの組織発現に関して安全である。さらに、特定のポリアデニル化シグナルがハイブリッドプロモーターに付随するコンストラクト中にある場合、疾患細胞における発現が増強される。

【０１１９】

ハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物は、特定の実施形態では、単回用量として投与されるべきであり、換言すれば、その後の用量は必要とされない。反復用量が必要とされる場合、特定の実施形態では、異なる又は同じＡＡＶ血清型が使用される。

【０１２０】

任意選択的に、ハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物は、他の治療アプローチ、例えば特に一時的な免疫抑制療法と組み合わせて投与されるべきである。ハイブリッドプロモーター、ポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物と組み合わせて考慮すべき他の治療アプローチには、アンジオテンシン変換酵素阻害剤（ＡＣＥｉ）、アンジオテンシン受容体遮断薬（ＡＲＢ）、又はアルドステロン拮抗薬化合物（例えば、スピロノラクトン、及びフィレネノンとしての新規薬剤）などの薬剤を使用したレニン－アンジオテンシン－アルドステロン系（ＲＡＡＳ）の阻害、又は近い将来、潜在的には、タンパク質尿及び慢性腎疾患（ＣＫＤ）への進行を減少させるための、スパサルタン、ナトリウム－グルコース輸送タンパク質２（ＳＧＬＴ２）阻害剤、又は他の承認された化合物としての新しい有望な療法が含まれ得る。

【０１２１】

明細書及び特許請求の範囲を通して、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という語及びこの語の変形は、他の技術的特徴、添加剤、成分、又はステップを排除することを意図しない。さらに、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という語は、「のみからなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」の場合を包含する。本発明の追加の目的、利点及び特徴は、本明細書を検討することにより当業者に明らかになるか、又は本発明の実施によって習得され得る。以下の実施例は例示として提供され、それらは本発明を限定することを意図するものではない。さらに、本発明は、本明細書に記載の特定の好ましい実施形態のすべての可能な組み合わせを網羅する。

【実施例】

【０１２２】

実施例１．本発明のポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターを有するコンストラクトによるＧＦＰの発現及び他のポドサイト特異的プロモーターを有する先行技術のコンストラクトとの比較

レポーター緑色蛍光タンパク質を発現するための配列番号１のポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターを含む、配列番号１０（本明細書では、図１の０．３ＮＰＨＳ２－ＳＣＰ１＿ＫＧＦＰ＿ＷＰＲＥ３＿最小ＳＶ４０ｐＡ、又はハイブリッド－ＳＣＰ１－ＧＦＰとも呼ばれる）によって定義されるポリヌクレオチドコンストラクトを、ポドサイト（Ｅ１１細胞株）、ＨＥＫ２９３細胞（ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ－１１２６８）、ＨｅｐＧ２細胞（任意の市販品）、ＨｅＬａ（＃ＣＣＬ－２）及び腎近位尿細管細胞＿ＲＰＴＥＣ細胞（任意の市販品）におけるプラスミドへの挿入によって発現させた。配列番号１１（本明細書では、図１の０．２ＮＰＨＳ２－最小ＣＭＶ＿ＫＴｕｒｂｏＧＦＰ＿ＷＰＲＥ３＿最小ＳＶ４０ｐＡ又はハイブリッド－ＣＭＶ－ＧＦＰとも呼ばれる）を用いて同じ実験を行った。

【０１２３】

比較例として、同じ（プラスミド）に、配列番号１４及び配列番号１５によって定義されるポリヌクレオチドコンストラクトをロードし、これらは、いずれも配列番号１によって定義されるものとは異なるプロモーターを含む、Ｈａｒｅｎｄｚａ　ｅｔ　ａｌ．２０

０９及びＭｏｅｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．２００３によってアッセイされたコンストラクトにそれぞれ対応する。配列番号１４は、本明細書では、図１の０．８ＮＰＨＳ２＿ＫＧＦＰ＿ＷＰＲＥ３＿最小ＳＶ４０ｐＡ又はＭｉｄｉ－ＮＨＰＳ２－ＧＦＰとも呼ばれる。配列番号１５は、本明細書では、図１の２．５ＮＰＨＳ２＿ＫＧＦＰ＿ＷＰＲＥ３＿最小ＳＶ４０ｐＡ又はＦＬ－ＮＨＰＳ２－ＧＦＰとも呼ばれる）。

【０１２４】

対照として、配列番号１６（ＣＭＶ＿ＫＧＦＰ＿ＷＰＲＥ３＿最小ＳＶ４０ｐＡ又は図１ではＣＭＶ－ＧＦＰとも呼ばれる）。

【０１２５】

Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ＃Ｌ３０００００８）を使用した一過性トランスフェクションにより細胞をトランスフェクトした。細胞を、１０％ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ＃１０２７００９８）、１％ピルビン酸ナトリウム［１００ｍＭ］（Ｇｉｂｃｏ＃１１３６００３９）、１％抗生物質／抗真菌剤（Ｇｉｂｃｏ＃１５２４０－０６２）及び０．２％プラスモシン（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ＃ａｎｔ－ｍｐｐ）を添加したＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ＃４２４３００８２）中、３７℃、５％ＣＯ２、Ｔａ、ＲＨ、培養培地など）で培養し、トランスフェクションの４８時間後に発現を決定した。

【０１２６】

緑色蛍光細胞として測定された細胞中の蛍光を顕微鏡によって検出した。アッセイの１つのレプリカの蛍光顕微鏡共焦点画像を図２（Ａ）に示す。図２（Ｂ）において、グラフは、アッセイされた細胞型の各々における細胞の１視野当たりの相対蛍光（Ｒｅｌ　ＧＦＰ細胞／視野）を示す。

【０１２７】

最後に、図３には、選択された細胞株におけるＬｍｘ１ｂ転写因子及びＦｏｘｃ２転写因子の発現が示されている。

【０１２８】

この実施例からのデータは、本発明のコンストラクトでポドサイトにおけるより高い発現が起こったことを確認することを可能にする。

【０１２９】

実施例２：ルシフェラーゼコンストラクトによる本発明のポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターの発現の確認

配列番号１の本発明のプロモーターを、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を含むコンストラクトにおいて試験した。配列番号８のコンストラクトは、ポリアデニル化シグナルとして初期ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを含んでいた。

【０１３０】

アッセイにおける対照は、構成的ＣＭＶプロモーターを含む配列番号１７（ＣＭＶ＿Ｋｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ＿ＷＰＲＥ３＿最小ＳＶ４０ｐＡ）のコンストラクトであった。

【０１３１】

データが図４に示されており、ここではプロモーター及びルシフェラーゼ遺伝子の概略図が示されており、ポドサイトにおける発現が、各コンストラクトについてのポドサイトにおける相対的ルシフェラーゼユニット（ＲＬＵ）として示されている。実施例１と同様にプラスミドを用いてアッセイを行った。

【０１３２】

実施例３：疾患細胞の選択性

本発明者らは、驚くべきことに、本発明のコンストラクト中のポリアデニル化シグナルが、２つのＣＰＥを含む３’－ＵＴＲ配列及び配列ＡＡＵＡＡＡの細胞質ポリアデニル化シグナル（ＣＰＥポリＡ）であった場合、発現が維持されたストレス条件でより高かったことを見出した（すなわち、小胞体（ＥＲ）ストレス条件）。

【０１３３】

このアッセイを腎細胞株（ＨＥＫ２９３、ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ－１１２６８）を用いて行い、データは、ＳＶ４０ポリＡとして公知のポリアデニル化シグナルと比較して、ＣＰＥ

ポリＡが、長期間のストレス後のより高い発現であっても、ストレス条件下でルシフェラーゼ遺伝子の発現を可能にしたことを実証している。対照的に、ＳＶ４０ポリＡを有するコンストラクトは、発現を経時的に維持したが、より低い程度であった。

【０１３４】

これらのアッセイで使用された配列番号１のポドサイト特異的プロモーターを含むコンストラクトの２つの試験バージョンは、ポリアデニル化シグナルとして初期ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル（図５のＳＶ４０ポリＡ）を含む配列番号８のコンストラクト；及びポリアデニル化シグナルとして、ルシフェラーゼ遺伝子に対して３’位（３’－ＵＴＲ）に非翻訳配列を含み、かつ２つの細胞質ポリアデニル化エレメント（ＣＰＥ）を含む配列番号９（図５のＣＰＥポリＡ）のコンストラクトであった。

【０１３５】

コンストラクトに組み込まれたエレメントのスキームも図５に示されている。この図は、小胞体ストレス条件下（ＥＲストレス）での発現を各々示している。この図は、ＥＲストレスの時間に沿って提供されるタンパク質発現（相対的ルシフェラーゼ発現）及びｍＲＮＡレベル（相対的ｍＲＮＡ発現）のデータを含む。当業者は、ＥＲストレス条件をどのように誘導するか、並びにタンパク質及びｍＲＮＡレベルの相対発現をどのように計算するかを知っているであろう。

【０１３６】

したがって、これらのデータは、本発明のポリヌクレオチドコンストラクト中のあるエレメントが、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターと組み合わされる場合の相乗作用を示す。

【０１３７】

実施例４：ＨＥＫ２９３細胞におけるＣＲＢ２タンパク質の発現

配列番号１のポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター及びＣＲＢ２の遺伝子（ｃｏｈＣＲＢ２）を含む配列番号１８のコンストラクトを、ＨＥＫ２９３細胞のプラスミドトランスフェクションに使用した。配列番号１８（図６のハイブリッド－ＳＣＰ１－ＣＲＢ２－ＳＶ４０ｐＡとして）は、ポリアデニル化シグナルとして初期ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを含んでいた。

【０１３８】

比較例として、構成的サイトメガロウイルスプロモーター及びＣＲＢ２遺伝子を有する配列番号５のコンストラクトもトランスフェクトした。配列番号５は、ポリアデニル化シグナルとして、合成ポリアデニル化シグナル（ＳｐＡ）として公知のものを含む。空ベクターを対照として使用した。

【０１３９】

このアッセイのデータを図６に示すが、これは、配列番号１のプロモーター（又は８５％の同一性を有するもの）を使用して、Ｃｒｂ２遺伝子（３．８ｋｂの遺伝子）の発現が、強力なプロモーターとして知られている構成的ＣＭＶプロモーターを使用した発現の比率であったことを示す。

【図面】

【図１】

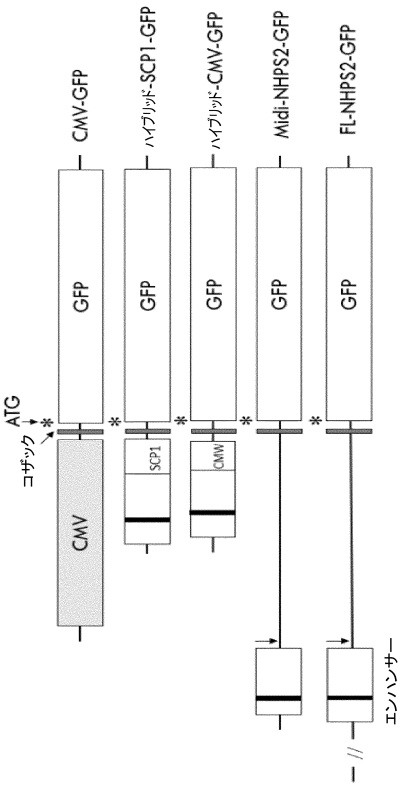


FIG. 1

【図２Ａ】

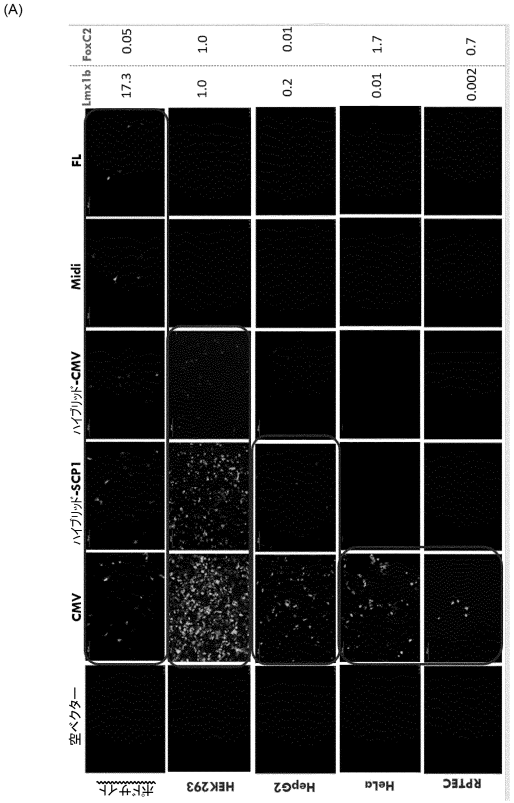
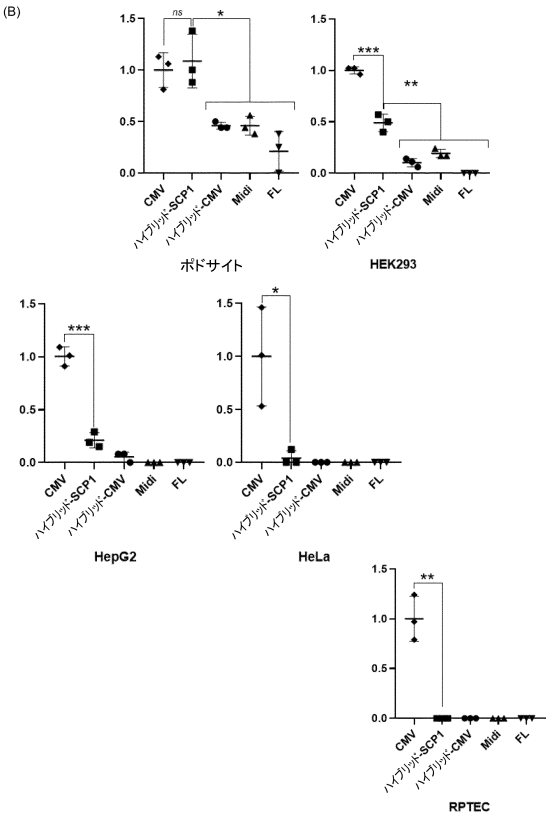


FIG. 2

【図２Ｂ】



Cont. FIG. 2

【図３】

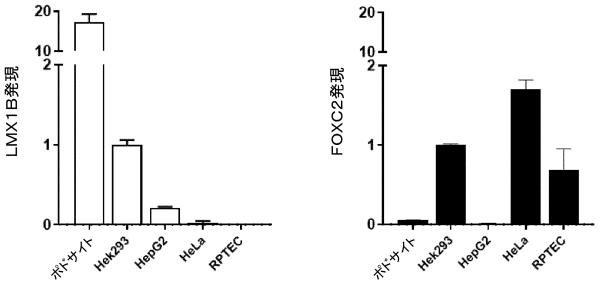


FIG. 3

【図４】

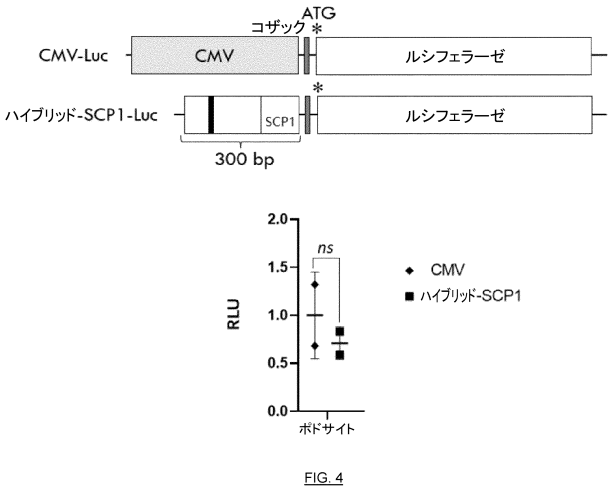


FIG. 4

【図５】

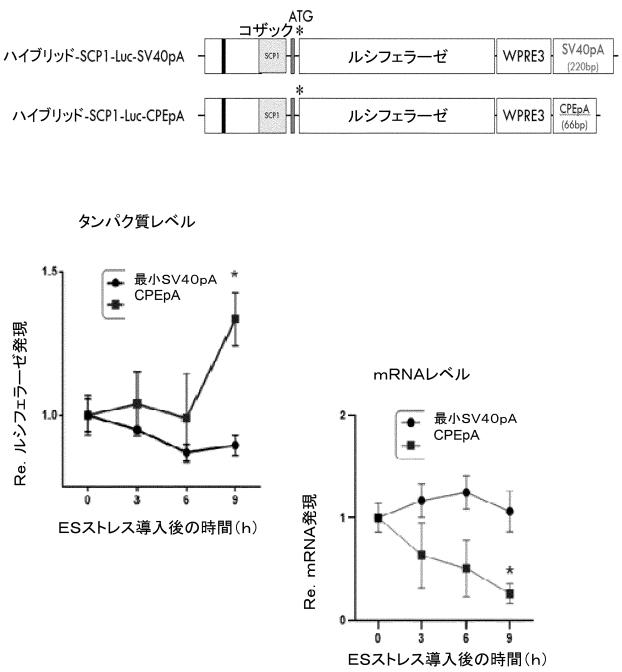


FIG. 5

【図６】

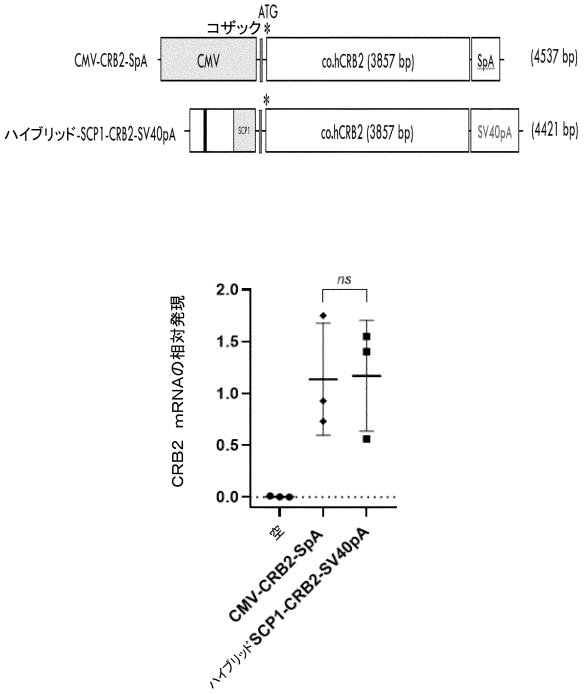


FIG. 6

【配列表】

2025515979000001.xml

【手続補正書】
【提出日】令和6年3月4日(2024.3.4)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された遺伝子からの機能性タンパク質の発現を可能にすることができるポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターであって、
（ａ）配列番号１３（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧ）を含むポドサイト特異的エンハンサー配列、又は配列番号１３と少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有する配列と、
（ｂ）コアプロモーター配列であって、
（ｂ１）配列番号２（ＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ）と８５～１００％の同一性パーセンテージを有する８１ヌクレオチド長の最小コアプロモーター配列、及び
（ｂ２）配列番号２０（ＧＧＣＧＴＴＴＡＣＴＡＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＴＣＧＴＴＴＡＧＴＧＡＡＣＣＧＴＣＡＧＡＴＣ）と８５～１００％の同一性パーセンテージを有する５６ヌクレオチド長の最小コアプロモーター
から選択されるコアプロモーター配列と
を含む、ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター。
【請求項２】
配列番号１のポリヌクレオチド配列、又は前記配列番号１（ＡＡＡＡＡＣＡＧＡＡＧＴＴＡＧＡＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＴＣＣＴＧＣＣＴＡＴＧＡＴＴＣＴＴＣＡＡＧＡＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＡＴＴＡＡＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＡＡＣＡＧＡＧＡＣＧＡＡＡＣＡＣＡＴＣＧＣＡＡＡＧＡＧＡＧＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＴＣＣＣＣＴＴＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＡＴＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＴＣＡＧＣＣＡＡＣＡＴＣＡＴＴＡＧＧＧＧＴＴＡＡＴＧＣＡＴＡＴＧＴＡＧＡＡＴＡＡＣＴＡＧＧＧＣＧＴＡＣＴＴＡＴＡＴＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＧＴＣＧＣＧＡＴＣＧＡＡＣＡＣＴＣＧＡＧＣＣＧＡＧＣＡＧＡＣＧＴＧＣＣＴＡＣＧＧＡＣＣＧ）と少なくとも８５％の同一性パーセンテージを有するヌクレオチド配列のみからなる、請求項１に記載のポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター。
【請求項３】
請求項１～２のいずれかに定義される単離されたポリヌクレオチドハイブリッドプロモーターと、前記ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された目的の遺伝子又は遺伝子の断片のヌクレオチド配列とを含むポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項４】
（ａ）ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列；
（ｂ）タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列；
（ｃ）転写後調節エレメントのヌクレオチド配列；並びに
（ｄ）５’及び３’逆方向末端反復ヌクレオチド配列
のうちの１つ以上をさらに含む、請求項３に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。

【請求項５】
５’→３’方向に、
（ｉ）５’逆方向末端反復ヌクレオチド配列と、
（ｉｉ）請求項１～２のいずれかに定義される単離されたポリヌクレオチドハイブリッドプロモーターと、
（ｉｉｉ）タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列と、
（ｉｖ）目的の遺伝子又は遺伝子の断片のヌクレオチド配列と、
（ｖ）転写後調節エレメントのヌクレオチド配列と、
（ｖｉ）ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列と、
（ｖｉｉ）３’逆方向末端反復ヌクレオチド配列と
を含む、請求項３又は４のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項６】
前記タンパク質翻訳開始部位コンセンサスヌクレオチド配列がコザックコンセンサス配列である、請求項３～５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項７】
前記転写後調節エレメントのヌクレオチド配列が、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）である、請求項３～６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項８】
前記ポリアデニル化シグナルヌクレオチド配列が、ウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）ポリアデニル化シグナル、初期ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル、合成ポリアデニル化シグナル（ＳｐＡ）、及び５０ヌクレオチド未満だけ離れている少なくとも２つの細胞質ポリアデニル化エレメントと、第１又は第２の細胞質ポリアデニル化エレメントから１００ヌクレオチド未満だけ離れている細胞質ポリアデニル化シグナルとを含む目的の遺伝子又は遺伝子の断片のポリヌクレオチド配列に対して３’位（３’－ＵＴＲ）の非翻訳配列から選択される、請求項３～７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項９】
前記ポドサイト特異的ハイブリッドプロモーターに作動可能に連結された前記目的の遺伝子が、
－１つ以上の腎疾患に関連する遺伝子、及び／又は
－最大４．０～５．０キロベース（ｋｂ）の長さを有する遺伝子
から選択される、請求項３～８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドコンストラクト。
【請求項１０】
請求項１若しくは２のいずれかに定義されるポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター、又は請求項３～９のいずれか一項に定義されるポリヌクレオチドコンストラクトを含むベクター。
【請求項１１】
特に血清型ＡＡＶ１９、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ－ＬＫ０３、ＡＡＶ－ＤＪ及びＡＡＶ－ＤＪ／８のうちの１つ以上から選択される、腎細胞及びポドサイトに対する指向性を有するアデノ随伴ウイルスベクター（ＡＡＶ）である、請求項１０に記載のベクター。
【請求項１２】
請求項１若しくは２のいずれかに定義されるポドサイト特異的ハイブリッドプロモーター、又は請求項３～９のいずれかに記載のポリヌクレオチドコンストラクト、又は請求項１０～１１のいずれかに記載のベクターを含む細胞。
【請求項１３】
治療有効量の請求項３～９のいずれかに記載のポリヌクレオチドコンストラクト、請求項１０～１１のいずれかに記載のベクター又は請求項１２に記載の細胞を、１つ以上の薬学的に許容され得る賦形剤及び／又は担体と一緒に含む医薬組成物。

【請求項１４】
医薬品として使用するための、請求項３～９のいずれかに定義されるポリヌクレオチドコンストラクト、請求項１０～１１のいずれかに定義されるベクター、又は請求項１２に定義される細胞、又は請求項１３に定義される医薬組成物。
【請求項１５】
腎疾患の予防及び／又は治療に使用するための、請求項１４に記載の使用のためのポリヌクレオチドコンストラクト、ベクター、細胞又は医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/061388

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

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

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HE BING ET AL: "Lmx1b and FoxC Combinatorially Regulate Podocin Expression in Podocytes", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY , vol. 25, no. 12 1 December 2014 (2014-12-01), pages 2764-2777, XP055971796, US ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1681/ASN.2012080823 Retrieved from the Internet: URL:https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/25/12/2764.full.pdf?with-ds=yes the whole document ----- -/--	1-15

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 July 2023	01/08/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Brenz Verca, Stefano

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061388

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARENDZA SIGRID ET AL: "The transcriptional regulation of Podocin (NPHS2) by Lmx1b and a promoter single nucleotide polymorphism", CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS, UNIVERSITY OF WROCAW. INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY, WROCAW; PL, PL, vol. 14, no. 4, 27 June 2009 (2009-06-27), pages 679-691, XP035994588, ISSN: 1425-8153, DOI: 10.2478/S11658-009-0026-0 [retrieved on 2009-06-27] the whole document -----	1-15
A	JUVEN-GERSHON TAMAR ET AL: "Rational design of a super core promoter that enhances gene expression", NATURE METHODS , vol. 3, no. 11 23 October 2006 (2006-10-23), pages 917-922, XP055971533, New York ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth937 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/nmeth937 cited in the application the whole document -----	1-15
A	WO 2020/150832 A1 (VALORISATION HSJ LP [CA]) 30 July 2020 (2020-07-30) claims 16,17; sequence 6 -----	1,3-15
A	WO 2021/181118 A1 (UNIV BRISTOL [GB]; SYNCONA INVESTMENT MAN LIMITED [GB]) 16 September 2021 (2021-09-16) cited in the application see the whole document, in particular the cited passages; claims 5,9,10,12,15; sequence 11 -----	1-15
A	M. J. MOELLER ET AL: "Two Gene Fragments that Direct Podocyte-Specific Expression in Transgenic Mice", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 13, no. 6, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 1561-1567, XP055756377, US ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1097/01.ASN.0000015614.68893.0B the whole document -/--	1-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061388

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& DATABASE EMBL [Online] 4 September 2002 (2002-09-04), "Homo sapiens podocin (NPHS2) gene, promoter region and partial cds.", XP055971782, retrieved from EBI accession no. EMBL:AF487463 Database accession no. AF487463 sequence -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/061388

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020150832 A1	30-07-2020	AU 2020212683 A1	12-08-2021
		CA 3125921 A1	30-07-2020
		CN 113366109 A	07-09-2021
		EP 3914719 A1	01-12-2021
		IL 285047 A	30-09-2021
		JP 2022519195 A	22-03-2022
		KR 20210120019 A	06-10-2021
		US 2022042041 A1	10-02-2022
		WO 2020150832 A1	30-07-2020
WO 2021181118 A1	16-09-2021	AU 2021234169 A1	06-10-2022
		BR 112022018036 A2	01-11-2022
		CA 3171232 A1	16-09-2021
		CN 115427578 A	02-12-2022
		EP 4118216 A1	18-01-2023
		IL 296255 A	01-11-2022
		JP 2023517934 A	27-04-2023
		WO 2021181118 A1	16-09-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ａ６１Ｐ	*13/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｋ	*35/12 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12	

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

セルカ イ エストゥディス アバンカツ （アイシーアールイーエー）
スペイン国 イー－０８０１０ バルセロナ パセイグ リュイス コンパニス ２３
(71)出願人 524403914
ニネバ セラピューティクス エセエレ
スペイン国 ０８０２８ バルセロナ カレール バルディリ レシャク ４ パルク シエンティフィック デ バルセロナ
(74)代理人 110000796
弁理士法人三枝国際特許事務所
(72)発明者 メセゲル ナバルロ アンナ
スペイン国 ０８０３５ バルセロナ パセイグ バル デブロン １１９－１２９
(72)発明者 チヨン ロドリゲス ミゲル
スペイン国 ０８１９３ バルセロナ パセイグ バル デブロン １１９－１２９
(72)発明者 アレバロ バウティスタ ジャズミン パオラ
スペイン国 ０８０３５ バルセロナ パセイグ バル デブロン １１９－１２９
(72)発明者 フェルナンデス－ミランダ ゴンサロ
スペイン国 ０８０２８ バルセロナ カレール バルディリ レシャク ４ パルク シエンティフィック デ バルセロナ ニネバ セラピューティクス エセエレ
(72)発明者 ラミス カステルトルト マルク
スペイン国 ０８０２８ バルセロナ カレール バルディリ レシャク ４ パルク シエンティフィック デ バルセロナ ニネバ セラピューティクス エセエレ

Ｆターム（参考） 4B065 AA91X AA93X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA13 NA14 ZA81
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 NA14 ZA81